

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

**Envolvimento da neurotransmissão  
noradrenérgica do córtex pré-frontal lateral na  
modulação do sistema cardiovascular  
em ratos.**

Fernando Henrique Ferrari Alves

Ribeirão Preto  
2010

# **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

**Envolvimento da neurotransmissão  
noradrenérgica do córtex pré-frontal lateral na  
modulação do sistema cardiovascular  
em ratos.**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em ciências. Área de concentração: Farmacologia.

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

Ribeirão Preto  
2010

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

Alves, Fernando Henrique Ferrari.

Envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do córtex pré-frontal lateral na modulação do sistema cardiovascular em ratos. Ribeirão Preto, 2010.  
150 p.: 31cm

Tese de Doutorado 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. Córtex pré-frontal lateral.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Fernando Henrique Ferrari Alves

Título: Envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do córtex pré-frontal lateral na modulação do sistema cardiovascular em ratos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Doutor 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. Hélio Zangrossi Júnior

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

Profº Dra. Sâmia Regiane Lourêngo Joca

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

Profº Dr. Laurival Antônio De Luca Junior

Instituição: UNESP      Assinatura: \_\_\_\_\_

Profª. Dra. Marli Cardoso Martins-Pinge

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

Apoio Financeiro:

**CNPq (processo: 870307/1997-5)**

**Dedico,**

*A minha mãe Maria José, por não medir esforços para que eu realizasse todos meus sonhos, por aliviar minhas angústias, por me ajudar e incentivar nos momentos difíceis e principalmente por me amar incondicionalmente.*

*Ao meu pai Agenor que me ensinou que é necessário esforço e dedicação para alcançar um objetivo, pelos conselhos dados com sabedoria e principalmente por me ensinar o que é ter dignidade.*

*Ao meu irmão Fabio, por toda a torcida e apoio em todos os momentos, pelo nosso amor e amizade.*

*A DEUS, por ter colocado cada uma dessas pessoas na minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa, por me receber em seu laboratório, por todo o respeito com que sempre me tratou, pela conduta profissional e pessoal que muito me ensina e se torna espelho para minha formação científica e pessoal e principalmente pela grande amizade. Ao senhor Prof. Morgan meu muito obrigado.

Aos membros dessa banca examinadora:

- Ao Prof. Dr. Hélio Zangrossi Junior, pela acessória científica durante todo o período do meu doutoramento e também pela disponibilidade em aceitar participar desta banca e pelas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

- Ao Prof. Laurival De Luca Jr., por aceitar participar desta banca, se deslocando de Araraquara até Ribeirão Preto e pelas sugestões que muito contribuíram para melhoria desse trabalho.

- A Prof. Dra. Sâmia R. L. Joca, por aceitar participar desta banca, por todas as sugestões que muito contribuíram para a melhoria desse trabalho e em especial por sua grande amizade.

- A Prof. Dra. Marli Martins-Pinge, por aceitar participar desta banca, por todo o esforço em se deslocar de Londrina até Ribeirão Preto e pelas sugestões que muito contribuíram para melhoria desse trabalho.

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



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

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

As "tias" Eliana e Maria Inês, por cuidarem dos animais com atenção e respeito.

A Diva por todo cuidado na lavagem do nosso material e por proporcionar boas risadas.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório:

- A Milena Vieira, por me acompanhar desde a graduação, me apoiar em todas as minhas decisões e por me incentivar nos momentos mais difíceis, meu muito obrigado.

- Ao agora Prof. Dr. Carlos Crestani por sempre me incentivar a estudar e a trabalhar duro, por me ajudar em todas as dificuldades e por ser meu grande companheiro dentro e fora do Laboratório. Um amigo que levo para vida.

- Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel, por toda preocupação que sempre direcionou a mim, pelos ensinamentos que muito contribuíram para minha formação, por estar sempre pronto a ensinar e ajudar e principalmente pela amizade dentro e fora do laboratório. Sou muito grato a você meu amigo

- Daniel Reis meu grande companheiro de longa data, por ser meu grande amigo, por me proporcionar momentos inesquecíveis.

- Cristiane Busnardo, por todo o carinho, amizade e por me dar a oportunidade de ser minha grande amiga.

- A América Scopinho, pela sua grande amizade e alegria que a todos contagia.

- Felipe Gomes pela grande amizade, rentáveis discussões científicas e pessoais que muito me divertem.

- Eduardo Fortaleza, Teofanes Neto e Silvana Lopes pela agradável convivência.

- Rodrigo Tavares por sua paciência e disponibilidade em ensinar e por toda atenção.

- Aos novos companheiros de laboratório. Nilson Junior, Denise Fabri, Sara Hott, Alessandra Fedoce, Laura Camargo, Lucas Rocha e Cibele.

- A todos os meus familiares, em especial, aos meus avós e tios, agradeço pelos conselhos que sempre contribuíram para o meu crescimento.

- Aos meus grandes amigos, Hermínio Mazaro, Pedro Ruete, Éder Ruete, Luiz Fernando Alves, Laura Alves, João Marcelo, Luciana Lourenço, Andréia Gutierrez, e Eduardo Camilo, por sempre me apoiarem e incentivarem, pela amizade e carinho que compartilhamos.

- Aos amigos do departamento Sabrina Lisboa, Tiago Garlet e Fernando Spiller pela amizade.

- Aos amigos que passaram pelo departamento, Sâmia Joca e Daniele Aguiar.

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

Ao CNPq pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

*“A ciência serve para nos dar uma idéia  
de quão extensa é a nossa ignorância.”*

Félicité Robert de Lamennais

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>17</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2 – OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
3.1- ANIMAIS.....	33
3.2- TÉCNICA DE IMPLANTE DE CÂNULA GUIA NO CPFL .....	33
3.2.1 - <i>Coordenadas utilizadas para o implante de cânulas guias no córtex pré-frontal lateral</i> .....	34
3.3 - CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS.....	35
3.4 - REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA .....	36
3.5 - MICROINJEÇÃO DE DROGAS NO CPFL .....	36
3.6 - ESTIMULAÇÃO BARORREFLEXA .....	36
3.7 - PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DA ATIVIDADE DO BARORREFLEXO. ....	37
3.8 - ESTRESSE POR RESTRIÇÃO .....	39
3.9 - DROGAS UTILIZADAS.....	39
3.10 - DETERMINAÇÃO ANATÔMICA DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO DAS DROGAS .....	40
3.11 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>4 – PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS</b> .....	<b>44</b>
4.1 - ESTUDO DOS EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE NA NO CPFL NA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DE RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	44
4.1.1 - <i>Efeitos cardiovasculares da administração de doses crescentes de NA no CPFL de ratos não anestesiados, construção da curva dose-resposta</i> .....	44
4.1.2 - <i>Efeitos cardiovasculares da administração repetida de NA no CPFL em ratos não anestesiados</i> .....	44
4.1.3 - <i>Efeitos cardiovasculares da administração de NA no CPFL em áreas circunvizinhas ao CPFL em ratos não anestesiados</i> .....	45
4.1.4 - <i>Efeitos cardiovasculares da administração de NA no CPFL em ratos anestesiados por uretana</i> .....	45
4.2 - ESTUDO DOS ADRENOCEPTORES ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À MICROINJEÇÃO DE NA NO CPFL DE RATOS NÃO-ANESTESIADOS.....	45
4.2.1 - <i>Efeito do pré-tratamento do CPFL com WB4101, 5-metil-urapidil ou RX821002 sobre as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados</i> .....	46
4.2.2 - <i>Respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de Fenilefrina no CPFL de ratos não anestesiados</i> .....	46
4.2.3 - <i>Efeito do pré-tratamento do CPFL com propranolol, sobre as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados</i> .....	46
4.3 - <i>Estudo dos mecanismos periféricos envolvidos nas respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL de ratos não-anestesiados</i> .....	47
4.3.1 - <i>Efeitos cardiovasculares do pré-tratamento sistêmico com pentolínio (bloqueador ganglionar), sobre as respostas à microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados</i> .....	47
4.3.2 - <i>Efeitos cardiovasculares do pré-tratamento sistêmico com dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP (composto de manning) (antagonista dos receptores vasopressinérgicos V<sub>1</sub>), sobre as respostas à microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados</i> .....	48
4.4 - ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA DO CPFL NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DO BARORREFLEXO.....	48
4.4.1- <i>Efeito do pré-tratamento do CPFL com Cobalto (CoCl<sub>2</sub>), sobre a resposta taquicárdica ou bradicárdica do barorreflexo em ratos não anestesiados</i> .....	49

4.4.2- Efeito do pré-tratamento do CPFL com antagonistas de adrenoceptores, sobre a resposta bradicárdica do barorreflexo em ratos não anestesiados.....	50
4.4.3 – Efeito da infusão de noradrenalina no CPFL nas respostas bradicárdicas barorreflexas.....	51
4.5 - ESTUDO DO PAPEL DESEMPENHADO PELO CPFL NO ER.....	52
4.5.1 - Efeito de um bloqueador de transmissão sináptica no CPFL sobre as respostas cardiovasculares ao ER.....	52
4.6. - ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA DO CPFL NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DURANTE O ER.....	53
4.6.1 - Efeitos da microinjeção bilateral com WB4101 ou RX821002 no CPFL sobre as respostas cardiovasculares ao ER.....	53
4.6.2 - Efeitos da microinjeção bilateral com propranolol no CPFL, sobre as respostas cardiovasculares ao ER.....	53
<b>5 - RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
5.1 - EFEITOS CARDIOVASCULARES DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE NA NO CPFL DE RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	55
5.2 - EFEITOS CARDIOVASCULARES DA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE NA NO CPFL EM RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	58
5.3 - RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À MICROINJEÇÃO DE NA EM ÁREAS CIRCUNVIZINHAS AO CPFL.....	60
5.4 - RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À MICROINJEÇÃO DE FENILEFRINA NO CPFL DE RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	62
5.5 - EFEITO DA ANESTESIA POR URETANA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À MICROINJEÇÃO DE NA NO CPFL.....	63
5.6 - EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DO CPFL COM WB4101, 5-METIL-URAPIDIL OU RX821002 SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À MICROINJEÇÃO DE NA NO CPFL DE RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	65
5.7 - EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DO CPFL COM PROPRANOLOL SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À MICROINJEÇÃO DE NA NO CPFL DE RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	73
5.8 - EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO SISTÊMICO COM SALINA, PENTOLÍNIU OU dTYR(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> (ME)AVP NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À MICROINJEÇÃO DE NA NO CPFL DE RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	75
5.9 - EFEITOS DA MICROINJEÇÃO UNILATERAL DE CoCl <sub>2</sub> NO LADO DIREITO OU ESQUERDO DO CPFL NA RESPOSTA BARORREFLEXA EM RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	82
5.10 - EFEITOS DA MICROINJEÇÃO BILATERAL DE LCA OU CoCl <sub>2</sub> NO CPFL NA RESPOSTA BARORREFLEXA EM RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	86
5.11 - EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DO CPFL COM WB4101, RX821002 OU PROPRANOLOL SOBRE A MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DO SISTEMA BARORREFLEXO EM RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	91
5.12 - EFEITO DA INFUSÃO UNILATERAL DE NORADRENALINA NO CPFL NA RESPOSTA BRADICÁRDICA BARORREFLEXA EM RESPOSTA A INFUSÃO INTRAVENOSA DE FENILEFRINA.....	96
5.13 - EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE LCA OU CoCl <sub>2</sub> NO CPFL NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DURANTE O ER.....	99
5.14 - EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE WB4101 NO CPFL NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DURANTE O ER.....	104
<b>6 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>114</b>
6.1 - MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À MICROINJEÇÃO DE NA NO CPFL.....	114
6.2 - PARTICIPAÇÃO DO CPFL E O ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA DO CPFL NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DO BARORREFLEXO.....	120
6.3 - PARTICIPAÇÃO DO CPFL E O ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA DO CPFL NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DURANTE O ESTRESSE POR RESTRIÇÃO.....	126
<b>7 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>131</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>133</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>145</b>

*RESUMO*

## RESUMO

O córtex pré-frontal lateral (CPFL) é uma estrutura encefálica envolvida no controle do sistema cardiovascular. Respostas cardiovasculares foram relatadas após estimulação elétrica ou química do CPFL. As respostas têm como substrato neural suas conexões com estruturas envolvidas no controle da atividade cardiovascular, tais como o núcleo dorsal do vago (NDV) e o núcleo do trato solitário (NTS).

Dentre os neurotransmissores presentes no CPFL, a noradrenalina (NA) aparece como possível moduladora do sistema cardiovascular. Estudos prévios já demonstraram a participação do sistema noradrenérgico presente no CPFL na modulação da atividade cardiovascular durante situações comportamentais. No presente estudo nós observamos que a microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados causou respostas pressoras e bradicárdicas de maneira dose-dependente, sendo que tais respostas foram bloqueadas pelo pré-tratamento do CPFL com WB4101 (15 nmol/100nL) ou 5-metil-urapidil (15 nmol/100nL), antagonistas seletivos de adrenoceptores  $\alpha_1$ . Todavia, o pré-tratamento com antagonista de receptores  $\alpha_2$  RX821002 (15 nmol/100nL) ou o pré-tratamento com antagonista não seletivo de adrenoceptores  $\beta$ , propranolol (15 nmol/100nL), não alterou as respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no CPFL. Esses dados nos sugerem que os adrenoceptores do subtipo  $\alpha_1$ , presentes no CPFL, medeiam as respostas cardiovasculares à microinjeção local de NA.

O pré-tratamento sistêmico com o bloqueador ganglionar pentolínio (5mg/kg) potencializou a resposta pressora à microinjeção de NA no CPFL, sendo que o pré-tratamento com dTir(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me) AVP (50µg/kg), um antagonista de receptores vasopressinêrgicos V<sub>1</sub>, foi capaz de bloquear tanto o aumento da pressão arterial (PA) quanto a queda na frequência cardíaca (FC) causada pela microinjeção de NA no CPFL. Assim, estes dados sugerem que as respostas cardiovasculares decorrentes da microinjeção de NA no CPFL são mediadas pela liberação do hormônio vasopressina na circulação sistêmica.

Nós também estudamos o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do CPFL na modulação da resposta bradicárdica do barorreflexo. A microinjeção bilateral no CPFL do WB4101 (15 nmol/100nL) causou um aumento no ganho da resposta bradicárdica reflexa decorrente de aumentos da pressão arterial (PA) induzida pela infusão intravenosa de fenilefrina, o que sugere que a ativação de adrenoceptores  $\alpha_1$  no CPFL tem uma influência inibitória sobre a resposta bradicárdica do barorreflexo. Microinjeção bilateral no CPFL do RX821002 (15 nmol/100nL) ou de propranolol (15 nmol/100nL) não afetou a atividade do barorreflexo. Entretanto, a infusão de NA no CPFL durante a estimulação do barorreflexo causou repostas inversas àquelas encontradas com a microinjeção do antagonista de adrenoceptores  $\alpha_1$  WB4101 e além disso, esse efeito da infusão de NA foi bloqueado pelo pré-tratamento com WB4101, o que mostra que, de fato, a neurotransmissão noradrenérgica no CPFL participa da modulação da atividade do barorreflexo.

Por fim, investigamos o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do CPFL nas respostas cardiovasculares durante o estresse por



restrição. Foi observado que a administração bilateral de  $\text{CoCl}_2$  ou de doses crescentes de WB4101 no CPFL, reduziu a resposta pressora e taquicárdica causada pelo estresse por restrição. Além disso, o pré-tratamento do CPFL com RX821002 reduziu significativamente a resposta pressora sem alterar a resposta taquicárdica durante o estresse por restrição. O pré-tratamento do CPFL com propranolol não alterou significativamente as respostas cardiovasculares ao estresse por restrição. Esses dados sugerem que a neurotransmissão noradrenérgica no CPFL participa da regulação da atividade cardiovascular durante situações de estresse e que os diferentes tipos de adrenocetores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  participam nessa modulação.

*ABSTRACT*

## ABSTRACT

The lateral prefrontal cortex (LPFC) is a cortical structure that is involved in the cardiovascular system control. Cardiovascular responses were related after LPFC electric or chemical stimulus. Thus, the neurotransmission present in the LPFC might be involved in the modulation of cardiovascular system. Responses have as neural substrate, their connections with structures involved in the cardiovascular activity control such as the dorsal nucleus of vago and the nucleus of the solitary tract.

Between the neurotransmitters present in the LPFC, noradrenaline (NA) appears as a putative modulator of the cardiovascular system. Previous studies already showed the participation of the noradrenergic system, present in CPFL, modulating cardiovascular system activity during behavioral situations. In this study, we observed that NA microinjection in the LPFC of unanesthetized rats caused long-lasting dose-related pressor and bradycardiac responses and that these cardiovascular responses caused by the NA microinjection in the LPFC were blocked by LPFC pretreatment with WB4101 (15 nmol/100nL) or 5-metil-urapidil (15 nmol/100nL), selective  $\alpha_1$ -adrenoceptors antagonists. However, the pretreatment with RX821002 (15 nmol/100nL) selective  $\alpha_2$ -adrenoceptors receptor antagonist or pre-treatment with propranolol (15 nmol/100nL) a non selective  $\beta$ -adrenoceptors antagonist, have not changed cardiovascular responses caused by the NA microinjection in the CPFL. These data suggest that the subtype  $\alpha_1$ -adrenoceptors, present in CPFL, mediate the cardiovascular responses to NA microinjection in the LPFC.

Systemic pre-treatment with the ganglion blocker pentolinium (5mg/kg) has potentiated the pressor response to NA microinjection in the LPFC and the pre-treatment with dTir(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me) AVP (50µg/kg), a V<sub>1</sub>-vasopressin receptor antagonist, was able to blockade the blood pressure increase as well as the FC decrease caused by the NA microinjection in the LPFC. Thus, these data suggest that cardiovascular responses coming from the NA microinjection in the LPFC are mediated by the release of vasopressin hormone to the systemic circulation.

We also have studied the involvement of LPFC noradrenergic transmission in the modulation of bradycardic responses of baroreflex. Bilateral microinjection of WB4101 in the LPFC increased the gain of reflex bradycardia in response to mean arterial pressure (MAP) increases evoked by intravenous infusion of phenylephrine, suggesting that  $\alpha_1$ -adrenoceptors activation in the LPFC has an inhibitory influence on baroreflex modulation. In addition, bilateral microinjection of equimolar doses of either the selective  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist RX821002 or the non-selective  $\beta$ -adrenoceptor antagonist propranolol into the IC did not affect the baroreflex response. However, NA infusion in the CPFL during the baroreflex stimulation, have caused inverse responses comparing to the findings with the WB4101 antagonist microinjection, showing that, in fact, LPFC noradrenergic neurotransmission participates in baroreflex activity modulation.

Finally, we have investigated the involvement of CPFL noradrenergic neurotransmission in cardiovascular responses during acute stress. It has been observed that CoCl<sub>2</sub> or the bilateral administration or crescent doses of WB4101 in

LPFC, decreased restraint-evoked pressor and tachycardiac responses generated by acute stress. Furthermore, LPFC pretreatment with RX821002 decreased only restraint-evoked pressor caused by acute stress, without change the tachycardiac responses. CPFL pre-treatment with propranolol have not significantly changed cardiovascular responses by acute stress. These data suggested that LPFC-noradrenergic neurotransmission participates in the regulation of cardiovascular activity during stress situations and those different types of adrenoceptors  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  play a role in this modulation.

# *INTRODUÇÃO*

## 1 - INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular desempenha um papel fundamental na perfusão tecidual, garantindo uma distribuição adequada do fluxo sanguíneo aos diferentes órgãos e tecidos do corpo, suprindo suas necessidades nutricionais e respiratórias (Spyer, 1994; Taylor *et al.*, 1999; Guyenet, 2006).

Diversos mecanismos reguladores cardiovasculares existem, os quais atuam isoladamente ou combinadamente, com o objetivo final de garantir adequado volume sanguíneo circulante e pressão arterial e venosa sistêmicas estáveis, dentro dos limites fisiológicos estabelecidos para cada espécie; uma vez que, o volume sanguíneo e a pressão circulatória são as duas variáveis hemodinâmicas que se constituem nos alvos finais da regulação cardiovascular (Donoghue *et al.*, 1982; Spyer, 1982; Guyenet, 2006).

O controle do sistema cardiovascular pode ser dividido em três níveis distintos, segundo uma organização hierárquica:

1° - Controle local exercido pela atividade miogênica do músculo liso vascular e do miocárdio, assim como por substâncias vasoativas liberadas pelo endotélio vascular;

2°- Controle autonômico, feito por estruturas neurais bulbares e controle por centros neurais suprabulbares (Brody *et al.*, 1987; Folkow, 1987);

3°- Participação de fatores hormonais tais como os sistemas vasopressinérgicos e o sistema renina-angiotensina que promovem o ajuste da pressão arterial (PA) a longo prazo, tanto por alterar o volume hídrico e conseqüentemente o volume

sanguíneo quanto por possuir atividade vasoconstritora (Cowley *et al.*, 1983; Cowley e Liard, 1988; Szczepanska-Sadowska, 1996).

Adicionalmente, mecanismos reflexos, como o barorreflexo, quimiorreflexo e o reflexo cardiopulmonar permitem um ajuste instantâneo da PA em resposta a alterações posturais, respiratórias e de volume sanguíneo (Dampney, 1994; Guyenet, 2006; Michelini, 2007)

Centros bulbares são os responsáveis pela manutenção do tônus pressórico geral e pelo controle da PA através dos mecanismos reflexos cardiovasculares, tais como o barorreflexo, quimiorreflexo e o reflexo cardiopulmonar (Dampney, 1994; Sapru, 2002). As terminações das fibras aferentes dos reflexos cardiovasculares estão localizadas no núcleo do trato solitário (NTS) (Miura e Reis, 1969; Dampney, 1994). Os neurônios da área rostral do bulbo ventrolateral (rBVL) determinam o tônus simpático, participando assim na manutenção da PA e frequência cardíaca (FC) basal (Feldberg e Guertzenstein, 1972; Dampney e Moon, 1980), além de mediar as alterações no componente simpático dos reflexos cardiovasculares (Granata *et al.*, 1983).

Duas outras áreas bulbares denominadas núcleo ambíguo e núcleo motor dorsal do vago (NDV) é onde estão localizados os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos (Mcallen e Spyer, 1976), mediando o tônus parassimpático cardíaco e o componente parassimpático dos reflexos cardiovasculares (Taylor *et al.*, 1999).

Além dos centros bulbares, estruturas suprabulbares também estão envolvidas na regulação do sistema cardiovascular. Foi relatado o envolvimento no controle cardiovascular de estruturas ventrais e dorsais da ponte como o



núcleo braquial, o núcleo Kolliker-Fuse e o grupo de células A5; estruturas mesencefálicas como a substância cinzenta periaquedutal (SCP) e estruturas prosencefálicas incluindo o hipotálamo, núcleos da amígdala, regiões específicas do córtex como, por exemplo, o córtex pré-frontal (CPF) (Dampney, 1994; Verberne e Owens, 1998).

O CPF é uma região límbica, que integra informação sensorial e visceral de receptores periféricos e têm sido implicado no controle da atividade autonômica (Anand e Dua, 1956; Delgado, 1960; Neafsey, 1990; Resstel e Correa, 2006). O CPF de mamíferos têm sido classicamente definido e delineado através de critérios anatômicos como, por exemplo, características cito - arquitetônicas (granular vs agranular) (Leonard, 1969), conectividade com o núcleo talâmico médio (Leonard, 1969; Krettek e Price, 1977; Goldman-Rakic e Porrino, 1985; Barbas, 1988; Gorelova e Yang, 1997), projeções de fibras dopaminérgicas do mesencéfalo ventral ou a combinação de todos esses critérios (Divac, 1971; Thierry *et al.*, 1973; Beckstead, 1976; Divac *et al.*, 1985).

O CPF é topograficamente subdividido em três principais regiões. Primeira, o córtex pré-frontal medial (CPFM) que constitui a maior porção da parede medial do hemisfério anterior e dorsal do corpo caloso (CC). Segunda, que se localiza na porção dorsal da extremidade caudal do bulbo olfatório que é denominada córtex pré-frontal orbital (CPFO). Terceira, localizada lateralmente que é referido como o córtex pré-frontal lateral (CPFL) ou córtex insular (CI) que em ratos é localizada na parte inferior do sulco rinal e se estende rostralmente aos níveis do bulbo olfatório e caudalmente a níveis da amígdala (Paxinos e Watson, 1997)

As primeiras evidências experimentais do envolvimento do córtex cerebral em alterações cardiovasculares surgiram em 1875, quando Schiff observou que a estimulação elétrica do córtex de cães causava aumento na FC. Esses resultados foram confirmados por Danilewsky (1875), Bochefontaine (1876) e Richet (1898) (citados em (Hoff *et al.*, 1963).

Em relação à participação específica do CPFL na modulação da atividade cardiovascular, foi demonstrado inicialmente que a estimulação elétrica dessa estrutura desencadeia tanto aumento quanto queda da PA e FC, dependendo da região do CPFL estimulada (Ruggiero *et al.*, 1987; Hardy e Holmes, 1988; Hardy e Mack, 1990; Yasui *et al.*, 1991) e que, essas respostas seriam decorrentes de aumento ou queda na atividade simpática renal, respectivamente (Cechetto e Chen, 1992). Além disso, nesse mesmo estudo os autores demonstraram que essas respostas dependiam de sinapses presentes no hipotálamo lateral (HL) (Cechetto e Chen, 1992), estrutura conhecida por modular respostas cardiovasculares (Pajolla *et al.*, 2005; Crestani, Deolindo *et al.*, 2009). Posteriormente, estudos demonstraram que essas respostas eram mediadas por receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA presentes no HL (Butcher e Cechetto, 1998).

Foi demonstrado também, que a estimulação química do CPFL desencadeia respostas cardiovasculares, sendo que a microinjeção do aminoácido excitatório ácido D,L-homocisteico no CPFL causa tanto aumento quanto queda na PA e FC em ratos anestesiados, dependendo da região estimulada (Yasui *et al.*, 1991), enquanto que em animais não anestesiados causa aumento da PA e

queda na FC (Butcher e Cechetto, 1995), sugerindo dessa forma o envolvimento desta estrutura na modulação do sistema cardiovascular.

Estudos utilizando técnicas de tracejamento neuronal, demonstraram que o CPFL apresenta projeções para regiões conhecidamente envolvidas na modulação do sistema nervoso autonômico, tais como o HL, a amígdala, o núcleo leito da estria terminal (NLET) e o NTS (Yasui *et al.*, 1991), as quais poderiam constituir substrato neuroanatômico para as respostas cardiovasculares observadas durante a estimulação elétrica ou química do CPFL.

O sistema noradrenérgico tem sido descrito como um importante sistema envolvido no controle da atividade cardiovascular em diversas situações fisiológicas e comportamentais (Siuta *et al.*, ; Tully e Bolshakov, ; Scopinho *et al.*, 2006). Respostas cardiovasculares têm sido descritas após a microinjeção de noradrenalina (NA) em diversas estruturas do sistema nervoso central, como por exemplo, o NTS (Zandberg *et al.*, 1979), área septal lateral (ASL) (Scopinho *et al.*, 2006), amígdala (Ohta *et al.*, 1991) e o NLET (Crestani *et al.*, 2007; 2008).

O CPFL é uma das principais áreas corticais que recebem inervação noradrenérgica, originária principalmente do *locus coeruleos* (LC) e que possui um importante papel na regulação da função cortical (Ungerstedt, 1971; Morrison *et al.*, 1979; Sara e Segal, 1991). Além disso, estudos utilizando a técnica de autoradiografia demonstraram a presença de diferentes tipos de adrenoceptores no CPFL (Young e Kuhar, 1980), demonstrando uma ativa neurotransmissão noradrenérgica no CPFL.

A neurotransmissão noradrenérgica presente no CPFL têm sido implicada em diversas situações tanto fisiológicas quanto comportamentais como,

por exemplo, na modulação da termogênese, no comportamento de ingestão de alimentos (Mcgregor *et al.*, 1991) e em patologias como por exemplo o déficit de atenção (Kim *et al.*). Estudos também demonstraram que em animais que sofreram estresse pré-natal tinham uma diminuição da neurotransmissão noradrenérgica no CPFL, que poderiam contribuir para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na adolescência ou idade adulta (Carboni *et al.*). Embora já se saiba a importância da neurotransmissão noradrenérgica e da participação do CPFL na modulação da atividade cardiovascular não existem evidências a cerca do envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do CPFL na modulação da atividade cardiovascular.

Um dos principais mecanismos reflexo neural de regulação do sistema cardiovascular é o sistema barorreflexo (Nosaka, 1996; Lanfranchi e Somers, 2002; Resstel e Correa, 2006). Os barorreceptores são terminações nervosas livres que estão localizados no arco aórtico e nos seios carotídeos que são ativados segundo a segundo pelas flutuações da PA sistêmica (La Rovere *et al.*, 2008). A ativação desses barorreceptores por um aumento na PA causa um aumento da resposta cardio-inibitória vagal e uma diminuição da atividade do sistema nervoso simpático, causando assim uma diminuição da resistência vascular periférica e uma diminuição do tônus cardíaco (La Rovere *et al.*, 2008).

Diversos estudos vêm demonstrando a participação do CPFL nessa modulação. A lesão eletrolítica unilateral (lado esquerdo) do CPFL causou um aumento do ganho das respostas bradicárdicas sem afetar significativamente as respostas taquicárdicas, o que não aconteceu quando houve a lesão eletrolítica do lado direito do CPFL, que por sua vez, não afetou significativamente nem as

respostas taquicárdicas e nem as respostas bradicárdicas do barorreflexo (Zhang *et al.*, 1998).

Diferentes resultados foram encontrados quando os estudos foram realizados utilizando a microinjeção de lidocaína (anestésico local, que tem como mecanismo de ação o bloqueio de canais de sódio do tipo voltagem-dependente), bilateralmente no CPFL, que demonstraram uma diminuição do ganho das respostas bradicárdicas do barorreflexo (Saleh e Connell, 1998). Entretanto, tanto os resultados de lesão eletrolítica quanto os de microinjeção de lidocaína no CPFL descritos acima foram realizados em animais anestesiados e já se sabe que a função do sistema barorreflexo é afetada pelo uso da anestesia (Fluckiger *et al.*, 1985; Shimokawa *et al.*, 1998).

Outros autores demonstraram em modelos animais de acidente vascular cerebral (AVC), causados pela oclusão da artéria cerebral média, que a bradicardia reflexa também era afetada sem diferenças significantes nas respostas taquicárdicas do barorreflexo (Saad *et al.*, 1989). Esses estudos citados acima nos trazem uma idéia da possível participação do CPFL na modulação da atividade barorreflexa. Entretanto os usos da lidocaína ou de lesão eletrolítica não trazem informações exatas a respeito do envolvimento da neurotransmissão presente no CPFL na modulação da atividade do barorreflexo, uma vez que o uso dessas técnicas não se limitam a atuar apenas sobre neurônios intrínsecos à área, mas também tem influência sobre fibras de passagem que podem de alguma maneira influenciar nos resultados observados. Diante disso, não existem evidências acerca do real envolvimento do CPFL, em particular da neurotransmissão noradrenérgica local sobre a modulação da atividade do barorreflexo.

Apesar da demonstração da participação do CPFL na regulação do sistema cardiovascular, a função desta regulação ainda não foi esclarecida. Diversos estudos vêm demonstrando a participação do CPFL na modulação de respostas comportamentais como, por exemplo, o medo condicionado (Stehberg e Simon), ansiedade (Lacroix *et al.*, 2000), memória (Wang *et al.*).

Acredita-se que respostas cardiovasculares observadas após estimulação do CPFL estariam associadas ao componente fisiológico da resposta comportamental a um estímulo estressante, uma vez que existe uma estreita correlação neuroanatômica e funcional entre o CPFL e estruturas cerebrais envolvidas tanto no controle comportamental quanto no cardiovascular (Cechetto e Chen, 1990). Corroborando tal assertiva, Funk and Stewart (1996) demonstraram que o aumento da PA e FC causados pelo pinçamento de cauda em ratos eram acompanhados por um aumento de NA no CPF. Além disso, essas respostas cardiovasculares eram atenuadas pela administração local no CPFL de antagonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Funk e Stewart, 1996). Esse estudo não apenas dá suporte ao envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do CPFL na mediação de respostas cardiovasculares durante o estresse, como também sugere a participação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos nesse processo.

Já se sabe que exposição a estímulos estressantes como, por exemplo, estresse por imobilização, associação a um estímulo aversivo (medo condicionado), dentre outros, são capazes de promover alterações no sistema cardiovascular (Lam *et al.*, 1995; Kaehler, Sinner, Kouvelas *et al.*, 2000; Kaehler, Sinner e Philippu, 2000; Kubo *et al.*, 2002; Resstel e Correa, 2006).

Há um crescente interesse na utilização de modelos animais de estresse, uma vez que, resultados com diferentes tipos de modelos de situações de estresse tem auxiliado na compreensão dos aspectos emocionais em humanos.

Um modelo experimental capaz de gerar respostas cardiovasculares associadas ao estresse é o modelo de restrição de movimentos (ER). O ER é um estímulo aversivo, inescapável, não condicionado, que desencadeia respostas autonômicas, caracterizadas por aumentos da PA e FC (Kubo *et al.*, 2002; Tavares e Correa, 2006; Tavares, Correa *et al.*, 2009). Esses aumentos na PA e FC durante situações de estresse são possíveis, pois há um remodelamento no “*set point*” do barorreflexo, que permite aumentos simultâneos de PA e FC (Crestani *et al.*, 2010). Além disso, essas respostas cardiovasculares são associadas a um aumento na atividade simpática, nos níveis de catecolaminas e glicocorticóides circulantes (De Boer *et al.*, 1990; Burke *et al.*, 1998).

Estudos demonstraram que durante o estresse por restrição há um aumento significativo da expressão da proteína *c-fos*, no CPFL de ratos (Cullinan *et al.*, 1995), sugerindo uma ativação do CPFL durante situações de estresse.

Baseado nas evidências acima, as hipóteses do presente estudo são que a microinjeção de noradrenalina no CPFL de ratos não anestesiados cause respostas cardiovasculares e que a neurotransmissão noradrenérgica presente no CPFL participa da modulação da atividade barorreflexa e na modulação da atividade cardiovascular durante situações de estresse.

## *OBJETIVOS*



## **2 – OBJETIVOS**

O objetivo geral desta tese foi verificar o papel da neurotransmissão noradrenérgica do CPFL na circuitaria central envolvida na modulação da atividade cardiovascular, bem como, no controle das respostas cardiovasculares associadas à exposição a estímulos aversivos. Dessa maneira, essa tese teve como objetivos específicos:

**2.1** - Estudar o efeito da microinjeção de noradrenalina no CPFL, bem como os possíveis receptores centrais envolvidos nessa modulação

**2.2** - Estudar o mecanismo periférico envolvido na resposta à microinjeção de NA no CPFL.

**2.3** - Estudar a participação do CPFL na modulação da atividade do barorreflexo, bem como descrever os tipos de receptores noradrenérgicos envolvidos nessa modulação.

**2.4** - Verificar a participação do CPFL nas respostas cardiovasculares induzidas pelo ER.

**2.5** - Estudar o papel da neurotransmissão noradrenérgica do CPFL nas respostas cardiovasculares induzidas pelo ER.

## *MATERIAL E MÉTODOS*

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1- Animais**

Foram utilizados ratos Wistar, 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 coletivas, com acesso livre a ração granulada (Nuvital, Dois Visinhos, Paraná) e água, e submetidos à alternância de luz (12h claro/ 12h escuro).

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (processo: 167/2007)

#### **3.2 - Técnica de implante de cânula guia no CPFL**

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (Aldrich Chemical Co. Inc.) na dose de 250 mg/Kg por via intraperitoneal (i.p.). 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, foram injetados 0,3 ml de solução de lidocaína com vasoconstritor (3% de fenilefrina, 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 perióstio. 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 Paxinos e Watson (1997). O bregma foi utilizado como ponto de referência para a coordenada lateral.

### **3.2.1 - Coordenadas utilizadas para o implante de cânulas guias no córtex pré-frontal lateral**

Ântero-posterior: +11,7 mm em relação à interaural;

Lateral: + 4 mm a partir da sutura média;

Vertical: -4,5 mm em relação ao osso;

Incisivo = -3,2 mm.

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). 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 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 um poli-antibiótico veterinário com estreptomicina e penicilina (i.m., 0.27 mg/kg, Pentabiótico, Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil) por via intramuscular (i.m.) para prevenir infecção, além do anti-inflamatório flunixin meglumine (2.5 mg/kg, i.m.; Banamine®, Schering Plough, Cotia, SP, Brasil para analgesia pós-operatória.

### 3.3 - Canulação da artéria e veia femorais

Setenta e duas horas após a implantação das cânulas guias no SNC, os animais foram anestesiados novamente com tribromoetanol (250 mg/Kg, i.p.). Foram implantados cateteres na artéria femoral, e quando necessário na veia femoral. Estes vasos foram dissecados e cateteres de polietileno foram introduzidos até a artéria aorta abdominal inferior ou veia cava, respectivamente.

Os cateteres foram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) (4-5 cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) (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. Os experimentos foram realizados 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 realização dos experimentos. Como medida profilática, ao final da cirurgia os animais receberam novamente o anti-inflamatório flunixin meglumine (2,5 mg/Kg, i.m.) (2.5 mg/kg, i.m.; Banamine®, Schering Plough, Cotia, SP, Brasil para analgesia pós-operatória.

### **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 nos cateteres, evitando obstruções. O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EUA) por um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial pulsátil foi registrada usando um pré-amplificador (HP7754-A, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EUA) e uma placa de aquisição de dados (MP100A, Biopac systems Inc. Goleta, CA, EUA) conectado a um computador. A pressão arterial média (PAM) e FC foram derivadas da pressão arterial pulsátil e processadas *on-line*.

### **3.5 - Microinjeção de drogas no CPFL**

As drogas administradas no CPFL foram dissolvidas em líquido cefalorraquidiano artificial (LCA). As agulhas injetoras (33 G, Small Parts, Miami Lakes, FL, USA) que foram utilizadas para microinjeção das drogas foram 1 mm mais longa do que a cânula guia fixada ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2  $\mu$ l (7001-KH, Hamilton, Reno, NV, USA) através de um tubo de polietileno (PE-10). As drogas foram injetadas no volume de 100nL.

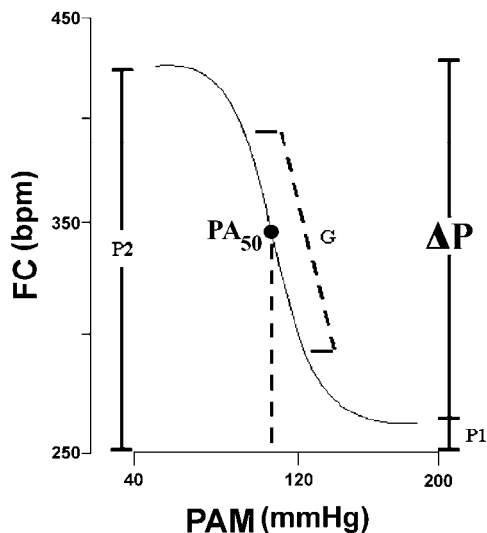
### **3.6 - Estimulação barorreflexa**

A estimulação dos barorreceptores arteriais foi realizada por infusão i.v. de fenilefrina (agonista dos receptores  $\alpha_1$ ) (50  $\mu$ g/mL) causando efeito pressor ou nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico) (NPS, 50  $\mu$ g/mL) causando efeito depressor, utilizando-se uma bomba de infusão (KD Scientific, Holliston, MA,

USA) (Alves *et al.*, 2009a; Crestani, Deolindo *et al.*, 2009). O cateter da veia femoral foi conectado através de um tubo de polietileno PE-50 a uma seringa de 1 mL preenchida com a solução vasoativa. A seringa, por sua vez, foi montada na bomba de infusão a qual foi programada para uma velocidade de infusão de 0,34 mL/min/Kg, para a fenilefrina e 0,08 mL/min/Kg para o NPS. Sob estas condições foi possível a obtenção de uma variação na pressão arterial (pressora ou depressora) entre 50 a 60 mmHg em um período de tempo de 40 a 50 segundos de infusão.

### **3.7 - Padronização do método de análise da atividade do barorreflexo.**

Após a infusão dos agentes vasoativos os dados registrados (PAM e FC) foram analisados para a observação da atividade do barorreflexo. A análise foi feita relacionando os pontos da variação de PAM com a variação da FC reflexa correspondente. Utilizando os pontos obtidos da correlação na variação da PA e FC durante as infusões de fenilefrina e NPS, foram traçadas curvas sigmóides como descrito na literatura (Korner *et al.*, 1972). A avaliação de cada curva sigmóide foi feita com base em três parâmetros (Quadro 1): 1- variação da FC ( $\Delta P$ , bpm, diferença entre os valores máximos e mínimos dos platôs da frequência cardíaca); 2- Pressão arterial média ( $PA_{50}$ , mmHg, valor de PAM que promove 50% de variação na FC) e 3- Variação do ganho (G, bpm/ mmHg, é a variação da inclinação da curva).



**Quadro 1** Parâmetros da curva sigmóide do barorreflexo relacionando frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM). P1 (bpm), platô mínimo da frequência cardíaca. P2 (bpm), platô máximo da frequência cardíaca. (P (bpm), diferença entre P1 e P2. PA<sub>50</sub> (mmHg), média da pressão arterial quando a frequência cardíaca variar 50%. G, ganho (inclinação da curva).

Partindo dos mesmos pontos obtidos da correlação dos valores de PAM e FC correspondente, foram traçadas curvas de regressão linear e determinada a atividade do barorreflexo separando a atividade barorreflexa durante o efeito pressor e depressor na PA. O valor da FC para cada valor de PA foi assumido decorrido 1,2 s. Este retardo na resposta reflexa da FC deve-se a dois fatores: o tempo de processamento das sinapses do barorreflexo, que de acordo com estudos de (Su *et al.*, 1992), é de aproximadamente 700 ms e o retardo eletrônico do próprio sistema de registro, que é de aproximadamente 500 ms.



### 3.8 - Estresse por restrição.

O tubo de restrição forçada é constituído por um segmento de PVC com assoalho plano, elevado a 5 cm do chão, medindo 15 cm de comprimento e 6,5 cm de diâmetro, permitindo assim, a imobilização do animal em posição normal. O rato permaneceu no tubo por 1 h, sendo que a pressão arterial foi registrada 10 min antes de ser colocado no tubo de restrição e depois continuamente durante toda a permanência no tubo.

### 3.9 - Drogas utilizadas

- Cloreto de noradrenalina (SIGMA, St. Louis, MO, USA).
- Cloreto de Cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ), bloqueador não-seletivo de sinapses (SIGMA, St. Louis, MO, USA).
- WB4101, antagonista seletivo dos adrenoceptores  $\alpha_1$  (TOCRIS, Westwoods Business Park Ellisville, MO, USA).
- RX821002, antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_2$  (TOCRIS, Westwoods Business Park Ellisville, MO, USA).
- Propranolol, antagonista não-seletivo de adrenoceptores  $\beta$  (SIGMA, St. Louis, MO, USA).
- Pentolínio, (SIGMA, St. Louis, MO, USA).
- dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP, (Peninsula Laboratories, King of Prussia, PA, USA).
- Tribromoetanol (SIGMA, St. Louis, MO, USA).
- Uretana (SIGMA, St. Louis, MO, USA).
- Fenilefrina (agonista adrenérgico -  $\alpha_1$ ), (SIGMA, St. Louis, MO, USA).

- Nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico), (SIGMA, St. Louis, MO, USA).
- Veículo - salina - NaCl a 0,9%.
- LCA – Composição em (nmol/L) 100 NaCl; 2 Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 2.5 KCl; 1.0 MgCl<sub>2</sub>; 27 NaHCO<sub>3</sub>; 2.5CaCl<sub>2</sub> (pH=7.4).

### **3.10 - Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas**

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana na dose de 1,2 mg/kg intraperitoneal, antes do início da perfusão. Foi injetado o corante azul de Evan a 1% no local da microinjeção da droga no CPFL. 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 10%. Posteriormente, os cérebros foram retirados da caixa craniana e pós-fixados na respectiva solução de perfusão. Os cérebros foram seccionados com o auxílio de um criostato. Foram feitas várias secções na região do CPFL, nas quais foram coradas com vermelho neutro a 1% e analisadas utilizando-se o Atlas de Paxinos e Watson (1997) como referência.

### 3.11 - Análise Estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os valores basais de PAM e FC e as respostas cardiovasculares máximas no estudo da administração de NA no CPFL em animais anestesiados foram comparados utilizando o teste t de *Student* pareado (antes do tratamento vs após tratamento). Análise de regressão não-linear foi utilizada para estudar o efeito da administração de diferentes doses de NA no CPFL. Análise de variância (ANOVA) de duas vias (tempo vs tratamento) foi usada para comparar curvas temporais de variações da PA e FC.

Para o estudo da participação da neurotransmissão noradrenérgica do CPFL na modulação da atividade do barorreflexo, os parâmetros das curvas sigmóides foram comparados antes e 10 e 60 min após o tratamento com o  $\text{CoCl}_2$  (bloqueador de sinapses) bem como os antagonistas noradrenérgicos ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$ ), utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via (one way). Para a análise separada das respostas taquicárdicas e bradicárdicas os valores de FC que correlacionavam a variações correspondentes a 10, 20, 30 e 40 mmHg de PA foram calculados. Esses valores foram plotados para criar curvas de regressão linear para cada rato e a inclinação das curvas de regressão linear e o intercepto das curvas no eixo x foram determinados e comparados antes e após os tratamentos para verificar alterações no ganho do barorreflexo e deslocamento das curvas utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via.

Para os estudos que investigaram a participação CPFL e da neurotransmissão noradrenérgica presente no CPFL na modulação da atividade

cardiovascular durante o estresse por restrição foram utilizadas análises de regressão não-linear para estudar o efeito da administração de diferentes doses dos antagonistas de adrenoceptores no CPFL sobre as respostas cardiovasculares ao estresse por restrição. Os pontos para a composição da curva foram gerados a partir da média de todos os pontos a partir do início da restrição dos animais.

# *PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS*

## **4 – PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula guia direcionada ao CPFL, e mantidos em recuperação por 72 h. Os experimentos foram realizados 24 h após a cirurgia de implantação do cateter na artéria femoral. Os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação por 30 minutos antes do início dos experimentos.

### **4.1 - Estudo dos efeitos da microinjeção de NA no CPFL na atividade cardiovascular de ratos não anestesiados.**

#### **4.1.1 - Efeitos cardiovasculares da administração de doses crescentes de NA no CPFL de ratos não anestesiados, construção da curva dose-resposta.**

Foram administradas diferentes doses (3, 7, 10, 15, 30 e 45 nmol/100nL) de NA no CPFL. As doses foram administradas aleatoriamente, e cada animal recebeu apenas duas doses. O mesmo volume de LCA foi injetado em um grupo de animais como forma de controle. As injeções foram realizadas com um intervalo de 24h a fim de evitar o fenômeno da taquifilaxia.

#### **4.1.2 - Efeitos cardiovasculares da administração repetida de NA no CPFL em ratos não anestesiados.**

Neste experimento foram estudados os efeitos de repetidas microinjeções de NA (ED50 15 nmol/100nL) no CPFL, para a verificação do possível fenômeno da taquifilaxia. Os animais receberam a microinjeção de NA no CPFL, 30 min e 24h após a primeira microinjeção de NA no CPFL.

#### **4.1.3 - Efeitos cardiovasculares da administração de NA no CPFL em áreas circunvizinhas ao CPFL em ratos não anestesiados.**

Este experimento teve por objetivo investigar se as respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no CPFL poderiam ser mediadas pela difusão da NA para áreas circunvizinhas ao CPFL. Para isso, foram feitas microinjeções de NA (15 nmol/100nL) no córtex motor primário e no fórceps menor do corpus callosum.

#### **4.1.4 - Efeitos cardiovasculares da administração de NA no CPFL em ratos anestesiados por uretana.**

Neste experimento foram estudados os efeitos da anestesia por uretana sobre resposta cardiovascular causada pela administração de NA no CPFL. Os experimentos foram realizados em dois dias. No primeiro dia os animais receberam uma microinjeção de NA (ED50 15 nmol/100nL) no CPFL. Vinte e quatro horas após os animais foram anestesiadas com uretana (1,2 mg/kg) (Alves *et al.*, 2007) e a NA foi microinjetada novamente no CPFL 1h após a administração do anestésico.

#### **4.2 - Estudo dos adrenoceptores envolvidos nas respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL de ratos não-anestesiados.**

Estes experimentos foram realizados em dois dias, a fim de evitar o fenômeno da taquifilaxia. No primeiro dia os animais receberam uma microinjeção de NA (15 nmol/100nL) no CPFL. Após 24h a NA foi microinjetada 10 minutos após a microinjeção dos antagonistas ou veículo no CPFL.

#### **4.2.1 - Efeito do pré-tratamento do CPFL com WB4101, 5-metil-urapidil ou RX821002 sobre as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados.**

Este experimento teve por objetivo verificar o possível envolvimento dos adrenoceptores  $\alpha$  nas respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL. Para tanto, foram utilizados os antagonistas seletivos de adrenoceptores  $\alpha_1$ , WB4101 (15 nmol/100nL) (Crestani *et al.*, 2008) ou 5-metil-urapidil (15 nmol/100nL) e o antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_2$ , RX821002 (15 nmol/100nL) (Crestani *et al.*, 2008).

#### **4.2.2 - Respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de Fenilefrina no CPFL de ratos não anestesiados.**

Uma vez confirmada a mediação das respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no CPFL por adrenoceptores do subtipo  $\alpha_1$  foi realizada a microinjeção de fenilefrina (200 nmol/100nL) (Correa e Peres-Polon, 1995), um agonista de receptores adrenoceptores do subtipo  $\alpha_1$  para a efetiva confirmação dessa mediação.

#### **4.2.3 - Efeito do pré-tratamento do CPFL com propranolol, sobre as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados.**

Este experimento teve por objetivo verificar o possível envolvimento de adrenoceptores  $\beta$  nas respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL.



Para tanto, foi utilizado o antagonista não-seletivo de adrenoceptores  $\beta$ , propranolol (15 nmol/100nL) (Crestani *et al.*, 2008).

#### **4.3 - Estudo dos mecanismos periféricos envolvidos nas respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL de ratos não-anestesiados.**

Estes experimentos foram realizados em dois dias, a fim de evitar o fenômeno da taquifilaxia. No primeiro dia, os animais receberam uma microinjeção de NA (15 nmol/100nL) no CPFL. Após 24h, a NA foi microinjetada 10 minutos após a infusão intravenosa de um antagonista vasopressinérgico, um bloqueador ganglionar ou veículo.

##### **4.3.1 - Efeitos cardiovasculares do pré-tratamento sistêmico com pentolínio (bloqueador ganglionar), sobre as respostas à microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados.**

Este experimento teve por objetivo verificar o possível envolvimento do sistema nervoso simpático na mediação das respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL. Os experimentos foram realizados em dois dias. No primeiro dia, os animais receberam uma microinjeção de NA (15 nmol/100nL) no CPFL. Após 24h, a NA foi microinjetada 10 minutos após a administração endovenosa de pentolínio (5mg/kg) (dose baseada no trabalho de (Alves *et al.*, 2007). Paralelamente a esse experimento um grupo controle foi submetido à microinjeção de NA no CPFL apenas com o pré-tratamento sistêmico com solução salina (veículo utilizado para a administração de pentolínio).

**4.3.2 - Efeitos cardiovasculares do pré-tratamento sistêmico com dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP (composto de manning); (antagonista dos receptores vasopressinérgicos V<sub>1</sub>), sobre as respostas à microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados.**

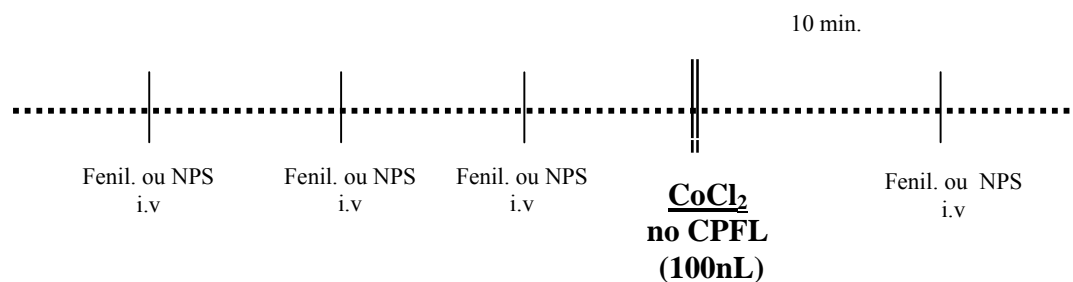
Este experimento teve por objetivo verificar o possível envolvimento do mecanismo vasopressinérgico humoral na mediação das respostas à microinjeção de NA no CPFL. Os experimentos foram realizados em dois dias. No primeiro dia, os animais receberam uma microinjeção de NA (15 nmol/100nL) no CPFL. Após 24h, a NA foi microinjetada 10 min depois da administração endovenosa de dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP (50µg/kg) (dose baseada no trabalho de (Alves *et al.*, 2007). Paralelamente a esse experimento um grupo controle foi submetido à microinjeção de NA no CPFL apenas com o pré-tratamento sistêmico com solução salina.

**4.4 - Estudo do envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do CPFL na modulação da atividade do barorreflexo.**

Nestes experimentos foram realizadas infusões de fenilefrina para determinação dos valores controle de atividade bradicárdica do barorreflexo ou nitroprussiato de sódio para a determinação dos valores controle de atividade taquicárdica do barorreflexo. Em seguida, foram microinjetados um bloqueador sináptico (cobalto) ou os antagonistas noradrenérgicos ou veículo bilateralmente no CPFL, e 10 e 60 minutos após foi realizada nova infusão de fenilefrina ou nitroprussiato de sódio.

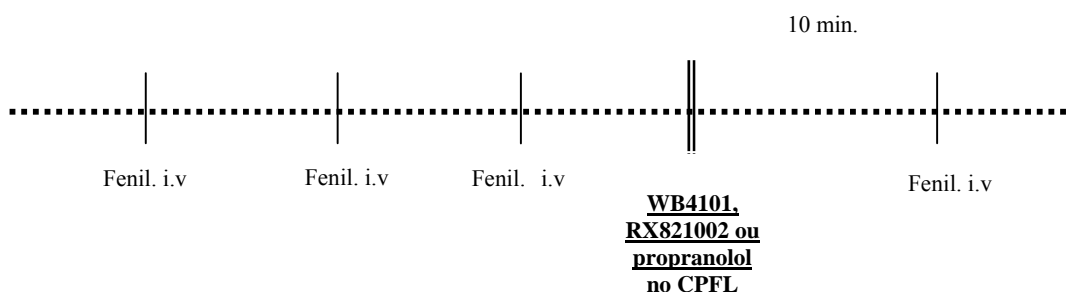
**4.4.1- Efeito do pré-tratamento do CPFL com Cobalto (CoCl<sub>2</sub>), sobre a resposta taquicárdica ou bradicárdica do barorreflexo em ratos não anestesiados.**

Este experimento teve por objetivo verificar o envolvimento de sinapses no CPFL na modulação da resposta taquicárdica ou bradicárdica do barorreflexo. Para tanto, foi administrado um bloqueador de sinapses cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) (1 nmol/100nL) (Crestani *et al.*, 2006) no CPFL.



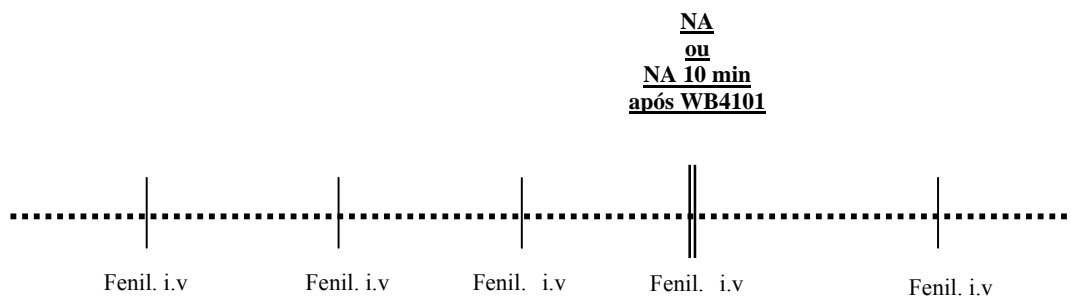
**4.4.2- Efeito do pré-tratamento do CPFL com antagonistas de adrenoceptores, sobre a resposta bradicárdica do barorreflexo em ratos não anestesiados.**

Uma vez confirmada a participação do CPFL na modulação da atividade barorreflexa nas respostas bradicárdicas, esses experimentos tiveram por objetivo investigar a participação da neurotransmissão noradrenérgica no CPFL na modulação da atividade barorreflexa. Para tanto foram administrados um antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$ , WB4101 (15 nmol/100nL) (Crestani *et al.*, 2008); um antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_2$ , RX821002 (15 nmol/100nL) (Crestani *et al.*, 2008) ou o antagonista não-seletivo de adrenoceptores  $\beta$ , propranolol (15 nmol/100nL) (Crestani *et al.*, 2008).



#### **4.4.3 – Efeito da infusão de noradrenalina no CPFL nas respostas bradicárdicas barorreflexas.**

Este experimento teve por objetivo confirmar a participação do sistema noradrenérgico na modulação das respostas bradicárdicas causadas pela infusão de fenilefrina. Para tanto, a noradrenalina (7 nmol/100nL, 0.6 µL/min), dose essa que não causa mudança significativa na PA ou FC, foi infundida unilateralmente no CPFL, concomitantemente a infusão de fenilefrina intravenosamente. Além disso, para confirmar a participação dos receptores  $\alpha_1$  nessa modulação, a noradrenalina (7 nmol/100nL, 0.6 µL/min) foi infundida concomitantemente a infusão de fenilefrina intravenosamente 10 min após a microinjeção de WB4101 (15 nmol/100nL) (Crestani *et al.*, 2008) unilateralmente no CPFL de ratos não anestesiados.



#### **4.5 - Estudo do papel desempenhado pelo CPFL no ER.**

Em todos os protocolos os animais foram levados, em suas respectivas caixas, à sala de experimentação. Cada animal foi conectado ao sistema de registro da pressão arterial, em sua respectiva caixa, para registro da pressão arterial basal por 10 min. Em seguida, ainda conectado ao sistema de registro da pressão arterial, o rato foi transferido para a gaiola de imobilização, onde permaneceu por 1h. A pressão arterial foi registrada durante todo o período de imobilização. Foi feita apenas uma microinjeção intracerebral bilateral de droga ou salina por rato, antes da imobilização.

##### **4.5.1 - Efeito de um bloqueador de transmissão sináptica no CPFL sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

Este experimento teve como objetivo verificar a possível participação do CPFL, na modulação das respostas cardiovasculares desencadeadas pelo ER. Para tanto, os animais tiveram cânulas guias implantadas bilateralmente no CPFL e receberam o bloqueador da transmissão sináptica  $\text{CoCl}_2$  (1 nmol/100nL) (Crestani, Alves *et al.*, 2009) antes da restrição.

#### **4.6. - Estudo do envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do CPFL na modulação da atividade cardiovascular durante o ER.**

##### **4.6.1 - Efeitos da microinjeção bilateral com WB4101 ou RX821002 no CPFL sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

Uma vez verificada a participação do CPFL na modulação da atividade cardiovascular durante o estresse por restrição, este experimento teve por objetivo verificar o possível envolvimento de adrenoceptores  $\alpha$ , presentes no CPFL, na modulação da atividade cardiovascular frente a um estímulo estressante, o ER. Para tanto, foram utilizados diferentes doses dos antagonistas seletivos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico, o WB4101 (0.3, 5, 10 e 15 nmol/100nL); e antagonista seletivo de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgico, o RX821002 (0.3, 5, 10 e 15nmlos/100nL).

##### **4.6.2 - Efeitos da microinjeção bilateral com propranolol no CPFL, sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

Este experimento teve por objetivo verificar o possível envolvimento de receptores  $\beta$ -adrenérgicos no CPFL, na modulação da atividade cardiovascular frente a um estímulo estressante, o ER. Para tanto, foi utilizado o antagonista não-seletivo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, propranolol (15 nmol/100nL).

## *RESULTADOS*



## 5 - RESULTADOS

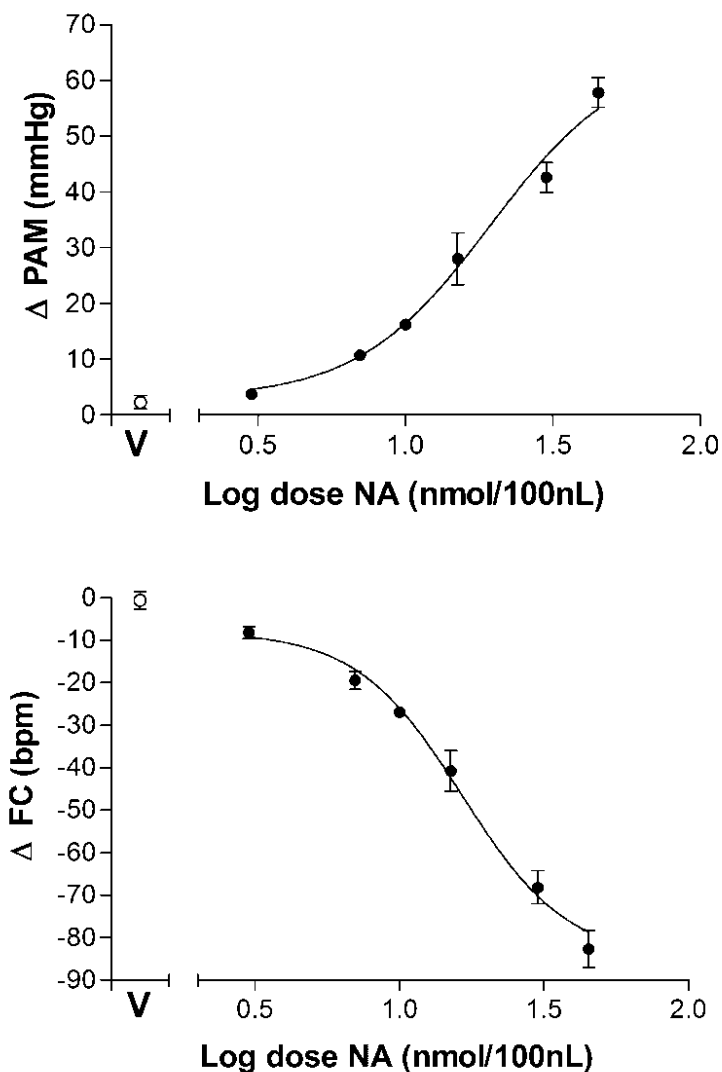
### 5.1 - Efeitos cardiovasculares da administração de doses crescentes de NA no CPFL de ratos não anestesiados.

Microinjeção de LCA (100nL) (n=5) no CPFL não alterou os valores basais de (PAM=  $97\pm 1$  vs  $100\pm 2$  mmHg;  $t=1,7$ ;  $p>0,05$ ) e (FC=  $358\pm 11$  vs  $348\pm 13$  bpm;  $t= 0,4$ ;  $p>0,05$ ) de ratos não anestesiados.

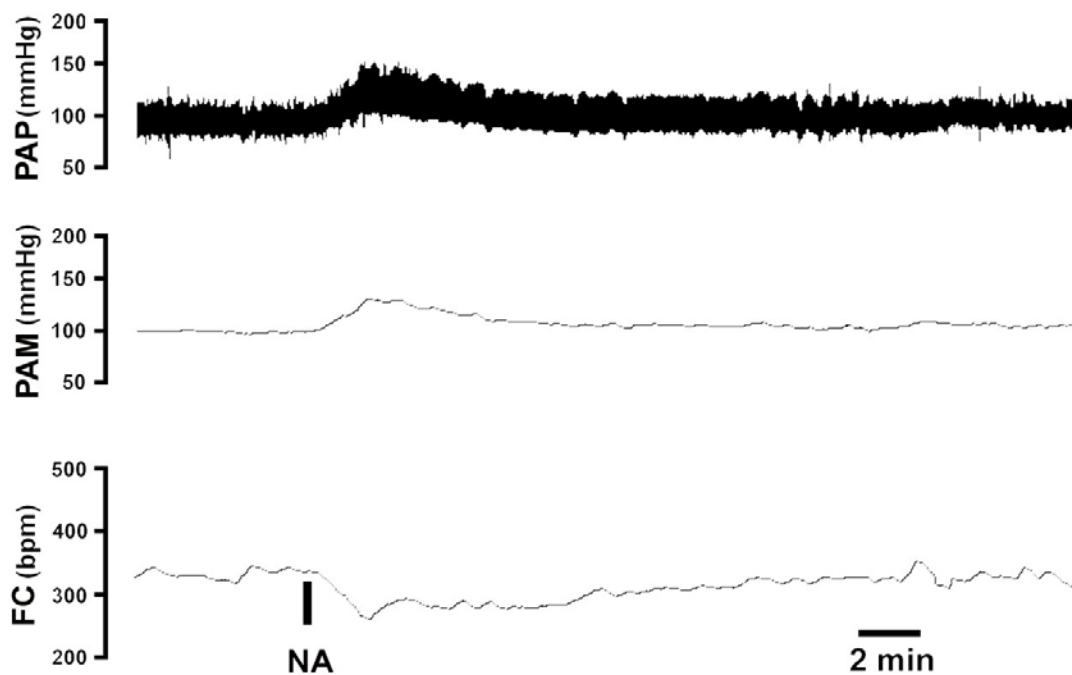
Microinjeção de diferentes doses de NA (3, 7, 15, 30 e 45 nmol/100nL) no CPFL de ratos normotensos e não anestesiados (PAM=  $99\pm 1$  e FC=  $369\pm 16,2$  n=28) causou respostas pressoras e bradicárdicas dose dependentes (Figura 1).

Análise de regressão não-linear indicou uma significativa correlação entre as doses e as respostas pressoras ( $r^2=0,91$ ,  $df=26$ ;  $p<0,05$ ) e bradicárdicas ( $r^2=0,92$ ,  $df=26$ ,  $p<0,05$ ). A  $ED_{50}$  aproximada foi de 15nmol para as respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no CPFL (Figura 1).

A (Figura 2) representa um registro de PA pulsátil, média e da frequência cardíaca de um animal representativo do grupo, que recebeu microinjeção de NA na dose 15 nmol/100nL no CPFL.



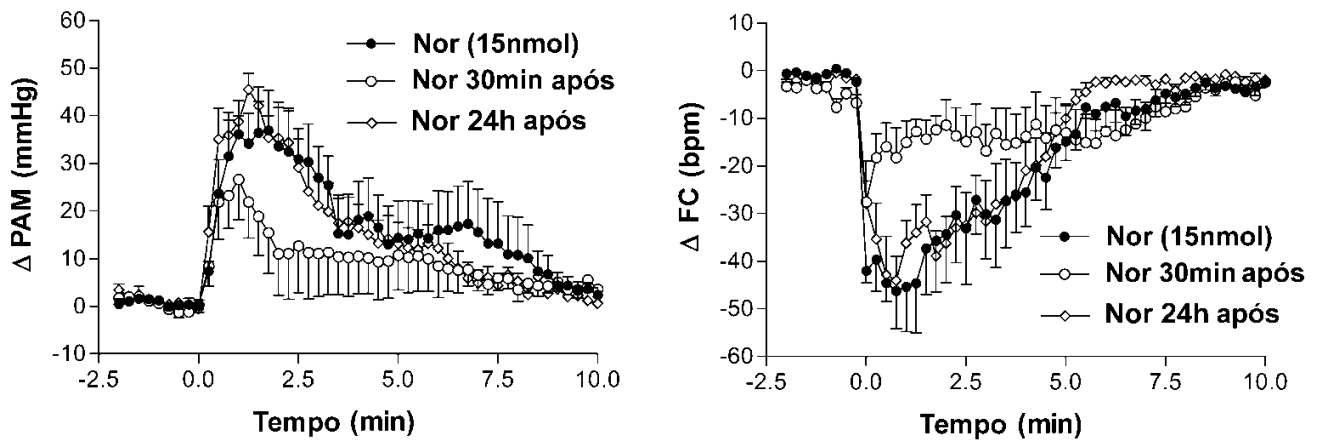
**Figura 1** – Regressão não linear do efeito da microinjeção de diferentes doses (3, 7, 10, 15, 30, ou 45 nmol/ 100nL) de NA no CPFL de ratos não anestesiados (n=28) sobre a pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC). Círculos pretos representam médias e as barras o erro padrão da média (SEM). As curvas foram geradas por uma análise de regressão não linear e foram estatisticamente diferentes ( $\Delta$ MAP,  $r^2 = 0.91$  and  $\Delta$ HR,  $r^2 = 0.92$ ). Os círculos brancos representam o grupo veículo (V).



**Figura 2** – Registro de PA média (PAM), PA pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de NA (15 nmol/100nL) no CPFL de ratos não anestesiados.

## **5.2 - Efeitos cardiovasculares da administração repetida de NA no CPFL em ratos não anestesiados.**

As respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA (15 nmol/100nL) foram diminuídas quando uma segunda injeção de NA (15 nmol/100nL) foi feita 30min após a primeira (PAM:  $F_{(1,392)}=30$ ,  $P<0.0001$  e FC:  $F_{(1,392)}=32$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 3). Entretanto as respostas cardiovasculares não foram afetadas quando a noradrenalina foi microinjetada 24h após a primeira injeção (PAM:  $F_{(1,392)}=1.7$ ,  $P>0.05$  e FC:  $F_{(1,392)}=5$ ,  $P>0.05$ ).

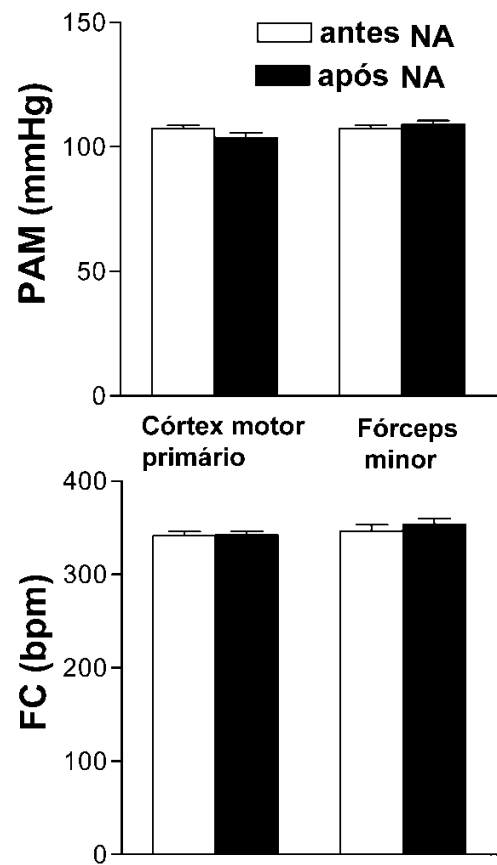


**Figura 3** – Variação da PAM ( $\Delta PAM$ ) e FC ( $\Delta FC$ ) ao longo do tempo em um grupo de animais que receberam NA (15 nmol/100nL) no CPFL (círculos pretos) e 30 minutos após (círculos brancos) a primeira injeção e os (losangos brancos) indicam uma nova microinjeção de NA 24h após a primeira. Círculos representam à média e as barras o SEM. Dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (tratamento vs tempo).

### **5.3 - Respostas cardiovasculares à microinjeção de NA em áreas circunvizinhas ao CPFL.**

Microinjeção de NA (15 nmol/100nL) em áreas circunvizinhas ao CPFL, como por exemplo o córtex motor primário (PAM antes:  $98 \pm 3$  e após:  $99 \pm 3$  mmHg,  $t=3$ ,  $P>0.05$ ; e HR antes:  $343 \pm 12$  e após:  $341 \pm 12$  bpm,  $t=1.2$ ,  $P>0.05$ ;  $n=3$ ) e o fórceps menor do corpus callosum (PAM antes:  $96 \pm 1$  e após:  $100 \pm 3$  mmHg  $t=1.5$ ,  $P>0.05$ ; e FC antes:  $359 \pm 15$  e após:  $357 \pm 17$  bpm;  $t=0.9$ ,  $P>0.05$ ;  $n=3$ ) não produziram efeitos na PAM e FC, representadas na (Figura 4).

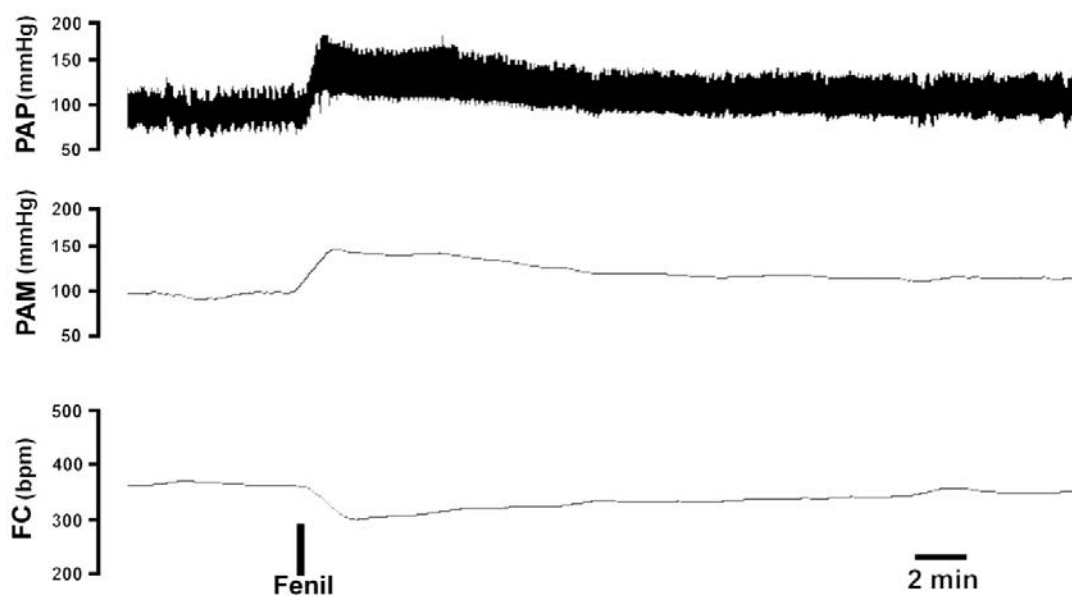
A (Figura 17) mostra uma representação diagramática da distribuição dos sítios de injeção em áreas circunvizinhas ao CPFL (Paxinos and Watson, 1997).



**Figura 4** – Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após a microinjeção de NA (15nmol/100nL) em áreas circunvizinhas ao CPFL, em ratos não-anestesiados. As colunas representam as médias  $\pm$  EPM,\*  $p < 0,05$ ; teste  $t$  de Student.

#### 5.4 - Respostas cardiovasculares à microinjeção de fenilefrina no CPFL de ratos não anestesiados.

A microinjeção de fenilefrina (n=5) no CPFL (valores basais de PAM:  $95 \pm 2$  mmHg; e FC:  $373 \pm 8$  bpm) causou respostas pressoras ( $\Delta$ PAM=  $49 \pm 4$  mmHg,  $t=9.7$ ,  $P<0.05$ ), e bradicárdicas ( $\Delta$ FC=  $-95 \pm 4$  bpm,  $t=11$ ,  $P<0.05$ ). A (Figura 5) representa um registro de PA pulsátil, média e frequência cardíaca de um animal representativo do grupo, que recebeu microinjeção de fenilefrina na dose 200 nmol/100nL no CPFL.



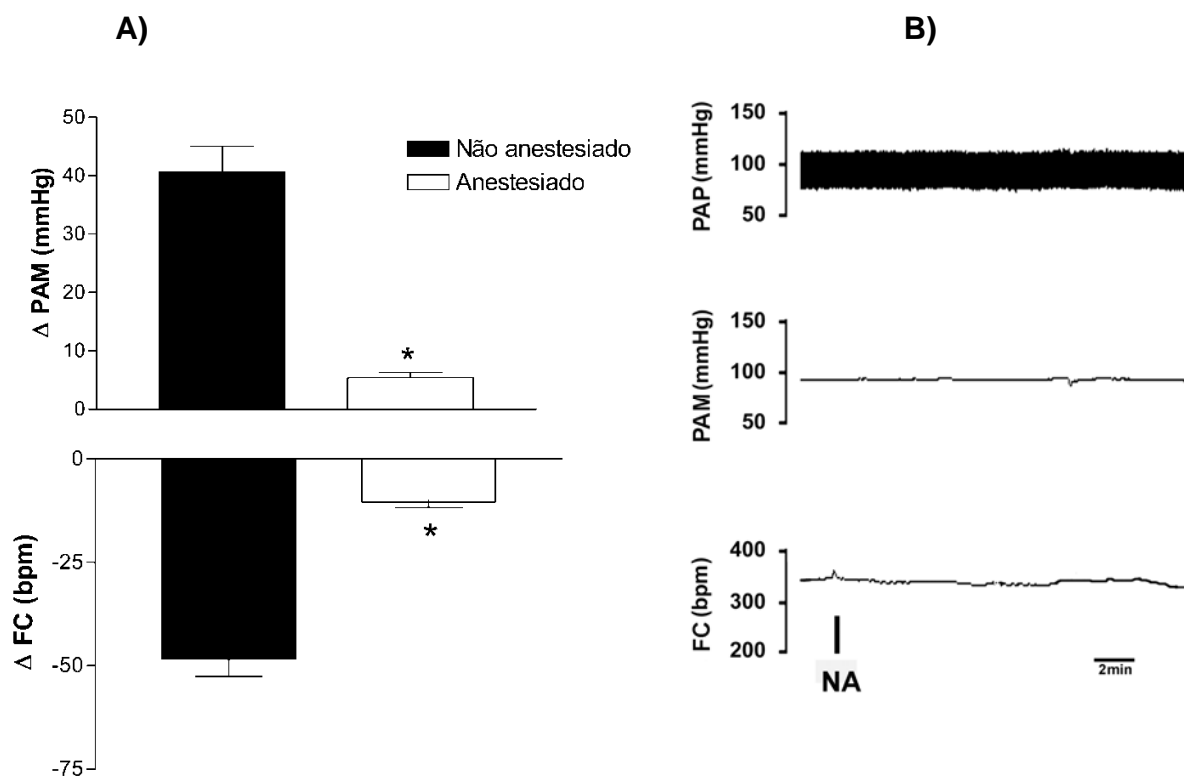
**Figura 5** – Registro mostrando variações de PA média (PAM), PA pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de fenilefrina (200 nmol/100nL) no CPFL de ratos não anestesiados.



### **5.5 - Efeito da anestesia por uretana sobre as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL.**

A anestesia por uretana causou mudanças significativas nos valores basais de PA e FC antes (PAM=  $100 \pm 2$  vs  $87 \pm 4$  mmHg,  $t = 2,8$ ;  $p < 0,05$ ) e (FC=  $366 \pm 10$  vs  $421 \pm 8$  bpm,  $t = 4,4$ ;  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ).

As respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA ( $15 \text{ nmol}/100\text{nL}$ ) no CPFL foram significativamente reduzidas nos animais anestesiados por uretana ( $\Delta\text{PAM} = 40,6 \pm 4,4$  vs  $5,4 \pm 0,92$  mmHg;  $t = 7,8$ ,  $p < 0,05$ ) e ( $\Delta\text{FC} = -48 \pm 4$  vs  $-10,4 \pm 1,32$  bpm;  $t = 7$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ); (Figura 6 – A). A (Figura 6 – B) representa um registro de PA pulsátil, média, e FC de um animal anestesiado representativo do grupo.

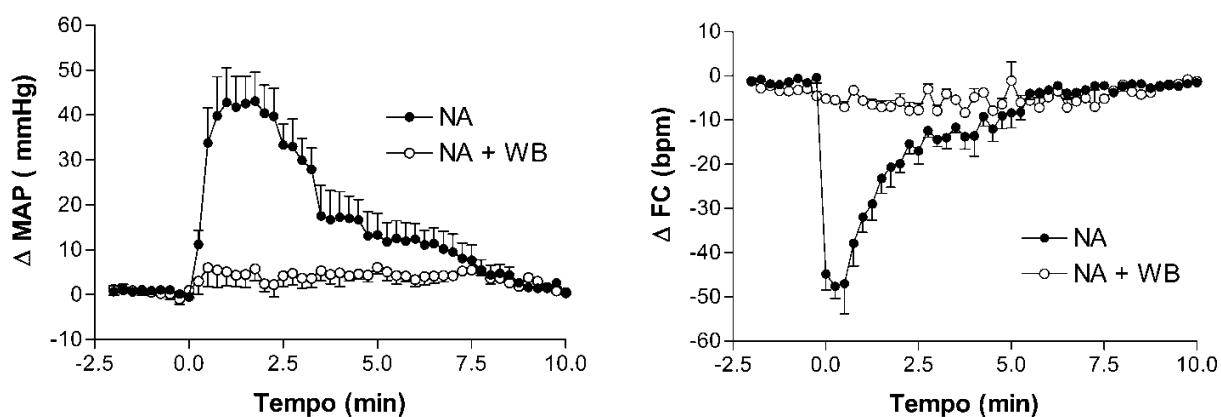


**Figura 6 - A)** Variação máxima da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) após administração de 15 nmol/100nL de NA no CPFL de ratos não-anestesiados ( $n= 5$ ) e anestesiados com uretana ( $n= 5$ ). As colunas representam as médias  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ , teste t de Student. **B)** - Registro de PA média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato anestesiado por uretana representativo do grupo, após a microinjeção de NA (15 nmol/100nL) no CPFL.

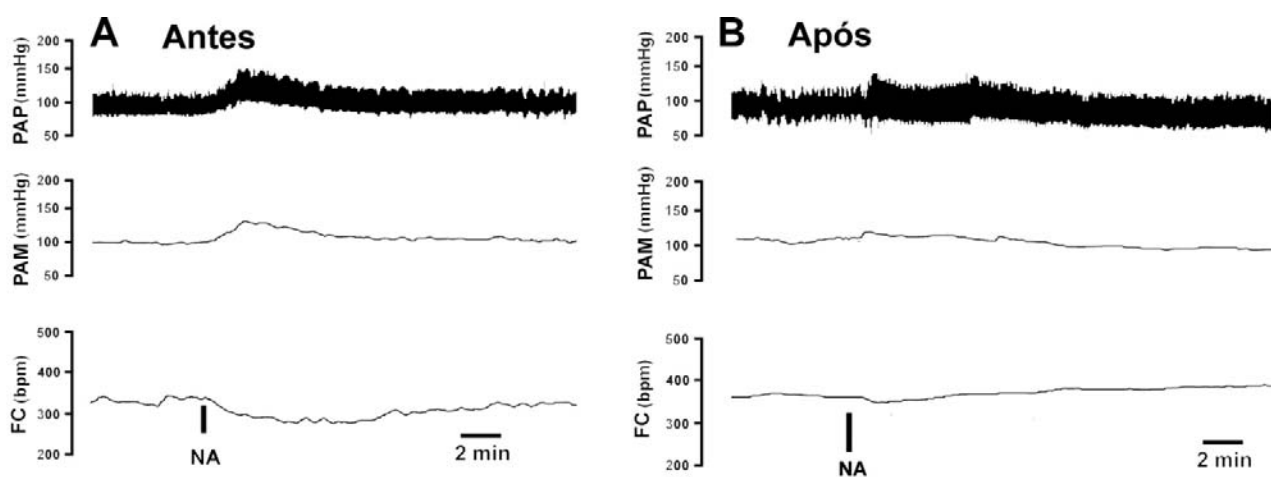
## 5.6 - Efeito do pré-tratamento do CPFL com WB4101, 5-metil-urapidil ou RX821002 sobre as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados.

**LCA** - O pré tratamento com LCA no CPFL (n=5) não afetou a resposta pressora ( $\Delta$ PAM=  $43 \pm 2$  vs  $45 \pm 3$  mmHg,  $t=0.3$ ,  $P>0.05$ ) e bradicárdica ( $\Delta$ FC=  $50 \pm 2$  vs  $49 \pm 3$  bpm,  $t=0.2$ ,  $P>0.05$ ) causada pela microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados.

**WB4101** - A microinjeção do antagonista seletivo para adrenoceptores do subtipo  $\alpha_1$ , WB4101 (15 nmol/100nL) (n=5) no CPFL de ratos não anestesiados, não causou mudanças significativas nos valores basais de (PAM=  $103 \pm 3$  vs  $100 \pm 3$  mmHg,  $t=0.6$ ,  $P>0.05$ ) ou (FC=  $356 \pm 7$  vs  $359 \pm 11$  bpm,  $t=0.3$ ;  $P>0.05$ ). Entretanto, as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL foram significativamente reduzidas após o pré-tratamento com WB4101. A análise das curvas temporais (Two-way ANOVA) indicou um significativo efeito do tratamento do CPFL com WB4101 nas respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL (PAM:  $F_{(1,392)}=278$ ,  $P<0.0001$ ; e FC:  $F_{(1,392)}=237$ ,  $P<0.0001$ ); um efeito significativo sobre o tempo (PAM:  $F_{(48,392)}=10$ ,  $P<0.0001$ ; e FC:  $F_{(48,392)}=25$ ,  $P<0.0001$ ) e uma interação entre o tratamento e o tempo (PAM:  $F_{(48,392)}=8$ ,  $P<0.0001$ ; e FC:  $F_{(48,392)}=19$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 7). Registro representativo mostrando as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL antes e após o tratamento do CPFL com o antagonista de adrenoceptores  $\alpha_1$  WB4101 é apresentado na (Figura 8).

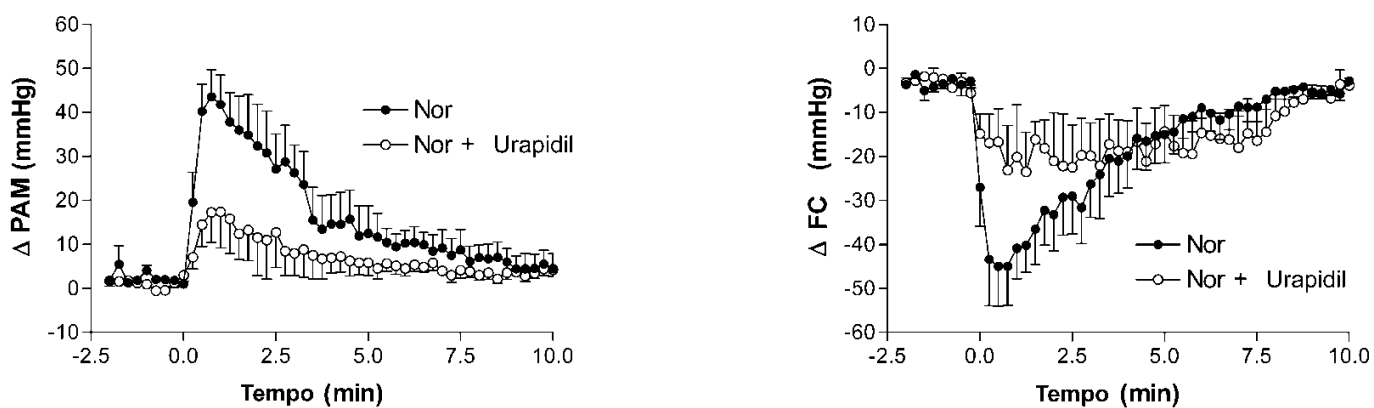


**Figura 7** – Variação da PAM ( $\Delta$ PAM) e FC ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo em um grupo de animais que receberam NA (15 nmol/100nL) no CPFL (círculos pretos) ou 10 min após o pré-tratamento do CPFL com um antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$  WB4101 (círculos brancos). Dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (tratamento vs tempo). Círculos representam à média e as barras o SEM.



**Figura 8** – Registro mostrando variações de PA média (PAM), PA pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de NA (15 nmol/100nL) no CPFL de ratos não anestesiados antes (**Figura A**) e 10 min após o pré-tratamento do CPFL com o antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$  WB4101 (**Figura B**).

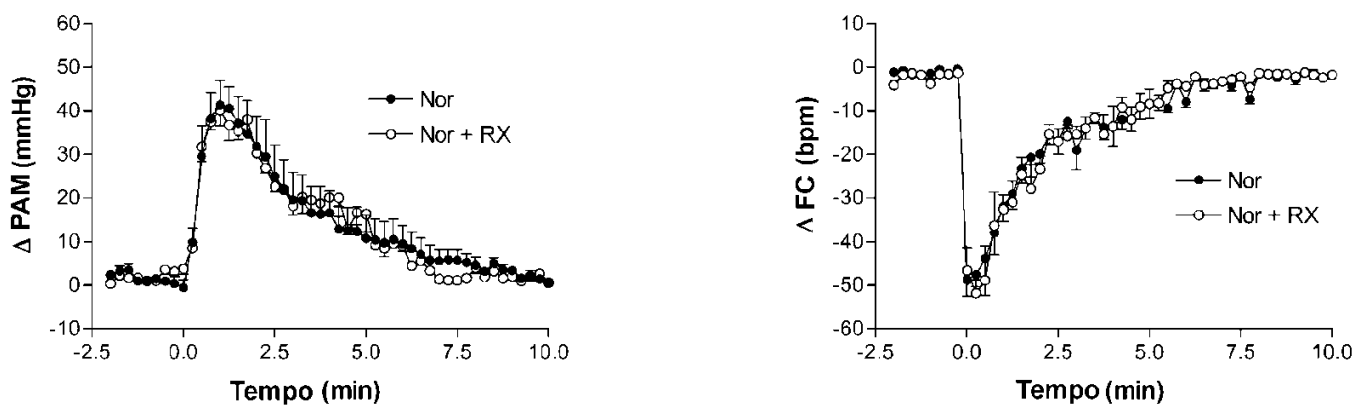
**5-metil-urapidil** - A microinjeção do antagonista seletivo para adrenoreceptores do subtipo  $\alpha_1$ , 5-metil-urapidil (15 nmol/100nL) (n=5) no CPFL de ratos não anestesiados não causou mudanças significativas nos valores basais de (PAM=  $95 \pm 2$  vs  $100 \pm 3$  mmHg,  $t = 1.1$ ,  $P > 0.05$ ) ou (FC=  $384 \pm 12$  vs  $362 \pm 11$  bpm,  $t = 1$ ,  $P > 0.05$ ). Entretanto, as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL foram significativamente reduzidas após o pré-tratamento com 5-metil-urapidil. A análise das curvas temporais (Two-way ANOVA) indicou um significativo efeito do tratamento do CPFL com 5-metil-urapidil nas respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL (PAM:  $F_{(1,392)} = 74$ ,  $P < 0.0001$ ; e FC:  $F_{(1,392)} = 4$ ,  $P < 0.0001$ ); um efeito significativo sobre o tempo (PAM:  $F_{(48,392)} = 6$ ,  $P < 0.0001$ ; e FC:  $F_{(48,392)} = 4$ ,  $P < 0.0001$ ) e uma interação entre o tratamento e o tempo (PAM:  $F_{(48,392)} = 4$ ,  $P < 0.0001$ ) e uma interação entre o tratamento e o tempo (PAM:  $F_{(48,392)} = 1.5$ ,  $P < 0.0001$ ; e FC:  $F_{(48,392)} = 1.1$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figura 9).



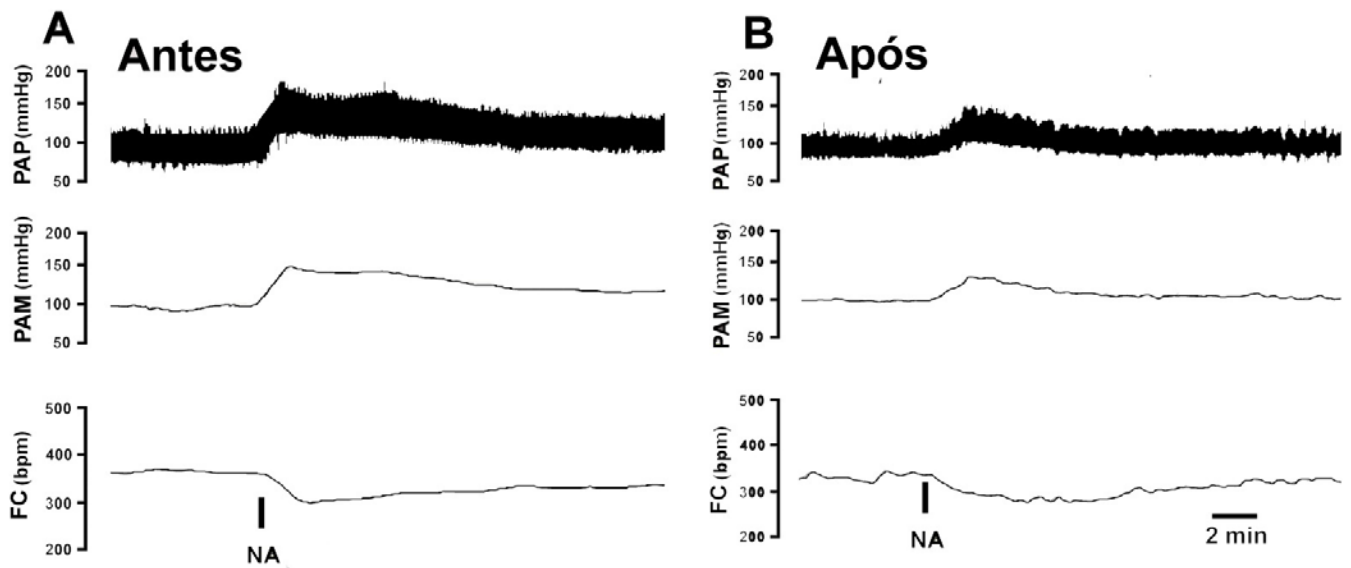
**Figura 9** – Variação da PAM ( $\Delta$ PAM) e FC ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo em um grupo de animais que receberam NA (15 nmol/100nL) no CPFL (círculos pretos) ou 10 min após o pré-tratamento do CPFL com um antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$  5-metil-urapidil (círculos brancos). Dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (tratamento vs tempo). Círculos representam à média e as barras o SEM.

**RX821002** - A microinjeção do antagonista seletivo para adrenoceptores do subtipo  $\alpha_2$ , RX821002 (15 nmol/100nL) (n=5) no CPFL de ratos não anestesiados não causou mudanças significativas nos valores basais de (PAM=  $99 \pm 3$  vs  $100 \pm 3$  mmHg,  $t=0.2$ ,  $P>0.05$ ) ou (FC=  $353 \pm 9$  vs  $366 \pm 12$  bpm,  $t=2.1$ ,  $P>0.05$ ). Além disso, a análise das curvas temporais (Two-way ANOVA) indicou que o pré tratamento com RX821002 também não afetou as respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no CPFL (PAM:  $F_{(1,392)}=0.2$ ,  $P>0.05$ ; e FC:  $F_{(1,392)}=0.2$ ,  $P>0.05$ ), mas indicou um significativo efeito no tempo (PAM:  $F_{(48,392)}=26$ ,  $P<0.0001$ ; e FC:  $F_{(48,392)}=48$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 10). Registro representativo mostrando as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL antes e após o tratamento do CPFL com o antagonista de adrenoceptores  $\alpha_2$  RX821002 é apresentado na (Figura 11).





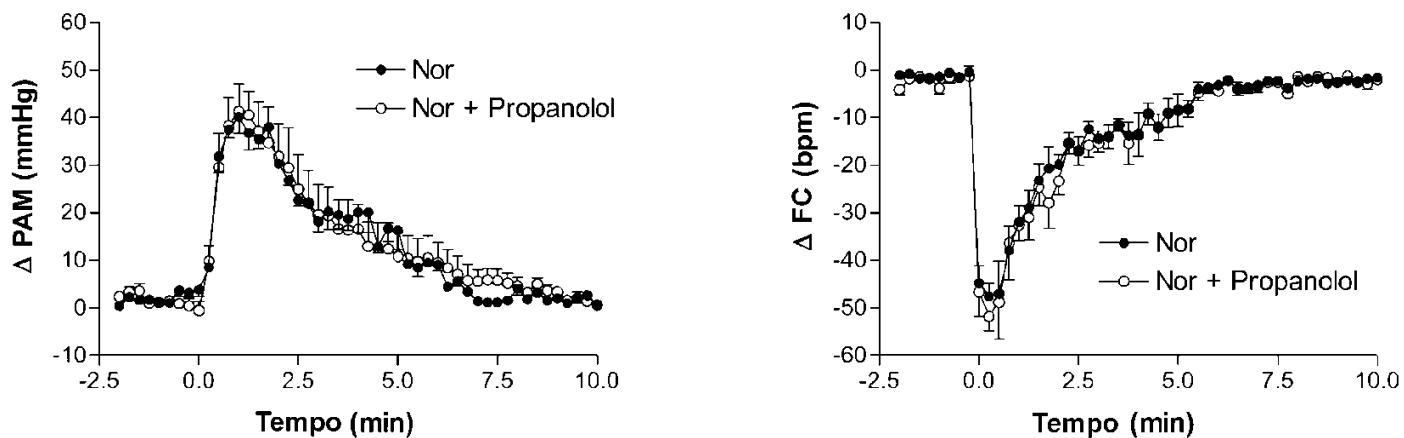
**Figura 10** – Variação da PAM ( $\Delta$ PAM) e FC ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo em um grupo de animais que receberam NA (15 nmol/100nL) no CPFL (círculos pretos) ou 10 min após o pré-tratamento do CPFL com um antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_2$  RX821002 (círculos brancos). Dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (tratamento vs tempo). Círculos representam à média e as barras o SEM.



**Figura 11** – Registro mostrando variações de PA média (PAM), PA pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de NA (15 nmol/100nL) no CPFL de ratos não anestesiados antes (**Figura A**) e 10 min após o pré-tratamento do CPFL com o antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_2$  RX821002 (**Figura B**).

### **5.7 - Efeito do pré-tratamento do CPFL com Propranolol sobre as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados.**

**Propranolol** - A microinjeção do antagonista seletivo para adrenocetores do subtipo  $\beta$  propranolol (15nmol/100nL) (n=5) no CPFL de ratos não anestesiados não causou mudanças significativas nos valores basais de (PAM=  $96 \pm 3$  vs  $101 \pm 4$  mmHg;  $t=1.5$ ,  $P>0.05$ ) ou (FC=  $356 \pm 9$  vs  $369 \pm 16$  bpm,  $t=0.9$ ,  $P>0.05$ ). Além disso, a análise das curvas temporais (Two-way ANOVA) indicou que o pré tratamento com propranolol também não afetou as respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no CPFL (PAM:  $F_{(1,392)}=0.2$ ,  $P>0.05$ ; e FC:  $F_{(1,392)}=2$ ,  $P>0.05$ ), mas indicou um efeito significativo no tempo (PAM:  $F_{(48,392)}=26$ ,  $P<0.0001$ ; e FC:  $F_{(48,392)}=51$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 12).

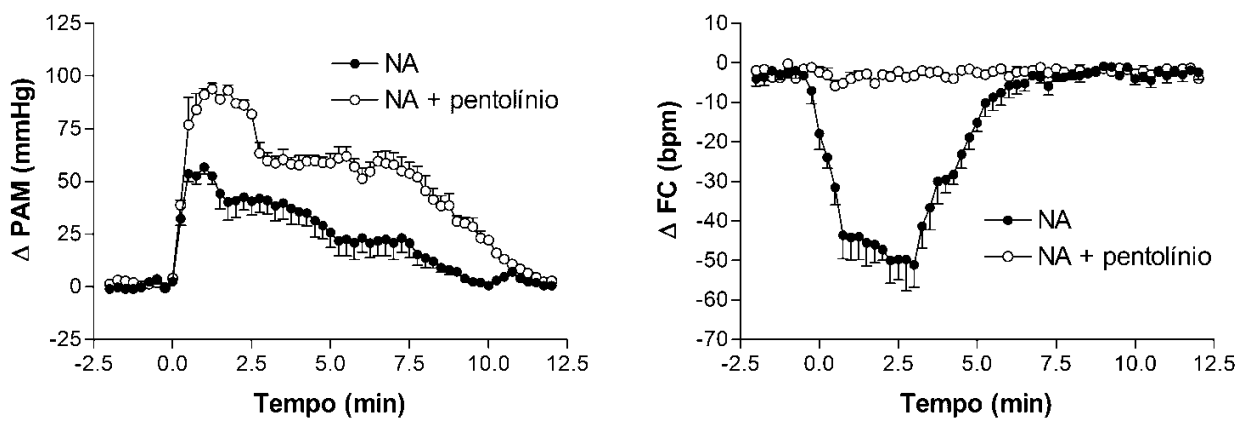


**Figura 12** – Variação da PAM ( $\Delta$ PAM) e FC ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo em um grupo de animais que receberam NA (15 nmol/100nL) no CPFL (círculos pretos) ou 10 min após o pré-tratamento do CPFL com um antagonista não seletivo de adrenoceptores  $\beta$ , propanolol (círculos brancos). Dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (tratamento vs tempo). Círculos representam à média e as barras o SEM.

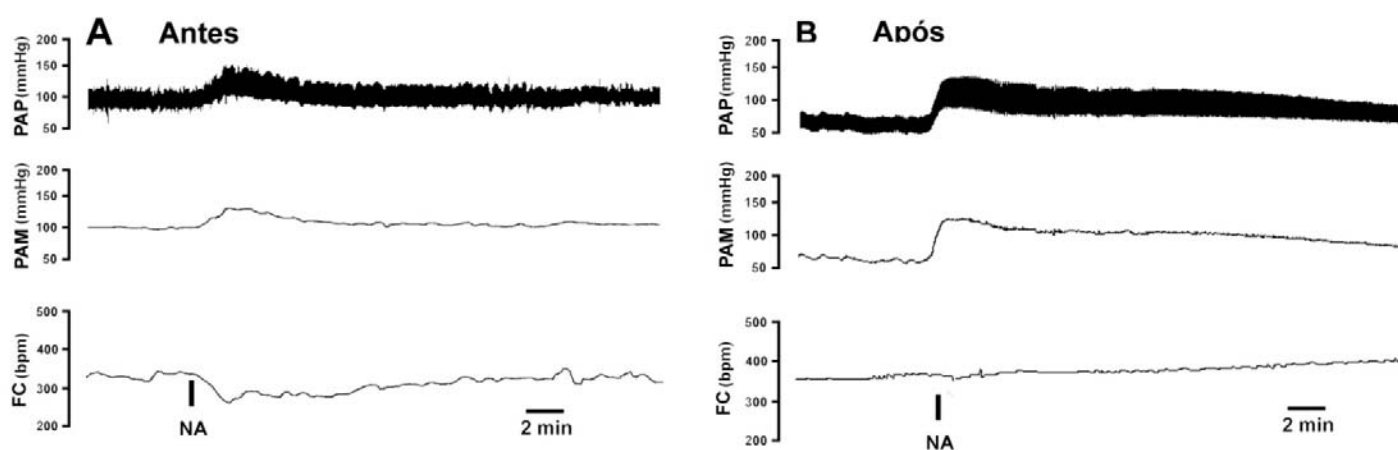
### 5.8 - Efeito do pré-tratamento sistêmico com salina, pentolínio ou dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP nas respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados.

**Salina** – O pré-tratamento intravenoso com salina (n=5) não afetou a resposta pressora ( $\Delta$ PAM=  $43\pm 2$  vs  $45\pm 3$  mmHg;  $t=0.3$ ,  $P>0.05$ ) e bradicárdica ( $\Delta$ FC=  $-50\pm 2$  vs.  $-49\pm 3$  bpm;  $t=0.2$ ,  $P>0.05$ ) à microinjeção de NA no CPFL.

**Pentolínio** – O pré-tratamento intravenoso com o bloqueador ganglionar pentolínio (5mg/kg) (N=5) reduziu os valores basais de (PAM=  $98\pm 3$  vs.  $68\pm 3$  mmHg,  $t=5.7$ ,  $P<0.05$ ) mas não afetou os valores basais de (FC=  $364\pm 10$  vs.  $382\pm 9$  bpm;  $t=1.08$ ,  $P>0.05$ ). Entretanto, a análise das curvas temporais (Two-way ANOVA) indicou que o pré-tratamento intravenoso com pentolínio potencializou a resposta pressora e bloqueou a resposta bradicárdica causada pela microinjeção de NA no CPFL indicando um significativo efeito do tratamento (PAM:  $F_{(1.456)}=701$ ,  $P<0.0001$ ; e FC:  $F_{(1.456)}=852$ ,  $P<0.0001$ ); um efeito significativo sobre o tempo (PAM:  $F_{(56.456)}=52$ ,  $P<0.0001$ ; e FC:  $F_{(56.456)}=28$ ,  $P<0.0001$ ) e uma interação entre tratamento e o tempo (PAM:  $F_{(56.456)}=5$ ,  $P<0.0001$ ; e FC:  $F_{(56.456)}=24$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 13). Registro representativo mostrando as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL antes e após o pré-tratamento intravenoso com o bloqueador ganglionar pentolínio é apresentado na Figura 14.



**Figura 13** – Variação da PAM ( $\Delta$ PAM) e FC ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo em um grupo de animais que receberam NA (15 nmol/100nL) no CPFL (círculos pretos) ou 10 min após infusão intravenosa de com um bloqueador ganglionar, pentolinio (círculos brancos). Dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (tratamento vs tempo). Círculos representam à média e as barras o SEM

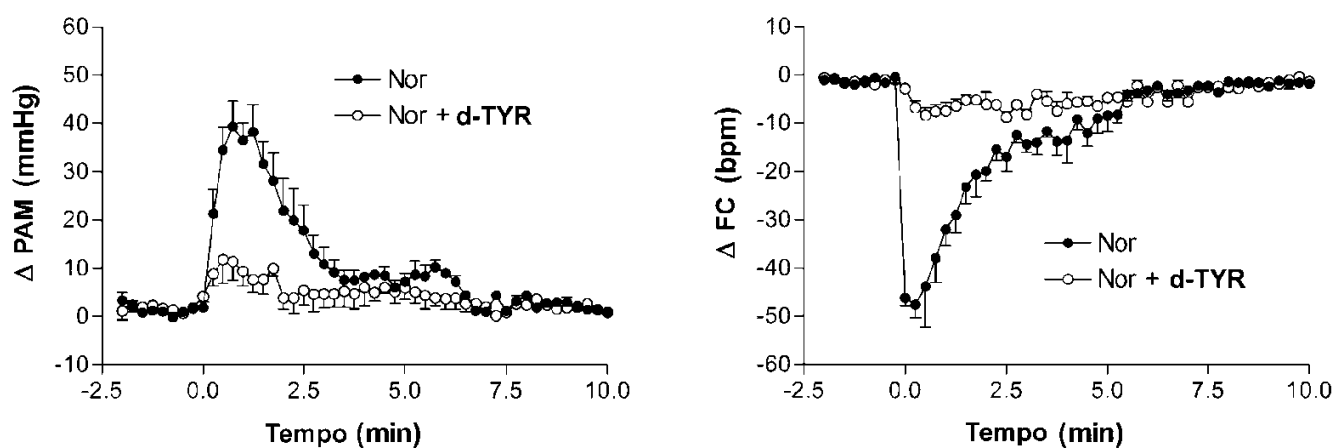


**Figura 14** – Registro mostrando variações de PA média (PAM), PA pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de NA (15 nmol/100nL) no CPFL de ratos não anestesiados antes (**Figura A**) e 10 min após o pré-tratamento intravenoso com um bloqueador ganglionar pentolínio (**Figura B**).

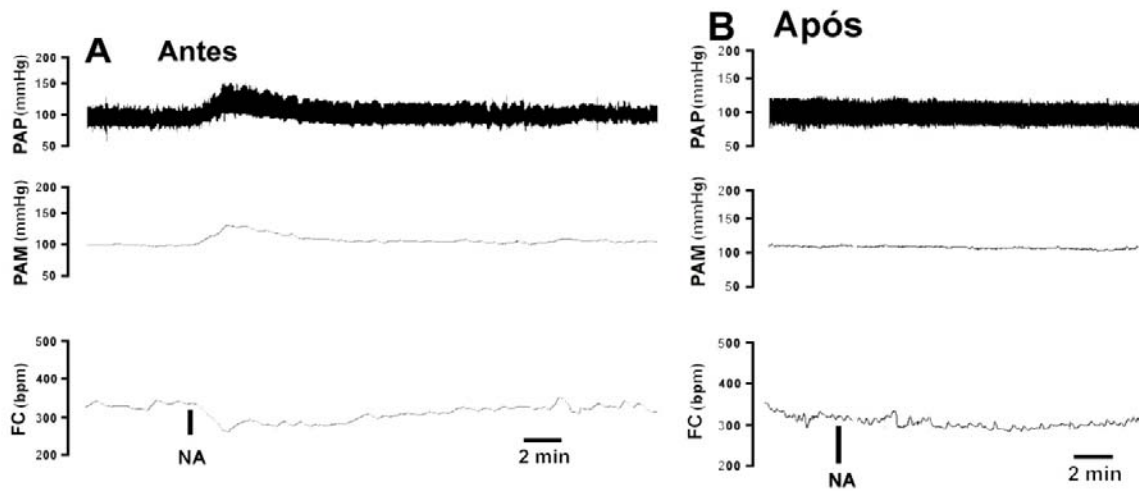
**dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP** – O pré-tratamento intravenoso com o antagonista seletivo de receptores V<sub>1</sub>-vasopressinérgicos, dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP (50µg/kg) (n=5) não afetou os valores basais de (PAM= 102±3 vs. 97±3 mmHg, t=1.3, P>0.05) ou (FC=368±12 vs. 352±9 bpm, t=0.6, P>0.05). Entretanto, a análise das curvas temporais (Two-way ANOVA) indicou que o pré-tratamento intravenoso com dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP reduziu significativamente a resposta pressora e bradicárdica causada pela microinjeção de NA no CPFL indicando um significativo efeito do tratamento (PAM: F<sub>(1.392)</sub>=120, P<0.0001; e FC: F<sub>(1.392)</sub>=294, P<0.0001); um significativo efeito sobre o tempo (PAM: F<sub>(48.392)</sub>=14, P<0.0001; e FC: F<sub>(48.392)</sub>=29, P<0.0001) e uma interação entre tratamento e o tempo (PAM: F<sub>(48.392)</sub>=6, P<0.0001; e FC: F<sub>(48.392)</sub>=18, P<0.0001) (Figura 15). Registro representativo mostrando as respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL antes e após o pré-tratamento intravenoso com o antagonista de receptores V<sub>1</sub> vasopressinérgicos (dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP) é apresentado na (Figura 16).

Representação diagramática dos sítios de injeção no CPFL de todos os animais utilizados no estudo dos efeitos cardiovasculares da microinjeção de noradrenalina no CPFL, bem como dos animais que foram utilizados para a investigação dos possíveis adrenoceptores envolvidos na mediação dessas respostas cardiovasculares e uma fotomicrografia representativa da secção coronal do cérebro de um dos animais utilizado neste conjunto de experimentos são apresentadas na (Figura 17).

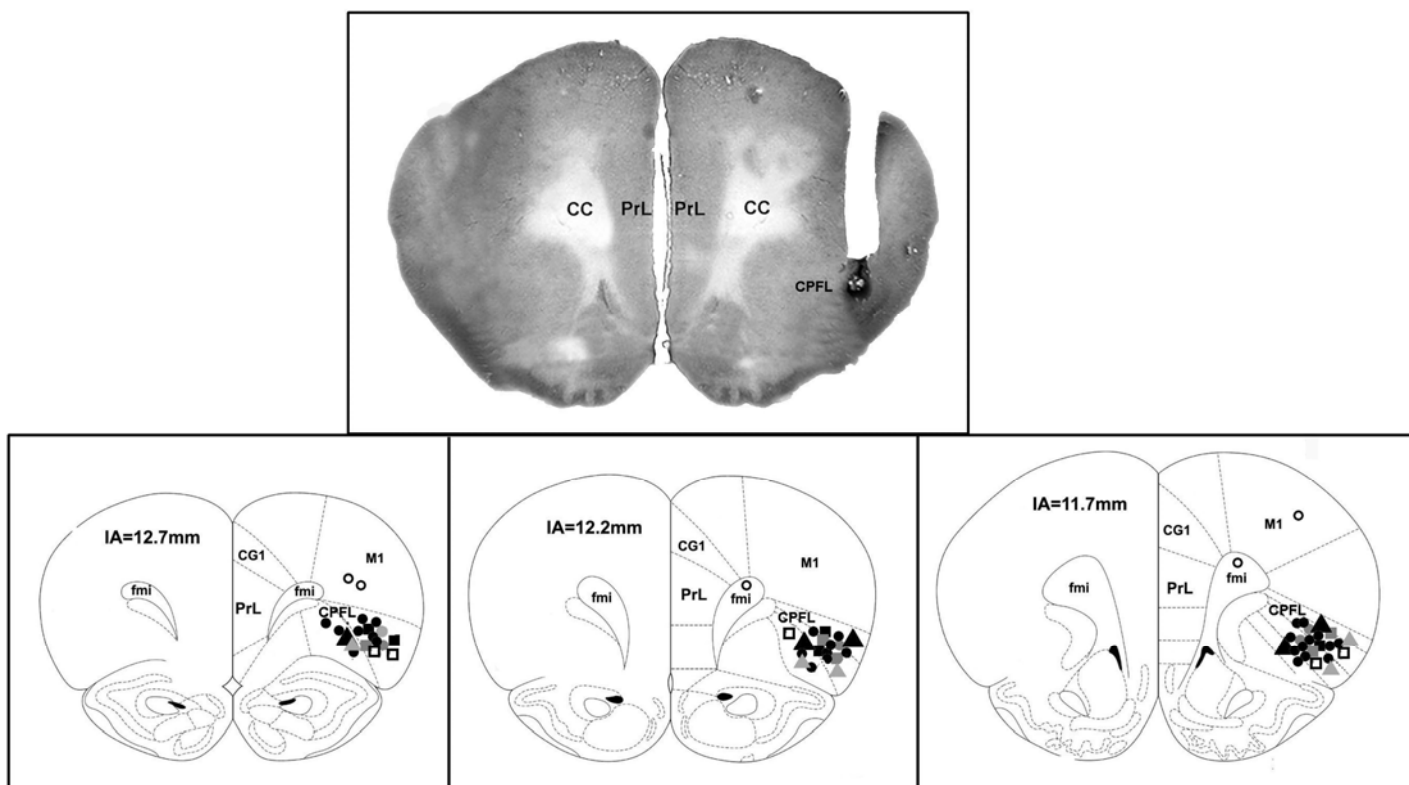




**Figura 15** – Variação da PAM ( $\Delta$ PAM) e FC ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo em um grupo de animais que receberam NA (15 nmol/100nL) no CPFL (círculos pretos) ou 10 min após infusão intravenosa de um antagonista de receptores vasopressinérgicos V1 (dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP) (círculos brancos). Dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (tratamento vs tempo). Círculos representam à média e as barras o SEM



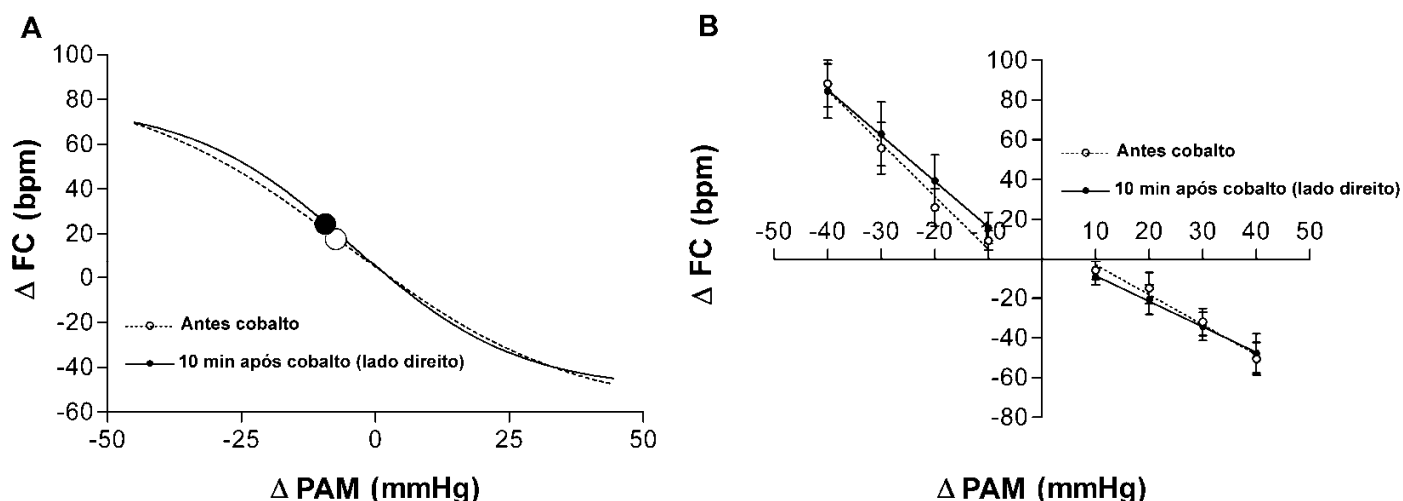
**Figura 16** – Registro mostrando variações de PA média (PAM), PA pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de NA (15 nmol/100nL) no CPFL de ratos não anestesiados antes (**Figura A**) e 10 min após o pré-tratamento intravenoso com um antagonista de receptores  $V_1$  vasopressinérgicos (dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP) (**Figura B**).



**Figura 17** – Fotomicrografia de um corte coronal de cérebro de um rato representativo do grupo mostrando o sitio de injeção no CPFL. Representação diagramática baseado no atlas (PAXINOS) indicando os sítios de injeção no CPFL de LCA (círculos cinzas), noradrenalina (círculos pretos), WB4101 (quadrados pretos), RX821002 (quadrados cinzas), 5-Metyl-Urapidil (quadrados brancos), fenilefrina (triângulos cinzas) ou propranolol (triângulos pretos) e noradrenalina em estruturas vizinhas ao CPFL (círculos brancos). Cg1 – córtex singular; PrL – córtex pré-limbico; M1 córtex motor primário; CPFL – córtex pré-frontal lateral; FMI – fórceps minor do corpo caloso .

### **5.9 - Efeitos da microinjeção unilateral de $\text{CoCl}_2$ no lado direito ou esquerdo do CPFL na resposta barorreflexa em ratos não anestesiados.**

**Lado Direito** – A microinjeção unilateral de  $\text{CoCl}_2$  (1 nmol/100nL) no lado direito do CPFL (n=5) não afetou os valores basais de (PAM=  $96 \pm 2$  vs  $98 \pm 2$  mmHg,  $t=0.5$ ;  $P>0.05$ ) ou (FC=  $347 \pm 9$  vs  $357 \pm 14$  bpm,  $t=1.5$ ;  $P>0.05$ ). Análise de regressão não linear indicou que a microinjeção unilateral de  $\text{CoCl}_2$  no lado direito do CPFL não afetou a resposta barorreflexa (Figura 18 - A) (Tabela 1). Além disso, análise de regressão linear mostrou que não houve diferença no ganho da curva de regressão linear para as respostas taquicárdicas ( $-2.6 \pm 0.5$  vs  $-2.3 \pm 0.6$  bpm/mmHg,  $t=0.3$ ,  $P>0.05$ ) e bradicárdicas ( $-1.6 \pm 0.3$  vs  $-1.4 \pm 0.4$  bpm/mmHg,  $t=0.3$ ,  $P>0.05$ ) (Figura 18 – B).

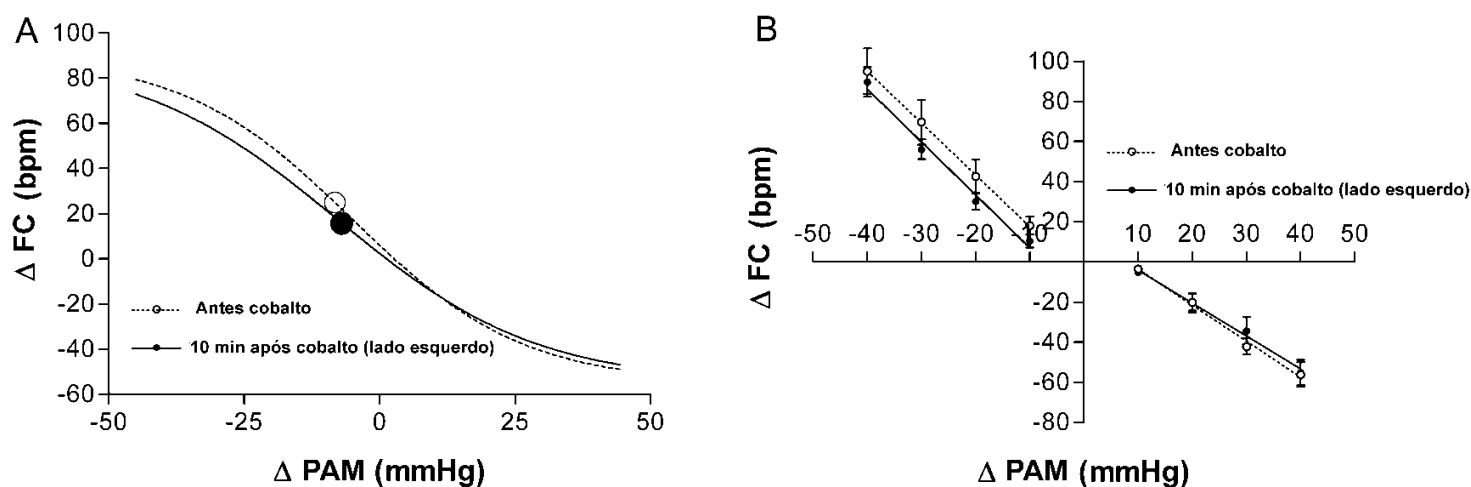


**Figura 18 - A** – Curva sigmoidal correlacionando valores de pressão arterial média ( $\Delta$  MAP) e frequência cardíaca ( $\Delta$  HR) antes ( $r^2=0.83$ ) e 10 min ( $r^2=0.83$ ) após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  (1 nmol/100nL) ( $n=5$ ) no lado direito do CPFL. **B** – Curva de regressão linear correlacionando as respostas ( $\Delta$  MAP) e ( $\Delta$  HR) antes ( $\circ$ ) ou 10 ( $\bullet$ ) min após a microinjeção unilateral de  $\text{CoCl}_2$  ( $n=5$ ). Aumentos ou quedas na pressão arterial foram induzidos pela infusão intravenosa respectivamente de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Valores da correlação  $r^2$  das curvas de regressão para as respostas bradicárdicas são respectivamente 0.65 e 0.55, antes ou 10 min após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$ . Valores da correlação  $r^2$  das curvas de regressão para as respostas bradicárdicas são respectivamente 0.72 e 0.56 antes ou 10 min após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  do lado direito do CPFL.

**Tabela 1-** Parâmetros derivados da curva sigmoidal barorreflexa geradas antes e 10 min após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  (1 nmol/100nL) no lado direito do CPFL. Valores são a média  $\pm$  S.E ( $n=5$ ).

Group	G (bpm/mmHg)	P1 (bpm)	P2 (bpm)	Range (bpm)	BP <sub>50</sub> (mmHg)
Antes $\text{CoCl}_2$	$-1.4 \pm 0.2$	$-60 \pm 3$	$97 \pm 10$	$157 \pm 12$	$-7 \pm 2$
10 min após $\text{CoCl}_2$ lado direito	$-1.4 \pm 0.1$	$-50 \pm 10$	$89 \pm 11$	$139 \pm 14$	$-9 \pm 4$
	$t=0$	$t=1$	$t=0.9$	$t=1$	$t=0.7$

**Lado Esquerdo** - A microinjeção unilateral de  $\text{CoCl}_2$  (1 nmol/100nL) no lado esquerdo do CPFL (n=5) não afetou os valores basais de (PAM=  $98 \pm 2$  vs  $99 \pm 2$  mmHg,  $t=0.4$ ;  $P>0.05$ ) ou (FC=  $342 \pm 9$  vs  $354 \pm 14$  bpm,  $t=1.2$ ;  $P>0.05$ ). Análises de regressão não linear indicaram que a microinjeção unilateral de  $\text{CoCl}_2$  no lado esquerdo do CPFL não afetou a resposta barorreflexa (Figura 19 - A) (Tabela 2). Além disso, análises de regressão linear mostraram que não houve diferença no ganho da curva de regressão linear para as respostas taquicárdicas ( $-2.5 \pm 0.4$  vs  $-2.6 \pm 0.3$  bpm/mmHg,  $t=0.2$ ,  $P>0.05$ ) e bradicárdicas ( $-1.7 \pm 0.2$  vs  $-1.6 \pm 0.3$  bpm/mmHg,  $t=0.2$ ,  $P>0.05$ ) (Figura 19 - B).



**Figura 19 - A** – Curvas sigmoidais correlacionando valores de pressão arterial média ( $\Delta$  MAP) e frequência cardíaca ( $\Delta$  HR) antes ( $r^2=0.88$ ) e 10 min ( $r^2=0.90$ ) após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  (1 nmol/100nL) ( $n=5$ ) no lado esquerdo do CPFL. **B** – Curva de regressão linear correlacionando as respostas ( $\Delta$  MAP) e ( $\Delta$  HR) antes ( $\circ$ ) ou 10 ( $\bullet$ ) min após a microinjeção unilateral de  $\text{CoCl}_2$  ( $n=5$ ). Aumentos ou quedas na pressão arterial foram induzidos pela infusão intravenosa respectivamente de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Valores da correlação  $r^2$  das curvas de regressão para as respostas bradicárdicas são respectivamente 0.84 e 0.74, antes ou 10 min após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  do lado esquerdo do CPFL. Valores da correlação  $r^2$  das curvas de regressão para as respostas bradicárdicas são respectivamente 0.70 e 0.87 antes ou 10 min após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  do lado esquerdo do CPFL.

**Tabela 2-** Parâmetros derivados da curva sigmoidal barorreflexa geradas antes e 10 min após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  (1 nmol/100nL) no lado esquerdo do CPFL. Valores são a média  $\pm$  S.E ( $n=5$ ).

Grupo	G (bpm/ mmHg)	P1 (bpm)	P2 (bpm)	Range (bpm)	BP <sub>50</sub> (mmHg)
Antes $\text{CoCl}_2$	$-1.4 \pm 0.2$	$-56 \pm 6$	$95 \pm 7$	$151 \pm 10$	$-8 \pm 2$
10 min após $\text{CoCl}_2$ lado esquerdo	$-1.2 \pm 0.1$	$-55 \pm 7$	$90 \pm 6$	$145 \pm 11$	$-7 \pm 3$
	$t=0.9$	$t=0.1$	$t=0.4$	$t=0.5$	$t=0.5$

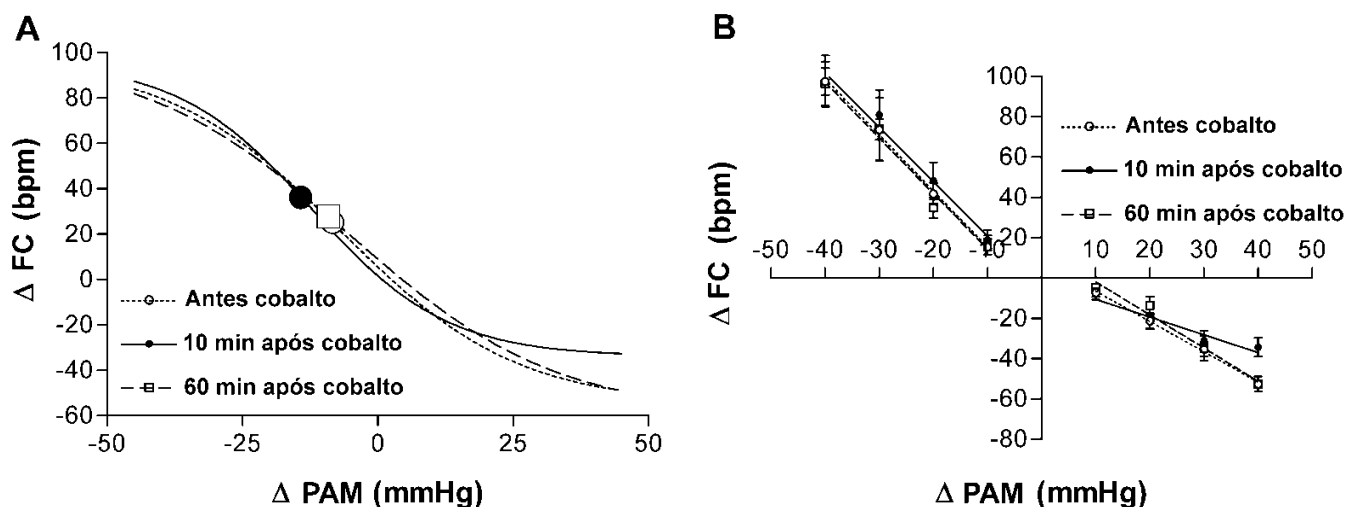
### 5.10 - Efeitos da microinjeção bilateral de LCA ou $\text{CoCl}_2$ no CPFL na resposta barorreflexa em ratos não anestesiados.

**LCA** - A microinjeção bilateral de LCA no CPFL (n=5) não afetou os valores basais de (PAM=  $97 \pm 1$  vs  $101 \pm 2$  mmHg,  $t=2$ ;  $P>0.05$ ) ou (FC=  $355 \pm 4$  vs  $371 \pm 10$  bpm  $t=2$ ;  $P>0.05$ ). A análise de regressão linear não indicou diferença no ganho das respostas reflexas bradicárdicas ( $-1.4 \pm 0.2$  vs  $-1.5 \pm 0.2$  bpm/mmHg,  $t=0.3$ ;  $P>0.05$ ) ou taquicárdicas ( $-1.7 \pm 0.2$  vs  $-1.9 \pm 0.2$  bpm/mmHg,  $t=0.6$ ;  $P>0.05$ ) após a microinjeção de LCA no CPFL.

**$\text{CoCl}_2$**  - A microinjeção bilateral de  $\text{CoCl}_2$  (1 nmol/100nL) no CPFL (n=7) não afetou os valores basais de (PAM=  $100 \pm 2$  vs  $98 \pm 2$  mmHg,  $t=0.5$ ;  $P>0.05$ ) ou (FC=  $368 \pm 9$  vs  $358 \pm 14$  bpm,  $t=1.5$ ;  $P>0.05$ ). Entretanto a análise de regressão não linear indicou que a microinjeção bilateral de  $\text{CoCl}_2$  no CPFL diminuiu o platô mínimo de FC ( $P_1$ , bpm), o valor médio de pressão arterial ( $\text{BP}_{50}$ , mmHg) e o ( $\Delta P$ , mmHg), quando comparados com o grupo controle. Sessenta minutos após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  os parâmetros analisados do barorreflexo retornaram aos valores controle (Figura 20 – A) (Tabela 3). Para analisar as respostas barorreflexa separadamente foi feita a curva de regressão linear tanto para as respostas taquicárdicas quanto para as respostas bradicárdicas. O ganho da resposta bradicárdica gerada pela regressão linear estava significativamente reduzida 10 min após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  no CPFL ( $-1.6 \pm 0.1$  vs  $-0.8 \pm 0.1$  bpm/mmHg,  $F=12$ ,  $P<0.05$ ). Os valores do ganho da regressão linear voltaram aos valores basais 60 min após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  ( $-1.7 \pm 0.2$  bpm/ mmHg,



$P > 0.05$ ). Entretanto, o ganho da resposta taquicárdica gerada pela regressão linear não foi afetada pela microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  no CPFL ( $F = 0.016$ ,  $P > 0.05$ ). O valores do ganho da regressão linear foram respectivamente  $-2.8 \pm 0.3$  antes da microinjeção de  $\text{CoCl}_2$ ,  $-2.7 \pm 0.5$  e  $-2.8 \pm 0.5$  bpm/mmHg 10 e 60 min após  $\text{CoCl}_2$  (Figura 20 – B). Um registro representativo mostrando o efeito da microinjeção bilateral de  $\text{CoCl}_2$  no CPFL sobre a resposta bradicárdica do barorreflexo é apresentada na (Figura 21). Representação diagramática dos sítios de injeção no CPFL de todos os animais utilizados no estudo da participação do CPFL na modulação do sistema barorreflexo e uma fotomicrografia representativa da secção coronal do cérebro de um dos animais utilizados neste conjunto de experimentos são apresentadas na Figura 22.

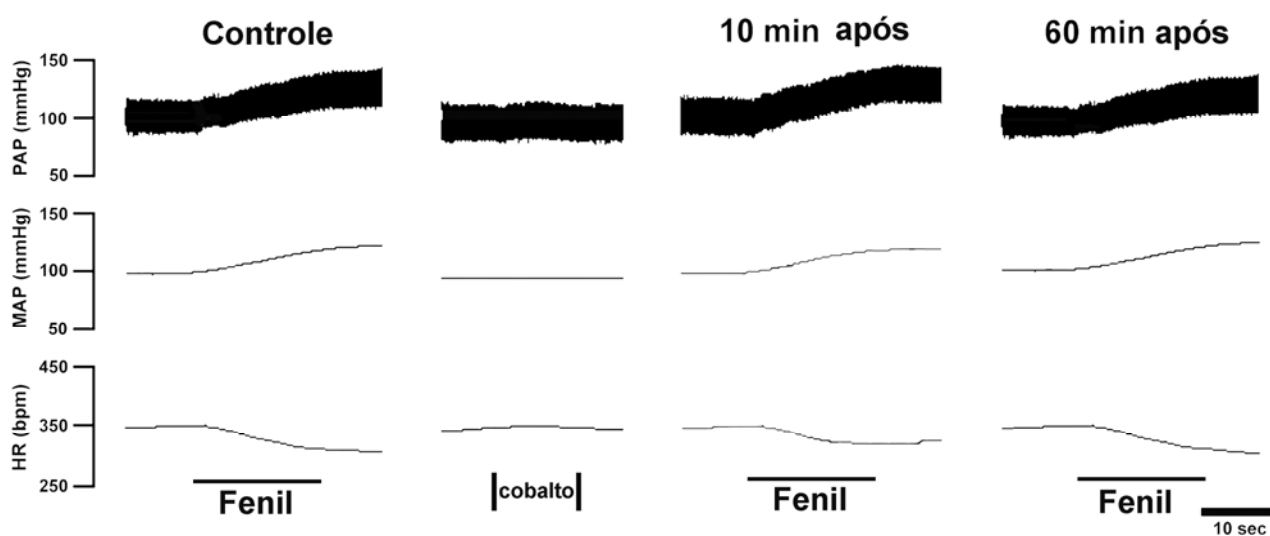


**Figura 20 -A** – Curvas sigmoidais correlacionando valores de pressão arterial média ( $\Delta$  MAP) e frequência cardíaca ( $\Delta$  HR) antes ( $r^2=0.91$ ), 10 min ( $r^2=0.85$ ) e 60 min ( $r^2=0.87$ ) após a microinjeção bilateral de  $\text{CoCl}_2$  (1nmol/100nL) (n=7) no CPFL. **B** – Curva de regressão linear correlacionando as respostas ( $\Delta$  MAP) e ( $\Delta$  HR) antes ( $\circ$ ), 10 ( $\bullet$ ) ou 60 ( $\square$ ) min após a microinjeção bilateral de  $\text{CoCl}_2$  no CPFL (n=7). Aumentos ou quedas na pressão arterial foram induzidos pela infusão intravenosa respectivamente de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Valores da correlação  $r^2$  das curvas de regressão para as respostas bradicárdicas são respectivamente 0.80 antes, 0.49 e 0.82, 10 ou 60 min após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  bilateralmente CPFL. Valores da correlação  $r^2$  das curvas de regressão para as respostas taquicárdicas são respectivamente 0.70 e 0.87 antes ou 10 min após a microinjeção bilateral de  $\text{CoCl}_2$  no CPFL.

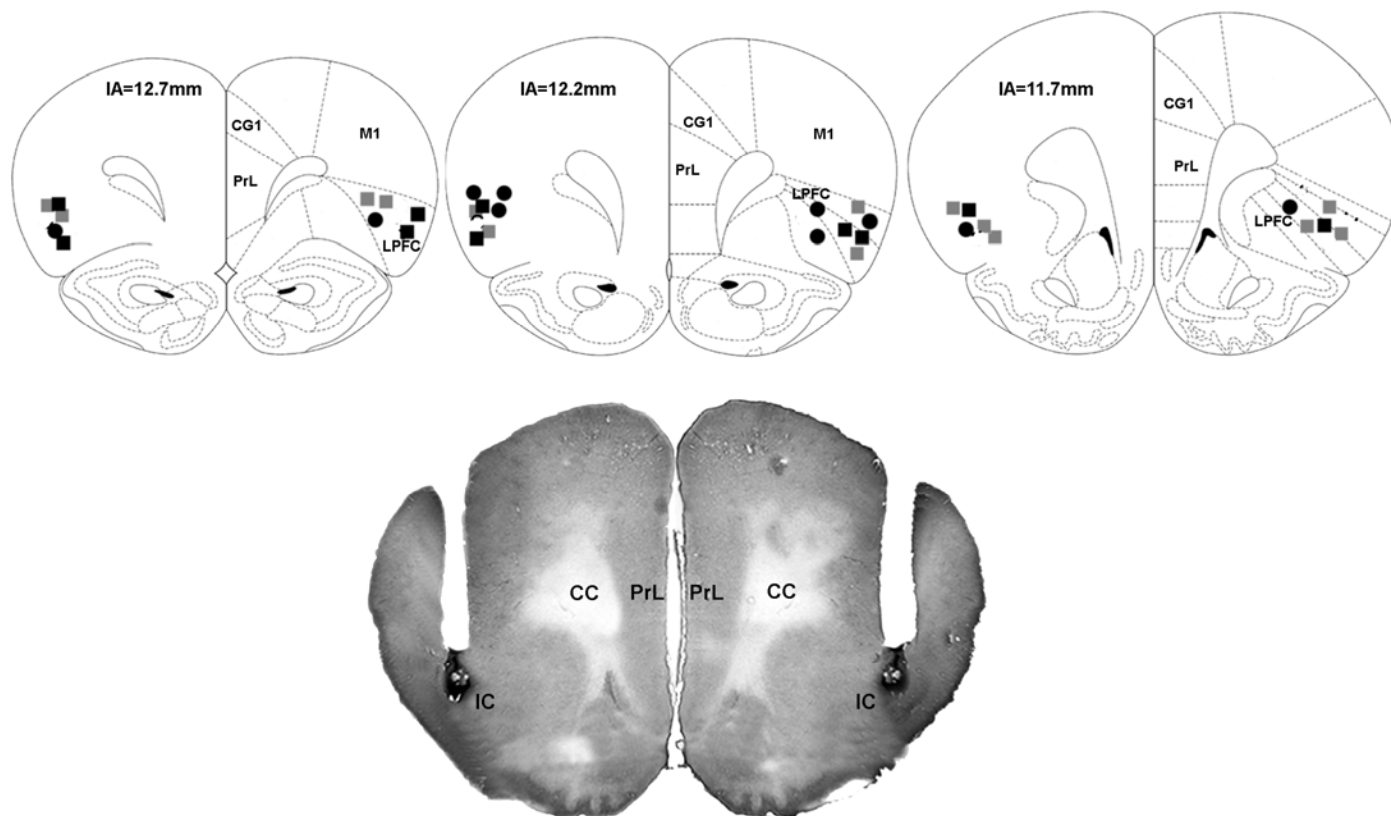
**Tabela 3** - Parâmetros derivados da curva sigmoidal barorreflexa geradas antes, 10 e 60 min após a microinjeção bilateral de  $\text{CoCl}_2$  (1nmol/100nL) no CPFL. Valores são a média  $\pm$  S.E (n=7).

Group	G (bpm/ mmHg)	P1 (bpm)	P2 (bpm)	Range (bpm)	BP <sub>50</sub> (mmHg)
Antes $\text{CoCl}_2$	$-1.3 \pm 0.2$	$-54 \pm 3$	$98 \pm 6$	$150 \pm 7$	$-8 \pm 1$
10 min após $\text{CoCl}_2$	$-1.5 \pm 0.1$	$-33 \pm 4^*$	$97 \pm 12$	$120 \pm 10^*$	$-14 \pm 1^*$
60 min após $\text{CoCl}_2$	$-1.4 \pm 0.1$	$-53 \pm 2$	$96 \pm 11$	$149 \pm 8$	$-9 \pm 3$
	$F= 0.5$	$F=14.5$	$F= 0.009$	$F= 4$	$F= 5$

\* $p<0.05$ , diferença significativa dos valores após  $\text{CoCl}_2$ , one-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett's.



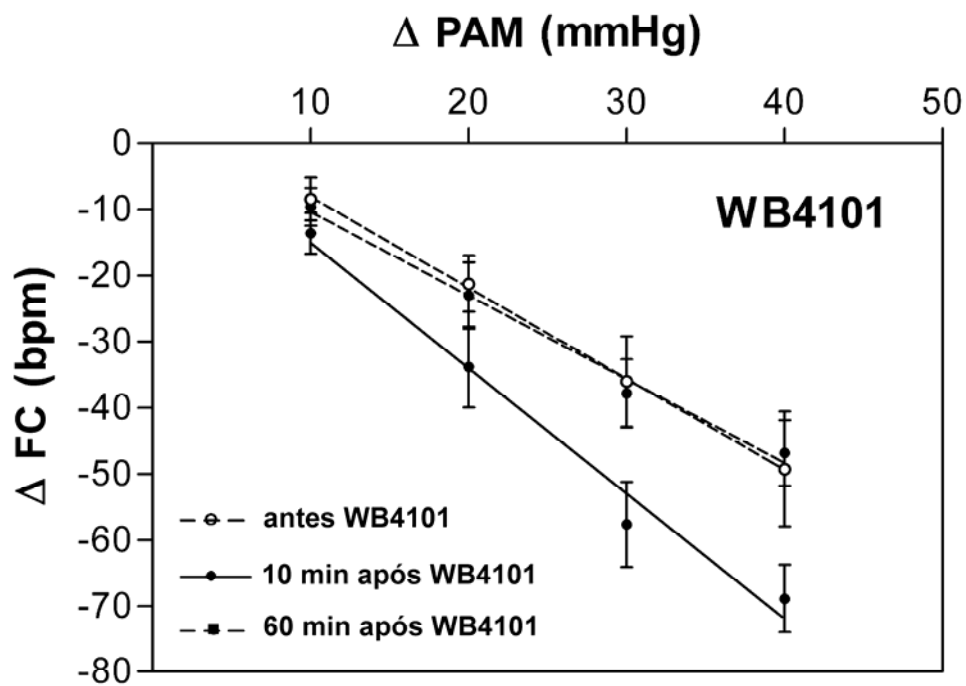
**Figura 21** - Registros representativos de um animal tratado com  $\text{CoCl}_2$ , ilustrando a resposta bradicárdica barorreflexa em resposta a aumentos de PAM causados pela infusão i.v. de fenilefrina antes e 10 ou 60 minutos após a microinjeção do  $\text{CoCl}_2$  (1 nmol/100nL) no CPFL. PAM- pressão arterial média; PAP- pressão arterial pulsátil; FC- frequência cardíaca.



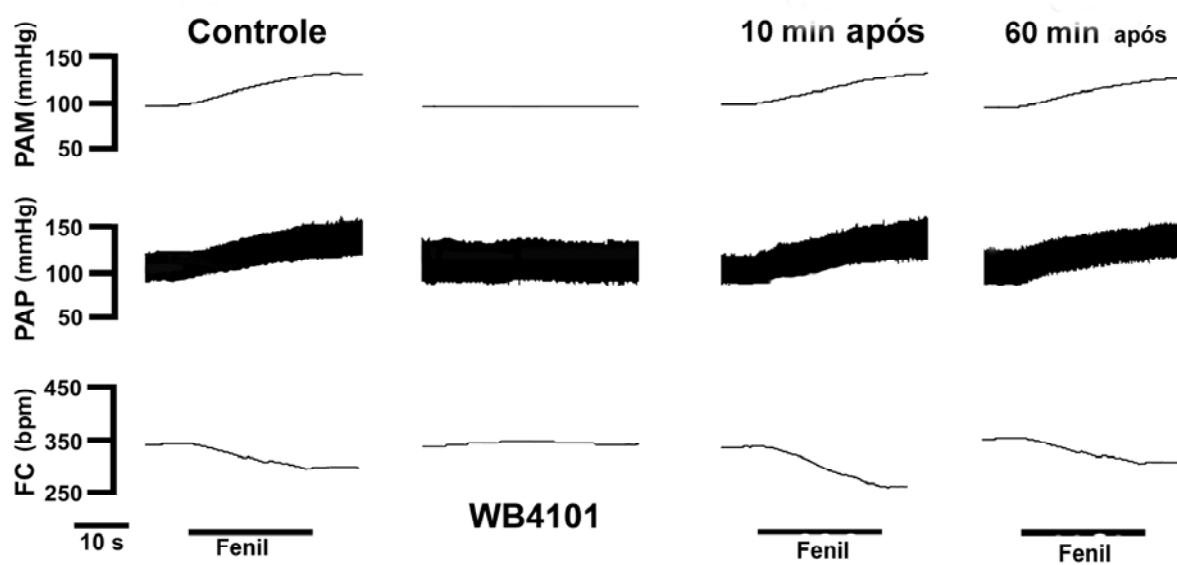
**Figura 22** - Representações diagramáticas (modificada de Paxinos e Watson, 1997) indicando os sítios de microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  unilateral lado direito ( $\square$ ) ou lado esquerdo ( $\square$ ) ou a microinjeção bilateral de LCA ( $\blacksquare$ ),  $\text{CoCl}_2$  ( $\bullet$ ). Cg1 – córtex cingular; PrL – córtex pré-limbico, M1 – córtex motor primário; LPFC – córtex pré-frontal lateral; cc – corpus callosum, (fmi) - forceps minor do corpus callosum. Fotomicrografia do cérebro de um rato representativo mostrando o sitio de injeção bilateral no CPFL.

### 5.11 - Efeito do pré-tratamento do CPFL com WB4101, RX821002 ou propranolol sobre a modulação da atividade do sistema barorreflexo em ratos não anestesiados.

**WB4101** – A microinjeção bilateral de WB4101 (15 nmol/100nL) antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$  (n=5) não afetou os valores basais de (PA=  $100\pm 2$  vs  $103\pm 4$  mmHg;  $t=0.6$ ;  $P>0.05$ ) ou (FC=  $374\pm 8$  vs  $358\pm 10$  bpm;  $t=1.1$ ;  $P>0.05$ ). Entretanto, o ganho da curva gerada pela regressão linear nas respostas bradicárdicas reflexas estava aumentada 10 minutos após o tratamento com WB4101 quando comparada aos valores controles, antes da microinjeção do WB4101 no CPFL ( $-1.3\pm 0.2$  vs  $-1.9\pm 0.2$  bpm/mmHg;  $F=5$ ,  $P<0.05$ ). O efeito do WB4101 foi reversível 60 min após a sua microinjeção e os valores da bradicardia reflexa voltaram aos valores basais ( $-1.2\pm 0.1$  bpm/mmHg;  $P>0.05$ ) (Figura 23). Nenhuma mudança foi observada nas respostas de bradicardia reflexa quando o WB4101 foi microinjetado em estruturas vizinhas ao CPFL como o córtex motor primário ou o forceps menor do corpus callosum ( $-1.4\pm 0.3$  vs  $-1.6\pm 0.4$  bpm/mmHg;  $t=0.4$ ;  $P>0.05$ ). Um registro representativo mostrando o efeito da microinjeção bilateral de WB4101 no CPFL sobre a resposta bradicárdica do barorreflexo é apresentada na (Figura 24).

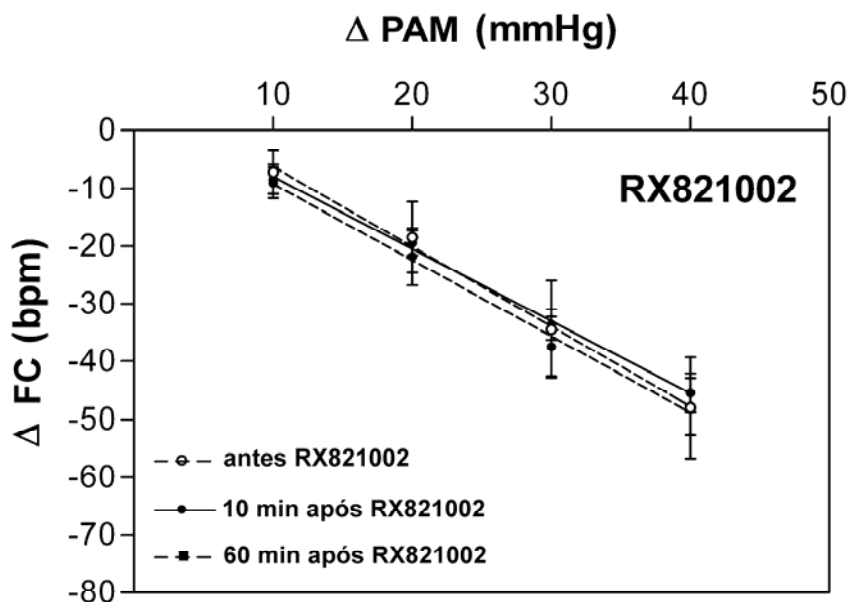


**Figura 23-** Curva de regressão linear mostrando a resposta cardíaca do barorreflexo em resposta a aumentos da PAM causado pela infusão i.v. de fenilefrina antes (controle, círculos brancos) e 10 ou 60 minutos (círculos pretos) após a microinjeção bilateral no CPFL do antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$  WB4101 (15 nmol/100nL) em animais não-anestesiados. Os valores de  $r^2$  foram 0.6 antes e 0.8 e 0.7 10 e 60 minutos após administração de WB4101 no CPFL, respectivamente.



**Figura 24-** Registros representativos de um animal tratado com WB4101, ilustrando a resposta bradicárdica do barorreflexo em resposta a aumentos de PAM causado pela infusão i.v. de fenilefrina antes e 10 ou 60 minutos após a microinjeção do WB4101 (15 nmol/100nL) no CPFL. PAM- pressão arterial média; PAP- pressão arterial pulsátil; FC- frequência cardíaca.

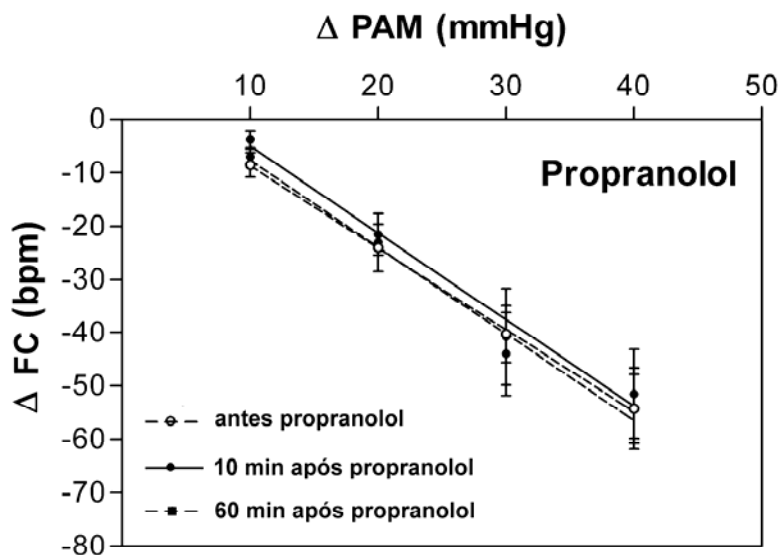
**RX821002** – A microinjeção bilateral de RX821002 (15 nmol/100nL) antagonista seletivo de adrenoreceptores  $\alpha_2$  (n=5) não afetou os valores basais de (PAM=  $97\pm 3$  vs  $99\pm 3$  mmHg;  $t=0.3$ ;  $P>0.05$ ) ou (FC=  $347\pm 6$  vs  $359\pm 7$  bpm;  $t=1.2$ ;  $P>0.05$ ). Além disso, A microinjeção de RX821002 no CPFL também não afetou significativamente o ganho da curva de regressão linear para variações na FC em função de aumentos na PAM ( $-1.3\pm 0.2$  vs  $-1.2\pm 0.1$  bpm/mmHg,  $F=0.02$ ;  $P>0.05$ ) (Figura 25).



**Figura 25** - Curva de regressão linear mostrando a resposta cardíaca do barorreflexo em resposta a aumentos da PAM causado pela infusão i.v. de fenilefrina antes (controle, círculos brancos) e 10 ou 60 minutos (círculos pretos) após a microinjeção bilateral no CPFL do antagonista seletivo de adrenoreceptores  $\alpha_2$  RX821002 (15 nmol/100nL) em animais não-anestesiados. Os valores de  $r^2$  foram 0.5 antes e 0.9 e 0.7, 10 e 60 minutos após administração de RX821002 no CPFL, respectivamente



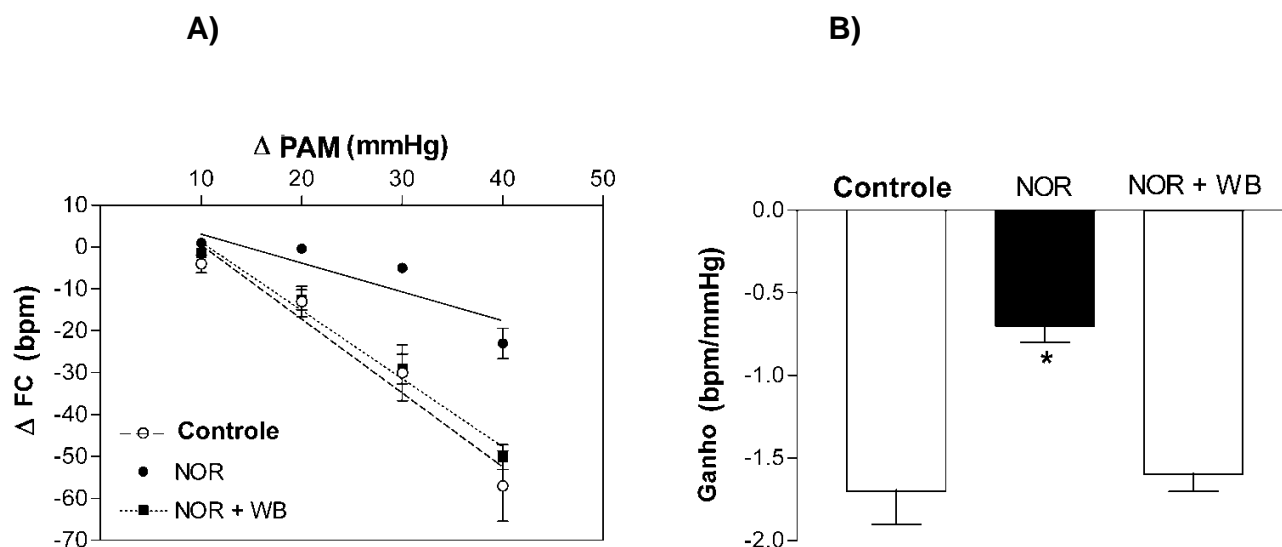
**Propranolol** – A microinjeção bilateral de propranolol (15 nmol/100nL) antagonista não seletivo de adrenoceptores  $\beta$  (n=5) não afetou os valores basais de (PAM=  $103 \pm 4$  vs  $99 \pm 3$  mmHg;  $t=0.6$ ;  $P>0.05$ ) ou (FC=  $339 \pm 8$  vs  $357 \pm 6$  bpm;  $t=1.7$ ;  $P>0.05$ ). Além disso, a microinjeção de propranolol no CPFL também não afetou de maneira significativa a regressão linear para variações na FC em função de aumentos na PAM ( $-1.5 \pm 0.2$  vs  $-1.6 \pm 0.3$  bpm/mmHg,  $F=0.05$ ;  $P>0.05$ ) (Figura 26).



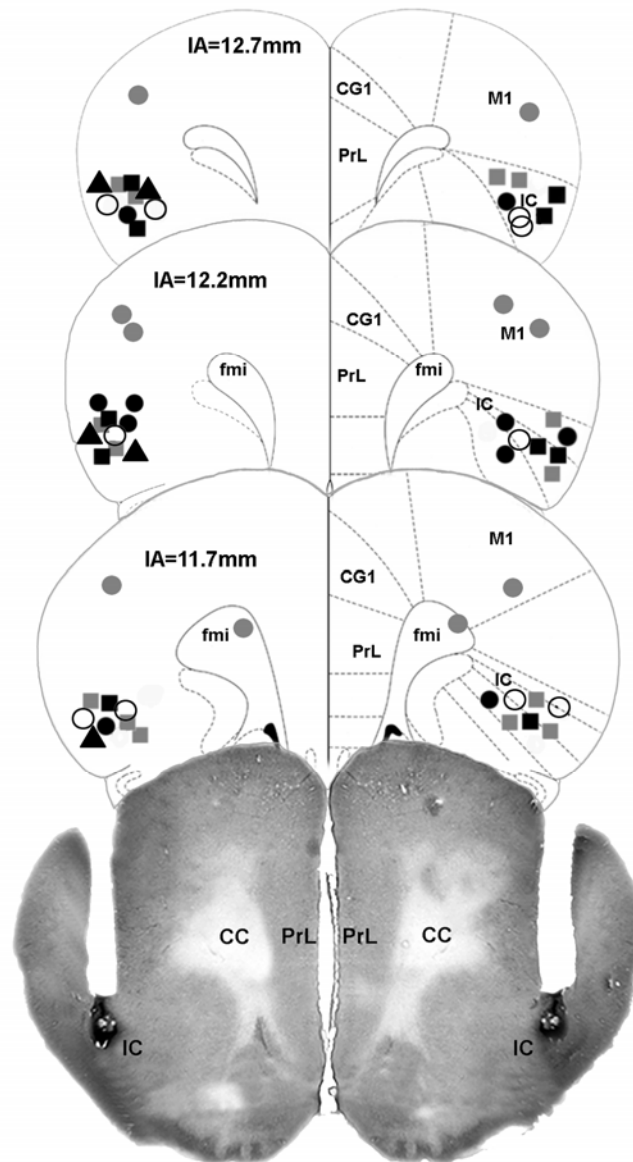
**Figura 26** - Curva de regressão linear mostrando a resposta cardíaca do barorreflexo em resposta a aumentos da PAM causado pela infusão i.v. de fenilefrina antes (controle, círculos brancos) e 10 (círculos pretos) ou 60 minutos (quadrados pretos) após a microinjeção bilateral no CPFL do antagonista não seletivo de adrenoceptores  $\beta$  propranolol (15 nmol/100nL) em animais não-anestesiados. Os valores de  $r^2$  foram 0.8 antes e 0.7 e 0.7, 10 e 60 minutos após administração de propranolol no CPFL, respectivamente

### **5.12 - Efeito da infusão unilateral de noradrenalina no CPFL na resposta bradicárdica barorreflexa em resposta a infusão intravenosa de fenilefrina.**

A infusão unilateral de NA (7 nmol/100nL) (n=5) no CPFL de ratos não anestesiados não alterou os valores basais de (PAM=  $96\pm 1$  vs  $97\pm 2$  mmHg;  $t=0.07$ ;  $P>0.05$ ) ou (FC=  $350\pm 8$  vs  $342\pm 6$  bpm;  $t=0.74$ ;  $P>0.05$ ). Entretanto, o ganho da curva de regressão linear gerada pelas resposta bradicárdica reflexa estava diminuída durante a infusão de NA no CPFL, quando comparada aos valores antes da infusão de NA ( $-1.2\pm 0.2$  vs  $-0.7\pm 0.2$  bpm/mmHg;  $F=15$ ,  $P<0.001$ ). Além disso, o efeito da infusão de NA na bradicardia reflexa foi bloqueada pelo pré-tratamento do CPFL com o WB4101 (15 nmol/100nL) (n=5) ( $-1.7\pm 0.2$  vs  $-1.6\pm 0.1$  bpm/mmHg;  $F=15$ ,  $P>0.05$ ) (Figura 27 – A, B). Representação diagramática dos sítios de injeção no CPFL de todos os animais utilizados no estudo da participação da neurotransmissão noradrenérgica do CPFL na modulação do sistema barorreflexo e uma fotomicrografia representativa da secção coronal do cérebro de um dos animais utilizados neste conjunto de experimentos são apresentadas na (Figura 28).



**Figura 27 – A)** Curva de regressão linear mostrando a resposta cardíaca do barorreflexo em resposta a aumentos da PAM causado pela infusão i.v. de fenilefrina antes (círculos brancos), durante a infusão de noradrenalina no CPFL (círculos pretos) ou durante a infusão de NA 10 min após a microinjeção de WB4101 (15nmols/100nL). Os valores de  $r^2$  foram 0.7 antes e 0.8 durante a infusão de NA e 0.9 durante a infusão de NA 10min após a microinjeção de WB4101 CPFL. **B)** Ganhos das curvas de regressão linear durante a infusão de NA no CPFL ou infusão de NA 10min após a microinjeção de WB4101.



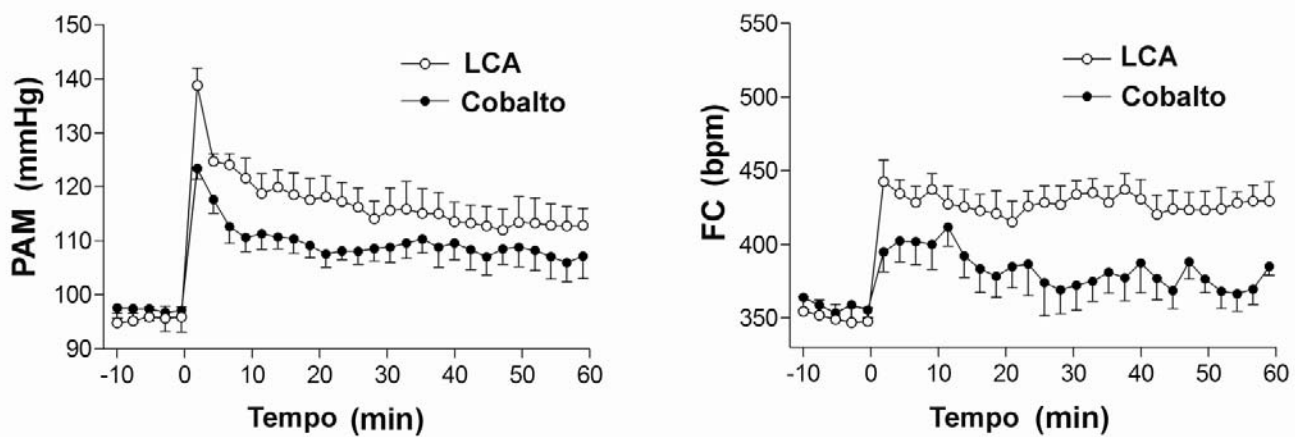
**Figura 28** – Representação diagramática baseada no atlas Paxinos e Watson (1997), indicando sítios de injeção para LCA (círculos brancos), WB4101 (círculos pretos), RX821002 (quadrados cinzas), propranolol (quadrados pretos) ou microinjeções unilaterais de NA no CPFL (triângulos pretos). Cg1 – córtex cingular; PrL – córtex pré-limbico, M1 – córtex motor primário; LPFC – córtex pré-frontal lateral; cc – corpus callosum, (fmi) - forceps minor do corpus callosum. Fotomicrografia de um corte coronal de um rato representativo mostrando os locais de microinjeção no CPFL.

### 5.13 - Efeito da microinjeção de LCA ou CoCl<sub>2</sub> no CPFL na modulação da atividade cardiovascular durante o ER.

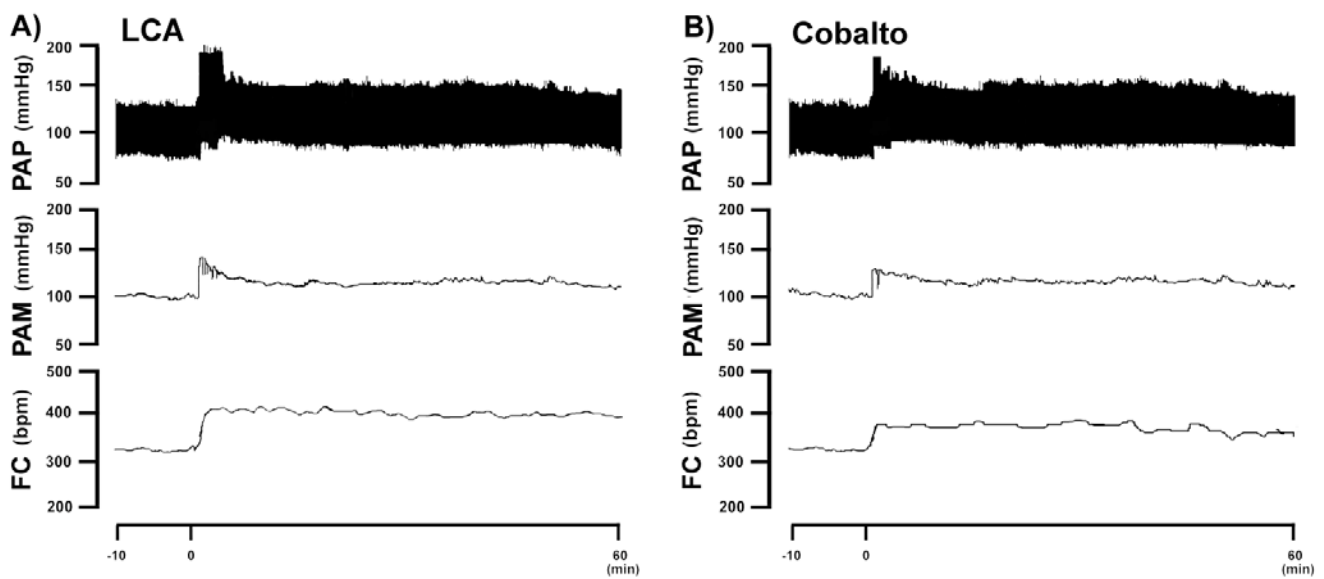
**LCA** - A microinjeção bilateral de LCA (100nL) (n=5) não afetou os valores basais de (PAM= 98±6 vs. 96±2 mm Hg; t=0.2, P>0.05) ou (FC= 364±13 vs. 350±10 bpm; t=0.5; P>0.05). Além disso, não houve diferença significativa nas respostas cardiovasculares entre os grupos não tratados e os que receberam a microinjeção de LCA bilateralmente no CPFL (n=6) (PAM:  $F_{(1,150)}=1.2$ , P>0.05) ou (FC:  $F_{(1,150)}=1.1$ , P>0.05) durante o ER. A Figura 30 – A mostra um registro representativo de pressão arterial pulsátil, pressão arterial média e frequência cardíaca de um animal que recebeu LCA bilateralmente no CPFL e foi submetido ao ER.

**CoCl<sub>2</sub>** – A microinjeção bilateral de CoCl<sub>2</sub> (1nmol/100nL) n=6 no CPFL não afetou os valores basais de (PAM= 94±1 vs. 97±3 mmHg; t=0.8, P>0.05) ou (FC= 375±8 vs. 357±5 bpm; t=1.3; P>0.05). Entretanto, a análise das curvas temporais das respostas cardiovasculares ao ER após o pré-tratamento bilateral do CPFL com CoCl<sub>2</sub> indicou uma significativa redução das respostas pressora PAM: ( $F_{(1,150)}=34$ , P<0.0001) e bradicárdica FC: ( $F_{(1,150)}=88$ , P<0.0001), quando comparadas com os animais que receberam LCA bilateralmente no CPFL (Figura 29). A Figura 30 – B mostra um registro representativo de pressão arterial pulsátil, pressão arterial média e frequência cardíaca de um animal que recebeu CoCl<sub>2</sub> bilateralmente no CPFL e foi submetido ao estresse por restrição. Representação diagramática dos sítios de injeção no CPFL de todos os animais utilizados no estudo da participação do CPFL na modulação da atividade

cardiovascular durante o ER e uma fotomicrografia representativa da secção coronal do cérebro de um dos animais utilizados neste conjunto de experimentos são apresentadas na Figura 31.

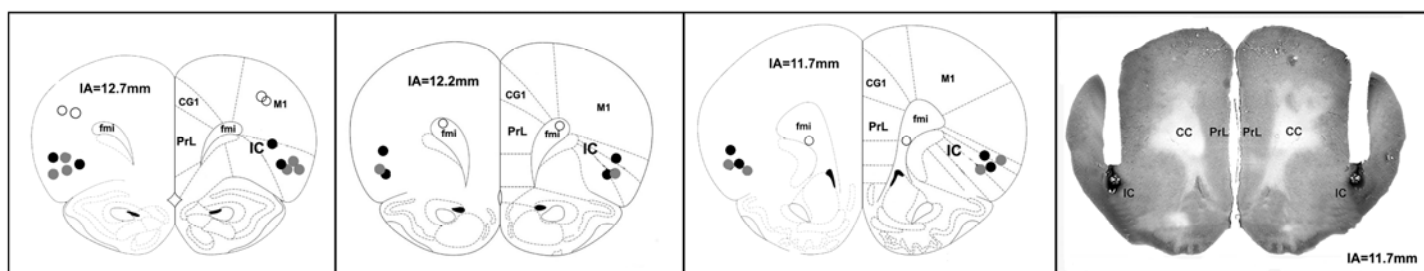


**Figura 29** – Variação da PAM ( $\Delta$ PAM) e FC ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo durante a restrição, em um grupo de animais tratados com veículo (LCA, 100nL, n=6) ou ( $\text{CoCl}_2$  1 nmol/100nL, n=6) no CPFL. Círculos representam à média e as barras o SEM. A restrição dos animais começou no  $t=0$ . Dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (tratamento vs tempo).



**Figura 30** – **A)** Registro mostrando variações de PA média (PAM), PA pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de (LCA, 100nL) no CPFL durante o período de exposição ao estresse por restrição. **B)** Registro mostrando variações de PAM, PAP e FC de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  (1nmol/100nL) no CPFL durante o período de exposição ao estresse por restrição.

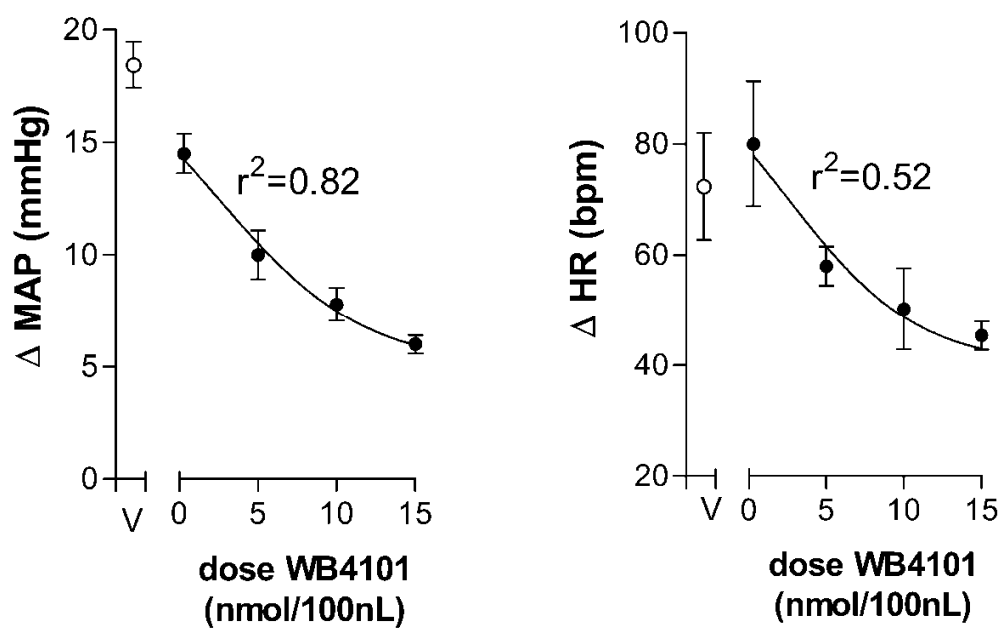




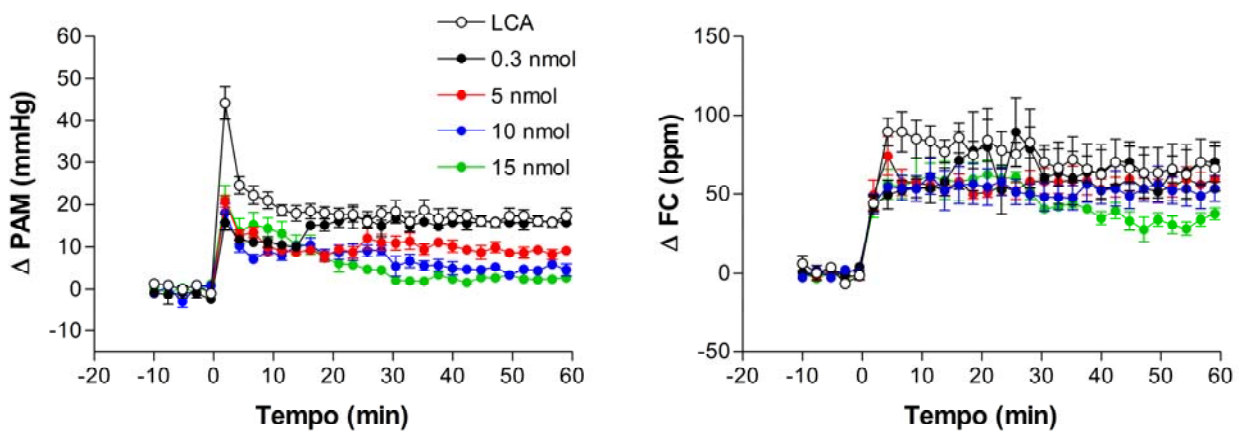
**Figura 31** – Representação diagramática baseada no atlas Paxinos e Watson (1997), indicando sítios de injeção para LCA (círculos cinzas),  $\text{CoCl}_2$  (círculos pretos), ou microinjeções de  $\text{CoCl}_2$  em áreas circunvizinhas ao CPFL (círculos brancos) dos animais submetidos ao ER. Cg1 – córtex cingular; PrL – córtex pré-limbico, M1 – córtex motor primário; LPFC – córtex pré-frontal lateral; cc – corpus callosum, (fmi) - forceps minor do corpus callosum. Fotomicrografia de um corte coronal de um rato representativo mostrando os locais de microinjeção no CPFL.

#### **5.14 - Efeito da microinjeção de diferentes doses de WB4101 no CPFL na modulação da atividade cardiovascular durante o ER.**

A microinjeção bilateral de doses crescentes do antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$  WB4101 (0,3, 5, 10, e 15 nmol/100nL) (n=4) para cada dose utilizada no CPFL, não afetou os valores basais de PAM ou FC, (tabela 1 e 2 do apêndice). Entretanto, pré-tratamento do CPFL com essas diferentes doses de WB4101, causou uma redução dose-dependente na resposta pressora ( $r^2=0.82$ ,  $df=15$ ,  $p<0.05$ ) e taquicárdica ( $r^2=0.52$ ,  $df=15$ ,  $p<0.05$ ) causada pelo ER (Figura 32). A (Figura 33) mostra as curvas temporais geradas a partir das respostas cardiovasculares durante o estresse por restrição, nas diferentes doses do antagonista  $\alpha_1$  (WB4101) microinjetados no CPFL.



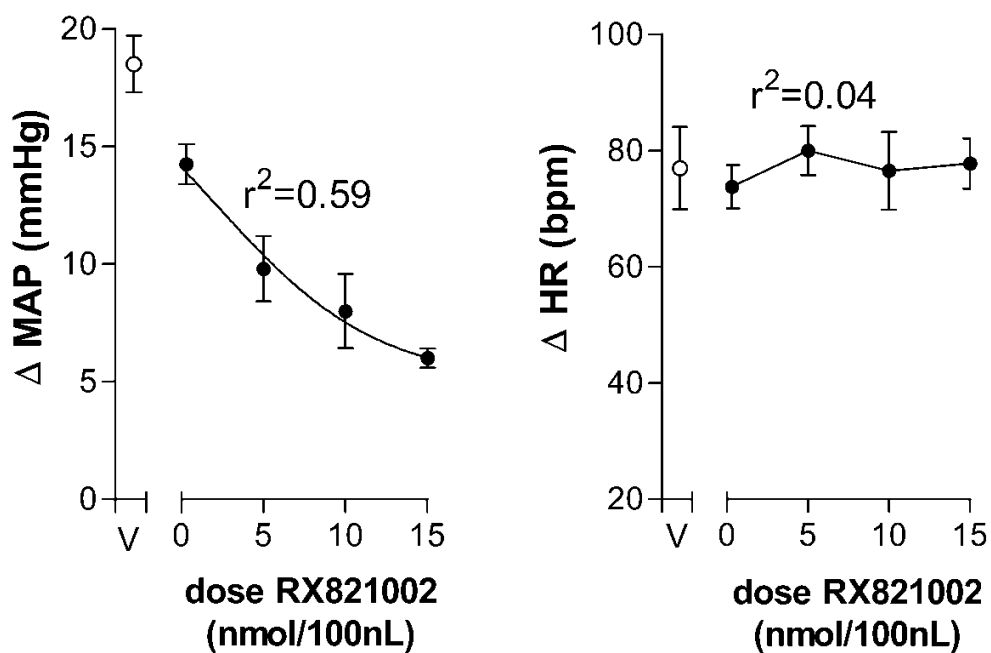
**Figura 32-** Inibição das respostas pressoras e taquicárdicas causadas pelo estresse por restrição pela microinjeção bilateral de diferentes doses (0.3, 5, 10 e 15 nmol/100nL) do antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$ , WB4101 no CPFL de ratos. Círculos representam à média e as barras o SEM.



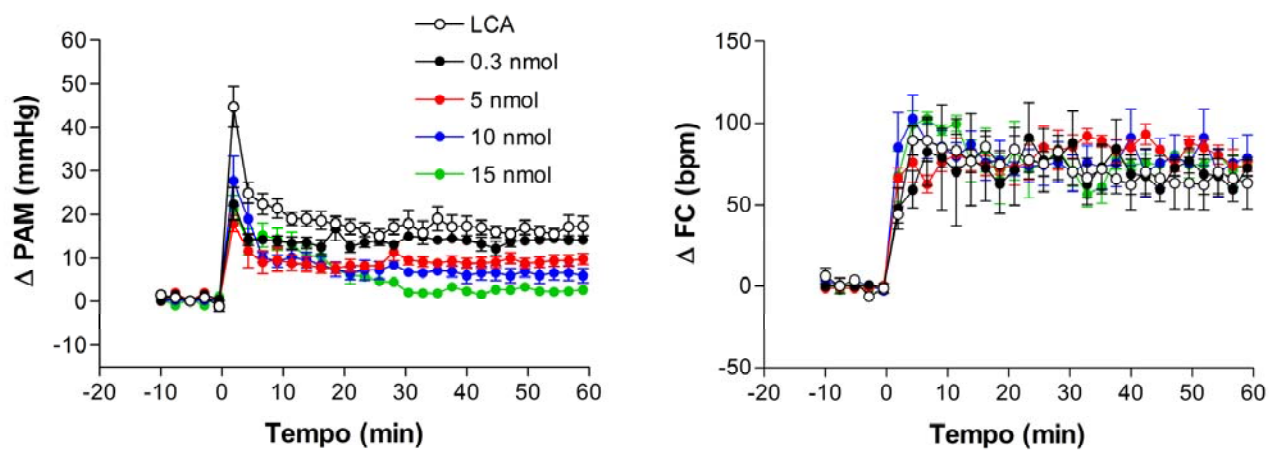
**Figura 33** – Variação da PAM ( $\Delta$ PAM) e FC ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo durante a restrição, em um grupo de animais tratados com diferentes doses do antagonista seletivo de adrenoreceptores  $\alpha 1$  WB4101 (0.3, 5, 10 e 15 nmol/100nL), no CPFL. Círculos representam à média e as barras o SEM. A restrição dos animais começou no t=0. Dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (tratamento vs tempo).

### **5.15 - Efeito da microinjeção de diferentes doses de RX821002 no CPFL na modulação da atividade cardiovascular durante o estresse por restrição.**

A microinjeção bilateral de diferentes doses do antagonista seletivo para adrenoceptores  $\alpha_2$  RX821002 (0,3, 5, 10, e 15 nmol/100nL) n=4 para cada dose utilizada no CPFL não afetou os valores basais de PAM ou FC, (tabela 3 e 4 do apêndice). Entretanto, pré-tratamento do CPFL com essas diferentes doses de RX821002, causou uma redução dose-dependente na resposta pressora ( $r^2=0.59$ ,  $df=16$ ,  $p<0.05$ ) sem afetar a resposta taquicárdica ( $r^2=0.04$ ,  $df=16$ ,  $p<0.05$ ) causada pelo ER (Figura 34). A (Figura 35) mostra as curvas temporais geradas a partir das respostas cardiovasculares durante o estresse por restrição, nas diferentes doses do antagonista  $\alpha_2$  (RX821002) microinjetados no CPFL.



**Figura 34-** Inibição das respostas pressoras e taquicárdicas causadas pelo estresse por restrição pela microinjeção bilateral de diferentes doses (0.3, 5, 10 e 15 nmol/100nL) do antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_2$ , RX821002 no CPFL de ratos. Círculos representam à média e as barras o SEM.

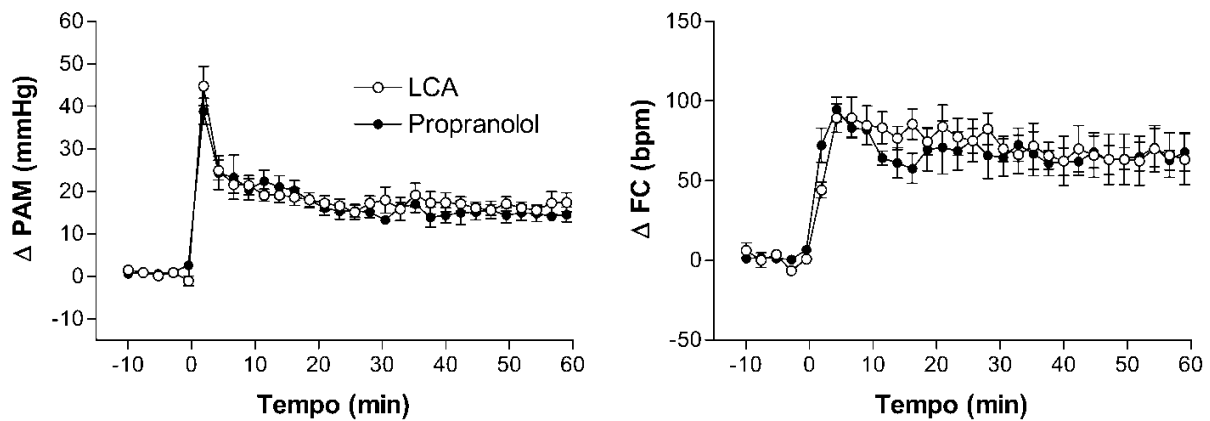


**Figura 35** – Variação da PAM ( $\Delta$ PAM) e FC ( $\Delta$ FC) ao longo do tempo durante a restrição, em um grupo de animais tratados com diferentes doses do antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_2$  RX821002 (0.3, 5, 10 e 15 nmol/100nL), no CPFL. Círculos representam à média e as barras o SEM. A restrição dos animais começou no t=0. Dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (tratamento vs tempo).

### **5.16 - Efeito da microinjeção de propranolol no CPFL na modulação da atividade cardiovascular durante o estresse por restrição.**

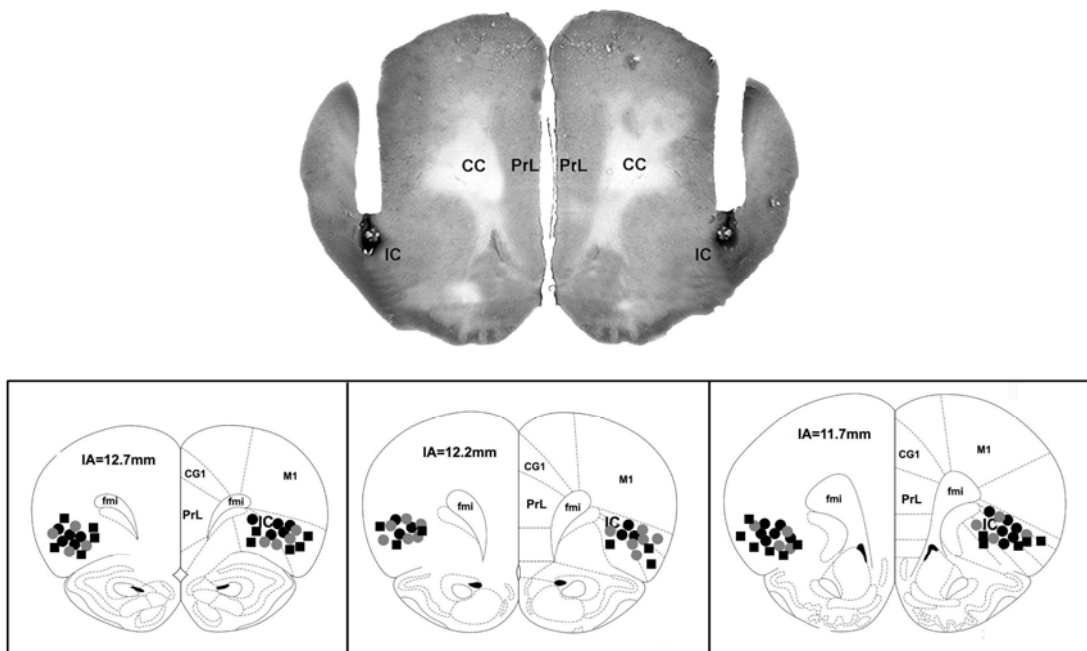
A microinjeção bilateral de propranolol (15 nmol/100nL) (n=6) no CPFL não afetou os valores basais de (PAM=  $99\pm 5$  vs  $95\pm 4$  mmHg,  $t=0.5$ ,  $P>0.05$ ) ou (FC=  $366\pm 11$  vs  $359\pm 13$  bpm,  $t=0.4$ ;  $P>0.05$ ). Além disso, a análise das curvas temporais (Two-way ANOVA) indicou que o pré tratamento com propranolol também não afetou as respostas cardiovasculares causadas pelo ER (PAM:  $F_{(1,270)}=2.6$ ,  $P>0.05$ ; e FC:  $F_{(1,270)}=1$ ,  $P>0.05$ ) (Figura 36). Representação diagramática dos sítios de injeção no CPFL de todos os animais utilizados no estudo da participação da neurotransmissão noradrenérgica no CPFL na modulação da atividade cardiovascular durante o ER e uma fotomicrografia representativa da secção coronal do cérebro de um dos animais utilizado neste conjunto de experimentos são apresentadas na (Figura 37).





**Figura 36** – Variação da PAM ( $\Delta PAM$ ) e FC ( $\Delta FC$ ) ao longo do tempo durante a restrição, em um grupo de animais que receberam o pré-tratamento com o antagonista não seletivo de adrenoreceptores  $\beta$  propranolol (15 nmol/100nL), no CPFL. Círculos representam à média e as barras o SEM. A restrição dos animais começou no t=0. Dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (tratamento vs tempo).

A)



**Figura 37 – A)** - Fotomicrografia de um corte coronal de um rato representativo mostrando os locais de microinjeção no CPFL. **B)** - Representação diagramática baseada no atlas Paxinos e Watson (1997), indicando sítios de injeção para WB4101 (círculos cinzas), RX821002 (círculos pretos), ou propranolol (quadrados pretos) dos animais submetidos ao ER. Cg1 – córtex cingular; PrL – córtex pré-lobulocaudal, M1 – córtex motor primário; LPFC – córtex pré-frontal lateral; cc – corpus callosum, (fmi) - forceps minor do corpus callosum.

## *DISCUSSÃO*

## 6 – DISCUSSÃO

### 6.1 - Mecanismos envolvidos nas respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no CPFL.

O CPFL é uma das principais áreas corticais que recebem inervação noradrenérgica, sendo essas inervações principalmente originárias de células localizadas no *locus coeruleus* (Ungerstedt, 1971; Morrison *et al.*, 1979). As sinapses noradrenérgicas no CPFL de ratos são geometricamente ordenadas lateralmente ao néocortex no que difere consideravelmente de outras aferências corticais (Morrison *et al.*, 1979)

No presente estudo nós relatamos que a microinjeção de NA no CPFL de ratos não anestesiados causou respostas cardiovasculares caracterizadas por aumento da pressão arterial e queda da frequência cardíaca, de forma dose-dependente. Esses efeitos cardiovasculares não foram causados por estímulo mecânico ou osmótico da área, já que nem a inserção da agulha injetora e nem a injeção local de LCA alteraram a pressão arterial dos animais.

Para investigar o subtipo de adrenoceptor presente no CPFL que medeia essas respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no CPFL os animais receberam microinjeções prévias de antagonistas seletivos de adrenoceptores do subtipo  $\alpha_1$ , WB4101 ou o 5-metil-urapidil; do subtipo  $\alpha_2$ , RX821002; ou do subtipo  $\beta$ , propranolol. O pré-tratamento com os antagonistas seletivos de adrenoceptores  $\alpha_1$  WB4101 ou 5-metil-urapidil, aboliu as respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no CPFL. Entretanto, o pré-tratamento com o antagonista de adrenoceptores  $\alpha_2$  RX821002 ou com o

antagonista não seletivo de adrenoceptores  $\beta$ , propranolol, não afetaram as respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no CPFL, o que sugere, uma mediação preferencial via receptores  $\alpha_1$ , nas respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no CPFL.

Doses similares dos antagonistas para adrenoceptores  $\alpha_1$  WB4101 e  $\alpha_2$  RX821002 foram previamente utilizadas para identificar o subtipo de adrenoceptor que estava envolvido na mediação de respostas pressoras causadas pela microinjeção de NA no CPFM (Fernandes *et al.*, 2003) ou na área septal lateral (ASL) (Scopinho *et al.*, 2006). Nessas áreas, as respostas pressoras causadas pela microinjeção de NA foram bloqueadas pelo pré-tratamento com o WB4101, mas não pelo pré-tratamento com RX821002, sugerindo um envolvimento de adrenoceptores locais do subtipo  $\alpha_1$ . Essas doses também foram utilizadas por nós em uma situação em que tanto adrenoceptores do subtipo  $\alpha_1$  quanto do subtipo  $\alpha_2$  mediavam as respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no (NLET) (Crestani *et al.*, 2008).

A efetividade do uso dos antagonistas WB4101 e RX821002 em identificar o subtipo de adrenoceptor envolvido na mediação dos efeitos causados pela microinjeção de NA nessas diversas áreas do SNC é confirmada com os resultados encontrados por (Busnardo *et al.*, 2009), que demonstraram que a microinjeção de NA no núcleo supraóptico do hipotálamo (NSH) causava respostas pressoras e bradicárdicas que eram bloqueadas pelo antagonista seletivo de receptores  $\alpha_2$ , RX821002.

Para confirmar o envolvimento dos adrenoceptores  $\alpha_1$  locais nas respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no CPFL, nós

realizamos a microinjeção de um agonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$ , a fenilefrina. A administração de fenilefrina no CPFL causou respostas similares na PA e FC comparadas àquelas observadas após a microinjeção de noradrenalina, dessa forma, reforçando a idéia que os adrenoceptores  $\alpha_1$  medeiam as respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA no CPFL. É importante notar que a dose de fenilefrina foi maior que a de NA, uma vez que se sabe que a noradrenalina é aproximadamente 10 vezes mais potente do que a fenilefrina em causar respostas cardiovasculares quando microinjetadas no SNC (Correa e Peres-Polon, 1995).

Mudanças na PA, FC e atividade do nervo simpático renal (NSR) foram reportadas após a estimulação química do CPFL (Butcher e Cechetto, 1995). O CPFL foi proposto como um modulador da atividade simpática renal através de sinapses presentes na porção ventrolateral do bulbo, uma vez que os aumentos na atividade do NSR causados pela estimulação do CPFL foram completamente abolidos após o pré-tratamento do bulbo ventrolateral com  $\text{CoCl}_2$  (Cechetto e Chen, 1992; Butcher e Cechetto, 1998). Dessa forma, o possível envolvimento do sistema nervoso simpático na mediação da resposta pressora causada pela microinjeção de NA no CPFL foi investigada.

O pré-tratamento sistêmico com um bloqueador ganglionar têm sido tradicionalmente utilizado para reduzir a atividade do sistema nervoso autônomo. Nesse presente estudo, o tratamento sistêmico com pentolínio diminuiu significativamente os níveis de PA, confirmando sua efetividade em reduzir a atividade simpática. A variação dos valores de PAM ( $\Delta\text{PAM}$ ) causados pela microinjeção de NA foram aumentados após o bloqueio ganglionar. Entretanto, o

aumento nos  $\Delta$ PAM foram similares às mudanças nos valores basais da PAM causados pelo tratamento com pentolínio. Deste modo os aumentos nos  $\Delta$ PAM causados pela microinjeção de NA no CPFL nos animais pré-tratados com pentolínio podem ser atribuídos a uma redução inicial nos valores de PAM causadas pelo pré-tratamento com o bloqueador ganglionar.

Aumentos similares nas respostas pressoras causadas pela microinjeção de NA também foram encontradas em diferentes áreas do SNC, como por exemplo, o NLET, o NSH ou mesmo o CPFM, em ratos tratados com pentolínio, sugerindo, uma mediação humoral dessas respostas. Nessas condições, o efeito pressor causado pela microinjeção central de NA, nessas diversas áreas do SNC, foi causada pela liberação de vasopressina para a circulação (Correa *et al.*, 1985; Fernandes *et al.*, 2003; Crestani *et al.*, 2007; Busnardo *et al.*, 2009)

Diversos trabalhos tem demonstrado que no CNS os adrenoceptores do subtipo  $\alpha_1$  medeiam a liberação de vasopressina pelas catecolaminas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Brooks *et al.*, 1986; Correa e Peres-Polon, 1995; Crestani *et al.*, 2007). Afim de verificar a participação da vasopressina circulante na resposta pressora causada pela microinjeção de NA no CPFL, nós tratamos os animais com um antagonista seletivo de receptores  $V_1$ -vasopressinérgicos dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP. Esse antagonista vasopressinérgico já tinha sido usado préveamente para evidenciar o envolvimento da liberação de vasopressina na mediação das respostas pressoras causadas pela microinjeção de noradrenalina tanto i.c.v quanto em áreas específicas do SNC (Correa *et al.*, 1985; Crestani *et al.*, 2007; Busnardo *et al.*, 2009), assim como também após a microinjeção

intraseptal de acetilcolina (Peres-Polon e Correa, 1994) e a microinjeção de L-glu na banda diagonal de broca (Tavares e Correa, 2006) ou no NSH (Busnardo *et al.*, 2007).

As respostas pressoras à microinjeção de NA no CPFL foram significativamente reduzidas após o tratamento com o dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP, o que sugere que a resposta pressora causada pela microinjeção de NA no CPFL envolve a liberação do hormônio vasopressina na circulação sistêmica. O pré-tratamento intravenoso com pentolínio ou dTyr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP aboliu a resposta bradicárdica causada pela microinjeção de NA no CPFL. Juntos, esses dados nos sugerem uma resposta bradicárdica reflexa vagal, consequência de aumentos na PAM e além disso, estudos já demonstraram que a vasopressina possui um efeito cronotrópico positivo sobre o coração (Chiba, 1977), o que reforça a idéia de uma bradicardia reflexa.

A vasopressina, também conhecida como hormônio antidiurético, é um potente vasoconstritor (Barer, 1961; Altura e Altura, 1984). Dois diferentes tipos de neurônios hipotalâmicos, magnocelular e parvocelular, são responsáveis pela síntese de vasopressina. Os neurônios magnocelulares são, em sua maioria, localizados no NSH e NPH. Cada neurônio dá origem a apenas um simples axônio na glândula pituitária posterior que libera vasopressina. Por ser desprovida de barreira hematoencefálica a vasopressina é liberada próxima aos capilares e facilmente entra na corrente sanguínea (Leng *et al.*, 1999). Não foram encontradas conexões diretas entre o CPFL e os NPH e NSH (Yasui *et al.*, 1991), o que sugere a existência de uma área relê na conexão entre essas áreas. Sendo assim, o CPFL pode estar conectado ao NPH ou ao NOS através de uma projeção indireta.



A microinjeção de NA no NLET causou respostas pressoras e bradicárdicas, que eram mediadas pela liberação de vasopressina para a circulação periférica (Crestani *et al.*, 2007). Conexões diretas entre o CPFL e o NLET já foram descritas (Yasui *et al.*, 1991), assim como conexões entre o NLET e o NPH e o NOS (Dong e Swanson, 2004). Considerando essas informações, há a possibilidade de que o NLET seja esse relê conectivo entre o CPFL e o NSH ou o NPH. Entretanto, mais estudos são necessários para de fato, entender essa conexão.

O papel fisiológico dessa resposta pressora e bradicárdica decorrente da microinjeção de NA no CPFL ainda não é clara. A liberação de vasopressina para a circulação sistêmica é estimulada pelo aumento da osmolaridade plasmática, quedas na PA ou mudanças no volume sanguíneo que são situações de estresse (Goldsmith, 1988). Dessa forma, podemos hipotetizar que a neurotransmissão noradrenérgica no CPFL pode integrar um controle cardíaco e neuroendócrino durante respostas a situações de estresse. Essa idéia é favorecida pelo fato de que estudos já demonstraram que durante situações de estresse o sistema noradrenérgico está ativado (Chen e Herbert, 1995; Dayas *et al.*, 2001). Dessa forma, neurotransmissão noradrenérgica presente no CPFL pode fazer parte de um circuito envolvido na modulação de respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais em situações de estresse.

## **6.2 - Participação do CPFL e o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do CPFL na modulação da atividade do barorreflexo.**

Nesse estudo nos propomos a investigar a participação do CPFL bem como, a neurotransmissão noradrenérgica presente no CPFL na modulação do sistema barorreflexo. Para a investigação da possível participação do CPFL na modulação do sistema barorreflexo foi utilizada a microinjeção de um bloqueador da neurotransmissão local, o cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ).

A microinjeção do  $\text{CoCl}_2$  em diversas áreas do SNC têm sido utilizado para o bloqueio da neurotransmissão presente na área, afim de investigar o possível envolvimento da mesma em diversos tipos de situações fisiológicas (Kretz, 1984; Crestani *et al.*, 2006). O cobalto reduz o influxo de cálcio  $\text{Ca}^{2+}$  pré-sináptico, levando a uma inibição da liberação de todos neurotransmissores e conseqüente bloqueio pré-sináptico (Kretz, 1984). A microinjeção do cobalto não afeta fibras de passagem que por ventura estão passando pela área em estudo, dando, portanto, o real papel da área na modulação de determinadas funções.

Nesse presente estudo nós observamos que a microinjeção unilateral de  $\text{CoCl}_2$  tanto do lado direito como do lado esquerdo do CPFL não afetou as respostas reflexas causadas por aumentos ou quedas na PA. Zang et al. (1998) demonstraram que a lesão eletrolítica do lado esquerdo do CPFL afetava a bradicardia reflexa, enquanto que a lesão do lado direito do CPFL não eram observadas diferenças nas respostas bradicárdicas reflexas, sugerindo dessa forma uma laterilização da modulação da atividade do sistema barorreflexo pelo CPFL. A diferença desses resultados com relação aos nossos pode ser explicada

pelo uso de um bloqueio não seletivo, (causado pela lesão eletrolítica), que resulta tanto na destruição de fibras de passagem quanto no de sinapses. Dessa maneira, a laterilização da modulação da atividade barorreflexa pode ser pelo bloqueio de fibras de passagem e não de sinapses.

A microinjeção bilateral de  $\text{CoCl}_2$  no CPFL afetou significativamente as respostas barorreflexas. As curvas sigmóides geradas 10min após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  no CPFL indicaram uma significativa diminuição no platô mínimo (P1) sem mudanças significativas no platô máximo (P2) das respostas reflexas. O platô mínimo indica o máximo da atividade parassimpática barorreflexa (Head e Mccarty, 1987). O índice de variação de FC, que expressa a diferença entre o platô máximo e o platô mínimo, também estava diminuído 10min após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  no CPFL, enquanto que 60 min. após a microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  no CPFL as respostas barorreflexas retornaram aos valores controles, o que indica uma reversibilidade da inibição sináptica causada pelo  $\text{CoCl}_2$ .

Para analisar separadamente o componente simpático e parassimpático do sistema barorreflexo, as respostas taquicárdicas e bradicárdicas foram analisadas separadamente usando curvas de regressão linear. A análise de regressão linear indicou que o bloqueio bilateral do CPFL pela microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  diminuiu o ganho das respostas bradicárdicas sem afetar significativamente as respostas taquicárdicas. Assim, confirmando os resultados das curvas de regressão não lineares, essas análises nos sugerem a participação do CPFL na modulação do componente parassimpático do barorreflexo.

Os nossos dados corroboram com resultados prévios que demonstraram uma diminuição no reflexo bradicárdico após a microinjeção de

lidocaína no CPFL (Saleh e Connell, 1998). Entretanto, uma vez que a lidocaína bloqueia tanto sinapses quanto fibras de passagem (Sandkuhler *et al.*, 1987), nossos resultados provem informações adicionais confirmando a participação da neurotransmissão presente no CPFL na modulação do sistema barorreflexo.

Entretanto, resultados prévios que utilizaram a lesão eletrolítica do CPFL ou mesmo em um modelo de isquemia cerebral que consiste na oclusão da artéria cerebral que também causa lesões no CPFL e áreas adjacentes, sugerem um papel oposto do CPFL na modulação da atividade do barorreflexo (Saad *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1998). Esses resultados contraditórios podem ser explicados pelo uso de diferentes metodologias, uma vez que o uso de lesões eletrolíticas ou mesmo o modelo de isquemia cerebral que causam lesões extremamente extensas e, além disso, estudos já demonstraram que a lesão eletrolítica ou mesmo a oclusão da artéria cerebral causando isquemia pode induzir a uma plasticidade neural na área afetada (Rangel *et al.*, 2003), podendo de alguma forma interferir no funcionamento fisiológico da área no controle da atividade do sistema barorreflexo.

Adicionalmente, ainda com relação às diferenças entre nossos dados, Zang *et al.* (1998) conduziram seus experimentos nos animais sob efeito de anestesia. Já foi demonstrado que a anestesia afeta a neurotransmissão em áreas que estão envolvidas na modulação da atividade do barorreflexo, como por exemplo, NTS, que é a primeira estação de chegada das aferências dos barorreceptores vindos do sistema nervoso periférico (Fluckiger *et al.*, 1985; Shimokawa *et al.*, 1998; Accorsi-Mendonca *et al.*, 2007). Diante disso, esses

dados nos sugerem que o CPFL possui um papel facilitatório no componente parassimpático do sistema barorreflexo.

Uma vez verificada a participação do CPFL na modulação da atividade parassimpática do sistema barorreflexo, nós investigamos a participação da neurotransmissão noradrenérgica presente no CPFL nessa modulação.

Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram um aumento no ganho da resposta bradicárdica do barorreflexo 10 min após a microinjeção do WB4101, antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$ , no CPFL. O efeito do WB4101 sobre a atividade do barorreflexo foi diferente àquele observado após administração de  $\text{CoCl}_2$  no CPFL. Estes dados sugerem que os adrenoceptores  $\alpha_1$  no CPFL possuem uma influência inibitória sobre a atividade parassimpática do barorreflexo. Para evidenciar a possível inibição dos adrenoceptores  $\alpha_2$  e  $\beta$  pelo WB4101, nós comparamos os efeitos da microinjeção bilateral de WB4101 com os efeitos da administração da dose equimolar do potente antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_2$ , RX821002, ou do antagonista não seletivo de adrenoceptores  $\beta$ , propranolol. O pré-tratamento com RX821002 ou propranolol não afetou a resposta bradicárdica reflexa, reforçando a idéia de que a resposta do WB4101 é devido ao bloqueio efetivo de adrenoceptores  $\alpha_1$ .

Também foi observado que a infusão unilateral de noradrenalina no CPFL, em uma dose que não afetava os valores basais de PA e FC, afetou de maneira oposta aquelas observadas com o pré-tratamento com o WB4101. Além disso, o efeito da infusão de NA no CPFL foi bloqueada pelo pré-tratamento com o WB4101 suportando a idéia de que a neurotransmissão noradrenérgica presente

no CPFL modula a atividade barorreflexa através da ativação de adrenoceptores  $\alpha_1$ .

Já foi demonstrado que o bloqueio de receptores ionotrópicos do tipo NMDA para o glutamato afetava as respostas reflexas de maneira semelhante a aquelas encontradas com a microinjeção de cobalto (Alves *et al.*, 2009b), conseqüentemente opostas àquelas encontradas nos dados com o antagonismo de adrenoceptores  $\alpha_1$  no CPFL. Há evidências na literatura da interação entre os sistemas glutamatérgico e noradrenérgico em diversas áreas do SNC (Pralong e Magistretti, 1995; Forray *et al.*, 1999). Foi demonstrado que a noradrenalina é capaz de liberar glutamato através da ativação de canais de  $K^+$  em “*slices*” de córtex cerebral de ratos (Flint *et al.*, 1985), sugerindo uma interação pré-sináptica entre noradrenalina e glutamato. Entretanto, esses dados não explicariam a possível interação entre as neurotransmissões glutamatérgica e noradrenérgica no CPFL na modulação da atividade do barorreflexo, uma vez que, o bloqueio de adrenoceptores poderia diminuir a liberação de glutamato e afetar a atividade barorreflexa similarmente a observada após o tratamento com um antagonista de receptores glutamatérgicos. Por outro lado, trabalhos já demonstraram que a administração de agonistas adrenérgicos também em “*slices*” de córtex pré-frontal de ratos, reduziu a amplitude das correntes excitatórias pós-sinápticas mediadas por receptores NMDA.

Foi descrito que tanto a administração de um inibidor da fosfolipase C (PLC), um inibidor da inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) ou um quelador de  $Ca^{2+}$ , foram capazes de bloquear a diminuição das correntes excitatórias mediadas por receptores NMDA induzidos por agonistas  $\alpha_1$  (Liu *et al.*, 2006). Esses resultados

podem suportar a idéia de uma interação entre esses sistemas modulando a atividade do barorreflexo pelo CPFL. Entretanto, experimentos ainda são necessários para elucidar essas especulações.

Resultados prévios sugerem que as fibras aferentes do nervo depressor aórtico que inerva o NTS são extremamente ricas em neurônios catecolaminérgicos (Katz e Karten, 1979). Tem sido proposto que a informação periférica gerada pelos barorreceptores localizados tanto no arco aórtico quanto no seio carotídeo é transmitida a estruturas supra-bulbares, inclusive o CPFL, através de fibras catecolaminérgicas (Miura e Reis, 1969; Van Giersbergen *et al.*, 1992). O CPFL envia projeções diretas para o NTS, que é a primeira estação de chegada das aferências dos barorreceptores periféricos no SNC. Sendo assim, os adrenoceptores  $\alpha_1$  no CPFL poderiam modular diretamente a bradicardia reflexa, tanto por inibir a entrada barorreceptora dos neurônios vagais ou por neutralizar o efeito facilitatório dos neurônios cardiovasculares.

Diversos trabalhos indicam que durante situações de estresse (Nosaka e Murata, 1989; Nosaka, 1996; Schadt e Hasser, 1998; Dampney *et al.*, 2008) e exercício físico (Dicarlo e Bishop, 1992; Krieger *et al.*, 1998; Dampney *et al.*, 2008) há uma redefinição no “*set point*” da regulação da PA pelos barorreceptores para valores mais elevados, indicando a ativação de vias neurais inibitórias durante essas situações. Deste modo, mudanças no limiar do barorreflexo relatados no presente estudo indicam que adrenoceptores  $\alpha_1$  no CPFL poderiam ser ativados durante estas situações, e modular a atividade de neurônios em áreas autonômicas do tronco cerebral relacionadas com o barorreflexo, causando uma inibição do componente parassimpático do

barorreflexo. Assim, baseado nas evidências do envolvimento do CPFL na modulação da atividade do barorreflexo, e em resultados que indicaram a ativação de neurônios do CPFL durante situações de estresse, nós avaliamos o envolvimento do CPFL, bem como da neurotransmissão noradrenérgica presente nessa área nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse por restrição

### **6.3 - Participação do CPFL e o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do CPFL na modulação da atividade cardiovascular durante o estresse por restrição.**

O CPFL recebe informações viscerais organizadas e é altamente conectado com diversas estruturas sub-corticais límbicas e outras envolvidas no controle autonômico (Kapp *et al.*, 1985; Yasui *et al.*, 1991). Essa combinação de aferências sensoriais e conectividade límbica/autonômica é necessária para que o CPFL seja um importante centro para a integração de respostas emocionais e autonômicas.

O estresse por restrição é um modelo de estresse caracterizado por promover um estímulo aversivo inescapável que causa respostas cardiovasculares caracterizadas por aumentos na PA e FC (Barron e Van Loon, 1989; Irvine *et al.*, 1997; Mcdougall *et al.*, 2000). Diversas áreas do SNC que estão conectadas diretamente com o CPFL como por exemplo o CPFM, amígdala, NPH, e o NLET já foram descritas na modulação da atividade cardiovascular durante o estresse por



restrição (Salome *et al.*, 2007; Crestani, Alves *et al.*, 2009; Tavares, Correa *et al.*, 2009; Tavares, Pelosi *et al.*, 2009).

Para testar a hipótese do envolvimento do CPFL na modulação da atividade cardiovascular durante o estresse por restrição, nós inibimos de forma não seletiva a neurotransmissão local do CPFL utilizando a administração bilateral de  $\text{CoCl}_2$  no CPFL e submetemos os animais ao estresse por restrição. Como já dito anteriormente a inativação química de áreas pela microinjeção de  $\text{CoCl}_2$  é muito comum em protocolos para o estudo em neurociência.

No presente estudo, nós verificamos que o pré-tratamento com  $\text{CoCl}_2$  diminuiu tanto as respostas pressoras quanto as respostas taquicárdicas durante o estresse por restrição. Essa observação prediz que o CPFL participa tanto do controle da atividade da PA quanto da FC durante o estresse por restrição.

Uma vez demonstrada a participação do CPFL na modulação da atividade cardiovascular durante o estresse por restrição, nós investigamos a participação da neurotransmissão noradrenérgica, presente no CPFL durante essa modulação. A microinjeção bilateral do antagonista seletivo de adrenocetores  $\alpha_1$  WB4101 diminuiu significativamente de forma dose-dependente as respostas pressoras e taquicárdicas causadas pelo estresse por restrição. Entretanto o pré-tratamento bilateral do CPFL com o antagonista seletivo de adrenocetores  $\alpha_2$  RX821002 afetou apenas as respostas pressoras, também de forma dose-dependente causadas pelo estresse por restrição, sem mudanças significativas nas respostas taquicárdicas. Além disso, o pré-tratamento com o antagonista não seletivo de receptores  $\beta$  propranolol, não afetou as respostas cardiovasculares decorrentes do estresse por restrição.

Esses dados acima sugerem que os dois subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  participam da modulação das respostas cardiovasculares durante o estresse por restrição, mas que possivelmente haja uma diferenciação de vias de modulação para os componentes cardíaco e vascular modulados pela neurotransmissão noradrenérgica pelos subtipos de adrenoceptores. Essa diferenciação de vias de modulação cardíaca e vascular já foi descrita em diferentes áreas do SNC, como por exemplo, o NLET onde o pré-tratamento com  $\text{CoCl}_2$  ou o antagonista de adrenoceptores WB4101 aumentou as respostas taquicárdicas, sem mudanças significativas nas respostas pressoras decorrentes do estresse por restrição (Crestani, Alves *et al.*, 2009).

Já foi descrito que os adrenoceptores do subtipo  $\alpha_2$  pré-sinápticos possuem um papel inibitório no SNC (Invernizzi e Garattini, 2004; Pertovaara, 2006). Diante de tal assertiva, podemos sugerir que a noradrenalina liberada no CPFL durante situações de estresse pode atuar em ambos receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  onde, os receptores  $\alpha_1$  possuem um papel excitatório na modulação da atividade cardíaca e vascular durante o estresse por restrição e que os receptores do subtipo  $\alpha_2$ , que possuem um papel inibitório no SNC, poderiam modular a liberação de algum outro neurotransmissor que seria o responsável apenas pela modulação da atividade vascular durante o estresse por restrição.

O controle autonômico cardíaco é um balanço entre a atividade simpática e a atividade parassimpática (Berntson *et al.*, 1991). Estudos demonstraram que as respostas cárdicas (taquicárdicas) e vasculares (pressoras), durante situações de estresse são mediadas pelo sistema nervoso simpático, pois ambas são abolidas após o pré-tratamento com um bloqueador ganglionar ou pelo

bloqueio tanto de  $\beta$  quanto de  $\alpha$  adrenoceptores, respectivamente (Carrive, 2002; 2006). Além disso, estudos também mostraram que o tratamento com um antagonista parassimpático aumentou as respostas taquicárdicas causadas pelo estresse psicológico (Iwata e Ledoux, 1988; Baudrie *et al.*, 1997; Tavares e Correa, 2006; Crestani, Alves *et al.*, 2009), o que sugere que há uma simultânea ativação da atividade simpática e parassimpática durante situações de estresse.

Já foi demonstrada que a atividade simpática está aumentada durante situações de estresse em que haja necessidade de comportamentos de luta ou fuga (Carrive, 2006). Mudanças na PA e FC e na atividade do nervo simpático renal já foram descritas após a estimulação do CPFL (Butcher e Cechetto, 1995). Tem sido proposto que o CPFL modula a atividade do sistema nervoso simpático através de sinapses presentes no bulbo ventrolateral, uma vez que, após a microinjeção do bloqueador de sinapses  $\text{CoCl}_2$  nessa porção do bulbo aboliu completamente o aumento da atividade simpática renal, observada após a estimulação do CPFL (Cechetto e Chen, 1992; Butcher e Cechetto, 1995; 1998). Esses resultados suportam a hipótese de que o CPFL participa de um substrato neural que modula o componente simpático das respostas cardiovasculares durante situações de estresse.

Estudos anteriores já haviam demonstrado que o bloqueio sináptico de outras regiões do córtex pré-frontal como, por exemplo, o córtex infralímbico (IL) diminuiu a resposta taquicárdica durante o estresse por restrição, enquanto que o bloqueio de sinapses no córtex pré-límbico aumentou a resposta taquicárdica durante o estresse por restrição (Tavares, Correa *et al.*, 2009). O efeito do bloqueio do córtex IL com  $\text{CoCl}_2$  foi similar ao que foi observado quando

o CPFL foi bloqueado também com  $\text{CoCl}_2$ , sugerindo uma influencia facilitatória do CPFL nas respostas cardiovasculares durante o estresse por restrição. Conexões recíprocas já foram descritas entre o CPFL e o córtex IL (Saper, 1982; Allen *et al.*, 1991), sugerindo que essas áreas podem atuar conjuntamente para a modulação de respostas cardiovasculares durante situações de estresse.

O “*set point*” de regulação da PA pelos barorreceptores está aumentado durante situações de estresse (Hatton *et al.*, 1997; Schadt e Hasser, 1998; Crestani *et al.*, 2010). Essas mudanças na função do sistema barorreflexo facilitam as respostas cardiovasculares frente a estímulos estressantes (Nosaka, 1996; Dampney *et al.*, 2008).

Nessa mesma tese nós reportamos que o antagonismo de receptores do subtipo  $\alpha_1$  no CPFL aumenta as respostas bradicárdicas reflexas causadas pela infusão de fenilefrina, sugerindo um papel inibitório da neurotransmissão noradrenérgica do CPFL na modulação da atividade barorreflexa, deste modo, a modulação do sistema barorreflexo pelos adrenoreceptores  $\alpha_1$  pode mediar, ao menos em parte, as respostas cardiovasculares durante o estresse por restrição.

De uma forma geral, nossos dados descritos acima sugerem que a neurotransmissão noradrenérgica presente no CPFL participa da modulação da atividade cardiovascular durante o estresse por restrição possivelmente, de forma separada com relação aos subtipos de receptores  $\alpha$ , possuindo um papel cardiovascular facilitatório quando atuando em receptores  $\alpha_1$  e apenas facilitatório no componente vascular quando atuando em receptores  $\alpha_2$ .

## *CONCLUSÕES*

## 7 – CONCLUSÕES

O trabalho apresentado nos permite concluir que:

- A microinjeção de NA no CPFL causa respostas pressoras e bradicárdicas de forma dose-dependente e que essas repostas envolvem a ativação de adrenoceptores do subtipo  $\alpha_1$  presentes no CPFL que causam a liberação de vasopressina para a circulação periférica.

- A neurotransmissão noradrenérgica do CPFL modula de maneira inibitória a resposta bradicárdica do barorreflexo. Esta modulação é mediada pela ativação de adrenoceptores  $\alpha_1$  no CPFL.

- Por fim nossos dados sugerem que a neurotransmissão noradrenérgica no CPFL possui um papel excitatório na modulação da atividade cardiovascular durante situações de estresse, especificamente o estresse por restrição.

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCORSI-MENDONCA, D.; LEAO, R. M.; AGUIAR, J. F.; VARANDA, W. A.; MACHADO, B. H. Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract of rat brain stem slices. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v. 292, n. 1, p. R396-402, Jan 2007.

ALLEN, G. V.; SAPER, C. B.; HURLEY, K. M.; CECHETTO, D. F. Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. J Comp Neurol, v. 311, n. 1, p. 1-16, Sep 1 1991.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Actions of vasopressin, oxytocin, and synthetic analogs on vascular smooth muscle. Fed Proc, v. 43, n. 1, p. 80-6, Jan 1984.

ALVES, F. H.; CRESTANI, C. C.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Bed nucleus of the stria terminalis N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide modulate the baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. J Neurosci Res, v. 87, n. 7, p. 1703-11, May 15 2009a.

ALVES, F. H.; CRESTANI, C. C.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Cardiovascular effects of carbachol microinjected into the bed nucleus of the stria terminalis of the rat brain. Brain Res, v. 1143, p. 161-8, Apr 27 2007.

ALVES, F. H.; CRESTANI, C. C.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex modulate baroreflex in unanesthetized rats. Auton Neurosci, v. 147, n. 1-2, p. 56-63, May 11 2009b.

ANAND, B. K.; DUA, S. Circulatory and respiratory changes induced by electrical stimulation of limbic system (visceral brain). J Neurophysiol, v. 19, n. 5, p. 393-400, Sep 1956.

BARBAS, H. Anatomic organization of basoventral and mediodorsal visual recipient prefrontal regions in the rhesus monkey. J Comp Neurol, v. 276, n. 3, p. 313-42, Oct 15 1988.

BARER, G. R. A comparison of the circulatory effects of angiotensin, vasopressin and adrenaline in the anaesthetized cat. J Physiol, v. 156, p. 49-66, Apr 1961.

BARRON, B. A.; VAN LOON, G. R. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. J Auton Nerv Syst, v. 28, n. 2, p. 179-87, Nov 1989.

BAUDRIE, V.; TULEN, J. H.; BLANC, J.; ELGHOZI, J. L. Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. J Auton Pharmacol, v. 17, n. 5, p. 303-9, Oct 1997.



BECKSTEAD, R. M. Convergent thalamic and mesencephalic projections to the anterior medial cortex in the rat. J Comp Neurol, v. 166, n. 4, p. 403-16, Apr 15 1976.

BERNTSON, G. G.; CACIOPPO, J. T.; QUIGLEY, K. S. Autonomic determinism: the modes of autonomic control, the doctrine of autonomic space, and the laws of autonomic constraint. Psychol Rev, v. 98, n. 4, p. 459-87, Oct 1991.

BRODY, M. J.; NATELSON, B. H.; ANDERSON, E. A.; FOLKOW, B.; LEVY, M. N.; OBRIST, P. A.; REIS, D. J.; ROSENMAN, R. H.; WILLIAMS, R. B., JR. Behavioral mechanisms in hypertension. Circulation, v. 76, n. 1 Pt 2, p. I95-100, Jul 1987.

BROOKS, D. P.; SHARE, L.; CROFTON, J. T. Central adrenergic control of vasopressin release. Neuroendocrinology, v. 42, n. 5, p. 416-20, 1986.

BURKE, S. L.; MALPAS, S. C.; HEAD, G. A. Effect of rilmenidine on the cardiovascular responses to stress in the conscious rabbit. J Auton Nerv Syst, v. 72, n. 2-3, p. 177-86, Oct 15 1998.

BUSNARDO, C.; TAVARES, R. F.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CORREA, F. M. Cardiovascular effects of L-glutamate microinjection in the supraoptic nucleus of unanaesthetized rats. Neuropharmacology, v. 52, n. 6, p. 1378-84, May 2007.

BUSNARDO, C.; TAVARES, R. F.; CORREA, F. M. Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline microinjection into the supraoptic nucleus of unanesthetized rats. Auton Neurosci, v. 145, n. 1-2, p. 63-70, Jan 28 2009.

BUTCHER, K. S.; CECHETTO, D. F. Autonomic responses of the insular cortex in hypertensive and normotensive rats. Am J Physiol, v. 268, n. 1 Pt 2, p. R214-22, Jan 1995.

BUTCHER, K. S.; CECHETTO, D. F. Receptors in lateral hypothalamic area involved in insular cortex sympathetic responses. Am J Physiol, v. 275, n. 2 Pt 2, p. H689-96, Aug 1998.

CARBONI, E.; BARROS, V. G.; IBBA, M.; SILVAGNI, A.; MURA, C.; ANTONELLI, M. C. Prenatal restraint stress: an in vivo microdialysis study on catecholamine release in the rat prefrontal cortex. Neuroscience, v. 168, n. 1, p. 156-66, Jun 16.

CARRIVE, P. Cardiovascular and behavioural components of conditioned fear to context after ganglionic and alpha-adrenergic blockade. Auton Neurosci, v. 98, n. 1-2, p. 90-3, Jun 28 2002.

CARRIVE, P. Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. Clin Exp Pharmacol Physiol, v. 33, n. 12, p. 1251-4, Dec 2006.

CECHETTO, D. F.; CHEN, S. J. Hypothalamic and cortical sympathetic responses relay in the medulla of the rat. Am J Physiol, v. 263, n. 3 Pt 2, p. R544-52, Sep 1992.

CECHETTO, D. F.; CHEN, S. J. Subcortical sites mediating sympathetic responses from insular cortex in rats. Am J Physiol, v. 258, n. 1 Pt 2, p. R245-55, Jan 1990.

CHEN, X.; HERBERT, J. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. Neuroscience, v. 64, n. 3, p. 675-85, Feb 1995.

CHIBA, S. Positive chronotropic and negative inotropic actions of vasopressin in isolated blood-perfused canine atrium. Jpn Heart J, v. 18, n. 2, p. 221-4, Mar 1977.

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

CORREA, F. M.; PERES-POLON, V. L. Central alpha 1-adrenoceptors mediate the pressor response to intracerebroventricular injection of noradrenaline in unanesthetized rats. Neuropharmacology, v. 34, n. 7, p. 793-8, Jul 1995.

COWLEY, A. W., JR.; LIARD, J. F. Vasopressin and arterial pressure regulation. Special lecture. Hypertension, v. 11, n. 2 Pt 2, p. I25-32, Feb 1988.

COWLEY, A. W., JR.; QUILLEN, E. Q., JR.; SKELTON, M. M. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. Fed Proc, v. 42, n. 15, p. 3170-6, Dec 1983.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. The bed nucleus of the stria terminalis modulates baroreflex in rats. Neuroreport, v. 17, n. 14, p. 1531-5, Oct 2006.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Both alpha1 and alpha2-adrenoceptors mediate the cardiovascular responses to noradrenaline microinjected into the bed nucleus of the stria terminalis of rats. Br J Pharmacol, v. 153, n. 3, p. 583-90, Feb 2008.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjection in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat brain. J Neurosci Res, v. 85, n. 7, p. 1592-9, May 15 2007.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H.; TAVARES, R. F.; CORREA, F. M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. Stress, v. 12, n. 3, p. 268-78, 2009.

CRESTANI, C. C.; DEOLINDO, M. V.; ALVES, F. H.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Non-N-methyl-d-aspartate glutamate receptors in the lateral hypothalamus modulate cardiac baroreflex responses in conscious rats. Clin Exp Pharmacol Physiol, v. 36, n. 11, p. 1079-85, Nov 2009.

CRESTANI, C. C.; TAVARES, R. F.; ALVES, F. H.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. Stress, v. 13, n. 1, p. 61-72, 2010.

CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P.; BATTAGLIA, D. F.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. Neuroscience, v. 64, n. 2, p. 477-505, Jan 1995.

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

DAMPNEY, R. A.; HORIUCHI, J.; MCDOWALL, L. M. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. Auton Neurosci, v. 142, n. 1-2, p. 3-10, Nov 3 2008.

DAMPNEY, R. A.; MOON, E. A. Role of ventrolateral medulla in vasomotor response to cerebral ischemia. Am J Physiol, v. 239, n. 3, p. H349-58, Sep 1980.

DAYAS, C. V.; BULLER, K. M.; DAY, T. A. Medullary neurones regulate hypothalamic corticotropin-releasing factor cell responses to an emotional stressor. Neuroscience, v. 105, n. 3, p. 707-19, 2001.

DE BOER, S. F.; KOOPMANS, S. J.; SLANGEN, J. L.; VAN DER GUGTEN, J. Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. Physiol Behav, v. 47, n. 6, p. 1117-24, Jun 1990.

DELGADO, J. M. Circulatory effects of cortical stimulation. Physiol Rev Suppl, v. 4, p. 146-78, Apr 1960.

DICARLO, S. E.; BISHOP, V. S. Onset of exercise shifts operating point of arterial baroreflex to higher pressures. Am J Physiol, v. 262, n. 1 Pt 2, p. H303-7, Jan 1992.

DIVAC, I. Frontal lobe system and spatial reversal in the rat. Neuropsychologia, v. 9, n. 2, p. 175-83, Jun 1971.

DIVAC, I.; MOGENSEN, J.; BJORKLUND, A. The prefrontal 'cortex' in the pigeon. Biochemical evidence. Brain Res, v. 332, n. 2, p. 365-8, Apr 22 1985.

DONG, H. W.; SWANSON, L. W. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. J Comp Neurol, v. 471, n. 4, p. 396-433, Apr 12 2004.

DONOGHUE, S.; GARCIA, M.; JORDAN, D.; SPYER, K. M. Identification and brain-stem projections of aortic baroreceptor afferent neurones in nodose ganglia of cats and rabbits. J Physiol, v. 322, p. 337-52, Jan 1982.

FELDBERG, W.; GUERTZENSTEIN, P. G. A vasodepressor effect of pentobarbitone sodium. J Physiol, v. 224, n. 1, p. 83-103, Jul 1972.

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

FLINT, R. S.; MURPHY, J. M.; CALKINS, P. M.; MCBRIDE, W. J. Monoamine, amino acid and cholinergic interactions in slices of rat cerebral cortex. Brain Res Bull, v. 15, n. 2, p. 197-202, Aug 1985.

FLUCKIGER, J. P.; SONNAY, M.; BOILLAT, N.; ATKINSON, J. Attenuation of the baroreceptor reflex by general anesthetic agents in the normotensive rat. Eur J Pharmacol, v. 109, n. 1, p. 105-9, Feb 12 1985.

FOLKOW, B. Psychosocial and central nervous influences in primary hypertension. Circulation, v. 76, n. 1 Pt 2, p. I10-9, Jul 1987.

FORRAY, M. I.; BUSTOS, G.; GYSLING, K. Noradrenaline inhibits glutamate release in the rat bed nucleus of the stria terminalis: in vivo microdialysis studies. J Neurosci Res, v. 55, n. 3, p. 311-20, Feb 1 1999.

FUNK, D.; STEWART, J. Role of catecholamines in the frontal cortex in the modulation of basal and stress-induced autonomic output in rats. Brain Res, v. 741, n. 1-2, p. 220-9, Nov 25 1996.

GOLDMAN-RAKIC, P. S.; PORRINO, L. J. The primate mediodorsal (MD) nucleus and its projection to the frontal lobe. J Comp Neurol, v. 242, n. 4, p. 535-60, Dec 22 1985.

GOLDSMITH, S. R. Baroreceptor-mediated suppression of osmotically stimulated vasopressin in normal humans. J Appl Physiol, v. 65, n. 3, p. 1226-30, Sep 1988.

GORELOVA, N.; YANG, C. R. The course of neural projection from the prefrontal cortex to the nucleus accumbens in the rat. Neuroscience, v. 76, n. 3, p. 689-706, Feb 1997.

GRANATA, A. R.; RUGGIERO, D. A.; PARK, D. H.; JOH, T. H.; REIS, D. J. Lesions of epinephrine neurons in the rostral ventrolateral medulla abolish the vasodepressor components of baroreflex and cardiopulmonary reflex. Hypertension, v. 5, n. 6 Pt 3, p. V80-4, Nov-Dec 1983.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. Nat Rev Neurosci, v. 7, n. 5, p. 335-46, May 2006.

HARDY, S. G.; HOLMES, D. E. Prefrontal stimulus-produced hypotension in rat. Exp Brain Res, v. 73, n. 2, p. 249-55, 1988.

HARDY, S. G.; MACK, S. M. Brainstem mediation of prefrontal stimulus-produced hypotension. Exp Brain Res, v. 79, n. 2, p. 393-9, 1990.

HATTON, D. C.; BROOKS, V.; QI, Y.; MCCARRON, D. A. Cardiovascular response to stress: baroreflex resetting and hemodynamics. Am J Physiol, v. 272, n. 5 Pt 2, p. R1588-94, May 1997.

HEAD, G. A.; MCCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. J Auton Nerv Syst, v. 21, n. 2-3, p. 203-13, Dec 1987.

HOFF, E. C.; KELL, J. F., JR.; CARROLL, M. N., JR. Effects of cortical stimulation and lesions on cardiovascular function. Physiol Rev, v. 43, p. 68-114, Jan 1963.

INVERNIZZI, R. W.; GARATTINI, S. Role of presynaptic alpha2-adrenoceptors in antidepressant action: recent findings from microdialysis studies. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v. 28, n. 5, p. 819-27, Aug 2004.

IRVINE, R. J.; WHITE, J.; CHAN, R. The influence of restraint on blood pressure in the rat. J Pharmacol Toxicol Methods, v. 38, n. 3, p. 157-62, Nov 1997.

IWATA, J.; LEDOUX, J. E. Dissociation of associative and nonassociative concomitants of classical fear conditioning in the freely behaving rat. Behav Neurosci, v. 102, n. 1, p. 66-76, Feb 1988.

KAEHLER, S. T.; SINNER, C.; KOUVELAS, D.; PHILIPPU, A. Effects of inescapable shock and conditioned fear on the release of excitatory and inhibitory amino acids in the locus coeruleus. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v. 361, n. 2, p. 193-9, Feb 2000.

KAEHLER, S. T.; SINNER, C.; PHILIPPU, A. Release of catecholamines in the locus coeruleus of freely moving and anaesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats: effects of cardiovascular changes and tail pinch. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v. 361, n. 4, p. 433-9, Apr 2000.

KAPP, B. S.; SCHWABER, J. S.; DRISCOLL, P. A. The organization of insular cortex projections to the amygdaloid central nucleus and autonomic regulatory nuclei of the dorsal medulla. Brain Res, v. 360, n. 1-2, p. 355-60, Dec 23 1985.

KATZ, D. M.; KARTEN, H. J. The discrete anatomical localization of vagal aortic afferents within a catecholamine-containing cell group in the nucleus solitarius. Brain Res, v. 171, n. 2, p. 187-95, Aug 3 1979.

KIM, B. N.; KIM, J. W.; KANG, H.; CHO, S. C.; SHIN, M. S.; YOO, H. J.; HONG, S. B.; LEE, D. S. Regional differences in cerebral perfusion associated with the alpha-2A-adrenergic receptor genotypes in attention deficit hyperactivity disorder. J Psychiatry Neurosci, v. 35, n. 5, p. 330-6, Sep.

KORNER, P. I.; SHAW, J.; WEST, M. J.; OLIVER, J. R. Central nervous system control of baroreceptor reflexes in the rabbit. Circ Res, v. 31, n. 5, p. 637-52, Nov 1972.

KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. J Comp Neurol, v. 171, n. 2, p. 157-91, Jan 15 1977.

KRETZ, R. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. J Neurosci Methods, v. 11, n. 2, p. 129-35, Jun 1984.

KRIEGER, E. M.; BRUM, P. C.; NEGRAO, C. E. Role of arterial baroreceptor function on cardiovascular adjustments to acute and chronic dynamic exercise. Biol Res, v. 31, n. 3, p. 273-9, 1998.

KUBO, T.; KANAYA, T.; NUMAKURA, H.; OKAJIMA, H.; HAGIWARA, Y.; FUKUMORI, R. The lateral septal area is involved in mediation of immobilization stress-induced blood pressure increase in rats. Neurosci Lett, v. 318, n. 1, p. 25-8, Jan 18 2002.

LA ROVERE, M. T.; PINNA, G. D.; RACZAK, G. Baroreflex sensitivity: measurement and clinical implications. Ann Noninvasive Electrocardiol, v. 13, n. 2, p. 191-207, Apr 2008.

LACROIX, L.; SPINELLI, S.; HEIDBREDE, C. A.; FELDON, J. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. Behav Neurosci, v. 114, n. 6, p. 1119-30, Dec 2000.

LAM, W.; LOUIS, W. J.; VERBERNE, A. J. Effect of dorsal periaqueductal grey lesion on baroreflex and cardiovascular response to air-jet stress. J Auton Nerv Syst, v. 53, n. 1, p. 35-42, May 17 1995.

LANFRANCHI, P. A.; SOMERS, V. K. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v. 283, n. 4, p. R815-26, Oct 2002.

LENG, G.; BROWN, C. H.; RUSSELL, J. A. Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. Prog Neurobiol, v. 57, n. 6, p. 625-55, Apr 1999.

LEONARD, C. M. The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. Brain Res, v. 12, n. 2, p. 321-43, Feb 1969.

LIU, W.; YUEN, E. Y.; ALLEN, P. B.; FENG, J.; GREENGARD, P.; YAN, Z. Adrenergic modulation of NMDA receptors in prefrontal cortex is differentially regulated by RGS proteins and spinophilin. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 103, n. 48, p. 18338-43, Nov 28 2006.

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

MCDOUGALL, S. J.; PAULL, J. R.; WIDDOP, R. E.; LAWRENCE, A. J. Restraint stress : differential cardiovascular responses in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. Hypertension, v. 35, n. 1 Pt 1, p. 126-9, Jan 2000.

MCGREGOR, I. S.; MENENDEZ, J. A.; ATRENS, D. M.; LIN, H. Q. Prefrontal cortex alpha 2 adrenoceptors and energy balance. Brain Res Bull, v. 26, n. 5, p. 683-91, May 1991.

MICHELINI, L. C. Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic pre-autonomic neurons on circulatory control: reflex mechanisms and changes during exercise. Clin Exp Pharmacol Physiol, v. 34, n. 4, p. 369-76, Apr 2007.

MIURA, M.; REIS, D. J. Termination and secondary projections of carotid sinus nerve in the cat brain stem. Am J Physiol, v. 217, n. 1, p. 142-53, Jul 1969.

MORRISON, J. H.; MOLLIVER, M. E.; GRZANNA, R. Noradrenergic innervation of cerebral cortex: widespread effects of local cortical lesions. Science, v. 205, n. 4403, p. 313-6, Jul 20 1979.

NEAFSEY, E. J. Prefrontal cortical control of the autonomic nervous system: anatomical and physiological observations. Prog Brain Res, v. 85, p. 147-65; discussion 165-6, 1990.

NOSAKA, S. Modifications of arterial baroreflexes: obligatory roles in cardiovascular regulation in stress and poststress recovery. Jpn J Physiol, v. 46, n. 4, p. 271-88, Aug 1996.

NOSAKA, S.; MURATA, K. Somatosensory inhibition of vagal baroreflex bradycardia: afferent nervous mechanisms. Am J Physiol, v. 257, n. 4 Pt 2, p. R829-38, Oct 1989.

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, Apr 1991.

PAJOLLA, G. P.; PELOSI, G. G.; CORREA, F. M. Involvement of NMDA receptors in the hypotensive response to the injection of L-glutamate into the lateral hypothalamus of unanesthetized rats. Brain Res, v. 1053, n. 1-2, p. 19-26, Aug 16 2005.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2 ed. Sydney Academic Press, v., 1997.

PERES-POLON, V. L.; CORREA, F. M. Pressor effects of acetylcholine injected into the lateral septal area of conscious rats. Neuropharmacology, v. 33, n. 12, p. 1537-44, Dec 1994.

PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. Prog Neurobiol, v. 80, n. 2, p. 53-83, Oct 2006.

PRALONG, E.; MAGISTRETTI, P. J. Noradrenaline increases K-conductance and reduces glutamatergic transmission in the mouse entorhinal cortex by activation of alpha 2-adrenoreceptors. Eur J Neurosci, v. 7, n. 12, p. 2370-8, Dec 1 1995.

RANGEL, A.; GONZALEZ, L. E.; VILLARROEL, V.; HERNANDEZ, L. Anxiolysis followed by angiogenesis relates to coping and corticosterone after medial prefrontal cortical damage in rats. Brain Res, v. 992, n. 1, p. 96-103, Nov 28 2003.

RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Involvement of the medial prefrontal cortex in central cardiovascular modulation in the rat. Auton Neurosci, v. 126-127, p. 130-8, Jun 30 2006.

RUGGIERO, D. A.; MRAOVITCH, S.; GRANATA, A. R.; ANWAR, M.; REIS, D. J. A role of insular cortex in cardiovascular function. J Comp Neurol, v. 257, n. 2, p. 189-207, Mar 8 1987.

SAAD, M. A.; HUERTA, F.; TRANCARD, J.; ELGHOZI, J. L. Effects of middle cerebral artery occlusion on baroreceptor reflex control of heart rate in the rat. J Auton Nerv Syst, v. 27, n. 2, p. 165-72, Jul 1989.

SALEH, T. M.; CONNELL, B. J. Role of the insular cortex in the modulation of baroreflex sensitivity. Am J Physiol, v. 274, n. 5 Pt 2, p. R1417-24, May 1998.

SALOME, N.; NGAMPAMUAN, S.; NALIVAICO, E. Intra-amygdala injection of GABAA agonist, muscimol, reduces tachycardia and modifies cardiac sympatho-vagal balance during restraint stress in rats. Neuroscience, v. 148, n. 2, p. 335-41, Aug 24 2007.

SANDKUHLER, J.; MAISCH, B.; ZIMMERMANN, M. The use of local anaesthetic microinjections to identify central pathways: a quantitative evaluation of the time course and extent of the neuronal block. Exp Brain Res, v. 68, n. 1, p. 168-78, 1987.

SAPER, C. B. Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. J Comp Neurol, v. 210, n. 2, p. 163-73, Sep 10 1982.

SAPRU, H. N. Glutamate circuits in selected medullo-spinal areas regulating cardiovascular function. Clin Exp Pharmacol Physiol, v. 29, n. 5-6, p. 491-6, May-Jun 2002.

SARA, S. J.; SEGAL, M. Plasticity of sensory responses of locus coeruleus neurons in the behaving rat: implications for cognition. Prog Brain Res, v. 88, p. 571-85, 1991.

SCHADT, J. C.; HASSER, E. M. Hemodynamic effects of acute stressors in the conscious rabbit. Am J Physiol, v. 274, n. 3 Pt 2, p. R814-21, Mar 1998.

SCOPINHO, A. A.; RESSTEL, L. B.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CORREA, F. M. Pressor effects of noradrenaline injected into the lateral septal area of unanesthetized rats. Brain Res, v. 1122, n. 1, p. 126-34, Nov 29 2006.



SHIMOKAWA, A.; KUNITAKE, T.; TAKASAKI, M.; KANNAN, H. Differential effects of anesthetics on sympathetic nerve activity and arterial baroreceptor reflex in chronically instrumented rats. J Auton Nerv Syst, v. 72, n. 1, p. 46-54, Aug 6 1998.

SIUTA, M. A.; ROBERTSON, S. D.; KOCALIS, H.; SAUNDERS, C.; GRESCH, P. J.; KHATRI, V.; SHIOTA, C.; KENNEDY, J. P.; LINDSLEY, C. W.; DAWS, L. C.; POLLEY, D. B.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J.; STANWOOD, G. D.; MAGNUSON, M. A.; NISWENDER, K. D.; GALLI, A. Dysregulation of the norepinephrine transporter sustains cortical hypodopaminergia and schizophrenia-like behaviors in neuronal retractor null mice. PLoS Biol, v. 8, n. 6, p. e1000393.

SPYER, K. M. Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. J Physiol, v. 474, n. 1, p. 1-19, Jan 1 1994.

SPYER, K. M. Central nervous integration of cardiovascular control. J Exp Biol, v. 100, p. 109-28, Oct 1982.

STEHBERG, J.; SIMON, F. Involvement of the insular cortex in retention of conditioned taste aversion is not time dependent. Neurobiol Learn Mem, v., Oct 15.

SU, D. F.; CERUTTI, C.; BARRES, C.; JULIEN, C.; VINCENT, M.; PAULTRE, C.; SASSARD, J. Arterial baroreflex control of heart period is not related to blood pressure variability in conscious hypertensive and normotensive rats. Clin Exp Pharmacol Physiol, v. 19, n. 11, p. 767-76, Nov 1992.

SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E. Interaction of vasopressin and angiotensin II in central control of blood pressure and thirst. Regul Pept, v. 66, n. 1-2, p. 65-71, Oct 8 1996.

TAVARES, R. F.; CORREA, F. M. Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. Neuroscience, v. 143, n. 1, p. 231-40, Nov 17 2006.

TAVARES, R. F.; CORREA, F. M.; RESSTEL, L. B. Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. J Neurosci Res, v. 87, n. 11, p. 2601-7, Aug 15 2009.

TAVARES, R. F.; PELOSI, G. G.; CORREA, F. M. The paraventricular nucleus of the hypothalamus is involved in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. Stress, v. 12, n. 2, p. 178-85, 2009.

TAYLOR, E. W.; JORDAN, D.; COOTE, J. H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. Physiol Rev, v. 79, n. 3, p. 855-916, Jul 1999.

THIERRY, A. M.; BLANC, G.; SOBEL, A.; STINUS, L.; GOLWINSKI, J. Dopaminergic terminals in the rat cortex. Science, v. 182, n. 4111, p. 499-501, Nov 2 1973.

TULLY, K.; BOLSHAKOV, V. Y. Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. Mol Brain, v. 3, p. 15.

UNGERSTEDT, U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. Acta Physiol Scand Suppl, v. 367, p. 1-48, 1971.

VAN GIERSBERGEN, P. L.; PALKOVITS, M.; DE JONG, W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. Physiol Rev, v. 72, n. 3, p. 789-824, Jul 1992.

VERBERNE, A. J.; OWENS, N. C. Cortical modulation of the cardiovascular system. Prog Neurobiol, v. 54, n. 2, p. 149-68, Feb 1998.

WANG, A. C.; HARA, Y.; JANSSEN, W. G.; RAPP, P. R.; MORRISON, J. H. Synaptic estrogen receptor-alpha levels in prefrontal cortex in female rhesus monkeys and their correlation with cognitive performance. J Neurosci, v. 30, n. 38, p. 12770-6, Sep 22.

YASUI, Y.; BREDER, C. D.; SAPER, C. B.; CECHETTO, D. F. Autonomic responses and efferent pathways from the insular cortex in the rat. J Comp Neurol, v. 303, n. 3, p. 355-74, Jan 15 1991.

YOUNG, W. S., 3RD; KUHAR, M. J. Noradrenergic alpha 1 and alpha 2 receptors: light microscopic autoradiographic localization. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 77, n. 3, p. 1696-700, Mar 1980.

ZANDBERG, P.; DE JONG, W.; 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, p. 43-56, Apr 1 1979.

ZHANG, Z. H.; RASHBA, S.; OPPENHEIMER, S. M. Insular cortex lesions alter baroreceptor sensitivity in the urethane-anesthetized rat. Brain Res, v. 813, n. 1, p. 73-81, Nov 30 1998.

# *APÊNDICE*

**Tabela 1** – Valores basais de pressão arterial média (PAM), antes e após a microinjeção de doses crescentes de WB4101, antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$  no CPFL de ratos não anestesiados

WB4101 (nmol/100nL)	Antes (PAM)±EPM	Após (PAM)±EPM	t=	n= (amostra)
0.3	102±3	100±4	0.4	4
5	98±3	100±4	0.3	4
10	96±3	104±3	2.6	4
15	103±3	98±6	0.8	4

**Tabela 2** – Valores basais de frequência cardíaca (FC), antes e após a microinjeção de doses crescentes de WB4101, antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$  no CPFL de ratos não anestesiados

WB4101 (nmol/100nL)	Antes (FC)±EPM	Após (FC)±EPM	t=	n= (amostra)
0.3	368±12	356±13	0.4	4
5	364±10	382±9	1	4
10	356±9	377±12	2.5	4
15	356±7	367±10	1.8	4

**Tabela 3** – Valores basais de pressão arterial média (PAM), antes e após a microinjeção de doses crescentes de RX821002, antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_2$  no CPFL de ratos não anestesiados

RX821002 (nmol/100nL)	Antes (PAM)±EPM	Após (PAM)±EPM	t=	n= (amostra)
0.3	96±3	106±3	2.6	4
5	99±3	101±2	0.5	4
10	103±4	102±5	0.3	4
15	95±2	101±2	1.3	4

**Tabela 4** – Valores basais de frequência cardíaca (FC), antes e após a microinjeção de doses crescentes de RX821002, antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_2$  no CPFL de ratos não anestesiados

<b>RX821002 (nmol/100nL)</b>	<b>Antes (PAM)±EPM</b>	<b>Após (PAM)±EPM</b>	<b>t=</b>	<b>n= (amostra)</b>
<b>0.3</b>	356±9	380±16	1.5	4
<b>5</b>	353±9	362±14	0.8	4
<b>10</b>	356±7	358±8	0.1	4
<b>15</b>	384±12	362±11	1	4

## **Lista de abreviaturas citadas na Tese:**

CI – Córtex Insular

CPF – Córtex pré-frontal

CPFL – Córtex pré-frontal lateral

CPFM – Córtex pré-frontal medial

CPFO – Córtex pré-frontal orbital

ER – Estresse por restrição

FC – Frequência cardíaca

HL – Hipotálamo lateral

LC – *Locus coeruleos*

NA – Noradrenalina

NDV – Núcleo dorsal do vago

NLET – Núcleo leito da estria terminal

NTS – Núcleo do trato solitário

PA – Pressão Arterial

rBVL – Bulbo ventrolateral rostral

SCP – Substancia cinzenta periaquedutal

SNC – Sistema nervoso central

*ARTIGOS PUBLICADOS  
REFERENTES À TESE*

# 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](#)