

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Farmacologia

**Efeitos cardiovasculares da microinjeção de  
noradrenalina no núcleo leito da estria  
terminal do cérebro de rato.**

Carlos César Crestani

Ribeirão Preto

2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Farmacologia

# **Efeitos cardiovasculares da microinjeção de noradrenalina no núcleo leito da estria terminal do cérebro de rato.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre, pelo curso de Pós-graduação em Ciências, Área de concentração: Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa**

Ribeirão Preto

2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto/USP

Crestani, Carlos Cesar.

Efeitos cardiovasculares da microinjeção de noradrenalina no núcleo leito da estria terminal do cérebro de rato. Ribeirão Preto, 2006.

95p.: ; 31cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Corrêa, Fernando Morgan de Aguiar

1. noradrenalina. 2. pressão arterial. 3. frequência cardíaca. 4. Núcleo leito da estria terminal.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Carlos César Crestani

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre, pelo curso de Pós-graduação em Ciências.  
Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Banca Examinadora**

Profº. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa

Instituição: FMRP-USP      Assinatura: \_\_\_\_\_

Profº Dr. Benedito Honório Machado

Instituição: FMRP-USP      Assinatura: \_\_\_\_\_

Profª. Dra. Marli Cardoso Martins-Pinge

Instituição: UEL-PR      Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dedico,**

*À minha família:*

*- minha mãe Regina, por toda dedicação, carinho e atenção incondicional. Mas principalmente, por segurar as pontas nos momentos mais difíceis, e possibilitar que eu me tornasse o que eu sou hoje.*

*- meu pai José Carlos, pelo "paitrocínio" e por toda força e apoio, me incentivando a seguir a carreira da docência e da pesquisa. Também por me ensinar que a honestidade e a dedicação são as maiores virtudes de uma pessoa.*

*- minha namorada Néia, por me agüentar e me ajudar com seus conselhos nos dias de estresse e dificuldade. E principalmente por todo carinho, amor e paciência, e por me ensinar a ser uma pessoa mais humana e acreditar na fé.*

*- meu irmão Eduardo, por toda torcida e apoio.*

*A DEUS, por ter colocado cada uma dessas pessoas na minha vida, sem às quais teria sido impossível chegar até aqui.*

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa, por me acolher em seu laboratório. Por toda atenção e paciência, e por me ensinar a “fazer ciência” de modo tão brilhante, tendo papel fundamental na minha formação e na conclusão deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Norberto Cysne Coimbra e Maria Cristina de Oliveira Salgado pela acessoria.

Aos membros da banca examinadora:

- Prof<sup>o</sup>. Dr. Benedito Honório Machado por se dispor em participar da banca, e pela sugestões que contribuíram para melhoria deste trabalho;

- Prof<sup>a</sup>. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge, por aceitar participar da banca, se deslocando de Londrina-PR até Ribeirão Preto-SP, e pelas sugestões que muito contribuíram para melhoria do trabalho. Mas principalmente por ser a responsável pela minha inserção no meio científico, contribuindo e acompanhando toda minha formação científica.

A Ivanilda A.C. Fortunato pelo cuidado com a preparação dos cortes histológicos e Idália I.B. Aguiar pela assistência técnica na realização dos procedimentos cirúrgicos.

A Simone S. Guilhaume, pela, atenção, disponibilidade e ensinamentos.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório:

- Fernando Alves por ter sido meu grande companheiro na pós-graduação, sendo um grande parceiro dent

- Leonardo Resstel pelos ensinamentos que muito tem contribuído em minha formação, pelos auxílios, pelas colaborações, e principalmente pela amizade dentro e fora do laboratório.
- Rodrigo Tavares pela paciência em me ajudar nos momentos de dificuldade;
- Gislaine Pelosi pela ajuda quando entrei no laboratório;
- Milenena Deolindo, pela amizade dentro e fora do laboratório;
- Ao Daniel Reis, América Scopinho, Eduardo Fortaleza, por me proporcionarem momentos agradáveis e me ajudarem sempre que necessitei.

Aos funcionários Sônia Andrade, José Waldik Ramon e Fátima Petean, por toda competência, disponibilidade e atenção com que atendem as nossas necessidades burocráticas.

Às “tias” Eliana e Mao cráticas.

Aos amigos Daniel Zoccal e Daniel Penteado do departamento de fisiologia, que tem sido grandes amigos desde a iniciação científica.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES e a FAEPA, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

## **RESUMO**

O núcleo leito da estria terminal (NLET) é envolvido no controle do sistema cardiovascular. Nosso objetivo neste estudo foi verificar os efeitos cardiovasculares da microinjeção de noradrenalina (NA) no NLET, e identificar os possíveis mecanismos periféricos envolvidos. A microinjeção de NA no NLET causou resposta pressora e bradicárdica dose dependente em ratos não-anestesiados. Estas respostas foram significativamente reduzidas em ratos anestesiados com uretana, inviabilizando o uso de animais anestesiados no estudo. Nenhuma resposta foi observada quando NA foi microinjetada em áreas adjacentes ao NLET, tais como a comissura anterior, a cápsula interna e a estria terminal, indicando um predomínio de efeito no NLET. A resposta pressora à NA foi potencializada pelo pré-tratamento sistêmico com o bloqueador ganglionar pentolínio, excluindo a possibilidade de uma mediação simpática da resposta. A resposta bradicárdica foi inibida, sugerindo ser uma resposta barorreflexa vagal, conseqüente ao aumento da PAM. As respostas cardiovasculares observadas após a microinjeção de NA no NLET foram bloqueadas pela injeção endovenosa de dTir(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP, um antagonista vasopressinérgico, sugerindo o envolvimento da liberação sistêmica de vasopressina nestas respostas. Em suma, os presentes resultados indicam que a microinjeção de NA no NLET causa resposta pressora mediada pela liberação sistêmica de vasopressina, e são acompanhadas de bradicardia reflexa.

## **ABSTRACT**

The bed nucleus of stria terminalis (BST) is involved in central cardiovascular control. In the present study, we studied the cardiovascular effects of microinjections of noradrenaline (NA) into the BST of rats and the peripheral mechanisms involved in their mediation. Injection of NA into the BST of unanaesthetized rats caused dose-related pressor and bradycardic responses. The responses to NA were markedly reduced in urethane-anaesthetized rats. No responses were observed when NA was microinjected into surrounding structures such as the anterior commissure, stria terminalis and internal capsule, indicating a predominant action on the BST. The pressor response was potentiated by i.v. pretreatment with the ganglion blocker pentolinium and blocked by i.v. pretreatment with the vasopressin antagonist dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP, suggesting that vasopressin release is mediating the cardiovascular responses of the NA. In conclusion, the results suggest that activation of noradrenergic receptors within the BST can evoke pressor responses, which are mediated by acute vasopressin release.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Efeito da microinjeção de diferentes doses de noradrenalina (NA, n=29) ou veículo (V, n=5) no NLET de ratos não anestesiados sobre a pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e a frequência cardíaca ( $\Delta$ FC). As concentrações injetadas foram: 3, 7, 10, 15, 30 e 45 nmol. .... 35

Figura 2 - (Esquerda) Variação máxima da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) após administração de 10 nmol/100 nL de NA no NLET de ratos não-anestesiados (coluna branca, n=5) e anestesiados com uretana (coluna preta, n=5). As colunas representam as médias  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ , teste *t* de Student. (Direita) Variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo após administração de 10 nmol/100 nL de NA no NLET de ratos não-anestesiados (círculos abertos, n=5) e anestesiados (círculos fechados, n=5) por uretana. Os círculos representam a média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida por teste de Bonferroni. .... 37

Figura 3 – Traçados da pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC), mostrando o efeito da microinjeção de NA (10 nmol/100NI) no NLET no animal não anestesiado e anestesiado com uretana..... 38

Figure 4 – Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após microinjeção de noradrenalina (NA) em áreas circunvizinhas ao NLET de ratos não-anestesiados. .... 39

Figura 5 – Representação diagramática dos sítios de injeção de noradrenalina (NA) na cápsula interna (ci, círculos fechados), comissura anterior (ca, círculos abertos), e estria terminal (et, quadrados fechados). Coordenadas baseadas no Atlas de Paxinos & Watson (1997). NLET: Núcleo Leito da Estria Terminal (área cinza); f: fornix; ASL: Área Septal Lateral; IA: interaural. .... 40

Figura 6 - Variação máxima da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) após administração de 10 nmol/100 nL de NA no NLET medial (coluna branca, n=8), lateral (coluna preta, n=7) e ventral (coluna com listas horizontais, n=4). As colunas representam as médias  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ , ANOVA de uma via seguida por teste de Bonferroni. .... 42

Figura 7 - Representação Diagramática dos sítios de injeção de NA no NLET medial (círculos abertos), lateral (círculos fechados) ou ventral (quadrados abertos). Modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1997). IA – interaural, VL – ventrículo lateral, SH – septohipotalâmico, ci – cápsula interna, ca – comissura anterior, PS – núcleo paraestrial, 3V – terceiro ventrículo, et – estria terminal.43

Figura 8 - Variação máxima da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) após administração de 10 nmol/100 nL de NA no NLET de ratos não-anestesiados antes (coluna branca) e após (colunas pretas) tratamento

com salina (n=4), dTir (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me) AVP (d-Tyr, n=5), ou pentolínio (n=5) no NLET. As colunas representam as médias  $\pm$  EPM, \* p < 0,05, teste t de Student.....46

Figura 9 - (Esquerda) Variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo após administração de 10 nmol/100 nL de NA no NLET de ratos não-anestesiados antes (círculos abertos, n=5) e após (círculos fechados, n=5) tratamento com dTir (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me) AVP (d-Tyr, n=5). Os círculos representam a média  $\pm$  EPM, \* p < 0,05, ANOVA de duas vias seguida por teste de Bonferroni. (Direita) Variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo após administração de 10 nmol/100 nL de NA no NLET de ratos não-anestesiados antes (círculos abertos, n=5) e após (círculos fechados, n=5) tratamento com pentolínio (n=5). Os círculos representam a média  $\pm$  EPM, \* p < 0,05, ANOVA de duas vias seguida por teste de Bonferroni. .... 47

Figura 10 – Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) microinjeção de noradrenalina (NA, 10 nmol/100nL) no NLET, registrados antes e após pré-tratamento com bloqueador ganglionar pentolínio (5mg/Kg), em ratos não anestesiados. As colunas representam as médias  $\pm$  EPM. ANOVA de uma via seguida por teste de Bonferroni. \* p < 0,05 comparando basal vs após NA, # p < 0,05 comparando basal antes e após tratamento com pentolínio e \*\* p < 0,05 comparando após NA antes e após tratamento com pentolínio. ns: não significativo. .... 48

Figura 11 - Representação Diagramática dos sítios de injeção de NA no NLET, modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1997). IA – interaural, VL – ventrículo lateral, SH – septohipotalâmico, ci – cápsula interna, ca – comissura anterior, PS – núcleo paraestrial, 3V – terceiro ventrículo, et – estria terminal.50

Figura 12 - Fotomicrografia de um corte histológico de um cérebro de rato representando o sítio de injeção de NA no NLET. .... 50

## Índice

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
3.1. Animais .....	23
3.2. Técnica de implante de cânulas guia .....	23
3.3. Canulação da artéria e veia femorais .....	24
3.4. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	25
3.5. Microinjeção de drogas no NLET .....	26
3.6. Drogas utilizadas .....	26
3.7. Determinação anatômica dos sítios de injeção de droga.....	27
3.8. Análise estatística .....	27
<b>4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>29</b>
4.1. Efeitos cardiovasculares da administração de diferentes doses de NA no NLET de ratos não anestesiados sobre a pressão arterial e frequência cardíaca. ....	30
4.2. Alterações cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no NLET de ratos não anestesiados ou anestesiados por uretana.....	30
4.3. Alterações cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no NLET de ratos pré-tratados com pentolínio.....	31
4.4. Alterações cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no NLET de ratos pré-tratados com dTir(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> (Me)AVP.....	31
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
5.1. Respostas cardiovasculares após microinjeção de NA no NLET de ratos não anestesiados.....	33
5.2. Efeito da anestesia com uretana sobre as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no NLET.....	35

5.3. Respostas cardiovasculares após microinjeção de NA em áreas adjacentes ao NLET .....	38
5.4. Respostas cardiovasculares após microinjeção de NA no NLET medial,lateral e ventral .....	41
5.5. Efeito do pré-tratamento endovenoso com salina, pentolínio ou dTir(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> (Me)AVP nas respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no NLET .....	44
Salina .....	44
Pentolínio .....	44
dTir(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> (Me)AVP .....	49
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>69</b>

# 1. INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular desempenha um papel fundamental na homeostase do meio interno, garantindo uma perfusão sanguínea adequada a órgãos e tecidos, possibilitando assim o fornecimento de nutrientes e oxigênio e a excreção de metabólitos e gás carbônico.

A regulação central do sistema cardiovascular envolve centros bulbares, tais como o núcleo do trato solitário (NTS), o núcleo caudalventrolateral (CVLM), o núcleo rostroventrolateral (RVLM), e o núcleo ambíguo (NA) (SPYER, 1994). Os neurônios do NTS constituem a terminação das aferências cardiovasculares e cardiopulmonares (JORDAN & SPYER, 1986); no RVLM estão presentes os neurônios pré-motores simpáticos (BARMAN & GEBBER, 1985; MCALLEN, 1985; DAMPNEY, 1994) e no NA estão localizados os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos (MCALLEN & SPYER, 1976). Estes núcleos estão envolvidos em mecanismos reflexos de controle do sistema cardiovascular tais como o barorreflexo, o quimiorreflexo e o reflexo cardiopulmonar, os quais garantem a manutenção da pressão arterial em uma estreita faixa de variação (GOLDSTEIN, 1991).

Além dos centros bulbares, centros supra-bulbares também estão envolvidos no controle cardiovascular, tais como a substância cinzenta periaquedutal, a amígdala, regiões do córtex cerebral, o hipotálamo, a área septal, e o núcleo leito da estria terminal (DAMPNEY, 1994; GELSEMA et al, 1987).

O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura límbica, localizada no prosencéfalo rostral, adjacente à comissura anterior. O NLET possui três subdivisões principais: medial, lateral e ventral (PAXINOS & WATSON, 1997; MOGA et al, 1989)

O NLET está associado a funções neuroendócrinas, comportamentais e autonômicas (DUNN, 1987; CASADA & DAJNY, 1991; DUNN & WILLIAMS, 1995).

Estimulação elétrica do NLET causa respostas neuroendócrinas (DUNN, 1987) e comportamentais (CASADA & DAJNY, 1991), similares àquelas obtidas em situações de estresse. Ao contrário, lesões do NLET reduzem as respostas neuroendócrinas (GRAY et al, 1993) e comportamentais desencadeadas pelo estresse (HAMMACK et al, 2004).

O NLET também foi demonstrado participar do controle do sistema cardiovascular. Estimulação elétrica do NLET desencadeou tanto respostas pressoras quanto depressoras em ratos anestesiados (DUNN & WILLIAMS, 1995). Além disso, estimulação química com aminoácidos excitatórios também causou respostas pressoras e depressoras (GELSEMA & CALARESU, 1987; CIRIELO & JANSSEN, 1993; GELSEMA et al, 1993; JANSSEN & CIRIELO, 1990.). Dados prévios de nosso laboratório mostraram o envolvimento do NLET na modulação do barorreflexo (CRESTANI et al, 2006).

A noradrenalina (NA) é um dos mediadores no sistema nervoso central (SNC) envolvidos no controle do sistema cardiovascular. Foram observadas respostas cardiovasculares após a microinjeção de NA em regiões do cérebro conhecidas por modular o sistema cardiovascular, tais como o NTS (ZANDBERG et al, 1979), a área septal (PIROLA et al, 1987), a amígdala (OHTA et al, 1991), o núcleo paraventricular (PVN; HARLAND et al, 1989), o hipotálamo anterior (POOLE, 1983), o hipotálamo medial e o lateral (CAMARGO et al, 1979), bem como o hipotálamo posterior (BREZENOFF & JENDEN, 1969).

Terminações noradrenérgicas foram encontradas no NLET (MOORE, 1978; PHELIX et al, 1992). Estas terminações são provenientes de neurônios localizados nos núcleos A1 (WOULFE et al, 1988) e A5 (BYRUM & GUYENET, 1987) do tronco cerebral, e no locus coeruleus (MOORE & CARD, 1984).

Confirmando a presença de terminações noradrenérgica no NLET, foi observado que a estimulação elétrica do NLET causa liberação local de NA (PALIJ & STAMFOR; 1993), e constatou-se a presença de mecanismos controladores dos níveis extracelulares de NA, como a recaptação neuronal (PALIJ & STAMFOR, 1992; FORRAY et al, 1997), e autoreceptores alpha-1 (FORRAY et al, 1999) e alpha-2 (PALIJ & STAMFOR, 1993, FORRAY et al, 1997). Além disso, observou-se *in vitro* (SAWADA & YAMAMOTO, 1981) e *in vivo* (CASADA & DAFNY, 1993) que a NA ao agir em neurônios do NLET desencadeia potencial pós-sináptico inibitório.

Funcionalmente, o sistema noradrenérgico no NLET tem sido demonstrado mediar respostas desencadeadas pelo estresse. Foi demonstrado que ratos submetidos ao estresse de restrição apresentam aumento na concentração de noradrenalina do NLET (PACAK et al, 1995). Além disso, utilizando o mesmo modelo de estudo foi observada redução nas respostas comportamentais e neuroendócrinas após bloqueio farmacológico de receptores noradrenérgicos nesta área (CECCHI et al, 2002).

Entretanto, não existem dados relacionando a neurotransmissão noradrenérgica do NLET com o controle cardiovascular. Apesar disso, a demonstração da mediação das respostas desencadeadas pelo estresse pelo sistema noradrenérgico do NLET reforça a possibilidade da

sua participação no controle do sistema cardiovascular, uma vez que durante o estresse são observadas alterações cardiovasculares (SCHADT & HASSER, 1998). Além disso, a NA se mostrou um importante mediador no controle cardiovascular exercido por outras áreas do SNC. Assim, tornou-se relevante avaliar a participação da neurotransmissão noradrenérgica no NLET sobre o sistema cardiovascular.

Diante disso, a hipótese do presente estudo é que a microinjeção de NA no NLET cause alterações cardiovasculares.

## 2. OBJETIVOS

- 1) Estudar o efeito da microinjeção de noradrenalina no NLET sobre a pressão arterial e frequência cardíaca, em ratos anestesiados e não anestesiados;
  
- 2) Verificar os mecanismos periféricos envolvidos na efetuação das respostas cardiovasculares à estimulação química do NLET pela noradrenalina.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos, de peso corporal variando entre 230-270g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto, e foram mantidos em caixas individuais, com acesso livre a ração granulada e água, e submetidos à alternância de luz (12 h claro/12 h escuro).

Todos os protocolos passaram por aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Processo: 090/2006).

### **3.2. Técnica de implante de cânula guia no NLET**

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (Aldrich Chemical Co. Inc.) na dose de 250 mg/Kg por via intraperitoneal. Após a tricotomia, a cabeça do rato foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, EUA), e foi realizada assepsia do campo cirúrgico com álcool a 70%. Para redução do sangramento durante a cirurgia, foi injetado 0,3 mL de solução de lidocaína com vasoconstritor (3% de levoarterenol, Harvey Química Farmacêutica Ind. e Comércio Ltda, Catanduva, SP). A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se completamente o periósteo. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada a 10%. Todas as coordenadas tiveram como referência os parâmetros obtidos do Atlas de Cérebro de Rato de Paxinos e Watson (1997), ajustados ao peso corporal do animal (BORGES,1999). O bregma foi utilizado como ponto de referência para a coordenada lateral.

### **NLET unilateral**

Antero-posterior: +7,7 mm em relação a interaural;

Lateral: + 4 mm a partir do bregma;

Vertical: -5,8 mm em relação ao osso;

Incisivo = 3,2.

Após o posicionamento da cânula de aço inoxidável, foi feito um orifício no crânio com auxílio de broca odontológica, por onde foi introduzida a cânula constituída por um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,6 mm, 23 gauge), com 13 mm de comprimento. A cânula foi fixada ao crânio com uma resina acrílica autopolimerisável (Simplex, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ) e pequenos parafusos foram previamente implantados na calota craniana. Um mandril com 0,2 mm de diâmetro externo foi introduzido na cânula, evitando a obstrução da mesma durante o período de recuperação do animal. Como medida profilática, ao final da cirurgia o animal recebeu 0,2 mL de pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular.

### **3.3. Canulação da artéria e veia femorais**

Quarenta e oito horas após a implantação das cânulas guias no NLET, os animais foram anestesiados novamente com tribromoetanol (Aldrich Chemical Co. Inc.) na dose de 250 mg/Kg por via intraperitoneal e foram

implantados cateteres na artéria e veia femorais. Estes vasos foram dissecados e cateteres de polietileno foram introduzidos até a artéria aorta abdominal inferior ou veia cava, respectivamente. Os cateteres eram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal.

Após implantação dos cateteres, os mesmos foram exteriorizados na região dorsal do animal através de um trocater e fixados à pele por sutura cirúrgica.

O cateter arterial foi utilizado para registro da pressão arterial e o cateter venoso para injeção de drogas. O registro da pressão arterial foi realizado pelo menos 24 h após o procedimento cirúrgico para implantação do cateter na artéria femoral, permitindo a recuperação dos animais dos efeitos anestésicos. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro da pressão arterial.

#### **3.4. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca**

Antes do início dos registros, 0,1 mL de solução salina com heparina (15 U/mL) foi injetada no interior dos cateteres, evitando obstruções. O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão arterial Hewlett Packard por um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial e frequência cardíaca foram registradas através de um pré-amplificador HP7754-A (Hewlett Packard, EUA) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (Biopac, EUA).

Os registros foram iniciados após um período de 15 min para adaptação dos animais às condições de som e iluminação do laboratório, e mais 15 min de registros basais foram realizados antes de iniciar os experimentos.

### **3.5. Microinjeção de drogas no NLET**

A NA foi dissolvida em líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) e foi injetado diretamente no NLET no volume de 100nL. Para realização das microinjeções foi utilizada uma seringa de 2  $\mu$ L (Hamilton, EUA) conectada a um tubo de polietileno (PE-10) e uma agulha injetora (0,25 mm de diâmetro externo). A agulha injetora era 1 mm mais longa do que a cânula guia fixada ao crânio.

### **3.6. Drogas utilizadas**

- Cloreto de noradrenalina (SIGMA, EUA)
- Pentolínio, bloqueador ganglionar (Sigma, EUA)
- dTir(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP, antagonista de receptores V<sub>1</sub> vasopressinérgicos (Peninsula, EUA)
- Veículo – líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) (NaCl 100mM; Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2mM; KCl 2,5mM; MgCl<sub>2</sub> 1,0mM; NaHCO<sub>3</sub> 27mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5mM; pH=7,4).
- Tribromoetanol(SIGMA, EUA)
- Uretana (SIGMA, EUA)
- Pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, Brasil)

### **3.7. Determinação anatômica do sítio de injeção da droga**

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana na dose de 1,2 g/kg por via intraperitoneal, antes do início da perfusão. Foi injetado o corante azul de Evans a 1% no local da microinjeção da droga, para determinação do sítio de injeção. Em seguida, os ratos foram submetidos à abertura da caixa torácica para exposição do coração. Para facilitar a perfusão cerebral, a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática. Uma incisão foi feita na aurícula direita para o escoamento do sangue e do perfusado, e uma agulha para perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo. A perfusão foi realizada inicialmente com 20 mL de solução fisiológica de NaCl 0,9%, seguida por 20 mL de solução tamponada de formalina a 10%.

Posteriormente, os cérebros foram retirados da caixa craniana e foram pós-fixados em solução de perfusão. Os cérebros foram seccionados com o auxílio de um criostato. Foram feitas várias secções da área do NLET, coradas com vermelho neutro a 1% e analisadas utilizando-se o Atlas de Paxinos e Watson (1997), como referência.

### **3.8. Análise estatística**

Análise de regressão não-linear foi utilizada para comparar os efeitos da administração das diferentes doses de NA no NLET sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca. Respostas máximas de PAM e FC foram comparadas utilizando o teste *t* de Student (antes do tratamento vs após

tratamento). ANOVA de duas vias (tratamento vs tempo) seguida do pós-teste de Bonferroni foi utilizada para comparar os efeitos da NA no NLET sobre a PAM e FC antes e após o tratamento. Valores de  $p < 0.05$  foram assumidos como sendo estatisticamente significativos.

## 4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula guia direcionada ao NLET e mantidos em recuperação por 48 h. O experimento foi realizado 24 h após a colocação do cateter na artéria femoral. Os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação por 15 min antes do experimento. Os experimentos foram realizados com os animais em livre movimentação, e a NA foi administrada após estabilização da pressão arterial.

#### **4.1. Efeitos cardiovasculares da administração de diferentes doses de NA no NLET de ratos não anestesiados sobre a pressão arterial e frequência cardíaca (curva dose-resposta).**

Este experimento teve por objetivo verificar as alterações cardiovasculares causadas pela microinjeção de diferentes doses de NA no NLET e estimar a dose que promove 50% do efeito (EC50) para ser utilizada nos experimentos subsequentes. Para tanto, a NA foi injetada no NLET nas doses de 3, 7, 10, 15, 30 e 45 nmol/100nL. Cada animal recebeu uma ou duas doses de NA, mantendo-se intervalo de 24h entre cada injeção, a fim de evitar o fenômeno de taquifilaxia.

#### **4.2. Alterações cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no NLET de ratos não anestesiados ou anestesiados por uretana**

Este experimento teve por objetivo verificar o efeito da anestesia por uretana sobre o padrão da resposta desencadeada pela injeção de NA no NLET. Os experimentos foram realizados em dois dias. No primeiro dia os animais receberam uma microinjeção de NA (10nmol/ 100 nL) no NLET.

Após 24 horas os animais foram anestesiados com uretana (1,2g/kg) e, uma hora depois receberam novamente a microinjeção de NA no NLET.

#### **4.3. Alterações cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no NLET de ratos pré-tratados com pentolínio.**

Este experimento teve por objetivo verificar o possível envolvimento do sistema nervoso simpático na mediação da resposta a microinjeção de NA no NLET. Os experimentos foram realizados em dois dias. No primeiro dia os animais receberam uma microinjeção de noradrenalina (10 nmol/100nL) no NLET. Após 24 h a NA foi microinjetada 15 min após a administração endovenosa de pentolínio (5mg/kg).

#### **4.4. Alterações cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no NLET de ratos pré-tratados com dTir(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP**

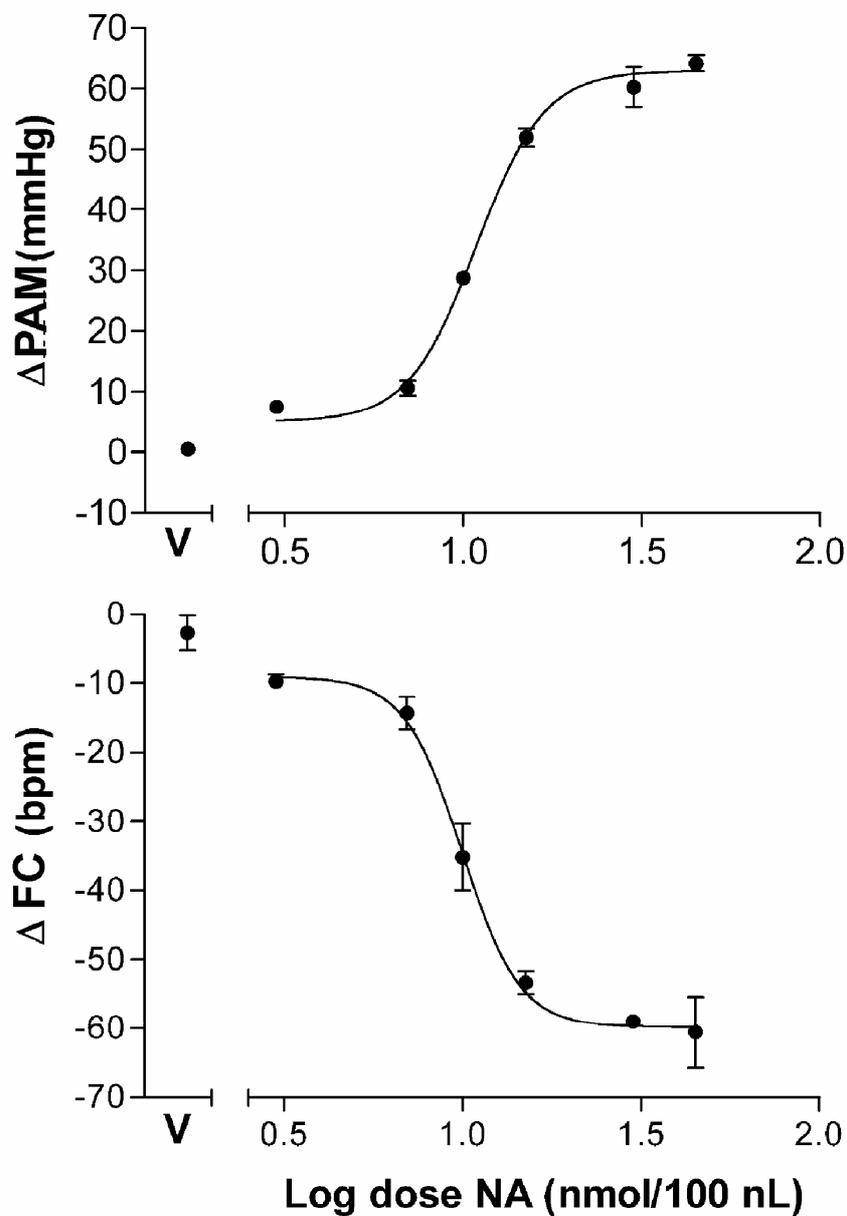
Neste experimento estudamos o possível envolvimento do mecanismo vasopressinérgico humoral na mediação da resposta pressora a microinjeção de NA. Os experimentos foram realizados em dois dias. No primeiro dia os animais receberam uma microinjeção de NA (10nmol/ 100nL) no NLET. Após 24 h a NA foi microinjetada 15 min depois da administração endovenosa de dTir(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP (50µg/Kg).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Respostas cardiovasculares após microinjeção de NA no NLET de ratos não anestesiados.

Microinjeção de LCA (n=5) no NLET não causou efeito na PAM ( $105\pm 13$  vs  $106\pm 7$  mmHg;  $t=0,6$ ,  $p>0,05$ ) ou FC ( $345\pm 6$  vs  $344\pm 4$  bpm;  $t=0,7$ ,  $p>0,05$ ) de ratos não anestesiados (Figura 1; Apêndice - Tabela 1). Microinjeções de NA (3, 7, 10, 15, 30 e 45 nmol) no NLET de ratos não anestesiados (PAM basal=  $97\pm 2$  mmHg e FC basal:  $342\pm 5$  bpm, n=29) causaram respostas pressoras e bradicárdicas dose-dependentes (Figura 1; Apêndice - Tabela 1).

Análise de regressão não-linear indicou uma significativa correlação entre as doses e as respostas pressoras ( $r^2=0.98$ ,  $df=21$ ,  $p<0.05$ ) ou bradicárdica ( $r^2=0.89$ ,  $df=18$ ,  $p<0.05$ , Fig. 1). A  $ED_{50}$  foi aproximadamente 10 nmol. Assim, a dose de 10nmol foi utilizada nos experimentos seguintes.



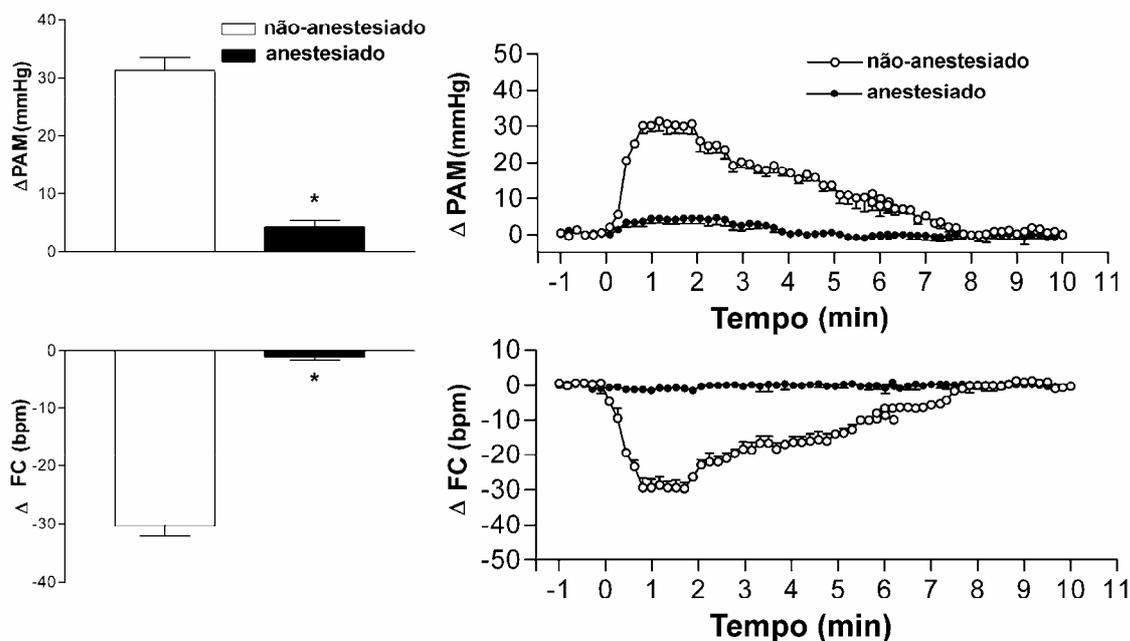
**Figura 1** – Variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) após microinjeção de diferentes doses de NA ( $n=29$ ) ou veículo (V,  $n=5$ ) no NLET de ratos não anestesiados. As concentrações injetadas foram: 3, 7, 10, 15, 30 e 45 nmol.

## 5.2. Efeito da anestesia com uretana sobre as respostas cardiovasculares observadas após microinjeção de NA no NLET.

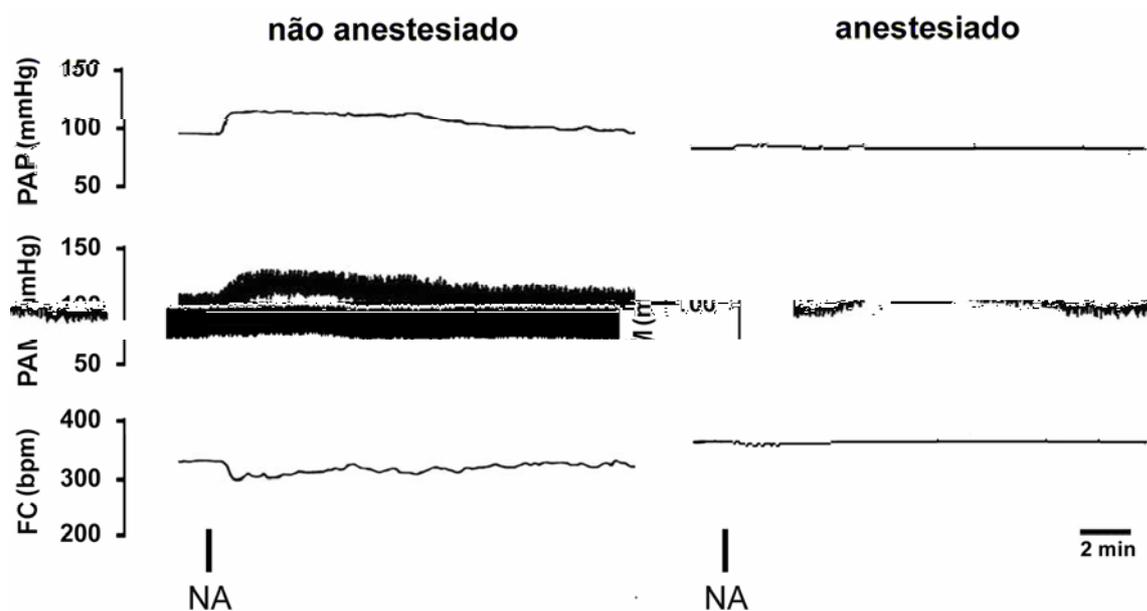
Anestesia com uretana (n=5) causou mudanças significativas nos valores basais de PAM ( $85 \pm 1$  mmHg) e FC ( $375 \pm 12$  bpm), quando comparados com os ratos não anestesiados (PAM=  $96 \pm 2$  mmHg;  $t=8.3$ ,  $p<0.05$  e FC=  $342 \pm 7$  bpm;  $t=6.4$ ,  $p<0.05$ ). As respostas cardiovasculares causadas pela injeção de NA ( $10\text{nmol}/100\text{nL}$ ) no NLET foi significativamente reduzida nos animais anestesiados com uretana ( $\Delta$ PAM antes=  $31 \pm 2$  mmHg e após=  $4 \pm 1$  mmHg;  $t=9.3$ ,  $p<0.05$  e  $\Delta$ FC antes=  $-29 \pm 3$  bpm e após=  $-1 \pm 1$  bpm;  $t=13.4$ ,  $p<0.05$ ; Figura 2).

ANOVA de duas vias indicou efeito significativo da anestesia com uretana sobre as respostas cardiovasculares da NA (PAM,  $F=1617$ ,  $p<0.01$  e FC,  $F=2814$ ,  $p<0.01$ ); um significativo efeito sobre o tempo (PAM,  $F=34.15$ ,  $p<0.01$  e FC,  $F=40.9$ ,  $p<0.01$ ) e interação entre tratamento e tempo (PAM,  $F=22.5$ ,  $p<0.01$  e FC,  $F=37.3$ ,  $p<0.01$ ; Figura 2).

Figura 3 apresenta traçados de pressão arterial pulsátil e média e da frequência cardíaca, mostrando o efeito da administração de NA no NLET no animal não anestesiado e anestesiado com uretana.



**Figura 2 - Esquerda** - Variação máxima da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) após administração de NA (10nmol/100nL) no NLET de ratos não-anestesiados (coluna branca) e anestesiados com uretana (coluna preta) (n=5). As colunas representam as médias  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ , teste *t* de Student. **Direita** - Variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo após administração de NA (10nmol/100nL) no NLET de ratos não-anestesiados (círculos abertos) e anestesiados (círculos fechados) por uretana (n=5). Os círculos representam a média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

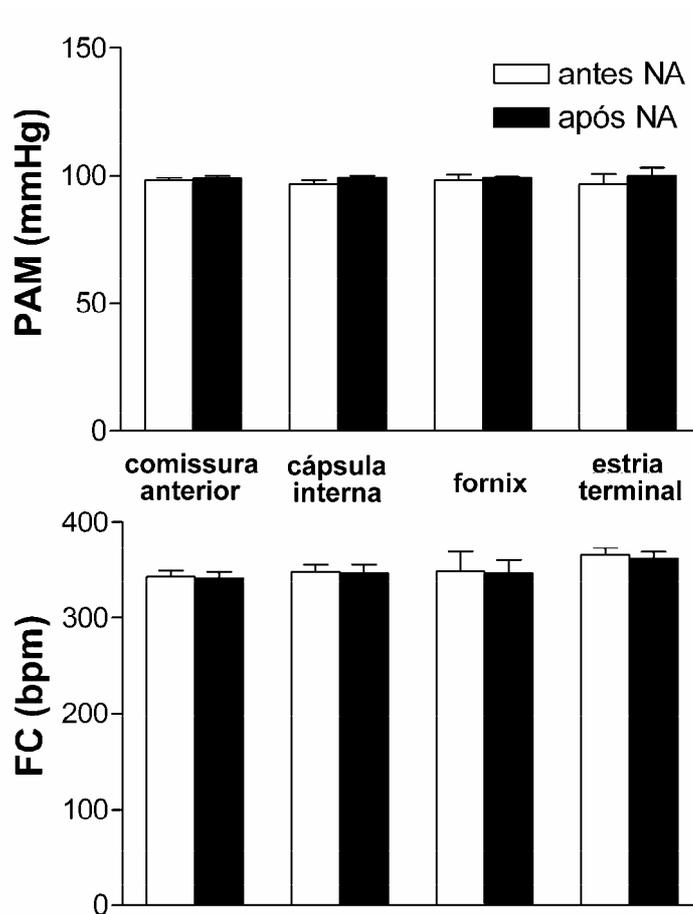


**Figura 2** – Traçados de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC), mostrando o efeito da microinjeção de NA (10 nmol/100nL) no NLET no animal não anestesiado e anestesiado com uretana.

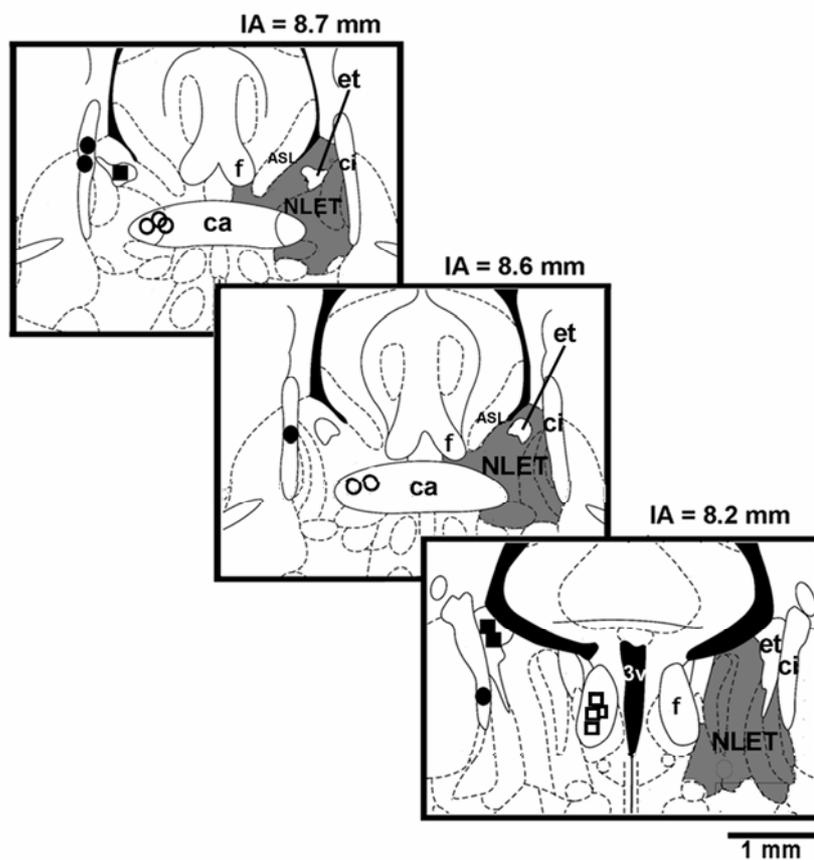
### **5.3. Respostas cardiovasculares após microinjeção de NA em áreas adjacentes ao NLET.**

Microinjeção de NA (10 nmol/100nL) na comissura anterior (PAM antes=  $98 \pm 2$  e após=  $99 \pm 2$  mmHg,  $t=3$ ,  $p>0.05$ ; e FC antes=  $343 \pm 5$  e após  $341 \pm 5$ ,  $t=1.2$ ,  $p>0.05$ ,  $n=5$ ), cápsula interna (PAM antes=  $96 \pm 1$  e após=  $100 \pm 2$  mmHg;  $t=1.5$ ,  $p>0.05$ ; e FC antes=  $359 \pm 15$  e após=  $357 \pm 17$  bpm;  $t=0.9$ ,  $p>0.05$ ,  $n=4$ ), fornix (PAM antes=  $98 \pm 3$  e após=  $100 \pm 2$  mmHg,  $t=1$ ,  $p>0.05$ ; e FC antes=  $348 \pm 20$  e após  $345 \pm 13$ ,  $t=0.5$ ,  $p>0.05$ ,  $n=4$ ) e estria terminal ( PAM antes=  $96 \pm 3$  e após=  $102 \pm 2$ ;  $t=2.2$ ,  $p>0.05$  e FC antes=  $365 \pm 6$  e após  $361 \pm 6$ ;  $t=3.7$ ,  $p>0.05$ ,  $n=3$ ), áreas adjacentes ao NLET, não causaram efeito na PAM e FC (Figura 4).

A representação diagramática da distribuição dos sítios de injeção de NA na comissura anterior, cápsula interna, fornix e estria terminal (PAXINOS & WATSON, 1997) é apresentada na Figura 5.



**Figure 4** – Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) microinjeção de NA (10nmol/100nL) em áreas circunvizinhas ao NLET, em ratos não-anestesiados. As colunas representam as médias  $\pm$  EPM, \* $p < 0,05$ , teste *t* de Student.

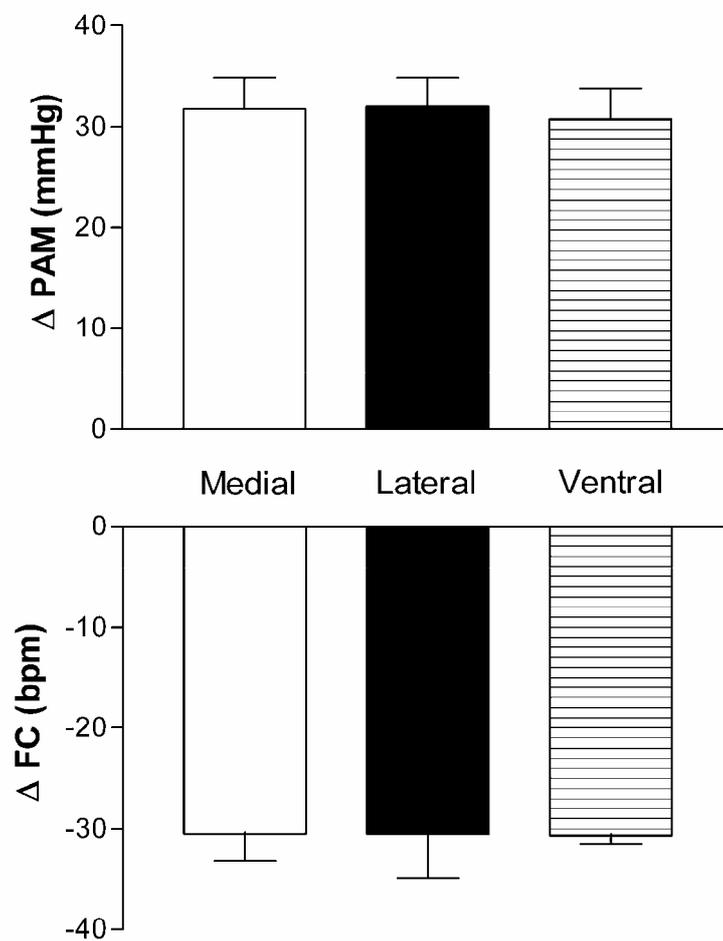


**Figura 5** – Representação Diagramática dos sítios de injeção de NA na cápsula interna (ci, círculos fechados), comissura anterior (ca, círculos abertos), estria terminal (et, quadrados fechados) e fornix (f, quadrados abertos). Coordenadas baseadas no Atlas de Cérebro de Rato de Paxinos & Watson (1997). NLET - núcleo leito da estria terminal (área cinza); ASL - Área Septal Lateral; IA – interaural.

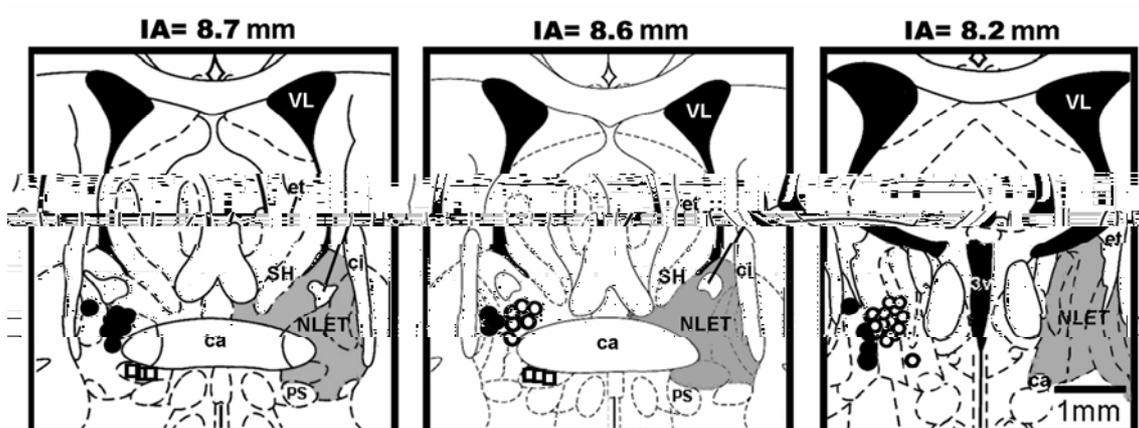
#### **5.4. Respostas cardiovasculares após microinjeção de NA no NLET medial, lateral e ventral.**

Quando NA (10 nmol/100nL) foi microinjetada no NLET medial ( $\Delta$ PAM=  $+31\pm 3$  e  $\Delta$ FC=  $-31\pm 2$ , n=8); lateral ( $\Delta$ PAM=  $+32\pm 4$  e  $\Delta$ FC=  $-30\pm 4$ , n=7) ou ventral ( $\Delta$ PAM=  $+31\pm 5$  e  $\Delta$ FC=  $-30\pm 1$ , n=5) não foram observadas diferenças significativas nas respostas de PAM (F=0,5;  $p>0.05$ ) ou FC (F=0,1;  $p>0.05$ ) (Figura 6).

A Figura 7 mostra uma representação diagramática (PAXINOS & WATSON, 1997) do NLET, indicando os sítios de microinjeção da NA no NLET medial, lateral e ventral.



**Figura 6** - Variação máxima da pressão arterial média ( $\Delta PAM$ ) e frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ) após administração de NA (10nmol/100nL) no NLET medial (coluna branca, n=8), lateral (coluna preta, n=7) e ventral (coluna com listas horizontais, n=5). As colunas representam as médias  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ , ANOVA de uma via seguida por teste de Bonferroni.



**Figura 7** - Representação Diagramática dos sítios de injeção de NA no NLET medial (círculos abertos), lateral (círculos fechados) ou ventral (quadrados abertos). Modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1997). NLET – núcleo leito da estria terminal (área cinza), IA – interaural, VL – ventrículo lateral, SH – septo, ci – cápsula interna, ca – comissura anterior, PS – núcleo paraestrial, 3V – terceiro ventrículo, et – estria terminal.

### 5.5. Efeito do pré-tratamento endovenoso com salina, pentolínio ou dTir(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP nas respostas cardiovasculares observadas após microinjeção de NA no NLET.

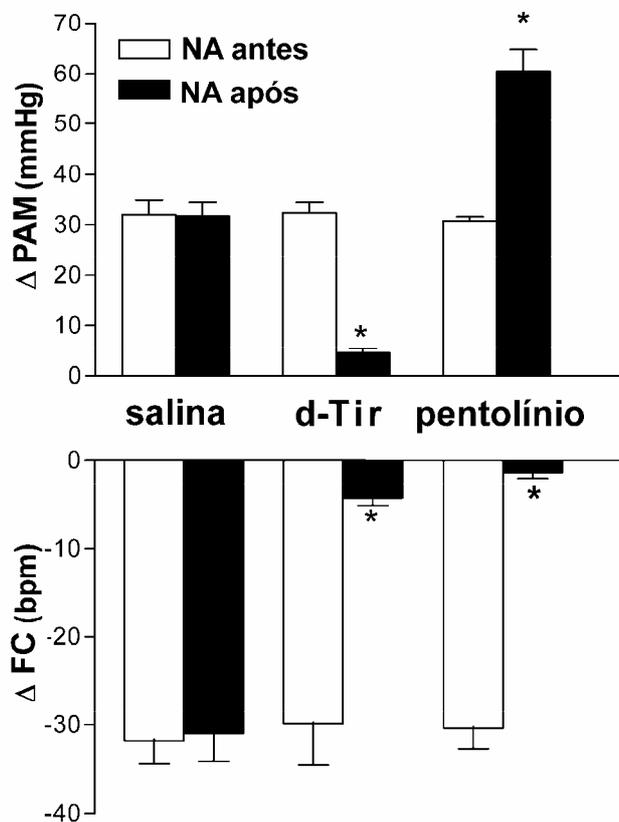
**Salina:** A administração endovenosa de salina (n=4) não afetou a resposta pressora ( $\Delta$  PAM antes= 32.1 $\pm$ 6 e após= 31 $\pm$ 3 mmHg; t=0.04, p>0.05) e bradicárdica ( $\Delta$  FC antes= -31 $\pm$ 2 e após= -30 $\pm$ 4 bpm, t=0.1, p>0.05) observada após microinjeção de NA (10nmol/100nL) no NLET (Figura 8).

**Pentolínio:** O pré-tratamento endovenoso com pentolínio (n=5), bloqueador ganglionar, aumentou a resposta pressora causada pela microinjeção de NA (10nmol/100nL) no NLET ( $\Delta$  PAM antes= 30 $\pm$ 1 e após= 60 $\pm$ 4 mmHg; t= 6.6, p<0,05), e reduziu a resposta bradicárdica ( $\Delta$ FC antes= -29 $\pm$ 5 e após= -1 $\pm$ 1 bpm; t=15.5, p<0.05, Figura 8).

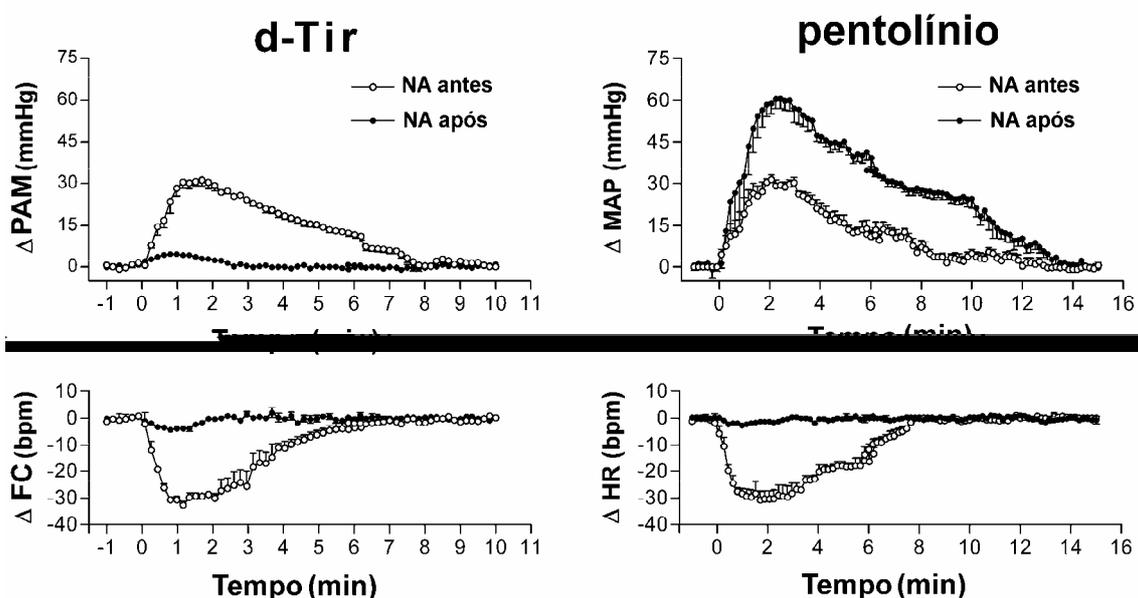
ANOVA de duas vias indicou efeito significativo do pentolínio sobre as respostas cardiovasculares observadas após administração de NA no NLET (PAM, F=1256, p<0.01 e FC, F=2042, p<0.01); um efeito significativo sobre o tempo (PAM, F=38.3, p< 0.01 e FC, F=36, p<0.01); e interação entre tratamento e tempo (PAM, F=5.8, p<0.01 e FC, F=31.4, p<0.01, Figura 9).

Análise dos valores basais de PA e FC mostrou que o pré-tratamento com pentolínio causou redução significativa nos valores basais de PAM (97 $\pm$ 3 vs 69 $\pm$ 4 mmHg; t=8; p<0.01), sem afetar a FC (341 $\pm$ 12 vs 346 $\pm$ 13 bpm; t=0,9, p>0.05, n=5, Fig.10). Além disso, o pré-tratamento com pentolínio não afetou os valores máximos de PAM (128 $\pm$ 4 vs 130 $\pm$ 4 mmHg; t=0,3; p>0,05; Figura 10) observados após a administração de NA no NLET. Entretanto, os

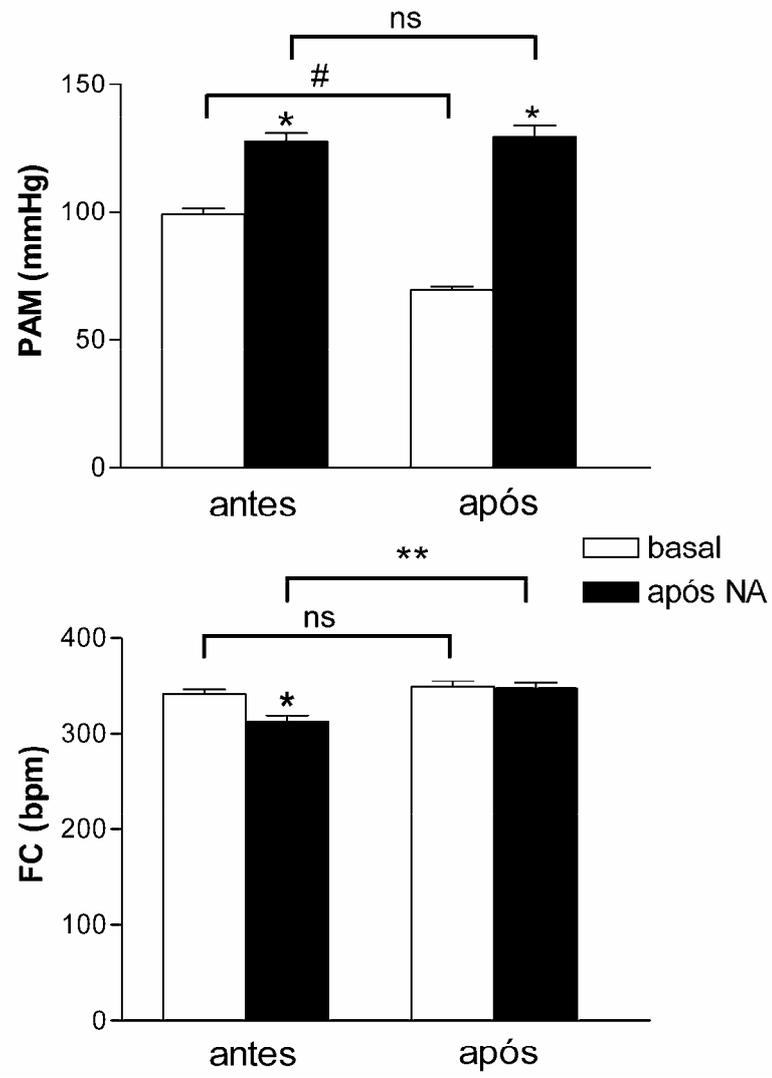
valores de FC foram aumentados ( $312 \pm 6$  vs  $347 \pm 7$  bpm;  $t=5$ ;  $p < 0,01$ ; Figura 10).



**Figura 8** - Variação máxima da pressão arterial média ( $\Delta PAM$ ) e frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ) após administração de NA (10nmol/100nL) no NLET de ratos não-anestesiados antes (coluna branca) e após (colunas pretas) tratamento com salina (n=4), dTir(CH2)5(Me)AVP (d-Tir, n=5), ou pentolínio (n=5) no NLET. As colunas representam as médias  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ , teste t de Student.



**Figura 9 – Esquerda** - Variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo após administração de NA (10nmol/100nL) no NLET de ratos não-anestesiados antes (círculos abertos) e após (círculos fechados) tratamento com dTir (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me) AVP (d-Tir, n=5). Os círculos representam a média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. **Direita** - Variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo após administração de NA (10nmol/100nL) no NLET de ratos não-anestesiados antes (círculos abertos) e após (círculos fechados) tratamento com pentolínio (n=5). Os círculos representam a média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

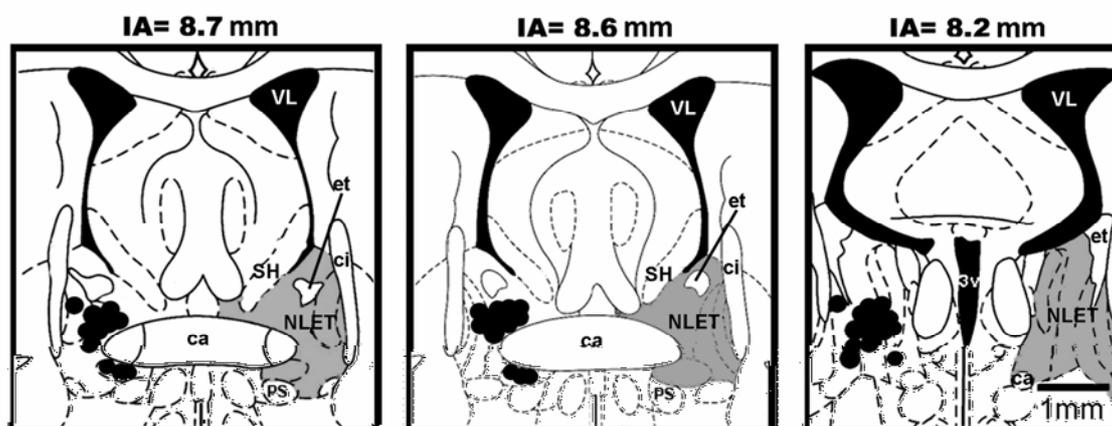


**dTir(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP:** O pré-tratamento endovenoso com dTir(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP (n=5), antagonista de receptores V<sub>1</sub> vasopressinérgicos, não afetou os valores basais de PAM ( 97±2 vs 98±3 mmHg; t=0.4, p>0.05) e FC ( 348±8 vs 353±12 bpm; t=0.3, p>0.05).

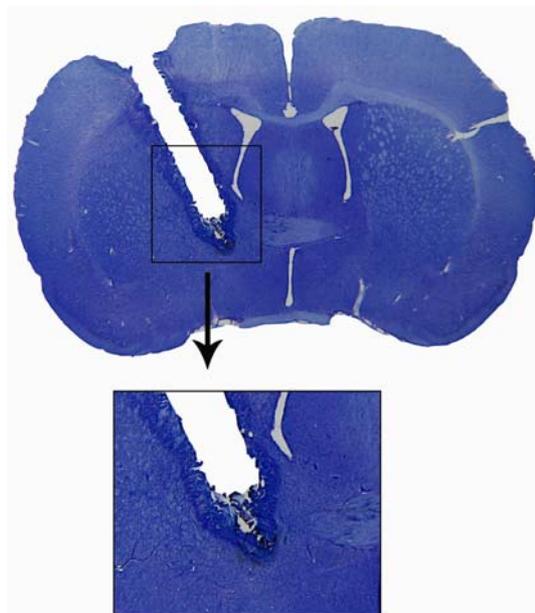
O pré-tratamento com dTir(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP reduziu as respostas cardiovasculares para microinjeção de NA (10 nmol/100nL) no NLET de ratos não anestesiados ( $\Delta$ PAM= 4±1 mmHg e  $\Delta$ FC= -4±1 bpm) quando comparadas com aquelas observadas antes da administração do antagonista de vasopressina ( $\Delta$ PAM= 32±3 mmHg e  $\Delta$ FC= -30±5 bpm, t=9.6, p<0.05 e t=5.7, p<0.05, respectivamente; Figura 8).

ANOVA de duas vias indicou significativo efeito do dTir(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP sobre os efeitos cardiovasculares da NA no NLET (PAM, F=3512, p<0.01 e FC, F=1082, p<0.01); um significativo efeito sobre o tempo (PAM, F=53.52, p<0.01 e FC, F=28.8, p<0.01); e interação entre tratamento e tempo (PAM, F=39.6, p<0.01 e FC, F=22.5, p<0.01, Figura 9).

A Figura 11 mostra uma representação diagramática (PAXINOS & WATSON, 1997) do NLET, indicando os sítios de microinjeção da NA nos animais utilizados no presente estudo. Na Figura 12 é apresentada uma fotomicrografia de corte de cérebro de rato mostrando o sítio de injeção de NA no NLET de um animal representativo.



modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1997). NLET – núcleo leito da estria terminal (área cinza), IA – interaural, VL – ventrículo lateral, SH – septo, ci – cápsula interna, ca – comissura anterior, PS – núcleo paraestrial, 3V – terceiro ventrículo, et – estria terminal.



**Figura 12** - Fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um rato mostrando o sítio de injeção de NA no NLET.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo nós demonstramos que a microinjeção de NA no NLET de ratos não anestesiados causa resposta pressora mediada pela liberação sistêmica de vasopressina, à qual é acompanhada de bradicardia reflexa.

O NLET é uma estrutura límbica envolvida no controle cardiovascular. Em ratos anestesiados foram relatadas respostas pressoras e depressoras após sua estimulação elétrica (DUNN & WILLIAMS, 1995); ou estimulação química com aminoácidos excitatórios (GELSEMA & CALARESU, 1987; CIRIELO & JANSSEN, 1993; GELSEMA et al, 1993;). Além disso, dados prévios de nosso laboratório indicaram o envolvimento do NLET na modulação do barorreflexo em ratos não-anestesiados (CRESTANI et al, 2006).

O NLET é um dos maiores alvos de inervação noradrenérgica no cérebro (SWANSON & HARTMAN, 1975; MOORE, 1978). As terminações noradrenérgicas do NLET são originárias de neurônios noradrenérgicos localizados no núcleo A1 (WOULFE et al, 1988), A5 (BYRUM & GUYENET, 1987) e no locus coeruleus (MOORE & CARD, 1984; MOORE, 1978) do tronco cerebral. Além disso, foi demonstrado que a estimulação elétrica do NLET causa liberação local de NA (PALIJ & STAMFOR; 1993). Assim, este pode constituir o substrato neuronal funcional envolvido nas respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no NLET.

Trabalhos anteriores do nosso laboratório mostraram a presença do fenômeno da taquifilaxia quando NA era administrada de forma repetida intracerebroventricular (i.c.v.; CORRÊA et al., 1985) e no córtex pré-frontal medial (FERNANDES, 2001). Desta forma, para evitar uma possível

ocorrência desse fenômeno no NLET, injeções repetidas de NA foram realizadas com intervalos de 24 horas.

Microinjeção de NA em áreas adjacentes ao NLET, tais como a comissura anterior, cápsula interna, fornix e estria terminal, não causaram efeitos cardiovasculares, reforçando a idéia de uma ação da NA restrita ao NLET.

A microinjeção de LCA no NLET não causou respostas cardiovasculares significantes. Assim, este dado exclui a possibilidade das respostas cardiovasculares observadas após microinjeção de NA no NLET serem decorrentes de estímulo mecânico da área.

No NLET há três subdivisões principais: medial, lateral e ventral (MOGA et al, 1989; PAXINOS & WATSON, 1997). A magnitude das respostas cardiovasculares observadas após a microinjeção de NA não foram diferentes quando a NA foi injetada no NLET medial, lateral ou ventral. Estes dados sugerem que neurônios sensíveis à NA estão distribuídos uniformemente pelas três subáreas do NLET, o que torna desnecessário um estudo separado das três subáreas.

Esta homogeneidade de respostas cardiovasculares à injeção de NA em diferentes porções do NLET está em conformidade com dados prévios de Ciriello & Janssen (1993), que mostraram não haver diferenças nas respostas cardiovasculares quando L-glutamato foi microinjetado em diferentes porções do NLET. Este dado reforça a idéia de uma distribuição homogênea de neurônios cardiovasculares sensíveis à NA no NLET, uma vez que interação entre a neurotransmissão glutamatérgica e noradrenérgica foi demonstrada

ocorrer no NLET (FORRAY et al, 1995; ALIAGA et al, 1995; FORRAY et al, 1999).

O possível extravasamento de droga do SNC para a circulação periférica deve ser considerado quando respostas similares são observadas após injeções centrais e periféricas da droga. Em nossos experimentos, as respostas pressoras e bradicárdicas à microinjeção de NA no NLET foram significativamente reduzidas em animais anestesiados com uretana. Esta marcada redução nas respostas cardiovasculares observadas nos animais anestesiados favorece a idéia de uma resposta mediada pelo SNC. Além disso, a ausência de resposta inviabiliza o uso de ratos anestesiados para estudar os efeitos cardiovasculares da microinjeção de NA no NLET.

Evidências prévias indicam que a anestesia pode afetar as respostas cardiovasculares mediadas pelo SNC, tais como as observadas após a administração i.c.v. de NA ou clonidina (CORRÊA et al., 1982; FORSYTH & PESOUT, 1978). Também, a anestesia bloqueou as respostas cardiovasculares desencadeadas pela microinjeção i.c.v. de angiotensina II (HOFFMAN & PHILLIPS, 1976; SEVERS & DANIELS-SEVERS, 1973).

Projeções do NLET para neurônios simpáticos bulbares relacionados à função cardiovascular têm sido demonstradas (SOFRONIEW, 1983). Conseqüentemente, a possível natureza simpática da resposta pressora observada após microinjeção de NA no NLET deveria ser considerada. Pré-tratamento sistêmico com bloqueador ganglionar é um instrumento tradicionalmente utilizado para bloquear a atividade nervosa simpática.

No presente estudo, o pré-tratamento endovenoso com pentolínio, um bloqueador ganglionar, reduziu signifi

confirmando o bloqueio simpático. Entretanto, a resposta pressora à microinjeção de NA no NLET foi aumentada. Assim, esta observação exclui a possibilidade de uma mediação simpática da resposta pressora observada após a microinjeção de NA no NLET. O aumento observado na resposta pressora após microinjeção de NA nos animais pré-tratados com pentolínio pode ser explicada em parte pela redução nos valores basais de PAM, uma vez que os valores máximos de pressão arterial observados após administração de NA no NLET nos animais pré-tratados com pentolínio foram similares àqueles observados nos animais controle.

Similar aumento na resposta pressora por bloqueio ganglionar foi relatado após injeção i.c.v. (CORRÊA et al., 1985), intracortical (FERNANDES et al., 2003) e na substância cinzenta periaquedutal (PELOSI & CORREA, 2005) dTirc.vH2)57(Me)AVP. Ae m,ssimeñdorvada

A vasopressina é sintetizada por neurônios magnocelulares localizadas no núcleo supra-óptico (NOS) e paraventricular (NPV) do hipotálamo, e liberada para a circulação periférica pela neuro-hipófise (SWAAB et al, 1975). Uma vez liberada, a vasopressina sistêmica é capaz de modular o sistema cardiovascular.

Existem receptores do tipo  $V_1$  vasopressinérgico localizados na musculatura lisa vascular (PHILLIPS et al, 1990). Estes são receptores acoplados a proteína G, que estimulam a enzima fosfolipase C levando à formação dos segundos mensageiros trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (BRILEY et al, 1994). Estes segundos mensageiros são capazes de elevar as concentrações intracelulares de cálcio livre, levando a contração da musculatura lisa vascular. Deste modo, a vasopressina sistêmica ao atuar em receptores  $V_1$  vasopressinérgico causa contração da musculatura lisa vascular (STEEDMAN, 1966), ocasionando aumento da pressão arterial.

Assim, nossos dados sugerem que ativação de neurônios no NLET através da microinjeção de NA é capaz de estimular os neurônios magnocelulares localizados no hipotálamo, causando liberação de vasopressina, que ao atuar em receptores  $V_1$  vasopressinérgicos na musculatura lisa vascular causa aumento na pressão arterial.

Foram demonstradas projeções do NLET para o NPV e o NSO do hipotálamo (DONG & SWANSON, 2006), favorecendo a hipótese de que neurônios do NLET influenciam neurônios magnocelulares vasopressinérgicos. Além disso, o sistema noradrenérgico do NLET tem sido implicado em respostas neuroendócrinas associadas a estresse agudo (FORRAY &

GYSLING, 2004), reforçando a idéia do envolvimento de neurônios noradrenérgicos do NLET na modulação do eixo hipotálamo-hipófise.

A mediação das respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no NLET pela liberação sistêmica de vasopressina pode explicar a ausência de respostas nos animais anestesiados com uretana. Anestesia causa aumento nas concentrações plasmáticas de vasopressina circulante (FORSLING et al, 1980). Conseqüentemente, a liberação adicional após estimulação do NLET pela NA não causa respostas cardiovasculares significantes.

Foi demonstrado que administração de dTir(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP em animais anestesiados com uretana causa redução dos valores basais de PAM, para valores similares àqueles observados em ratos anestesiados hipofisectomizados (CORREA, 1990). Este dado sugere que a elevação nas concentrações plasmáticas de vasopressina em animais anestesiados pode estar em parte relacionada ao aumento da participação da vasopressina circulante na manutenção dos valores basais de PAM nos animais anestesiados.

A ativação de fibras aferentes que ascendem de neurônios A1 no bulbo ventrolateral, estimula liberação de vasopressina na circulação periférica (DAY & SIBBALD, 1989). Este dado reforça a idéia de que projeções catecolaminérgicas do tronco cerebral para o NLET podem ser o substrato neuronal funcional envolvido na resposta pressora à injeção de NA no NLET.

O pré-tratamento tanto com pentolínio quanto com dTir(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP bloquearam a resposta bradicárdica observada após microinjeção de NA no NLET. Juntos, estes dados sugerem que a resposta

bradicárdica à microinjeção de NA no NLET é decorrente da resposta barorreflexa vagal, conseqüente ao aumento da PAM. Esta idéia é reforçada pela demonstração de que a vasopressina ao agir diretamente no coração tem um efeito cronotrópico positivo (CHIBA, 1977).

A função fisiológica deste caminho pressor ativado pela NA no NLET não está ainda elucidada. No entanto, nossos resultados sugerem a existência de um mecanismo noradrenérgico no NLET que integraria o controle cardiovascular e neuroendócrino, podendo fazer parte de um mecanismo de ajuste de balanço hídrico associado a respostas ao estresse. Esta idéia é favorecida por trabalhos mostrando liberação de NA no NLET de ratos submetidos ao estresse por imobilização (PACAK et al, 1995), e por relatos de que a administração de antagonistas de receptores noradrenérgicos no NLET reduz as respostas neuroendócrinas associadas ao estresse (CECHI et al, 2002).

Outro possível papel fisiológico da neurotransmissão noradrenérgica presente no NLET poderia estar relacionada à função motora, por meio de um possível envolvimento em ajustes cardiovasculares e neuroendócrinos relacionados ao exercício físico. Trabalhos prévios mostraram que a liberação de vasopressina é acentuadamente estimulada durante o exercício físico (PETRIDES et al, 1997). Assim, este dado favorece a idéia de uma possível participação da neurotransmissão noradrenérgica do NLET na mediação de ajustes neuroendócrinos e cardiovasculares associados ao exercício físico, envolvendo liberação de vasopressina.

Em suma, nossos resultados sustentam a idéia do envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do NLET na modulação do

sistema cardiovascular. Entretanto, a função fisiológica desta modulação necessita de futuros esclarecimentos.

## 7. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a microinjeção de NA no NLET de ratos não anestesiados causa aumento da pressão arterial mediada pela liberação sistêmica de vasopressina, à qual é acompanhado de queda da frequência cardíaca, decorrente da ativação dos barorreceptores pelo aumento da pressão arterial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIAGA, E.;BUSTOS, G. e GYSLING, K. Release of endogenous catecholamines from the striatum and bed nucleus of stria terminalis evoked by potassium and N-methyl-D-aspartate: in vitro microdialysis studies. **J Neurosci Res**, v.40, n.1, Jan 1, p.89-98. 1995.

BARMAN, S. M. e GEBBER, G. L. Axonal projection patterns of ventrolateral medullospinal sympathoexcitatory neurons. **J Neurophysiol**, v.53, n.6, Jun, p.1551-66. 1985.

BORGES, R.F.B. **Ajustes de coordenadas estereotáticas para ratos com pesos variáveis**. Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo. 68p. 1999.

BREZENOFF, H. E. e JENDEN, D. J. Modification of arterial blood pressure in rats following microinjection of drugs into the posterior hypothalamus. **Int J Neuropharmacol**, v.8, n.6, Dec, p.593-600. 1969.

BRYLEY, E.M.; LOLAIT, S.J.; AXELROD, J.; FELDER, C.C. The cloned vasopressin V1a receptor stimulates phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D through activation of receptor-operated calcium channels. **Neuropeptides**, v.27, p.63-74, 1994.

BYRUM, C. E. e GUYENET, P. G. Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. **J Comp Neurol**, v.261, n.4, Jul 22, p.529-42. 1987.

CAMARGO, L. A.;SAAD, W. A.;MACHADO, J. A.;RODRIGUES, G. N. e SAAD, W. A. Effects of noradrenergic stimulation of the medial and lateral hypothalamus on cardiovascular responses. **Pharmacol Res Commun**, v.11, n.2, Feb, p.147-56. 1979.

CASADA, J. H. e DAFNY, N. Restraint and stimulation of bed nucleus of the stria terminalis produce similar stress-like behaviors. **Brain Res Bull**, v.27, n.2, Aug, p.207-12. 1991.

\_\_\_\_\_. Responses of neurons in bed nucleus of the stria terminalis to microiontophoretically applied morphine, norepinephrine and acetylcholine. **Neuropharmacology**, v.32, n.3, Mar, p.279-84. 1993.

CECCHI, M.;KHOSHBOUEI, H.;JAVORS, M. e MORILAK, D. A. Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. **Neuroscience**, v.112, n.1, p.13-21. 2002.

CHIBA, S. Positive chronotropic and negative inotropic actions of vasopressin in isolated blood-perfused canine atrium. **Jpn Heart J**, v.18, n.2, p.221-224. 1977.

CIRIELLO, J. e JANSSEN, S. A. Effect of glutamate stimulation of bed nucleus of the stria terminalis on arterial pressure and heart rate. **Am J Physiol**, v.265, n.5 Pt 2, Nov, p.H1516-22. 1993.

CORREA, F.M.A. CNS catecholaminergic mechanism in cardiovascular control. **Ciência e Cultura**, v.42, n.7, p.488-94, 1990.

CORREA F.M.A.; MAGRO I.A.S.; PERES-POLON V.L. CNS mediation of cardiovascular responses to the intracerebroventricular administration of catecholamines. **Trends Pharmacol. Sci**, v.3, p.330-32. 1982.

CORREA, F. M.; MAGRO, I. A.;PERES-POLON, V. L. e ANTUNES-RODRIGUES, J. Mechanism of the CNS-mediated pressor response to intracerebroventricular injection of noradrenaline in unanaesthetized rats. **Neuropharmacology**, v.24, n.9, Sep, p.831-7. 1985.

CRESTANI, C.C.; ALVES, F.H.F.; RESSTEL, L.B.M.; CORREA, F.M.A. The bed nucleus of stria terminalis modulates the baroreflex in rats. **Neuroreport**, v.17, n.14, p.1531-35, 2006.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**, v.74, n.2, Apr, p.323-64. 1994.

DAY, T. A. e SIBBALD, J. R. A1 cell group mediates solitary nucleus excitation of supraoptic vasopressin cells. **Am J Physiol**, v.257, n.5 Pt 2, Nov, p.R1020-6. 1989.

DONG, H. W. e SWANSON, L. W. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. **J Comp Neurol**, v.494, n.1, Jan 1, p.142-78. 2006.

DUNN, J. D. Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Res**, v.407, n.2, Mar 31, p.327-31. 1987.

DUNN, J.D.; WILLIAMS, T.J. Cardiovascular responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. **J Comp Neurol**, v.352, n.2, Feb 6, p.227-34. 1995.

FERNANDES, K.B.M. **Mecanismos envolvidos na resposta pressora à microinjeção de noradrenalina no córtex pré-frontal medial de ratos não anestesiados.** Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo. 112p. 2001.

FERNANDES, K. B.;CRIPPA, G. E.;TAVARES, R. F.;ANTUNES-RODRIGUES, J. e CORREA, F. M. Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline injection into the cingulate cortex of unanesthetized rats. **Neuropharmacology**, v.44, n.6, May, p.757-63. 2003.

FORRAY, M. I.;ANDRES, M. E.;BUSTOS, G. e GYSLING, K. Regulation of endogenous noradrenaline release from the bed nucleus of stria terminalis. **Biochem Pharmacol**, v.49, n.5, Mar 1, p.687-92. 1995.

FORRAY, M. I.;BUSTOS, G. e GYSLING, K. Regulation of norepinephrine release from the rat bed nucleus of the stria terminalis: in vivo microdialysis studies. **J Neurosci Res**, v.50, n.6, Dec 15, p.1040-6. 1997.

\_\_\_\_\_. Noradrenaline inhibits glutamate release in the rat bed nucleus of the stria terminalis: in vivo microdialysis studies. **J Neurosci Res**, v.55, n.3, Feb 1, p.311-20. 1999.

FORRAY, M. I. e GYSLING, K. Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Brain Res Brain Res Rev**, v.47, n.1-3, Dec, p.145-60. 2004.

FORSLING, M.L.; INGRAM, D.L.; STANIER, M.W. Plasma antidiuretic hormone during hypoxia and anaesthesia in pigs. **J Endocrinol**, v.85, n.2, p.253,9, 1980.

FORSYTH, R. P. e PESOUT, J. Cardiovascular effects of intracerebroventricular norepinephrine in conscious and anaesthetized monkeys. **Neuropharmacology**, v.17, n.2, Feb, p.103-8. 1978.

GELSEMA, A. J. e CALARESU, F. R. Chemical microstimulation of the septal area lowers arterial pressure in the rat. **Am J Physiol**, v.252, n.4 Pt 2, Apr, p.R760-7. 1987.

GELSEMA, A. J.;COPELAND, N. E.;DROLET, G. e BACHELARD, H. Cardiovascular effects of neuronal activation of the extended amygdala in rats. **Brain Res**, v.626, n.1-2, Oct 29, p.156-66. 1993.

GOLDSTEIN, D. S. Central catecholamines and the control of sympathetic tone. In 2, **Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation**, v.02. Eds. Kunos G., Ciriello J., Boston, 1991.

GRAY, T. S.;PIECHOWSKI, R. A.;YRACHETA, J. M.;RITTENHOUSE, P. A.;BETHEA, C. L. e VAN DE KAR, L. D. Ibotenic acid lesions in the bed nucleus of the stria terminalis attenuate conditioned stress-induced increases in prolactin, ACTH and corticosterone. **Neuroendocrinology**, v.57, n.3, Mar, p.517-24. 1993.

HAMMACK, S. E.;RICHEY, K. J.;WATKINS, L. R. e MAIER, S. F. Chemical lesion of the bed nucleus of the stria terminalis blocks the behavioral consequences of uncontrollable stress. **Behav Neurosci**, v.118, n.2, Apr, p.443-8. 2004.

HARLAND, D.;GARDINER, S. M. e BENNETT, T. Paraventricular nucleus injections of noradrenaline: cardiovascular effects in conscious Long-Evans and Brattleboro rats. **Brain Res**, v.496, n.1-2, Sep 4, p.14-24. 1989.

HOFFMAN, W. E. e PHILLIPS, M. I. A prolonged pressor response to intraventricular angiotensin II following bilateral nephrectomy. **Life Sci**, v.19, n.9, Nov 1, p.1323-9. 1976.

JANSSEN, S.A.;CIRIELO, J. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in cardiovascular regulation. **Proc. Can. Fed. Biol. Soc.**, v.33, p.170, 1990.

JORDAN, D. e SPYER, K. M. Brainstem integration of cardiovascular and pulmonary afferent activity. **Prog Brain Res**, v.67, p.295-314. 1986.

MCALLEN, R. M. Mediation of the fastigial pressor response and a somatosympathetic reflex by ventral medullary neurones in the cat. **J Physiol**, v.368, Nov, p.423-33. 1985.

MCALLEN, R. M. e SPYER, K. M. The location of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the medulla of the cat. **J Physiol**, v.258, n.1, Jun, p.187-204. 1976.

MOGA, M. M.;SAPER, C. B. e GRAY, T. S. Bed nucleus of the stria terminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat. **J Comp Neurol**, v.283, n.3, May 15, p.315-32. 1989.

MOORE, R. Y. Catecholamin innervation of the basal forebrain. I. The septal area. **J Comp Neurol**, v.177, n.4, Feb 15, p.665-84. 1978.

MOORE, R.Y. and CARD, J.P. Noradrenaline containing neuron systems. In: **Handbook of Chemical Neuroanatomy**, v.2, p.123-56, 1984.

OHTA, H.; WATANABE, S.; UEKI, S. Cardiovascular changes induced by chemical stimulation of the amygdala in rats.**Brain Res Bull.**, v.26, n.4, p.575-81, 1991.

PACAK, K.;MCCARTY, R.;PALKOVITS, M.;KOPIN, I. J. e GOLDSTEIN, D. S. Effects of immobilization on in vivo release of norepinephrine in the bed nucleus of the stria terminalis in conscious rats. **Brain Res**, v.688, n.1-2, Aug 7, p.242-6. 1995.

PALIJ, P. e STAMFORD, J. A. Real-time monitoring of endogenous noradrenaline release in rat brain slices using fast cyclic voltammetry: 1. Characterisation of evoked noradrenaline efflux and uptake from nerve terminals in the bed nucleus of stria terminalis, pars ventralis. **Brain Res**, v.587, n.1, Jul 31, p.137-46. 1992.

\_\_\_\_\_. Real-time monitoring of endogenous noradrenaline release in rat brain slices using fast cyclic voltammetry. 2. Operational characteristics of the alpha 2

autoreceptor in the bed nucleus of stria terminalis, pars ventralis. **Brain Res**, v.607, n.1-2, Apr 2, p.134-40. 1993.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Third edition, Academic Press, Australia, 1997.

PELOSI, G.G.; CORREA, F.M.A. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjected into the dorsal periaqueductal gray area of unanaesthetized rats. **Eur J Neurosci**, v.22, n.12, p.3188-94, 2005.

PETRIDES, J.S.; GOLD, P.W.; MUELLER, G.P.; SINGH, A.; STRATAKIS, C.; CHROUSOS, G.P.; E DEUSTER, P.A. Marked differences in functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis between groups of men. **J Appl Physiol**, v.82, n.6, p.1979-1988. 1997.

PHÉLIX, C. F.; LIPOSITS, Z. e PAULL, W. K. Monoamine innervation of bed nucleus of stria terminalis: an electron microscopic investigation. **Brain Res Bull**, v.28, n.6, Jun, p.949-65. 1992.

PHILLIPS, P.A.; ABRAHAMS, J.M.; KELLY, J.M.; MOOSER, V.; TRINDER, D.; JOHNSTON, C.I. Localization of vasopressin binding sites in rat tissues using specific V1 and V2 selective ligands. **Endocrinology**, v.126, p.1478-84, 1990

PIROLA, C. J.; SCHEUCHER, A.; BALDA, M. S.; DABSYS, S. M.; FINKIELMAN, S. e NAHMOD, V. E. Serotonin mediates cardiovascular responses to acetylcholine, bradykinin, angiotensin II and norepinephrine in the lateral septal area of the rat brain. **Neuropharmacol.**, v.26, n.6, Jun, p.561-6. 1987.

POOLE, S. Cardiovascular responses of rats to intrahypothalamic injection of carbachol and noradrenaline. **Br J Pharmacol**, v.79, n.3, Jul, p.693-700. 1983.

SAWADA, S. e YAMAMOTO, C. Postsynaptic inhibitory actions of catecholamines and opioid peptides in the bed nucleus of the stria terminalis. **Exp Brain Res**, v.41, n.3-4, p.264-70. 1981.

SCHADT, J.C.; HASSER, E.M. Hemodynamic effects of acute stressor in the conscious rabbit. **Am. J. Physiol.**, v.274, n.3, p.R814-21, 1998.

SWAAB, D.F.; NIJVELDT, F.; POOL, C.W. Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. **J Endocrinol**, v.67, p.461-462. 1975.

SEVERS, W. B. e DANIELS-SEVERS, A. E. Effects of angiotensin on the central nervous system. **Pharmacol Rev**, v.25, n.3, Sep, p.415-49. 1973.

SOFRONIEW, M. V. Direct reciprocal connections between the bed nucleus of the stria terminalis and dorsomedial medulla oblongata: evidence from immunohistochemical detection of tracer proteins. **J Comp Neurol**, v.213, n.4, Feb 1, p.399-405. 1983.

SPYER, K.M. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. **J Physiol**, v.474, n.1, p.1-19, 1994.

STEEDMAN, W.M. Micro-eletrode studies on mammalian muscle vasucular. **J Physiol**, v.186, n.2, p. 382-400, 1966.

SWANSON, L. W. e HARTMAN, B. K. The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. **J Comp Neurol**, v.163, n.4, Oct 15, p.467-505. 1975.

WOULFE, J. M.;HRYCYSHYN, A. W. e FLUMERFELT, B. A. Collateral axonal projections from the A1 noradrenergic cell group to the paraventricular nucleus and bed nucleus of the stria terminalis in the rat. **Exp Neurol**, v.102, n.1, Oct, p.121-4. 1988.

ZANDBERG, P.;DE JONG, W. e DE WIED, D. Effect of catecholamine-receptor stimulating agents on blood pressure after local application in the nucleus tractus solitarii of the medulla oblongata. **Eur J Pharmacol**, v.55, n.1, Apr 1, p.43-56. 1979.

APÊNDICE

**TABELA**

**Tabela 1** - Variações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC), em resposta a microinjeção de diferentes concentrações de noradrenalina no NLET de ratos não-anestesiados.

<b>noradrenalina (nmol/100nL)</b>	<b><math>\Delta</math> PAM<math>\pm</math>EPM (mmHg)</b>	<b><math>\Delta</math> FC<math>\pm</math>EPM (bpm)</b>	<b>n (amostra)</b>
LCA	0,75 $\pm$ 1	-2 $\pm$ 2	5
3	7,5 $\pm$ 1	-9 $\pm$ 1	5
7	10 $\pm$ 2	-14 $\pm$ 2	5
10	32 $\pm$ 2,3	-35,2 $\pm$ 4	5
15	44 $\pm$ 4,1	-53,3 $\pm$ 2	5
30	57 $\pm$ 2,2	-59,1 $\pm$ 2	4
45	61,2 $\pm$ 3	-60,3 $\pm$ 6	5

**MANUSCRIPT**

**Cardiovascular effects of noradrenaline microinjection in the bed nucleus of the  
stria terminalis of the rat brain.**

Crestani, CC; Alves, FHF; Resstel, LBM; Corrêa, FMA.\*

Departments of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14090-090, Brazil.

\*Corresponding author. Fax: + 55-16-3633-2301.

E-mail address: fmdacorr@fmrp.usp.br

**Running Title:** Cardiovascular responses to noradrenaline into the BST

**Grant information:** C.C. Crestani and F.H.F. Alves are CAPES MSc fellows and L.B.M. Resstel has a CNPq (151931/2005-4) postdoctoral fellowship. The present research was supported by grants from the CNPq (306381/2003-6 and 505394/2003-0).

**Abstract**

The bed nucleus of the stria terminalis (BST) is a limbic structure involved in regulating the hypothalamic-pituitary-adrenal axis as well as in central cardiovascular control. We presently report on cardiovascular effects caused by microinjection of noradrenaline (NA) in the BST of the rat brain and the peripheral mechanisms involved in their mediation.

Injection of NA (3, 7, 10, 15, 30 or 45 nmol in 100 nL) in the BST of unanesthetized rats caused long-lasting dose-related pressor and bradycardiac responses. No responses were observed when the dose of 10 nmol of NA was microinjected into surrounding structures such as the anterior commissure, the stria terminalis and the internal capsule, indicating a predominant action at the BST. Responses to NA microinjection in the BST were markedly reduced in urethane-anesthetized rats. The pressor response was potentiated by iv pretreatment with the ganglion blocker pentolinium and blocked by iv pretreatment with the selective V<sub>1</sub>-vasopressin antagonist dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP. Pretreatment with the vasopressin antagonist also abolished the bradycardiac response to NA in the BST indicating its reflex origin.

In conclusion, results indicate that activation of noradrenergic receptors within the BST evokes pressor responses, which are mediated by acute vasopressin release.

**Key words:** Bed nucleus of the stria terminalis, cardiovascular system, noradrenaline and vasopressin

## 1. Introduction

The bed nucleus of the stria terminalis (BST) is a limbic structure associated with autonomic, neuroendocrine and behavioral roles (Dunn & Williams, 1995; Dunn, 1987; Casada & Dajny, 1991).

Electric stimulation of the BST elicited both pressor or depressor responses in anesthetized rats (Gelsema et al, 1987; Dunn & Williams, 1993). Chemical stimulation of the BST L-glutamate (L-glu) or D,L-homocysteic acid were reported to cause either depressor (Ciriello & Janssen, 1993; Gelsema et al, 1993) or pressor responses (Gelsema & Calaresu, 1987). Besides the reports on the effects of excitatory amino acids there is no evidence on the possible cardiovascular effects of other classical central nervous system neurotransmitters that are present in the BST. Among those, noradrenaline (NA) is well known for its involvement in central cardiovascular control.

Cardiovascular responses have been reported after NA microinjection into medullary structures such as the nucleus tractus solitarius (Zandberg, 1979) as well as in supra-medullary structures such as the septal area (Pirola et al, 1987), the amygdala (Ohta et al, 1989) or hypothalamic nuclei (Brezenoff et al, 1969; Camargo et al, 1979; Harland et al, 1989; Poole et al, 1983).

Noradrenergic neural terminals were identified in the BST (Phelix et al, 1992). These terminations originate from neurons located in the A1 (Woulfe et al, 1988) and A5 (Byrum & Guyenet, 1987) brain stem nuclei and locus coeruleus (Moore & Card, 1984; Moore, 1978). Electrical stimulation has been reported to evoke NA efflux in the BST (Palij & Stamford, 1992). However, there is no evidence on possible cardiovascular effects mediated by BST noradrenergic synapses. Consequently, it would be relevant to explore possible cardiovascular effects caused by NA microinjected in the BST.

In the present study we report on the cardiovascular effects evoked by NA microinjection in the BST of unanesthetized rats and the peripheral mechanisms involved in their mediation.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Animal**

Forty nine male Wistar rats weighing 230-270 g were used. Animals were kept in the Animal Care Unit of the Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Rats were housed individually in plastic cages under standard laboratory conditions. They were kept under a 12 h light/dark cycle (lights on at 06:30 h) and had free access to food and water. Housing conditions and experimental procedures were approved by the Institution's Animal Ethics Committee.

### **2.2 Surgical Preparation**

Four days before the experiment, the rats were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg i.p.). After scalp anesthesia with 2% lidocaine, the skull was exposed and a stainless steel guide cannulas (26G) was implanted into the BST 1 mm above site injection, using a stereotaxic apparatus (Stoelting, USA). Stereotaxic coordinates for cannula implantation into the BST were: AP= +7.7 mm; L=4.0 mm from the medial suture, V= -5.8 mm from the skull with a lateral inclination of 23° (Paxinos and Watson, 1997). Cannulas were fixed to the skull with dental cement and one metal screw.

One day before the experiment, the rats were anesthetized with tribromoethanol and a catheter was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery for

blood pressure and heart rate recording. When intravenous injection drug was necessary, a second catheter was implanted into the femoral vein for infusion.

Catheters consisted of 4 cm of PE-10 heat-bonded to 13 cm of PE-50 polyethylene tubing (Clay Adams, USA). Catheters were tunneled under the skin and exteriorized on the animal's dorsum.

## **2.2. Measurement of Cardiovascular Responses**

After surgery, the animals were kept in individual cages used in the transport to the experimental room. Animals were allowed 15 min to adapt to the conditions of the experimental room such as sound and illumination before start blood pressure and heart rate recording. The experimental room was acoustically isolated and had constant background noise produced by an air exhauster. At least another 15 min period was allowed before beginning experiments. Care was taken to start injections whenever a stable blood pressure and specially heart rate was observed. Pulsatile arterial pressure (PAP) of freely moving animals was recorded using an HP-7754A preamplifier (Hewlett Packard, USA) and an acquisition board (MP100A, Biopac Systems Inc, USA) connected to a computer. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) values were derived from the PAP recordings and processed on-line.

## **2.3. Drug microinjection into to BST**

NA were dissolved in artificial cerebrospinal fluid (ACF) with the following composition: 100mM NaCl; 2mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 2.5mM KCl; 1mM MgCl<sub>2</sub>; NaHCO<sub>3</sub> 27mM; 2.5mM CaCl<sub>2</sub> (pH=7.4). Injection needles (33G, Small Parts, Miami Lakes, FL, USA) that were used for microinjection into the BST were 1 mm longer than guide cannulas and were connected to a 2 µL syringe (7002H, Hamilton, USA) through PE-10 tubing.

The needle was carefully inserted into the guide cannula and drugs were injected in a final volume of 100 nL. After a 20 s period, the needle was removed.

#### **2.4. Experimental protocols**

Different doses of NA were microinjected into the BST of unanesthetized rats. All animals received one injection of the vehicle and up to two injections of 3, 7, 10, 15, 30 or 45 nmol in 100 nL of NA. The order of microinjections was randomized to avoid build-up effects. The interval between microinjections was 24 h. The dose of 10 nmol of NA in 100 nL, that approximates the ED<sub>50</sub> was used when studying effects of different treatments on the cardiovascular responses to NA.

In the protocol to study the effects of anesthesia on cardiovascular effects of 10 nmol of NA microinjected in the BST animals were anesthetized with urethane (1.25 g/Kg i.p.) and NA was microinjected in the BST one h later.

The experiments to study the peripheral mechanisms involved in the cardiovascular response to NA were carried out in two days. On day one, 10 nmol of NA were microinjected in the BST as control. On the second day, NA was re-injected in the BST 10 min after iv treatment with saline (1 mL/ kg); 5 mg/ kg of the ganglion blocker pentolinium (Moriguchi *et al.*, 1998); or 50 µg/ kg of the vasopressin antagonist dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP (Fernandes *et al.*, 2003).

#### **2.5 Histological determination of the microinjection site**

At the end of the experiment, animals were anesthetized with urethane (1.25 g/ kg i.p.) and 100 nL of 1% Evan's blue dye was microinjected into the BST as a marker of the microinjection site. Animals were submitted to intracardiac perfusion with 0.9% NaCl followed by 10% formalin. The brains were removed and postfixed for 24 h at

4°C and 40µm sections were cut using a cryostat (CM-1900, Leica, Germany). Brain sections were stained with 0.5% cresyl violet for light microscopic analysis. Microinjection sites were determined considering in serial sections, according to the rat brain atlas of Paxinos & Watson (1997).

## **2.6. Drugs**

The following drugs were used: noradrenaline-HCl (Sigma, USA); pentolinium bitartrate (Sigma, USA), dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP (Peninsula, USA), tribromoethanol (Aldrich, USA) and urethane (Sigma, USA).

## **2.7. Statistical Analysis**

Nonlinear regression analysis was used to compare arterial pressure and heart rate results from NA administration into the BST. Two-way ANOVA (treatment vs. time) followed by Bonferroni's post hoc test was used to compare the cardiovascular MAP and HR changes in NA effects before and after treatments. The maximum MAP and HR responses were compared using paired Student's t-test (before treatment vs. after treatment);  $P < 0.05$  was assumed to be statistically significant.

## **3. Results**

### **3.1. Cardiovascular responses to microinjection of NA into to BST of unanesthetized rats.**

Microinjections of ACF in the BST had no effects on MAP ( $\Delta$ MAP:  $0 \pm 1$  mmHg) or HR ( $\Delta$ HR:  $-1 \pm 1$  bpm) of unanesthetized rats. Microinjections of NA (3, 7, 10, 15, 30 or 45 nmol in 100 nL) into the BST of unanesthetized rats (basal MAP:  $97 \pm 4$

mmHg and basal HR:  $342 \pm 12$  bpm,  $n=18$ ) caused dose-related pressor responses accompanied by bradycardia (Fig. 1).

Nonlinear regression analysis indicated a significant correlation between doses and pressor ( $r^2=0.98$ ,  $df=21$ ,  $p<0.05$ ) or bradycardiac ( $r^2=0.89$ ,  $df=18$ ,  $p<0.05$ ) responses, Fig. 1. The approximate  $ED_{50}$  was 10 nmol for the cardiovascular responses.

A typical recording showing the cardiovascular response to the microinjection of 10 nmol of NA into the BST is presented in Fig. 2.

### **3.2 Effects of NA microinjection into structures surrounding the BST.**

Microinjections of 10 nmol of NA into anterior commissure (MAP before:  $98 \pm 3$  and after:  $99 \pm 3$  mmHg,  $t=3$ ,  $p>0.05$  and HR before:  $343 \pm 12$  and after:  $341 \pm 12$  bpm,  $t=1.2$ ,  $p>0.05$ ,  $n=5$ ), internal capsule (MAP before:  $96 \pm 1$  and after:  $100 \pm 3$  mmHg;  $t=1.5$ ,  $p>0.05$  and HR before:  $359 \pm 15$  and after:  $357 \pm 17$  bpm;  $t=0.9$ ,  $p>0.05$ ,  $n=4$ ) and stria terminalis (MAP before:  $96 \pm 7$  and after:  $102 \pm 6$ ;  $t=2.2$ ,  $p>0.05$  and HR before:  $365 \pm 13$  and after:  $361 \pm 15$ ;  $t=3.7$ ,  $p>0.05$ ,  $n=3$ ), areas surrounding the BST, had no effects on MAP or HR.

The diagrammatic representation of injection site in the areas surrounding the BST (Paxinos and Watson, 1997) is presented in the Fig. 3.

### **3.3 Effect of urethane anesthesia on the cardiovascular response to NA microinjected in the BST.**

Urethane anesthesia caused significant changes in basal MAP (MAP:  $85 \pm 1$  mmHg,  $n=5$ ) and HR (HR:  $402 \pm 29$  bpm,  $n=5$ ), when compared with unanesthetized rats (MAP:  $96 \pm 3$  mmHg;  $t=8.3$ ,  $p<0.05$  and HR:  $342 \pm 11$  bpm;  $t=6.4$ ,  $p<0.05$ ,  $n=5$ ).

The cardiovascular responses evoked by NA microinjection in the BST was significantly reduced in urethane-anaesthetized animals ( $\Delta$ MAP before:  $31 \pm 4$  mmHg and after:  $4 \pm 2$  mmHg;  $t=9.3$ ,  $p<0.05$  and  $\Delta$ HR before:  $-29 \pm 6$  bpm and after:  $-1.5 \pm 1$  bpm;  $t=13.4$ ,  $p<0.05$ ,  $n=5$ ), Fig. 4.

Two-way ANOVA indicated significant effects of NA on MAP and HR (MAP:  $F=1617$ ,  $p<0.01$  and HR:  $F=2814$ ,  $p<0.01$ ); a significant effect over time (MAP:  $F=34.15$ ,  $p<0.01$  and HR:  $F=40.9$ ,  $p<0.01$ ) and interaction between treatment and time (MAP:  $F=22.5$ ,  $p<0.01$  and HR:  $F=37.3$ ,  $p<0.01$ ), Fig. 4.

### **3.4 Effect of the iv treatment with saline, pentolinium or dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP on the cardiovascular effects to NA microinjected in the BST.**

**Saline:** The iv administration of saline did not affect the pressor ( $32 \pm 6$  vs  $31 \pm 6$  mmHg;  $t=0.04$ ,  $p>0.05$ ,  $n=4$ ) and bradycardiac ( $-32 \pm 5$  vs  $-31 \pm 7$ ;  $t=0.1$ ,  $p>0.05$ ,  $n=4$ ) responses to NA microinjection into to BST (Fig. 5).

**Pentolinium:** Pretreatment with the ganglion blocker pentolinium significantly reduced baseline values of MAP ( $97 \pm 3$  vs  $69 \pm 4$  mmHg;  $t=11.74$ ,  $p<0.05$ ,  $n=5$ ), but did not affect baseline HR ( $341 \pm 12$  vs  $346 \pm 13$  bpm;  $t=0.8$ ,  $p>0.05$ ,  $n=5$ ).

The pretreatment with pentolinium potentiated the pressor response evoked by NA microinjection in the BST ( $\Delta$ MAP before:  $30 \pm 2$  mmHg and after:  $60 \pm 8$  mmHg;  $t=6.6$ ,  $p<0.05$ ,  $n=5$ ). Moreover, the bradycardiac response to NA injection into the BST was reduced ( $\Delta$ HR before:  $-29 \pm 9$  and  $\Delta$ HR after:  $-1 \pm 2$  bpm;  $t=15.5$ ,  $p<0.05$ ,  $n=5$ , Fig. 5).

Two-way anova indicated significant effect of pentolinium on NA cardiovascular effects (MAP:  $F=1256$ ,  $p<0.01$  and HR:  $F=2042$ ,  $p<0.01$ ); a significant effect over time (MAP:  $F=38.3$ ,  $p<0.01$  and HR:  $F=36$ ,  $p<0.01$ ) and interaction between treatment and time (MAP:  $F=5.8$ ,  $p<0.01$  and HR:  $F=31.4$ ,  $p<0.01$ ), Fig. 6.

**dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP:** Pretreatment with selective V<sub>1</sub>-vasopressin antagonist dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP did not affect the baseline values of MAP ( $97\pm 4$  vs  $98\pm 6$  mmHg;  $t=0.4$ ,  $p>0.05$ ,  $n=5$ ) and HR ( $348\pm 16$  vs  $353\pm 25$  bpm;  $t=0.3$ ,  $p>0.05$ ,  $n=5$ ).

After the pretreatment with the vasopressin antagonist the cardiovascular responses to NA microinjection into the BST were significantly reduced ( $\Delta$ MAP:  $5\pm 2$  mmHg and  $\Delta$ HR:  $-4\pm 2$  bpm,  $n=5$ ) when compared to those observed before antagonist ( $\Delta$ MAP:  $32\pm 5$  mmHg and  $\Delta$ HR:  $-31\pm 10$  bpm,  $t=9.6$ ,  $p<0.05$  and  $t=5.7$ ,  $p<0.05$ , respectively; Fig. 5).

Two-way ANOVA indicated significant effects of dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP on NA cardiovascular effects (MAP:  $F=3512$ ,  $p<0.01$  and HR:  $F=1082$ ,  $p<0.01$ ); a significant effect over time (MAP:  $F=53.52$ ,  $p<0.01$  and HR:  $F=28.8$ ,  $p<0.01$ ) and interaction between treatment and time (MAP:  $F=39.6$ ,  $p<0.01$  and HR:  $F=22.5$ ,  $p<0.01$ ), Fig. 6.

A diagrammatic representation of the BST (according to the rat brain atlas of Paxinos and Watson, 1997) indicating the microinjection sites of NA in the animals used in the present study is presented in Fig. 7.

#### 4. Discussion

In the present study we report that NA microinjected in the BST of unanesthetized rats evoked dose-related pressor and bradycardiac responses.

The BST is a limbic structure involved with cardiovascular control. In anesthetized rats, both pressor and depressor response have been reported after electric stimulation (Dunn and Williams, 1995) or chemical stimulation with L-glu (Gelsema and Calaresu, 1987; Gelsema et al, 1993; Ciriello and Janssen, 1993) of the BST. Additionally, there is evidence indicating that the BST modulates baroreflex in unanesthetized rats (Crestani et al, 2006).

The BST is one of the major targets of noradrenergic innervation in the brain (Swanson et al, 1975; Moore et al, 1979). The synaptic terminations in the BST are mainly originated from noradrenergic group cell into the A1 (Woulfe et al, 1988), A5 (Byrum & Guyenet, 1987) and locus coeruleus (Moore & Card, 1984; Moore, 1978). Moreover, electric stimulation of BST has been reported to evoke local NA efflux (Palij & Stamford; 1993). Consequently, the cardiovascular response observed after NA injection into the BST suggests a possible involvement of the BST noradrenergic neural substrate in central cardiovascular control.

Microinjections of NA into surrounding areas such as the anterior commissure, the internal capsule and the stria terminalis had no cardiovascular effects, reinforcing the idea on an action restricted to the BST.

The possible leakage of drug from the central nervous system (CNS) to the peripheral circulation should also be considered when similar responses are observed after central and systemic drug injection. In our experiments the pressor and bradycardiac responses to NA into the BST were significantly reduced in urethane-anesthetized rats. This marked decrease observed in the pressor response to NA into the BST after anesthesia favors the idea of a CNS-mediated response. Previous evidence pointed out that anesthesia may affect CNS-mediated responses cardiovascular, such those caused by intracerebroventricular (icv) NA or clonidine (Corrêa *et al.*, 1982;

Forsyth & Pesout, 1978). Also, anesthesia was reported to block the pressor responses caused by icv angiotensin II (Hoffman & Phillips, 1976; Severs & Daniels-Severs, 1973). In addition, the lack of pressor responses precludes the use of urethane-anesthetized rats to study the cardiovascular effects of NA microinjected in the BST.

Neuronal inputs from the BST to bulbar cardiac-related sympathetic neurons have been demonstrated (Sofroniew et al, 1983). Consequently, the possible sympathetic nature of the pressor response observed after the injection of NA into the BST should be studied. Systemic pretreatment with a ganglion blocker is traditionally used as a pharmacological tool to block sympathetic nervous activity. In the present study, the i.v. pretreatment with pentolinium significantly lowered basal blood pressure, confirming sympathetic blockade. However, the pressor response to NA was potentiated after ganglion blockade. This observation rules out a major sympathetic involvement in the pressor response to NA in the BST.

Similar potentiation of central NA pressor responses after ganglion blockade was reported after i.c.v. (Corrêa *et al.*, 1985) or intracortical (Fernandes *et al.*, 2003) injection of NA in unanesthetized rats, suggesting humoral mediation. Under those conditions, the pressor effect of the central injection of NA was reported to be caused by vasopressin release into circulation (Corrêa *et al.*, 1985; Fernandes *et al.*, 2003).

To explore a possible mediation by vasopressin release, we studied the effect of the i.v. pretreatment with the vasopressin antagonist dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP on the cardiovascular response to NA into the BST. The pressor response to NA was significantly reduced after pretreatment with dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP, suggesting that vasopressin release mediates the pressor response to NA injected into the BST.

The idea that catecholaminergic projections from the rostral ventrolateral medulla to the BST could be the functional neural substrate involved in the vasopressin-

related pressor response to the injection of NA into the BST is favored by reports that activation of noradrenergic afferents that arise from the A1 neurons in the ventrolateral medulla stimulates vasopressin release into the peripheral circulation (Day & Sibbald, 1989).

Vasopressin is mainly synthesized by magnocellular cells within the supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nuclei of the hypothalamus and released into circulation by the neurohypophysis (Swaab et al, 1975). There is evidence showing connections between the BST and the PVN and SON (Dong et al, 2006), supporting the hypothesis that BST has an influence on magnocellular vasopressinergic neurons. Additionally, the BST noradrenergic system has been implicated in neuroendocrine responses associated with acute stress (Forray & Gysling, 2004), suggesting that a noradrenergic system into BST could be involved in the vasopressin release.

The i.v. treatment with pentolinium or dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP blocked the bradycardiac response to NA into the BST. Together, these data suggesting a vagal baroreflex response, consequent to MAP increase. Moreover, vasopressin has been reported to cause positive chronotropic effect (Chiba, 1977), what reinforces the idea of reflex bradycardia. Also, there was a good correlation between pressor increases and HR decreases further suggesting that bradycardiac responses concomitant with pressor increase had reflex origin.

The physiological role of this pressor pathway activated by NA injection into BST is still unclear, our results suggest the existence of a noradrenergic mechanism in the BST that integrates cardiovascular and neuroendocrine control and could take part in fluid balance adjustments to stress responses. This idea is supported by reports indicating release of NA in the BST during stress evoked by immobilization in rats (Pacak et al, 1995) as well the fact that neuroendocrine responses associate with stress

were reduced when after microinjection of noradrenergic antagonists in the BST (Cechi et al, 2002).

In summary, NA microinjected in the BST evoked blood pressure increase accompanied of bradycardia in unanesthetized rats, being mediated by acute vasopressin release into the circulation.

## Acknowledgments

The authors wish to thank I.A.C. Fortunato and I.I.B. Aguiar and S.S. Guillaume for technical help.

## References

- Brezenoff HE, Jenden DJ. 1969. Modification of arterial blood pressure in rats following microinjection of drugs into the posterior hypothalamus. *Int J Neuropharmacol* 8: 593-600.
- Byrum CE, Guyenet PG. 1987. Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. *J Comp Neurol* 261: 529-542.
- Camargo LA, Saad WA, Machado JA, Rodrigues GN, Saad WA. 1979. Effects of noradrenergic stimulation of the medial and lateral hypothalamus on cardiovascular responses. *Pharmacol Res Commun* 11: 147-156.
- Casada JH, Dafny N. 1991. Restraint and stimulation of bed nucleus of the stria terminalis produce similar stress-like behaviors. *Brain Res Bull* 27: 207-212.
- Cecchi M, Khoshbouei H, Javors M, Morilak DA. 2002. Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. *Neuroscience* 112: 13-21.
- Chiba S. 1977. Positive chronotropic and negative inotropic actions of vasopressin in isolated blood-perfused canine atrium. *Jpn Heart J* 18(2): 221-224.
- Ciriello J, Janssen SA. 1993. Effect of glutamate stimulation of bed nucleus of the stria terminalis on arterial pressure and heart rate. *Am J Physiol* 265: H1516-1522.
- Correa FMA, Magro IAS, Peres-Polon VL. 1982. CNS mediation of cardiovascular responses to the intracerebroventricular administration of catecholamines. *Trends Pharmacol. Sci.* 3: 330-332.

- Correa FM, Magro IA, Peres-Polon VL, Antunes-Rodrigues J. 1985. Mechanism of the CNS-mediated pressor response to intracerebroventricular injection of noradrenaline in unanesthetized rats. *Neuropharmacology* 24: 831-837.
- Crestani CC, Alves FHF, Resstel LB, Correa FMA. 2006. The bed nucleus of stria terminalis modulates baroreflex in rats. *Neuroreport* version in press.
- Day TA, Sibbald JR. 1989. A1 cell group mediates solitary nucleus excitation of supraoptic vasopressin cells. *Am J Physiol* 257: R1020-1026.
- Dong HW, Swanson LW. 2006. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. *J Comp Neurol* 494: 142-178.
- Dunn JD. 1987. Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 407: 327-331.
- Dunn JD, Williams TJ. 1993. Cardiovascular responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Experimental Biology* 7: 101-109, 1993.
- Dunn JD, Williams TJ. 1995. Cardiovascular responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 352: 227-234.
- Fernandes KB, Crippa GE, Tavares RF, Antunes-Rodrigues J, Correa FM. 2003. Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline injection into the cingulate cortex of unanesthetized rats. *Neuropharmacology* 44: 757-763
- Forray MI, Gysling K. 2004. Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res Brain Res Rev* 47: 145-160.
- Forsyth RP, Pesout J. 1978. Cardiovascular effects of intracerebroventricular norepinephrine in conscious and anaesthetized monkeys. *Neuropharmacology* 17: 103-108.

- Gelsema AJ, Calaresu FR. 1987. Chemical microstimulation of the septal area lowers arterial pressure in the rat. *Am J Physiol* 252: R760-767.
- Gelsema AJ, Copeland NE, Drolet G, Bachelard H. 1993. Cardiovascular effects of neuronal activation of the extended amygdala in rats. *Brain Res* 626: 156-166.
- Gelsema AJ, McKittrick DJ, Calaresu FR. 1987. Cardiovascular responses to chemical and electrical stimulation of amygdala in rats. *Am J Physiol* 253: R712-718.
- Harland D, Gardiner SM, Bennett T. 1989. Paraventricular nucleus injections of noradrenaline: cardiovascular effects in conscious Long-Evans and Brattleboro rats. *Brain Res* 496: 14-24.
- Hoffman WE, Phillips MI. 1976. A prolonged pressor response to intraventricular angiotensin II following bilateral nephrectomy. *Life Sci* 19: 1323-1329.
- Matsui H, Yamamoto C. 1984. The possible involvement of adenylate cyclase inhibition in the field potential suppression through alpha-2 adrenergic receptors in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 293: 187-190.
- Moore RY. 1978. Catecholamin innervation of the basal forebrain. I. The septal area. *J Comp Neurol* 177: 665-684.
- Moore RY, Bloom FE. 1979. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu Rev Neurosci* 2: 113-168.
- Moore RY, Card JP. 1984. Noradrenaline containing neuron systems. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy* 2: 23-56.
- Moriguchi S, Ohzuru N, Koga N, Honda K, Saito R, Takano Y, Kamiya H. 1998. Central administration of a nitric oxide synthase inhibitor causes pressor responses via the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system in Wistar rats. *Neurosci Lett* 245: 109-112.

- Ohta H, Watanabe S, Ueki S. 1991. Cardiovascular changes induced by chemical stimulation of the amygdala in rats. *Brain Res Bull* 26: 575-581.
- Pacak K, McCarty R, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS. 1995. Effects of immobilization on in vivo release of norepinephrine in the bed nucleus of the stria terminalis in conscious rats. *Brain Res* 688: 242-246.
- Palij P, Stamford JA. 1992. Real-time monitoring of endogenous noradrenaline release in rat brain slices using fast cyclic voltammetry: 1. Characterisation of evoked noradrenaline efflux and uptake from nerve terminals in the bed nucleus of stria terminalis, pars ventralis. *Brain Res* 587: 137-146.
- Palij P, Stamford JA. 1993. Real-time monitoring of endogenous noradrenaline release in rat brain slices using fast cyclic voltammetry. 2. Operational characteristics of the alpha 2 autoreceptor in the bed nucleus of stria terminalis, pars ventralis. *Brain Res* 607: 134-140.
- Paxinos G, Watson C. 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sydney, third edition.
- Phelix CF, Liposits Z, Paull WK. 1992. Monoamine innervation of bed nucleus of stria terminalis: an electron microscopic investigation. *Brain Res Bull* 28: 949-965.
- Pirola CJ, Scheucher A, Balda MS, Dabsys SM, Finkielman S, Nahmod VE. 1987. Serotonin mediates cardiovascular responses to acetylcholine, bradykinin, angiotensin II and norepinephrine in the lateral septal area of the rat brain. *Neuropharmacology* 26: 561-566.
- Poole S. 1983. Cardiovascular responses of rats to intrahypothalamic injection of carbachol and noradrenaline. *Br J Pharmacol* 79: 693-700.
- Swaab DF, Nijveldt F, Pool CW. 1975. Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. *J Endocrinol* 67: 461-462.

- Sawada S, Yamamoto C. 1981. Postsynaptic inhibitory actions of catecholamines and opioid peptides in the bed nucleus of the stria terminalis. *Exp Brain Res* 41: 264-270.
- Severs WB, Daniels-Severs AE. 1973. Effects of angiotensin on the central nervous system. *Pharmacol Rev* 25: 415-449.
- Sofroniew MV. 1983. Direct reciprocal connections between the bed nucleus of the stria terminalis and dorsomedial medulla oblongata: evidence from immunohistochemical detection of tracer proteins. *J Comp Neurol* 213: 399-405.
- Swanson LW, Hartman BK. 1975. The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J Comp Neurol* 163: 467-505.
- Woulfe JM, Hryciyshyn AW, Flumerfelt BA. 1988. Collateral axonal projections from the A1 noradrenergic cell group to the paraventricular nucleus and bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Exp Neurol* 102: 121-124.
- Zandberg P, De Jong W, De Wied D. 1979. Effect of catecholamine-receptor stimulating agents on blood pressure after local application in the nucleus tractus solitarii of the medulla oblongata. *Eur J Pharmacol* 55: 43-56.

### Figure legends

**Fig. 1.** Changes in mean arterial pressure ( $\Delta$ MAP) and heart rate ( $\Delta$ HR) evoked by NA microinjection (3, 7, 10, 15, 30 or 45 nmol/100 nL) in the BST of unanesthetized rats (n=19). Circles represent means and bars the SEM. Dose–response curves were generated by nonlinear regression analysis and were statistically significant ( $\Delta$ MAP,  $r^2=0.98$  and  $\Delta$ HR,  $r^2=0.89$ ).

**Fig. 2.** Typical recordings showing MAP, pulsatile arterial pressure (PAP) and HR changes in response to NA (10 nmol /100 nL) microinjection into the BST of one unanesthetized rat.

**Fig.3.** Diagrammatic representation of sites of injections of NA into internal capsule (ic; closed circle), anterior commissure (ac; open circle) and stria terminalis (st; closed square). Coordinates based on the atlas of Paxinos and Watson (1997). ac- anterior commissure, BST: bed nucleus of the stria terminalis, f- fornix, IA- Interaural coordinate, ic- internal capsule, LSV: lateral septal-ventricle, LV- lateral ventricle, PS- parastrial nuclei, st- stria terminalis and 3V- third ventricle.

**Fig 4** (Left) Changes in mean arterial pressure ( $\Delta$ MAP) and heart rate ( $\Delta$ HR) in response to NA 10 nmol/ 100 nL into the BST of unanesthetized and anaesthetized rats (n=5). Columns represent the mean and the bars the SEM; \* $p < 0.05$ , paired Student's t-test. (Right) Time-course effects on the MAP and HR of the injection of NA 10 nmol/ 100 nL into the BST of unanesthetized and anaesthetized rats (n = 5). The injections were made at time 0. Circles represent the mean and bars the SEM; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

**Fig. 5** Changes in mean arterial pressure ( $\Delta$ MAP) and heart rate ( $\Delta$ HR) in response to NA 10 nmol/ 100 nL into BST before (open columns) and after (filled columns) i.v. pretreatment with saline (0.9% NaCl; 1 mL/ kg, n=4), dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP (d-Tyr, 50  $\mu$ g/ kg, n=5) or pentolinium (5 mg/ kg, n=5). Columns represent the mean and bars the SEM; \*p<0.05, paired Student's t-test.

**Fig. 6** Time-course of the effect of 10 nmol/ 100 nL of NA microinjected into the BST on MAP and HR before (open circles) or after (closed circles) i.v. pretreatment with pentolinium (5 mg / kg, n=5) or dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP (d-Tyr, 50  $\mu$ g / kg, n=5). NA injections were made at time 0. Circles represent the mean and bars the SEM; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

**Fig. 7** Photomicrography and diagrammatic representation, modified from the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1997), indicating the microinjection sites (closed circles) in the BST of the all animals used in the experiments. ac- anterior commissure, BST: bed nucleus of the stria terminalis, f- fornix, IA- Interaural coordinate, ic- internal capsule, LSV: lateral septal-ventricle, LV- lateral ventricle, PS- parastrial nuclei, st- stria terminalis and 3V- third ventricle.

Figure 1.

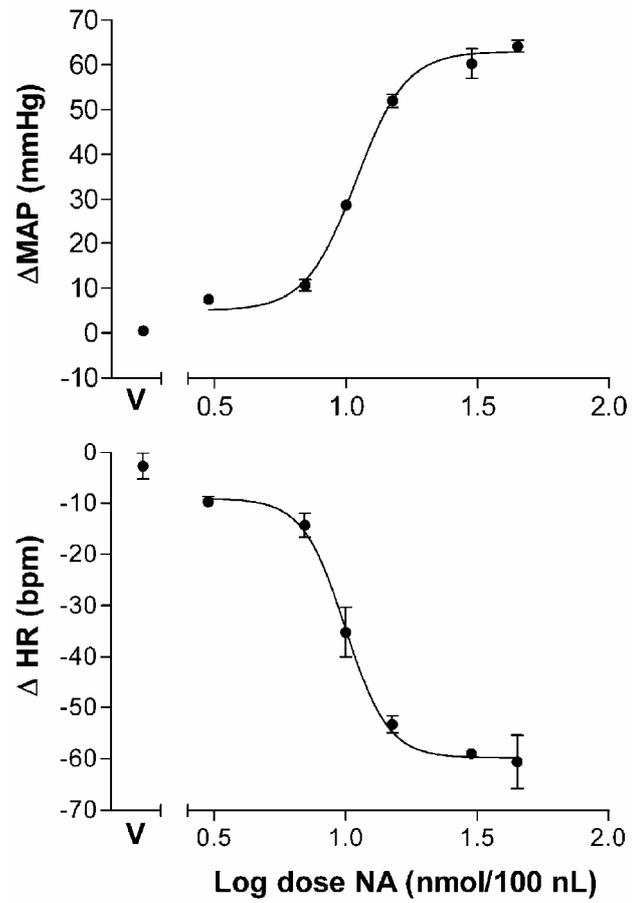


Figure 2.

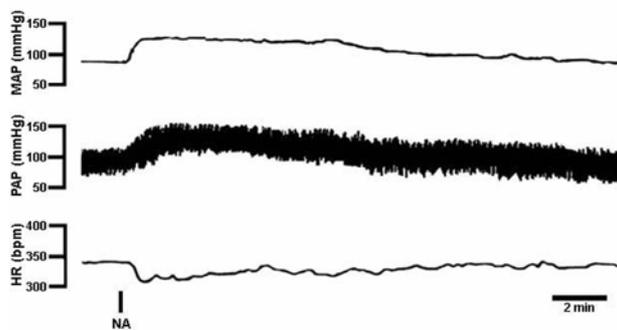


Figure 3.

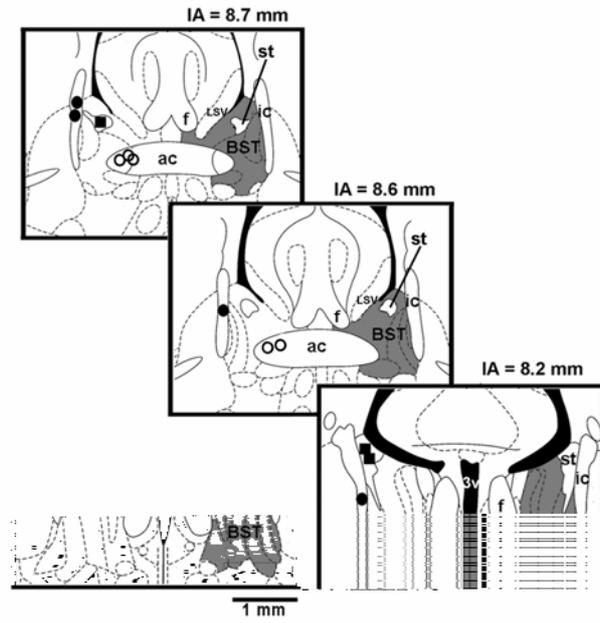


Figure 4.

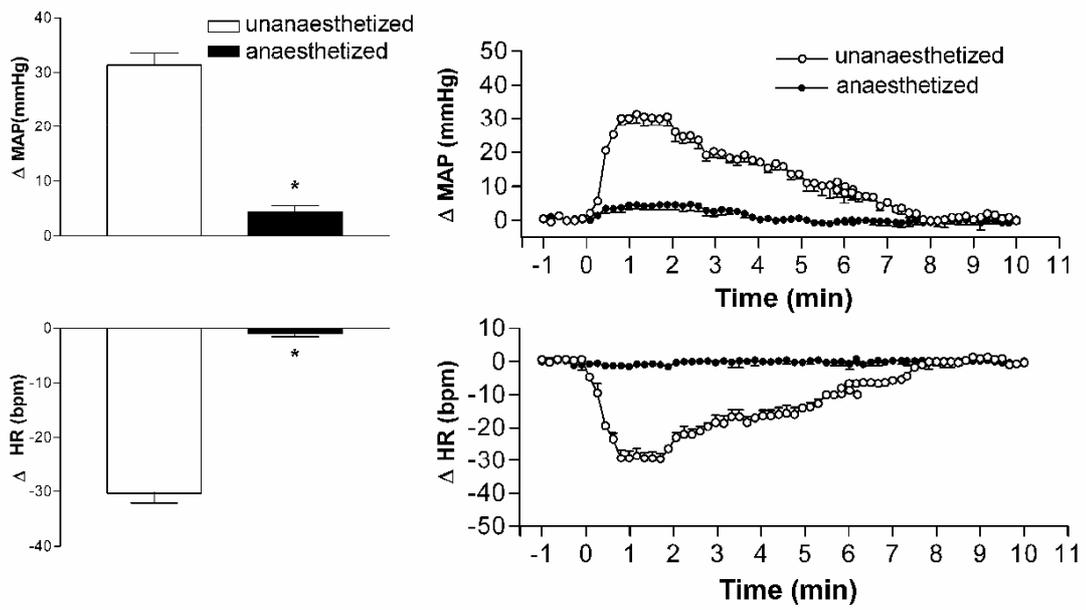


Figure 5.

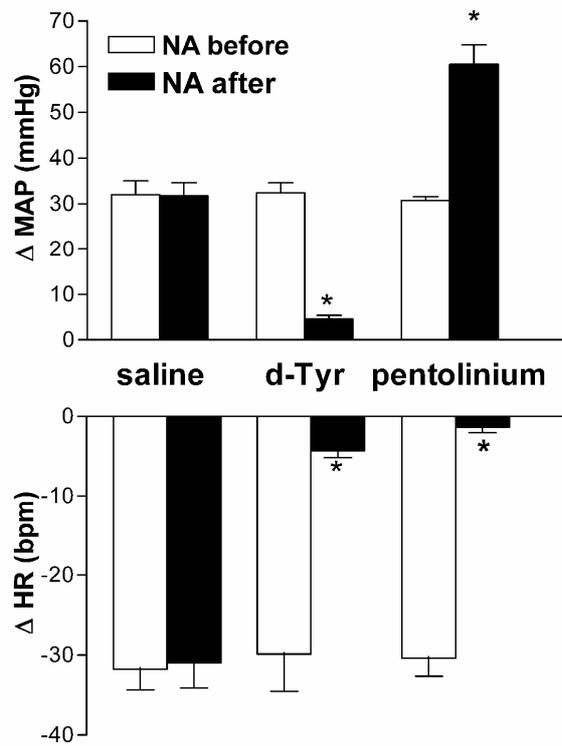


Figure 6.

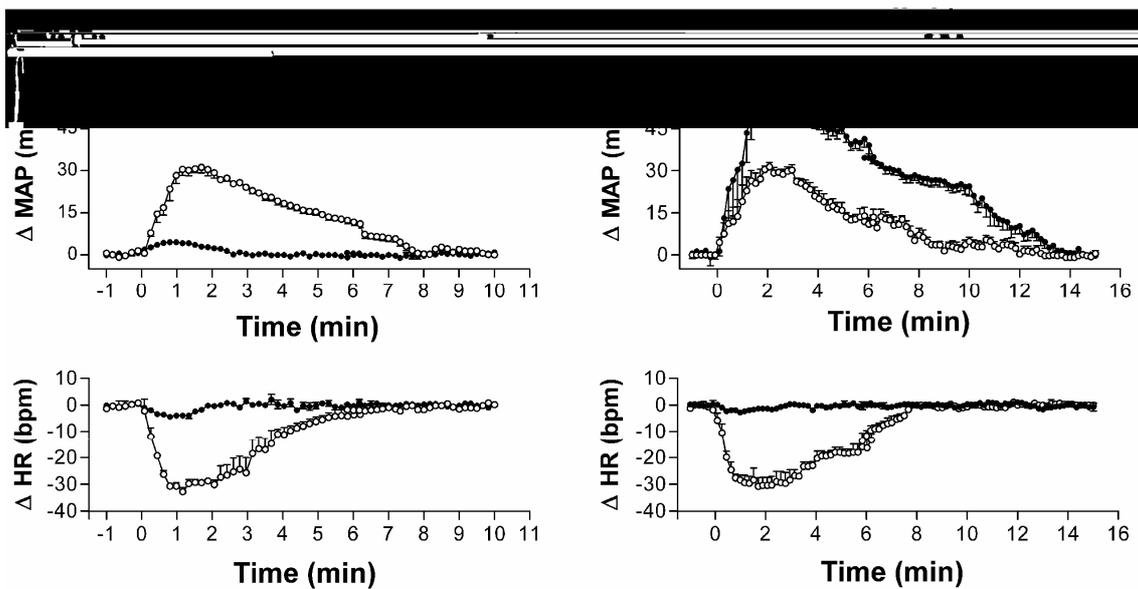
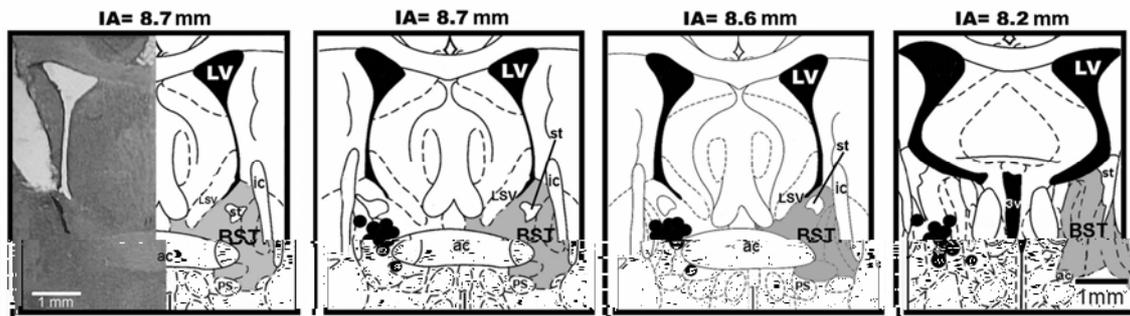


Figure 7.





# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)