UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Envolvimento do sistema renina-angiotensina na modulação das respostas autonômicas, neuroendócrina e funcionais ocasionadas pela exposição aguda ao estresse de restrição em ratos.

DOUTORANDA: TAÍZ FRANCINE BRASIL DA SILVA

RIBEIRÃO PRETO

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Envolvimento do sistema renina-angiotensina na modulação das respostas autonômicas, neuroendócrina e funcionais ocasionadas pela exposição aguda ao estresse de restrição em ratos.

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia da FMRP–USP para obtenção do título de Doutorado em Ciências Biológicas com ênfase em Farmacologia.

DOUTORANDA: **TAÍZ FRANCINE BRASIL DA SILVA**

ORIENTADOR: **PROF. DR. FERNANDO MORGAN DE AGUIAR CORRÊA** - PROFESSOR TITULAR – DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA – FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

RIBEIRÃO PRETO

2020

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de

Ribeirão Preto/USP

Brasil, Taíz Francine Silva

Envolvimento do sistema renina-angiotensina na modulação das respostas autonômicas, neuroendócrina e funcionais ocasionadas pela exposição aguda ao estresse de restrição em ratos./ Taíz Francine Brasil da Silva; orientador: Fernando Morgan de Aguiar Corrêa. – Ribeirão Preto, 2020.

102 f.

Tese (Doutorado)--Universidade de São Paulo, 2020.

1. Sistema renina-angiotensina 2. Estresse de restrição 3. Sistema cardiovascular 4. Sistema nervoso autônomo 5. Variabilidade da frequência cardíaca 6. Barorreflexo espontâneo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Brasil, Taíz Francine Silva

Envolvimento do sistema renina-angiotensina na modulação das respostas autonômicas, neuroendócrina e funcionais ocasionadas pela exposição aguda ao estresse de restrição em ratos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Doutorado em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em: ___ /___ / 2020.

BANCA EXAMINADORA

PROF. DR. FERNANDO MORGAN DE AGUIAR CÔRREA

INSTITUIÇÃO: FMRP-USP ASSINATURA: _____

PROF. DR.

INSTITUIÇÃO: ASSINATURA: _____

PROF. DR.

INSTITUIÇÃO: ASSINATURA: _____

PROF. DR.

INSTITUIÇÃO: ASSINATURA: _____

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88882.328264/2019-01.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 88882.328264/2019-01

DEDICATÓRIA

*À **Deus**, por alimentar todos os dias a minha fé, a qual me permite alcançar lugares antes nunca imaginados.*

*À minha **família** por todo apoio e amor incondicional, em especial ao meu querido **avô Ió**, o incentivador dos meus sonhos e minha grande referência, por me ensinar os mais preciosos valores que carregarei por toda a vida.*

*Ao meu companheiro **Gabriel**, o maior presente que essa trajetória me trouxe, por partilharmos a vida, o amor, os sonhos, e as aspirações acadêmicas.*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao professor Fernando Morgan de Aguiar Corrêa por ter sido um verdadeiro agente transformador em minha vida ao longo dos últimos seis anos. Obrigada pela orientação, paciência, conselhos e por todo conhecimento e amadurecimento que pude construir em seu laboratório.

Aos professores da banca examinadora por terem aceitado, prontamente, compartilhar conhecimento e realizar importantes sugestões para que esse trabalho seja aprimorado.

Ao professor José Antunes Rodrigues por ter, gentilmente, aberto a porta de seu laboratório para colaboração.

Aos amigos de laboratório Amanda, América, Cris, Eduardo e Ivaldo pela partilha do dia-a-dia, do conhecimento e por todas as relevantes colaborações e discussões que permitiram que esse trabalho fosse lapidado e concluído. A convivência com vocês foi uma peça-chave na evolução da minha vida profissional e pessoal.

Agradeço nossa querida técnica Ivanilda Fortunato, Vá, por todo carinho, auxílio e instruções técnicas para que esse trabalho pudesse ser realizado.

A técnica Valci, do laboratório do professor Antunes, por ter contribuído e auxiliado em parte desse trabalho.

Ao pessoal da secretaria, Gislaine e Waldik por auxiliarem em toda burocracia com tamanha competência.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte do desenvolvimento desse trabalho. Obrigada.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

BEI – índice de efetividade do barorreflexo

CVLM – bulbo ventrolateral caudal (*caudal ventrolateral medulla*)

ECA – enzima conversora de angiotensina

ER – estresse de restrição

FC – frequência cardíaca

GABA – ácido gama-aminobutírico

HF – alta frequência (*high frequence)*

HPA – eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HRV – variabilidade da frequência cardíaca (*heart rate variability*)

IP – intervalo de pulso

LF – baixa frequência (*low frequence)*

NTS – núcleo do trato solitário

PA – pressão arterial

PAS – pressão arterial sistólica

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

RVLM – bulbo ventrolateral rostral (*rostral ventrolateral medulla*)

SBR – sensibilidade do barorreflexo espontâneo

SNA – sistema nervoso autônomo

SRA – sistema renina-angiotensina

VLF – frequência muito baixa (*very low frequence)*

Ang-I – angiotensina-I

Ang-II – angiotensina-II

PAM – pressão arterial média

ALT – alanina aminotransferase

AST – aspartato aminotransferase

CK-MB – creatinoquinase, fração MB

FFT – transformada rápida de Fourier (*fast Fourier transform*)

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 46

FIGURA 2. 47

FIGURA 3. 51

FIGURA 4. 55

FIGURA 5. 59

FIGURA 6. 64

FIGURA 7. 64

FIGURA 8. 65

FIGURA 9. 65

FIGURA 10. 66

FIGURA 11. 66

FIGURA 12. 67

FIGURA 13. 68

FIGURA 14. 69

FIGURA 15. 72

FIGURA 16. 73

FIGURA 17. 75

FIGURA 18. 76

FIGURA 19. 77

FIGURA 20. 78

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. VALORES DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) BASAIS ANTES E APÓS O PRÉ-TRATAMENTO COM VEÍCULO OU DIFERENTES DOSES DE LISINOPRIL (INIBIDOR DA ECA) VIA I.V. EM RATOS. 53

TABELA 2. VALORES DE FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) BASAIS ANTES E APÓS O PRÉ-TRATAMENTO COM VEÍCULO OU DIFERENTES DOSES DE LISINOPRIL (INIBIDOR DA ECA) VIA I.V. EM RATOS. 54

TABELA 3. VALORES DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) ANTES E APÓS O PRÉ-TRATAMENTO COM VEÍCULO OU DIFERENTES DOSES DE LOSARTAN (ANTAGONISTA SELETIVO DO RECEPTOR AT-1) VIA I.V. EM RATOS..... 57

TABELA 4. VALORES DE FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) ANTES E APÓS O PRÉ-TRATAMENTO COM VEÍCULO OU DIFERENTES DOSES DE LOSARTAN (ANTAGONISTA SELETIVO DO RECEPTOR AT-1) VIA I.V. EM RATOS..... 58

RESUMO

RESUMO

Brasil, TFS. **Envolvimento do sistema renina-angiotensina na modulação das respostas autonômicas, neuroendócrina e funcionais ocasionadas pela exposição aguda ao estresse de restrição em ratos**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A regulação do sistema cardiovascular engloba diferentes mecanismos, de curto e longo prazo, cuja função é manter os parâmetros cardiovasculares dentro de uma estreita faixa de variação, mesmo frente a situações que desafiam a homeostase do organismo. O sistema renina-angiotensina (SRA) participa desta regulação e está envolvido no controle cardiovascular e no equilíbrio hidroeletrolítico, além de estar relacionado à hipertensão. O modelo de estresse de restrição (ER) foi padronizado na literatura como uma situação aversiva capaz de promover aumento sustentado da pressão arterial, frequência cardíaca e estimulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Estudos demonstraram que situações aversivas levam ao aumento de angiotensina circulante, além de aumentar os níveis centrais deste peptídeo e expressão de receptores AT1, em estruturas do sistema nervoso central (SNC) relacionadas ao estresse. Estímulos estressores estão associados à modulação do sistema nervoso autônomo (SNA) simpático e parassimpático e, consequentemente, do barorreflexo, sendo que alterações nesse mecanismo de ajuste estão diretamente relacionadas à gênese e desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A análise da variabilidade da frequência cardíaca (HRV) constitui outra importante ferramenta para avaliar a atividade do SNA. Além disso, estudos sugerem que estímulos estressores são capazes de ocasionar lesão celular com consequente aumento da liberação de enzimas citosólicas para a circulação. Baseado nessas informações pode-se levantar a hipótese que o SRA desempenhe um importante papel na modulação das alterações autonômicas, neuroendócrina e funcionais observadas em resposta a estímulos estressores, em particular o ER. O pré-tratamento intravenoso de ratos com lisinopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), reduziu as respostas pressora e taquicárdica desencadeadas pelo ER; em contrapartida, a dose de 1 mg/kg de lisinopril potencializou a resposta taquicárdica evocada pelo

ER. Adicionalmente, a administração de losartan, antagonista seletivo para o receptor AT1, reduziu as respostas pressora e taquicárdica ocasionadas por esta situação aversiva. Os pré-tratamentos com losartan (1 mg/kg) e lisinopril (0,3 mg/kg) não alteraram a pressão arterial sistólica (PAS), a variabilidade da PAS, o intervalo de pulso (IP) e a variabilidade do IP. Apenas o pré-tratamento com lisinopril 0,3 mg/kg aumentou a potência de banda de *low frequence* (LF) do espectro da PAS após o tratamento sem afetar o LF durante o ER. O pré-tratamento com lisinopril 0,3 mg/kg aumentou a potência de banda de LF do espectro do IP na terceira hora do ER. O pré-tratamento com losartan 1 mg/kg, por sua vez, aumentou a potência de banda de *high frequence* (HF) e reduziu a LF em unidades normalizadas (u.n.) e a razão LF/HF do espectro do IP na primeira hora do ER. Com relação à sensibilidade do barorreflexo (SBR), os pré-tratamentos com losartan (1 mg/kg) e lisinopril (0,3 mg/kg) não alteraram o ganho das sequências barorreflexas totais, das sequências UP e DOWN. No entanto, o pré-tratamento com losartan 1 mg/kg reduziu o índice de efetividade do barorreflexo (BEI) das sequências totais na terceira hora do ER, sem afetar o BEI das sequências UP e DOWN. Estes resultados indicam que: (1) a Ang-II, via receptor AT1, desempenha uma influência facilitatória sobre a resposta cardiovascular causada pelo ER; (2) a Ang-II facilita a ativação simpática e reduz a atividade parassimpática frente ao ER; (3) a Ang-II favorece a ativação do barorreflexo durante o ER e (4) a Ang-II, via receptor AT1 favorece a liberação de corticosterona frente à esse modelo de estresse. Sendo assim, o prejuízo na síntese de Ang-II, bem como o antagonismo de receptores AT1 podem constituir uma estratégia farmacológica importante para melhorar as consequências desencadeadas pelo ER.

Palavras-chave: Sistema renina-angiotensina, estresse de restrição, sistema nervoso autônomo, sistema cardiovascular, variabilidade da frequência cardíaca, barorreflexo espontâneo.

ABSTRACT

ABSTRACT

BRASIL, TFS. **Involvement of the renin-angiotensin system in the modulation of autonomic, neuroendocrine and functional responses caused by acute exposure to restraint stress in rats.** Thesis (Doctorade) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

The regulation of the cardiovascular system comprises different short- and long-term mechanisms that function to maintain the cardiovascular parameters within a narrow range of variation, even under situations that challenge organism's homeostasis. The renin-angiotensin system (RAS) participates in this regulation and is involved in the cardiovascular control and hydro electrolytic balance, in addition to being related to hypertension. The restraint stress (RS) model has been standardized in the literature as an aversive situation capable of promoting a sustained increase in blood pressure and heart rate and stimulation of the hypothalamic-pituitary adrenal axis (HPA). Studies have shown that aversive situations lead to an increase in circulation angiotensin, in addition to increase the central levels of this peptide and the expression of AT1 receptors in central nervous system structures related to stress. Stressful stimuli are associated with the modulation of the sympathetic and parasympathetic autonomic nervous system (ANS), and consequently, of the baroreflex and changes in this adjustment mechanism are directly related to the genesis and development of cardiovascular diseases. The analysis of heart rate variability (HRV) is another important toll to assess ANS activity. In addition, studies suggest that stressful stimuli cause cell injury and a consequent increase in the release of cytosolic enzymes into the circulation. Based on this information, the hypothesis of the present study is that the RAS plays an important role in the modulation of autonomic, neuroendocrine and functional alterations observed in response to stressful stimuli, in particular, the RS. The intravenous pre-treatment of rats with lisinopril, angiotensin converting enzyme inhibitor, reduced the pressor and tachycardic responses caused by RS, in contrast the dose of 1 mg/kg of lisinopril potentiated the tachycardic response evoked by RS. Additionally, the administration of losartan, a selective AT1 receptor antagonist, reduced the

pressor and tachycardic responses caused by this aversive situation. The pretreatments with losartan (1 mg/kg) or lisinopril (0.3 mg/kg) did not affect the systolic blood pressure (SBP), SBP variability, pulse interval (PI) and PI variability. Only the pretreatment with lisinopril 0.3 mg/kg increased the power of the low frequencies (LF) band of the SBP spectrum after the treatment without affecting this parameter during RS. The pretreatment with losartan 1 mg/kg, in turn, increased the power of the HF band and reduced the LF (u.n) and the LF/HF ratio of the PI spectrum in the first hour of RS. With regard to baroreflex sensitiveness (SBR), pretreatments with losartan (1 mg/kg) or lisinopril (0.3 mg/kg) did not affect the gain of the total, UP and DOWN baroreflex sequences. However, the pretreatment with losartan (1 mg/kg) reduced the baroreflex effectiveness index (BEI) of the total sequences in the third hour of the RS, without affecting the BEI of the UP and DOWN sequences. These results indicate that (1) Ang-II, via the AT1 receptor, plays a facilitating influence on the cardiovascular response caused by RS; (2) Ang-II facilitates sympathetic activation and reduces parasympathetic activity related to RS; (3) Ang-II favors the baroreflex activation during RS and (4) Ang-II via AT1 receptor favors the corticosterone release in front of this stress model. Thus, the impairment in the synthesis of Ang-II, as well as the antagonism of AT1 receptors, may constitute an important pharmacological strategy to improve the consequences caused by RS.

Keywords: renin-angiotensin system, restraint stress, autonomic nervous system, cardiovascular system, heart rate variability, spontaneous baroreflex.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 26

2. OBJETIVOS 35

3. METODOLOGIA 38

3.1. Animais: 38

3.2. Canulação da artéria femoral: 38

3.3. Registro da PA e FC: 39

3.4. Protocolo de estresse agudo: 39

3.5. Variabilidade da frequência cardíaca: 40

3.6. Sensibilidade do barorreflexo espontâneo:). 41

3.7. Coleta de sangue: 41

3.8. Dosagem de corticosterona: 42

3.9. Dosagem dos parâmetros funcionais (testes bioquímicos): 42

3.10. Drogas utilizadas: 42

3.11. Análise estatística: 43

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS 46

4.1. Efeito do ER agudo e influência do SRA sobre alterações autonômicas (PA, FC, HRV e SBR) ocasionadas em ratos: 47

4.2. Efeito do ER agudo e influência do SRA sobre as alterações funcionais ocasionadas em ratos normotensos: 48

4.3. Efeito do ER agudo e influência do SRA sobre a alteração hormonal ocasionadas em ratos normotensos: 48

5. RESULTADOS 50

5.1. Efeito da administração periférica (i.v) de diferentes doses de Ang-II na ausência e na presença de losartan (antagonista AT1) e Ang-I na presença e na ausência de lisinopril (inibidor da ECA) sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) avaliados. 50

5.2. Efeito da administração periférica de diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) ocasionados pelo ER. 52

5.3. Efeito da administração periférica de diferentes doses de losartan (antagonista seletivo do receptor AT1) sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) ocasionados pelo ER. 56

5.4. Efeito da administração periférica de diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) e losartan (antagonista seletivo do receptor AT1 sobre a variabilidade da frequência cardíaca (PAS e IP) de animais submetidos ao ER. 60

5.5. Efeito da administração periférica de diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) e losartan (antagonista seletivo do receptor AT1 sobre a sensibilidade do barorreflexo de animais submetidos ao ER. 70

5.6. Efeito da administração periférica de diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) e losartan (antagonista seletivo do receptor AT1) sobre os parâmetros funcionais de animais submetidos ao ER. 74

5.7) Efeito da administração periférica de diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) e losartan (antagonista seletivo do receptor AT1) sobre o parâmetro neuroendócrino de animais submetidos ao ER. 78

6. DISCUSSÃO 80

7. CONCLUSÃO 93

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 95

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A regulação do sistema cardiovascular é de extrema importância para a manutenção da homeostase do organismo e depende da interação entre fatores hormonais, locais, bem como de mecanismos neurais que realizam o controle momento a momento da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) (CHALMERS; PILOWSKY, 1991). O desequilíbrio desses mecanismos está diretamente relacionado ao desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares (FISHER; YOUNG; FADEL, 2009; GRASSI; MARK; ESLER, 2015; HALL et al., 2010), as quais são consideradas a principal causa de morte em todo mundo (WHO, 2018).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um complexo sistema humoral diretamente envolvido no controle cardiovascular e no equilíbrio hidroeletrolítico (BRUNNER et al., 1972; PEACH, 1977). A geração dos componentes desse sistema inicia-se a partir da clivagem do angiotensinogênio, a qual é realizada pela enzima renina, liberando o decapeptídeo angiotensina I (Ang-I). Em seguida, a enzima conversora de angiotensina (ECA) cliva dois aminoácidos da porção carboxi-terminal da Ang-I, dando origem à angiotensina II (Ang-II) (URATA et al., 1990).

Com relação aos receptores angiotensinérgicos, a Ang-II atua através de três subtipos: AT1, AT-2 e AT-3 (DE GASPARO et al., 2000; KASCHINA; UNGER, 2003; SANDBERG et al., 1992), porém a ligação ao receptor AT1 é responsável pelos seus principais efeitos cardiovasculares, tais como liberação de noradrenalina, vasoconstrição, secreção de aldosterona, reabsorção renal de sódio, estimulação simpática e hipertrofia celular vascular e cardíaca.

(NICKENIG & HARRISON, D. G., 2002a, 2002b; STRAWN; FERRARIO; TALLANT, 1999).

Neste sentido, os bloqueadores do SRA, tais como os antagonistas dos receptores AT1 e os inibidores da ECA, são amplamente utilizados na clínica para o tratamento da hipertensão, uma vez que sua utilização bloqueia ou reduz os principais efeitos cardiovasculares da Ang-II (TE RIET et al., 2015).

Além de seu envolvimento na gênese de doenças cardiovasculares, vários trabalhos também indicam o envolvimento do SRA na modulação de respostas ocasionadas por situações aversivas, nas quais também ocorre ativação simpática (BUSNARDO; TAVARES; CORREA, 2014; MILIK; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA; SZCZEPANSKA-SADOWSKA, 2016; PORTER, 2000; SAAVEDRA et al., 2006).

A exposição ao estresse ocasiona uma perturbação do estado de homeostase, desencadeando um conjunto de respostas integradas dos sistemas fisiológicos, com o objetivo de preservar a integridade do organismo (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). O estresse psicológico tem sido apontado pela literatura como um importante fator para o risco cardiovascular e essa relação tem sido amplamente investigada por pesquisas básicas e aplicadas (GINTY et al., 2017; NALIVAIKO, 2011; REICH et al., 1981; ROZANSKI; BLUMENTHAL; KAPLAN, 1999; STEINBERG et al., 2004). Dentre os modelos de estresse animal, está o estresse por restrição (ER), o qual foi padronizado na literatura como um estímulo aversivo e inescapável capaz de ocasionar respostas autonômicas características em roedores, envolvendo aumento sustentado de PA e FC, e o redirecionamento do fluxo sanguíneo para órgãos importantes na resposta a um estressor, tais como músculos, cérebro e coração, bem como ativação do eixo

hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (BARRON; VAN LOON, 1989; IRVINE; WHITE; CHAN, 1997; KRIEMAN et al., 1992; MCDOUGALL et al., 2000; TAVARES; CORRÊA, 2006).

A ativação do eixo HPA frente à percepção de um estímulo aversivo ocasiona liberação do hormônio liberador de corticotrofina pelo hipotálamo, o qual estimula a pituitária a liberar o hormônio adrenocorticotrófico na circulação sanguínea, e este por sua vez, estimula o córtex da glândula adrenal a liberar, de maneira sistêmica, os glicocorticóides (KOLBER; WIECZOREK; MUGLIA, 2008; MYERS; MCKLVEEN; HERMAN, 2014). Em roedores, a ativação do eixo HPA frente à um estímulo estressor pode ser avaliada pela determinação da concentração plasmática de corticosterona (MAGARINOS; MCEWEN, 1995).

Com relação à participação do SRA em respostas ocasionadas por situações aversivas, estudos evidenciaram ao utilizar diferentes modelos experimentais de estresse, o aumento da atividade do SRA, uma vez que a ativação simpática e, consequentemente, a ativação de receptores beta-adrenérgicos, no aparelho justa glomerular, favorece a liberação e síntese de renina, enzima considerada fator limitante para a formação de Ang-II e, desta forma, ocorre aumento de Ang- II circulante, além da ativação de receptores AT1 localizados em regiões do eixo HPA, favorecendo a liberação de catecolaminas e glicocorticóides (SAAVEDRA; BENICKY, 2007). Diferentes estruturas do SNC, diretamente associadas à resposta ao estresse, dentre estas a amígdala, hipocampo e estruturas do eixo HPA, expressam receptores AT1 (AGUILERA, 1998; CASTRÉN et al., 1987; TSUTSUMI; SAAVEDRA, 1991a). Estudos demonstraram o aumento da formação de Ang-II em regiões do SNC e da expressão de receptores AT1 no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e

no órgão subfornical, ao se utilizar modelos de estresse de imobilização, isolamento, e em particular, de restrição (ARMANDO et al., 2001; CASTREN; SAAVEDRA, 1988; LEONG et al., 2002; SAAVEDRA et al., 2006). Sendo assim, pode-se hipotetizar que a utilização de fármacos que interferem com o SRA seja capaz de modificar as respostas desencadeadas pelo ER agudo.

Dentre os mecanismos neurais de ajuste momento a momento da PA e FC, destaca-se o barorreflexo, o qual atua por meio da modulação dos sistemas nervosos simpático e parassimpático (HUANG et al., 2010). O mecanismo do barorreflexo é iniciado pelos barorreceptores localizados no arco-aórtico e no seio carotídeo, os quais são mecanossensíveis e respondem a oscilações na pressão arterial (PAPADEMETRIOU et al., 2011). Ao ocorrer aumento na PA ocorre estiramento nos vasos do seio carotídeo e arco aórtico, ativando os barorreceptores e gerando impulsos nervosos que são conduzidos pelos nervos sinusal e depressor aórtico até o núcleo do trato solitário (NTS), estrutura localizada no bulbo (DAMPNEY, 1994).

O NTS, por sua vez, estimula os núcleos ambíguo e dorsal do vago, conhecidos por serem regiões com corpos celulares de neurônios pré-ganglionares parassimpáticos. O NTS também envia projeções excitatórias para o bulbo ventrolateral caudal (CVLM) estimulando a liberação do neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA) no bulbo ventrolateral rostral (RVLM), o qual envia projeções para neurônios pré-ganglionares simpáticos (AVERILL; DIZ, 2000). Dessa forma, ocorre redução da atividade simpática e aumento do tônus vagal, promovendo redução da frequência cardíaca e da resistência vascular periférica e resultando em diminuição da pressão arterial (LOHMEIER; ILIESCU, 2015).

Em contrapartida, ao ocorrer redução da pressão arterial, a frequência de disparo de potenciais de ação para o NTS diminui e portanto, a estimulação dos neurônios parassimpático nos núcleos ambíguo e dorsal do vago reduz, ao mesmo tempo que ocorre diminuição da liberação de GABA no RVLM (LOHMEIER; ILIESCU, 2015). Assim, ocorre aumento do tônus simpático e diminuição da ativação parassimpática, ocasionando aumento na FC e resistência vascular periférica com consequentemente aumento da PA (LOHMEIER; ILIESCU, 2015).

A análise do barorreflexo é uma técnica que verifica a correlação entre oscilações consecutivas na PA que se refletem na FC, fornecendo informações importantes a respeito do controle cardiovascular em condições fisiológicas e patológicas (BERTINIERI et al., 1985). Sabe-se que o ER é capaz de influenciar o barorreflexo, uma vez que a exposição de ratos ao ER aumentou o ganho da resposta taquicárdica do barorreflexo e diminuiu a magnitude da resposta bradicárdica, sugerindo um aumento da atividade simpática em resposta à exposição a este modelo aversivo (CRESTANI et al., 2010).

É bem estabelecido que alterações na atividade do barorreflexo contribuam para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (ENGI et al., 2012); deste modo, fármacos que revertam a ineficiência do controle exercido pelo sistema nervoso autônomo tornam-se fundamentais para reduzir a chance de aparecimento ou progressão de doenças cardiovasculares.

A determinação da sensibilidade do barorreflexo (SBR), por meio do método das sequências, envolve a detecção de sequências que correlacionam alterações consecutivas na PA e no intervalo de pulso (IP), sendo portanto, uma técnica não-invasiva que permite o estudo funcional do sistema nervoso

autônomo (SNA). Utilizando a SBR, foi demonstrado que o estresse crônico repetido é capaz de aumentar o número de sequências barorreflexas crescentes (UP) (DUARTE et al., 2015), demonstrando que o exposição à eventos estressores é capaz de interferir com a atividade do barorreflexo.

Outra técnica que surgiu como importante ferramenta para análise da atividade do SNA é a análise da variabilidade da frequência cardíaca (HRV). Sabe-se que o fenômeno da variabilidade cardiovascular está associado à emoção e humor, e que essa associação é de extrema importância para o bem-estar físico e mental (KEMPA A.H., 2013). Além disso, enquanto alta variabilidade está relacionada a uma boa adaptação, baixa variabilidade está associada à má adaptação do sistema cardiovascular (PUMPRLA et al., 2002); neste sentido, já está bem estabelecido que indivíduos com doença cardiovascular possuem menor variabilidade cardíaca quando comparados a normotensos (SINGH et al., 1998).

Um dos métodos utilizados para estudar a HRV é a análise no domínio da frequência por meio de análise espectral (SILVA et al., 2017). A análise espectral da HRV quantifica a atividade do sistema nervoso autônomo através da detecção de oscilações rítmicas em diversas frequências nos parâmetros sucessivos de PA e IP, as quais podem refletir a modulação exercida pelo sistema simpático ou parassimpático sobre o sistema cardiovascular (AKSELROD et al., 1981). Ao identificar e desmembrar as diferentes frequências de oscilações existentes dentro dos sinais da PA e IP, identifica-se o componente de alta frequência (*High Frequency* – HF), o qual varia de 0,75 a 3,00 Hz, em roedores, sendo um indicador da atividade do nervo vago sobre o coração. Outro fator identificado é o componente de baixa frequência (*Low Frequency* – LF), que por sua vez varia

entre 0,20 e 0,75 Hz e representa a modulação vagal e simpática sobre o coração, com predomínio do simpático (SILVA et al., 2017). Esta técnica, ainda, identifica o componente de frequência muito baixa (*Very Low Frequence*- VLF), a qual, em roedores, varia entre 0 e 0,2 Hz e representa, por sua vez, a modulação exercida por fatores humorais, tais como o óxido nítrico, fator natriurético atrial, catecolaminas e, em particular, do SRA sobre a PA (FAZAN JR; SALGADO, 2017; SILVA et al., 2017).

Recentemente, alguns trabalhos têm estudado a HRV em modelos animais de estresse crônico (DUARTE et al., 2015; FIRMINO et al., 2019; PARK et al., 2017), contudo não está esclarecido na literatura se a exposição ao ER agudo de 180 min, associada ao tratamento com fármacos que interferem com o SRA são capazes de alterar a atividade no SNA, avaliada através da SBR e da HRV.

Por conseguinte, existem evidências na literatura que o estresse emocional agudo, incluindo o ER, é capaz de ocasionar dano tecidual em diferentes órgãos, incluindo o coração (RAAB; CHAPLIN; BAJUSZ, 1964; SÁNCHEZ et al., 2002), e que a ativação simpática com a consequente ativação dos receptores beta-adrenérgicos é importante para desencadear esse mecanismo de lesão celular (ARAKAWA et al., 1997). A lesão à órgãos específicos pode ser avaliada através da determinação da atividade de enzimas citosólicas no plasma sanguíneo, uma vez que a lesão celular ocasiona a liberação de enzimas marcadoras específicas do citosol para a circulação (ARAKAWA et al., 1997). Dada a importância do SRA na resposta ao estresse, pode-se levantar a hipótese que o ER de 180 min ocasiona aumento de enzimas marcadoras de lesão celular que o SRA está envolvido nessa resposta.

Considerando as informações apresentadas, a hipótese do presente estudo é que o SRA desempenha um importante papel na modulação das respostas autonômicas, neuroendócrina e funcionais frente ao ER agudo (180 min).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral estudar o envolvimento do SRA nas respostas ocasionadas por exposição ao ER agudo de 180 min. Para isso, tivemos como objetivos específicos:

2.1. Avaliar o envolvimento do SRA nas alterações autonômicas desencadeadas por exposição ao ER agudo (180 min), sendo elas: a resposta cardiovascular, HRV e SBR, por meio do pré-tratamento dos animais com diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) ou losartan (antagonista seletivo dos receptores AT1).

2.2. Estudar a influência do SRA na resposta hormonal ocasionada pela exposição ao ER agudo (180 min), por meio da dosagem plasmática do hormônio corticosterona frente ao pré-tratamento dos animais com diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) ou losartan (antagonista seletivo dos receptores AT1).

2.3. Analisar as alterações funcionais ocasionadas pela exposição ao ER agudo, por meio de dosagens plasmáticas das enzimas marcadoras de atividade cardíaca, hepática e renal, creatinoquinase fração MB (CK-MB), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina, respectivamente, assim como o envolvimento do SRA nestas alterações, por meio do tratamento dos animais com diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) ou losartan (antagonista seletivo dos receptores AT1).

MATERIAIS E MÉTODOS

3. METODOLOGIA

3.1. Animais: Os experimentos foram realizados em ratos Wistar com peso variando entre 240-260g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto (USP) e foram mantidos agrupados (4 animais por caixa), com alimentação de ração e água *ad libitum*. Os animais foram aclimatados à temperatura controlada (23 ± 2ºC) e submetidos à alternância de luz (12 h claro/12 h escuro, com luz de 6 h às 18 h). Todos os experimentos foram realizados durante o ciclo claro. Todos os protocolos experimentais seguiram as normas da comissão de ética em experimentação animal (CETAE) e estiveram de acordo com os princípios éticos adotados pelo código brasileiro de experimentação animal (COBEA), nº 016/2017.

3.2. Canulação da artéria femoral: Os animais foram anestesiados com ketamina-xilazina (solução de 5ml de ketamina a 10% e 1,6ml de xilazina a 2%), administrada 10 mg/kg por via intraperitoneal. Uma cânula de polietileno foi implantada na artéria femoral, até atingir a aorta abdominal inferior, e outra cânula foi implantada na veia femoral para posteriores tratamentos farmacológicos. As cânulas foram constituídas por segmentos de polietileno PE-10 (4,5 cm) fundidos à segmentos de polietileno PE-50 (14,5 cm). Cada cânula foi preenchida com salina heparinizada (NaCl a 0,9% + heparina com solução a 0,25%, 5 U/mL), a fim de evitar formação de coágulos e prejuízo do fluxo sanguíneo, e obstruída com um pino de metal. Ao final da cirurgia, os animais receberam 2,5 mg/kg do analgésico e antiinflamatório flunixina meglumina (Banamine, Schering-Plough, Brasil), por via subcutânea e foram alojados em caixas individuais para recuperação cirúrgica e posterior realização dos

protocolos experimentais. O registro dos parâmetros cardiovasculares foi realizado através da cânula femoral, 24h após a cirurgia com os animais acordados.

3.3. Registro da PA e FC: No dia do experimento, os animais foram levados, em suas respectivas caixas, à sala de experimentação. Para aquisição dos parâmetros cardiovasculares, a cânula implantada na artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão arterial (Hewlett Packard, USA) por meio de um segmento de polietileno PE-50. A PA e a FC foram registradas por meio de um pré-amplificador de um polígrafo HP7754-A (Hewlett Packard, USA) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (MP-100, Biopac, USA). Cada animal foi conectado ao sistema de aquisição de dados, em sua caixa, para o registro contínuo da PA e FC basal por um período de 30 min. Em seguida, foi realizada uma injeção i.v. de droga ou veículo, seguida de 30 min de registro da basal após o tratamento. Posteriormente, o animal ainda conectado ao sistema de aquisição de dados, foi transferido para o tubo de restrição, onde permaneceu por 180 min. A PA e a FC foram registradas durante todo o período em que o animal permaneceu no tubo de restrição.

3.4. Protocolo de estresse agudo: O tubo de restrição é constituído por um tubo cilíndrico de plástico, medindo 15 cm de comprimento e 6,5 cm de diâmetro. O rato permaneceu em restrição no tubo por 180 min, sendo a PA e a FC registradas continuamente durante a sua permanência no tubo.

3.5. Variabilidade da frequência cardíaca: A análise da variabilidade do IP e PAS (pressão arterial sistólica) foi realizada por meio do programa computacional CardioSeries v2.7 (MARTINS DIAS, 2019). O programa foi projetado para realizar a análise da variabilidade cardiovascular nos domínios do tempo e da frequência, permitindo um ajuste preciso dos parâmetros relacionados com a análise no domínio da frequência. Foram utilizados trechos com 10 minutos de duração com valores de IP e PAS que mantiverem o máximo possível de estacionaridade, para serem utilizados na análise da variabilidade do IP e PAS. Posteriormente, para regularização do intervalo de tempo entre batimentos, os valores de IP e PAS foram reamostrados a 10Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo *spline*, e as séries com valores interpolados foram divididos em segmentos de 512 pontos , com sobreposição de 50 % (Protocolo de Welch).

Em seguida, cada segmento foi visualmente examinado em busca de transientes que pudessem afetar o cálculo de densidade espectral de potência (PSD). Foi utilizado um janelamento do tipo Hanning e posteriormente cada segmento estacionário de IP e PAS foi submetido à análise espectral pela Transformada Rápida de Fourier (FFT). Os espectros de IP foram integrados em bandas de baixa (LF: 0,20 – 0,75 Hz) e alta (HF: 0,75 – 3,00 Hz) frequência, enquanto que os espectros de PAS foram integrados somente na banda de baixa frequência (LF: 0,20 – 0,75 Hz).

A média das potências dos espectros do IP, nas bandas de frequência (LF e HF), foram utilizadas para expressar a potência do IP para cada rato. Já a

média dos valores das potências dos espectros da PAS na banda de LF, foi utilizada para expressar a potência da PAS para cada rato.

3.6. Sensibilidade do barorreflexo espontâneo: A SBR foi calculada, no domínio do tempo, por meio do método da sequência. Séries temporais de PAS e IP foram processadas pelo programa computacional Cardio Series v2.7 (MARTINS DIAS, 2019). O programa buscou por sequências de 4 ou mais batimentos que apresentassem aumentos progressivos na PAS acompanhados por aumentos, também progressivos, no IP (sequências UP), ou sequências de 4 ou mais batimentos que apresentassem reduções progressivas na PAS acompanhadas por reduções, também progressivas, no IP (sequências DOWN). Diferenças foram consideradas somente quando mudanças maiores ou iguais a 1 mmHg (PAS) e 1 ms (IP) foram observadas. A SBR foi determinada a partir da média do coeficiente angular da reta da regressão linear entre os valores de PAS e IP de cada sequência encontrada. O índice de efetividade do barorreflexo (BEI) foi definido pela razão entre o número de sequências barorreflexas e o número total de rampas de PAS (aumentos ou reduções progressivas, por 4 ou mais batimentos, na PAS independente de alterações concomitantes do IP).

3.7. Coleta de sangue: Para os experimentos que investigaram a participação do SRA na modulação das respostas hormonais e funcionais ocasionadas pelo ER, o método de coleta utilizado foi a decapitação. Após a decapitação, o sangue foi coletado do tronco, em tubos de plástico contendo EDTA (1mg/20µL para cada mL de sangue total), mantidos em gelo. O plasma foi separado por centrifugação (20 min, 3000 rpm, 4º C) e armazenados à -20º C até a realização das dosagens. As amostras foram coletadas em ratos *naïve* (não submetidos à

cirurgia, não-tratados e não-estressados) e imediatamente após o término do ER (180 min).

3.8. Dosagem de corticosterona: Para realizar a dosagem plasmática de corticosterona, 25 µL do plasma anteriormente obtido foi extraído com etanol. A concentração de corticosterona plasmática foi determinada por meio de radioimunoensaio específico conforme metodologia previamente descrita por (RUGINSK et al., 2013). A sensibilidade do ensaio de corticosterona foi de 0,4µg/dL. Os anticorpos para corticosterona foram obtidos da Sigma, St. Louis, USA.

3.9. Dosagem dos parâmetros funcionais (testes bioquímicos): Para realização da dosagem dos parâmetros funcionais foram utilizados 500 µL do plasma anteriormente obtido. Os parâmetros funcionais analisados foram: ALT e AST (marcadores da função hepática), ureia e creatinina (marcadores da função renal) e CK-MB (enzima marcadora da função cardíaca. A determinação destes parâmetros foi realizada por método cinético de maneira semi-automatizada, utilizando-se o equipamento BIO-200 (Bioplus, Brasil).

3.10. Drogas utilizadas:

-Lisinopril (Gemini, Brasil), inibidor da ECA.

-Losartan (Gemini, Brasil), antagonista seletivo do receptor AT1.

-Cloridrato de ketamina (Dopalen, Brasil) e Xilazina (Dopaser, Brasil), anestésico utilizado para procedimentos cirúrgicos.

-Banamine (flunixina meglumina, Schering-Plough veterinária, Brasil), analgésico administrado como profilático.

3.11. Análise estatística: Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa Prism (GraphPad, USA). As curvas temporais de Ang-I e Ang-II foram analisadas pelo teste de análise de variância de dois fatores (*two-way* ANOVA), seguido do pós-teste de Fisher, utilizando-se como variáveis os fatores do tratamento (controle ou droga) e o tempo como medida repetida.

As basais da PA e FC antes e após os tratamentos, de cada grupo utilizado, foram comparadas pelo teste *t* de Student pareado. As basais foram, ainda, comparadas entre os grupos pelo teste de análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA), utilizando como variável o tratamento (controle ou droga).

As alterações cardiovasculares ocasionadas pelo ER (curvas temporais) foram analisadas pelo teste de análise de variância de dois fatores (*two-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Fisher, utilizando-se como variáveis os fatores do tratamento (controle ou droga) e o tempo como medida repetida. Para representação gráfica e análise estatística, os dados foram transformados em 62 pontos, sendo 2 pontos referentes ao período basal, e 20 pontos por hora de restrição, totalizando 60 pontos de ER. A média total de variação de PA e FC (ΔPA e ΔFC) foram analisadas pelo teste de análise de variância de um fator (*one-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, utilizando como variável o tratamento (controle ou droga). Para a representação gráfica e análise estatística, o período de 180 min de ER foram transformados em uma média total de variação ± EPM.

Os dados de variabilidade da frequência cardíaca e sensibilidade do barorreflexo espontâneo foram analisados pelo teste de análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey, utilizando-se como

variáveis os fatores do tratamento (controle ou droga) e o tempo como medida repetida. Para representação gráfica, cada parâmetro foi analisado em um registro de 10 minutos estacionários contidos em cinco períodos distintos: período basal inicial, período basal após o tratamento, primeira hora de ER, segunda hora de ER e terceira hora de ER.

Por fim, os dados funcionais e hormonais foram analisados pelo teste de análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey, utilizando como variável o tratamento (controle ou droga). Para representação gráfica, cada parâmetro analisado foi determinado em um grupo naive (controle sem cirurgias, sem tratamento e sem estresse) e imediatamente após o protocolo de ER de 180 min.

PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4) PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Abaixo estão descritos os protocolos experimentais realizados nesse estudo. Conforme indicado na figura 1, os animais utilizados nesse estudo passaram por cirurgia para canulação da artéria e veia femoral (1d) para registro dos parâmetros cardiovasculares, e tratamentos, respectivamente. No dia do experimento (2d), os animais receberam uma única injeção (tratamento agudo) de veículo (NaCl 0,9%), lisinopril, inibidor da ECA, (0,1, 0,3 ou 1 mg/kg) ou losartan, antagonista seletivo do receptor AT1 (0,3, 1 ou 3 mg/kg), aproximadamente às 07:30h e 30 min após foram submetidos ao ER por 180 min. Posteriormente, os animais foram devidamente eutanasiados e as amostras sanguíneas foram coletadas.

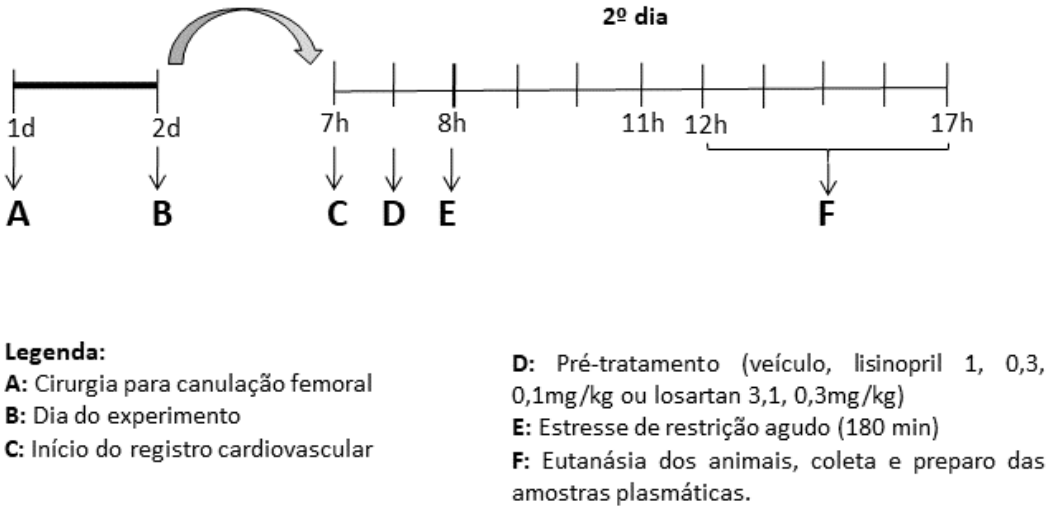

Figura 1. Esquema temporal representativo do protocolo experimental realizado.

4.1. Efeito do ER agudo e influência do SRA sobre alterações autonômicas (PA, FC, HRV e SBR) ocasionadas em ratos: Este protocolo teve por objetivo estudar as alterações cardiovasculares ocasionadas pela exposição de ratos ao ER agudo (180 min), bem como a modulação exercida pela ECA e pelo receptor angiotensinérgico AT1 nestas alterações. Para isso, foram realizados registros da PA e FC de animais estressados tratados com veículo, lisinopril (0,1; 0,3 ou 1 mg/kg) ou losartan (0,3; 1 e 3 mg/kg), de acordo com o organograma apresentado a seguir (Figura 2). Posteriormente, os registros obtidos dos animais tratados com veículo, lisinopril 0,3 ou losartan 1 mg/kg foram analisados no domínio da frequência para determinar a HRV, e no domínio da sequência para avaliação da SBR.

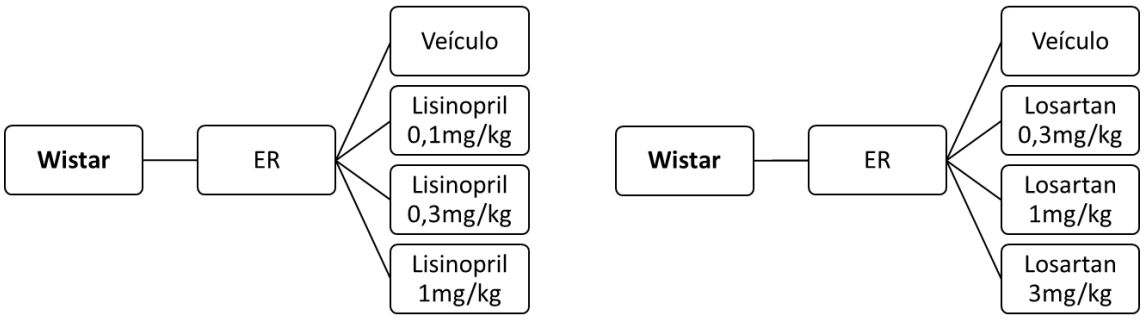

Figura 2. Organograma representativo dos oito grupos utilizados nos protocolos experimentais.

4.2. Efeito do ER agudo e influência do SRA sobre as alterações funcionais ocasionadas em ratos normotensos: Este protocolo teve por objetivo estudar as alterações funcionais ocasionadas pela exposição de ratos ao ER agudo (180 min), bem como a influência exercida pela ECA e pelo receptor angiotensinérgico AT1 nestas alterações. Foram determinados os teores de marcadores de função cardíaca (CK-MB), renal (ureia e creatinina) e hepática (ALT e AST), por meio de método cinético utilizando o plasma de animais naive ou estressados pré-tratados com veículo, lisinopril (0,1, 0,3 ou 1 mg/kg) ou losartan (0,3, 1 e 3 mg/kg), conforme representado no organograma experimental (Figura 2).

4.3. Efeito do ER agudo e influência do SRA sobre a alteração hormonal ocasionadas em ratos normotensos: Este protocolo teve por objetivo analisar as respostas hormonais ocasionadas pela exposição de ratos ao ER agudo (180 min), bem como a modulação exercida pela ECA e pelo receptor angiotensinérgico AT1 nestas alterações. Para atingir este objetivo, foram realizadas dosagens plasmáticas do hormônio corticosterona, através de radioimunoensaio, em animais naive ou estressados pré-tratados com veículo, lisinopril (0,1, 0,3 ou 1 mg/kg) ou losartan (0,3, 1 e 3 mg/kg), conforme representado no organograma experimental (Figura 2).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da administração periférica (i.v) de diferentes doses de Ang-II na ausência e na presença de losartan (antagonista AT1) e Ang-I na presença e na ausência de lisinopril (inibidor da ECA) sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) avaliados.

A análise de duas vias (*two-way* ANOVA) indicou que o pré-tratamento periférico (i.v.) com lisinopril na dose de 0,3 mg/kg reduziu a resposta pressora ocasionada pelo tratamento com Ang-I nas doses de 50 e 250 ng/kg em função do tempo (tratamento: $F_{2,6}$= 8,33, P=0,01; tempo: $F_{2,12}$=115,8, P<0,0001; interação: $F_{4,12}$= 3,352, P=0,04), sem afetar a resposta bradicárdica reflexa (tratamento: $F_{2,6}$=1,30, P>0,05; tempo: $F_{2,12}$= 12,32, P=0,001; interação: $F_{4,12}$=0,73, P>0,05). O pós-teste de Fisher indicou que o pré-tratamento com lisinopril na dose de 0,3 mg/kg não afetou a resposta pressora discreta ocasionada pela dose de 10ng/kg de Ang-I (P>0,05) (Figura 3.A).

Por sua vez, a análise de duas vias (*two-way* ANOVA) indicou que o pré-tratamento periférico (i.v.) com losartan na dose de 1 mg/kg reduziu a resposta pressora ocasionada pelo tratamento com Ang-II nas doses de 25 e 125 ng/kg em função do tempo (tratamento: $F_{2,6}$=8,33, P=0,01; tempo: $F_{2,12}$=115,8, P<0,0001; interação: $F_{4,12}$=3,35, P=0,04), sem afetar a resposta bradicárdica reflexa (tratamento: $F_{2,6}$=0,84, P>0,05; tempo: $F_{2,12}$=38,96, P<0,0001; interação: F4,12=0,97, P>0,05). O pós-teste de Fisher indicou que o pré-tratamento com losartan na dose de 1 mg/kg não afetou a resposta pressora discreta ocasionada pela dose de 5ng/kg de Ang-II (P>0,05) (Figura 3.B)

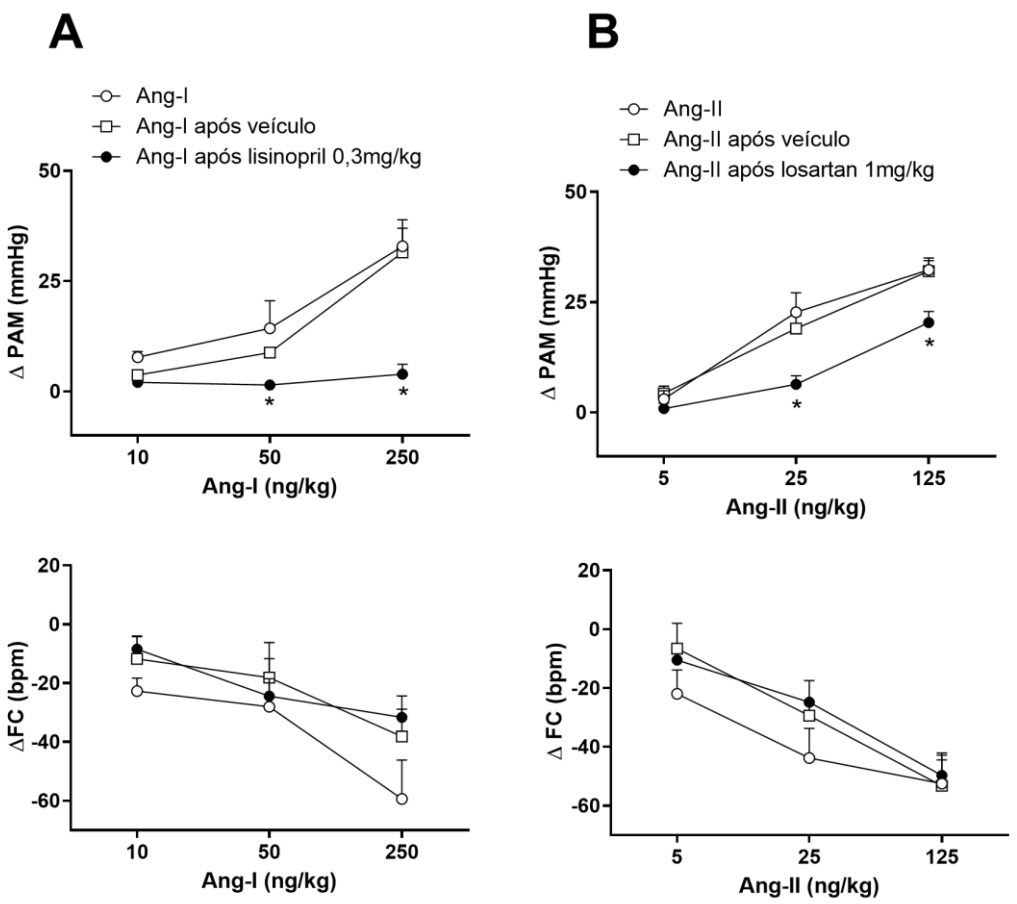

Figura 3. (A) Variação da pressão arterial (ΔPAM) e da frequência cardíaca (ΔFC) ocasionada pela injeção i.v. de diferentes doses de Ang-II (0, 25 e 125 ng/kg, círculos abertos, n=3) antes e após o tratamento i.v. com veículo (NaCl 0,9%, quadrados abertos, n=3) ou losartan (1 mg/kg, círculos fechados, n=3) em ratos. **(B)** Variação da pressão arterial (ΔPAM) e da frequência cardíaca (ΔFC) ocasionada por diferentes doses de Ang-I (0, 50 e 250 ng/kg, círculos abertos, n=3), antes e após o tratamento i.v. com veículo (NaCl, 0,9%, quadrados abertos, n=3) ou lisinopril (0,3 mg/kg, círculos fechados, n=3). Pontos indicam a média e as barras o EPM. * indica diferença significativa quando comparado ao grupo veículo, P<0.05. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Fisher.

5.2. Efeito da administração periférica de diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) ocasionados pelo ER.

O teste t de Student pareado indicou que os pré-tratamentos sistêmicos com lisinopril (1; 0,3 e 0,1 mg/kg) não alteraram os valores basais de PA e FC. A análise de uma via (one-way ANOVA) indicou que as basais de PA e FC não foram diferentes entre os grupos veículo e lisinopril 1; 0,3 ou 0,1 mg/kg. (Tabelas 1 e 2).

A análise de duas vias (*two-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Fisher, indicou que o pré-tratamento periférico (i.v.) com lisinopril nas doses de 1; 0,3 e 0,1 mg/kg reduziu a resposta pressora, em função do tempo (tratamento: $F_{3,20}$=4,40, P=0,01; tempo: $F_{63,1260}$=13,36, P<0,0001; interação: $F_{189,1260}$=1,27, P=0,01), sem afetar a resposta taquicárdica (tratamento: $F_{3,20}$=1,85, P>0,05; tempo: $F_{63,1260}$=7,31, P<0,0001; interação: $F_{189,1260}$=0,76, P>0,05), induzidas pelo ER, quando comparado ao grupo veículo (Figura 4.A).

Entretanto, a análise de uma via (*one-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, indicou que todas as doses de lisinopril utilizadas reduziram a média total de variação (média de 180 pontos) da resposta pressora (ΔPAM) (F=32,72 P<0,0001) desencadeada pelo ER. O pós-teste de Bonferroni também indicou diferença significativa entre a redução da resposta pressora ocasionada pelas doses de 0,3 e 0,1 mg/kg de lisinopril, quando comparadas à maior dose utilizada (1 mg/kg) (P<0,05), e entre as doses de 0,3 e 0,1 mg/kg de lisinopril (P<0,05) (Figura 4.B).

Em adição, a análise de uma via (*one-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, indicou que todas as doses de lisinopril utilizadas alteraram a média total de variação (média de 180 pontos) da resposta taquicárdica (ΔFC) (F=123,6, P<0,0001) desencadeada pelo ER, quando comparada a ΔFC do grupo veículo. O pós-teste de Bonferroni também indicou diferença significativa entre as doses de 0,3 e 0,1 mg/kg de lisinopril, quando comparadas a maior dose utilizada (1 mg/kg) (P<0,05), uma vez que esta dose do inibidor da ECA potencializou a média total de variação (média de 180 pontos) da resposta taquicárdica (ΔFC), enquanto as doses de 0,3 e 0,1 mg/kg reduziram a média total de variação da resposta taquicárdica desencadeadas pelo ER (Figura 4.B)

Tabela 1. Valores de pressão arterial média (PAM) basais antes e após o pré-tratamento com veículo ou diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) via i.v. em ratos.

		PAM ±EPM (mmHg)			
Lisinopril (mg/kg)	**n=**	**Antes**	**Após**	**t**	**P**
0	8	94,06 ± 2,98	95,09 ± 2,60	0,85	>0,05
0,1	5	100,3 ± 4,37	101,5 ± 1,67	0,34	>0,05
0,3	5	97,81 ± 2,43	99,83 ± 2,52	0,71	>0,05
1	6	93,92 ± 4,02	91,45 ± 5,87	1,01	>0,05
		F=0,75, P>0,05	*F=0,23, p>0,05*		

Tabela 2. Valores de frequência cardíaca (FC) basais antes e após o pré-tratamento com veículo ou diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) via i.v. em ratos.

		FC ±EPM (bpm)			
Losartan (mg/kg)	**n=**	**Antes**	**Após**	**t**	**P**
0	8	361,8 ± 10,58	372,7 ± 7,14	1,49	>0,05
0,1	5	352,8 ± 12,48	370,3 ± 11,80	1,50	>0,05
0,3	5	358,6 ± 8,66	361,1 ± 9,78	0,19	>0,05
1	6	364,4 ± 10,82	370,5 ± 9,76	1,97	>0,05
		F=0,18, P>0,05	*F=0,83, P>0,05*		

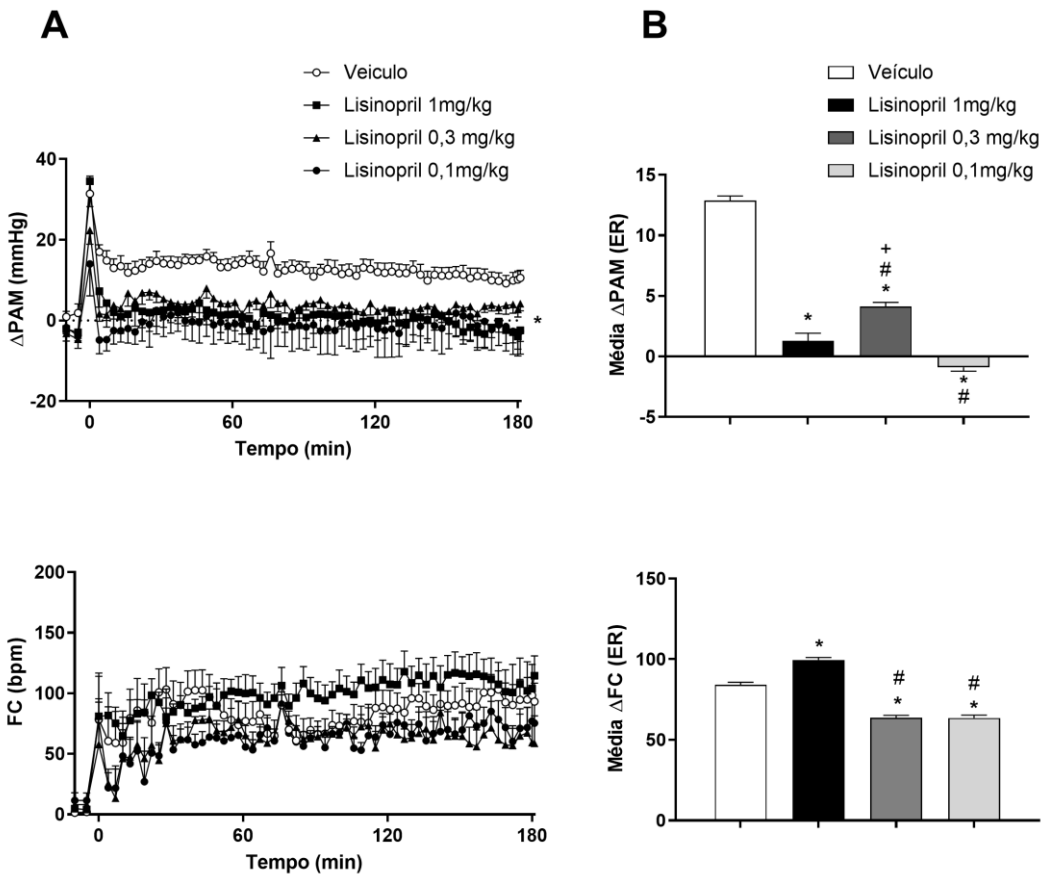

Figura 4. (A) Variação da pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC) de ratos submetidos ao ER (180 min) e pré-tratados i.v. com veículo (NaCl 0,9% círculos abertos, n=8) ou lisinopril 1, 0,3 ou 0,1 mg/kg (quadrados, triângulos, círculos fechados n=6, 5, 5, respectivamente). No tempo 0min os animais foram submetidos ao ER. Pontos representam as médias e as barras o EPM, * indica diferença significativa entre o grupo tratado com lisinopril e o grupo tratado com veículo. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Fisher. **(B)** Média da variação de PAM (ΔPAM) e da frequência cardíaca (ΔFC) do grupo tratado com veículo ou lisinopril 1, 0,3 ou 0,1 mg/kg durante à exposição ao ER. Colunas representam a média e as barras o EPM. * indica diferença significativa quando comparado ao grupo veículo, # indica diferença significativa quando comparado ao grupo lisinopril 1 mg/kg, + indica diferença significativa quando comparado ao grupo lisinopril 0,1 mg/kg, P<0,05. *One-way* ANOVA, pós-teste Bonferroni.

5.3. Efeito da administração periférica de diferentes doses de losartan (antagonista seletivo do receptor AT1) sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) ocasionados pelo ER.

O teste t de Student pareado indicou que os pré-tratamentos sistêmicos com losartan (3, 1 e 0,3 mg/kg) não alteraram os valores basais de PA e FC. A análise de uma via (one-way ANOVA) indicou que as basais de PA e FC não foram diferentes entre os grupos veículo e losartan (3, 1 ou 0,3 mg/kg) (Tabelas 3 e 4).

A análise de duas vias (*two-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Fisher, indicou que o pré-tratamento periférico (i.v.) com losartan na doses de 3, 1 e 0,3 mg/kg não afetou a resposta pressora (tratamento: $F_{3,20}$=1,99 P>0,05; tempo $F_{63,1260}$=9,14, P<0,0001; interação: $F_{189,1260}$=1,35, P=0,020) nem a resposta taquicárdica (tratamento: $F_{3,20}$=1,17 P>0,05; tempo: $F_{63,1260}$=8,28, P<0,0001; interação: $F_{189,1260}$=1,27, P=0,0104) ocasionadas pela exposição ao ER (Figura 5.A)

Entretanto, a análise de uma via (*one-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, indicou que todas as doses de losartan utilizadas reduziram a média total de variação (média de 180 pontos) da resposta pressora (ΔPAM) (F=67,50 P<0,0001) desencadeada pelo ER. O pós-teste de Bonferroni também indicou diferença significativa na redução da resposta pressora ocasionada pelas doses de 3 e 1 mg/kg de losartan, quando comparadas à menor dose utilizada (0,3 mg/kg) (Figura 5.B).

Além disso, a análise de uma via (*one-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, indicou que todas as doses de losartan utilizadas alteraram a média total de variação (média de 180 pontos) da resposta taquicárdica (ΔFC) (F=50,09, P<0,0001) desencadeada pelo ER, quando comparada a ΔFC do grupo veículo. O pós-teste de Bonferroni também indicou diferença significativa entre as doses de 1 e 0,3 mg/kg de losartan, quando comparadas a maior dose utilizada (3 mg/kg) (P<0,05), e entre as doses de 1 e 0,3 mg/kg de losartan (P<0,05) (Figura 5.B).

Tabela 3. Valores de pressão arterial média (PAM) antes e após o pré-tratamento com veículo ou diferentes doses de losartan (antagonista seletivo do receptor AT-1) via i.v. em ratos.

		PAM ±EPM (mmHg)			
Losartan (mg/kg)	**n=**	**Antes**	**Após**	**t**	**P**
0	8	94,06 ± 2,98	95,09 ± 2,60	0,85	>0,05
0,3	5	97,05 ± 5,46	98,25 ± 5,88	0,70	>0,05
1	6	100,20 ± 3,85	101,9 ± 4,76	0,76	>0,05
3	5	108,9 ± 5,24	109,6 ± 5,45	0,36	>0,05
		F=3,27, P>0,05	*F=1,94, P>0,05*		

Tabela 4. Valores de frequência cardíaca (FC) antes e após o pré-tratamento com veículo ou diferentes doses de losartan (antagonista seletivo do receptor AT-1) via i.v. em ratos.

		FC ±EPM (bpm)			
Losartan (mg/kg)	**n=**	**Antes**	**Após**	**t**	**P**
0	8	361,8 ± 10,58	372,7 ± 7,14	1,49	>0,05
0,3	5	379,1 ± 4,80	387,4 ± 5,10	1,48	>0,05
1	6	373,3 ± 12,02	393,8 ± 7,75	2,22	>0,05
3	5	374,2 ± 14,54	389,8 ± 9,67	1,49	>0,05
		F=0,47, P>0,05	*F=1,71, P>0,05*		

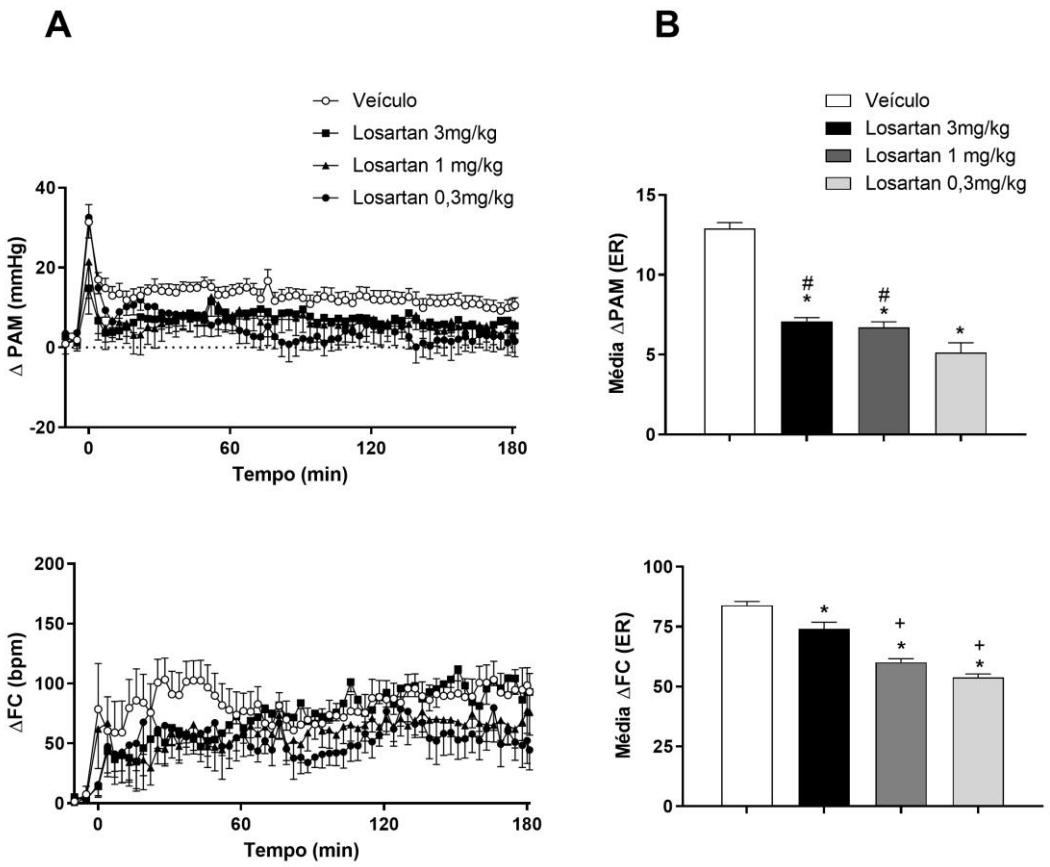

Figura 5.(A) Variação da pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC) de ratos submetidos ao ER (180 min) e pré-tratados i.v. com veículo (NaCl 0,9%, círculos abertos, n=8) ou losartan 3, 1 ou 0,3 mg/kg (quadrados, triângulos, círculos fechados n=5, 6, 5, respectivamente). No tempo 0min os animais foram submetidos ao ER. Pontos representam as médias e as barras o EPM, * indica diferença significativa quando comparado ao grupo tratado com veículo. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Fisher. **(B)** Média da variação de PAM (ΔPAM) e da frequência cardíaca (ΔFC) dos grupos tratados com veículo ou losartan 3, 1 e 0,3 mg/kg durante à exposição ao ER. Colunas representam a média e as barras o EPM. * indica diferença significativa quando comparado ao grupo veículo, # indica diferença significativa quando comparado ao grupo losartan 0,3 mg/kg, + indica diferença significativa quando comparado ao grupo losartan 3 mg/kg, P<0,05. *One-way* ANOVA, pós-teste Bonferroni.

5.4. Efeito da administração periférica de diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) e losartan (antagonista seletivo do receptor AT1) sobre a variabilidade da frequência cardíaca (PAS e IP) de animais submetidos ao ER.

As figuras 6, 7 e 8 indicam, respectivamente, a PAS, variabilidade total e potência da banda LF da PAS em condições basais antes, após os tratamentos e durante as três horas de ER. A análise *two-way* ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey, indicou que os tratamentos utilizados não afetaram a PAS (tratamento: $F_{2,11}$=0,08, P>0,05; tempo: $F_{4,44}$=4,74, P=0,0029; interação: F8,44=3,15, P>0,05), e variabilidade total da PAS (tratamento: $F_{2,11}$=0,52, P>0,05; tempo: $F_{4,44}$=2,83, P=0,03; interação: $F_{8,44}$=1,49, P>0,05) (Figuras 6 e 7). Com relação a potência da banda de LF do espectro da pressão arterial sistólica (PAS), a análise *two-way* ANOVA não indicou diferença significativa entre os tratamentos (tratamento: $F_{2,11}$=1,94, P>0,05; tempo: $F_{4,44}$=3,67, P=0,01; interação: $F_{8,44}$=1,18, P>0,05), entretanto a análise ponto-a-ponto realizada pelo pós-teste de Tukey indicou diferença significativa entre os grupos veículo e lisinopril 0,3 mg/kg no período basal pós-tratamento (Figura 8).

A análise *two-way* ANOVA indicou que o tratamento afetou de maneira significativa a potência da banda de VLF do espetro da PAS (tratamento: $F_{2,11}$=13,72, P=0,001; tempo: $F_{4,44}$=4,02, P=0,007; interação: $F_{8,44}$=2,58, P>0,05). O pós-teste de Tukey indicou que o tratamento com losartan 1 mg/kg aumentou de maneira significativa a potência de banda de VLF na terceira hora de ER, quando comparada ao veículo no mesmo período de tempo (P<0,05). Em

adição, o tratamento com losartan 1 mg/kg diferiu do tratamento com lisinopril 0,3 mg/kg nas três horas de ER ($P<0,05$), uma vez que este último ocasionou tendência de redução da potência de banda de VLF (Figura 9).

No que concerne ao IP, as figuras 10 e 11 representam o IP e a variabilidade total do IP em condições basais antes, após os tratamentos e durante as três horas de ER. A análise *two-way* ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey indicou que os tratamentos utilizados não alteraram o IP (tratamento: $F_{2,11}=1,87$, $P>0,05$; tempo: $F_{4,44}=28,89$, $P<0,0001$; interação: $F_{8,44}=0,76$, $P>0,05$) e a variabilidade total do IP (tratamento: $F_{2,11}=0,05$, $P>0,05$; tempo: $F_{4,44}=0,51$, $P>0,05$, interação: $F_{8,44}=3,22$, $P=0,0057$) (Figuras 10 e 11).

Com relação à potência das bandas de LF e HF do IP (Figura 12), a análise *two-way* ANOVA indicou que os pré-tratamentos realizados não alteraram de maneira significativa a potência da banda de LF (tratamento: $F_{2,11}=2,27$, $P>0,05$; tempo: $F_{4,44}=7,53$, $P<0,0001$; interação: $F_{8,44}=1,75$, $P>0,05$). Entretanto, a análise ponto-a-ponto realizada pelo pós-teste de Tukey indicou que o pré-tratamento com lisinopril 0,3 mg/kg aumentou significativamente a potência da banda de LF na terceira hora de ER ($P<0,05$), quando comparada ao grupo veículo no mesmo período de tempo. Foi possível observar, ainda, diferença estatisticamente significativa na potência da banda de LF na terceira hora de ER entre os grupos lisinopril 0,3 mg/kg e losartan 1 mg/kg ($P<0,05$) (Figura 12.A). A análise de duas vias (two-way ANOVA) da potência da banda de HF, por sua vez, indicou aumento significativo de HF no grupo pré-tratado com losartan 1 mg/kg (tratamento: $F_{2,11}=4,29$, $P=0,04$; tempo: $F_{4,44}=0,33$, $P>0,05$;

interação: $F_{8,44}$=1,59, P>0,05) na primeira hora do ER, quando comparada ao grupo veículo no mesmo período de tempo (Figura 12.B).

A figura 13 mostra as potências das bandas de LF e HF do espectro do IP em unidades normalizadas (u.n). A análise *two-way* ANOVA indicou que os pré-tratamentos realizados não alteraram a potência da banda de LF (u.n) (tratamento: $F_{2,11}$=1,59, P>0,05; tempo: $F_{4,44}$=11,93, P<0,0001; interação: $F_{8,44}$= 1,88, P>0,05). Entretanto, foi possível observar que o pré-tratamento com losartan 1 mg/kg reduziu de maneira significativa a potência da banda de LF (u.n) na primeira hora do ER, quando comparada ao grupo veículo no mesmo período de tempo na análise ponto-a-ponto realizada pelo pós-teste de Tukey (Figura 13.A). Em adição, os pré-tratamentos realizados não afetaram de maneira significativa a potência da banda de HF (u.n) (tratamento: $F_{2,11}$=0,02, P>0,05; tempo: $F_{4,44}$=9,00, P<0,0001; interação: $F_{8,44}$= 1,46, P>0,05, *two-way* ANOVA, pós-teste de Tukey) (Figura 13.B).

Por fim, a figura 14 representa a razão entre as potências de LF e HF (LF/HF). Apesar da análise de duas vias (*two-way* ANOVA) indicar que os pré-tratamentos realizados não afetaram de maneira significativa a razão de LF/HF (tratamento: $F_{2,11}$=1,93, P>0,05; tempo: $F_{4,44}$=10,87, P<0,0001; interação: $F_{8,44}$= 2,48, P=0,02), a análise ponto-a-ponto realizada pelo pós-teste de Tukey indicou que o pré-tratamento com losartan 1 mg/kg reduziu a razão LF/HF na primeira hora de ER, quando comparada ao grupo veículo no mesmo período de tempo (P<0,05), além disso, foi possível observar diferença significativa entre a razão

LF/HF dos grupos lisinopril 0,3 mg/kg e losartan 1 mg/kg na terceira hora do ER ($P<0,05$) (Figura 14).

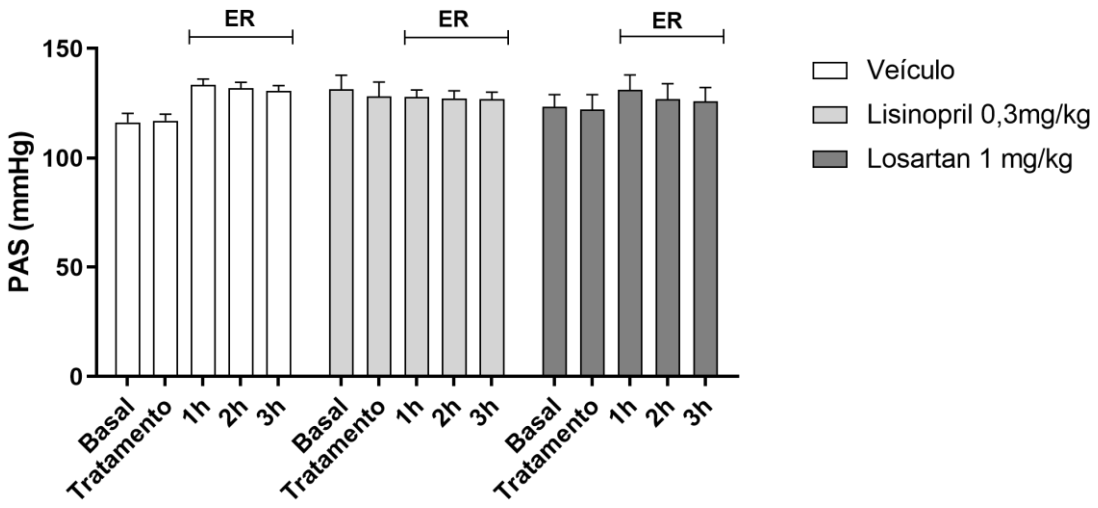

Figura 6. Pressão arterial sistólica (PAS) de ratos submetidos ao ER (3h) e pré-tratados i.v. com veículo (NaCL 0,9%, barras brancas, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barras cinza-claro, n=4) ou losartan 1 mg/kg (barras cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

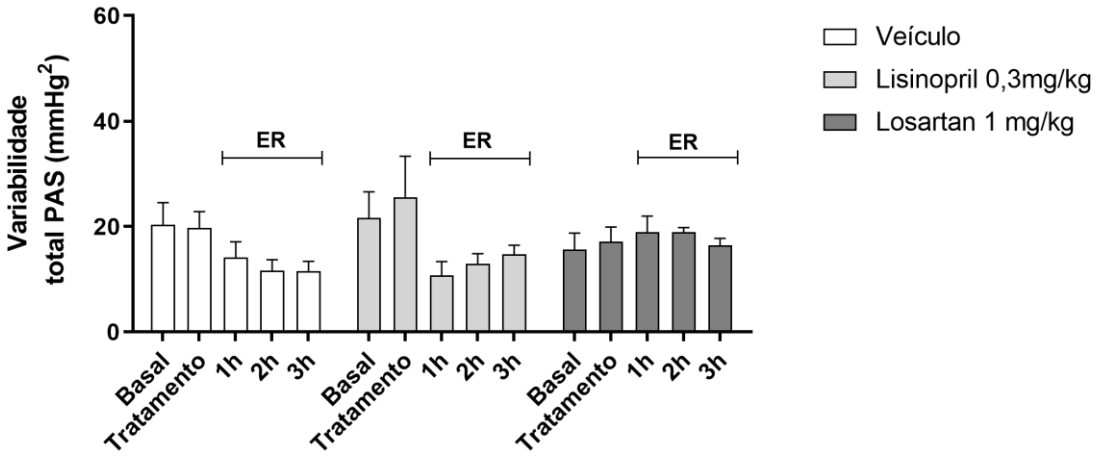

Figura 7. Variabilidade total da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos submetidos ao ER (3h) e pré-tratados i.v. com veículo (NaCL 0,9%, barras brancas, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barras cinza-claro, n=4) ou losartan 1 mg/kg (barras cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

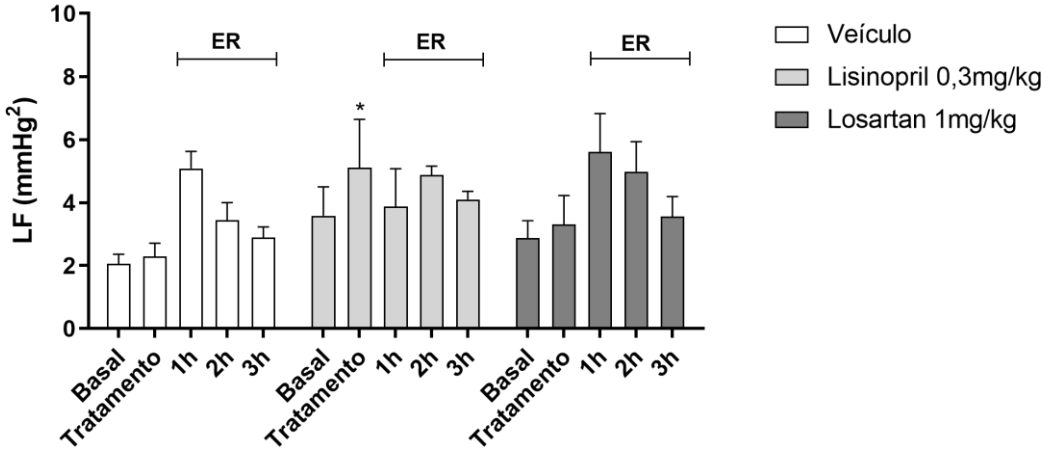

Figura 8. Potência da banda de baixa frequência (LF) do espectro da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos submetidos ao ER (3h) e pré-tratados i.v. com veículo (NaCL 0,9%, barras brancas, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barras cinza-claro, n=4) ou losartan 1 mg/kg (barras cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. * indica diferença significativa quando comparado ao grupo veículo, no mesmo período de tempo, P<0,05. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

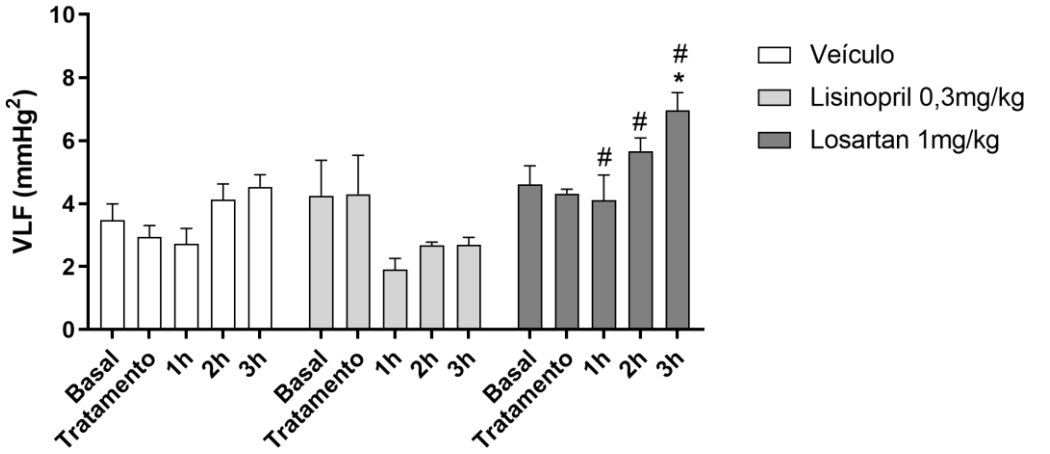

Figura 9. Potência da banda de muito baixa frequência (VLF) do espectro da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos submetidos ao ER (3h) e pré-tratados i.v. com veículo (NaCL 0,9%, barras brancas, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barras cinza-claro, n=4) ou losartan 1 mg/kg (barras cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. * indica diferença significativa quando comparado ao grupo veículo, no mesmo período de tempo, P<0,05. # indica diferença significativa quando comparado ao grupo lisinopril 0,3 mg/kg, no mesmo período de tempo. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

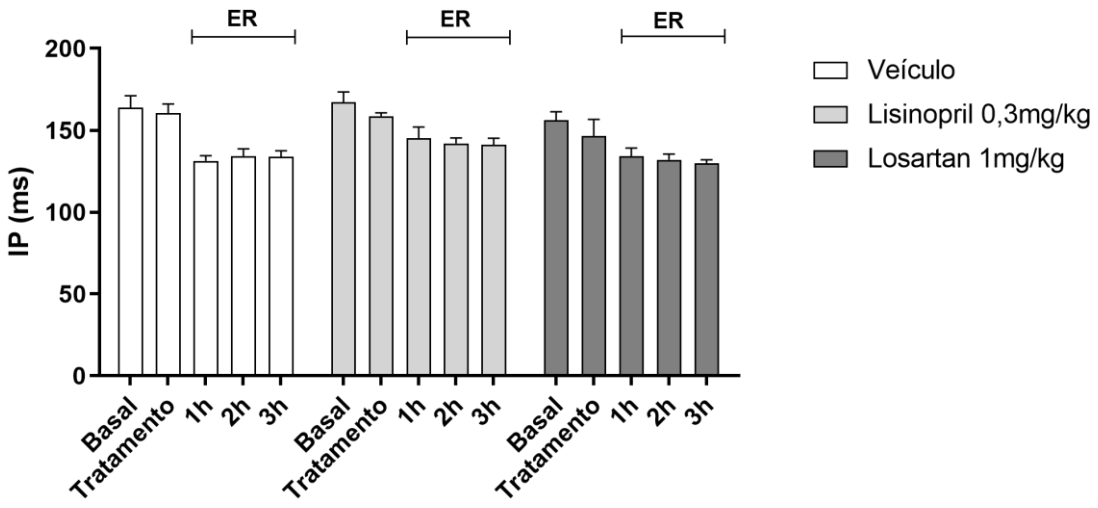

Figura 10. Intervalo de pulso (IP) de ratos submetidos ao ER (3h) e pré-tratados i.v. com veículo (NaCL 0,9%, barras brancas, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barras cinza-claro, n=4) ou losartan 1 mg/kg (barras cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

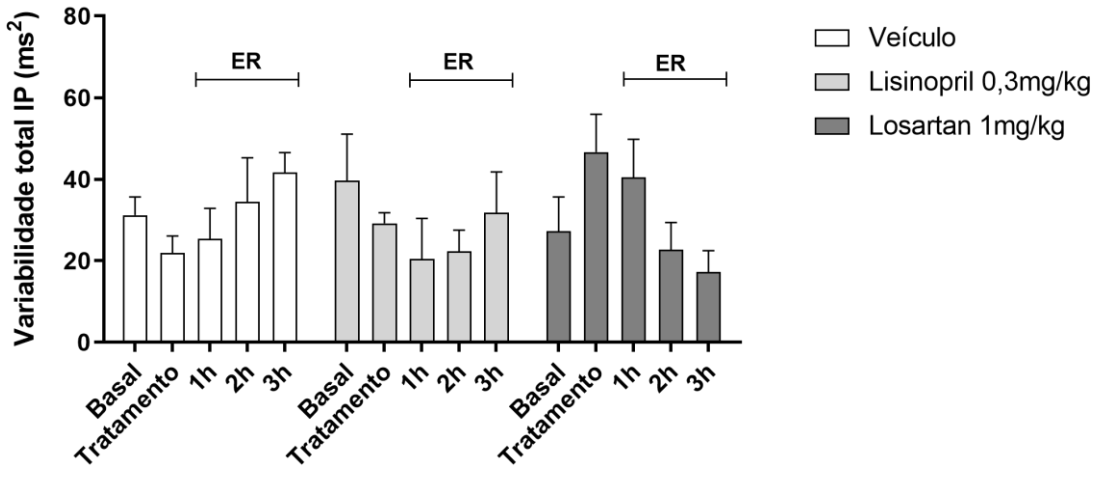

Figura 11. Variabilidade total do intervalo de pulso (IP) de ratos submetidos ao ER (3h) e pré-tratados i.v. com veículo (NaCL 0,9%, barras brancas, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barras cinza-claro, n=4) ou losartan 1 mg/kg (barras cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

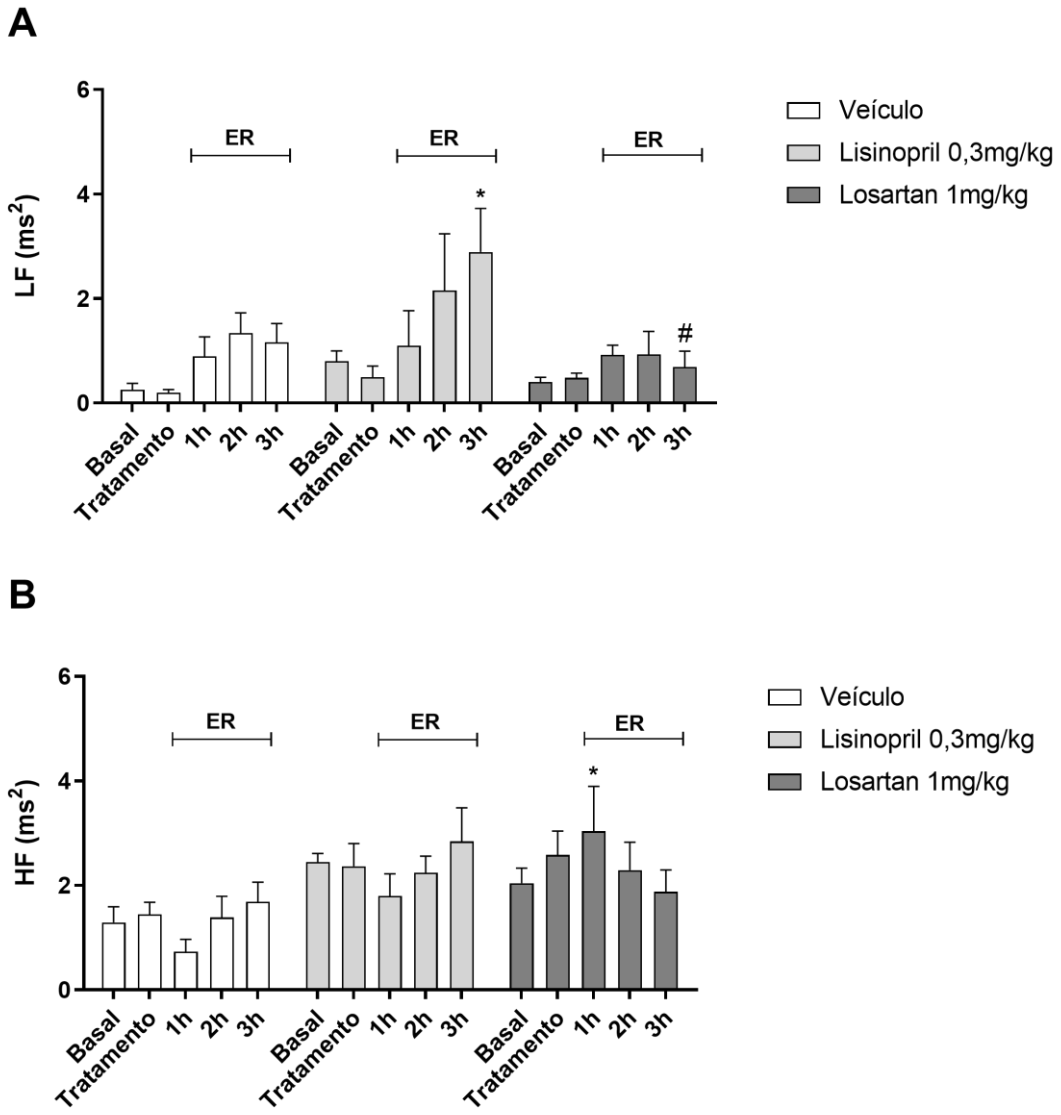

Figura 12. (A) Potência da banda de baixa frequência (LF); **(B)** e alta frequência (HF) do espectro do intervalo de pulso de ratos submetidos ao ER (3h) e pré-tratados i.v. com veículo (NaCL 0,9%, barras brancas, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barras cinza-claro, n=4) ou losartan 1 mg/kg (barras cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. * indica diferença significativa quando comparado ao grupo veículo, no mesmo período de tempo, P<0,05. # indica diferença significativa quando comparado ao grupo lisinopril 0,3 mg/kg, no mesmo período de tempo. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

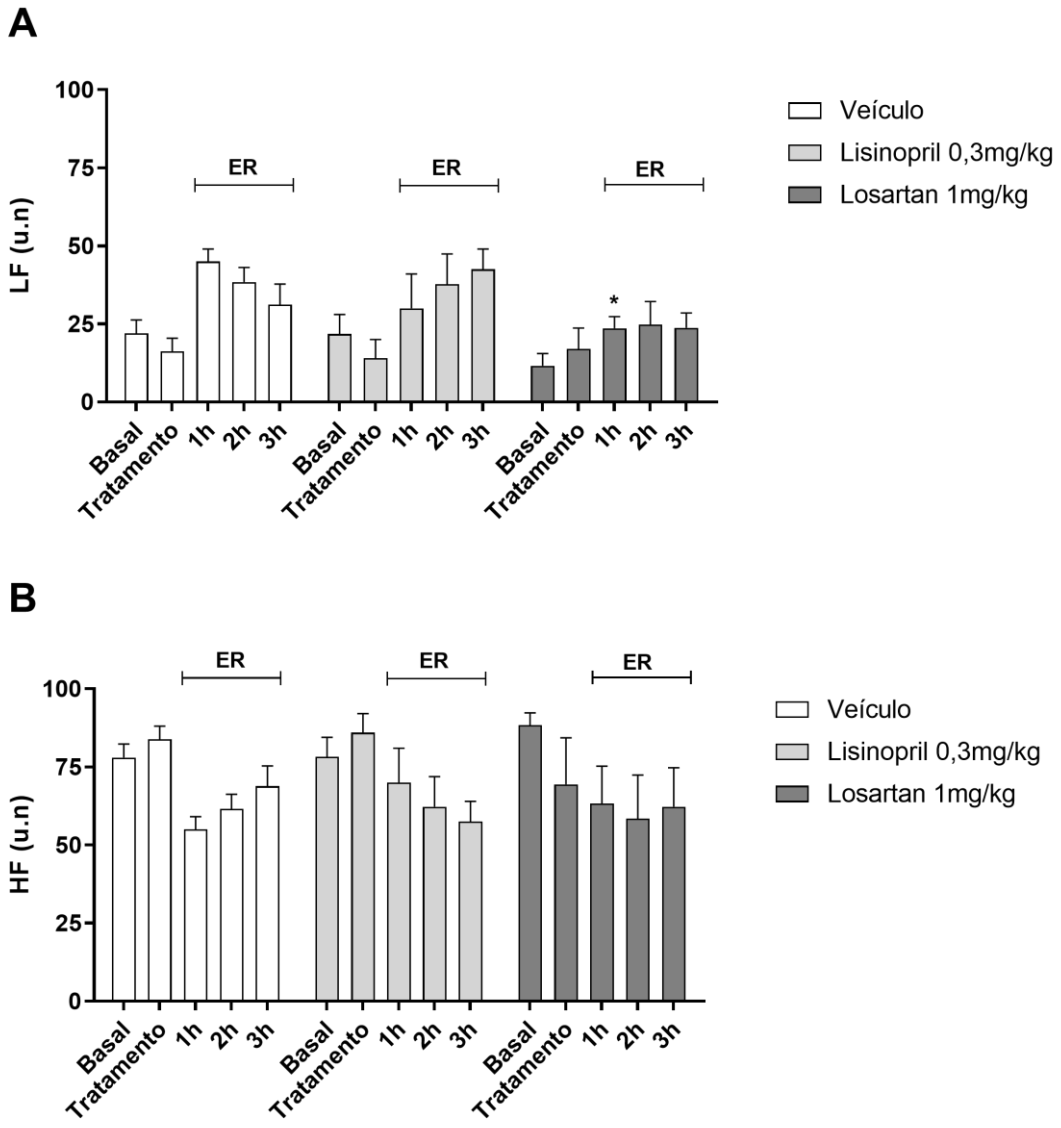

Figura 13. (A) Potência da banda de baixa frequência (LF) e **(B)** e alta frequência (HF) em unidades normalizadas (u.n.) do espectro do intervalo de pulso de ratos submetidos ao ER (3h) e pré-tratados i.v. com veículo (NaCL 0,9%, barras brancas, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barras cinza-claro, n=4) ou losartan 1 mg/kg (barras cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. * indica diferença significativa quando comparado ao grupo veículo, no mesmo período de tempo, P<0,05. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

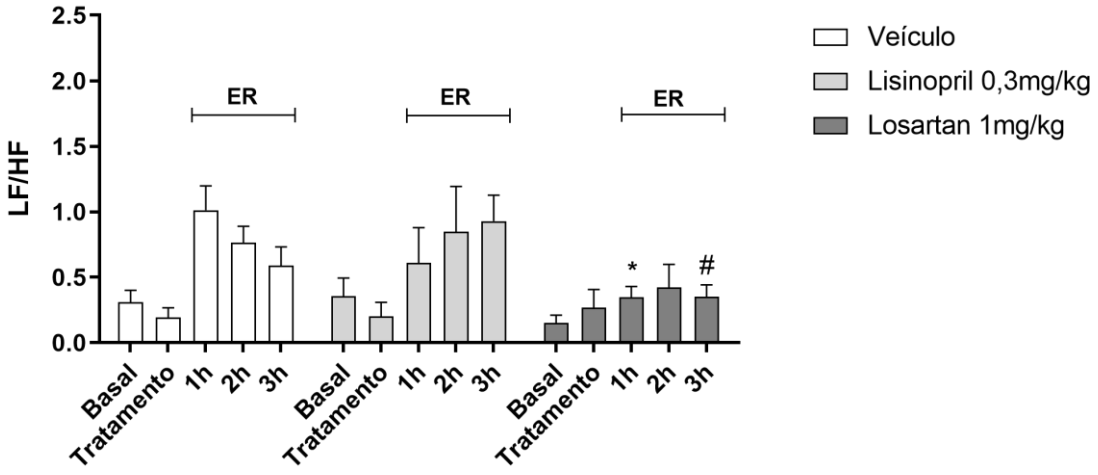

Figura 14. Razão entre as potências das bandas de LF/HF do espectro do intervalo de pulso de ratos submetidos ao ER (3h) e pré-tratados i.v. com veículo (NaCL 0,9%, barras brancas, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barras cinza-claro, n=4) ou losartan 1 mg/kg (barras cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. * indica diferença significativa quando comparado ao grupo veículo, no mesmo período de tempo, P<0,05. # indica diferença significativa quando comparado ao grupo lisinopril 0,3 mg/kg, no mesmo período de tempo. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

5.5. Efeito da administração periférica de diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) e losartan (antagonista seletivo do receptor AT1) sobre a sensibilidade do barorreflexo de animais submetidos ao ER.

A figura 15 representa o ganho das sequências barorreflexas. A análise de duas vias (*two-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey não indicou diferença significativa entre os pré-tratamentos realizados nos parâmetros ganho total das sequências barorreflexas (tratamento: $F_{2,11}$=0,65, P>0,05; tempo: $F_{4,44}$=0,99, P>0,05; interação: $F_{8,44}$=1,96, P>0,05, figura 15.A), ganho das sequências UP (tratamento: $F_{2,11}$=1,12, P>0,05; tempo: $F_{4,44}$=0,97, P>0,05; interação: $F_{8,44}$=2,11, P>0,05, figura 15.B) e ganho das sequências DOWN (tratamento: $F_{2,11}$=0,009, P>0,05; tempo: $F_{4,44}$=1,29, P>0,05; interação: $F_{8,44}$=0,75, P>0,05, figura 15.C).

Com relação ao BEI, representado na figura 16, a análise *two-way* ANOVA não indicou diferença significativa dos pré-tratamentos no BEI de todas as sequências (tratamento: $F_{2,11}$=0,65, P>0,05; tempo: $F_{4,44}$=0,99, P>0,05; interação: $F_{8,44}$=1,93, P>0,05). Entretanto, o pós-teste de Tukey indicou que o grupo pré-tratado com losartan 1 mg/kg apresentou redução do BEI das sequências totais, quando comparado ao grupo veículo na terceira hora do ER (P<0,05) (Figura 16.A). Não houve alteração dos pré-tratamentos realizados no BEI das sequências UP (tratamento: $F_{2,11}$=1,24, P>0,05; tempo: $F_{4,44}$=0,97, P>0,05; interação: $F_{8,44}$=2,11, P>0,05), entretanto o pós-teste de Tukey indicou diferença significativa entre os grupos tratados com lisinopril 0,3 mg/kg e losartan 1 mg/kg (P<0,05), quando comparados com o grupo veículo na terceira hora de ER (Figura 16.B). Por fim, não foram observadas alterações significativas dos

pré-tratamentos no BEI das sequências DOWN (tratamento: $F_{2,11}$=0,009, P>0,05; tempo: $F_{4,44}$=1,29, P>0,05; interação: $F_{8,44}$=0,75, P>0,05) (Figura 16.C).

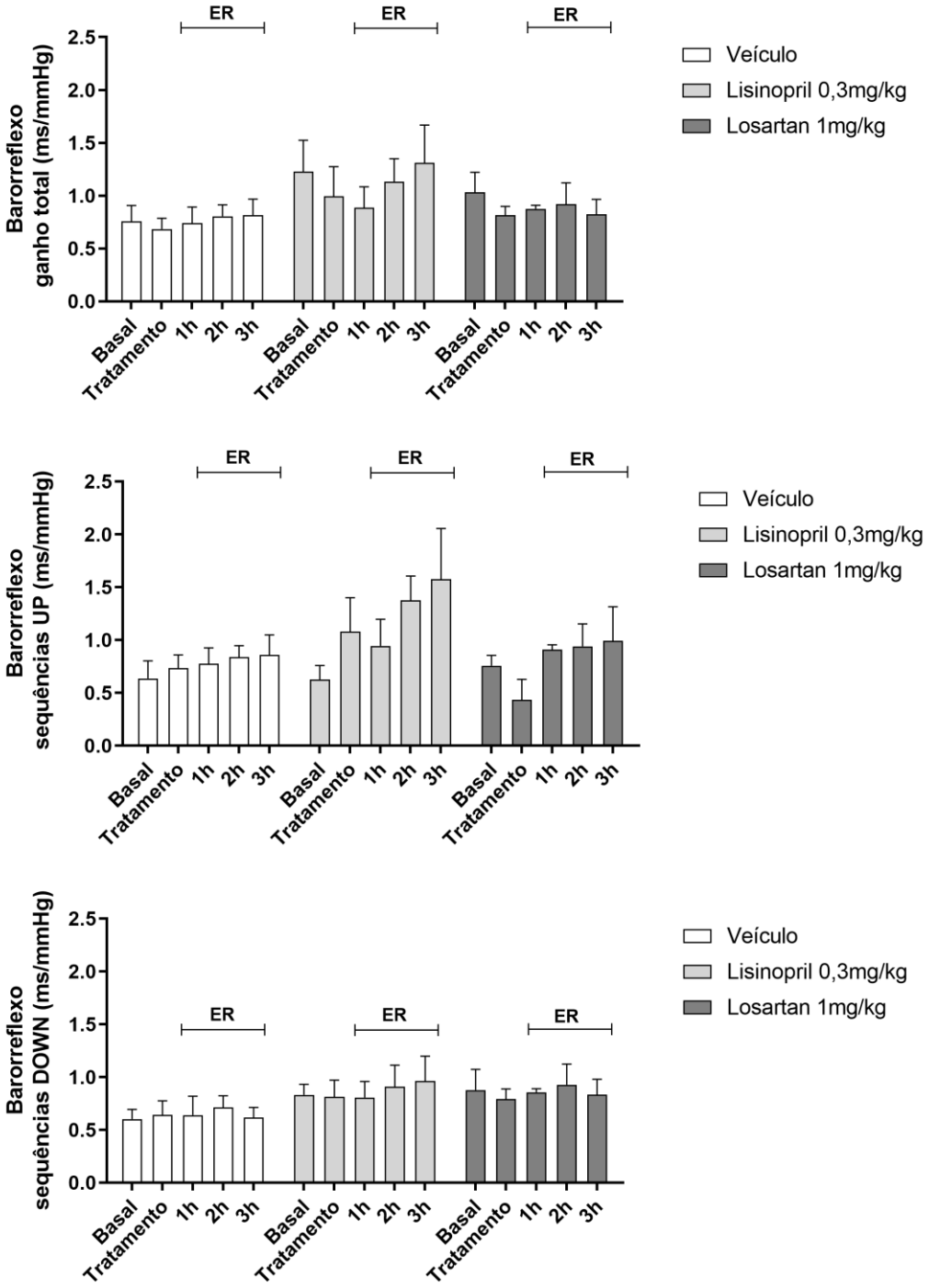

Figura 15. (A) Ganho de todas as sequências barorreflexas, **(B)** ganho das sequências UP, **(C)** Ganho das sequências DOWN de animais submetidos ao ER (3h) e pré-tratados i.v. com veículo (NaCl 0,9%, barras brancas, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barras cinza-claro, n=4) ou losartan 1 mg/kg (barras cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

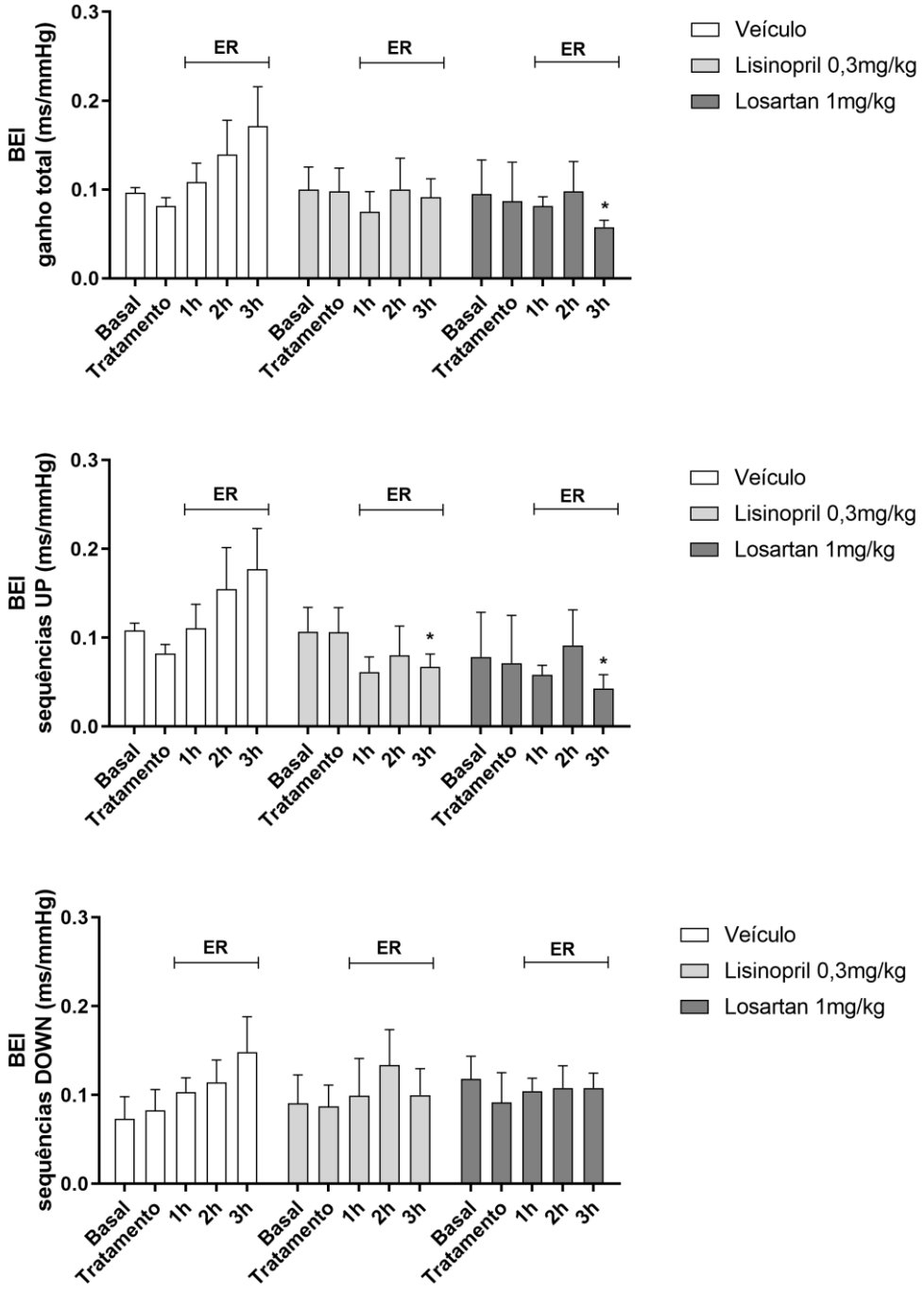

Figura 16. (A) Índice de efetividade do barorreflexo total (BEI), **(B)** BEI das sequências barorreflexas UP e **(C)** BEI de sequências barorreflexa DOWN de animais submetidos ao ER (3h) e pré-tratados i.v. com veículo (NaCl 0,9%, barras brancas, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barras cinza-claro, n=4) ou losartan 1 mg/kg (barras cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. * indica diferença significativa quando comparado ao grupo veículo, no mesmo período de tempo, P<0,05. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

5.6. Efeito da administração periférica de diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) e losartan (antagonista seletivo do receptor AT1) sobre os parâmetros funcionais de animais submetidos ao ER.

A análise de uma via (*one-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey indicou aumento nos níveis plasmáticos da enzima aspartato aminotransferase (AST) (F=3,38, P=0,04) nos animais pré-tratados i.v. com lisinopril, na dose de 0,3 mg/kg e submetidos ao ER, quando comparados aos animais naive (animais não-estressados e não submetidos à cirurgia (Figura 17.B).

Entretanto, a análise de uma via (*one-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey, indicou que o pré-tratamento periférico (i.v) com losartan na dose de 1 mg/kg ou com lisinopril na dose 0,3 mg/kg não afetou as concentrações plasmáticas da enzima alanina aminotransferase (ALT) (F=2,67, P>0,05), da ureia (F=0,87, P>0,05), da creatinina (F=2,17, P>0,05) e da enzima creatinoquinase fração MB (CK-MB) (F=0,77, P>0,05) em animais submetidos ao ER (180 min), quando comparados ao grupo veículo. Além disso, não houve diferença significante nos níveis desses marcadores funcionais nos os animais estressados, quando comparados ao grupo naive (animais não-estressados e não submetidos à cirurgia) (P>0,05) (Figuras 17.A, 18 e 19).

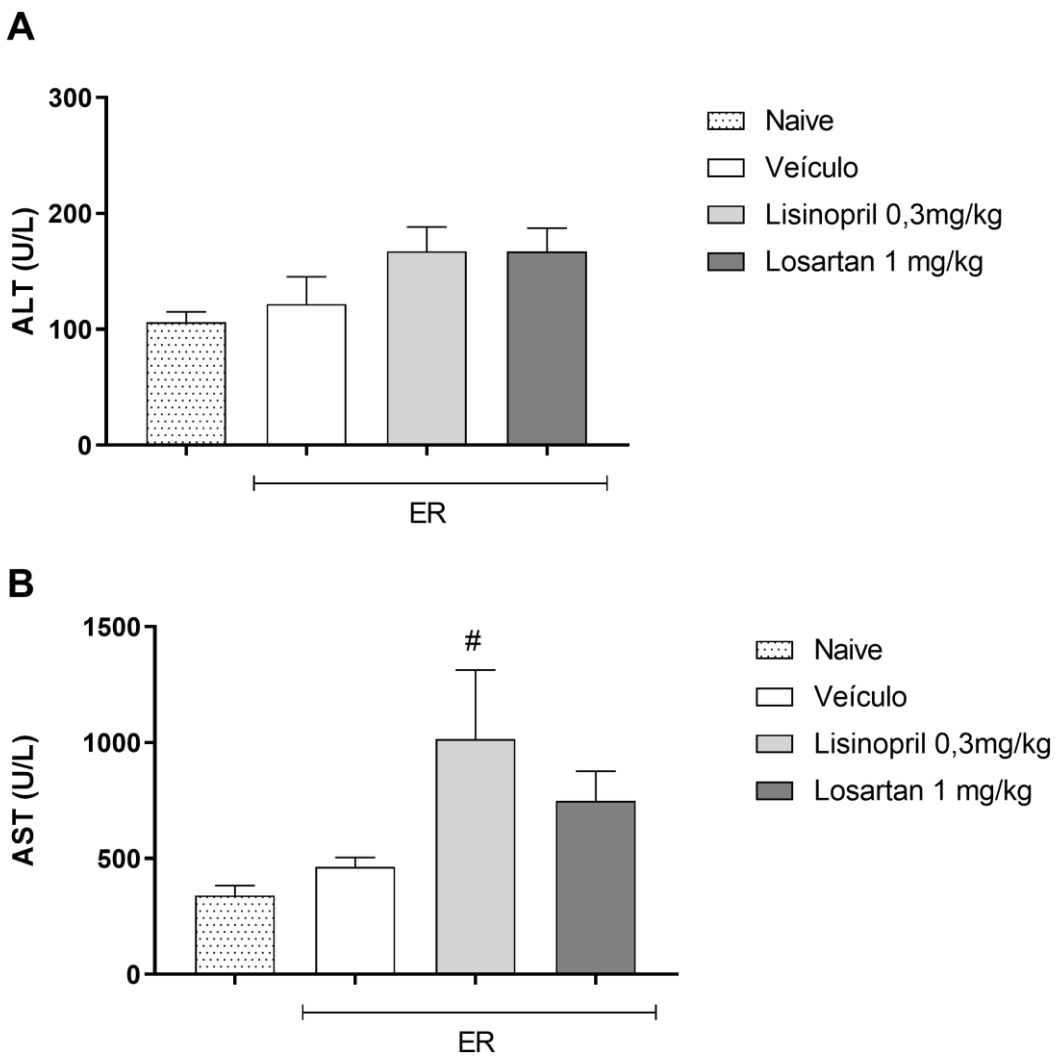

Figura 17. (A) Concentração plasmática da enzima alanina aminotransferase (ALT) e **(B)** aspartato aminotransferase (AST) em ratos naive (barra pontilhada, n=5) ou submetidos ao ER (180 min) e pré-tratados i.v. (30min antes) com veículo (NaCl 09%, barra branca, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barra cinza-claro, n=5) ou losartan 1 mg/kg (barra cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. # indica diferença significativa quando comparado ao grupo naive, P<0,05. *One-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

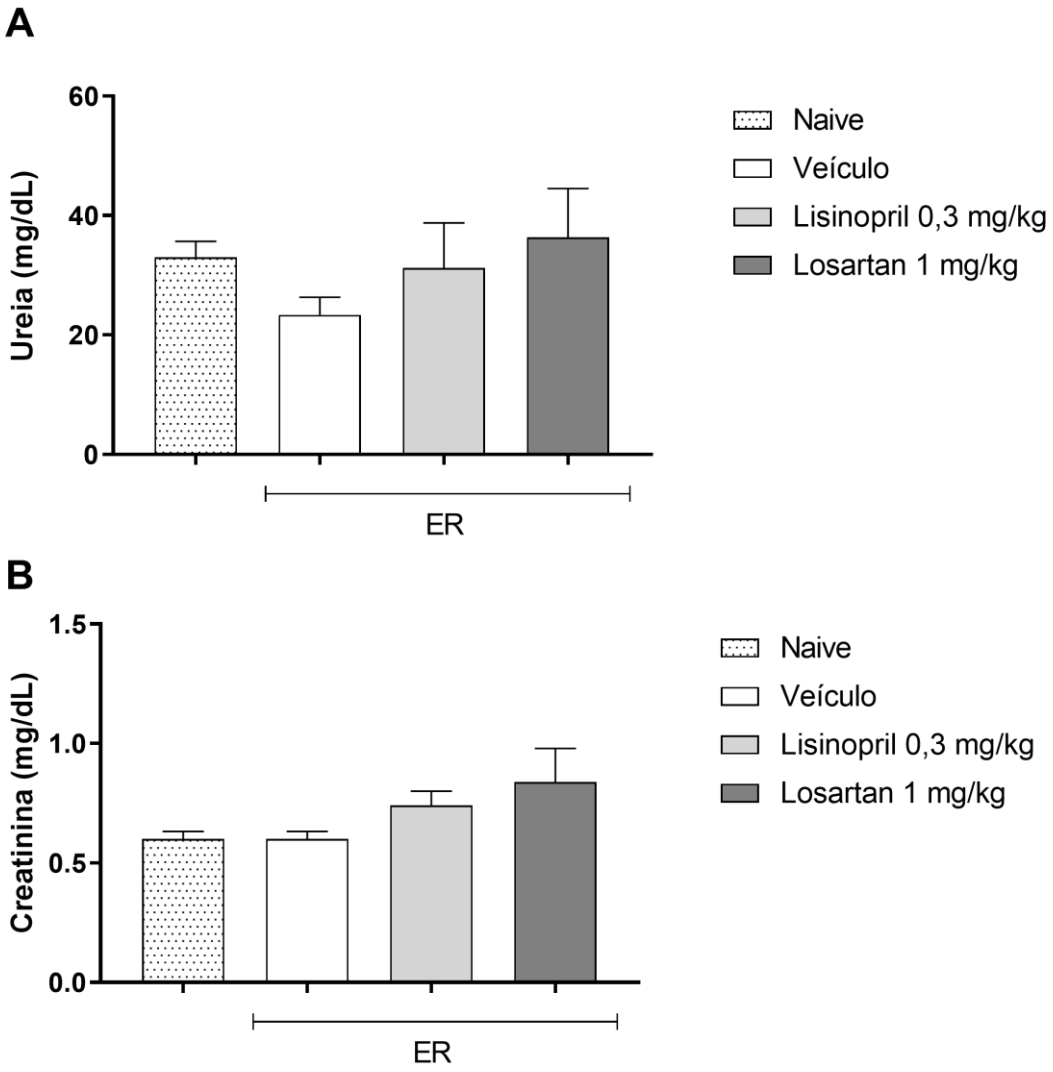

Figura 18. (A) Concentração plasmática de ureia e **(B)** creatinina de ratos naive (barra pontilhada, n=5) ou submetidos ao ER (180 min) e pré-tratados i.v. (30min antes) com veículo (NaCl 09%, barra branca, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barra cinza-claro, n=5) ou losartan 1 mg/kg (barra cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. *One-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

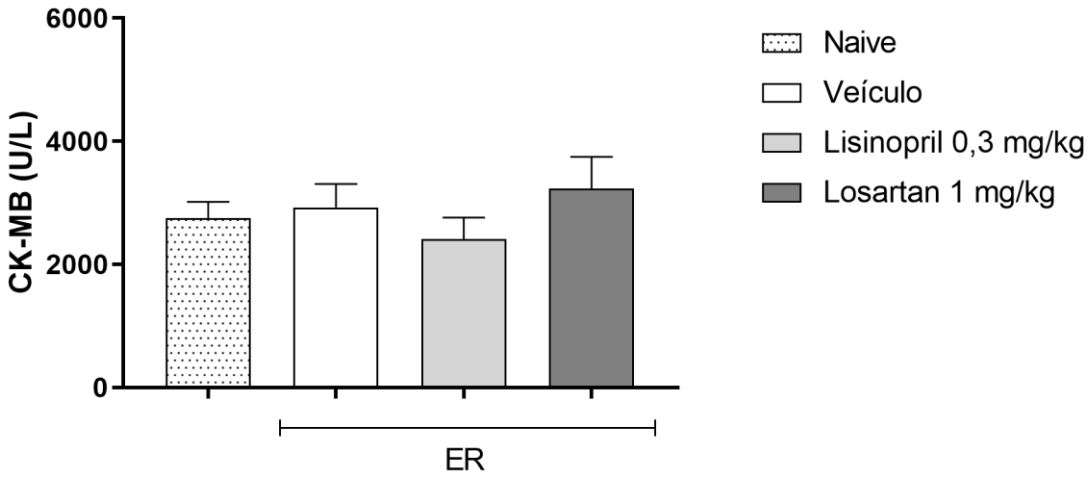

Figura 19. Concentração plasmática da enzima creatinoquinase fração MB (CK-MB) de ratos naive (barra pontilhada, n=5) ou submetidos ao ER (180 min) e pré-tratados i.v. (30min antes) com veículo (NaCl 09%, barra branca, n=5), lisinopril 0,3 mg/kg (barra cinza-claro, n=5) ou losartan 1 mg/kg (barra cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. *One-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

5.7) Efeito da administração periférica de diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) e losartan (antagonista seletivo do receptor AT1) sobre o parâmetro neuroendócrino de animais submetidos ao ER.

A análise de uma via (*one-way* ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey, indicou que o ER aumentou a concentração plasmática de corticosterona (P<0,05). Por sua vez, os pré-tratamentos com lisinopril na dose de 0,3 mg/kg e com losartan na dose de 1 mg/kg reduziram a concentração plasmática de corticosterona (F=9,6, P=0,0009) quando comparada ao grupo pré-tratado com veículo (Figura 20).

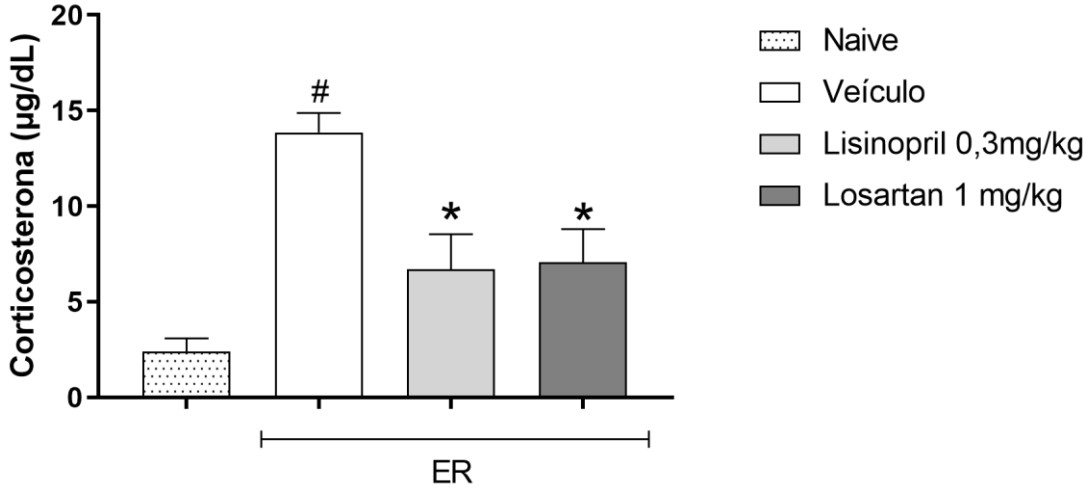

Figura 20. Concentração plasmática de corticosterona de ratos naive (barra pontilhada, n=5) ou submetidos ao ER (180 min) e pré-tratados i.v. (30min antes) com veículo (NaCl 09%, barra branca, n=4), lisinopril 0,3 mg/kg (barra cinza-claro, n=5) ou losartan 1 mg/kg (barra cinza-escuro, n=5). Colunas representam as médias e as barras o EPM. * indica diferença significante quando comparado ao grupo veículo. # indica diferença significante quando comparado ao grupo naive, P<0,05. *One-way* ANOVA, pós-teste de Tukey.

.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A hipótese levantada nesse estudo foi que SRA desempenha um importante papel na modulação das respostas autonômicas, neuroendócrina e funcionais frente ao ER agudo (180 min).

O presente estudo demonstrou que o SRA é capaz de influenciar as respostas autonômicas ocasionadas pelo ER, uma vez que a administração intravenosa de diferentes doses de lisinopril, inibidor da ECA, reduziu a resposta pressora e reduziu a resposta taquicárdica evocadas pelo ER, nas doses de 0,3 e 0,1 mg/kg, sendo a dose de 1 mg/kg de lisinopril capaz de potencializar a resposta taquicárdica frente à esta situação aversiva. O pré-tratamento intravenoso com diferentes doses de losartan, antagonista seletivo dos receptores AT1, reduziu a resposta pressora e a resposta taquicárdica desencadeadas pela exposição a este modelo de estresse inescapável.

Além disso, os pré-tratamentos com losartan 1 mg/kg e lisinopril 0,3 mg/kg alteraram a atividade do SNA avaliada através da variabilidade do intervalo de pulso e a SBR. Nosso estudo também demonstrou que o SRA modula positivamente a atividade a do eixo HPA frente ao ER, uma vez que os fármacos que interferem com o SRA reduziram a liberação de corticosterona ocasionada por exposição a esse modelo aversivo. Observamos ainda que o ER (180min) parece não desencadear uma resposta de dano celular e que o SRA não influencia a liberação sistêmica de enzimas marcadoras de lesão celular do fígado, rim e coração.

A resposta autonômica ocasionada pela exposição ao ER agudo está bem estabelecida na literatura. Elevação de PA e FC ocorrem devido à ativação do sistema nervoso simpático, uma vez que o bloqueio dos receptores α e β-adrenérgicos é capaz de abolir ambas as respostas (DOS REIS et al., 2014); adicionalmente, o bloqueio do sistema nervoso parassimpático ocasiona um aumento da resposta taquicárdica desencadeada por esse modelo de estresse inescapável, sugerindo, assim, que a resposta pressora seja mediada por via simpática, enquanto a resposta taquicárdica é mediada tanto por ativação simpática quanto por modulação parassimpática (BAUDRIE et al., 1997; CARRIVE, 2006).

Adicionalmente, está bem estabelecido que a ativação simpática, via ativação de receptores β-adrenérgicos localizados no aparelho justaglomerular, favorece a ativação da enzima renina, culminando em aumento dos níveis circulantes de Ang-II (SAAVEDRA; BENICKY, 2007), contribuindo também para a resposta cardiovascular frente ao ER.

Outro fator que contribui diretamente para a resposta cardiovascular ocasionada por exposição ao ER é o barorreflexo. Foi descrito por Crestani e colaboradores (2010) que o aumento sustentado de PA e FC ocorre devido à uma alteração do *setpoint* de ativação do barorreflexo para valores mais elevados de PA, facilitando a resposta taquicárdica e impedindo, dessa forma, a bradicardia reflexa.

O primeiro passo no presente trabalho foi a validação da efetividade das doses de lisinopril (inibidor da ECA) e losartan (antagonista seletivo do receptor

AT1) utilizadas no protocolo de ER. Foi realizada a construção de curvas dose-resposta para a Ang-I, seguida da administração de lisinopril na dose de 0,3 mg/kg e reconstrução da curva após 2:30h do tratamento, permitindo a avaliação do tempo de duração do efeito da dose testada e sua aplicação no modelo de ER de três horas de duração. Foi possível observar que a administração dessa dose de lisinopril reduziu significativamente a resposta pressora, ocasionada pela conversão da Ang-I em Ang-II, mesmo após 2:30h, validando-a para utilização nos protocolos posteriores. Também realizamos a construção de curvas dose-resposta para a Ang-II seguida da administração de losartan na dose de 1 mg/kg e reconstrução da curva 2:30h após o tratamento. O tratamento com losartan reduziu significativamente a resposta pressora ocasionada pelas doses Ang-II, validando essa dose para os protocolos realizados posteriormente.

Em seguida, o presente estudo avaliou a participação do SRA na modulação das respostas autonômicas ocasionadas pelo ER. Para isso, os animais foram primeiramente pré-tratados intravenosamente com lisinopril, inibidor da ECA, nas doses de 1, 0,3 e 0,1 mg/kg. A ECA é responsável pela clivagem de Ang-I em Ang-II (ROKS et al., 1999; URATA et al., 1990), ou seja, o bloqueio da enzima culminaria no prejuízo da formação de Ang-II. O pré-tratamento intravenoso com lisinopril, causou redução da resposta pressora desencadeada pelo ER. Além disso, as doses de 0,3 e 0,1 mg/kg ocasionaram redução da resposta taquicárdica, sendo a dose de 1 mg/kg capaz de potencializar a resposta taquicárdica evocada pelo ER. Dessa forma, nossos dados sugerem que a Ang-II exerce uma influência facilitatória sobre a resposta

pressora desencadeada pela exposição a esta situação aversiva. Em adição, a Ang-II desempenharia papel modulador na resposta taquicárdica evocada pelo ER.

Corroborando os nossos resultados, outros trabalhos demonstraram que o prejuízo na formação de Ang-II é capaz de alterar a resposta cardiovascular desencadeada por modelos de estresse. Foi demonstrado que a pré-administração de captopril, inibidor da ECA, reduziu a resposta pressora desencadeada pelo estresse por novidade agudo (LEE; WEBB; BRANDS, 2004). Adicionalmente, ratos previamente estressados de maneira crônica e posteriormente tratados com captopril, apresentaram uma redução da resposta pressora máxima ocasionada por uma nova exposição ao *air-jet stress*, além disso, em ratos infartados cirurgicamente, o tratamento com captopril foi capaz de reduzir a resposta taquicárdica máxima ocasionada pelo *air-jet stress*, tanto no grupo previamente estressado de maneira crônica, quando no grupo não-estressado (CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA et al., 2014). Em conjunto, esses resultados sugerem que a inibição da ECA, e consequente diminuição da formação de Ang-II, pode ser importante na prevenção de alterações cardiovasculares desencadeadas por modelos de estresse.

O próximo passo no presente estudo foi investigar qual receptor angiotensinérgico estaria envolvido no desencadeamento das respostas cardiovasculares ocasionadas pelo ER. Para avaliar a participação dos receptores AT1, os animais foram pré-tratados intravenosamente com losartan, um antagonista seletivo para os receptores AT1. Nossos resultados indicam que

a pré-administração de losartan reduziu as respostas pressora e taquicárdica desencadeadas pelo ER agudo, sugerindo que os receptores AT1 também desempenham influência facilitatória sobre a resposta cardiovascular ocasionada pelo ER.

Corroborando os nossos achados, diferentes trabalhos têm ressaltado que o tratamento com antagonistas seletivos para os receptores AT1 ameniza diferentes alterações relacionadas à exposição a eventos estressores. Dessa forma, foi demonstrado que o pré-tratamento periférico de ratos com candersartan, antagonista seletivo de receptores AT1, reduziu a resposta simpatoadrenal, através da redução de noradrenalina, adrenalina, aldosterona e corticosterona sintetizadas pela adrenal frente ao estresse de isolamento agudo (ARMANDO et al., 2001). Além disso, o tratamento com telmisartan, outro antagonista seletivo AT1, foi capaz de atenuar o impacto negativo, sobre a memória, desencadeado tanto pela exposição crônica quanto aguda ao ER (WINCEWICZ; BRASZKO, 2015). O pré-tratamento com candesartan por 14 dias, também foi capaz de reduzir em 80% a formação de úlceras gástricas em decorrência da exposição ao ER agudo em associação a baixa temperatura (BREGONZIO et al., 2004). Este conjunto de dados sugere que o antagonismo de receptores AT1 é de extrema relevância terapêutica, não somente frente à hipertensão, mas também frente a diferentes alterações desencadeadas por exposição ao estresse.

Não se pode excluir a hipótese de que os benefícios promovidos por fármacos que interferem com o SRA, frente a estímulos aversivos, também

sejam mediados por vias angiotensinérgicas centrais. Há expressão de grande número de receptores angiotensinérgicos nos órgãos circunventriculares, estruturas centrais desprovidas de barreira hematoencefálica, incluindo o órgão subfornical e a eminência mediana (TSUTSUMI; SAAVEDRA, 1991a, 1991b), facilitando a comunicação entre o SRA da periferia e do SNC.

Nesse sentido, já foi descrito na literatura que estímulos aversivos, tais como o estresse por isolamento e o ER associado a baixas temperaturas, aumentam a expressão de receptores AT1 em importantes áreas envolvidas na modulação de respostas ocasionadas pelo estresse (BREGONZIO et al., 2008; SAAVEDRA et al., 2006). Também foi previamente demonstrado por nosso grupo de estudo, que a administração de losartan, antagonista seletivo do receptor AT1, no PVN ocasiona redução da resposta pressora desencadeada pelo ER agudo, sendo a redução semelhante àquela observada após a administração de losartan i.v. na dose de 5mg/kg (BUSNARDO; TAVARES; CORREA, 2014). Em adição, a microinjeção de lisinopril, inibidor da ECA, no córtex pré-límbico foi capaz de reduzir tanto a resposta pressora, quanto a resposta taquicárdica desencadeadas pelo ER agudo, enquanto a microinjeção de candesartan, antagonista seletivo AT1, no PL ocasionou redução da resposta pressora, sem interferir com a resposta taquicárdica desencadeada por esse estímulo aversivo (BRASIL; FASSINI; CORRÊA, 2018), sugerindo que ocorra participação tanto do SRA periférico, quanto do SRA central, na modulação das diferentes respostas desencadeada pelo ER.

Após a obtenção dos registros cardiovasculares, o passo seguinte foi a avaliação da variabilidade da PAS, da HRV, e análise da SBR. Não houve aumento significativo de PAS e da variabilidade da PAS, apesar de haver tendência de aumento da PAS e redução da variabilidade da PAS durante o ER. Foi possível observar que o ER ocasionou tendência de aumento da potência da banda de LF no espectro da PAS, e que o tratamento com lisinopril 0,3 mg/kg aumentou significativamente esse parâmetro, quando comparado ao veículo. Entretanto, nenhuma alteração significativa de LF foi observada durante o ER. A literatura aponta que oscilações na potência de banda de LF refletem a modulação simpática (MALIK; CAMM, 1990). Com relação à potência de banda de VLF, a qual indica principalmente a modulação humoral da PAS, foi possível observar que o tratamento com losartan 1 mg/kg aumentou este parâmetro na terceira hora do ER quando comparado ao veículo, e ainda, que durante as três horas do ER, o pré-tratamento com losartan diferiu do pré-tratamento com lisinopril, visto que este último ocasionou tendência de redução de VLF durante o ER. Esses resultados sugerem que o prejuízo na formação de Ang-II é mais impactante sobre a potência de banda de VLF, do que o antagonismo do receptor AT1.

Não houve alteração significativa do IP e da variabilidade total do IP, apesar de ser possível observar tendência à redução do IP durante o ER. O tratamento com lisinopril 0,3 mg/kg aumentou significativamente a potência da banda de LF do espectro do IP na terceira hora do ER, ao passo que o losartan 1 mg/kg aumentou a potência de banda de HF na primeira hora do ER, quando

comparados ao veículo no mesmo período de tempo. A análise desses parâmetros em unidades normalizadas indicou que o tratamento com losartan 1 mg/kg reduziu a potência de banda de LF na primeira hora do ER, quando comparado ao grupo veículo no mesmo período de tempo. Em adição, o tratamento com losartan 1 mg/kg reduziu significativamente a razão LF/HF na primeira hora do ER, quando comparado ao veículo, e na terceira hora quando comparado ao lisinopril 0,3 no mesmo tempo. As oscilações de LF do espectro do IP são mediadas por modulação simpática, ao passo que as alterações de alta frequência estão relacionadas ao sistema nervoso parassimpático (MALIK; CAMM, 1990). Os dados da HRV da PAS e do IP sugerem que a Ang-II facilita a ativação do sistema simpático e reduza a atividade do sistema parassimpático no modelo de ER agudo de 180min.

Comparando nossos achados com os dados descritos na literatura, uma série de trabalhos têm estudado as alterações na variabilidade cardiovascular em decorrência do estresse. Duarte e colaboradores (2015) ao estudarem o estresse crônico (10 dias), em ratos adolescentes, demonstraram que o estresse crônico variado ocasiona aumento da potência da banda de LF do espectro do IP (aumento da modulação simpática cardíaca), enquanto o estresse crônico repetido ocasiona aumento das potências da banda de LF e HF (aumento das modulações simpática e parassimpática cardíacas), sem afetar a variabilidade da PAS. Em contrapartida, Firmino e colaboradores (2019), demonstraram que o estresse crônico variado e o repetido (14 dias), em ratos adultos, reduziram a potência da banda de LF e de HF, bem como a razão de LF/HF do espectro do

IP, ao passo que apenas o estresse crônico repetido aumentou a potência da banda de LF do espectro da PAS, indicando redução da modulação simpática e parassimpática cardíaca e aumento da modulação simpática vascular.

Com relação ao estresse agudo, um recente trabalho clínico demonstrou que mulheres submetidas ao estresse psicológico agudo apresentaram aumento da potência de banda de LF e da razão LF/HF do intervalo RR durante o estresse, parâmetros indicativos do aumento da atividade simpática cardíaca (MOHAMMADI et al., 2019).

Em relação à análise da SBR pelo método da sequência, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa tanto no ganho total quanto no ganho das sequências UP e DOWN do barorreflexo. Entretanto, o tratamento com losartan 1 mg/kg reduziu o BEI das sequências totais e das sequências UP na terceira hora do ER, enquanto o tratamento com lisinopril 0,3 mg/kg reduziu o BEI das sequências UP na terceira hora do ER, quando comparados ao veículo na terceira hora de ER. Os dados da SBR sugerem que a Ang-II facilita a ativação do barorreflexo durante o ER, nesse sentido, a reversão da ineficiência do desse mecanismo de controle da PA, utilizando fármacos que interferem com o SRA, pode constituir uma estratégia para o tratamento das alterações ocasionadas pelo estresse. Ao estudar a SBR em modelos de estresse crônico, Duarte e colaboradores (2015) demonstraram que o estresse crônico variado causou aumento no ganho das sequências barorreflexas totais, sugerindo aumento da SBR. Firmino e colaboradores (2019), por sua vez, demonstraram que o estresse crônico, repetido e variado, reduziu o ganho total das sequências barorreflexas, indicando que o estresse ocasiona redução da SBR.

Os achados da variabilidade cardiovascular e da SBR permanecem contraditórios na literatura e podem ser devido às diferenças de idade dos animais, do protocolo de estresse e da intensidade do estressor utilizado. O presente trabalho foi o primeiro a investigar o papel do SRA na modulação desses parâmetros frente ao ER.

O presente estudo também avaliou as possíveis alterações funcionais ocasionadas por exposição ao ER. Para isso, avaliamos a atividade de enzimas marcadoras de lesões celulares específicas para as funções hepática, renal e cardíaca. O ER não causou alterações nas concentrações plasmáticas das enzimas ALT, AST, ureia, creatinina e CK-MB, quando comparado com o grupo *naïve*. Além disso, o bloqueio da ECA ou de receptores AT1 pelo pré-tratamento com lisinopril 0,3 mg/kg ou losartan 1 mg/kg não afetou os níveis plasmáticos dessas enzimas, indicando o não envolvimento do SRA na sua modulação. Por outro lado, foi observada diferença estatisticamente significativa nos níveis plasmáticos da enzima marcadora da função hepática AST, após o tratamento com lisinopril 0,3 mg/kg, assim como uma tendência de aumento nessa enzima após o tratamento com losartan 1 mg/kg. Também foi observado uma tendência de aumento, não significativa, da enzima hepática ALT após os tratamentos realizados (lisinopril 0,3 ou losartan 1 mg/kg). Esse resultado, possivelmente, deve-se ao metabolismo hepático dos fármacos administrados, e não seja decorrência do estímulo estressor, uma vez que não observamos diferença entre o grupo estressado e tratado com veículo e o grupo *naïve* (não estressado).

Em adição, Sánchez e colaboradores (2002) reportaram que o ER de 1h foi capaz de ocasionar o aumento da atividade enzimática de LDH, CK-MB, ALT e AST em camundongos; entretanto, esse aumento foi menor quando comparada à liberação dessas enzimas marcadoras de lesão celular em resposta à estímulos estressores mais intensos, tais como o estresse de imobilização e o ER em associação com o frio (4ºC). Essa divergência entre os resultados funcionais pode ser explicada por dois fatores: a diferença entre a espécie utilizada e a diferença de intensidade do estímulo estressor estudado.

Outra resposta bem consolidada frente à exposição ao ER é a ativação do eixo HPA com consequente liberação de corticosterona (BRASIL et al., 2020; BUSNARDO et al., 2019; LOPES-AZEVEDO et al., 2019). Assim sendo, avaliamos a participação do SRA na resposta neuroendócrina ocasionada pelo ER agudo de 180 min, através da determinação das concentrações plasmáticas de corticosterona em animais pré-tratados com veículo, losartan (1 mg/kg) ou lisinopril (0,3 mg/kg), imediatamente após o término do ER. A exposição ao ER aumentou, de maneira estatisticamente significativa, a liberação de corticosterona quando comparado ao grupo *naïve* (não-estressado). Além disso, o pré-tratamento com lisinopril 0,3 mg/kg ou losartan 1 mg/kg reduziu significativamente a liberação de corticosterona ocasionada por esse modelo aversivo, sugerindo que a Ang-II, via receptor AT1, desempenha uma influência facilitatória sobre a liberação de corticosterona em decorrência da ativação do eixo HPA causada pelo ER.

Já foi demonstrado que os receptores AT1 estão expressos ao longo das estruturas do eixo HPA, sendo elas: o PVN, cujos receptores estão localizados em neurônios produtores de CRH (AGUILERA et al., 1995), a pituitária anterior (SAAVEDRA, 1992) e o córtex da adrenal (AGUILERA, 1993) e que o estresse aumenta a expressão desses receptores (ARMANDO et al., 2001; CASTREN; SAAVEDRA, 1988; LEONG et al., 2002), sugerindo que o SRA modula diretamente a atividade do eixo HPA. Em concordância com os nossos achados, Armando e colaboradores (2001, 2007) demonstraram que a administração do antagonista seletivo do receptor AT1 candesartan impediu o aumento de ACTH na pituitária e o aumento da secreção urinária de corticosterona causados pelo estresse de isolamento. Em adição, o tratamento oral com losartan, reduziu significativamente a liberação de corticosterona ocasionada pelo estresse de imobilização crônico de 10 dias (URESIN et al., 2004). Também foi demonstrado que o tratamento oral com telmisartan, outro antagonista seletivo do receptor AT1, ocasionou redução significativa da liberação plasmática de corticosterona ocasionada pelo estresse de restrição crônico de 21 dias (WINCEWICZ; BRASZKO, 2015). Esses dados, em conjunto, sugerem que o SRA e o eixo HPA trabalhem em estreita colaboração frente ao estresse psicológico e que os fármacos que interferem com o SRA, periférica e centralmente, podem constituir uma importante estratégia terapêutica no controle da resposta ao estresse.

CONCLUSÃO

7.CONCLUSÃO

Em conclusão, os presentes resultados sugerem que a Ang-II, via receptor AT1 desempenha influência facilitatória sobre a resposta cardiovascular desencadeada pelo ER. Os dados da variabilidade da PAS e do IP sugerem que a Ang-II facilite a ativação do sistema nervoso simpático e reduza a atividade do sistema nervoso parassimpático, no modelo de ER. Em adição, a análise da SBR sugere que a Ang-II favoreça a ativação do barorreflexo durante o ER, além de favorecer a liberação de corticosterona frente a esse modelo de estresse.

Este conjunto de achados sugere que o prejuízo na síntese de Ang-II, bem como o antagonismo de receptores AT1 possam constituir uma estratégia farmacológica importante para melhorar as consequências desencadeadas pelo ER.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, G. Factors controlling steroid biosynthesis in the zona glomerulosa of the adrenal. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, n. 1–3, p. 147–151, abr. 1993.

AGUILERA, G. et al. Direct regulation of hypothalamic corticotropin-releasing-hormone neurons by angiotensin II. **Neuroendocrinology**, v. 61, n. 4, p. 437–44, abr. 1995.

AGUILERA, G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. **Trends Endocrinol Metab**, v. 9, n. 8, p. 329–336, 1998.

AKSELROD, S. et al. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. **Science (New York, N.Y.)**, v. 213, n. 4504, p. 220–2, 10 jul. 1981.

ARAKAWA, H. et al. Stress increases plasma enzyme activity in rats: differential effects of adrenergic and cholinergic blockades. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 280, n. 3, p. 1296–303, 1997.

ARMANDO, I. et al. Peripheral administration of an angiotensin II AT(1) receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation Stress. **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 3880–9, set. 2001.

ARMANDO, I. et al. Angiotensin II AT1 receptor blockade prevents the hypothalamic corticotropin-releasing factor response to isolation stress. **Brain Research**, v. 1142, p. 92–99, abr. 2007.

AVERILL, D. B.; DIZ, D. I. Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. **Brain Research Bulletin**, v. 51, n. 2, p. 119–128, jan. 2000.

BARRON, B. A.; VAN LOON, G. R. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 28, n. 2, p. 179–87, nov. 1989.

BAUDRIE, V. et al. Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. **J Auton Pharmacol**, v. 17, n. 5, p. 303–309, 1997.

BERTINIERI, G. et al. A new approach to analysis of the arterial baroreflex. **J Hypertens Suppl**, v. 3, n. 3, p. S79-81, 1985.

BRASIL, T. F. S. et al. The Dorsomedial Hypothalamus Is Involved in the Mediation of Autonomic and Neuroendocrine Responses to Restraint Stress. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, jan. 2020.

BRASIL, T. F. S.; FASSINI, A.; CORRÊA, F. M. AT1 and AT2 Receptors in the Prelimbic Cortex Modulate the Cardiovascular Response Evoked by Acute Exposure to Restraint Stress in Rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 1, p. 305–316, 10 jan. 2018.

BREGONZIO, C. et al. Angiotensin II AT 1 Receptor Blockade Prevents Gastric Ulcers during Cold-Restraint Stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1018, n. 1, p. 351–355, jun. 2004.

BREGONZIO, C. et al. Angiotensin II AT(1) receptor blockade selectively enhances brain AT(2) receptor expression, and abolishes the cold-restraint stress-induced increase in tyrosine hydroxylase mRNA in the locus coeruleus of spontaneously hypertensive rats. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 11, n. 6, p. 457–66, nov. 2008.

BRUNNER, H. R. et al. Essential hypertension: renin and aldosterone, heart attack and stroke. **N Engl J Med**, v. 286, n. 9, p. 441–449, 1972.

BUSNARDO, C. et al. Nitrergic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 90, p. 16–27, 2019.

BUSNARDO, C.; TAVARES, R. F.; CORREA, F. M. Angiotensinergic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates the pressor response to acute restraint stress in rats. **Neuroscience**, v. 270, p. 12–19, 2014.

CARRIVE, P. Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 33, n. 12, p. 1251–4, dez. 2006.

CASTRÉN, E. et al. Specific angiotensin II binding sites in the rat stellate and superior cervical ganglia. **Brain research**, v. 422, n. 2, p. 347–51, 6 out. 1987.

CASTREN, E.; SAAVEDRA, J. M. Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in rat paraventricular nucleus and subfornical organ.

Endocrinology, v. 122, n. 1, p. 370–2, jan. 1988.

CHALMERS, J.; PILOWSKY, P. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. **J Hypertens**, v. 9, n. 8, p. 675–694, 1991.

CRESTANI, C. C. et al. Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 13, n. 1, p. 61–72, jan. 2010.

CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A. et al. Angiotensin Converting Enzyme Inhibition Reduces Cardiovascular Responses to Acute Stress in Myocardially Infarcted and Chronically Stressed Rats. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**, v. 74, n. 2, p. 323–364, 1994.

DE GASPARO, M. et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 3, p. 415–472, 2000.

DOS REIS, D. G. et al. Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. **Stress**, v. 17, n. 4, p. 362–372, 2014.

DUARTE, J. O. et al. Stress vulnerability during adolescence: comparison of chronic stressors in adolescent and adult rats. **Psychosom Med**, v. 77, n. 2, p. 186–199, 2015.

DUARTE, J. O.; PLANETA, C. S.; CRESTANI, C. C. Immediate and long-term effects of psychological stress during adolescence in cardiovascular function: Comparison of homotypic vs heterotypic stress regimens. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 52–59, 20 fev. 2015.

ENGI, S. A. et al. Effect of the single or combined administration of cocaine and testosterone on cardiovascular function and baroreflex activity in unanesthetized rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 231–40, mar. 2012.

FAZAN JR, R.; SALGADO, H. C. Variabilidade da frequência cardíaca: métodos clássicos. **Revista Hipertensão**, v. 14, n. 2, p. 2–11, 2017.

FIRMINO, E. M. S. et al. Effect of chronic stress on cardiovascular and ventilatory

responses activated by both chemoreflex and baroreflex in rats. **The Journal of experimental biology**, v. 222, n. Pt 20, 23 out. 2019.

FISHER, J. P.; YOUNG, C. N.; FADEL, P. J. Central sympathetic overactivity: maladies and mechanisms. **Auton Neurosci**, v. 148, n. 1–2, p. 5–15, 2009.

GINTY, A. T. et al. Cardiovascular and autonomic reactivity to psychological stress: Neurophysiological substrates and links to cardiovascular disease. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 207, p. 2–9, nov. 2017.

GRASSI, G.; MARK, A.; ESLER, M. The sympathetic nervous system alterations in human hypertension. **Circ Res**, v. 116, n. 6, p. 976–990, 2015.

HALL, J. E. et al. Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. **J Biol Chem**, v. 285, n. 23, p. 17271–17276, 2010.

HUANG, C. C. et al. Long-term effects of baroreflex function after stenting in patients with carotid artery stenosis. **Auton Neurosci**, v. 158, n. 1–2, p. 100–104, 2010.

IRVINE, R. J.; WHITE, J.; CHAN, R. The influence of restraint on blood pressure in the rat. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 38, n. 3, p. 157–62, nov. 1997.

KASCHINA, E.; UNGER, T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. **Blood Press**, v. 12, n. 2, p. 70–88, 2003.

KEMPA A.H., Q. D. S. The relationship between mental and physical health: Insights from the study of heart rate variability. **International Journal of Psychophysiology**, v. 89, n. 3, p. 288–296, 2013.

KOLBER, B. J.; WIECZOREK, L.; MUGLIA, L. J. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered glucocorticoid or mineralocorticoid receptor function. **Stress**, v. 11, n. 5, p. 321–338, 7 jan. 2008.

KRIEMAN, M. J. et al. Effects of adinazolam on plasma catecholamine, heart rate and blood pressure responses in stressed and non-stressed rats. **Neuropharmacology**, v. 31, n. 1, p. 33–8, jan. 1992.

LEE, D. L.; WEBB, R. C.; BRANDS, M. W. Sympathetic and angiotensin-dependent hypertension during cage-switch stress in mice. **American Journal**

of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 287, n. 6, p. R1394–R1398, dez. 2004.

LEONG, D. S. et al. Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT(1A), AT(1B) and AT(2) receptors. **Neuroendocrinology**, v. 75, n. 4, p. 227–40, abr. 2002.

LOHMEIER, T. E.; ILIESCU, R. The Baroreflex as a Long-Term Controller of Arterial Pressure. **Physiology**, v. 30, n. 2, p. 148–158, mar. 2015.

LOPES-AZEVEDO, S. et al. The Supraoptic Nucleus of the Hypothalamus Modulates Autonomic, Neuroendocrine, and Behavioral Responses to Acute Restraint Stress in Rats. **Neuroendocrinology**, 18 jun. 2019.

MAGARINOS, A. M.; MCEWEN, B. S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. **Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 83–88, 1995.

MALIK, M.; CAMM, A. J. Heart rate variability. **Clinical Cardiology**, v. 13, n. 8, p. 570–576, ago. 1990.

MARTINS DIAS, D. P. **Cardio Series**, 2019. Disponível em: <www.danielpenteado.com>

MCDOUGALL, S. J. et al. Restraint stress : differential cardiovascular responses in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 35, n. 1 Pt 1, p. 126–129, 2000.

MILIK, E.; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A.; SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E. Effect of Chronic Mild Stress on AT1 Receptor Messenger RNA Expression in the Brain and Kidney of Rats. **Psychosom Med**, v. 78, n. 2, p. 208–220, 2016.

MOHAMMADI, A. et al. The persistent effect of acute psychosocial stress on heart rate variability. **The Egyptian Heart Journal**, v. 71, n. 1, p. 18, 11 dez. 2019.

MYERS, B.; MCKLVEEN, J. M.; HERMAN, J. P. Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 2, p. 180–196, abr. 2014.

NALIVAIKO, E. Animal models of psychogenic cardiovascular disorders: what we can learn from them and what we cannot. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 38, n. 2, p. 115–25, fev. 2011.

NICKENIG & HARRISON, D. G., G. The AT1-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis part I: oxidative stress and atherogenesis. **Circulation**, v. 105, n. 3, p. 393–396, 2002a.

NICKENIG & HARRISON, D. G., G. The At1-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis part II: At1 receptor regulation. **Circulation**, v. 105, n. 4, p. 530- 536., 2002b.

PAPADEMETRIOU, V. et al. Carotid Baroreceptor Stimulation for the Treatment of Resistant Hypertension. **International Journal of Hypertension**, v. 2011, p. 1–5, 2011.

PARK, S. E. et al. Differential heart rate variability and physiological responses associated with accumulated short- and long-term stress in rodents. **Physiology & Behavior**, v. 171, p. 21–31, mar. 2017.

PEACH, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiol Rev**, v. 57, n. 2, p. 313–370, 1977.

PORTER, J. P. Contribution of central ANG II to acute stress-induced changes in baroreflexfunction in young rats. . **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 4, p. R1386–R1391, 2000.

PUMPRLA, J. et al. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. **Int J Cardiol**, v. 84, n. 1, p. 1–14, 2002.

RAAB, W.; CHAPLIN, J. P.; BAJUSZ, E. Myocardial Necroses Produced in Domesticated Rats and in Wild Rats by Sensory and Emotional Stresses. **Experimental Biology and Medicine**, v. 116, n. 3, p. 665–669, 1 jul. 1964.

REICH, P. et al. Acute psychological disturbances preceding life-threatening ventricular arrhythmias. **JAMA**, v. 246, n. 3, p. 233–5, 17 jul. 1981.

ROKS, A. J. et al. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 34, n. 2, p. 296–301, ago. 1999.

ROZANSKI, A.; BLUMENTHAL, J. A.; KAPLAN, J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. **Circulation**, v. 99, n. 16, p. 2192–2217, 1999.

RUGINSK, S. et al. Anandamide modulates the neuroendocrine responses

induced by extracellular volume expansion. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, p. n/a-n/a, jul. 2013.

SAAVEDRA, J. M. Brain and pituitary angiotensin. **Endocr Rev**, v. 13, n. 2, p. 329–380, 1992.

SAAVEDRA, J. M. et al. A centrally acting, anxiolytic angiotensin II AT1 receptor antagonist prevents the isolation stress-induced decrease in cortical CRF1 receptor and benzodiazepine binding. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 1123–1134, 2006.

SAAVEDRA, J. M.; BENICKY, J. Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 10, n. 2, p. 185–93, jun. 2007.

SÁNCHEZ, O. et al. Acute stress-induced tissue injury in mice: differences between emotional and social stress. **Cell Stress & Chaperones**, v. 7, n. 1, p. 36, 2002.

SANDBERG, K. et al. Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. **J Biol Chem**, v. 267, n. 14, p. 9455–9458, 1992.

SILVA, L. E. V. et al. Comparison between spectral analysis and symbolic dynamics for heart rate variability analysis in the rat. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 8428, 2017.

SINGH, J. P. et al. Reduced heart rate variability and new-onset hypertension: insights into pathogenesis of hypertension: the Framingham Heart Study. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 32, n. 2, p. 293–7, ago. 1998.

STEINBERG, J. S. et al. Increased incidence of life-threatening ventricular arrhythmias in implantable defibrillator patients after the World Trade Center attack. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 44, n. 6, p. 1261–4, 15 set. 2004.

STRAWN, W. B.; FERRARIO, C. M.; TALLANT, E. A. Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. **Hypertension**, v. 33, n. 1 Pt 2, p. 207–211, 1999.

TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A. Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. **Neuroscience**, v. 143, n. 1, p. 231–40, 17 nov. 2006.

TE RIET, L. et al. Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. **Circulation research**, v. 116, n. 6, p. 960–75, 13 mar. 2015.

TSUTSUMI, K.; SAAVEDRA, J. M. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. **The American journal of physiology**, v. 261, n. 1 Pt 2, p. R209-16, jul. 1991a.

TSUTSUMI, K.; SAAVEDRA, J. M. Angiotensin-II Receptor Subtypes in Median Eminence and Basal Forebrain Areas Involved in Regulation of Pituitary Function. **Endocrinology**, v. 129, n. 6, p. 3001–3008, dez. 1991b.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 13 jun. 2009.

URATA, H. et al. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. **Circ Res**, v. 66, n. 4, p. 883–890, 1990.

URESIN, Y. et al. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS**, v. 5, n. 2, p. 93–6, jun. 2004.

WHO. Source: Global Health Estimates 2016: Death by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2016. Geneva. **World Health Organization**, 2018.

WINCEWICZ, D.; BRASZKO, J. J. Angiotensin II AT1 receptor blockade by telmisartan reduces impairment of spatial maze performance induced by both acute and chronic stress. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 16, n. 3, p. 495–505, 12 set. 2015.