

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Envolvimento da neurotransmissão angiotensinérgica do córtex pré-límbico na modulação de respostas autonômicas, hormonal e *status* oxidativo evocados pelo estresse de restrição em ratos.

Taíz Francine Brasil da Silva

RIBEIRÃO PRETO

2016

Taíz Francine Brasil da Silva

Envolvimento da neurotransmissão angiotensinérgica do córtex pré-límbico na modulação de respostas autonômicas, hormonal e *status* oxidativo evocados pelo estresse de restrição em ratos.

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

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

RIBEIRÃO PRETO

2016

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 da neurotransmissão angiotensinérgica do córtex pré-límbico na modulação de respostas autonômicas, hormonal e status oxidativo evocados pelo estresse de restrição em ratos./ Taíz Francine Brasil da Silva; orientador: Fernando Morgan de Aguiar Corrêa. – Ribeirão Preto, 2016.

78 f.

Dissertação (Mestrado)--Universidade de São Paulo, 2016.

1. Córtex pré-límbico 2. Sistema renina-angiotensina 3. Estresse de restrição. 4. Sistema cardiovascular.

Brasil, Taíz Francine Silva

Envolvimento da neurotransmissão angiotensinérgica do córtex pré-límbico na modulação de respostas autonômicas, hormonal e *status* oxidativo evocados pelo estresse de restrição em ratos.

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

Aprovado em: ___ / ___ / 2016.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Rubens Fazan Junior

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal

Instituição: FOAR-UNESP

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus avós maternos,

*Pelo amor incondicional, força, apoio, incentivo e
confiança na capacidade me emprestada por
Deus. Muito obrigada!*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me emprestar forças e capacidade necessárias para concluir este trabalho e por me abençoar em cada passo desta caminhada.

Ao Prof. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa por ter gentilmente aberto as portas de seu laboratório e por ter tido participação fundamental no meu amadurecimento acadêmico e pessoal. Obrigada pela orientação, paciência e por todo o conhecimento a mim transferido.

Agradeço aos meus avós maternos Oliorcilio e Arminda por acreditarem nos meus sonhos, me incentivarem e batalharem junto comigo para realizá-los. Sem vocês este trabalho nunca seria realizado.

A minha mãe pelo amor oferecido, por todos os conselhos, preocupações, apoio, força e por todas às vezes que deixou de sonhar seus próprios sonhos para que os meus pudessem ser realizados. Ao meu pai por me apoiar, aconselhar e principalmente por estar presente em minha vida.

A toda a minha família por sempre me incentivarem a lutar por meus sonhos. Sem o apoio de cada um de vocês seria impossível concluir esta etapa de minha vida.

Aos professores da banca examinadora: Dr. Rubens Fazan Junior e Dr. Daniel Zoccal por terem aceitado prontamente fazer parte da apresentação desta dissertação e pelas sugestões.

Ao professor José Eduardo Tanus Santos e Leonardo Resstel por terem aberto as portas de seus laboratórios e ao Lucas Pinheiro pelos ensinamentos, paciência e auxílio.

Aos meus amigos de laboratório América, Cris, Eduardo, Silvana e Aline pela atenção, por compartilhar o conhecimento e também por todos os momentos de risada e de distração. Em especial, agradeço a Aline Fassini por toda a ajuda, auxílio e conhecimento a mim oferecidos. Conviver com vocês foi fundamental para que fosse feliz em nosso laboratório. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório da Prof.^a Rita Tostes: Pedro, Nathanne, Camila Zanotto, Camila Pereira, Karlla e Rhéure pela amizade, convivência e por compartilharem momentos de alegria comigo. Em especial, aos meus amigos Pedro e Edismauro por todos estes anos de amizade, preocupação e dedicação.

Agradeço a Ivanilda Fortunato (Vá) pelo carinho, auxílio e instruções técnicas para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao pessoal da secretaria Soninha, Ramon e Fátima por auxiliarem em toda a dificuldade burocrática e pelos conselhos e ensinamentos e competência. Agradeço em especial a Soninha pelo carinho e amizade. Obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

PL – córtex pré-límbico

HPA – eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

SRA – sistema renina-angiotensina

EROs – espécies reativas de oxigênio

ECA – enzima conversora de angiotensina

SNC – sistema nervoso central

RVLM – bulbo ventrolateral rostral (rostral ventrolateral medulla)

CVLM – bulbo ventrolateral caudal (caudal ventrolateral medulla)

CPF – córtex pré-frontal

CPFMv – córtex pré-frontal medial ventral

IL – córtex infra-límbico

DP – córtex dorsopeduncular

ER – estresse de restrição

NTS – núcleo do trato solitário

PA – pressão arterial

FC – frequência cardíaca

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

SON – núcleo supraóptico

OSF – órgão subfornical

RESUMO

RESUMO

Brasil, T.F.S. **Envolvimento da neurotransmissão angiotensinérgica do córtex pré-límbico na modulação de respostas autonômicas, hormonal e status oxidativo evocados pelo estresse de restrição em ratos.** Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O córtex pré-límbico (PL) é uma importante área límbica envolvida em vários processos funcionais correlatos ao estresse, tais como respostas cardiovasculares, hormonais e comportamentais. O modelo de estresse de restrição (ER) foi padronizado na literatura como uma situação aversiva capaz de promover aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, queda da temperatura cutânea e estimulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Trabalhos da literatura evidenciaram que ratos submetidos ao ER apresentavam aumento da atividade neuronal no PL, sugerindo que essa estrutura module respostas ao ER. Assim, a inibição temporária de sinapses no PL potencializou a resposta taquicárdica induzida pelo ER, sem alterar a resposta pressora. Além do controle cardiovascular, outros trabalhos demonstraram que o PL também participa do controle hormonal durante o ER. O ER agudo também está envolvido com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), fator que pode estar envolvido nas alterações a longo prazo observadas após exposição a uma situação aversiva.

O sistema renina angiotensina (SRA) central modula respostas cardiovasculares, inclusive aquelas induzidas por situações aversivas, além de ter um papel reconhecido na produção de EROs. Além disso, foi demonstrado que o PL possui SRA funcional com presença dos peptídeos a ele relacionados.

Baseado nos fatos mencionados acima, a hipótese do presente projeto é que a neurotransmissão angiotensinérgica do PL está envolvida na modulação de respostas autonômicas (aumento de pressão arterial e frequência cardíaca, e queda da temperatura cutânea) e hormonal (aumento plasmático de corticosterona) evocadas pelo ER, e que essa via envolveria a formação de EROs.

A microinjeção do inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) lisinopril no PL, nas doses de 0,5 e 1nmol/100nL, reduziu a resposta pressora, sendo a dose de 1nmol/100nL de lisinopril também capaz de reduzir a resposta taquicárdica induzida pelo ER; porém nenhuma dose utilizada ocasionou mudanças na queda da temperatura cutânea evocada pelo ER. O pré-tratamento do PL com o antagonista de receptores do subtipo AT₁ candesartan reduziu o efeito pressor induzido pelo ER, porém não alterou a resposta taquicárdica e queda da temperatura cutânea associadas ao ER. Por sua vez, o pré-tratamento com o antagonista de receptores do subtipo AT₂, PD123177, reduziu a resposta taquicárdica sem alterar a resposta pressora e a queda da temperatura cutânea evocadas pelo ER. Em adição, o estresse de restrição agudo e os pré-tratamentos

realizados não foram capazes de alterar a atividade da enzima NADPH oxidase no PL.

Em conclusão, os presentes resultados sugerem a participação do SRA na modulação da resposta cardiovascular ao ER, através da ativação de receptores AT₁, e AT₂ do PL, afetando respectivamente, o componente vascular e o cardíaco da resposta autonômica causada pelo ER. Além disso, os resultados da atividade da enzima NADPH oxidase no PL sugerem que o ER agudo, os receptores AT₁, AT₂ e a ECA não modulam o status oxidativo local.

Palavras-chave: córtex pré-límbico, sistema renina-angiotensina, estresse de restrição, sistema cardiovascular, candesartan, lisinopril, PD123177.

ABSTRACT

ABSTRACT

Brasil, T.F.S. **Involvement of angiotensinergic neurotransmission in prelimbic cortex on the modulation of autonomic, hormonal and oxidative *status* evoked by restraint stress in rats.** School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2016.

The prelimbic cortex is an important limbic structure involved in several stress-related functional processes, such as cardiovascular, hormonal and behavior responses. Restraint stress (RS) was standardized in literature as an aversive situation able to promote blood pressure and heart rate increases, reduction in tail temperature and stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA). Previous studies demonstrated that rats submitted to RS exhibited increased neuronal activity in the PL, suggesting that this structure modulates RS-evoked responses. Temporary, synaptic temporary inhibition in the PL markedly increased the RS-evoked tachycardiac response, without affecting the pressor one. Beyond cardiovascular control, other studies demonstrated that PL also participates in hormonal control during RS. Acute RS is also involved in the production of reactive oxygen species (ROS), which could be involved in long-term changes observed after exposure to an aversive situation.

The central renin-angiotensin system (RAS) modulates cardiovascular responses, including those induced by aversive situations. In addition, this system has a well-known role in ROS production. Furthermore, the presence of angiotensinergic peptides in PL has also been demonstrated, suggesting the existence of a functional RAS in this structure.

Based on the facts mentioned above, the hypothesis of the present study was that the angiotensinergic neurotransmission in PL is involved in the modulation of autonomic responses (blood pressure and heart rate increase, and reduction in tail temperature) evoked by RS, and this pathway would involve ROS formation.

Microinjection of lisinopril (0.5 and 1nmol/100nL), an inhibitor of angiotensin-converting enzyme (ACE), into PL reduced the pressor response, and the dose 1nmol/nL was also able to reduce the tachycardiac response induced by RS; however, none of doses changed the reduction in tail temperature evoked by RS. PL treatment with candesartan, an AT₁ receptors antagonist, reduced the RS-evoked pressor response, but did not affect the RS-evoked tachycardiac response and reduction in tail temperature. In addition, pretreatment with PD123177, an AT₂ receptors antagonist, reduced the RS-evoked tachycardiac response, without affecting the pressor response or the RS-evoked reduction in tail temperature. In addition, neither acute RS or local treatments affected NADPH oxidase activity in the PL.

In conclusion, the present results suggests the involvement of the central RAS in the modulation of the cardiovascular responses caused by RS, through the

activation of both AT₁ and AT₂ receptors in the PL. The PL AT₁ receptors modulating the vascular, and the AT₂ modulating the cardiac component of RS-evoked autonomic response. Furthermore, our study suggests that neither acute RS or local AT₁, AT₂ and ACE affect oxidative *status* in the PL.

Key words: prelimbic cortex, renin-angiotensin system, restraint stress, cardiovascular system, candesartan, lisinopril, PD123177

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
1) Animais	31
2) Técnica de implante de cânula-guia no PL.	31
3) Canulação da artéria femoral.....	32
4) Registro da pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura cutânea.....	32
5) Dosagem de corticosterona.	33
6) Técnica para microinjeção de drogas no PL.....	33
7) Estresse por Restrição.....	33
8) Drogas utilizadas.	34
9) Determinação anatômica do sítio de injeção.	34
10) Estudo da influência do ER na modulação da atividade da enzima NADPH oxidase no PL.	35
11) Análise estatística.....	35
PROCOLOS EXPERIMENTAIS	38
1) Efeito da administração de lisinopril (inibidor da ECA) no PL sobre as respostas autonômicas e hormonais evocadas pelo ER.	38
2) Efeito da administração de candesartan (antagonista seletivo para o receptor AT ₁) no PL sobre as respostas autonômicas e hormonais evocadas pelo ER.	38
3) Efeito da administração de PD123177 (antagonista seletivo para o receptor AT ₂) no PL sobre as respostas autonômicas e hormonais evocadas pelo ER.....	39
4) Efeito do ER agudo sobre a a atividade da enzima NADPH oxidase no PL.....	39
5) Efeito da administração de lisinopril, candesartan ou DP123177 no PL sobre a atividade da enzima NADPH oxidase local em resposta ao ER.	39
RESULTADOS	42
1) Determinação do sítio de injeção.....	42
2) Efeito da administração de lisinopril (inibidor da ECA) no PL sobre as respostas autonômicas evocadas pelo ER.....	42

3) Efeito da administração de diferentes doses de candesartan (antagonista seletivo do receptor AT ₁) no PL sobre as respostas autonômicas evocadas pelo ER.....	47
4) Efeito da administração de diferentes doses de PD123177 (antagonista seletivo do receptor AT ₂) no PL sobre as respostas autonômicas evocadas pelo ER.....	51
5) Efeito do ER agudo sobre a atividade da enzima NADPH oxidase no PL.....	55
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÃO.....	67

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular desempenha uma importante função na manutenção da homeostase, promovendo uma distribuição adequada do fluxo sanguíneo aos órgãos e tecidos do organismo. Além de mecanismos hormonais e locais, o controle momento a momento da pressão arterial e frequência cardíaca envolve o sistema nervoso central (SNC) (Verberne *et al.*, 1997). Estruturas bulbares, tais como o núcleo do trato solitário (NTS), o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) e caudal (CVLM) controlam a atividade simpática, modulando principalmente o tônus vascular (Chalmers e Pilowsky, 1991; Goldeinstein, 1992), enquanto os núcleos dorsal do vago e ambíguo controlam a atividade parassimpática cardíaca (Mcallen e Spyer, 1976).

Estruturas suprabulbares, através de conexões com o tronco encefálico, também podem modular a atividade autonômica para o sistema cardiovascular (Hilton, 1966) principalmente em situações comportamentais. Dentre as regiões suprabulbares que participam no controle do sistema cardiovascular destacam-se o hipotálamo, amígdala, área septal e regiões específicas do córtex cerebral (Loewy e Mckellar, 1980; Loewy, 1991; Dampney, 1994; Resstel, 2005; Scopinho, 2006; Fortaleza, 2011). O córtex pré-frontal (CPF) pode ser dividido topograficamente em três porções: a medial (CPFM – córtex pré-frontal medial), ventrolateral e a orbital (Leonard, 1969; Krettek e Price, 1977; Sarter e Markowitsch, 1984; Groenewegen, 1988; Sesack *et al.*, 1989; Neafsey, 1990). O CPFM é uma região integrante do sistema límbico (Cechetto, 1990; Verberne e Owens, 1998) e está envolvida na modulação de respostas autonômicas, sobretudo frente a reações aversivas. Anatomicamente, o CPFM de ratos é subdividido em duas porções, a dorsal e a ventral (CPFMv), sendo que a porção ventral compreende os córtices pré-límbico (PL), infralímbico (IL) e dorsopeduncular (DP) (Paxinos, 1997).

Há relatos na literatura indicando que a estimulação do CPFM causa alterações cardiovasculares, tal como resposta depressora após estimulação elétrica (Owens *et al.*, 1999; Owens e Verberne, 2000). Assim, a estimulação elétrica do CPFMv causou resposta cardiovascular pressora em animais anestesiados e resposta depressora em animais não-anestesiados (Burns e Wyss, 1985; Tavares *et al.*, 2004), sugerindo que essas respostas decorram da ativação de neurônios intrínsecos desta área cortical.

A estimulação do CPFMv, através da microinjeção de glutamato, causou respostas pressoras e taquicárdicas desencadeadas pela ativação do sistema nervoso simpático e foram abolidas pelo pré-tratamento com AP7, sugerindo que estas respostas sejam mediadas por ativação de receptores NMDA (Resstel, 2006), enquanto a estimulação da mesma área com noradrenalina causou respostas pressoras e bradicárdicas mediadas por liberação sistêmica de vasopressina (Fernandes, 2003). Adicionalmente, estudo de nosso grupo demonstrou que a administração de angiotensina II na porção pré-limbica do CPFMv causou respostas semelhantes às evocadas por injeções de noradrenalina (Nogari, 2015). Foi demonstrado que o CPFMv também é capaz de influenciar o barorreflexo, uma vez que a microinjeção de lidocaína nesta região alterou a variação da resposta pressora frente a injeção de fenilefrina, e além disso, os receptores endocanabinóides CB(1) nesta região aumentou a atividade barorreflexa em ratos não-anestesiados (Resstel *et al.*, 2004; Ferreira-Junior, 2012).

A administração local de lidocaína ou a lesão completa dessa área cortical não alteraram a pressão arterial e a frequência cardíaca basal de ratos tanto normotensos quanto hipertensos (Verberne *et al.*, 1997; Verberne e Owens, 1998; Resstel *et al.*, 2004), sugerindo que apesar do CPFMv participar do controle cardiovascular, essa estrutura não está envolvida na manutenção do tônus basal da pressão arterial e da frequência cardíaca. Neste sentido, diversos estudos da literatura demonstraram que o CPFM integra respostas autonômicas e hormonais

frente a estímulos emocionais (Neafsey, 1990; Fryszak e Neafsey, 1994; Resstel e Correa, 2006; Tavares e Correa, 2006).

O estresse de restrição (ER) foi padronizado na literatura como uma situação aversiva caracterizada por alterações comportamentais e fisiológicas tais como aumento de pressão arterial e frequência cardíaca, visando o aumento do fluxo sanguíneo para órgãos importantes na reação de luta ou fuga, tais como músculos e cérebro, e reduzindo o fluxo para leitos cutâneos, resultando em queda da temperatura cutânea e aumento da temperatura interna, bem como ativação do eixo HPA e comportamento ansiogênico observado 24hrs após exposição ao ER (Barron e Van Loon, 1989; Krieman *et al.*, 1992; Irvine *et al.*, 1997; Bhatnagar *et al.*, 1998; Mcdougall *et al.*, 2000). Evidenciando o papel essencial desempenhado pelo CPFM, e em particular pelo PL, durante situações de estresse foi demonstrado que animais submetidos ao ER apresentavam aumento da atividade neuronal nessa região (Imaki *et al.*, 1993; Yokoyama e Sasaki, 1999). Além disso, a inibição temporária, bilateral, do PL com o bloqueador sináptico cloreto de cobalto (CoCl_2) potencializou a resposta taquicárdica, sem alterar a resposta pressora induzida pelo ER, demonstrando que essa região desempenha uma influência inibitória sobre a taquicardia evocada pelo ER (Tavares *et al.*, 2009). Adicionalmente, os receptores NMDA no PL também desempenham papel inibitório sobre o aumento de frequência cardíaca observado durante o ER, sem alterar o aumento de pressão arterial (Tavares e Correa, 2006). Em contrapartida, o bloqueio de receptores opióides no PL através da microinjeção de naloxona, antagonista não-seletivo de receptores opióides, reduziu a resposta pressora e taquicárdica induzida pelo ER (Fassini *et al.*, 2014).

Além da modulação cardiovascular, o CPFM também está envolvido com a atividade do eixo HPA durante situações aversivas. Foi observado aumento dos níveis circulantes de ACTH e corticosterona durante o ER em animais com lesões no CPFM (Diorio *et al.*, 1993; Figueiredo *et al.*, 2003). Animais *knockdown* para

receptores glicocorticóides no PL apresentaram potencialização da resposta do eixo HPA ao estresse agudo (Mcklveen *et al.*, 2013).

Em paralelo ao aumento de glicocorticóides observado em resposta ao estresse psicológico, vários trabalhos demonstram que a exposição a situações aversivas induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Manoli, 2007 ; Du *et al.*, 2009). Spiers *et al.*, 2013 demonstraram que ratos expostos ao estresse agudo de restrição apresentavam aumento do status oxidativo no hipocampo, enquanto a amígdala não foi afetada. Esses dados sugerem que ocorram mudanças a nível celular na exposição ao estresse agudo, as quais precederiam alterações em longo prazo.

O aumento de metabolismo observado durante uma reação aversiva, visando à preparação do organismo para uma reação de luta ou fuga, é uma das principais causas da alteração do status oxidativo durante o ER. As EROs são formadas a partir da transferência de um elétron do NADPH para o oxigênio molecular, formando o ânion superóxido (O_2^-), ação catalisada pela enzima NADPH oxidase, presente em neurônios (Noh e Koh, 2000; Tammariello *et al.*, 2000; Li, 2002; Groemping *et al.*, 2003; Taniyama e Griendling, 2003).

Embora vários trabalhos destaquem a importância do PL na modulação, a curto e longo prazo, de respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais frente a situações aversivas, ainda não foi estudado se o estresse agudo é capaz de alterar o status oxidativo do CPFM, e em particular do PL.

O SRA está 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; Roks, 1999). Outro componente biologicamente ativo do SRA é a angiotensina 1-7 (Ang (1-

7)), cuja formação se dá pela remoção da fenilalanina da porção carboxi-terminal da Ang-II realizada pela ECA2, uma enzima análoga à ECA (Vickers *et al.*, 2002; Harmer, 2002). Além disso, a Ang(1-7) pode ser formada diretamente a partir da AngI por ação de diversas enzimas, incluindo as oligopeptidases (Chappell, 1994). Por sua vez, a Ang(1-7) pode ser convertida em angiotensina 1-5 (Ang(1-5)) por meio da ECA (Ferrario, 1997).

No que concerne aos receptores angiotensinérgicos, a Ang-II atua através de três subtipos: AT₁, AT₂ e AT₃ (Sandberg *et al.*, 1992; De Gasparo *et al.*, 2000; Kaschina e Unger, 2003); por sua vez a Ang(1-7) atua por meio do receptor Mas (Santos, 2003). Apesar da Ang-II ligar-se aos receptores AT₁, AT₂ e AT₃, a ligação ao receptor AT₁ é responsável pela maioria dos seus efeitos cardiovasculares, tais como liberação de noradrenalina, vasoconstrição, secreção de aldosterona, reabsorção renal de sódio, estimulação simpática, hipertrofia celular vascular e cardíaca, proliferação celular e estresse oxidativo (Strawn *et al.*, 1999; Nickenig, G., & Harrison, D. G. , 2002; Nickenig, G., & Harrison, D. G. , 2002).

O primeiro estudo evidenciando a presença de peptídeos do SRA no SNC foi realizado por (Bickerton, 1961). A partir desse trabalho, diversos estudos indicaram a presença de peptídeos funcionais deste sistema em diferentes áreas centrais. Foi relatada a presença do precursor angiotensinogênio (Deschepper *et al.*, 1986; Stornetta *et al.*, 1988; Thomas e Sernia, 1988) e da renina em células da glia e neurônios (Hermann *et al.*, 1987), bem como expressão da ECA no plexo coróide, órgão subfornical, órgão vasculoso da lamina terminal, na área postrema, ao longo dos gânglios basais, além de quantidades significativas em importantes áreas envolvidas no controle cardiovascular, tais como o hipotálamo e regiões bulbares (Chai *et al.*, 1987). Em adição, outros estudos relataram a presença de Ang-II nos núcleos supraóptico (SON) e paraventricular (PVN), órgão subfornical (OSF), medula oblongata e em particular, no córtex cerebral (Printz *et al.*, 1982; Healy e Printz, 1984; Saavedra *et al.*, 1986), evidenciando a síntese central dos peptídeos deste

sistema. É bem consolidada na literatura a ideia que as espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas no mecanismo de sinalização da Ang-II na periferia, porém recentemente tem sido sugerido que essa via também esteja presente em neurocircuitarias autonômicas (Zimmerman e Davisson, 2004).

Wang e colaboradores (2004) demonstraram a presença da enzima NADPH oxidase em neurônios do NTS que expressavam o receptor AT_1 , além de evidenciar que as EROs derivadas da NADPH oxidase estão envolvidas nos efeitos da Ang-II sobre o influxo de Ca^{2+} em neurônios do NTS intermediário dorsomedial, visto que esta região central recebe projeções autonômicas via nervo vago, sendo uma importante área de ação da Ang-II, sugerindo que as EROs estão envolvidas na sinalização molecular que controla o sistema nervoso autônomo (Wang *et al.*, 2004).

Há evidências indicando o envolvimento do SRA em respostas a situações aversivas. Neste sentido, foi demonstrado que o ER agudo de duas horas é capaz de modular a expressão de receptores angiotensinérgicos AT_1 no PVN, OSF e iminência mediana e pituitária anterior (Leong *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrado que situações aversivas induzem aumento de Ang-II em áreas centrais, tais como o PVN e OSF (Castren e Saavedra, 1988; Yang *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1996). Além disso, o tratamento periférico e crônico (13 dias) em uma dose de 0,5mg/kg/dia de candesartan, antagonista seletivo de receptores AT_1 , preveniu o comportamento de ansiedade causado pelo estresse, além de prevenir alterações na expressão de receptores CRF_1 e $GABA_A$ no CPFMV (Saavedra *et al.*, 2006). Em adição, as alterações causadas pelo estresse no barorreflexo foram atenuadas com o pré-tratamento periférico com losartan, antagonista seletivo de receptores AT_1 (Porter, 2000). Corroborando esses dados, trabalho recente do nosso grupo demonstrou que a neurotransmissão angiotensinérgica no PVN é capaz de modular respostas cardiovasculares causadas pelo ER agudo, pois o pré-tratamento deste núcleo com um inibidor da ECA ou com antagonista de receptores AT_1 reduziu o aumento da pressão arterial evocado pelo ER sem afetar a resposta taquicárdica

(Busnardo *et al.*, 2014), sugerindo a participação do SRA central na modulação de respostas desencadeadas por situações aversivas.

Dessa forma, considerando que o córtex PL está envolvido no controle do sistema cardiovascular durante situações de estresse; que o SNC apresenta um SRA funcional com a presença peptídeos e receptores angiotensinérgicos e que o SRA central participa na modulação das respostas autonômicas e produção de EROs durante situações aversivas, a hipótese do presente projeto é que a neurotransmissão angiotensinérgica do PL está envolvida na modulação das respostas autonômicas (aumento de pressão arterial e frequência cardíaca, e queda da temperatura cutânea) e hormonal (aumento plasmático de corticosterona) evocadas pelo ER, assim como na formação de EROs causada por exposição a esse modelo de estresse agudo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo:

- 1) Estudar a participação da neurotransmissão angiotensinérgica do PL sobre as respostas autonômicas (aumento de pressão arterial, aumento de frequência cardíaca e queda da temperatura cutânea) e endócrina (aumento de corticosterona) evocadas pelo ER, através da administração local de bloqueador da ECA.

- 2) Avaliar quais os subtipos de receptores estão envolvidos na modulação das respostas autonômicas e endócrina provocadas pelo ER, através da administração farmacológica de antagonistas seletivos dos receptores AT₁ e AT₂.

- 3) Avaliar se o ER influencia a atividade da enzima NADPH oxidase no PL.

- 4) Verificar a influência do SRA sobre a atividade da enzima NADPH no PL frente ao ER.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Animais

Os experimentos foram realizados em ratos machos Wistar com peso variando entre 240-260g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da USP de Ribeirão Preto sendo mantidos em caixas individuais, com alimentação de ração e água. Os animais foram submetidos à alternância de luz (12 h claro/12 h escuro). O protocolo para uso de animais em experimentação segue as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), nº 116/2015.

2) Técnica de implante de cânula-guia no PL.

O anestésico utilizado para este procedimento cirúrgico foi ketamina-xilazina (solução de 5ml de ketamina a 10% e 1,6ml de xilazina a 2%), sendo administrado 1mL/kg por via intraperitoneal. A cabeça do animal foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, USA) e após tricotomia, foi feita assepsia do local com álcool a 70%. A seguir, foi injetado 0,3mL de lidocaína, com vasoconstritor, subcutaneamente para anestesia local do escalpo. A calota craniana foi exposta por incisão, de aproximadamente 1,5 cm, na pele, afastando-se todo o periósteo. A assepsia local foi feita com salina e água oxigenada a 10%. As coordenadas utilizadas para o córtex pré-límbico (PL) foram determinadas a partir do Atlas do cérebro de rato (Paxinos, 1997): *ântero-posterior*: 3,3 mm anterior a linha do bregma; *lateral*: 1,9 mm em relação à sutura sagital; *vertical*: 2,4 mm abaixo da dura mater; *abaixamento da barra do incisivo*: 3,2 mm; e *inclinação lateral*: 22°. Com o auxílio de broca odontológica, foi feita a trepanação do crânio e as cânulas guia foram introduzidas bilateralmente no PL. As cânulas foram constituídas de segmentos de agulha hipodérmica com 11 mm de comprimento e 0,55 mm de diâmetro externo, 24G. Elas foram fixadas ao crânio com resina acrílica autopolimerizável e um

pequeno parafuso fixado na calota craniana. Mandris com 0,2 mm de diâmetro externo e 11 mm de comprimento foram introduzidos nas cânulas, com o objetivo de se evitar sua obstrução durante o período de recuperação pós-cirurgia. Ao final da cirurgia os animais receberam 0,3 mL de Pentabiótico^R veterinário (White, Brasil) por via intramuscular e 2,5 mg/Kg do analgésico e antiinflamatório flunixinameglumina (Banamine, Schering-Plough, Brasil) por via subcutânea.

3) Canulação da artéria femoral.

Após 48 h da cirurgia para implante da cânula-guia no crânio, os animais foram novamente anestesiados com ketamina-xilazina e uma cânula de polietileno foi implantada na artéria femoral, sendo introduzida até a aorta abdominal inferior. A cânula é constituída por segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) fundido a segmento de polietileno PE-50 (14-15 cm), sendo preenchida com salina (NaCl a 0,9%) contendo anticoagulante (5U/mL de heparina) e obstruída com um pino de metal. O registro da pressão arterial foi realizado através da cânula femoral, 24h após a cirurgia para os animais acordados.

4) Registro da pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura cutânea.

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 pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (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). A cânula implantada na artéria femoral foi conectada ao transdutor de pressão para registro da pressão arterial e a frequência cardíaca, os animais receberam injeção de drogas ou veículo no PL e após 10 min, os animais foram submetidos ao ER por 60 min. Além dos parâmetros cardiovasculares, as variações de temperatura cutânea também foram registradas. A temperatura da cauda, variável da temperatura cutânea, foi registrada utilizando uma câmera térmica Multi-Purpose

Thermal Imager IRI 4010 (Infra Red Integrated Systems Ltd Park Circle, Tithe Barn Way Swan Valley Northampton, USA) a uma distância de 50 cm, a intervalos de três minutos durante o período de registro da PA e FC basais e após a aplicação local das drogas; e de dez em dez minutos durante o período em que o animal permaneceu no tubo de restrição.

5) Dosagem de corticosterona.

Para a dosagem plasmática de corticosterona, foram coletados 400µL de sangue da artéria femoral para cada amostra. A primeira amostra foi coletada para determinar o valor basal de hormônios (animais não-estressados). A seguir, outras amostras foram coletadas nos minutos 20 e 60 após o animal ser submetido ao ER. As amostras foram coletadas entre 8:30h e 10:30h em tubos plásticos heparinizados e centrifugadas a 4°C, sendo amostras de plasma retiradas e congeladas a -20°C para determinação dos níveis de corticosterona. A dosagem foi realizado radioimunoensaio específico, de acordo com a metodologia descrita por Mecawi *et al.* 2013.

6) Técnica para microinjeção de drogas no PL.

Para microinjeção de drogas no PL, foi utilizada uma seringa de 1µL modelo KH-7001 (Hamilton, USA) conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha microinjetora de metal (33 G). A agulha microinjetora era 1,0mm mais longa do que a cânula guia. Todas as microinjeções foram aplicadas bilateralmente, no volume de 100 nL.

7) Estresse por Restrição.

O tubo de restrição era constituído por um tubo cilíndrico de plástico, medindo 15 cm de comprimento e 6,5cm de diâmetro. O rato permaneceu no tubo por 1 h, sendo a pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura cutânea registradas continuamente durante a sua permanência no tubo.

8) Drogas utilizadas.

-Candesartancilexetil (Sigma, USA), antagonista seletivo dos receptores AT₁.

-PD123177(S)-1-[(4-Amino-3-methylphenyl)methyl]-5-(diphenylacetyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-Imidazol[4,5-c]pyridine-6-carboxylic acid trifluoroacetatesalhydrate (Sigma, USA), antagonista seletivo de receptores AT₂.

-Lisinopril (Merck,Sharp&Dohme, Rahway, NJ, USA), inibidor da ECA.

-Uretana (Sigma, USA), anestésico que foi utilizado para a perfusão dos animais.

-Quetamina e Xilazina (Audrey Chemical Co. Inc., USA), anestésico que foi utilizado para os procedimentos cirúrgicos.

-Pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, Brasil), antibiótico que foi administrado como profilático.

-Banamine (Schering-Plough Veterinária, Brasil), analgésico que foi administrado como profilático.

9) Determinação anatômica do sítio de injeção.

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2g/kg i.p.). O corante azul de Evan a 1% foi injetado no local da microinjeção das drogas, para determinação do sítio de injeção. Em seguida, os ratos foram submetidos a perfusão cerebral. Para isso, abriu-se a caixa torácica para exposição do coração, e em seguida a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática. Uma agulha para perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo, e uma incisão foi feita na aurícula direita para o escoamento do sangue e do perfusato. A perfusão foi realizada inicialmente com 20 mL de solução fisiológica de NaCl 0,9%, seguida por 20mL de solução tamponada de formalina a 10%. Posteriormente, os cérebros foram retirados da caixa craniana e pós-fixados em solução de perfusão. Os cérebros foram seccionados utilizando de um criostato.

Foram feitas várias secções da área do PL, coradas com cresil violeta a 0,5% e analisadas utilizando-se o atlas (Paxinos, 1997) como referência.

10) Estudo da influência do ER na modulação da atividade da enzima NADPH oxidase no PL.

A produção de ânion superóxido pela enzima NADPH oxidase foi analisada no PL de ratos pertencentes aos grupos tratados com 1nmol/100nL das drogas utilizadas. Imediatamente após o final da seção de estresse, o cérebro dos animais foram retirados e submetidos à técnica de dissecação. O hemisfério esquerdo foi submetido à dissecação. Inicialmente foram realizados dois cortes coronais, dando origem à lâmina do CPMF, e nesta lâmina o PL foi dissecado tomando por referência o corpo caloso para avaliar a atividade da enzima NADPH oxidase por meio da quimiluminescência amplificada por lucigenina. O PL foi transferido para frascos contendo 1 mL de tampão de Hank's (pH 7.2). Após equilíbrio e leitura basal, adicionou-se uma concentração de lucigenina (5 μ mol/L), incapaz de afetar o ciclo redox e em seguida, a β -NADPH (12 μ mol/L) foi adicionada ao frasco. A luminescência foi medida continuamente por um período de 20 min em luminômetro *single-tube* Berthold FB12 à 37°C. A leitura basal do córtex PL foi subtraída do sinal obtido da enzima β -NADPH e os resultados foram normalizados de acordo com a quantidade de proteína presente na amostra, a qual foi determinada pelo método de Bradford (Montenegro *et al.*, 2011).

11) Análise estatística.

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa Prism (GraphPad, USA). O teste t de Student pareado foi usado para comparar os valores basais de PA, FC, temperatura cutânea e corticosterona antes e após os tratamentos farmacológicos. As alterações autonômicas e hormonal foram analisadas pelo teste de análise de variância de dois fatores (*two-way* ANOVA)

utilizando-se como variáveis os fatores do tratamento (controle ou droga) e o tempo como medida repetida.

O teste t de Student não-pareado foi utilizado para comparar os resultados da atividade da enzima NADPH oxidase nos grupos experimentais de ratos naive *versus* estresse. Além disso, o teste de variância de um fator (*one-way* ANOVA) foi utilizado para comparar os resultados da atividade da enzima NADPH oxidase utilizando como variável o tratamento (veículo ou droga). Foram considerados como significativos os resultados que apresentaram $p < 0,05$.

PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS

PROCOLOS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos, os animais foram levados, em suas respectivas caixas, à sala de experimentação. Cada animal foi conectado ao sistema de registro da pressão arterial para registro da PA, FC e temperatura cutânea basal por 10 min, permanecendo em suas respectivas caixas. Uma amostra sanguínea foi coletada um minuto antes do animal ser submetido ao estresse de restrição para dosagem basal dos níveis de corticosterona. Em seguida, ainda conectado ao sistema de registro da pressão arterial, o rato foi transferido para o tubo de restrição, onde permaneceu por 1 h. A PA, FC e temperatura cutânea foram registradas durante todo o período de restrição, enquanto as amostras sanguíneas foram coletadas nos minutos 15, 30 e 60. Foi feita apenas uma microinjeção bilateral de droga ou veículo por animal, que foi aplicada 10 min antes da restrição.

1) Efeito da administração de lisinopril (inibidor da ECA) no PL sobre as respostas autonômicas e hormonais evocadas pelo ER.

Este protocolo teve por objetivo determinar se a ECA está envolvida na modulação da resposta cardiovascular, temperatura cutânea e níveis de corticosterona induzidos pelo ER. Os animais foram divididos em quatro grupos. Em um dos grupos foi microinjetado 100 nL de veículo (ACSF), enquanto os outros receberam injeção de lisinopril nas doses de 0,1; 0,5 ou 1 nmol/100nL (Busnardo *et al.*, 2014), sendo que cada animal recebeu microinjeção de uma única dose de droga.

2) Efeito da administração de candesartan (antagonista seletivo para o receptor AT₁) no PL sobre as respostas autonômicas e hormonais evocadas pelo ER.

Este protocolo teve por objetivo determinar se o receptor AT₁ está envolvido na modulação da resposta cardiovascular, temperatura cutânea e níveis de

corticosterona induzidos pelo ER. Os animais foram divididos em quatro grupos. Em um grupo foi microinjetado 100 nL de veículo (ACSF), enquanto os outros receberam injeção de candesartan nas doses de 0,1; 0,5 ou 1 nmol/100nL, sendo que cada animal recebeu microinjeção de uma única dose de droga.

3) Efeito da administração de PD123177 (antagonista seletivo para o receptor AT₂) no PL sobre as respostas autonômicas e hormonais evocadas pelo ER.

Este protocolo teve por objetivo determinar se o receptor AT₂ está envolvido na modulação da resposta cardiovascular, temperatura cutânea e níveis de corticosterona induzidos pelo ER. Os animais foram divididos em quatro grupos. Em um grupo foi microinjetado 100 nL de veículo (ACSF), enquanto os outros receberam microinjeção de PD123177 nas doses de 0,1; 0,5 ou 1 nmol/100nL, sendo que cada animal recebeu microinjeção de uma única dose de droga.

4) Efeito do ER agudo sobre a a atividade da enzima NADPH oxidase no PL.

Este protocolo teve por objetivo determinar se o ER é capaz de modular a atividade da enzima NADPH oxidase no PL. Os animais foram divididos em dois grupos. Um grupo não estressado foi utilizado como controle, e o outro foi submetido ao ER por uma hora. Imediatamente após a sessão de ER, o PL foi coletado para posterior avaliação desta atividade por meio método da quimiluminescência amplificada por lucigenina.

5) Efeito da administração de lisinopril, candesartan ou DP123177 no PL sobre a atividade da enzima NADPH oxidase local em resposta ao ER.

Este protocolo teve por objetivo determinar se o SRA presente no PL é capaz de modular a formação ânion superóxido via NADPH oxidase em ratos submetidos ao ER. Os animais receberam droga ou veículo no PL e foram submetidos ao ER por uma hora. Imediatamente após o final da seção de estresse, o cérebro dos animais foram retirados e submetidos a técnica de dissecação. Foi realizado um corte

coronal anterior e posterior ao sítio de microinjeção, no hemisfério esquerdo. Posteriormente, na lâmina obtida, o PL foi dissecado tomando por referência o corpo caloso para avaliar a atividade da enzima NADPH oxidase por meio da quimiluminescência amplificada por lucigenina.

RESULTADOS

RESULTADOS

1) Determinação do sítio de injeção

Representação diagramática baseada no atlas de Paxinos e Watson (1997), indicando a dispersão dos sítios de microinjeção no PL.

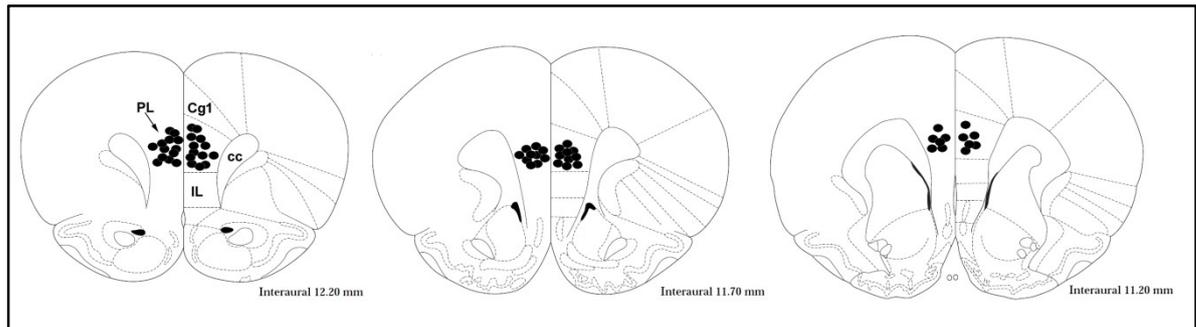


FIGURA 1- Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de rato Paxinos e Watson (1997), indicando a dispersão dos sítios de microinjeção no PL (círculos preenchidos). PL: córtex pré-limbíco; IL: córtex infra-limbíco, Cg1: córtex cingulado 1, cc: corpo caloso.

2) Efeito da administração de lisinopril (inibidor da ECA) no PL sobre as respostas autonômicas evocadas pelo ER.

A microinjeção de LCA 100nL e lisinopril nas doses de 0,1, 0,5 e 1nmol/100nL não alterou os valores basais da PAM, FC e queda da temperatura cutânea ($p < 0,05$), conforme representado na tabela 1.

Tabela 1

Valores basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura da cauda (TC) antes e após microinjeção de diferentes doses de lisinopril (inibidor da ECA) no PL de ratos.

Lisinopril nmol/100nL	n	MAP			FC			TC		
		Antes±EPM (mmHg)	Após ±EPM (mmHg)	t=	Antes±EPM (bpm)	Após ±EPM (bpm)	t=	Após ±EPM °C	Após ±EPM °C	t=
0	6	98,08 ±2,82	98,47 ±2,85	0,3	387,6±12,14	379,2 ± 12,83	1,9	31,81 ± 1,32	31,26 ± 1,22	1,5
0,1	5	96,70 ±2,47	97,46 ±3,06	0,6	387,1±20,38	387,5±24,6 8	0,1	29,81 ± 0,79	29,86 ± 0,83	0,1

0,5	5	104,4 ±12,36	102,3 ±12,83	2,1	373,9 ± 20,34	381,9 ± 18,49	1,4	32,35 ± 0,51	31,92 ± 0,72	0,4
1	6	98,93 ± 2,38	98,94 ± 2,80	0,005	363,6 ± 14,82	394,1 ± 8,00	4,2	32,18 ± 1,21	31,88 ± 1,40	0,3

A análise de duas vias (*two-way ANOVA*) indicou que o pré-tratamento do PL com lisinopril nas doses de 0,5 e 1nmol/100nL reduziu a resposta pressora, em função do tempo (tratamento: $F_{3,300}=28,61$, $p<0,05$; tempo: $F_{19,300}=14,37$, $p<0,05$; interação: $F_{57,300}=0,83$; $p>0,05$), e além disso, a dose de 1nmol/100nL de lisinopril foi capaz de reduzir a resposta taquicárdica, em função do tempo (tratamento: $F_{3,300}=13,81$, $p<0,05$, tempo: $F_{19,300}=8,6$, $p<0,05$; interação: $F_{57,300}=0,38$, $p>0,05$) induzida pelo ER, porém nenhuma dose utilizada ocasionou mudanças na queda da temperatura cutânea (tratamento: $F_{3,190}=1,633$, $p>0,05$; tempo: $F_{9,190}=5,06$, $p<0,05$; interação: $F_{27,190}=0,31$, $p<0,05$) ocasionada pelo modelo aversivo utilizado. A dose de 0,1nmol/100nL de lisinopril não foi capaz de alterar as respostas autonômicas induzidas pelo ER ($p>0,05$).

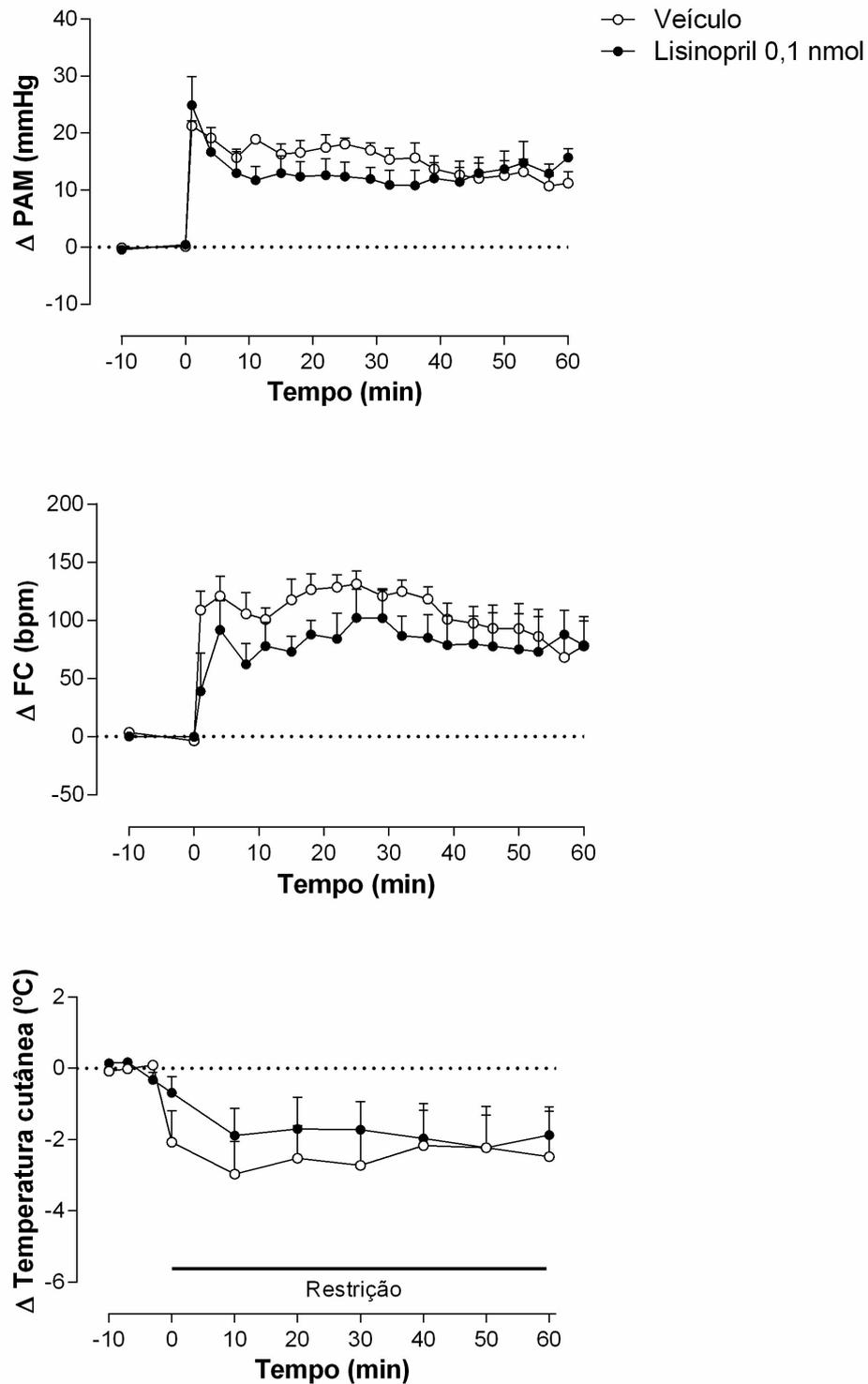


FIGURA 2- Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) e queda da temperatura cutânea ao longo do tempo de ratos submetidos ao estresse de restrição e pré-tratados no PL com lisinopril 0,1nmol/100nL (círculos pretos, n=5) ou veículo (círculos brancos, n=6). No tempo 0min os animais foram submetidos ao estresse de restrição. Pontos representam as médias e as barras o EPM.

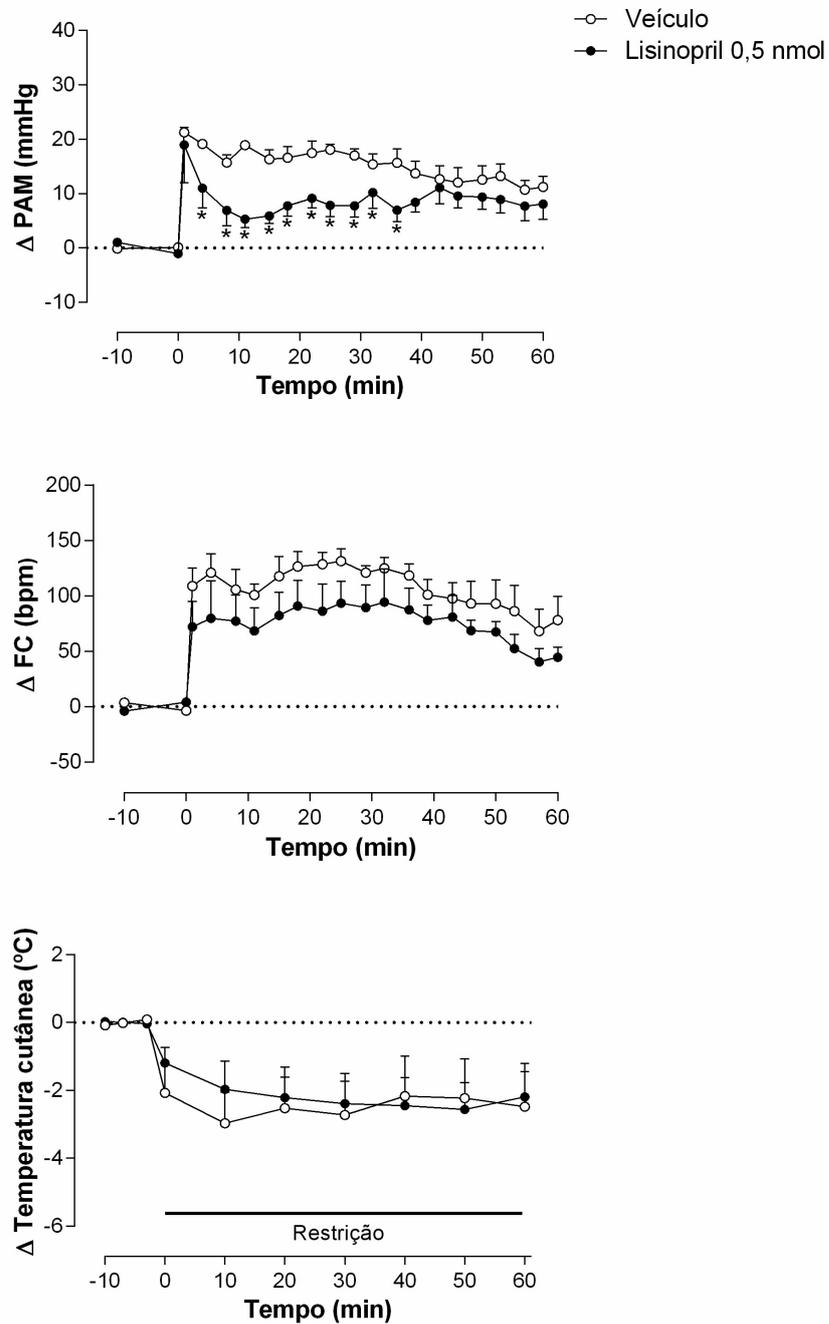


FIGURA 3- Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) e queda da temperatura cutânea ao longo do tempo de ratos submetidos ao estresse de restrição e pré-tratados no PL com lisinopril 0,5nmol/100nL (círculos pretos, n=5) ou veículo (círculos brancos, n=6). No tempo 0min os animais foram submetidos ao estresse de restrição. Pontos representam as médias e as barras o EPM, * indica que o grupo que recebeu 0,5nmol/100nL de lisinopril é diferente do grupo que recebeu veículo, $p < 0,05$, pós-teste de Fisher.

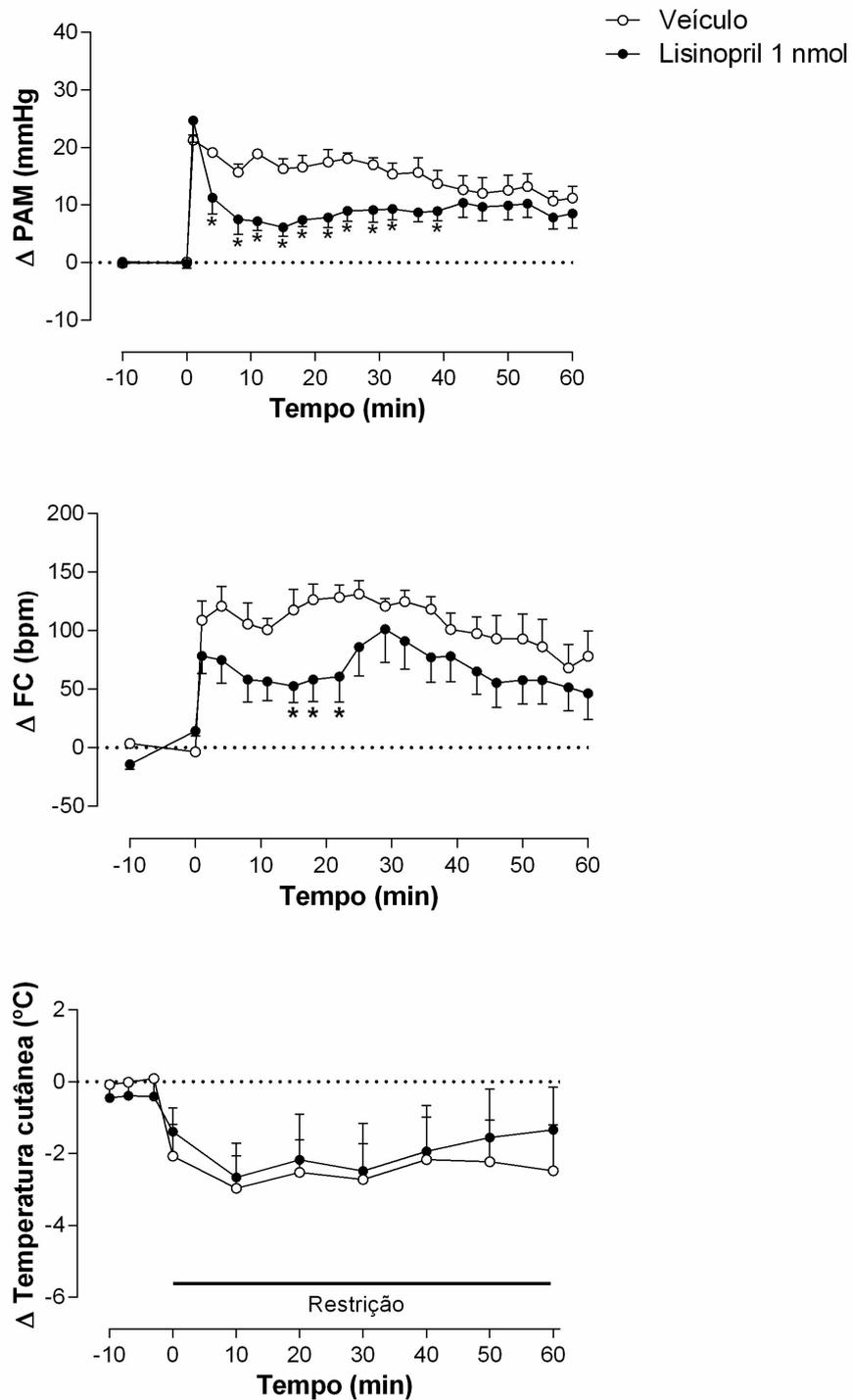


FIGURA 4- Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) e queda da temperatura cutânea ao longo do tempo de ratos submetidos ao estresse de restrição e pré-tratados no PL com lisinopril 1nmol/100nL (círculos pretos, n=6) ou veículo (círculos brancos, n=6). No tempo 0min os animais foram submetidos ao estresse de restrição. Pontos representam as médias e as barras o EPM, * indica que o grupo que recebeu 1nmol/100nL de lisinopril é diferente do grupo que recebeu veículo, $p < 0,05$, pós-teste de Fisher.

3) Efeito da administração de diferentes doses de candesartan (antagonista seletivo do receptor AT₁) no PL sobre as respostas autonômicas evocadas pelo ER.

A microinjeção de LCA 100 nL e candesartan nas doses de 0,1, 0,5 e 1nmol/100nL não alterou os valores basais da PAM, FC e queda da temperatura cutânea ($p < 0,05$), conforme representado na tabela 2.

Tabela 2

Valores basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura da cauda (TC) antes e após a microinjeção de diferentes doses de candesartan (antagonista seletivo AT₁) no PL de ratos.

Candesartan nmol/100nL	n	MAP			FC			TC		
		Antes±EPM (mmHg)	Após ±EPM (mmHg)	t=	Antes±EPM (bpm)	Após ±EPM (bpm)	t=	Após ±EPM °C	Após ±EPM °C	t=
0	6	91,8±3,25	93,1±3,29	1,9	372,1 ± 16,07	369,7 ± 13,48	0,5	32,30 ± 1,12	31,63 ± 1,29	1,7
0,1	5	98,6 ± 5,27	99,0 ± 3,84	0,2	370,1 ± 20,07	364,6 ± 21,52	2,1	31,61 ± 2,08	32,41 ± 1,64	1,1
0,5	5	98,21 ± 4,26	100,6 ± 4,87	1,9	358,0 ± 16,34	360,4 ± 15,15	0,9	31,10 ± 1,00	31,51 ± 0,68	0,3
1	6	102,3 ± 1,65	102,5 ± 2,14	0,1	362,1 ± 11,43	358,9 ± 9,77	0,6	32,41 ± 0,92	31,78 ± 1,32	1,0

A análise de *two-way* ANOVA indicou que o tratamento com candesartan na dose de 1nmol/100nL reduziu a respostas pressora, em função do tempo (tratamento: $F_{3,340}=26,67$, $p < 0,05$; tempo: $F_{19,340}=16,07$, $P < 0,05$; interação: $F_{57,340}=0,37$, $p > 0,05$) sem alterar a resposta taquicárdica (tratamento: $F_{3,360}=1,43$, $p > 0,05$; tempo: $F_{19,360}=6,6$, $p < 0,05$; interação: $F_{57,360}=0,28$, $P > 0,05$) e queda da temperatura cutânea (tratamento: $F_{3,114}=0,3497$, $p > 0,05$, tempo: $F_{5,115}=12,07$, $p < 0,05$; interação: $F_{15,114}=0,15$, $p > 0,05$) ocasionadas pela exposição aguda ao ER. As doses 0,1 e 0,5nmol/100nL de candesartan não foram capazes de causar alterações nas respostas autonômicas induzidas por essa situação aversiva ($p > 0,05$).

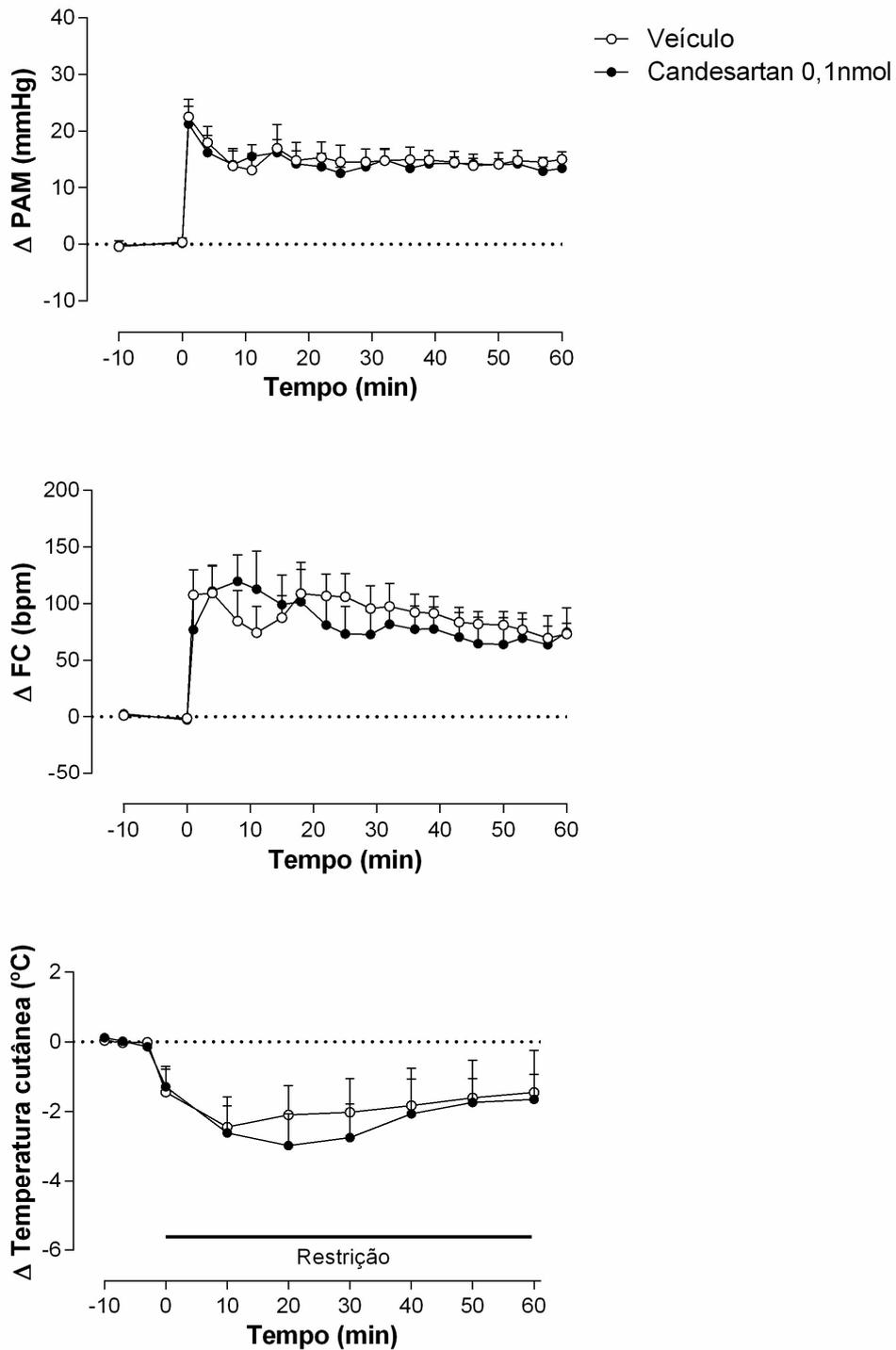


FIGURA 5-Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea ao longo do tempo, de ratos submetidos ao estresse de restrição e pré-tratados no PL com candesartan na dose de 0,1nmol/100nL (círculos pretos, n=5) ou veículo (círculos brancos, n=6). No tempo 0min os animais foram submetidos ao estresse de restrição. Pontos representam as médias e as barras o EPM.

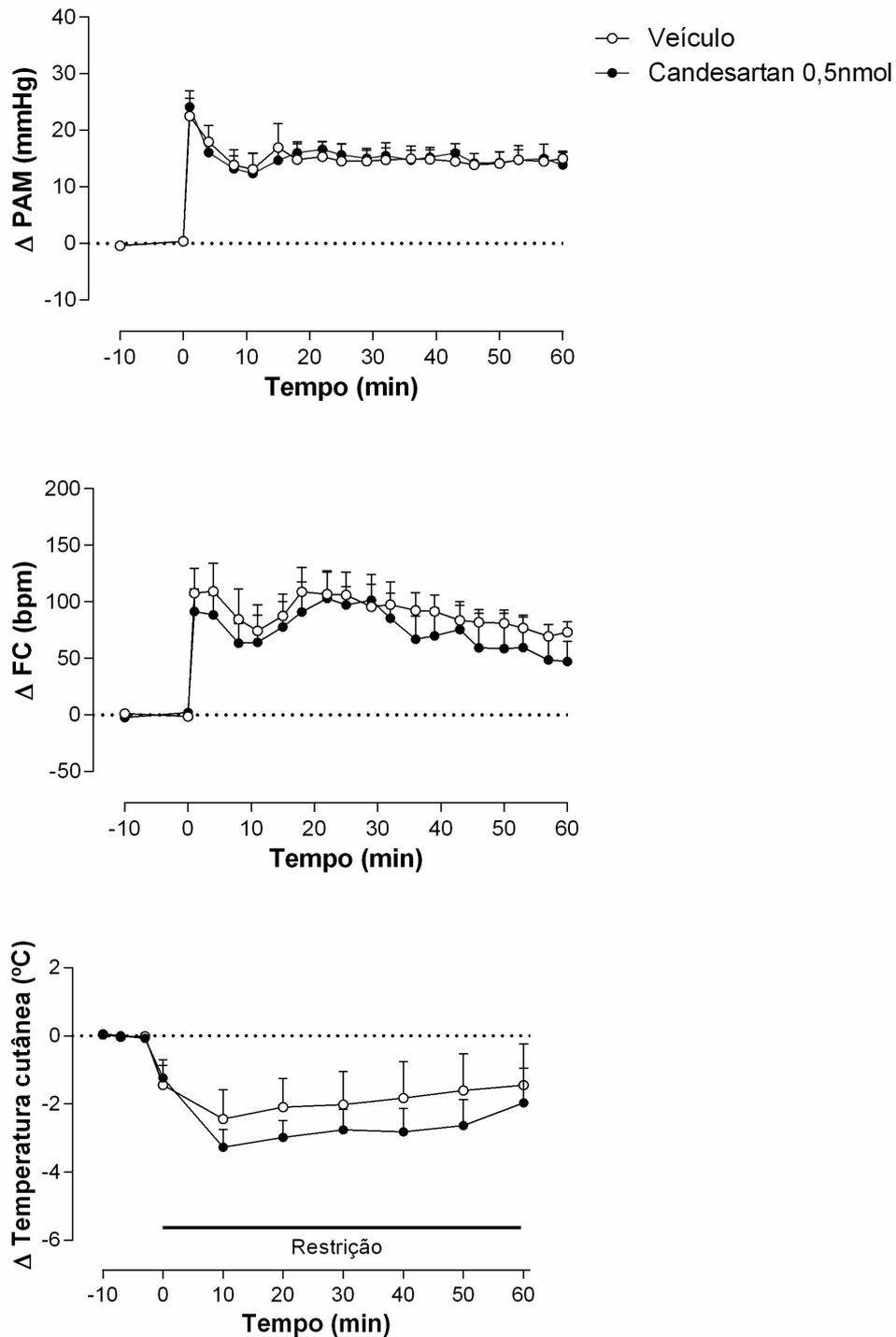


FIGURA 6-Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea ao longo do tempo, de ratos submetidos ao estresse de restrição e pré-tratados no PL com candesartan na dose de 0,5nmol/100nL (círculos pretos, n=5) ou veículo (círculos brancos, n=6). No tempo 0min os animais foram submetidos ao estresse de restrição. Pontos representam as médias e as barras o EPM.

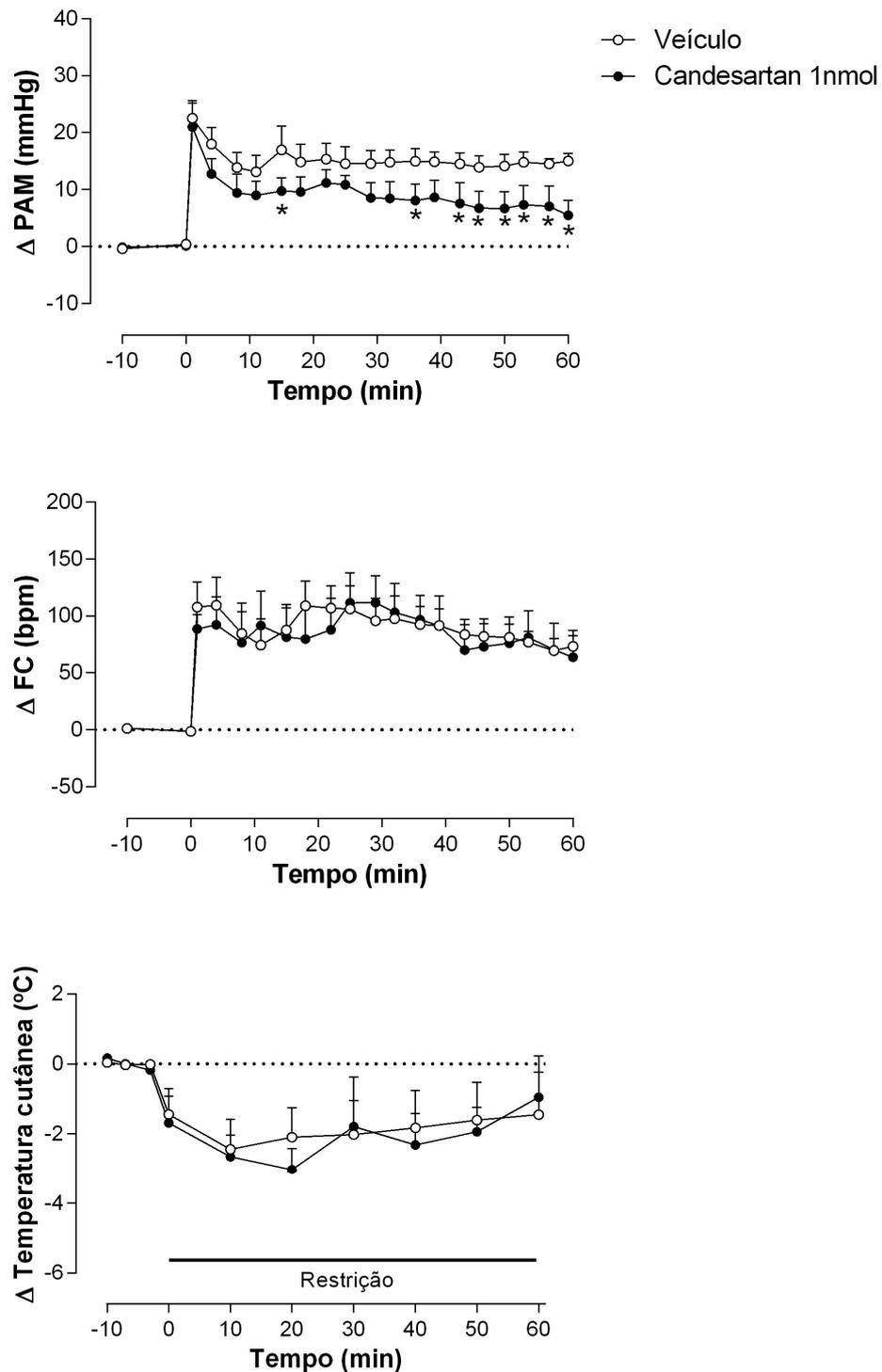


FIGURA 7-Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea ao longo do tempo, de ratos submetidos ao estresse de restrição e pré-tratados no PL com candesartan na dose de 1nmol/100nL (círculos pretos, n=6) ou veículo (círculos brancos, n=6). No tempo 0min os animais foram submetidos ao estresse de restrição. Pontos representam as médias e as barras o EPM, * indica que o grupo que recebeu 1nmol/100nL de candesartan é diferente do grupo que recebeu veículo, $p < 0,05$, pós-teste de Fisher.

4) Efeito da administração de diferentes doses de PD123177 (antagonista seletivo do receptor AT₂) no PL sobre as respostas autonômicas evocadas pelo ER.

A microinjeção de LCA 100 nL e PD123177 nas doses de 0,1, 0,5 e 1nmol/100nL não alterou os valores basais da PAM, FC e queda da temperatura cutânea ($p < 0,05$), conforme representado na tabela 3.

Tabela 3

Valores basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura da cauda (TC) antes e após a microinjeção de diferentes doses de PD123177 (antagonista seletivo AT₂) no PL de ratos.

PD123177 nmol/100nL	n	MAP			FC			TC		
		Antes±EPM (mmHg)	Após ±EPM (mmHg)	t=	Antes±EPM (bpm)	Após ±EPM (bpm)	t=	Após ±EPM °C	Após ±EPM °C	t=
0	5	102,1 ±	104,0 ±	2,6	387,5 ±	382,4 ±	1,0	32,26 ±	31,70 ±	1,4
		6,24	6,652		14,55	14,52		0,92	1,04	
0,1	5	93,93 ±	94,35 ±	0,7	357,1 ±	371,8 ±	1,4	31,96 ±	31,53 ±	0,4
		4,73	5,06		15,01	10,12		0,79	0,80	
0,5	5	97,90 ±	99,19 ±	1,4	362,7 ±	360,3 ±	0,8	30,25 ±	29,87 ±	0,2
		1,97	2,25		11,96	11,92		0,91	0,84	
1	6	103,4 ±	103,3 ±	0,07	385,9 ±	384,3 ±	0,2	32,42 ±	31,94 ±	1,1
		4,91	5,72		10,72	9,02		1,10	1,27	

A análise de *two-way* ANOVA indicou que o tratamento com PD123177 na dose de 1nmol/100nL reduziu a resposta taquicárdica (tratamento: $F_{3,300}=23,92$, $p < 0,05$; tempo: $F_{19,300}=9,8$, $p < 0,05$; interação: $F_{57,300}=0,74$, $p > 0,05$) sem alterar a resposta pressora (tratamento: $F_{3,300}=5,642$, $p > 0,05$; tempo: $F_{19,300}=9,8$, $p < 0,05$; interação: $F_{57,300}=0,52$, $p > 0,05$) e queda da temperatura cutânea (tratamento: $F_{3,102}=0,9518$, $p > 0,05$; tempo: $F_{5,102}=11,2$, $p < 0,05$; interação: $F_{15,102}=0,20$, $p > 0,05$) evocadas pelo estresse de restrição. As doses 0,1 e 0,5nmol/100nL de PD123177 não foram capazes de ocasionar mudanças nas respostas autonômicas induzidas por esse modelo aversivo ($p > 0,05$).

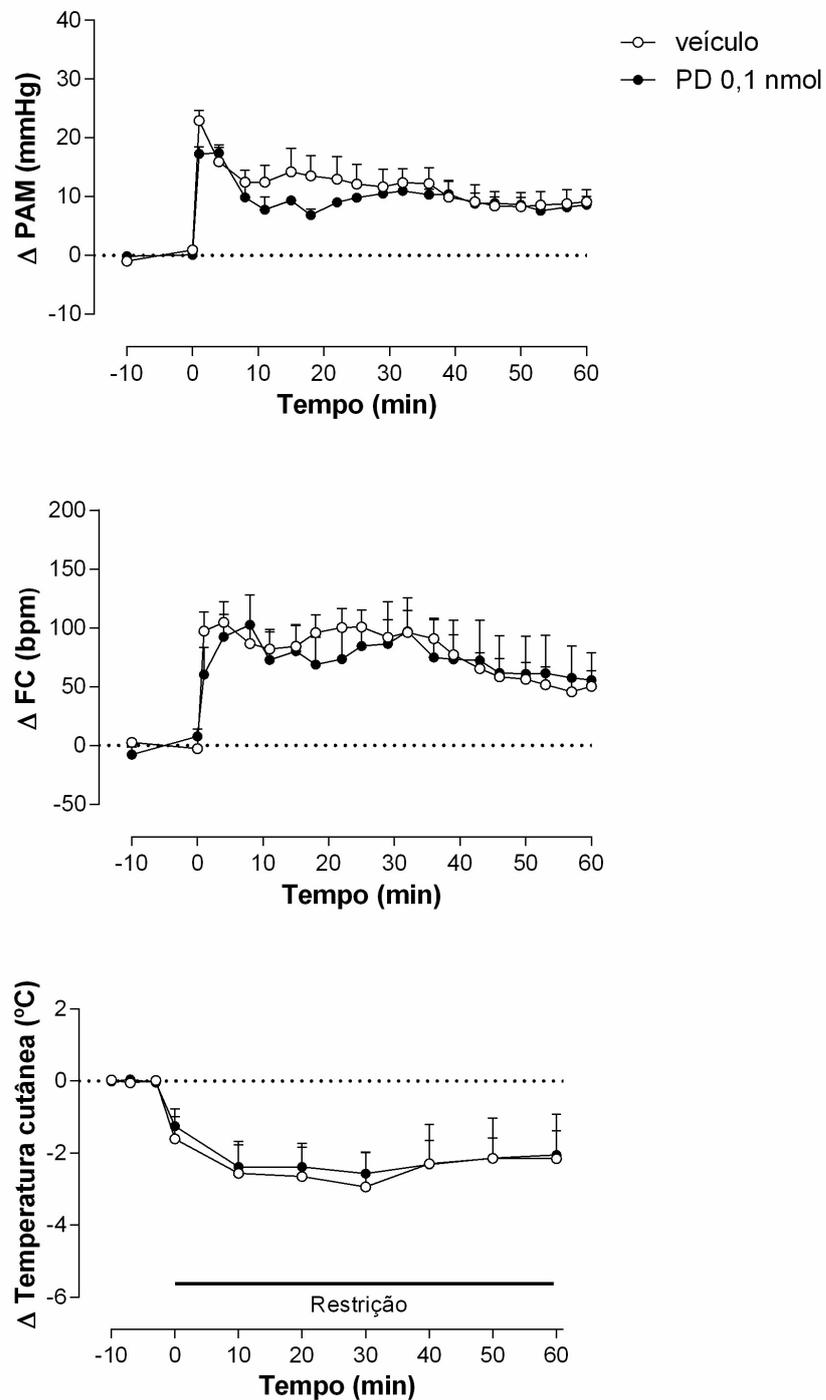


FIGURA 8- Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea ao longo do tempo de ratos submetidos ao estresse de restrição e pré-tratados no PL com PD123177 na dose de 0,1nmol/100nL (círculos pretos, n=5) ou veículo (círculos brancos, n=5). No tempo 0min os animais foram submetidos ao estresse de restrição. Pontos representam as médias e as barras o EPM.

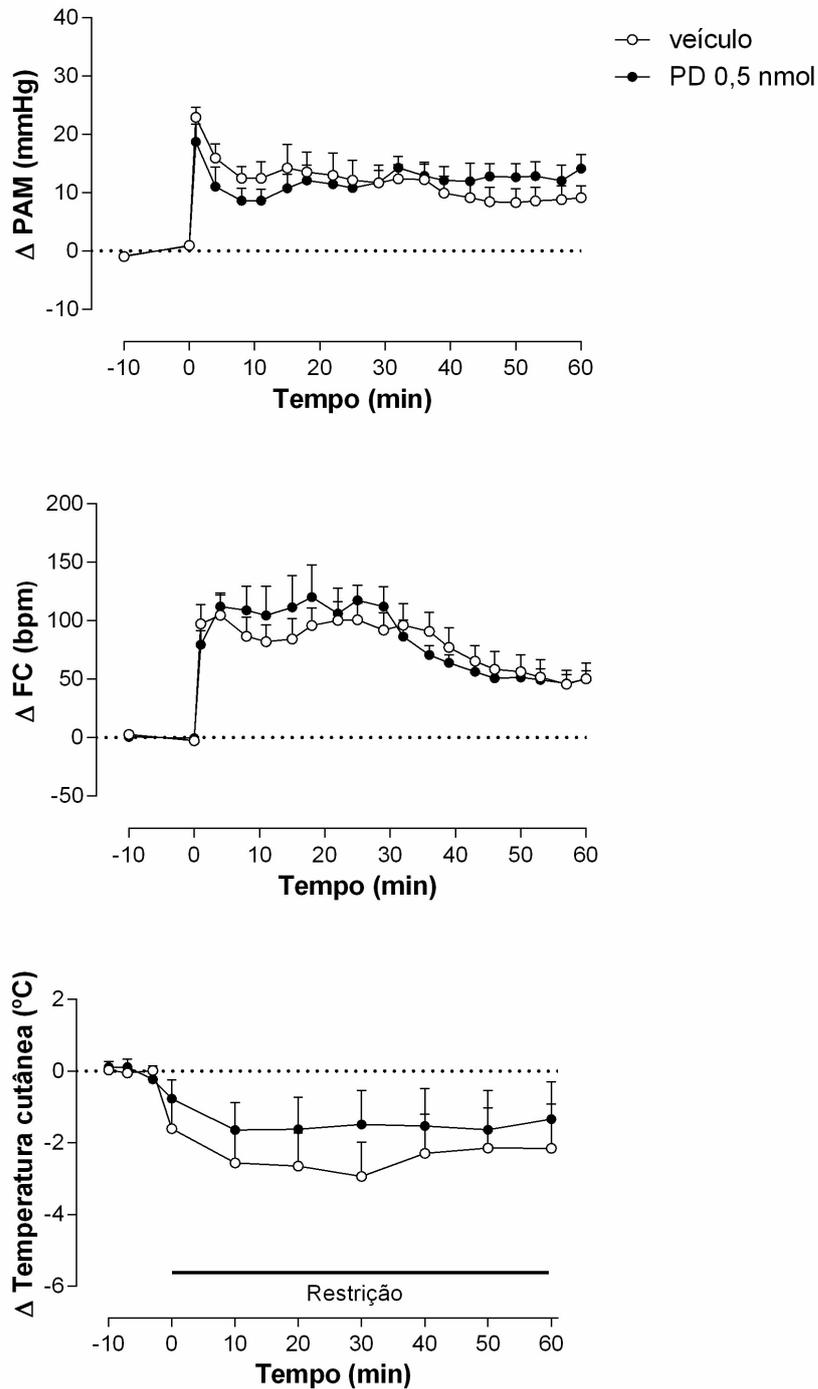


FIGURA 9- Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea ao longo do tempo de ratos submetidos ao estresse de restrição e pré-tratados no PL com PD123177 na dose de 0,5nmol/100nL (círculos pretos, n=5) ou veículo (círculos brancos, n=5). No tempo 0min os animais foram submetidos ao estresse de restrição. Pontos representam as médias e as barras o EPM.

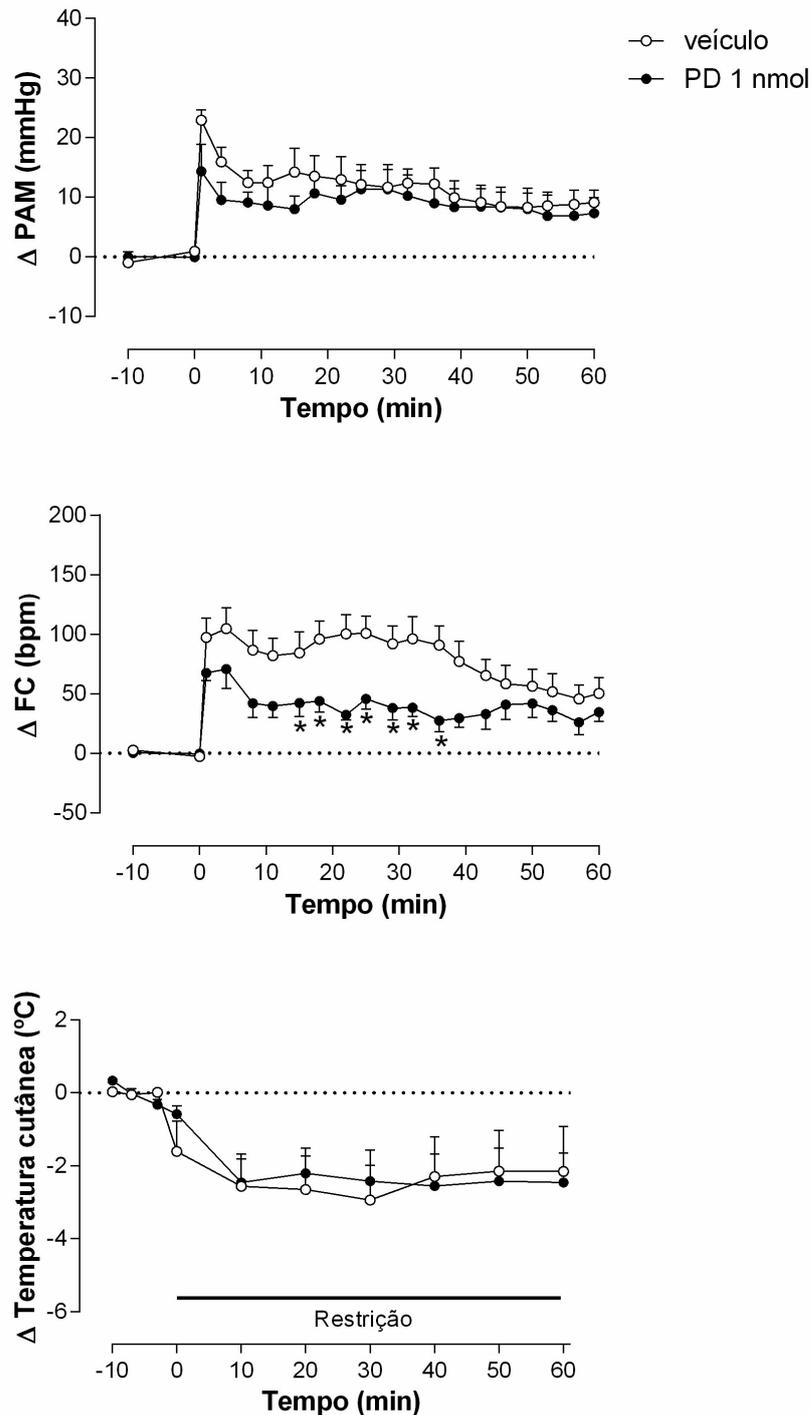


FIGURA 10- Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea ao longo do tempo de ratos submetidos ao estresse de restrição e pré-tratados no PL com PD123177 na dose de 1nmol/100nL (círculos pretos, n=6) ou veículo (círculos brancos, n=5). No tempo 0min os animais foram submetidos ao estresse de restrição. Pontos representam as médias e as barras o EPM, * indica que o grupo que recebeu 1nmol/100nL de PD123177 é diferente do grupo que recebeu veículo, $p < 0,05$, pós-teste de Fisher.

5) Efeito do ER agudo sobre a atividade da enzima NADPH oxidase no PL.

O teste t de Student não-pareado indicou que o ER agudo não foi capaz de aumentar a atividade da enzima NADPH oxidase no PL quando comparado ao grupo naive ($t=1,1$, $p<0,05$, $n=10$).

Além disso, o *one-way* ANOVA indicou que o pré-tratamento do PL com os antagonistas angiotensinérgicos e com o inibidor da ECA não foi capaz de alterar a atividade da enzima NADPH oxidase quando comparado ao grupo veículo ($p>0,05$).

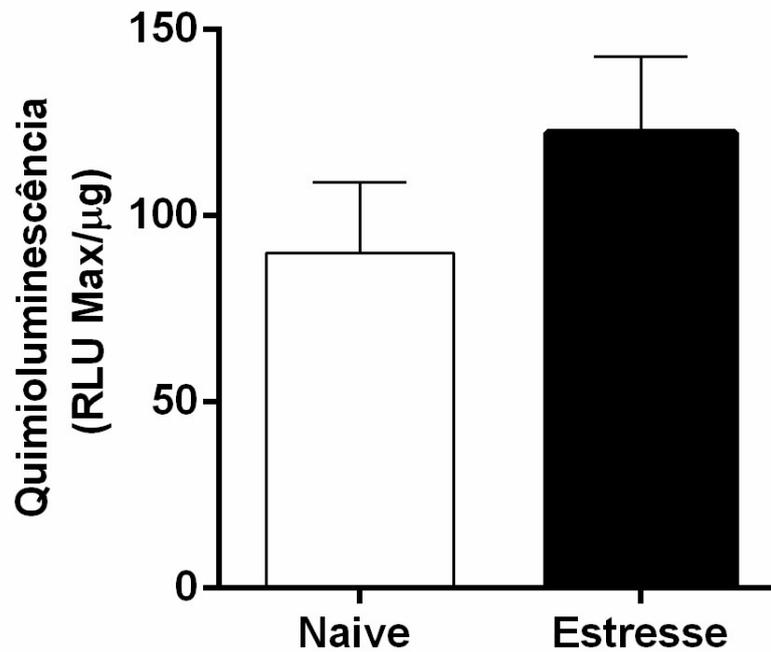


FIGURA 11- Atividade da enzima NADPH oxidase no PL dos animais pertencentes aos grupos experimentais *naive* (barra branca n=10) e *estresse* (barra preta, n=10). Os resultados estão expressos em relativas unidades de fluorescência (RLU) por micrograma (μg) de proteína (Bradford). Os animais do grupo estresse foram submetidos ao ER por 60 min. Barras representam as médias \pm EPM, * indica que o grupo estressado foi diferente do grupo naive, $p < 0,05$, teste t de Student não-pareado.

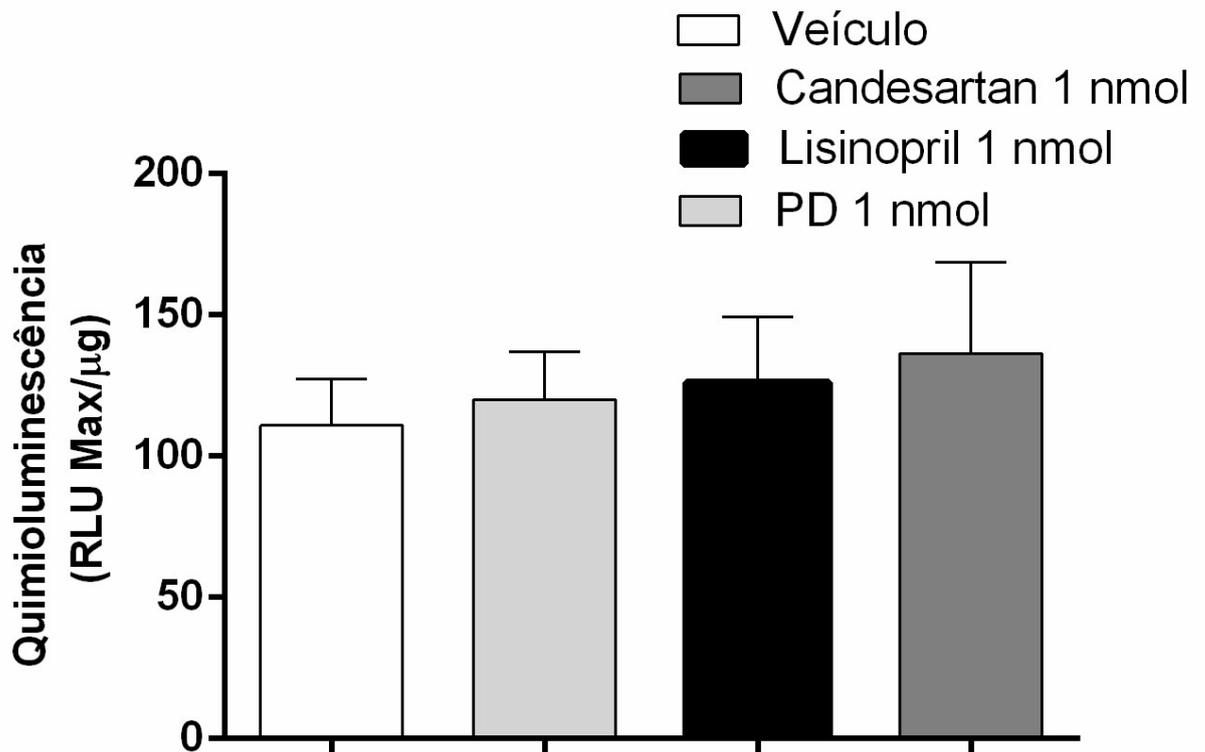


FIGURA 12- Atividade da enzima NADPH oxidase no PL dos animais pertencentes aos grupos experimentais veículo (barra branca n=9), candesartan (barra cinza claro, n=5), lisinopril (barra preta, n=6) e PD123177 (barra cinza escuro, n=7). Os resultados estão expressos em relativas unidades de fluorescência (RLU) por micrograma (μg) de proteína (Bradford). Todos os animais foram submetidos ao ER por 60 min. Barras representam as médias \pm EPM, $p > 0,05$, one-way ANOVA.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a neurotransmissão angiotensinérgica presente no PL é capaz de influenciar as respostas cardiovasculares ocasionadas pelo ER. A microinjeção local de candesartan, antagonista seletivo de receptores AT_1 , reduziu a resposta pressora sem afetar a resposta taquicárdica e a queda na temperatura cutânea evocadas pelo ER. Além disso, o pré-tratamento do PL com PD123177, antagonista seletivo de receptores AT_2 , reduziu a resposta taquicárdica, sem alterar a resposta pressora e a queda da temperatura cutânea ocasionadas pelo ER.

O pré-tratamento do PL com lisinopril, inibidor da ECA, causou redução das respostas pressora e taquicárdica, sem afetar a queda da temperatura cutânea, desencadeadas pelo ER. Dessa forma, nossos dados sugerem que a ECA no PL exerce uma influência facilitatória sobre as respostas pressora e taquicárdica ocasionadas pelo ER, que os receptores AT_1 possuem influência facilitatória sobre a resposta pressora sem afetar a resposta taquicárdica desencadeada pelo ER e que os receptores AT_2 presentes no PL exercem influência facilitatória sobre a resposta taquicárdica sem afetar a resposta pressora observadas durante exposição aguda ao estresse. Em adição, este trabalho demonstrou que o ER e o pré-tratamento com as drogas utilizadas não foram capazes de alterar a atividade da enzima NADPH oxidase no PL.

O ER está bem aceito na literatura como um estímulo aversivo capaz de ocasionar alterações autonômicas características, sendo elas o aumento sustentado da pressão arterial e da frequência cardíaca (Barron e Van Loon, 1989; Krieman *et al.*, 1992; Irvine *et al.*, 1997; Mcdougall *et al.*, 2000; Tavares e Correa, 2006),

vasodilatação nos músculos esqueléticos, acompanhada por vasoconstrição cutânea, causando rápido aumento da temperatura corpórea interna e queda na temperatura cutânea (Blessing e Seaman, 2003; Vianna e Carrive, 2005). Foi demonstrado que as respostas pressora e taquicárdica são mediadas por ativação do sistema nervoso simpático, uma vez que o antagonismo de receptores β e α -adrenérgicos é capaz de abolir estas respostas (Dos Reis *et al.*, 2014). Adicionalmente, bloqueio do parassimpático ocasiona um aumento da resposta taquicárdica evocada por modelos de estresse psicológico, sugerindo ser a resposta pressora mediada via simpático, enquanto a resposta taquicárdica é mediada tanto por ativação simpática quanto parassimpática (Baudrie *et al.*, 1997; Carrive, 2006).

Há evidências indicando que o córtex PL é capaz de participar na modulação de respostas cardiovasculares desencadeadas pelo ER, uma vez que a inibição reversível desta área com CoCl_2 potencializou a resposta taquicárdica sem alterar a resposta pressora evocada por este modelo aversivo (Tavares e Correa, 2006; Tavares *et al.*, 2009). Entretanto, os neurotransmissores envolvidos nesta modulação não se encontram completamente elucidados, uma vez que o bloqueio local com CoCl_2 promove bloqueio inespecífico de neurotransmissões.

Há evidências da existência de projeções diretas do CPFMV para estruturas diretamente envolvidas no controle cardiovascular, tais como o NTS, o núcleo ambíguo e o CVLM e RVLM (Hurley *et al.*, 1991; Buchanan *et al.*, 1994; Vertes, 2004). Além disso, é descrito na literatura conexões entre o PL com regiões bulbares envolvidas na regulação do sistema nervoso simpático (Verbene e Owens, 1998). Entretanto, a existência de conexões intermediárias com vias envolvidas na atividade cardiovascular do CPFMV não pode ser excluída, uma vez que existem

trabalhos funcionais que apontam a existência de conexões com o hipotálamo e a amígdala (Hardy e Mack, 1990).

O presente estudo avaliou a participação da neurotransmissão angiotensinérgica presente no PL na modulação das respostas autonômicas evocadas pelo ER. Para isso, os animais foram pré-tratados com lisinopril, inibidor da ECA. A ECA é a enzima responsável pela clivagem da Ang-I em Ang-II (Urata *et al.*, 1990; Tavares e Correa, 2006; Tavares *et al.*, 2009; Roks, 1999), ou seja, o bloqueio da enzima culminaria no prejuízo da produção de Ang-II. Foi demonstrado que a exposição a eventos estressores pode aumentar a liberação de Ang-II em várias estruturas encefálicas (Saavedra, 1992; Yang *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1996).

O tratamento do PL com lisinopril atenuou as respostas pressora e taquicárdica, sem alterar a queda da temperatura cutânea da cauda, evocadas pelo ER, sugerindo que a Ang-II desempenha uma influência facilitatória sobre as respostas pressora e taquicárdica evocadas pelo ER; porém não modula a queda da temperatura caudal, ressaltando o envolvimento da neurotransmissão angiotensinérgica do PL na modulação das respostas cardiovasculares desencadeadas pela exposição ao estresse agudo. Corroborando esta observação, trabalho do nosso grupo demonstrou que a microinjeção de lisinopril no PVN também ocasionou uma redução da resposta pressora, porém sem interferir com a resposta taquicárdica observada durante a exposição ao ER, sugerindo que a neurotransmissão angiotensinérgica do PVN exerce uma influência facilitatória sobre o componente vascular da resposta ao estresse (Busnardo *et al.*, 2014).

O próximo passo no presente estudo foi investigar qual receptor angiotensinérgico estaria envolvido no desencadeamento das respostas

autonômicas evocadas pelo ER. Para avaliar a participação dos receptores AT₁, foi utilizado o candesartan. Vários trabalhos indicam que o candesartan apresenta uma afinidade maior para o receptor AT₁ quando comparado com outros antagonistas deste mesmo receptor (Bhuiyan *et al.*, 2009; Bosnyak, 2011). O tratamento do PL com candesartan reduziu a resposta pressora sem afetar a resposta taquicárdica e a queda da temperatura cutânea evocadas pelo ER, sugerindo uma influência facilitatória do receptor AT₁ sobre a resposta pressora desencadeada pelo ER.

Foi descrito na literatura que diferentes tipos de estresse, tais como o estresse por isolamento e o ER em baixas temperaturas, são capazes de aumentar a expressão de receptores AT₁ em estruturas envolvidas na modulação de respostas frente a situações aversivas (Saavedra *et al.*, 2006; Bregonzio, 2008). Além disso, o bloqueio dos receptores AT₁, através da administração periférica de candesartan, foi capaz de prevenir respostas hormonais e simpatoadrenais decorrentes da exposição ao estresse de isolamento (Armando, 2001).

Corroborando o presente achado, estudos apontam a participação dos receptores AT₁ na modulação de respostas cardiovasculares em outras áreas centrais, dentre elas a PAG e o NTS (D'amico *et al.*, 1997; Tan, 2007). Além disso, trabalho do nosso grupo evidenciou a participação do receptor AT₁ presente no PVN na modulação da resposta pressora ao ER, sem afetar a resposta taquicárdica por ele evocada (Busnardo *et al.*, 2014). Este conjunto de dados acima mencionados, assim como os apresentados no presente trabalho, sugere que os receptores AT₁ estão envolvidos na modulação de respostas autonômicas desencadeadas por estresse.

Para investigar a possível participação dos receptores AT₂ na modulação das respostas autonômicas evocadas pelo ER, utilizou-se o PD123177, antagonista seletivo para o este receptor. A microinjeção deste antagonista no PL reduziu a resposta taquicárdica, sem afetar a resposta pressora e a queda da temperatura cutânea ocasionadas pelo ER, sugerindo que estes receptores desempenhem uma influencia facilitatória sobre a resposta taquicárdica evocada por esse modelo de estresse agudo.

Já foi descrito na literatura que os receptores AT₂ estão presentes em estruturas relacionadas a funções motoras, comportamentais e sensoriais no cérebro de ratos adultos, tais como o complexo da oliva inferior e núcleos talâmicos (Tsutsumi e Saavedra, 1991). Bregonzio et al. (2008) demonstraram que o estresse agudo aumenta a ligação da Ang-II a receptores AT₂ na oliva inferior, enquanto que no núcleo ventrolateral talâmico, o mesmo encontra-se diminuído frente a esta situação. Em adição, o bloqueio farmacológico de receptores AT₂, após administração intracerebroventricular de PD123319, atenuou a ansiedade e o comprometimento motor induzidos por Ang-II, sugerindo que estes receptores também participam na modulação de respostas comportamentais (Braszko *et al.*, 2003).

No que concerne a estudos em áreas centrais envolvidas no controle cardiovascular, há evidencias de presença de receptores AT₂ em áreas centrais diretamente envolvidas neste controle, tais como o CVLM e o RVLM. A administração bilateral de PD123319 no RVLM aumentou as respostas pressora e taquicárdica em um modelo de contração muscular estática. Por outro lado, o mesmo tratamento no CVLM reduziu as respostas cardiovasculares frente à mesma

situação, demonstrando que o receptor AT₂ desempenha papéis distintos na modulação das respostas cardiovasculares nas áreas estudadas (Tedesco, 2009). Estes dados, assim como os dados do presente estudo, sugerem que o receptor AT₂ está envolvido na modulação de diferentes respostas ocasionadas por situações de estresse.

Outra consequência da exposição ao estresse é o aumento na produção de EROs. Foi demonstrado que o estresse oxidativo, desencadeado por exposição a estímulos estressores, ocorre devido à ativação simpática e aumento da taxa respiratória, fornecendo maior quantidade de oxigênio para os tecidos. Este aumento da demanda metabólica gera um estresse mitocondrial e, conseqüentemente, o desequilíbrio entre a geração de EROs e o sistema antioxidante do organismo (Halliwell, 1994; Manoli, 2007). Foi demonstrado que o estresse de imobilização agudo é capaz de ocasionar mudanças rápidas no ciclo redox no plasma de ratos, aumentando fatores pró-oxidantes e diminuindo os antioxidantes (Chen *et al.*, 2014). Além disso, Samarghandian *et al.*, 2016 evidenciaram que o estresse de restrição crônico aumenta o estresse oxidativo no fígado, rim e, em particular, no cérebro. Trabalhos demonstraram que a exposição ao ER por 120 minutos também altera o *status* oxidativo, induzindo um estado pró-oxidativo no hipocampo, bem como no córtex cerebral após um período de exposição de sete horas ao ER (Moretti *et al.*, 2013; Spiers *et al.*, 2013). Recentemente, outro trabalho demonstrou que o ER agudo é capaz de alterar o status oxidativo e a peroxidação lipídica no hipocampo e no estriado, sendo que esta alteração exibiu um perfil diferente em cada uma das regiões (Spiers *et al.*, 2016).

Apesar de evidências sugerirem que a exposição aguda ao estresse altera o *status* oxidativo no córtex, no presente estudo nós não observamos diferenças na atividade da enzima NADPH oxidase, no PL em animais estressados agudamente por 60min quando comparados a animais que não foram submetidos ao ER. Esse dado nos sugere que, possivelmente, o ânion superóxido possa estar sendo sintetizado por outras vias de produção. Dessa forma, nós não observamos nenhuma alteração na atividade da NADPH oxidase nos animais tratados no PL que foram submetidos ao ER.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Em conclusão, os presentes resultados sugerem que a Ang-II atue através dos receptores AT₁ e AT₂ do córtex PL modulando, respectivamente, o componente vascular e o cardíaco da resposta autonômica ocasionada pelo ER. Além disso, os resultados referentes à atividade da enzima NADPH oxidase, sugerem que o ER agudo, os receptores AT₁, AT₂ e a ECA não alteram a atividade desta enzima no PL.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMANDO, I. E. A. Peripheral administration of an angiotensin II AT1 receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation stress. **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 3880-3889, 2001.
- BARRON, B. A.; VAN LOON, G. R. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. **J Auton Nerv Syst**, v. 28, n. 2, p. 179-87, Nov 1989.
- BAUDRIE, V. et al. Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. **J Auton Pharmacol**, v. 17, n. 5, p. 303-9, Oct 1997.
- BHATNAGAR, S. et al. The effects of prior chronic stress on cardiovascular responses to acute restraint and formalin injection. **Brain Res**, v. 797, n. 2, p. 313-20, Jun 29 1998.
- BHUIYAN, M. A. et al. Binding sites of valsartan, candesartan and losartan with angiotensin II receptor 1 subtype by molecular modeling. **Life Sci**, v. 85, n. 3-4, p. 136-40, Jul 17 2009.
- BICKERTON, R. K., & BUCKLEY, J. P. Evidence for a central mechanism in angiotensin induced hypertension. **Experimental Biology and Medicine** v. 106, n. 4, p. 834-836., 1961.
- BLESSING, W. W.; SEAMAN, B. 5-hydroxytryptamine(2A) receptors regulate sympathetic nerves constricting the cutaneous vascular bed in rabbits and rats. **Neuroscience**, v. 117, n. 4, p. 939-48, 2003.
- BOSNYAK, S., JONES, E. S., CHRISTOPOULOS, A., AGUILAR, M. I., THOMAS, W. G., & WIDDOP, R. E. . Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. **Clinical science**, v. 121, n. 7, p. 297-303, 2011.
- BRASZKO, J. J.; KULAKOWSKA, A.; WINNICKA, M. M. Effects of angiotensin II and its receptor antagonists on motor activity and anxiety in rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 54, n. 2, p. 271-81, Jun 2003.
- BREGONZIO, C., SELTZER, A., ARMANDO, I., PAVEL, J., & SAAVEDRA, J. M. . Angiotensin II AT1 receptor blockade selectively enhances brain AT2 receptor expression, and abolishes the cold-restraint stress-induced increase in tyrosine hydroxylase mRNA in the locus coeruleus of spontaneously hypertensive rats. **Stress** v. 11, n. 6, p. 457-466, 2008.
- BRUNNER, H. R. et al. Essential hypertension: renin and aldosterone, heart attack and stroke. **N Engl J Med**, v. 286, n. 9, p. 441-9, Mar 2 1972.

BUCHANAN, S.L.; THOMPSON, R.H.; MAXWELL, B.L. POWELL, D.A. Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit. **Exp. Brain Res.**, v100, p.469-483, 1994.

BURNS, S. M.; WYSS, J. M. The involvement of the anterior cingulate cortex in blood pressure control. **Brain Res**, v. 340, n. 1, p. 71-7, Aug 5 1985.

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. 12-9, Jun 13 2014.

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.

CARRIVE, P. Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 33, n. 12, p. 1251-1254, 2006.

CECHETTO, D. F., & CHEN, S. J. Subtropical sites mediating sympathetic responses from insular cortex in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v. 258, n. 1, p. R245-R255, 1990.

CHAI, S. Y.; MCKINLEY, M. J.; MENDELSON, F. A. Distribution of angiotensin converting enzyme in sheep hypothalamus and medulla oblongata visualized by in vitro autoradiography. **Clin Exp Hypertens A**, v. 9, n. 2-3, p. 449-60, 1987.

CHALMERS, J.; PILOWSKY, P. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. **J Hypertens**, v. 9, n. 8, p. 675-94, Aug 1991.

CHAPPELL, M. C., TALLANT, E. A., BROSNIHAN, K. B., & FERRARIO, C. M. . Conversion of angiotensin I to angiotensin-(1-7) by thimet oligopeptidase (EC 3.4. 24.15) in vascular smooth muscle cells. **Journal of Vascular Medicine and Biology**, v. 5, p. 129, 1994.

CHEN, H. J. et al. Reactive nitrogen species contribute to the rapid onset of redox changes induced by acute immobilization stress in rats. **Stress**, v. 17, n. 6, p. 520-7, Dec 2014.

D'AMICO, M. et al. AT1 receptors mediate pressor responses induced by angiotensin II in the periaqueductal gray area of rats. **Life Sci**, v. 61, n. 1, p. PL17-20, 1997.

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

DE GASPARO, M. et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 3, p. 415-72, Sep 2000.

DESCHEPPER, C. F.; BOUHNİK, J.; GANONG, W. F. Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. **Brain Res**, v. 374, n. 1, p. 195-8, May 21 1986.

DIORIO, D.; VIAU, V.; MEANEY, M. J. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **J Neurosci**, v. 13, n. 9, p. 3839-47, Sep 1993.

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. 362-72, Jul 2014.

DU, J. et al. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 9, p. 3543-8, Mar 3 2009.

FASSINI, A. et al. Opioid receptors in the prelimbic cortex modulate restraint stress-induced cardiovascular responses in the rat. **Neuropharmacology**, v. 85, p. 367-74, Oct 2014.

FERNANDES, K. B. P., CRIPPA, G. E., TAVARES, R. F., ANTUNES-RODRIGUES, J. F. M. A., & CORRÊA, F. M. A. . Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline injection into the cingulate cortex of unanesthetized rats. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 6, p. 757-763, 2003.

FERRARIO, C. M. Angiotension-(1-7) and antihypertensive mechanisms. . **Journal of nephrology**, v. 11, n. 6, p. 278-283, 1997.

FERREIRA-JUNIOR, N. C., FEDOCE, A. G., ALVES, F. H., CORRÊA, F. M., & RESSTEL, L. B. . Medial prefrontal cortex endocannabinoid system modulates baroreflex activity through CB1 receptors. . **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 7, p. R876-R885., 2012.

FIGUEIREDO, H. F. et al. The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 8, p. 2357-64, Oct 2003.

FORTALEZA, E. A. T., SCOPINHO, A. A., & DE AGUIAR CORRÊA, F. M. . Cardiovascular responses to microinjection of noradrenaline into the medial amygdaloid nucleus of conscious rats result from α_2 -receptor activation and vasopressin release. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 9, p. 1677-1684, 2011.

FRYSZTAK, R. J.; NEAFSEY, E. J. The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. **Brain Res**, v. 643, n. 1-2, p. 181-93, Apr 18 1994.

GOLDEINSTEIN, D. S. Central catecholamines and the control of sympathetic tone. In: KUNOS, G. E. C. (Ed.). **Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation**, v.02, 1992.

GROEMPING, Y. et al. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. **Cell**, v. 113, n. 3, p. 343-55, May 2 2003.

GROENEWEGEN, H. J. Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. **Neuroscience**, v. 24, n. 2, p. 379-431, Feb 1988.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721-4, Sep 10 1994.

HARDY, S.G.; HOLMES, D.E. Prefrontal stimulus-produced hypotension in rat. **Exp. Brain Res.**, v. 73, p.249-255, 1988.

HARMER, D., GILBERT, M., BORMAN, R., & CLARK, K. L. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. . **FEBS letters** v. 532, n. 1, p. 107-110., 2002

HEALY, D. P.; PRINTZ, M. P. Distribution of immunoreactive angiotensin II, angiotensin I, angiotensinogen and renin in the central nervous system of intact and nephrectomized rats. **Hypertension**, v. 6, n. 2 Pt 2, p. 1130-6, Mar-Apr 1984.

HERMANN, K. et al. Presence of renin in primary neuronal and glial cells from rat brain. **Brain Res**, v. 437, n. 2, p. 205-13, Dec 29 1987.

HILTON, S. M. Hypothalamic regulation of the cardiovascular system. **Br Med Bull**, v. 22, n. 3, p. 243-8, Sep 1966.

HURLEY, K.M.; HERBERT H.; MOGA, M.M. SAPER, C.B. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 8, p. 249-276, 1991.

IMAKI, T. et al. Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. **Brain Res**, v. 616, n. 1-2, p. 114-25, Jul 9 1993.

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

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

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

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.

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

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, Apr 2002.

LI, J. M., & SHAH, A. M. . Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p. 19952-19960, 2002.

LOEWY, A. D. Forebrain nuclei involved in autonomic control. **Prog Brain Res**, v. 87, p. 253-68, 1991.

LOEWY, A. D.; MCKELLAR, S. The neuroanatomical basis of central cardiovascular control. **Fed Proc**, v. 39, n. 8, p. 2495-503, Jun 1980.

MANOLI, I., ALESCI, S., BLACKMAN, M. R., SU, Y. A., RENNERT, O. M., & CHROUSOS, G. P. Mitochondria as key components of the stress response. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 18, n. 5, p. 190-198, 2007

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

MCDOUGALL, S. J. et al. Restraint stress : differential cardiovascular responses in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 35, n. 1 Pt 1, p. 126-9, Jan 2000.

MCKLVEEN, J. M. et al. Role of prefrontal cortex glucocorticoid receptors in stress and emotion. **Biol Psychiatry**, v. 74, n. 9, p. 672-9, Nov 1 2013.

MECAWI, A. S. et al. The Role of Angiotensin II on Sodium Appetite After a Low-Sodium Diet. **Journal of neuroendocrinology**, v. 25, n. 3, p. 281-291, 2013.

MONTENEGRO, M. F. et al. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 1, p. 144-52, Jul 1 2011.

MORETTI, M. et al. Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. **J Mol Neurosci**, v. 49, n. 1, p. 68-79, Jan 2013.

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

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

NICKENIG, G., & HARRISON, D. 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, 2002.

NOGARI, B. M. **Efeitos cardiovasculares causados pela microinjeção de angiotensina II no cortex pré-límbico de ratos**. 2015. 73 (Mestrado). Farmacologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

NOH, K. M.; KOH, J. Y. Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. **J Neurosci**, v. 20, n. 23, p. RC111, Dec 1 2000.

OWENS, N. C.; SARTOR, D. M.; VERBERNE, A. J. Medial prefrontal cortex depressor response: role of the solitary tract nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 89, n. 4, p. 1331-46, 1999.

OWENS, N. C.; VERBERNE, A. J. Medial prefrontal depressor response: involvement of the rostral and caudal ventrolateral medulla in the rat. **J Auton Nerv Syst**, v. 78, n. 2-3, p. 86-93, Jan 14 2000.

PAXINOS, G. W., C. **The rat brain stereotaxic coordinates**. 2ª Edição. Australia: Academic Press, 1997.

PEACH, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiol Rev**, v. 57, n. 2, p. 313-70, Apr 1977.

PORTER, J. P. Contribution of central ANG II to acute stress-induced changes in baroreflex function in young rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 279, n. 4, p. R1386-91, Oct 2000.

PRINTZ, M. et al. Minireview: the brain renin-angiotensin system. In: GARTEN, D.; PRINTZ, M., et al (Ed.). Berlin: Springer, v.04, 1982. p.3-52.

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

RESSTEL, L. B.; FERNANDES, K. B.; CORREA, F. M. Medial prefrontal cortex modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. **Brain Res**, v. 1015, n. 1-2, p. 136-44, Jul 23 2004.

RESSTEL, L. B. M., & CORREA, F. M. A. . Pressor and tachycardic responses evoked by microinjections of l-glutamate into the medial prefrontal cortex of unanaesthetized rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 2513-2520, 2005.

RESSTEL, L. B. M., & CORRÊA, F. M. A. . Injection of l-glutamate into medial prefrontal cortex induces cardiovascular responses through NMDA receptor–nitric oxide in rat. . **Neuropharmacology**, v. 51, n. 1, p. 160-167, 2006.

ROKS, A. J., VAN GEEL, P. P., PINTO, Y. M., BUIKEMA, H., HENNING, R. H., DE ZEEUW, D., & VAN GILST, W. H. Angiotensin-(1–7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. . **Hypertension**, v. 34 n. 2, p. 296-301, 1999.

SAAVEDRA, J. M. Brain and pituitary angiotensin. **Endocr Rev**, v. 13, n. 2, p. 329-80, May 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. 1123-34, Jun 2006.

_____. Quantitative distribution of angiotensin II binding sites in rat brain by autoradiography. **Peptides**, v. 7, n. 4, p. 679-87, Jul-Aug 1986.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Protective Effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain, Liver, and Kidney. **Biochem Res Int**, v. 2016, p. 2645237, 2016.

SANDBERG, K. et al. Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. **J Biol Chem**, v. 267, n. 14, p. 9455-8, May 15 1992.

SANTOS, R. A., E SILVA, A. C. S., MARIC, C., SILVA, D. M., MACHADO, R. P., DE BUHR, I., ... & MENDES, E. P. . Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8258-8263., 2003.

SARTER, M.; MARKOWITSCH, H. J. Collateral innervation of the medial and lateral prefrontal cortex by amygdaloid, thalamic, and brain-stem neurons. **J Comp Neurol**, v. 224, n. 3, p. 445-60, Apr 10 1984.

SCOPINHO, A. A., RESSTEL, L. B. M., ANTUNES-RODRIGUES, J., & CORRÊA, F. M. A. Pressor effects of noradrenaline injected into the lateral septal area of unanesthetized rats. **Brain Research**, v. 1122, n. 1, p. 126-134, 2006.

SESACK, S. R. et al. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **J Comp Neurol**, v. 290, n. 2, p. 213-42, Dec 8 1989.

SPIERS, J. G. et al. Acute restraint stress induces rapid and prolonged changes in erythrocyte and hippocampal redox status. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 11, p. 2511-9, Nov 2013.

_____. Acute restraint stress induces rapid changes in central redox status and protective antioxidant genes in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 67, p. 104-12, May 2016.

STORNETTA, R. L. et al. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. **Science**, v. 242, n. 4884, p. 1444-6, Dec 9 1988.

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. 207-11, Jan 1999.

TAMMARIELLO, S. P.; QUINN, M. T.; ESTUS, S. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. **J Neurosci**, v. 20, n. 1, p. RC53, Jan 1 2000.

TAN, P. S., KILLINGER, S., HORIUCHI, J., & DAMPNEY, R. A. . Baroreceptor reflex modulation by circulating angiotensin II is mediated by AT1 receptors in the nucleus tractus solitarius. . **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293 n. 6, p. R2267-R2278., 2007.

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075-81, Dec 2003.

TAVARES, R. F.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; DE AGUIAR CORREA, F. M. Pressor effects of electrical stimulation of medial prefrontal cortex in unanesthetized rats. **J Neurosci Res**, v. 77, n. 4, p. 613-20, Aug 15 2004.

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

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

TEDESCO, A. A., A. . Angiotensin II type-2 (AT2) receptor antagonism alters cardiovascular responses to static exercise and simultaneously changes glutamate/GABA levels within the ventrolateral medulla. . **Neuroscience research**, v. 64, n. 4, p. 372-379, 2009.

THOMAS, W. G.; SERNIA, C. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat brain. **Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 319-41, Apr 1988.

TSUTSUMI, K.; SAAVEDRA, J. M. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. **Am J Physiol**, v. 261, n. 1 Pt 2, p. R209-16, Jul 1991.

URATA, H. et al. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. **Circ Res**, v. 66, n. 4, p. 883-90, Apr 1990.

VERBERNE, A. J. et al. Supramedullary modulation of sympathetic vasomotor function. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 24, n. 9-10, p. 748-54, Sep-Oct 1997.

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

VERTES R.P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse**, v. 51, p.32-58, 2004.

VIANNA, D. M.; CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 21, n. 9, p. 2505-12, May 2005.

VICKERS, C. et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **J Biol Chem**, v. 277, n. 17, p. 14838-43, Apr 26 2002.

WANG, G. et al. NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. **J Neurosci**, v. 24, n. 24, p. 5516-24, Jun 16 2004.

YANG, G.; WAN, Y.; ZHU, Y. Angiotensin II--an important stress hormone. **Biol Signals**, v. 5, n. 1, p. 1-8, Jan-Feb 1996.

YANG, G. et al. Changes in circulating and tissue angiotensin II during acute and chronic stress. **Biol Signals**, v. 2, n. 3, p. 166-72, May-Jun 1993.

YOKOYAMA, C.; SASAKI, K. Regional expressions of Fos-like immunoreactivity in rat cerebral cortex after stress; restraint and intraperitoneal lipopolysaccharide. **Brain Res**, v. 816, n. 2, p. 267-75, Jan 23 1999.

ZIMMERMAN, M. C.; DAVISSON, R. L. Redox signaling in central neural regulation of cardiovascular function. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 84, n. 2-3, p. 125-49, Feb-Apr 2004.