

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PARTICIPAÇÃO DA REGIÃO INFRALÍMBICA DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL  
NA RESPOSTA CARDIOVASCULAR AO ESTRESSE EMOCIONAL

FLÁVIA CAMARGOS DE FIGUEIRÊDO MÜLLER RIBEIRO

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO ANTÔNIO PELIKY FONTES

BELO HORIZONTE – MG  
2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

FLÁVIA CAMARGOS DE FIGUEIRÊDO MÜLLER RIBEIRO

PARTICIPAÇÃO DA REGIÃO INFRALÍMBICA DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL  
NA RESPOSTA CARDIOVASCULAR AO ESTRESSE EMOCIONAL

Dissertação de mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Fisiologia e Farmacologia do Instituto de  
Ciências Biológicas – ICB, UFMG para  
obtenção do título de mestre em  
fisiologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO ANTÔNIO PELIKY FONTES

BELO HORIZONTE  
2010

Aos meus queridos pais, Franz e Mônica,  
que nunca me faltaram com suporte e amor.

Essa vitória é nossa!

## **Agradecimentos**

Agradeço à Deus, presença constante em minha vida, por me proporcionar tudo o que precisei para alcançar essa conquista. Sou grata por cada momento em que o Senhor esteve comigo, sendo certeza nos momentos de incerteza.

Aos meus pais, exemplos de força e dignidade, pelo apoio, incentivo e amor incondicional.

Aos meus irmãos, Frederico, Franz e Barbara por torcerem e estarem sempre ao meu lado.

Ao Dudu, pelo amor, compreensão, companherismo e paciência durante este período.

Ao Prof. Marco Antônio Peliky Fontes pela confiança depositada em mim, por me mostrar o caminho da ciência, pela orientação e por todas as oportunidades que me ofereceu.

Ao Prof. Joseph DiMicco pela oportunidade, aprendizado e carinho.

Ao Dmitry e Maria pela ajuda e ensinamentos em Indianópolis

Ao Daniel, Nikita, Raphy e Gabriel por alegrarem meus dias em Indianópolis

À Djane e Regis pela amizade, confiança e apoio que me ofereceram em Indy.

À Neilia, Ramy, Virginia, Chao, David e Vanina, meus amigos estrangeiros.

Aos Profs.do Laboratório de Hipertensão, Andrea, Maria José e Robson pelos ensinamentos.

À Prof. Maria da Glória por ter me mostrado o caminho da fisiologia.

Ao Zezé pela amizade e auxílio durante os experimentos.

À Celinha por estar sempre disposta a me ajudar e por sua competência.

À todos que participaram e participam da célula da Vanessa e Marquinhos por estarem sempre comigo em oração muito antes de eu iniciar esse mestrado.

Às minha amigas de infância, Tatiana, Juliana, Bárbara e Rachel, sempre presentes em momentos especiais.

À todos do laboratório de Hipertensão que me apoiaram e divertiram durante esses anos. Agradeço especialmente à Rose, Soninha, Marcelo, Analina, Michele, Marilene, Janaína, Renatinha e Dani Ianzer e claro, meus “irmãos científicos”, Carlos, Augusto, Gonzaga e Charles.

À Gigi, Erica e Nívia, amigas com quem pude contar em todos os momentos. Não chegaria até aqui sem o apoio delas.

A todos os professores e amigos do Departamento pela amizade e apoio.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>14</b>
2.1. Objetivo Geral .....	14
2.2. Objetivos Específicos .....	14
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>15</b>
3.1. Animais .....	15
3.2. Anestesia .....	15
3.3. Procedimentos Gerais .....	16
3.4. Drogas .....	18
3.5. Procedimentos Experimentais .....	19
3.6. Protocolos Experimentais .....	20
3.7. Histologia .....	24
3.8. Análise estatística .....	24
<b>4. Resultados</b> .....	<b>25</b>
4.1. Protocolo 1 .....	25
4.1.1. Protocolo 2 .....	29
<b>5. Discussão</b> .....	<b>36</b>
<b>6. Conclusão</b> .....	<b>49</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>50</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AC** - Cingulado anterior

**Ach** - Acetilcolina

**ACTH** - Hormônio adrenocorticotrópico

**AGm** - Região agranular medial

**BMI** - Bicuculina metiodide

**CoCl<sub>2</sub>** - Cloreto de cobalto

**CRF** - Fator de liberação de corticotropina

**DMH** - Hipotálamo dorsomedial

**EAA** - Aminoácidos excitatórios

**FC** - Frequência cardíaca

**GABA<sub>A</sub>** - Receptor para ácido gama amino butírico (subtipo A)

**HPA** - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

**IL** - Região infralímbica

**IML** - Coluna intermediolateral da medula espinhal

**I/dIPAG** - Substância cinzenta periaquedutal lateral

**LHA** - Área hipotalâmica lateral

**IPFC** - Córtex pré-frontal lateral

**mPFC** - Córtex pré-frontal medial

**mRNA** - RNA mensageiro

**NA** – Noradrenalina

**NMDA** - Ácido N-Metil-D-Aspartato

**NTS** - Núcleo do trato solitário

**PAG** - Substância cinzenta periaquedutal

**PAM** - Pressão arterial média

**PFC** - Córtex pré-frontal

**PL** - Região prélimbica

**pPVN** - Região parvocelular do núcleo paraventricular

**PVN** - Núcleo paraventricular do hipotálamo

**RSNA** - Atividade simpática para o nervo renal

**RVLM** - Bulbo ventrolateral rostral

**SNC** – Sistema nervoso central

**vMPFC** - Porção ventral do córtex pré-frontal medial

## Resumo

O córtex pré-frontal medial (mPFC) tem sido descrito como uma importante estrutura cortical envolvida na integração de respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais frente a um estímulo emocional. Evidências anatômicas demonstraram que o mPFC, em particular, as regiões prélimbica (PL) e infralimbica (IL) modulam as funções autonômicas e neuroendócrinas por meio de projeções para diferentes estruturas subcorticais envolvidas na organização da resposta central ao estresse. O objetivo deste estudo foi aprofundar o entendimento sobre a participação da região IL na resposta cardiovascular ao estresse emocional. A inibição bilateral da região IL utilizando o agonista de receptor GABA<sub>A</sub>, muscimol (100pmol/100nl) não alterou os parâmetros cardiovasculares, temperatura corporal e atividade locomotora basais de ratos acordados. A inibição da região IL também não alterou a resposta cardiovascular em 3 diferentes paradigmas de estresse avaliados (*cage switch*, contenção associado ao barulho produzido pelo jato de ar e jato de ar). Da mesma forma, a inibição da IL também não alterou a resposta termogênica e atividade locomotora em dois modelos de estresse avaliados (*cage switch* e contenção associado ao barulho produzido pelo jato de ar). No entanto, a estimulação unilateral da região IL com o aminoácido excitatório, NMDA (6pmol/100nl), reduziu a frequência cardíaca basal sem alterar os valores de pressão arterial. Adicionalmente, a microinjeção prévia de NMDA na região IL atenuou a resposta taquicárdica ao estresse por jato de ar sem alterar a resposta pressora. Nenhuma diferença com relação a atenuação da resposta taquicárdica evocada pelo estresse por jato de ar foi observada ao se comparar a estimulação do lado direito com o lado esquerdo da região IL. Em

conclusão, os resultados descartam o papel tônico da IL na manutenção dos parâmetros cardiovasculares, termogênese e atividade locomotora basais ou na resposta cardiovascular, termogênica e comportamental ao estresse emocional. Por outro lado nosso estudo mostra que, quando ativada, a região IL pode modular de maneira inibitória a resposta taquicárdica evocada pelo estresse emocional. Este resultado sugere uma possível participação fásica da região IL na resposta cardiovascular ao estresse emocional.

**Palavras chaves:** córtex pré-frontal medial, região infralímbica, muscimol, frequência cardíaca, pressão arterial, estresse, NMDA.

## Abstract

The medial prefrontal cortex (mPFC) has been described as an important cortical structure involved in autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to emotional stimuli. Anatomical and functional studies demonstrated that mPFC, in particular, prelimbic (PL) and infralimbic (IL) cortices can modulate autonomic and neuroendocrine functions via different projections to subcortical structures involved in stress response. The aim of the present study was to elucidate the role of IL cortice in cardiovascular response to emotional stress. Bilateral microinjection of muscimol, a GABA<sub>A</sub> receptor agonist and neuronal inhibitor (100pmol/100nl) in the IL cortice had no effect upon baseline cardiovascular, thermogenic and behavioral parameters. The IL cortice inhibition did not change the cardiovascular response to three different paradigms of stress (cage switch, restraint associated with air jet noise and air jet stress). Similarly, bilateral microinjection of muscimol into IL cortice did not affect the thermogenic and behavioral response to two different models of stress (cage switch, restraint associated with air jet noise). However, unilateral microinjection of NMDA (6pmol/100nl), an excitatory amino acid, reduced baseline heart rate without affecting the blood pressure. In addition pretreatment with NMDA attenuated the tachycardic response without a significant effect on the pressor response to air jet stress. No differences were observed when we compared right and left stimulation of IL cortice. These results indicate that IL cortice does not modulate the cardiovascular, thermogenic and behavioral parameters during baseline conditions or acute psychological stress. The present study also demonstrated an inhibitory influence of IL cortice on air jet-evoked tachycardic

response. These result suggest that IL cortice has a modulatory action upon cardiovascular response to emotional stress.

**Key words:** medial prefrontal cortex, infralimbic cortice, muscimol, heart rate, blood pressure, stress, NMDA.

## 1. INTRODUÇÃO

O estresse pode ser definido como um estado de ameaça à homeostase do indivíduo. Durante situações de estresse, respostas compensatórias são ativadas para manutenção da homeostase. Estas respostas resultam da ativação de circuitos centrais específicos que são geneticamente programados e constantemente modulados por fatores ambientais (Pacak and Palkovits, 2001). O sistema nervoso central dos mamíferos em resposta ao estresse emocional, gera um padrão integrado de alterações endócrinas, autonômicas e comportamentais que foram evolutivamente conservadas através das espécies (Selye, 1955, LeDoux, 1994, DiMicco et al., 2002). Essas alterações incluem o aumento da ativação do sistema nervoso simpático, manifestada pelo aumento de frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM) e temperatura corporal (Julius, 1993); ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) com consequente aumento da concentração plasmática do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (Marti and Armario, 1998), além de alterações comportamentais incluindo medo e ansiedade (Cannon, 1987). As alterações fisiológicas resultantes das situações de estresse psicológico preparam o organismo para enfrentar situações de risco com o objetivo de aumentar a probabilidade de sobrevivência (Harris et al., 2000, Hayashi et al., 2006). Classicamente o conjunto dessas alterações fisiológicas é conhecido como síndrome de emergência ou reação de luta ou fuga (Cannon, 1929, Cannon, 1987).

As situações de estresse psicológico encontram-se cada vez mais presentes no mundo atual, contribuindo para o aparecimento de várias doenças cardiovasculares incluindo hipertensão arterial (Folkow, 1982, Davies et al., 1999, Unger and Parati,

2005), arritmias cardíacas (Leor et al., 1996), infarto do miocárdio (Parati et al., 2001) e até mesmo morte súbita (Parati et al., 2001, Critchley et al., 2005). Estudos clínicos e epidemiológicos têm revelado que novos fatores de risco podem estar relacionados com o surgimento e a manutenção de doenças cardiovasculares. O estresse emocional é um dos principais fatores de risco, sendo classificado como um tipo de risco modificável (Greenland et al., 2000), e considerado pela Organização Mundial de Saúde como uma preocupação decorrente das atividades ocupacionais da vida moderna (Rozanski et al., 1999). A exposição frequente ao estresse psicológico e a dificuldade do sistema cardiovascular de se adaptar a esse estímulo, tem sido apontado como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Barron and Van Loon, 1989, Schwartz et al., 2003).

Embora muitos estudos em humanos e modelos experimentais estabeleçam uma correlação entre estresse e o risco aumentado de doenças cardiovasculares, assim como estresse e depressão, pouco se sabe sobre as vias centrais envolvidas e os mecanismos responsáveis pela resposta cardiovascular ao estresse (Kasckow et al., 2001, Gillespie and Nemeroff, 2005). Além disso, os substratos neurais que desempenham um importante papel na disfunção da resposta ao estresse observada em várias doenças, tais como a síndrome do pânico e o transtorno do estresse pós-traumático permanecem pouco conhecidos (McNally, 2008, Strawn and Geraciotti, 2008). A identificação de áreas no sistema nervoso central (SNC) e o estudo de suas respectivas conexões e neurotransmissão é uma etapa crítica para o melhor entendimento da organização central desta resposta e futuro desenvolvimento de drogas para tratamento de doenças relacionadas ao estresse .

Várias estruturas do sistema nervoso central envolvidas na organização central da resposta cardiovascular ao estresse emocional têm sido descritas na literatura. Entre elas destacam-se o núcleo do trato solitário (NTS) (Owens and Verberne, 1996), bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (Morrison, 1999, Fontes et al., 2001), substância cinzenta periaquedutal (PAG) (Carrive, 1993), rafe pallidus (RF) (Morrison, 1999), hipotálamo (Reis and Ledoux, 1987, Armony et al., 1995), hipotálamo dorsomedial (DMH) (Soltis and DiMicco, 1991), núcleo central da amígdala (Iwata et al., 1986, Roozendaal et al., 1991), córtex insular (Delgado, 1960, Neafsey, 1990, Fisk and Wyss, 1997) e córtex pré-frontal (Neafsey, 1990, Cullinan et al., 1995).

### **1.1 - O Córtex Pré-frontal Medial: Localização, Subdivisões, Funções e Projeções**

O PFC tem sido descrito como uma importante estrutura cortical envolvida na modulação do sistema cardiovascular (Loewy, 1991). O PFC recebe projeções diretas do núcleo talâmico dorsal medial (Leonard, 1969) e possui extensas conexões com estruturas límbicas. Neuroanatomicamente, o PFC é dividido em duas regiões: córtex pré-frontal lateral (IPFC) conhecida como uma área sensitiva visceral, e córtex pré-frontal medial (mPFC) considerado uma área motora visceral (Leonard, 1969). O mPFC localiza-se adjacente a parede medial do lobo frontal de ambos hemisférios, estendendo-se no sentido caudal até a base. Ele consiste de 4 principais subdivisões: região agranular medial (AGm), cíngulo anterior (AC), região pré-límbica (PL) e região infralímbica (IL) (figura 1) (Berendse and Groenewegen, 1991, Ray and Price, 1992, Ongur and Price, 2000).

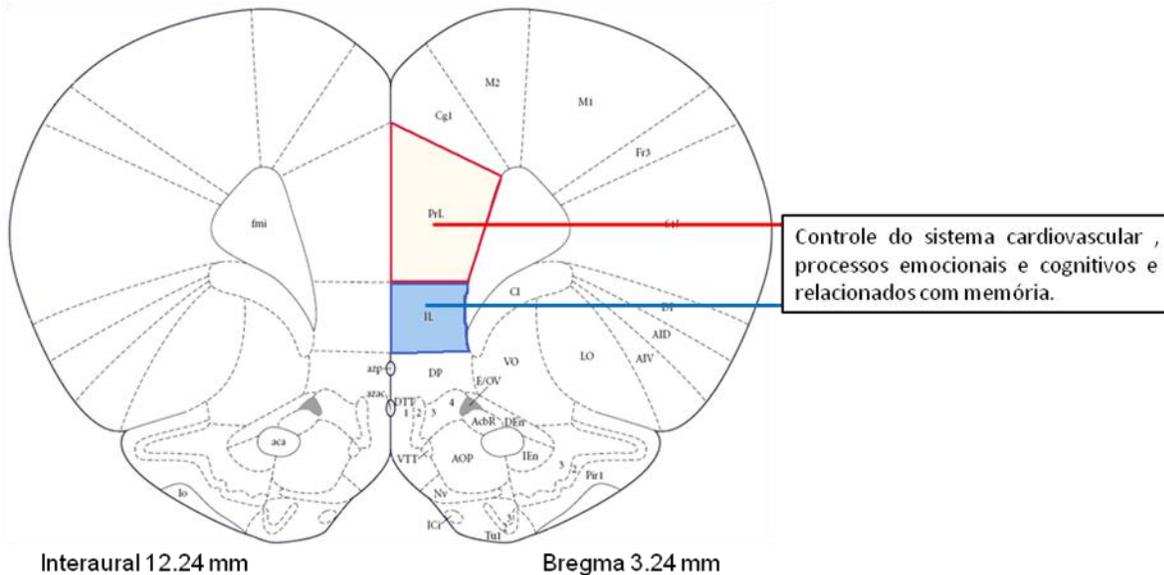


Figura 1: Representação esquemática das subdivisões infralímbica (IL) e pré-límbica (PL) do córtex pré-frontal medial (mPFC) do rato que participam da modulação da resposta cardiovascular ao estresse. Adaptado de Paxinos e Watson (1998).

Acredita-se que o mPFC exerce um papel em uma variedade de processos que incluem: atenção, memória, organização temporal, integração da informação sensorial (Nauta, 1971, Broersen, 2000, Rolls, 2000), atividade visceromotora e tomada de decisão (Neafsey et al., 1986, Neafsey, 1990, Petrides, 1995). Adicionalmente, o mPFC como parte do sistema límbico integra respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais frente a um estímulo emocional (Neafsey, 1990, Jinks and McGregor, 1997, Buijs and Van Eden, 2000, Van Eden and Buijs, 2000, Sullivan and Gratton, 2002). Apesar da ablação dessa região não causar alterações nos parâmetros cardiovasculares basais de ratos normotensos e hipertensos, existem evidências de que o mPFC possa exercer um importante papel como modulador das alterações

cardiovasculares associadas a respostas comportamentais. (Verberne et al., 1987, Verberne et al., 1988, Neafsey, 1990, Sequeira et al., 2000).

O mPFC envia projeções para várias estruturas do SNC envolvidas na regulação cardiovascular tais como o NTS, coluna intermediolateral da medula espinhal (IML) (Van Eden and Buijs, 2000), região parvocelular do núcleo paraventricular (pPVN), complexo amigdalóide, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e particularmente para o hipotálamo dorsomedial (DMH) (Vertes, 2004). McDougall e colaboradores (2004) demonstraram que a microinjeção bilateral de muscimol, um agonista dos receptores para ácido gama amino butírico, subtipo A (GABA<sub>A</sub>) e potente inibidor neuronal, no mPFC, atingindo as regiões IL e PL, durante uma situação de estresse, não alterou os parâmetros cardiovasculares basais ou a resposta pressora e taquicárdica evocadas pelo estresse de contenção. No entanto, a microinjeção prévia de muscimol no DMH atenuou a resposta cardiovascular ao estresse de contenção, como já foi demonstrado anteriormente em vários estudos (DiMicco et al., 1996, Stotz-Potter et al., 1996a, Stotz-Potter et al., 1996b, Xavier et al., 2009). É importante ressaltar que o estresse induziu um aumento na expressão de Fos, no DMH, amígdala medial e NTS nos animais que receberam microinjeção bilateral de muscimol no mPFC. Dessa forma, esses dados sugerem que durante uma situação de estresse, o mPFC não modula o sistema cardiovascular mas inibe núcleos subcorticais específicos, tal como o DMH, que exerce controle sobre aspectos de uma resposta integrada ao estresse (McDougall et al., 2004).

Estudos têm mostrado o importante papel do mPFC como parte do circuito envolvido na resposta central ao estresse. Foi observado que a exposição a uma

variedade de estressores resultou em um aumento acentuado da ativação neuronal. Essa ativação neuronal foi confirmada através do aumento de expressão do gene c-fos, um importante marcador da atividade neuronal (Handa et al., 1993, Beck and Fibiger, 1995). Complementarmente, foi identificada uma significativa liberação do neurotransmissor excitatório, glutamato nessa região durante a exposição ao estresse (Moghaddam, 1993). Um estudo utilizando labirinto em cruz elevado demonstrou que a estimulação de receptores GABA<sub>A</sub> através de infusões de muscimol no mPFC reduziu a ansiedade, sugerindo que a inibição dessa região atenua o comportamento relacionado ao medo (Shah et al., 2004). Adicionalmente, Amat e colaboradores (2005), utilizando experimentos de estresse, observaram que a inativação temporária do mPFC com muscimol durante uma situação de estresse controlável e incontrolável, eliminou os efeitos de controle sobre o agente estressor (Amat et al., 2005).

## **1.2 - Diferenças Funcionais e Nas Vias Eferentes do Córtex Pré-frontal**

As subdivisões do mPFC parecem atuar de maneira independente e com funções distintas. A porção dorsal do mPFC (Agm e AC) parece estar envolvida em uma série de comportamentos motores, enquanto a porção ventral (vMPFC) compreendendo as regiões IL e PL, está associada ao controle do sistema cardiovascular, processos emocionais, cognitivos e relacionados com a memória (Vertes, 2004). Foi demonstrado que a estimulação elétrica da vMPFC produz um aumento de PAM em ratos acordados (Burns and Wyss, 1985) e redução da PAM sem alterações na frequência cardíaca em ratos anestesiados (Burns and Wyss, 1985, Hardy and Holmes, 1988, Verberne, 1996). Entretanto, sabe-se que a estimulação elétrica promove ativação não somente de corpos neuronais, mas também de axônios

de passagem, o que causa dificuldade na interpretação de dados obtidos (Goodchild et al., 1982). Owens e Verberne (2001) para esclarecer se a resposta hipotensora evocada pelo estímulo elétrico foi causada por fibras de passagem ou ativação de corpos neuronais, realizaram a estimulação química utilizando L-glutamato. Resposta similar a estimulação elétrica foi observada após a microinjeção unilateral de L-glutamato, indicando que a resposta hipotensora era causada pela excitação de corpos neuronais (Owens and Verberne, 2001).

Dentre os diversos neurotransmissores presentes na vMPFC, a acetilcolina (ACh), noradrenalina (NA) e glutamato produzem respostas cardiovasculares quando microinjetados na vMPFC. Os efeitos da microinjeção de ACh e NA foram avaliados tanto em ratos anestesiados quanto acordados. A microinjeção de ACh produziu uma resposta hipotensora em animais acordados e anestesiados (Crippa et al., 1999), enquanto a NA evocou uma resposta pressora em ratos acordados. Importante notar que essa resposta pressora causada pela NA foi significativamente atenuada em animais anestesiados (Fernandes et al., 2003). Adicionalmente, estudos mostraram que a microinjeção de L-glutamato ou ácido D,L-homocisteico gerou uma resposta hipotensora em ratos anestesiados, descrita como uma ação simpatoinibitória (Bacon and Smith, 1993, Verberne, 1996, Fisk and Wyss, 1997). Por outro lado, a estimulação química da vMPFC em animais acordados evocou uma resposta contrária a observada anteriormente. Resstel e Correa (2005) demonstraram que a microinjeção unilateral de L-glutamato nessa região causa uma resposta pressora e taquicárdica dose-dependente. Os autores ainda sugerem que essa resposta é dependente da ativação

simpática cardíaca e potenciada pelo bloqueio de receptores muscarínicos periféricos (Resstel and Correa, 2005).

Um novo conceito com relação às funções desempenhadas pela porção ventral do mPFC tem sido sugerido. A região IL encontra-se relacionada a funções visceromotoras, enquanto a PL está envolvida com processos cognitivos. Apesar dessa aparente diferença funcional, as regiões IL e PL são frequentemente citadas como uma única região, sem levar em consideração suas projeções eferentes (Vertes, 2004). Além disso, a grande maioria dos trabalhos não discrimina os sítios de microinjeção realizados nessas regiões. Até pouco tempo, acreditava-se que essas regiões projetavam-se para núcleos comuns (Sesack et al., 1989, Takagishi and Chiba, 1991). No entanto, um estudo anatômico recente utilizando técnicas de marcação neuronal anterógrada, comprovou que existem diferenças quanto a densidade e extensão das projeções entre as duas regiões (figura 2). Com exceção do córtex, tálamo e PAG, as regiões IL e PL projetam-se para núcleos diferentes ao longo do encéfalo (Vertes, 2004).

Com exceção do núcleo paraventricular do hipotálamo, a região PL projeta-se de maneira escassa para núcleos envolvidos na manutenção do tônus autonômico. As fibras da região PL emitem suas projeções principalmente para o córtex insular agranular, núcleo acumbens, tubérculo olfatório, núcleo mediodorsal do tálamo, região capsular do núcleo central e núcleo basolateral da amígdala e núcleo dorsal e medial da rafe (Vertes, 2004). Estudos sugerem que a região IL exerce maior influência sobre as funções do sistema nervoso autônomo (Burns and Wyss, 1985, Hardy and Holmes, 1988, Fisk and Wyss, 1997). Foi evidenciado que as projeções da região IL são

consistentes com seu envolvimento nas funções visceromotoras, sendo suas principais projeções para o núcleo central, basomedial e medial da amígdala, núcleo supramamilar, posterior, perifornical, lateral e dorsomedial do hipotálamo, além do NTS e IML (Hurley et al., 1991, Vertes, 2004). Fisk e Wiss (2000) demonstraram que a estimulação elétrica da região IL causa uma resposta transitória de queda na pressão arterial, que não está associada à taquicardia compensatória do baroreflexo. Adicionalmente foi observado que a microinjeção de lidocaína, um anestésico local, na área hipotalâmica lateral (LHA) e PAG foi capaz de bloquear parcialmente a resposta hipotensora após a estimulação da região IL (Fisk and Wyss, 2000). Um estudo semelhante reportou que os efeitos causados pela estimulação da região IL foram atenuados após microinjeções bilaterais de muscimol no NTS (Owens et al., 1999). Em conjunto, esses achados funcionais vão de acordo com os estudos anatômicos e indicam que a influência da região IL sobre a função cardiovascular é mediada em parte por projeções diretas ou indiretas da região IL para LHA, PAG e NTS. É importante ressaltar que a PAG, uma estrutura mesencefálica, é relé sináptico nas vias descendentes cardiovasculares do DMH (da Silva et al., 2003, de Menezes et al., 2006, de Menezes et al., 2008) responsável pelo controle das respostas autonômicas e dos diferentes padrões comportamentais de defesa, (Tricklebank et al., 1985, Carrive et al., 1988)

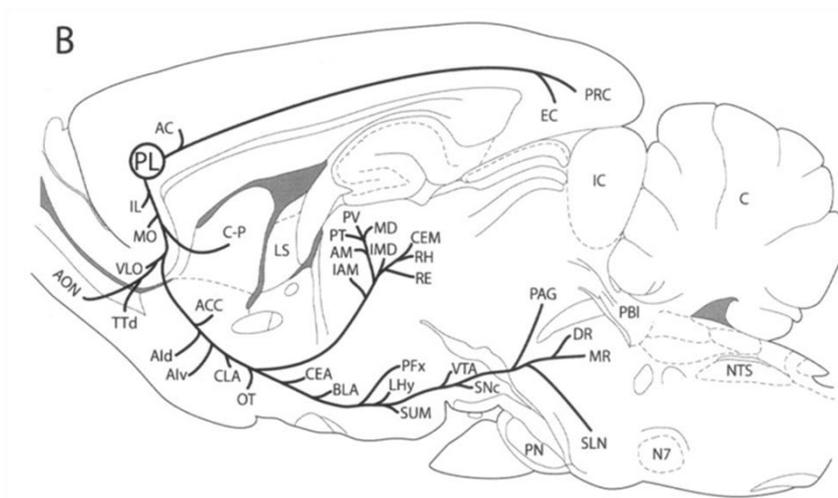
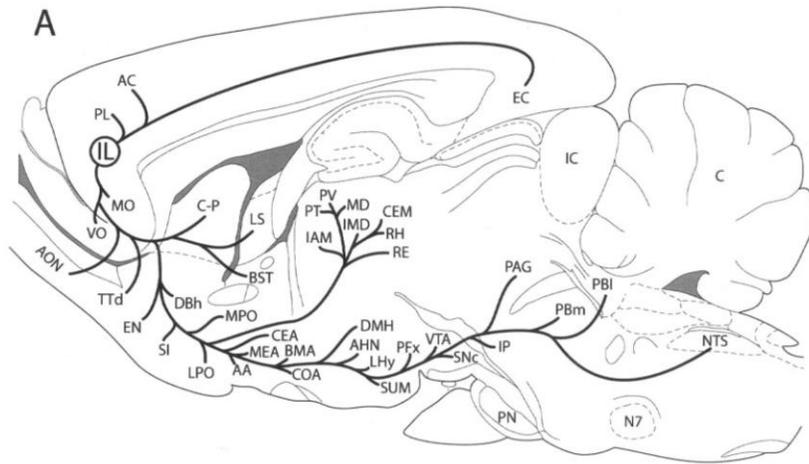


Figura 2: Corte sagital esquemático resumindo as principais projeções da região infralímbica (A) e pré-límbica (B) do córtex pré-frontal medial (mPFC). Figura modificada de Vertes, 2004.

O papel do mPFC na modulação do sistema cardiovascular durante a exposição a uma situação de estresse tem sido investigado extensivamente por diferentes grupos de pesquisa. Apesar dos estudos anatómicos comprovarem uma diferença aparente

entre as projeções das duas regiões do vMPFC, estudos avaliando a funcionalidade da região PL e IL mostram a influência de ambas regiões na modulação da resposta cardiovascular ao estresse. Al Maskati e colaboradores (1989) demonstraram que a estimulação elétrica ou química prévia das regiões IL e PL abole a resposta pressora e taquicárdica observada após a estimulação da amígdala e hipotálamo. Esse achado sugere que a porção ventral do mPFC exerce uma influência inibitória sobre os componentes cardiovasculares produzidos na reação de defesa, similares ao estímulo elétrico do hipotálamo e amígdala (al Maskati and Zbrozyna, 1989). Recentemente, Tavares e colaboradores (2009) demonstraram um papel oposto da inativação farmacológica na neurotransmissão das regiões PL e IL sobre a resposta taquicárdica evocada pelo estresse de contenção em ratos. A microinjeção bilateral de cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ), um bloqueador sináptico não específico, na região PL potencializou a resposta taquicárdica causada pelo estresse de contenção sem alterar a PAM. No entanto, quando as sinapses na região IL foram inibidas, a resposta taquicárdica ao estresse de contenção foi significativamente atenuada sem alterações nos valores de PAM (Tavares et al., 2009). Esses resultados sugeriram que a região PL exerce uma influência inibitória sobre a taquicardia evocada pelo estresse de contenção, enquanto a IL exerce uma influência excitatória. Dados anteriores deste mesmo grupo ainda demonstram que a inibição exercida pela região PL é mediada por receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA, estando associada a ativação do sistema nervoso parasimpático (Tavares and Correa, 2006). Radley e colaboradores (2006) compararam os efeitos da lesão das regiões IL e PL sobre a resposta neuroendócrina e autonômica ao estresse agudo de contenção. Foi observado que a lesão da região PL

aumentou atividade do eixo HPA, expressão de RNA mensageiro (mRNA) do fator de liberação de corticotropina (CRF) e fos na região neurosecretória do núcleo hipotalâmico paraventricular (PVN), enquanto a lesão da região IL resultou em reduzida atividade do eixo HPA, expressão de mRNA do CRF nesta região e aumento de fos nas regiões do PVN envolvidas no controle autonômico. Esses resultados sugerem que as regiões IL e PL do mPFC regulam de maneira diferente as respostas neuroendócrinas e autonômicas mediadas pelo PVN ao estresse emocional (Radley et al., 2006).

### **1.3- Vias Neurais Lateralizadas e Consequências Funcionais**

Diferenças nas propriedades do funcionamento dos lados direito e esquerdo do sistema nervoso central, conhecida como lateralização da função, têm sido observadas em diversas estruturas ou regiões do encéfalo (Toga and Thompson, 2003). Estudos têm mostrado que assimetria de funções no sistema nervoso pode resultar em desequilíbrio autonômico com implicações para o sistema cardiovascular (Lane et al., 1992). Recentemente Xavier e colaboradores (2009), demonstraram que o DMH direito é crítico para alcançar níveis mais elevados de taquicardia e que as vias descendentes do mesmo são lateralizadas (Xavier et al., 2009). Estes achados funcionais estão de acordo com estudos anatômicos prévios que demonstraram que as vias descendentes do DMH são ipsilaterais (Thompson et al., 1996).

Estudos demonstraram que indivíduos com patologias restritas ao mPFC exibiram déficits emocionais pronunciados relacionados à disfunção autonômica (Damasio et al., 1990, Damasio, 1994, Damasio et al., 1994). De maneira interessante,

esses déficits no mPFC foram relacionados somente ao hemisfério direito (Bechara et al., 2000). Sullivan e Gratton (1999) investigaram a regulação da lateralização da função do mPFC em resposta ao estresse utilizando ácido ibotênico. Foi demonstrado que o mPFC direito intacto é necessário para evocar respostas neuroendócrinas e autonômicas frente uma situação de estresse (Sullivan and Gratton, 1999).

De um modo geral, é possível concluir que as evidências da literatura têm sido pouco esclarecedoras e até conflitantes em alguns casos em relação ao papel funcional da vMPFC na resposta cardiovascular ao estresse emocional. Primeiro por não ter levado em consideração uma potencial diferença funcional entre as duas regiões (PL e IL), e segundo por razões metodológicas. Nesse sentido, o presente estudo visa avaliar de maneira um pouco mais criteriosa o papel da IL sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais relacionadas ao estresse emocional.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Reavaliar o papel do mPFC, especificamente da região infralímbica na organização central da resposta cardiovascular, termogênica e comportamental ao estresse emocional.

### **2.1 - Objetivos Específicos**

- 1) Avaliar o efeito da inibição bilateral da IL sobre os parâmetros cardiovasculares basais e sobre a resposta cardiovascular em 3 diferentes tipos de estresse em ratos.
- 2) Avaliar o efeito produzido pela microinjeção unilateral do ácido N-Metil-D-Aspartato (NMDA) na região IL sobre os parâmetros cardiovasculares basais e sobre a resposta cardiovascular ao estresse por jato de ar.
- 3) Comparar os efeitos da estimulação dos lados direito e esquerdo da IL sobre os parâmetros cardiovasculares basais e sobre a resposta cardiovascular ao estresse por jato de ar.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 - Animais**

A primeira etapa dos experimentos foi realizada em ratos Sprague-Dawley (Harlan, Indianápolis, In, EUA), pesando entre 290-330g. Os animais foram acondicionados individualmente e foi permitido livre acesso à água e comida. Os animais eram mantidos em um biotério com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura mantida a 22-23 °C. A segunda etapa dos experimentos foi realizada em ratos Wistar com peso entre 270 e 330g provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os regulamentos determinados pelo National Institute of Health (NIH) e aprovados pelo Instituto de Cuidados Animais (USA, IN).

#### **3.2 - Anestesia**

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos dos protocolos experimentais realizados em Indianápolis, foi utilizado Ketamina-xilazina como anestésico (80 mg/Kg de ketamina e 11.5 mg/Kg de xilazina), administrado por via intraperitoneal (i.p.). Para os procedimentos cirúrgicos realizados no Brasil o anestésico utilizado foi Tribromoetanol (250 mg/Kg i.p.). Suplementações foram injetadas em doses menores durante a cirurgia, quando necessário.

### 3.3 - Procedimentos Gerais

Em todos os experimentos realizados em Indianápolis, EUA, um sistema de aquisição de dados por telemetria (Data Sciences, MN, EUA) foi utilizado para a medida e aquisição da temperatura corporal, PAM, FC e atividade locomotora. A atividade locomotora era calculada pela alteração na intensidade do sinal sobre o tempo, onde a unidade de atividade é, aproximadamente, equivalente a locomoção de 1 cm/s aproximadamente. Os animais foram anestesiados para inserção do cateter flexível de um transmissor de telemetria (Data Sciences, MN, EUA) na artéria aorta abdominal através da artéria femoral direita. O corpo do transmissor era acomodado na cavidade abdominal e suturado à parede abdominal. Seis dias após o implante do transmissor, os ratos foram novamente anestesiados (80 mg/Kg de ketamina e 11.5 mg/Kg de xilazina i.p. suplementado quando necessário), para implante de cânulas guia bilaterais. Estas cânulas eram de metal sendo que a extremidade por onde a injetora era inserida era revestida por plástico, (26 G, Plastics one, Roanoke, VA, EUA). As cânulas foram posicionadas na região IL do mPFC utilizando-se de técnica previamente descrita (Bailey and Dimicco, 2001, Zaretskaia et al., 2002, da Silva et al., 2003). Resumidamente, os ratos foram posicionados em um aparelho estereotáxico (STOELTING, IL, USA), com a cabeça posicionada 3,3mm abaixo da linha interaural. Após uma injeção subcutânea de cloridrato de lidocaína 2% associado à epinefrina 1:2000000 para provocar analgesia e vasoconstrição local, foi feita uma incisão mediana para a exposição do crânio e localização do bregma. O implante foi realizado utilizando-se o bregma como ponto de referência e de acordo com as coordenadas estereotáxicas do Atlas de Paxinos & Watson (Paxinos, G., Watson, C., 1998): para a

região IL do mPFC, + 2,7 mm anterior,  $\pm$  0,6mm lateral, -4,7 mm ventral. As cânulas foram fixadas com auxílio de dois parafusos de aço inox, cola Vetbond eacrílico dental. Cânulas oclusoras de metal foram inseridas dentro das cânulas guia e os animais colocados nas suas respectivas caixas para a recuperação. Um analgésico foi administrado (buprenorfina, 0,02mg / kg, s.c.) com o objetivo de diminuir o desconforto dos animais após a cirurgia. Foi permitido aos ratos um período de recuperação, de pelo menos cinco dias, antes do início de qualquer um dos protocolos descritos a seguir.

Nos experimentos realizados no Brasil os animais foram previamente anestesiados com Tribromoetanol (250 mg/Kg i.p. suplementado quando necessário), para o implante de cânulas-guia bilaterais na IL-mPFC , como descrito anteriormente. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais receberam uma dose intramuscular de 0,2 mL de pentabiótico veterinário (1:200000 UI) e o analgésico e anti-inflamatório Banamine (1,1 - 2,2mg/Kg). Após 5 dias de recuperação, os animais foram novamente anestesiados e uma pequena incisão na região inguinal foi efetuada para a exposição da artéria femoral. Um cateter de polietileno (PE-10 Clay Adams, 0.011 ID) de aproximadamente quatro centímetros (soldado por aquecimento a um tubo de PE-50 de 15 cm) foi introduzido na artéria femoral, até alcançar a aorta abdominal. A perviedade desse cateter foi mantida com solução salina (0,9%), contendo heparina 25 UI/mL. Após a introdução do cateter na artéria, este foi passado pelo tecido subcutâneo do animal até a sua exteriorização na região interescapular. Todas as incisões foram fechadas com pequenas suturas. Após 24 horas de recuperação, a extremidade livre

da cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão para aquisição dos valores de PAM e FC.

Todos os animais receberam cuidados pós-operatórios após as cirurgias como determinado pelo Instituto de cuidados de animais (IN, USA). Os procedimentos apropriados foram realizados para assegurar que cada animal estava em bom estado de saúde quando da realização dos experimentos. Os cuidados pós-operatórios eram iniciados logo após o término dos procedimentos cirúrgicos. Os animais eram inspecionados diariamente para a verificação do bem estar dos mesmos. Inflamação persistente, infecção, perda de peso progressiva, paralisia do membro inferior e padrões de comportamento anormais foram utilizados como parâmetro de exclusão. Os animais que apresentaram um ou mais sintomas citados foram excluídos do estudo.

### **3.4 - Drogas**

Todas as drogas utilizadas foram adquiridas da Sigma. A droga utilizada no protocolo de inibição bilateral da IL foi o agonista GABA<sub>A</sub>, muscimol na concentração de 100pmol/100nl, diluído em salina estéril. Para ativação unilateral da IL foi utilizado o NMDA na concentração de 6pmol/100nl, diluído em salina estéril.

### 3.5 - Procedimentos Experimentais

Todos os experimentos realizados em Indianópolis foram feitos em uma sala onde a temperatura era mantida em 24-25°C. No dia anterior aos experimentos os animais eram transferidos para a sala de experimentos e suas caixas colocadas em cima da placa receptora. Este procedimento foi realizado com o objetivo de adaptação ao novo ambiente, uma vez que o deslocamento dos animais induziria estresse, o que poderia produzir alterações nos resultados. Os procedimentos de injeção só foram realizados após a estabilização de todos os parâmetros fisiológicos (temperatura corporal, FC, PAM e atividade locomotora) por pelo menos 15 minutos. As microinjeções foram realizadas através de uma agulha microinjetora (33G, 1mm maior que a cânula guia Plastics one, Roanoke, VA, EUA) conectada a uma seringa Hamilton de 10 µl através de um tubo de TEFLON (DI 0,12 mm, DE 0,65 mm; Bioanalytic Systems, West Lafayette, IN, EUA). A seringa era colocada em uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA) que era utilizada para injetar 100nl de solução em 30 s. A microinjeção era considerada efetiva se, imediatamente após a remoção da microinjetora, o fluxo retornava três segundos após a reativação da bomba, indicando que a injetora não estava ocluída.

Para os experimentos realizados no Brasil foi utilizado Biopac Systems e através do software Acknowledge 3.8 as oscilações de pressão arterial pulsátil (PAP) captadas permitiram calcular a FC e PAM. A cânula inserida na artéria foi acoplada a um transdutor de pressão (strain-Gauge-DT-XX Viggo-spectramed) ligado a um amplificador e a um sistema de conversão analógico-digital para aquisição de dados. As cânulas-injetoras foram confeccionadas a partir de agulhas gengivais 30 G. As

agulhas foram cortadas no tamanho de 17 mm e conectadas a um tubo de polietileno (Norton, 0.010) e a uma seringa Hamilton de 10  $\mu$ L, preenchida com água deionizada. O polietileno foi preenchido com a solução, e entre a água destilada e a substância contida no polietileno formou-se uma pequena bolha. A cânula-injetora foi introduzida na cânula-guia e a solução injetada. Durante a administração das substâncias, o movimento descendente da bolha de ar indicou o sucesso da microinjeção. Após a retirada da cânula-injetora ela foi testada, para verificar alguma obstrução.

### **3.6 - Protocolos Experimentais**

#### **Protocolo 1**

A primeira série de experimentos avaliou o efeito da microinjeção bilateral de veículo (salina 0,9%, 100nl) e muscimol (100pmol/100nl) na IL sobre a resposta cardiovascular, termogênica e atividade locomotora ao estresse. Cada rato foi submetido de maneira randomizada a 4 experimentos diferentes, em dias alternados, com um intervalo de 2 dias: microinjeção bilateral de muscimol (100pmol/100nl) ou salina (100nl) seguido pelo estresse ou permanecendo na caixa sem ser perturbado (controle). Dessa forma foi possível avaliar em um mesmo animal o efeito da microinjeção de muscimol ou salina sobre os parâmetros cardiovasculares, termogênico e atividade locomotora basal e durante a situação de estresse (i.e. salina/controle, muscimol /controle, salina/estresse, controle/estresse). Para essa série de experimentos foram utilizados dois modelos de estresse:

1) *Cage switch* - um modelo leve de estresse emocional, parcialmente modificado da versão campo aberto (*open field stress*) (Long et al., 1990, Johnson Rowsey et al., 2002), onde o animal é simplesmente transferido de sua caixa para uma caixa limpa, representando um novo ambiente (figura 3). O estresse por *cage switch* tinha a duração de 20 minutos. Após este período o animal retornava para sua caixa e os parâmetros cardiovasculares, termogênico e atividade locomotora foram monitorados durante 30 minutos (n=4).

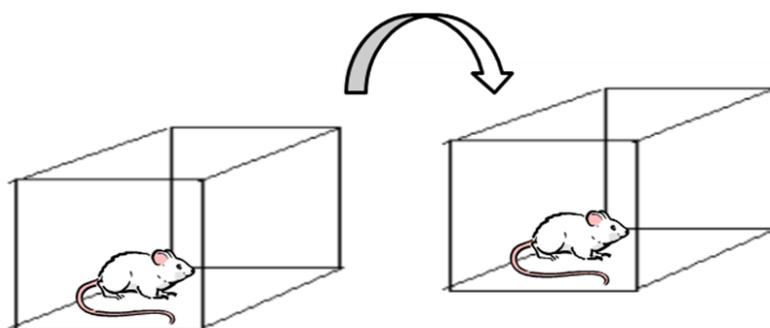


Figura 3: Esquema representativo do paradigma de estresse por *cage switch*. Os parâmetros cardiovasculares, termogênico e atividade locomotora eram mensurados por um sistema de rádio-telemetria.

2) Contenção associado ao barulho do jato de ar - um modelo de estresse médio que envolve os elementos contenção e barulho. Nesse modelo o animal era colocado em um contenedor de acrílico que impedia a mudança de posição durante o período de 20 minutos (figura 4). Após este período o contenedor era aberto, permitindo que o animal ficasse livre dentro da caixa para monitorização dos parâmetros cardiovasculares, termogênico e atividade locomotora durante 30 minutos (n=4).

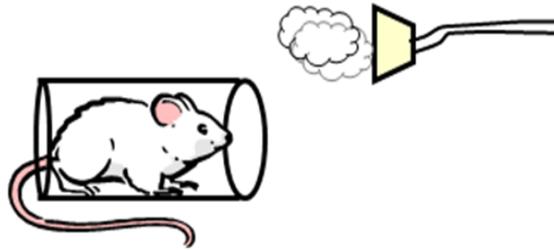


Figura 4: Esquema representativo do paradigma do estresse por contenção associado ao barulho provocado pelo jato de ar. Os parâmetros cardiovasculares, termogênico e atividade locomotora eram mensurados por um sistema de rádio-telemetria.

## Protocolo 2

A segunda etapa de experimentos utilizou o modelo de estresse por jato de ar, considerado um potente modelo de estresse por combinar estressores físicos e emocionais. O estresse por jato de ar consistia inicialmente no posicionamento do rato em um tubo contensor de acrílico. Após a inserção do rato nesse tubo, um jato de ar com fluxo de 10 litros/minuto era direcionado à cabeça do rato durante 10 minutos (figura 5). Após o final deste período, os parâmetros cardiovasculares foram monitorados durante 30 minutos.

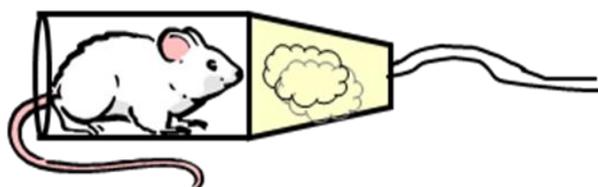


Figura 5: Esquema representativo do paradigma do estresse por jato de ar. Os parâmetros cardiovasculares, termogênico e atividade locomotora eram mensurados por um sistema de biopac.

Inicialmente foi avaliado o efeito da microinjeção bilateral de muscimol (n=6) ou salina (n=6) na região IL sobre a resposta cardiovascular ao estresse por jato de ar, com o objetivo de avaliar a inibição dessa região durante esse modelo de estresse.

Para avaliar o efeito da ativação de receptores NMDA, foi realizada microinjeção unilateral de salina (100nl) ou NMDA (6pmol/100nl) na IL previamente ao estresse por jato de ar. A ativação da região IL foi realizada nos lados direito e esquerdo do mPFC em grupos de animais separados.

### 3.7 - Histologia

No final de cada experimento os animais foram sacrificados com overdose de anestésico (pentobarbital 100mg/100nl) e os sítios de microinjeção foram marcados com o corante *alcian blue* 2% (100nl). Os ratos foram então submetidos à perfusão cardíaca com 60 ml de salina seguida de 60 ml de formaldeído 4%. Os cérebros foram removidos e armazenados em formaldeído 4% durante 12 horas com o objetivo de pós-fixação. Após esse período, os cérebros foram então transferidos para uma solução de sacarose 30% até a saturação. Foram feitos cortes coronais de 50 µm da região IL com o auxílio de um criostato. Os cortes foram colocados em lâminas, secos ao ar livre e corados com vermelho neutro a 1%. Os sítios de microinjeção foram determinados usando como referência o Atlas de Paxinos e Watson (1998).

### 3.8 - Análise Estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para todos os experimentos o nível de significância foi considerado quando  $P < 0.05$ . Os dados dos experimentos realizados no protocolo 1 foram analisados pelo teste  $t$  de Student pareado, enquanto o teste  $t$  de Student não pareado foi utilizado para análise dos dados obtidos no protocolo 2. Diferenças entre três ou mais grupos experimentais foram analisadas através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 - Protocolo 1: Efeito da inibição bilateral da IL sobre os parâmetros cardiovasculares, termogênicos e atividade locomotora basais e durante o estresse por *cage switch* e contenção.

A inibição bilateral da IL-mPFC através da microinjeção de muscimol (100pmol/100nl) não alterou os parâmetros basais cardiovasculares, termogênicos e atividade locomotora quando comparado ao tratamento com salina (100nl) (tabela 1).

Tabela 1: Valores basais de PAM, FC, temperatura e atividade locomotora e alterações produzidas pela microinjeção bilateral de muscimol ou salina na IL-mPFC.

Parâmetro	Microinjeção	Valores Basais	Alterações
PAM (mmHg)	Salina n=4	109 ± 3	7 ± 2
	Muscimol n=4	110 ± 2	0 ± 2
FC (bpm)	Salina n=4	325 ± 10	48 ± 7
	Muscimol n=4	339 ± 7	61 ± 10
Temperatura (°C)	Salina n=4	36.7 ± 0.2	0.2 ± 0.1
	Muscimol n=4	37.2 ± 0.2	-0.1 ± 0.1
Atividade Locomotora (unidades)	Salina n=4	0 ± 0	8 ± 3
	Muscimol n=4	8 ± 3	5 ± 5

Valores são média ± EPM. PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca.

Ao submeter os animais ao estresse por *cage switch*, considerado um modelo leve de estresse, pode-se observar um aumento nos valores de FC, PAM, temperatura corporal e atividade locomotora ( $76 \pm 3$  bpm,  $12 \pm 1$  mmHg,  $0,45 \pm 0,05$  °C,  $14 \pm 2$  unidades). A microinjeção bilateral prévia do agonista gabaérgico, muscimol na IL não foi capaz de alterar a resposta cardiovascular, termogênica e comportamental evocada pelo estresse por *cage switch* ( $63 \pm 5$  bpm,  $13 \pm 1$  mmHg,  $0,47 \pm 0,05$  °C,  $8 \pm 2$  unidades) (figura 6).

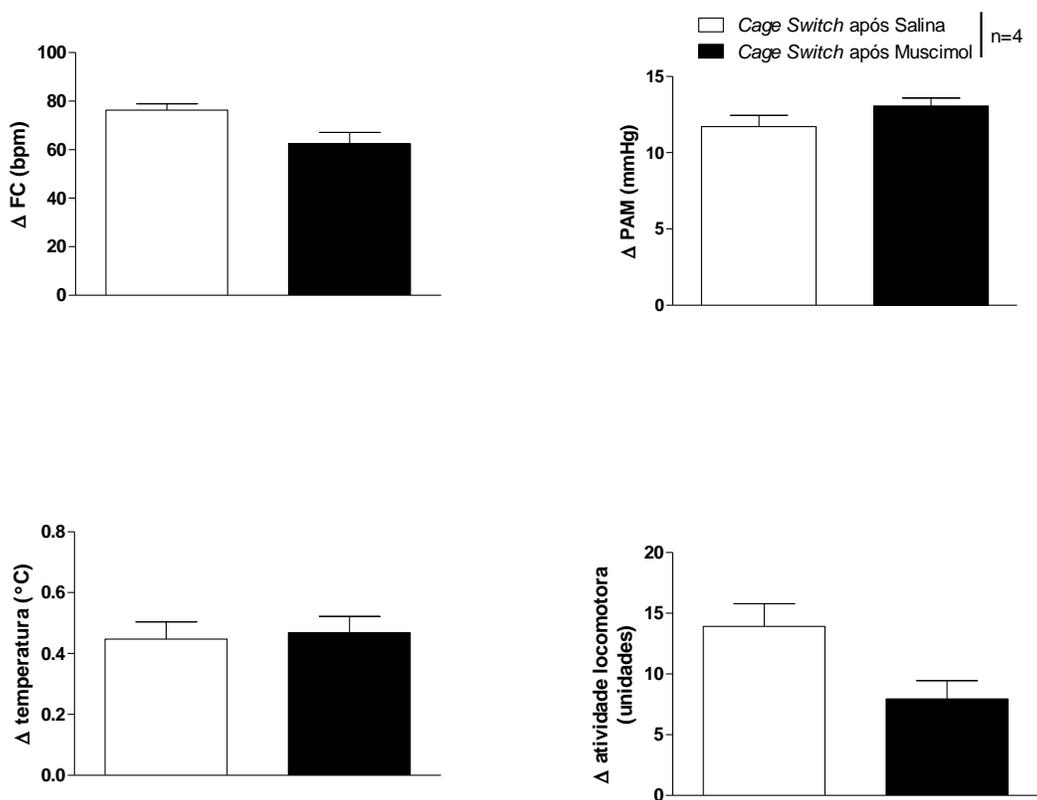


Figura 6: Alterações na FC, PAM, temperatura corporal e atividade locomotora evocadas pelo estresse por *cage switch* após microinjeção bilateral de salina (100nl) ou muscimol (100pmol/100nl) na IL.

A mesma resposta foi observada durante o estresse por contenção associado ao barulho produzido pelo jato de ar (n=4). A inibição prévia da IL não alterou as respostas cardiovasculares e termogênica ( $137 \pm 20$  bpm,  $26 \pm 3$  mmHg,  $0,58 \pm 0,13$  °C) evocadas por esse modelo de estresse quando comparada com o grupo controle ( $136 \pm 13$  bpm,  $23 \pm 4$  mmHg,  $0,63 \pm 0,13$  °C) (figura 7).

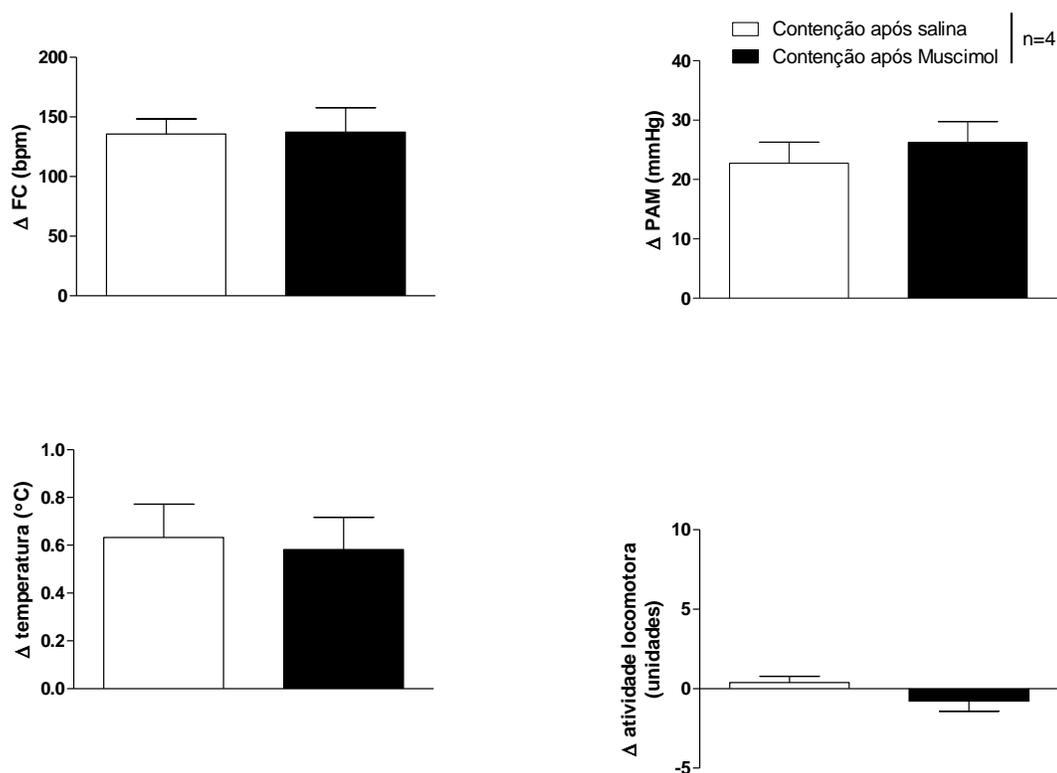


Figura 7: Alterações na FC, PAM, temperatura corporal e atividade locomotora evocadas pelo estresse por contenção associado ao barulho do jato de ar após microinjeção bilateral de salina (100nl) ou muscimol (100pmol/100nl) na IL.

Quando os animais foram submetidos ao mais potente modelo de estresse, a microinjeção prévia de muscimol (n=7) também não alterou a taquicardia ( $118 \pm 18$  bpm) e a resposta pressora ( $15 \pm 3$  mmHg) evocada pelo estresse por jato de ar quando comparado aos animais que receberam salina ( $101 \pm 15$  bpm,  $15 \pm 2$  mmHg) (n=5) (figura 8).

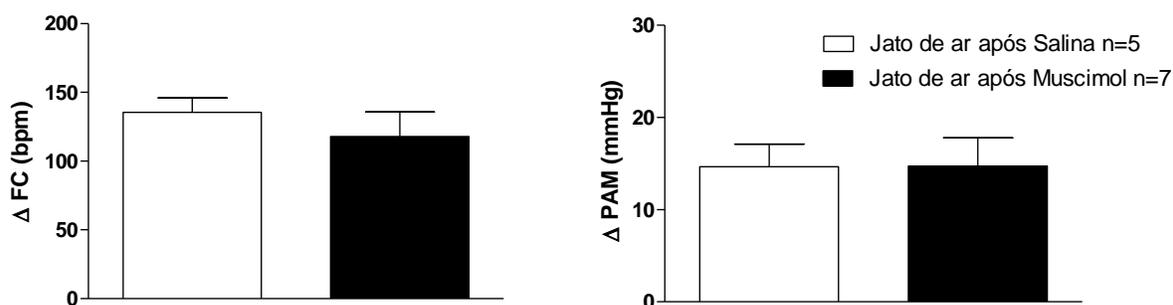


Figura 8: Alterações na FC e PAM provocadas pelo estresse por jato de ar após microinjeção bilateral de salina (100nl) ou muscimol (100pmol/100nl) na IL.

#### 4.1.1 - Protocolo 2: Efeito da estimulação unilateral da IL-mPFC sobre os parâmetros cardiovasculares basais seguido pelo estresse por jato de ar.

A tabela 2 mostra que a estimulação unilateral da região IL utilizando o aminoácido excitatório, NMDA, na dose de 6pmol/100nl reduziu os valores basais de FC sem alterar a PAM quando comparado à microinjeção de salina (100nl) no lado ipsilateral tanto no hemisfério direito quanto no hemisfério esquerdo (figura 9).

Tabela 2: Valores basais de PAM e FC e alterações produzidas pela microinjeção unilateral direita e esquerda de salina ou NMDA na IL

Parâmetro	Microinjeção	Valores Basais	Alterações
<b>PAM (mmHg)</b>	Salina - D (n=5)	111 ± 5	3 ± 2
	NMDA - D(n=5)	106 ± 2	5 ± 2
	Salina - E (n=5)	110 ± 1	4 ± 1
	NMDA - E (n=6)	113 ± 2	2 ± 1
<b>FC (bpm)</b>	Salina - D(n=5)	371 ± 9	22 ± 3
	NMDA - D(n=5)	365 ± 3	-15 ± 8 **
	Salina - E (n=4)	358 ± 15	14 ± 4
	NMDA - E (n=6)	354 ± 12	-5 ± 7 *

Valores são média ± EPM. PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca. \*\*  $P < 0,01$  e

$P < 0,05$  comparado com o efeito produzido pela microinjeção ipsilateral de salina na IL

(teste  $t$  não pareado).

Subsequentemente, ao submeter os animais ao estresse por jato de ar foi observado que a microinjeção prévia de NMDA (6pmol/100nl) tanto no lado direito quanto do lado esquerdo da IL, foi capaz de atenuar a taquicardia evocada pelo estresse sem alterar os valores de PAM (figura 9 e 10). Quando comparada ao efeito obtido no tratamento com salina, a microinjeção de NMDA no lado direito reduziu em 93% a taquicardia induzida pelo jato de ar (salina - D  $144 \pm 14$  bpm vs. NMDA - D  $10 \pm 11$  bpm).e no lado esquerdo reduziu em 87% (salina - E  $129 \pm 11$  bpm vs. NMDA - E  $16 \pm 7$  bpm). No entanto, a resposta pressora não foi alterada pelo tratamento prévio com NMDA tanto no lado direito (salina - D  $14 \pm 3$  mmHg vs. NMDA - D  $12 \pm 1$  mmHg), quanto no lado esquerdo (salina - E  $17 \pm 2$  mmHg vs. NMDA - E  $13 \pm 2$  mmHg).

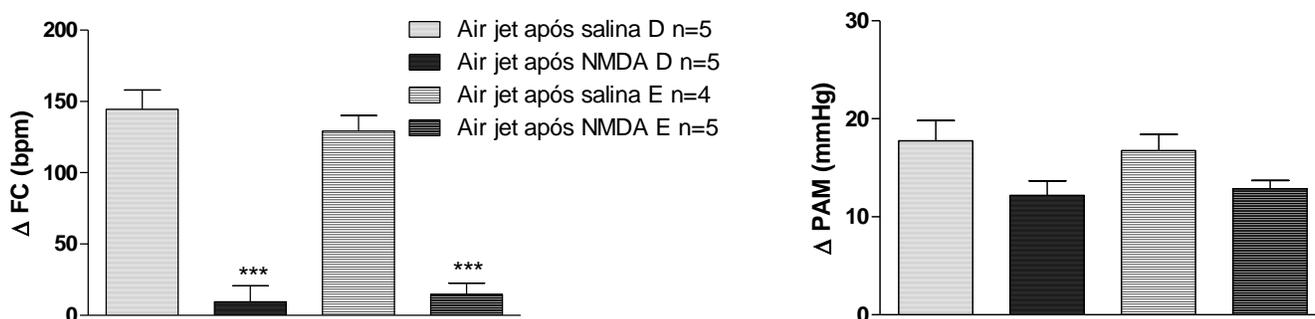


Figura 9: Alterações máximas na FC e PAM provocadas pelo estresse por jato de ar após microinjeção de salina (100nl) ou NMDA (6pmol/100nl) nos lados direito e esquerdo da IL. \*\*\*  $P < 0,0001$  comparado com o efeito produzido pela microinjeção de salina na IL. Medidas repetidas ANOVA, seguida pelo pós teste de Bonferroni.

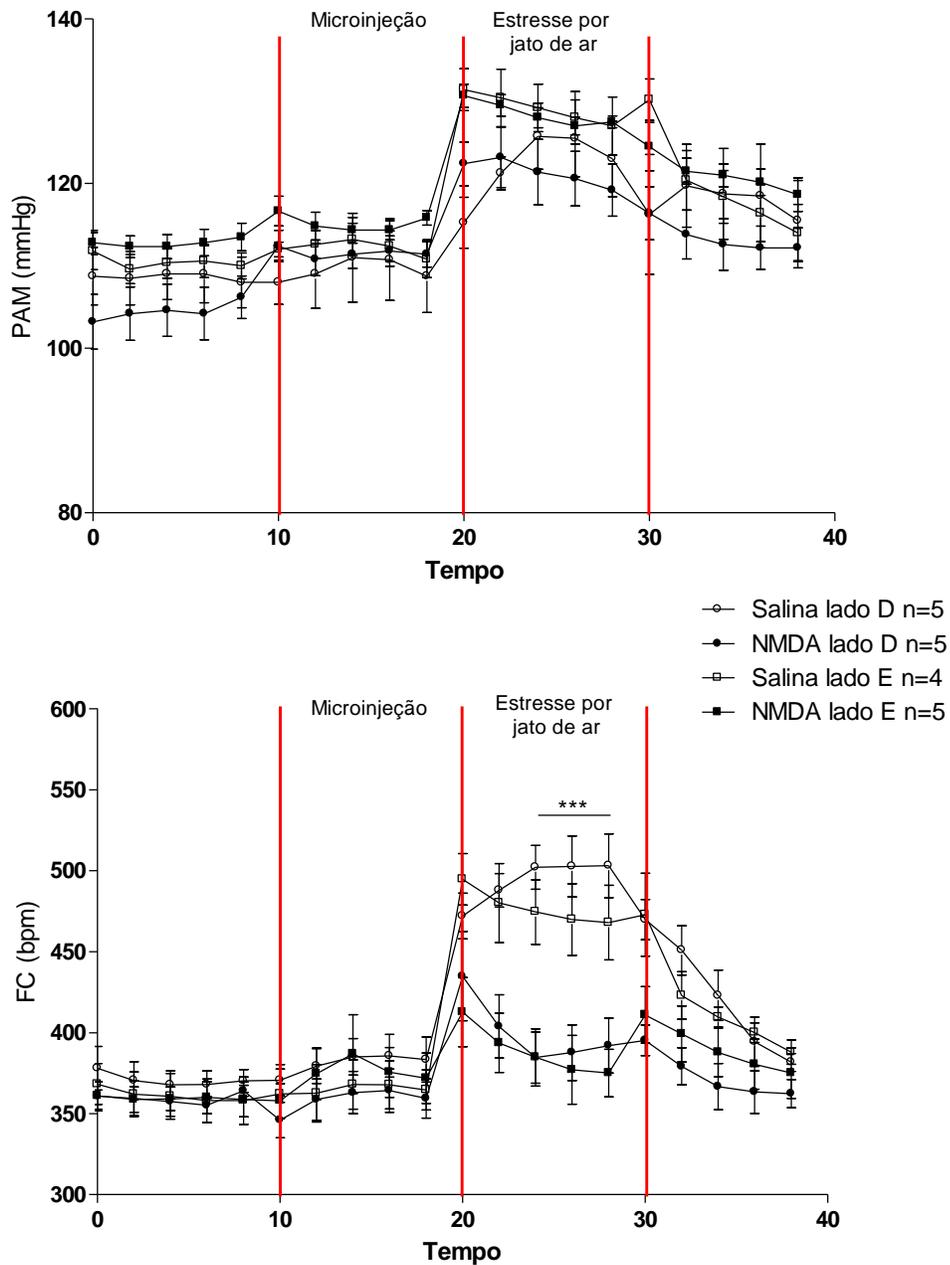


Figura 10: Gráficos representando as alterações cardiovasculares a partir dos valores basais ( $\pm$  EPM) de PAM e FC sobre o tempo (minutos) após a microinjeção de salina (100nl - símbolos abertos) ou NMDA (6 $\mu$ mol/100nl - símbolos fechados) na IL em t=10 min seguidos da realização do estresse por jato de ar em t=20 min em ratos acordados. \*\*\* Diferença significativa entre a resposta ao estresse após a microinjeção de salina comparada com a microinjeção de NMDA na IL-mPFC. Medidas repetidas ANOVA,  $P < 0,001$ .

Em quatro ratos onde o sítio de microinjeção estava localizado fora da região IL, a dose de 6 pmol/100 nl de NMDA não foi capaz de alterar significativamente a resposta taquicárdica evocada pelo estresse por jato de ar (figura 11).

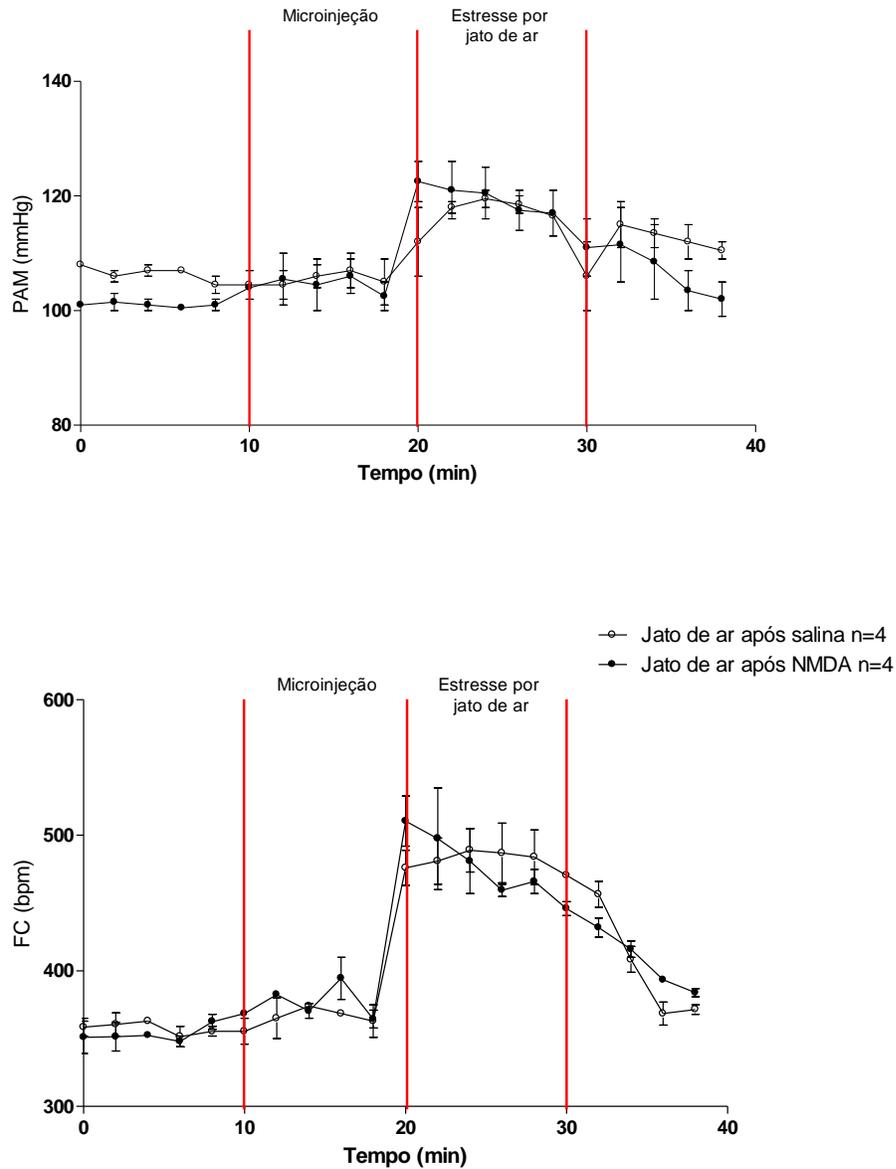


Figura 11: Gráficos representando as alterações cardiovasculares a partir dos valores basais ( $\pm$  EPM) de PAM e FC sobre o tempo (minutos) após a microinjeção de salina (100nl - símbolos abertos) ou NMDA (6pmol/100nl - símbolos fechados) em áreas adjacentes, mas fora da região IL em t=10 min, seguidos da realização do estresse por jato de ar em t=20 min em ratos acordados.

A análise histológica confirmou que todos os sítios de injeção dos experimentos discutidos acima estavam localizados na região IL do mPFC (Paxinos & Watson, 1998). As injeções do mPFC foram restritas à região IL, e aproximadamente 2.52 - 3.72 mm anterior ao bregma. As figuras 12 a 15 representam os mapas com a descrição dos sítios de microinjeção de todos os experimentos incluídos nesta análise. Experimentos em que os sítios de microinjeção encontravam-se fora dos limites da IL não foram incluídos nesta análise. A figura 16 representa uma fotomicrografia de um corte coronal da IL, sendo (A) para microinjeção unilateral e (B) para microinjeção bilateral.

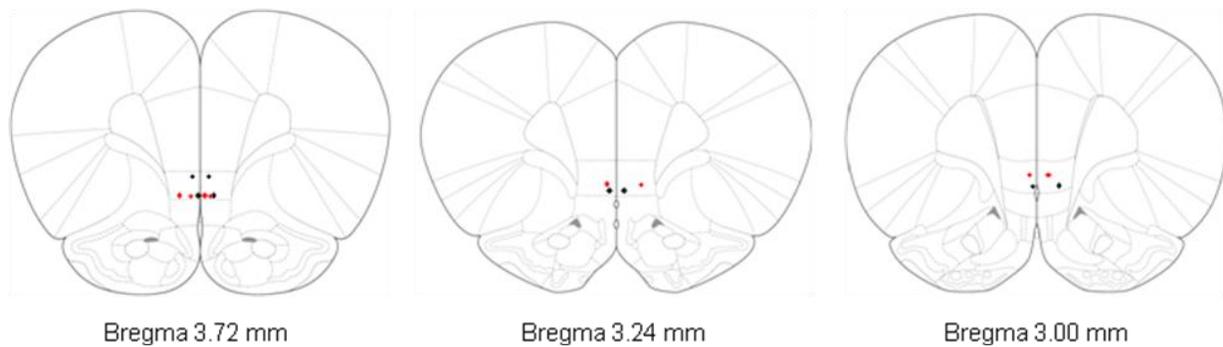


Figura 12: Diagrama esquemático das secções coronais de cérebro de rato ilustrando os sítios de microinjeção na IL. Os números indicam a distância a partir do bregma. Os losangos representam os sítios de microinjeção bilateral de salina (100nl) ou muscimol (100pmol/100nl) relativos aos dados sumarizados nas figuras 6 e 7: losango vermelho, animais submetidos ao estresse por *cage switch*; losango preto, animais submetidos ao estresse de contenção associado ao barulho do jato de ar. Modificado de Paxinos & Watson, 1998.

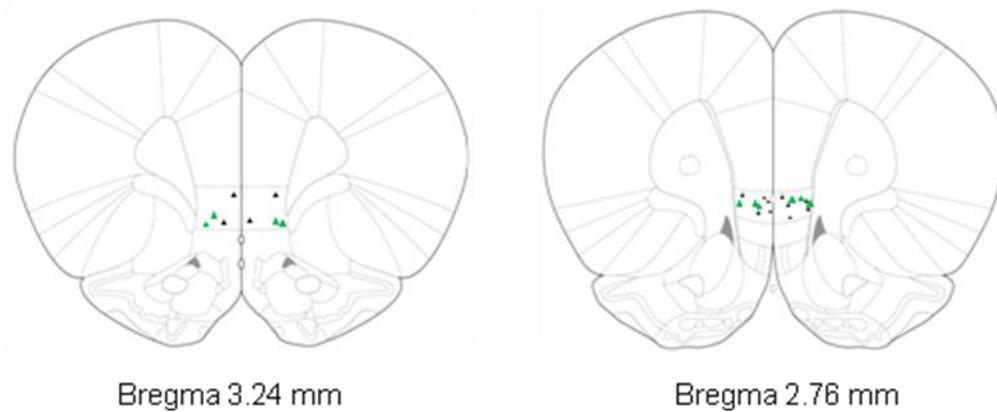


Figura 13: Diagrama esquemático das secções coronais de cérebro de rato ilustrando os sítios de microinjeção na IL. Os números indicam a distância a partir do bregma. Os triângulos representam os sítios de microinjeção bilateral relativos aos dados sumarizados na figura 8: triângulo verde, salina (100nl); triângulo preto, muscimol (100pmol/100nl). Modificado de Paxinos & Watson, 1998.

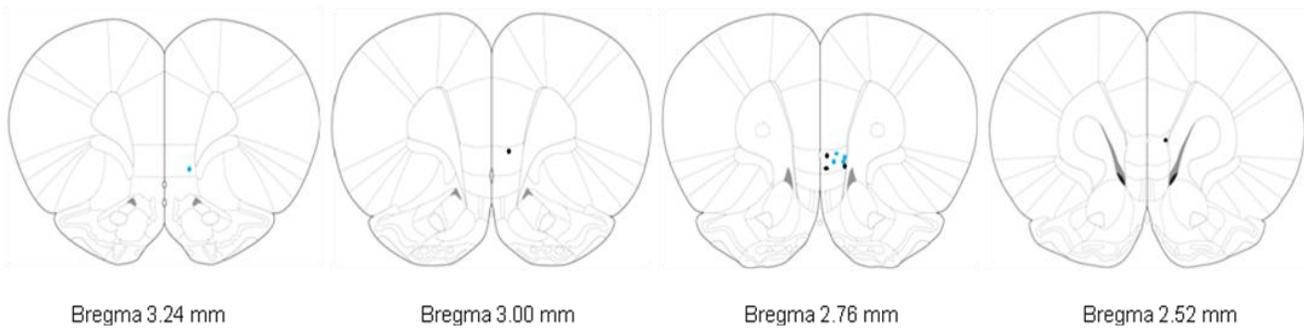


Figura 14: Diagrama esquemático das secções coronais de cérebro de rato ilustrando os sítios de microinjeção na IL. Os números indicam a distância a partir do bregma. Os círculos representam os sítios de microinjeção unilateral direita relativos aos dados sumarizados na figura 9 e 10: círculo azul, salina (100nl); círculo preto, NMDA (6pmol/100nl). Modificado de Paxinos & Watson, 1998.

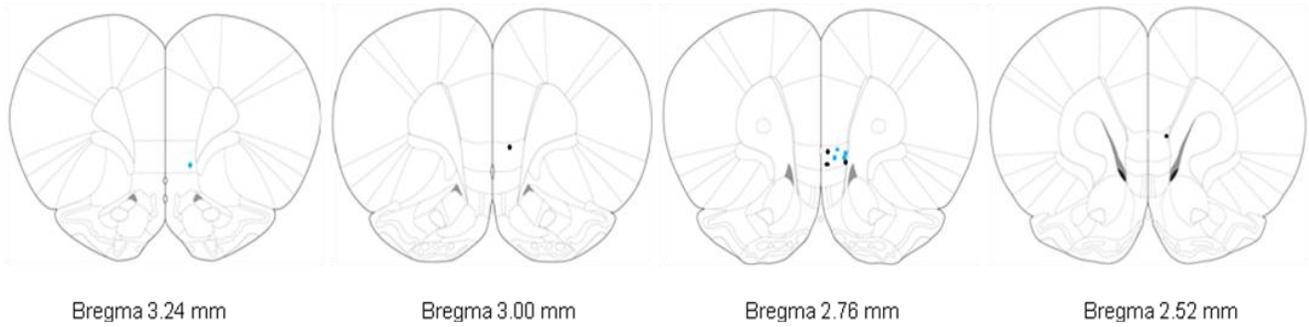


Figura 15: Diagrama esquemático das secções coronais de cérebro de rato ilustrando os sítios de microinjeção na IL. Os números indicam a distância a partir do bregma. Os círculos representam os sítios de microinjeção unilateral esquerda relativos aos dados sumarizados na figura 9 e 10: círculo azul, salina (100nl); círculo preto, NMDA (6pmol/100nl). Modificado de Paxinos & Watson, 1998.

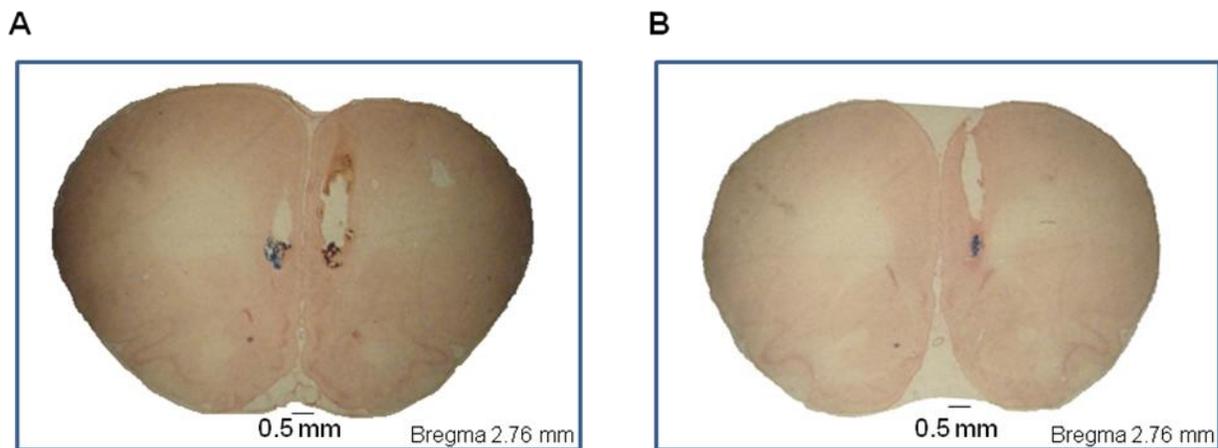


Figura 16: Fotomicrografia de um corte coronal (50  $\mu$ m) ao nível do mPFC para verificação histológica do sítio de microinjeção na região IL; (A) microinjeção bilateral e (B) microinjeção unilateral.

## DISCUSSÃO

Os principais resultados deste estudo sugerem que a inibição da região IL não interferiu na resposta cardiovascular, termogênica e atividade locomotora nos diferentes paradigmas de estresse avaliados. Entretanto, a ativação de receptores NMDA nessa região atenuou de maneira importante a resposta cardiovascular ao estresse por jato de ar, sugerindo uma possível participação modulatória desta região sobre a resposta cardiovascular ao estresse emocional. A seguir, iremos abordar primeiramente alguns aspectos metodológicos que serão sucedidos pela discussão mais detalhada dos resultados funcionais observados no presente estudo.

A participação do mPFC na modulação do sistema nervoso autonômico tem sido demonstrada em diversos estudos funcionais (Burns and Wyss, 1985, Fryszak and Neafsey, 1994, Verberne and Owens, 1998). Fryszak e Neafsey (1994) demonstraram que a lesão por aspiração da região dorsal do mPFC resultou em potenciação da taquicardia provocada pelo estresse por *cage switch*, enquanto a lesão por aspiração e a lesão química envolvendo as regiões dorsal e ventral do mPFC promoveu bradicardia durante o mesmo modelo de estresse (Fryszak and Neafsey, 1994). Sabendo-se que o mPFC possui várias conexões com estruturas corticais e subcorticais (Sesack et al., 1989, Conde et al., 1995, Vertes, 2004), muitas fibras de passagem podem ter sido destruídas durante as lesões por aspiração, transecção e eletrolítica. Além disso, as técnicas de lesão por aspiração ou eletrolíticas podem não ser apropriadas para o estudo da função do mPFC, uma vez que não deixa claro quando os efeitos da lesão são decorrentes da destruição dos neurônios do mPFC ou devido a perda de fibras de passagem.

A porção ventral do mPFC (vMPFC) é subdividida em 3 regiões: PL, IL e córtex peduncular dorsal. Evidências neuroanatômicas demonstraram que as regiões do vMPFC projetam-se de maneira diferente ao longo do encéfalo, sugerindo funções independentes e distintas entre essas estruturas (Floyd et al., 2001, Vertes, 2004). Apesar destas evidências anatômicas, a grande maioria dos estudos funcionais não limitam as microinjeções e/ou lesões a somente uma subdivisão do vMPFC, desconsiderando possíveis ações opostas entre essas regiões. Resstel e Correa (2005) mostraram que a microinjeção de L-glutamato em diferentes doses no vMPFC causou uma resposta taquicárdica e pressora dose-dependente em animais acordados. Apesar dos autores afirmarem que a microinjeção de L-glutamato nas 3 subdivisões do vMPFC (PL, IL e córtex peduncular dorsal) evocaram a mesma resposta cardiovascular, é possível que um volume relativamente alto (200 nl) possa ter difundido para regiões próximas ou até mesmo destacado a ação de uma única região do vMPFC (Resstel and Correa, 2005). Além do alto volume microinjetado, também foram utilizadas altas doses de L-glutamato (9, 27, 81, 150 e 300 nmol/200nl) o que poderia exercer um efeito excitotóxico local. Verbene (1996) observou uma resposta depressora após microinjeção de L-glutamato em animais anestesiados utilizando dose e volume menores (10nmol/100nl) aos utilizados no estudo supracitado (Verberne, 1996). Recentemente foi demonstrado uma ação completamente oposta entre a região PL e IL durante a resposta cardiovascular ao estresse por contenção (Tavares et al., 2009). A taquicardia evocada pelo estresse foi potenciada após a inibição da PL e atenuada após a inibição da neurotransmissão da região IL. No presente estudo nós

utilizamos uma melhor resolução das microinjeções, na tentativa de elucidar a verdadeira função da região IL sobre a resposta cardiovascular ao estresse emocional.

Visando minimizar o efeito de espalhamento da droga para regiões adjacentes, utilizamos um volume de microinjeção reduzido (100nl). Estudos anteriores utilizaram volumes relativamente mais altos (200 a 500nl) para verificar o efeito da inibição e/ou estimulação desta região sobre a resposta cardiovascular ao estresse, o que poderia aumentar a chance de difusão da droga para regiões adjacentes a avaliada, causando um efeito inespecífico (al Maskati and Zbrozyna, 1989, Fryszak and Neafsey, 1994, McDougall et al., 2004, Resstel and Correa, 2005, Tavares and Correa, 2006, Tavares et al., 2009). Fisk e Wiss (1997) avaliaram a extensão atingida por volumes de 50, 100 e 200 nl de ácido D-L homocisteico microinjetado no mPFC correlacionando a microinjeção com as respostas cardiovasculares encontradas. Foi observado que a efetividade da estimulação química era dependente da localização e extensão alcançada pela microinjeção, ou seja, injeções com volumes maiores evocaram maiores alterações nos valores de FC e PAM (Fisk and Wyss, 1997).

Tavares e colaboradores (2009) demonstraram que a inibição da região PL com  $\text{CoCl}_2$  potencia a resposta taquicárdica provocada pelo estresse por contenção (Tavares et al., 2009). Uma vez que a região IL encontra-se ventralmente à PL-mPFC, poderia ser questionado sobre uma possível interferência de lesão mecânica da região PL consequente ao implante da cânula guia na região IL sobre as respostas funcionais obtidas no presente estudo. No entanto essa possibilidade é descartada pelo fato de não termos observado nenhuma potenciação dos parâmetros cardiovasculares,

termogênicos e comportamentais evocados durante os diferentes modelos de estresse emocional nos experimentos utilizando muscimol.

No presente estudo optamos por avaliar a participação da região IL em três paradigmas de estresse: 1)- *Cage switch*, considerado um modelo de estresse leve por envolver aspectos ambientais e psicológicos, 2)- estresse por contenção associado ao barulho produzido pelo jato de ar, uma mistura de estressores físicos e psicológicos e 3)- estresse por jato de ar, um modelo de estresse complexo que inclui elementos de contenção, frio e barulho, produzindo alterações cardiovasculares características da reação de defesa (Soltis and DiMicco, 1992). Como observado em nossos resultados, existe uma diferença com relação a magnitude da resposta cardiovascular evocada pelos diferentes paradigmas de estresse. Pacák e Palkovits (2001) demonstraram a existência de vias centrais específicas para diferentes paradigmas de estresse. Segundo os autores, essas vias participam de maneira distinta na regulação do fluxo simpatoneural e adrenomedular assim como da atividade do eixo HPA. Dessa forma, a representação neural do estresse e seus sintomas não podem ser descritos como causa da disfunção de apenas uma região do encéfalo ou neurotransmissor (Pacak and Palkovits, 2001). Preferivelmente, a representação neural do estresse reflete a participação de vários circuitos que agem para evocar um conjunto de respostas autonômicas e neuroendócrinas. Como utilizamos três modelos de estresse, não se pode afirmar que a ausência de efeitos após a microinjeção de muscimol seja pela utilização um modelo específico de estresse.

Em confirmação a um estudo prévio (McDougall et al., 2004), mas utilizando um volume reduzido, observamos no presente estudo que inibição bilateral da região IL

com o agonista de receptor GABA<sub>A</sub> muscimol - que tem capacidade de inibir virtualmente todos os neurônios do sistema nervoso central (Brown et al., 1981) - não alterou os parâmetros cardiovasculares, termogênico ou atividade locomotora basais de ratos acordados. Esse achado é consistente com estudos de lesões, nos quais a destruição do mPFC não causou efeito sobre os valores basais de frequência cardíaca e pressão arterial de animais acordados (Verberne et al., 1987, Frysztak and Neafsey, 1994).

É importante ressaltar que nossos resultados após inibição da região IL fornecem a primeira evidência de que essa região não participa da modulação de temperatura corporal basal. O mesmo foi observado durante dois modelos de estresse (*cage switch* e contenção) em que avaliamos as alterações de temperatura. De fato, é possível sugerir que a região IL não está envolvida na modulação da temperatura corporal. Diversos estudos demonstraram que os centros controladores de temperatura estão localizados em estruturas subcorticais, tais como área pré-óptica (POA) (Hori et al., 1988, Boulant, 2000), rafe pallidus (Bamshad et al., 1999, Cano et al., 2003), PAG (de Menezes et al., 2006, 2009) e DMH (DiMicco et al., 2002, Zaretskaia et al., 2002, Zaretskaia et al., 2003).

No presente estudo observamos que a inibição bilateral prévia dessa região também não alterou as respostas cardiovascular, termogênica e atividade locomotora ao estresse por *cage switch* e contenção e a resposta cardiovascular ao estresse por jato de ar. Da mesma forma, McDougall e colaboradores (2004) mostraram que a microinjeção prévia de muscimol no mPFC não alterou a resposta pressora e taquicárdica evocada pelo estresse de contenção, mas aumentou a expressão de fos

no DMH, amígdala e NTS(McDougall et al., 2004). Esses dados neuroanatômicos funcionais são consistentes com a hipótese de uma projeção eferente inibitória a partir do mPFC como um mediador na regulação psicológica, visto que a inibição do mPFC resultou em uma desinibição dos neurônios sensíveis ao estresse no hipotálamo e amígdala. Uma possível explicação para falha do nosso estudo e para o estudo de McDougall e colaboradores em demonstrar uma potenciação da resposta cardiovascular ao estresse de contenção e ao estresse por jato de ar após a injeção de muscimol seria o fato desses modelos de estresse evocarem uma resposta cardiovascular máxima ou próxima da máxima e então nenhuma potenciação poderia ser observada. No entanto essa hipótese pode ser descartada a partir dos resultados obtidos em nosso trabalho realizando o estresse por *cage switch*. Nesse modelo de estresse, os animais apresentam uma resposta cardiovascular e termogênica leve, sendo possível observar uma potenciação da resposta ao estresse. De maneira contrária, Shah e colaboradores (2004) demonstraram que a infusão bilateral do agonista GABA<sub>A</sub> muscimol no mPFC atenua a resposta ao medo no modelo de labirinto em cruz elevada e no *shock-probe burying paradigm*. Esses resultados sugerem que a ativação de receptores GABA<sub>A</sub> no mPFC atenua o comportamento de medo, induzindo um efeito ansiolítico (Shah et al., 2004). Adicionalmente, um estudo realizando lesão excitotóxica com ácido ibotênico demonstrou que a lesão do mPFC atenua o comportamento relacionado ao medo e ansiedade (Shah and Treit, 2003). No presente estudo observamos que após a microinjeção de muscimol na região IL, houve uma tendência de redução da atividade locomotora durante o estresse por cage switch, mostrando um possível efeito ansiolítico após a inibição da região IL. Uma possível

explicação para não termos observado tal efeito, seria o alto volume injetado no estudo supracitado (0,5 µl/min), causando um efeito inespecífico sobre outras regiões. Além disso, como mencionado anteriormente, é possível que as respostas evocadas por diferentes modelos de estresse sejam mediadas por vias neuronais diferentes.

Como não observamos nenhum efeito modulatório após a inibição da região IL sobre a resposta cardiovascular e termogênica nos 3 modelos de estresse utilizados, resolvemos então avaliar o efeito da estimulação de receptores do tipo NMDA na resposta cardiovascular ao estresse por jato de ar. Estudos anteriores identificaram a presença de terminações glutamatérgicas e receptores ionotrópicos no vMPFC de ratos (Gigg et al., 1994, Nicolle and Baxter, 2003). Resstel e Correa (2006) demonstraram que as respostas cardiovasculares evocadas pela microinjeção de L-glutamato no vMPFC são mediadas por receptores locais do tipo NMDA (Resstel and Correa, 2006).

No presente estudo foi observado que a estimulação unilateral da região IL através do aminoácido excitatório, NMDA, reduziu os valores basais de frequência cardíaca sem alterar a PAM, sugerindo uma provável participação inibitória sobre neurônios motores simpáticos envolvidos na eferência cardíaca. A concentração de NMDA utilizada em nosso estudo (6pmol/100nl) foi escolhida baseada em estudos prévios onde a menor concentração de NMDA microinjetada na substância cinzenta periaquedutal lateral (l/dIPAG) produziu alterações cardiovasculares e termogênicas (da Silva et al., 2003, de Menezes et al., 2009). Nesse sentido, os resultados deste estudo utilizando muscimol, em conjunto com estudos anteriores realizando lesão (Fryszak and Neafsey, 1994) ou inibição do mPFC com  $\text{CoCl}_2$  (Tavares et al., 2009) (Tavares and Correa, 2006) reforçam a idéia de que o mPFC não exerce uma ação

tônica sobre a atividade cardíaca, mas quando ativado pode modular o sistema cardiovascular.

O presente estudo ainda mostrou que a estimulação unilateral da região IL com NMDA reduziu a taquicardia evocada pelo estresse por jato de ar sem alterar o componente pressor. Amat e colaboradores (2005) observaram que a inibição da região IL com o agonista GABA<sub>A</sub>, muscimol, durante uma situação de estresse controlável bloqueou completamente o efeito da controlabilidade ao estresse, demonstrando a participação dessa estrutura em processos cognitivos e emocionais (Amat et al., 2005). Adicionalmente, um estudo neuroanatômico utilizando traçador neuronal anterógrado demonstrou que a região IL, diferentemente da PL, envia projeções densas para o DMH (Vertes, 2004). As vias descendentes responsáveis por mediar alguns efeitos fisiológicos evocados pelo DMH têm sido em parte esclarecidas (Fontes et al., 2001, Samuels et al., 2002), entretanto, nada se sabe sobre as regiões corticais que podem modular a atividade dos neurônios do DMH.

O papel crítico do DMH na resposta cardiovascular ao estresse emocional foi levantado após experimentos que demonstraram que a microinjeção de muscimol no DMH reduz de maneira importante a resposta taquicárdica e pressora em ratos submetidos ao estresse por jato de ar (Stotz-Potter et al., 1996a, Stotz-Potter et al., 1996b) além de produzir um efeito ansiolítico (Shekhar et al., 1990). Por outro lado, a ativação do DMH através da microinjeção do antagonista GABA<sub>A</sub> (BMI) ou de aminoácidos excitatórios (EAA) (Soltis and DiMicco, 1991) resulta em um aumento significativo de frequência cardíaca devido ao aumento da atividade simpática do nervo cardíaco, aumento de atividade simpática para o nervo renal (RSNA) e elevação da

PAM (Cao et al., 2004). Fontes e colaboradores (2001) mostraram que as elevações de PA e RSNA produzidas pela ativação/desinibição do DMH, apresentavam-se atenuadas mediante inibição do bulbo ventrolateral rostral (RVLM). Enquanto a taquicardia observada após a ativação do DMH parece ser mediada por uma via independente dos neurônios da RVLM (Fontes et al., 2001). Como demonstrado por Samuels e colaboradores (2002), a taquicardia evocada pela ativação do DMH, é dependente de neurônios da RP (Samuels et al., 2002, Cao et al., 2004). Dessa forma, é possível hipotetizar uma possível participação da IL como moduladora do tônus inibitório gabaérgico sobre o DMH durante a resposta taquicárdica ao estresse por jato de ar (figura17).

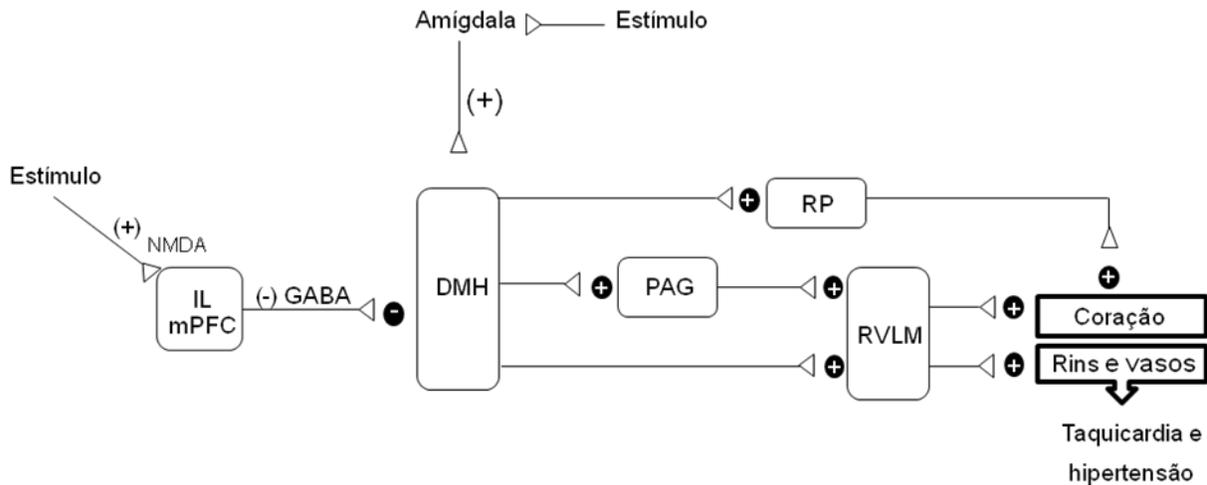


Figura 17: Esquema representando uma possível via neural envolvida nas alterações cardiovasculares que ocorrem durante a ativação dos neurônios da região IL. IL, região infralímbica; mPFC córtex pré-frontal medial; DMH, hipotálamo dorsomedial, PAG, substância cinzenta periaquedutal, RP, rafe pallidus, RVLM, bulbo rostral ventrolateral.

É importante ressaltar que não descartamos o envolvimento de outras estruturas subcorticais na integração da resposta cardiovascular ao estresse emocional. Além do DMH, Vertes (2004) demonstrou projeções diretas da região IL para outros núcleos envolvidos na organização central da resposta ao estresse emocional, tais como a amígdala e NTS (Vertes, 2004). Fisk e Wiss (2000) utilizando técnicas anatômicas e funcionais demonstraram que a região IL tem projeções densas e extensivas para o núcleo central da amígdala, núcleo mediodorsal do tálamo, LHA, PAG, núcleo parabraquial e NTS, estruturas envolvidas no controle do sistema nervoso autônomo. Os achados funcionais deste estudo reforçam a idéia de que a modulação do sistema cardiovascular pela região IL pode ser mediada por estruturas subcorticais, visto que a inibição da PAG e LHA atenuaram a resposta hipotensora evocada pela estimulação

elétrica da região IL (Fisk and Wyss, 2000). Vale ressaltar que a PAG é relé das vias centrais do DMH (da Silva et al., 2003, de Menezes et al., 2006). Adicionalmente, Owens e colaboradores (1999) demonstraram que a inibição do NTS através da microinjeção de muscimol atenuou os efeitos evocados pela estimulação elétrica da região IL, sugerindo outra importante via neural pela qual a região IL influencia o sistema nervoso autônomo (Owens et al., 1999). Estudos fisiológicos ainda mostraram que a estimulação da região IL afeta a atividade de neurônios presentes no NTS, aumentando a expressão do marcador neuronal c-fos (Owens and Verberne, 1996, Owens et al., 1999), enquanto a inibição dessa região resulta em um aumento na expressão de c-fos na amígdala medial, DMH e NTS de animais submetidos ao estresse de contenção (McDougall et al., 2004). Dessa forma, é possível que a região IL altere a atividade do sistema nervoso autônomo por meio de vias polisinápticas.

Um estudo recente comparando a função da região IL e PL na modulação da resposta cardiovascular ao estresse por contenção mostrou dados funcionais completamente contrários ao nosso estudo. No presente estudo observamos que a ativação da região IL com NMDA atenuou a resposta taquicárdica ao estresse por jato de ar, enquanto Tavares e colaboradores (2009) demonstraram que a resposta taquicárdica ao estresse por contenção foi atenuada após a inibição da neurotransmissão da região IL com  $\text{CoCl}_2$  (Tavares et al., 2009), sugerindo um papel tônico excitatório desta região no controle da resposta cardiovascular ao estresse. É importante notar que não observamos em nosso estudo nenhuma alteração da resposta cardiovascular ao estresse após inibição da região IL com muscimol. De maneira intrigante, somente o grupo de Tavares observou alterações na resposta

cardiovascular ao estresse emocional após a inibição com cloreto de cobalto das regiões PL e IL. Adicionalmente, dados não mostrados neste trabalho utilizando bicuculina methiodide, demonstraram que a microinjeção prévia desse fármaco na região IL não alterou os efeitos cardiovasculares, termogênicos e atividade locomotora dos animais submetidos ao estresse por *cage switch*, reforçando a idéia de que essa região não exerce uma modulação tônica sobre essas variáveis durante o estresse emocional. McDougall e colaboradores (2004), assim como nós, não observaram alterações nessas respostas após inibição da região IL com muscimol. Apesar dessas drogas apresentarem mecanismos de ação diferentes, sendo o muscimol um agonista de receptor GABA<sub>A</sub> e o cloreto de cobalto um bloqueador sináptico não específico, espera-se que, funcionalmente, os efeitos evocados após a microinjeção de ambas as droga sejam parecidos. Como mencionado anteriormente, uma possível justificativa para esses resultados opostos seria o fato de Tavares e colaboradores utilizarem um volume relativamente alto (200nl) para avaliar o efeito da inibição de regiões tão próximas uma a outra, podendo gerar dúvidas quanto a verdadeira função de cada subdivisão do mPFC.

Em humanos, o hemisfério direito é descrito como dominante para geração de respostas fisiológicas ao estresse (Henry, 1997, Wittling, 1997), tendo uma função preferencial durante o processamento emocional (Gainotti, 1983, Robinson et al., 1984). Diversos estudos em ratos demonstraram assimetrias hemisféricas funcionais no mPFC, particularmente durante situações estressoras e altamente emocionais (Carlson et al., 1991, Sullivan and Szechtman, 1995). Sullivan e Gratton (1999) observaram que lesões do mPFC direito reduziu os níveis de corticosterona plasmática

em resposta ao estresse de contenção assim como lesões bilaterais, enquanto a lesão do lado esquerdo não alterou esses níveis. De forma contrária, somente a lesão do lado esquerdo foi capaz de aumentar a defecação induzida por esse modelo de estresse (Sullivan and Gratton, 1999). Esses resultados sugerem que o mPFC esquerdo é especializado em gerar estratégias de adaptação durante um modelo de estresse médio ou na fase inicial do estresse, enquanto os mecanismos do mPFC direito predominam em situações de estresse prolongado ou incontrolável. No presente estudo, não observamos nenhuma diferença significativa ao compararmos a magnitude das respostas cardiovasculares durante o estresse por jato de ar evocadas após ativação da região IL direita e esquerda. A microinjeção prévia de NMDA tanto no hemisfério direito quanto no esquerdo atenuou de maneira similar a taquicardia provocada pelo estresse por jato de ar. Uma possível justificativa para não termos observado nenhuma predominância hemisférica poderia ser pelo fato da região IL estar localizada adjacente a parede medial do lobo frontal, sem nenhuma divisão entre um hemisfério e outro. Dessa forma, é possível que a droga possa ter difundido de um lado para o outro lado, havendo predominância de apenas um hemisfério.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo descarta o papel tônico da região IL na manutenção dos parâmetros cardiovasculares, termogênicos e comportamentais basais. Adicionalmente, a integridade da região IL parece não ser essencial na geração de resposta cardiovascular, termogênica e comportamental ao estresse emocional. Por outro lado, nossos resultados sugerem que receptores do tipo NMDA presentes na região IL, quando ativados, podem modular de maneira importante a resposta taquicárdica ao estresse por jato de ar.

De acordo com estudos anatômicos prévios (Vertes, 2004), mostrando que a região IL envia densa projeção para o DMH e de acordo com os resultados do presente estudo, demonstrando que a ativação da região IL atenua somente a resposta taquicárdica induzida pelo estresse, pode-se sugerir que a região IL emite projeção inibitória para o DMH, que é um núcleo crítico envolvido principalmente na taquicardia induzida pelo estresse emocional. No entanto, a confirmação funcional dessa via precisa ser investigada no futuro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

al Maskati HA, Zbrozyna AW (Stimulation in prefrontal cortex area inhibits cardiovascular and motor components of the defence reaction in rats. *J Auton Nerv Syst* 28:117-125.1989).

Amat J, Baratta MV, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF (Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci* 8:365-371.2005).

Armony JL, Servan-Schreiber D, Cohen JD, LeDoux JE (An anatomically constrained neural network model of fear conditioning. *Behav Neurosci* 109:246-257.1995).

Bacon SJ, Smith AD (A monosynaptic pathway from an identified vasomotor centre in the medial prefrontal cortex to an autonomic area in the thoracic spinal cord. *Neuroscience* 54:719-728.1993).

Bailey TW, Dimicco JA (Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R8-15.2001).

Bamshad M, Song CK, Bartness TJ (CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol* 276:R1569-1578.1999).

Barron BA, Van Loon GR (Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. *J Auton Nerv Syst* 28:179-187.1989).

Bechara A, Tranel D, Damasio H (Characterization of the decision-making deficit of patients with ventromedial prefrontal cortex lesions. *Brain* 123 ( Pt 11):2189-2202.2000).

Beck CH, Fibiger HC (Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. *J Neurosci* 15:709-720.1995).

Berendse HW, Groenewegen HJ (Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Neuroscience* 42:73-102.1991).

Boulant JA (Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis* 31 Suppl 5:S157-161.2000).

Broersen LM (Attentional processes and learning and memory in rats: the prefrontal cortex and hippocampus compared. *Prog Brain Res* 126:79-94.2000).

Brown DA, Higgins AJ, Marsh S, Smart TG (Actions of GABA on mammalian neurones, axons, and nerve terminals. *Adv Biochem Psychopharmacol* 29:321-326.1981).

Buijs RM, Van Eden CG (The integration of stress by the hypothalamus, amygdala and prefrontal cortex: balance between the autonomic nervous system and the neuroendocrine system. *Prog Brain Res* 126:117-132.2000).

Burns SM, Wyss JM (The involvement of the anterior cingulate cortex in blood pressure control. *Brain Res* 340:71-77.1985).

Cannon WB (1929) Bodily changes in pain, hunger, fear and rage; an account of recent researches into the function of emotional excitement. New York, London,: D. Appleton and Company.

Cannon WB (The James-Lange theory of emotions: a critical examination and an alternative theory. By Walter B. Cannon, 1927. *Am J Psychol* 100:567-586.1987).

Cano G, Passerin AM, Schiltz JC, Card JP, Morrison SF, Sved AF (Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *J Comp Neurol* 460:303-326.2003).

Cao WH, Fan W, Morrison SF (Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience* 126:229-240.2004).

Carlson JN, Fitzgerald LW, Keller RW, Jr., Glick SD (Side and region dependent changes in dopamine activation with various durations of restraint stress. *Brain Res* 550:313-318.1991).

Carrive P (The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 58:27-47.1993).

Carrive P, Bandler R, Dampney RA (Anatomical evidence that hypertension associated with the defence reaction in the cat is mediated by a direct projection from a restricted portion of the midbrain periaqueductal grey to the subretrofacial nucleus of the medulla. *Brain Res* 460:339-345.1988).

Conde F, Maire-Lepoivre E, Audinat E, Crepel F (Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *J Comp Neurol* 352:567-593.1995).

Crippa GE, Peres-Polon VL, Kuboyama RH, Correa FM (Cardiovascular response to the injection of acetylcholine into the anterior cingulate region of the medial prefrontal cortex of unanesthetized rats. *Cereb Cortex* 9:362-365.1999).

Critchley HD, Taggart P, Sutton PM, Holdright DR, Batchvarov V, Hnatkova K, Malik M, Dolan RJ (Mental stress and sudden cardiac death: asymmetric midbrain activity as a linking mechanism. *Brain* 128:75-85.2005).

Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64:477-505.1995).

da Silva LG, de Menezes RC, dos Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA (Role of periaqueductal gray on the cardiovascular response evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 984:206-214.2003).

Damasio AR (Descartes' error and the future of human life. *Sci Am* 271:144.1994).

Damasio AR, Tranel D, Damasio H (Individuals with sociopathic behavior caused by frontal damage fail to respond autonomically to social stimuli. *Behav Brain Res* 41:81-94.1990).

Damasio H, Grabowski T, Frank R, Galaburda AM, Damasio AR (The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science* 264:1102-1105.1994).

Davies SJ, Ghahramani P, Jackson PR, Noble TW, Hardy PG, Hippisley-Cox J, Yeo WW, Ramsay LE (Association of panic disorder and panic attacks with hypertension. *Am J Med* 107:310-316.1999).

de Menezes RC, Zaretsky DV, Fontes MA, DiMicco JA (Microinjection of muscimol into caudal periaqueductal gray lowers body temperature and attenuates increases in temperature and activity evoked from the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 1092:129-137.2006).

de Menezes RC, Zaretsky DV, Fontes MA, DiMicco JA (Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. *J Physiol* 587:1201-1215.2009).

de Menezes RC, Zaretsky DV, Sarkar S, Fontes MA, Dimicco JA (Microinjection of muscimol into the periaqueductal gray suppresses cardiovascular and neuroendocrine response to air jet stress in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R881-890.2008).

Delgado JM (Circulatory effects of cortical stimulation. *Physiol Rev Suppl* 4:146-178.1960).

DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV (The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav* 71:469-480.2002).

DiMicco JA, Stotz-Potter EH, Monroe AJ, Morin SM (Role of the dorsomedial hypothalamus in the cardiovascular response to stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:171-176.1996).

Fernandes KB, Crippa GE, Tavares RF, Antunes-Rodrigues J, Correa FM (Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline injection into the cingulate cortex of unanesthetized rats. *Neuropharmacology* 44:757-763.2003).

Fisk GD, Wyss JM (Pressor and depressor sites are intermingled in the cingulate cortex of the rat. *Brain Res* 754:204-212.1997).

Fisk GD, Wyss JM (Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. *Brain Res* 859:83-95.2000).

Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R (Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol* 432:307-328.2001).

Folkow B (Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev* 62:347-504.1982).

Fontes MA, Tagawa T, Polson JW, Cavanagh SJ, Dampney RA (Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2891-2901.2001).

Fryszak RJ, Neafsey EJ (The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. *Brain Res* 643:181-193.1994).

Gainotti G ([Emotions and hemispheric lateralization. Review of the literature]. *Encephale* 9:345-364.1983).

Gigg J, Tan AM, Finch DM (Glutamatergic hippocampal formation projections to prefrontal cortex in the rat are regulated by GABAergic inhibition and show convergence with glutamatergic projections from the limbic thalamus. *Hippocampus* 4:189-198.1994).

Gillespie CF, Nemeroff CB (Hypercortisolemia and depression. *Psychosom Med* 67 Suppl 1:S26-28.2005).

Goodchild AK, Dampney RA, Bandler R (A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies, but not axons of passage, within localized regions of the central nervous system. *J Neurosci Methods* 6:351-363.1982).

Greenland P, Abrams J, Aurigemma GP, Bond MG, Clark LT, Criqui MH, Crouse JR, 3rd, Friedman L, Fuster V, Herrington DM, Kuller LH, Ridker PM, Roberts WC, Stanford W, Stone N, Swan HJ, Taubert KA, Wexler L (Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention:

noninvasive tests of atherosclerotic burden: Writing Group III. *Circulation* 101:E16-22.2000).

Handa RJ, Nunley KM, Bollnow MR (Induction of c-fos mRNA in the brain and anterior pituitary gland by a novel environment. *Neuroreport* 4:1079-1082.1993).

Hardy SG, Holmes DE (Prefrontal stimulus-produced hypotension in rat. *Exp Brain Res* 73:249-255.1988).

Harris CW, Edwards JL, Baruch A, Riley WA, Pusser BE, Rejeski WJ, Herrington DM (Effects of mental stress on brachial artery flow-mediated vasodilation in healthy normal individuals. *Am Heart J* 139:405-411.2000).

Hayashi N, Someya N, Endo MY, Miura A, Fukuba Y (Vasoconstriction and blood flow responses in visceral arteries to mental task in humans. *Exp Physiol* 91:215-220.2006).

Henry JP (Psychological and physiological responses to stress: the right hemisphere and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, an inquiry into problems of human bonding. *Acta Physiol Scand Suppl* 640:10-25.1997).

Hori T, Nakashima T, Koga H, Kiyohara T, Inoue T (Convergence of thermal, osmotic and cardiovascular signals on preoptic and anterior hypothalamic neurons in the rat. *Brain Res Bull* 20:879-885.1988).

Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB (Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol* 308:249-276.1991).

Iwata J, LeDoux JE, Meeley MP, Arneric S, Reis DJ (Intrinsic neurons in the amygdaloid field projected to by the medial geniculate body mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *Brain Res* 383:195-214.1986).

Jinks AL, McGregor IS (Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res* 772:181-190.1997).

Johnson Rowsey P, Yang YL, Gordon CJ (Peripheral cholinergic pathway modulates hyperthermia induced by stress in rats exposed to open-field stress. *J Appl Physiol* 92:789-794.2002).

Julius S (Corcoran Lecture. Sympathetic hyperactivity and coronary risk in hypertension. *Hypertension* 21:886-893.1993).

Kasckow JW, Baker D, Geraciotti TD, Jr. (Corticotropin-releasing hormone in depression and post-traumatic stress disorder. *Peptides* 22:845-851.2001).

Lane JD, Adcock RA, Burnett RE (Respiratory sinus arrhythmia and cardiovascular responses to stress. *Psychophysiology* 29:461-470.1992).

LeDoux JE (Emotion, memory and the brain. *Sci Am* 270:50-57.1994).

Leonard CM (The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. *Brain Res* 12:321-343.1969).

Leor J, Poole WK, Kloner RA (Sudden cardiac death triggered by an earthquake. *N Engl J Med* 334:413-419.1996).

Loewy AD (Forebrain nuclei involved in autonomic control. *Prog Brain Res* 87:253-268.1991).

Long NC, Vander AJ, Kunkel SL, Kluger MJ (Antiserum against tumor necrosis factor increases stress hyperthermia in rats. *Am J Physiol* 258:R591-595.1990).

Marti O, Armario A (Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci* 16:241-260.1998).

McDougall SJ, Widdop RE, Lawrence AJ (Medial prefrontal cortical integration of psychological stress in rats. *Eur J Neurosci* 20:2430-2440.2004).

McNally RJ (Panic and posttraumatic stress disorder: implications for culture, risk, and treatment. *Cogn Behav Ther* 37:131-134.2008).

Moghaddam B (Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem* 60:1650-1657.1993).

Morrison SF (RVLM and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *Am J Physiol* 276:R962-973.1999).

Nauta WJ (The problem of the frontal lobe: a reinterpretation. *J Psychiatr Res* 8:167-187.1971).

Neafsey EJ (Prefrontal cortical control of the autonomic nervous system: anatomical and physiological observations. *Prog Brain Res* 85:147-165; discussion 165-146.1990).

Neafsey EJ, Hurley-Gius KM, Arvanitis D (The topographical organization of neurons in the rat medial frontal, insular and olfactory cortex projecting to the solitary nucleus, olfactory bulb, periaqueductal gray and superior colliculus. *Brain Res* 377:561-570.1986).

Nicolle MM, Baxter MG (Glutamate receptor binding in the frontal cortex and dorsal striatum of aged rats with impaired attentional set-shifting. *Eur J Neurosci* 18:3335-3342.2003).

Ongur D, Price JL (The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex* 10:206-219.2000).

Owens NC, Sartor DM, Verberne AJ (Medial prefrontal cortex depressor response: role of the solitary tract nucleus in the rat. *Neuroscience* 89:1331-1346.1999).

Owens NC, Verberne AJ (An electrophysiological study of the medial prefrontal cortical projection to the nucleus of the solitary tract in rat. *Exp Brain Res* 110:55-61.1996).

Owens NC, Verberne AJ (Regional haemodynamic responses to activation of the medial prefrontal cortex depressor region. *Brain Res* 919:221-231.2001).

Pacak K, Palkovits M (Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22:502-548.2001).

Parati G, Antonicelli R, Guazzarotti F, Paciaroni E, Mancia G (Cardiovascular effects of an earthquake: direct evidence by ambulatory blood pressure monitoring. *Hypertension* 38:1093-1095.2001).

Paxinos G, Watson, C (The rat brain in stereotaxic coordinates, New York: Academic. 1998).

Petrides M (Impairments on nonspatial self-ordered and externally ordered working memory tasks after lesions of the mid-dorsal part of the lateral frontal cortex in the monkey. *J Neurosci* 15:359-375.1995).

Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE (Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci* 26:12967-12976.2006).

Ray JP, Price JL (The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal cortex topography. *J Comp Neurol* 323:167-197.1992).

Reis DJ, Ledoux JE (Some central neural mechanisms governing resting and behaviorally coupled control of blood pressure. *Circulation* 76:12-9.1987).

Resstel LB, Correa FM (Pressor and tachycardic responses evoked by microinjections of L-glutamate into the medial prefrontal cortex of unanaesthetized rats. *Eur J Neurosci* 21:2513-2520.2005).

Resstel LB, Correa FM (Injection of l-glutamate into medial prefrontal cortex induces cardiovascular responses through NMDA receptor - nitric oxide in rat. *Neuropharmacology* 51:160-167.2006).

Robinson RG, Kubos KL, Starr LB, Rao K, Price TR (Mood disorders in stroke patients. Importance of location of lesion. *Brain* 107 ( Pt 1):81-93.1984).

Rolls ET (Memory systems in the brain. *Annu Rev Psychol* 51:599-630.2000).

Roosendaal B, Koolhaas JM, Bohus B (Central amygdala lesions affect behavioral and autonomic balance during stress in rats. *Physiol Behav* 50:777-781.1991).

Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J (Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation* 99:2192-2217.1999).

Samuels BC, Zaretsky DV, DiMicco JA (Tachycardia evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus in rats is mediated through medullary raphe. *J Physiol* 538:941-946.2002).

Schwartz AR, Gerin W, Davidson KW, Pickering TG, Brosschot JF, Thayer JF, Christenfeld N, Linden W (Toward a causal model of cardiovascular responses to stress and the development of cardiovascular disease. *Psychosom Med* 65:22-35.2003).

Selye H (Stress and disease. *Science* 122:625-631.1955).

Sequeira H, Viltart O, Ba-M'Hamed S, Poulain P (Cortical control of somato-cardiovascular integration: neuroanatomical studies. *Brain Res Bull* 53:87-93.2000).

Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 290:213-242.1989).

Shah AA, Sjovold T, Treit D (Inactivation of the medial prefrontal cortex with the GABAA receptor agonist muscimol increases open-arm activity in the elevated plus-maze and attenuates shock-probe burying in rats. *Brain Res* 1028:112-115.2004).

Shah AA, Treit D (Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. *Brain Res* 969:183-194.2003).

Shekhar A, Hingtgen JN, DiMicco JA (GABA receptors in the posterior hypothalamus regulate experimental anxiety in rats. *Brain Res* 512:81-88.1990).

Soltis RP, DiMicco JA (Interaction of hypothalamic GABAA and excitatory amino acid receptors controlling heart rate in rats. *Am J Physiol* 261:R427-433.1991).

Soltis RP, DiMicco JA (Hypothalamic excitatory amino acid receptors mediate stress-induced tachycardia in rats. *Am J Physiol* 262:R689-697.1992).

Stotz-Potter EH, Morin SM, DiMicco JA (Effect of microinjection of muscimol into the dorsomedial or paraventricular hypothalamic nucleus on air stress-induced neuroendocrine and cardiovascular changes in rats. *Brain Res* 742:219-224.1996a).

Stotz-Potter EH, Willis LR, DiMicco JA (Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. *J Neurosci* 16:1173-1179.1996b).

Strawn JR, Geraciotti TD, Jr. (Noradrenergic dysfunction and the psychopharmacology of posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety* 25:260-271.2008).

Sullivan RM, Gratton A (Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *J Neurosci* 19:2834-2840.1999).

Sullivan RM, Gratton A (Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. *Brain Res* 927:69-79.2002).

Sullivan RM, Szechtman H (Asymmetrical influence of mesocortical dopamine depletion on stress ulcer development and subcortical dopamine systems in rats: implications for psychopathology. *Neuroscience* 65:757-766.1995).

Takagishi M, Chiba T (Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Res* 566:26-39.1991).

Tavares RF, Correa FM (Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. *Neuroscience* 143:231-240.2006).

Tavares RF, Correa FM, Resstel LB (Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. *J Neurosci Res* 87:2601-2607.2009).

Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW (Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 376:143-173.1996).

Toga AW, Thompson PM (Mapping brain asymmetry. *Nat Rev Neurosci* 4:37-48.2003).

Tricklebank MD, Forler C, Middlemiss DN, Fozard JR (Subtypes of the 5-HT receptor mediating the behavioural responses to 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine in the rat. *Eur J Pharmacol* 117:15-24.1985).

Unger T, Parati G (Acute stress and long-lasting blood pressure elevation: a possible cause of established hypertension? *J Hypertens* 23:261-263.2005).

Van Eden CG, Buijs RM (Functional neuroanatomy of the prefrontal cortex: autonomic interactions. *Prog Brain Res* 126:49-62.2000).

Verberne AJ (Medullary sympathoexcitatory neurons are inhibited by activation of the medial prefrontal cortex in the rat. *Am J Physiol* 270:R713-719.1996).

Verberne AJ, Lewis SJ, Jarrott B, Louis WJ (Medial prefrontal cortical lesions and baroreceptor heart rate reflex sensitivity in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 6:123-127.1988).

Verberne AJ, Lewis SJ, Worland PJ, Beart PM, Jarrott B, Christie MJ, Louis WJ (Medial prefrontal cortical lesions modulate baroreflex sensitivity in the rat. *Brain Res* 426:243-249.1987).

Verberne AJ, Owens NC (Cortical modulation of the cardiovascular system. *Prog Neurobiol* 54:149-168.1998).

Vertes RP (Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32-58.2004).

Wittling W (The right hemisphere and the human stress response. *Acta Physiol Scand Suppl* 640:55-59.1997).

Xavier CH, Nalivaiko E, Beig MI, Menezes GB, Cara DC, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA (Functional asymmetry in the descending cardiovascular pathways from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience* 164:1360-1368.2009).

Zaretskaia MV, Zaretsky DV, DiMicco JA (Role of the dorsomedial hypothalamus in thermogenesis and tachycardia caused by microinjection of prostaglandin E2 into the preoptic area in anesthetized rats. *Neurosci Lett* 340:1-4.2003).

Zaretskaia MV, Zaretsky DV, Shekhar A, DiMicco JA (Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. *Brain Res* 928:113-125.2002).

# 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](#)