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

**Sistema glutamatérgico e nitrérgico do hipocampo dorsal de ratos e a modulação da
atividade autonômica durante situações de estresse.**

Teophanes Barbosa Moraes Neto

Ribeirão Preto, 2011.

Teophanes Barbosa Moraes Neto

Sistema glutamatérgico e nitrérgico do hipocampo dorsal de ratos e a modulação da atividade autonômica durante situações de estresse.

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa

Ribeirão Preto, 2011.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus

Administrativa de Ribeirão Preto/ USP

MORAES-NETO, TEOPHANES BARBOSA

Sistema glutamatérgico e nitrérgico do hipocampo dorsal de ratos e a modulação da atividade autonômica durante situações de estresse.

67 p.: il.; 31 cm

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

Orientador: Corrêa, Fernando Morgan de Aguiar.

1. Hipocampo Dorsal
2. Glutamato
3. Sistema autonômico
4. Estresse

Data da defesa: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Leandro José Bertoglio _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“Do or do not. There is no try.”

Yoda

*Para Nádia Luna, o grande amor da minha vida, pelo apoio,
companheirismo, dedicação, alegria e todo o amor e carinho...*

*Para Regina e Ricardo e para José e Dilma, meus queridos pais, pelo
incentivo, pela ajuda e por serem ótimos exemplos...*

Para Woodstock e Icaro, meus filhos, pelas alegrias e carinho...

A vocês, com todo o meu amor e gratidão,

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa, pela orientação e paciência que sempre teve comigo. Por toda sua ajuda na minha formação como pesquisador e pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes, por ter confiado em mim, mesmo nos momentos mais difíceis desta jornada e sempre estar a minha disposição para me ajudar, pela orientação e conduta ética que me servem de inspiração. E por além de “chefe”, ser um excelente irmão, que sempre me incentivou, me ajudou e sempre esta disposta a uma boa festa. Sem você, irmão, nada disso seria possível.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio e Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, pela avaliação e pelas sugestões que contribuíram para este trabalho.

À Sâmia Joca, minha cunhada, pela amizade, pelos esclarecimentos científicos e por todos os bons momentos em família.

A América, por me ensinar e auxiliar tanto nos experimentos quanto na dissertação e pelos momentos de diversão que nossa amizade proporcionou.

Ao Daniel, pela amizade e estar sempre disposto a me ajudar.

Aos amigos e colegas que tive a alegria de trabalhar, Cristiane, Milena, Fernando, Carlão, Eduardo, Silvana, Sara Hott, Denise, Alessandra, Nilson, Gabriela, Leandro, Cibebe, Lucas e Ricardo.

Aos vários colegas e amigos do departamento que sempre estão afim de um bom churrasco: Sabrina, Felipe, Carol, Plinio, Thiago, Vitor, Vinicius e Cassiano.

A Laura Camargo, por todas as ajudas, procedimentos realizados e todo cuidado com o nosso laboratório.

A Idalia I. B. Aguiar e a Ivanilda A. C. Fortunato, pelo carinho e assistência técnica na realização dos procedimentos cirúrgicos e de aquisição histológica.

A Simone Guilhaume, José Carlos e Eleni pela amizade e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Ao pessoal da secretaria Sônia Andrade, Fátima Petean e em especial a José Waldik Ramon que, com boa vontade, carinho e muita competência, atenderam e auxiliaram com as dificuldades burocráticas.

Às funcionárias Eliana B.C. de Barros e Maria I.C. Nemoto, pelo cuidado e respeito que dedicam aos animais no biotério.

Aos meus irmãos, por todo amor e carinho.

Aos amigos distantes, mas sempre queridos.

Agradeço a CAPES e a CNPQ pelo suporte financeiro.

RESUMO

O hipocampo dorsal (HD) é uma estrutura do sistema límbico que está envolvida em processos emocionais, de memória e aprendizado. Além disso, o HD também exerce influência sobre a atividade autonômica.

Durante situações aversivas pode se observar tanto respostas autonômicas (aumento da pressão arterial, frequência cardíaca e queda da temperatura cutânea) quanto comportamentais. O HD está envolvido com diversas alterações associadas a reações defensivas e apresenta conexões com diversas estruturas que modulam essas respostas, fazendo parte de uma via responsável por modular as respostas durante situações aversivas. São observados aumentos nas respostas autonômicas durante o estresse por restrição (ER). Durante a atividade do HD está aumentada. Além disso, é possível observar aumento dos níveis de glutamato no HD.

A ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no sistema nervoso central aumenta a síntese de óxido nítrico (NO) por ativação da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase (nNOS). Além disso, esta interação, NMDA/NO, no HD parece ser importante nas reações defensivas. Portanto, no presente estudo nós observamos que a administração de glutamato no HD promove aumentos do sistema cardiovascular, similares a aqueles observados durante situações de estresse. Estas respostas cardiovasculares são associadas com um aumento da atividade simpática. Além disso, os efeitos do glutamato foram inibidos pela administração do AP7, um antagonista NMDA, do N^ω-Propyl-L-Arginine, um inibidor da nNOS ou do Carboxy-PTIO(S)-3-carboxy-4-hydroxyphenylglycine, um sequestrador de NO. Finalmente, a administração destas drogas foi capaz de reduzir as respostas autonômicas causadas pelo ER.

Portanto, nossos achados mostram que o sistema glutamatérgico presente no HD está envolvido com a modulação autonômica através de receptores do tipo NMDA e a ativação de nNOS. Além disso, esta via NMDA/NO está envolvida na modulação autonômica durante situações de estresse.

SUMMARY

The dorsal hippocampus (DH) is a structure of limbic system that is involved in emotional, learning and memories process. Moreover, the DH also exerts influence on autonomic activity.

During aversive situations it is possible observe autonomic responses (increase in blood pressure, heart rate and decrease in cutaneous temperature) associated to defensive behavioral. The DH is involved with alterations associated to defensive reactions and presents connections with several structures which modulate that responses, making part of a pathway involved with behavior and autonomic responses associated with aversive situations. Increase of autonomic responses are observed during restraint stress (RS). During RS the DH activity is increased. Moreover, it is possible observe increases in glutamate levels in DH.

In central nervous system the activation of NMDA glutamatergic receptors increases the nitric oxide (NO) synthesis by activate the neuronal isoform of nitric oxide syntase (nNOS). Moreover, this interaction, NMDA/ NO, in the DH appears to important in the defensive reactions. Therefore, in the present work we observed that administration of glutamate in the DH promotes increases of cardiovascular system, similar those observed during stress situation. These cardiovascular responses were associate with an increase of sympathetic activity. Also, the glutamate effects were inhibited by administration of AP7, a NMDA antagonist, N^ω-Propyl-L-Arginine, a nNOS inhibitor, or Carboxy-PTIO(S)-3-carboxy-4-hydroxyphenylglycine, a NO scavenger. Finally, the administration of these drugs were able to reduces the autonomic responses evoked by RS.

Therefore, our findings showed that glutamatergic system present in DH are involved with autonomic modulation through NMDA receptors and nNOS activation. Moreover, this NMDA/ NO is involved with autonomic modulation during stress situation.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	17
MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
1. Animais	18
2. Técnica de implante de cânula-guia no hipocampo dorsal	18
3. Canulação da artéria e veia femoral	19
4. Técnica para microinjeção de drogas no cérebro	19
5. Drogas utilizadas	20
6. Medidas cardiovasculares e estresse por restrição	20
7. Registro da temperatura cutânea	21
8. Determinação anatômica do local de injeção	21
9. Protocolos experimentais	22
9.1. Efeitos da administração de L-glu no HD sobre a PA e FC de ratos não anestesiados	22
9.2. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo α_1 -adrenérgico prazosin sobre as respostas cardiovasculares causadas pela administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados	22
9.3. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo β_1 -adrenérgico atenolol sobre as respostas cardiovasculares causadas pela administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados	23
9.4. Efeito da administração de um antagonista glutamatérgico de receptores do tipo NMDA (AP7) no HD sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados	23
9.5. Efeito da administração de um inibidor da síntese de óxido nítrico (N-Propyl) no HD sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados	24
9.6. Efeito da administração do sequestrador de óxido nítrico (c-PTIO) no HD sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo L-glu no HD de ratos não anestesiados.....	24
9.7. Efeitos da administração de antagonista de receptores NMDA sobre as respostas autonômicas ao ER	25
9.8. Detecção dos níveis hipocâmpais de nitrito e nitrato (NO_x) após o ER.....	25

9.8.1. Coleta e preparo das amostras	25
9.8.2. Quantificação das proteínas totais	26
9.8.3. Determinação dos níveis hipocâmpais de NO ₂ / NO ₃	26
9.9. Efeitos da administração de um inibidor da síntese de óxido nítrico sobre as respostas autonômicas ao ER.....	26
9.10. Efeitos da administração do sequestrador de óxido nítrico sobre as respostas autonômicas ao ER	27
10. Análise estatística.....	27
RESULTADOS	28
1. Efeitos cardiovasculares causados pela administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados.....	28
2. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo α_1 -adrenérgico prazosin sobre as respostas cardiovasculares causadas pela administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados	31
3. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo β_1 -adrenérgico atenolol sobre as respostas cardiovasculares causadas pela administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados	31
4. Efeito da administração de AP7, antagonista dos receptores NMDA, no HD sobre as respostas cardiovasculares causadas pela administração de L-glu.....	34
5. Efeito da administração de N-Propyl, um inibidor da síntese de óxido nítrico, sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados.....	36
6. Efeito da pré-administração de c-PTIO, sequestrador de NO, sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados	36
7. Efeitos da administração de AP-7, antagonista de receptores NMDA, no HD sobre as respostas autonômicas causadas pelo ER.....	39
8. Detecção dos níveis hipocâmpais de NO _x	44
9. Efeitos da administração do N-Propyl, um inibidor da síntese de óxido nítrico, no HD sobre as respostas autonômicas ao ER	44
10. Efeitos da administração do c-PTIO, um sequestrador de óxido nítrico, no HD sobre as respostas autonômicas ao ER.....	44
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

INTRODUÇÃO

O hipocampo é parte integrante do sistema límbico e está diretamente envolvido com a modulação de processos emocionais, de aprendizado e memória (Macleane, 1952; Papez, 1995; Siegel e Flynn, 1968). Segundo Brodal (1998) a formação hipocampal é formada pelo giro denteado, complexo subocular, córtex entorrinal e o próprio hipocampo (CA1 a CA4). Em ratos, o hipocampo possui a forma de um “C” que vai da porção rostro-medial a partir da área septal até a sua porção rostro-dorsal no lobo temporal (Amaral e Witter, 1995). Assim, o hipocampo pode ser dividido em hipocampo dorsal e hipocampo ventral (Paxinos e Watson, 1997).

Em diversos mamíferos, a estimulação elétrica do hipocampo induz alterações comportamentais e reações defensivas tais como, respostas de ataque (Siegel e Flynn, 1968) e de atenção (Kaada et al., 1953), agitação, rosnado e reações de fuga (Macleane e Delgado, 1953), atordoamento e confusão (Macleane, 1957). Também é possível observar respostas autonômicas desencadeadas pela estimulação elétrica do hipocampo dorsal (HD) de diversos mamíferos, as quais são caracterizadas por inibição respiratória (Anand e Dua, 1956; Andy e Akert, 1955; Kaada e Jasper, 1952; Liberson e Akert, 1955), inibição do peristaltismo antral (Kaada, 1951), aumento da pressão arterial com aumento ou redução da frequência cardíaca (Anand e Dua, 1956; Smith, 1944) e aumento da atividade simpática (Andy e Akert, 1953; Carlson *et al.*, 1941). Finalmente, a administração de glutamato no HD de ratos anestesiados provoca queda da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) de forma similar a estimulação elétrica (Ruit e Neafsey, 1988). Esses autores sugerem que o fato da resposta observada com o glutamato ser semelhante à resposta da estimulação elétrica indica que tais respostas cardiovasculares ocorreram pela ativação de neurônios hipocampais e não por estimulação de fibras de passagem. Dessa forma, esses trabalhos demonstram a íntima relação

do hipocampo, em particular sua porção dorsal, com a modulação da atividade autonômica, em particular com as respostas associadas ao sistema cardiovascular.

O termo estresse foi utilizado pela primeira vez por Hans Selye (1998) para descrever uma ameaça real ou potencial à integridade física e/ou emocional. Pacak e Palkovits (2001) definiram o estresse com um estímulo que perturba a homeostasia e a dividiu em quatro tipos: 1) estressores físicos, que podem ser causados por frio, calor, radiação intensa, ruídos, vibração e outros; 2) estressores psicológicos, que afetam os processos emocionais e podem causar alterações de comportamento; 3) estressores sociais, tais como ser incluído no território de outro animal dominante e em humanos, desemprego e separações no casamento e 4) estressores que perturbam a homeostase cardiovascular ou metabólica, tais como exercícios, hipoglicemia, calor intenso e hemorragia. Os modelos animais de estresse utilizados experimentalmente muitas vezes misturam esses estímulos estressores, como manipulação do animal, estresse por imobilização, antecipação de estímulo doloroso e hemorragia hipotensiva (Pacak e Palkovits, 2001).

A exposição a eventos estressores causa alterações autonômicas como o aumento da PA, FC e dos níveis de corticosterona, redução da temperatura cutânea, decorrente principalmente do aumento de ativação autonômica simpática (Kubo et al., 2002; Tavares et al., 2007; Taylor et al., 1989) e alterações comportamentais, como o aumento da imobilidade no teste de nado forçado (Joca e Guimaraes, 2006). O estresse por restrição (ER) é um modelo experimental de estresse agudo amplamente utilizado, sendo um estímulo estressor inescapável onde o animal é colocado em um tubo, de plástico ou de metal, que restringe seus movimentos (Conti et al., 2001; Yoshino et al., 2005). O ER provoca respostas de alterações hormonais (Taylor et al., 1989) e autonômicas, como aumento da FC e da PA (Kubo *et al.*, 2002; Tavares e Correa, 2006) e redução da temperatura cutânea (Hodges et al., 2009). Além disso, o ER causa alterações comportamentais negativas, tais como a diminuição da

exploração no teste de campo aberto (Kennett *et al.*, 1985; Kennett *et al.*, 1987; Mechiel Korte e De Boer, 2003), redução do número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (LCE) (Guimaraes *et al.*, 1993; Padovan *et al.*, 2000; Padovan e Guimaraes, 2000) e aumento do tempo de imobilidade no modelo de nado forçado (Sevgi *et al.*, 2006) 24 horas após a exposição ao estresse.

O HD apresenta conexões com diversas estruturas encefálicas envolvidas com a modulação das respostas associadas ao ER tais como o córtex pré-frontal medial (CPFM), o núcleo leito da estria terminal (NLET), a área septal lateral (ASL) e a amígdala medial (MeA) (Crestani *et al.*, 2010; Fortaleza *et al.*, 2009; Kubo *et al.*, 2002; Tavares e Correa, 2006). Trabalhos anteriores já demonstraram que durante o ER, neurônios presentes no HD são ativados (Chen *et al.*, 2006). Além disso, resultados de nosso laboratório (ainda não publicados) demonstraram que a inibição local da neurotransmissão do HD reduz as respostas autonômicas de aumento da PA, aumento da FC e queda da temperatura cutânea causadas pelo ER, sugerindo que o HD tem uma função importante sobre as respostas autonômicas observadas durante o ER podendo ser parte de uma via modulatória dessas respostas. Reforçando esse papel do HD sobre a modulação de respostas autonômicas associadas à situação aversivas, Resstel *et al.* (2008b) mostraram que os aumentos de FC e PA, mas não a resposta comportamental (o congelamento), causados pelo medo condicionado ao contexto são dependentes da neurotransmissão do HD em ratos.

Os aminoácidos excitatórios medeiam amplamente neurotransmissões por todo o sistema nervoso central (SNC) de mamíferos (Cotman *et al.*, 1987; Fagg e Foster, 1983). Dentre esses aminoácidos o glutamato (L-glu) é tido como o principal neurotransmissor e está amplamente envolvido com a modulação do sistema autonômico, uma vez que a sua administração em estruturas como o CPFM, a banda diagonal de Broca (BDB), o núcleo supraóptico (NSO), o núcleo paraventricular (PVN), o hipotálamo lateral (HL) e no HD é

capaz de causar respostas cardiovasculares (Busnardo *et al.*, 2007; Busnardo *et al.*, 2009; Pajolla *et al.*, 2005; Resstel *et al.*, 2006; Ruit e Neafsey, 1988; Tavares *et al.*, 2007). Foi demonstrado que a administração de L-glu no HD de ratos *Wistar-Kyoto* (WKY) e de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) causava uma queda da pressão arterial, que foi bloqueada pela administração prévia do antagonista glutamatérgico de receptores NMDA, AP-5. Além disso, a administração de CNQX, um antagonista glutamatérgico de receptores não-NMDA, não alterou a resposta pressora causada pelo glutamato (Wang e Ingenito, 1994), sugerindo que o sistema glutamatérgico no HD através de receptores NMDA modula a atividade cardiovascular. Além disso, Moghaddam (1993) demonstrou que durante o ER há um aumento da liberação de L-glu no HD de ratos. Esses resultados sustentam um possível envolvimento do sistema glutamatérgico, em particular de receptores NMDA, na modulação de respostas associadas ao ER.

O óxido nítrico (NO), um radical livre gasoso, é sintetizado a partir da L-arginina por diferentes enzimas (Garthwaite *et al.*, 1988; Garthwaite *et al.*, 1989). No SNC a principal isoforma destas enzimas é a neuronal (nNOS), que está presente em neurônios hipocâmpais (Blackshaw *et al.*, 2003), e sua atividade é regulada pelo influxo de Ca^{2+} induzido pela ativação de receptores de glutamato, preferencialmente os do tipo NMDA (Garthwaite *et al.*, 1989). Joca *et al.* (2006) demonstraram que a inibição da nNOS no HD de ratos produzia um efeito ansiolítico, caracterizado pela redução da imobilidade no modelo de nado forçado. Resstel e Corrêa (2006) relataram que a ativação de receptores NMDA pela administração de L-glu no CPFM de ratos, causava aumento da PA e da FC, que eram bloqueadas por L-NAME (inibidor inespecífico da NOS) e por N^{ω} -propyl-L-arginina (inibidor seletivo da nNOS), mostrando que as respostas cardiovasculares causadas por L-glu no CPFM envolvem a formação de NO através da ativação de receptores NMDA. No hipocampo, a ativação de

receptores NMDA causa o aumento da formação de NO (Garthwaite et al., 1989), sugerindo que nesta área também há interação entre receptores NMDA e NO.

Diante das evidências de que o HD atua modulando as respostas comportamentais e autonômicas em reações defensivas e apresenta projeções para outras áreas conhecidas por também atuarem em tais respostas, associado ao fato de que tanto o L-glu quanto o NO presentes no HD estão envolvidos com a modulação de respostas associadas a situações aversivas, a hipótese do presente estudo é que a administração de L-glu no HD promove respostas cardiovasculares pela ativação de receptores NMDA e consequente formação de NO e que o sistema glutamatérgico/ nitrérgico presente no HD modula as respostas autonômicas decorrentes do ER.

OBJETIVOS

O objetivo central desse trabalho foi investigar a possível interação entre o sistema glutamatérgico e o sistema nitrérgico presentes no HD na modulação da atividade autonômica.

O presente trabalho tem por objetivos específicos:

1. Investigar a participação dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico na modulação das respostas cardiovasculares decorrentes a administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados.
2. Investigar a participação dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico do HD na modulação das respostas autonômicas durante o ER.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Durante os experimentos foram utilizados ratos *Wistar* com peso variando entre 210-250 g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto sendo mantidos em caixas individuais, com alimentação de ração e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos à alternância de luz (12 h claro/ 12 h escuro).

2. Técnica de implante de cânula-guia no hipocampo dorsal

O anestésico usado neste procedimento cirúrgico foi o tribromo-cloro-etanol (Adrich Chemical Co. Inc.) na dose de 250 mg/ Kg por via intraperitoneal. A cabeça do animal foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, USA). Após tricotomia foi feita assepsia do local com álcool a 70%. Durante a cirurgia foi injetado 0,3 mL de lidocaína com vasoconstritor. A calota craniana foi exposta por incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se todo o periósteo. A assepsia local foi feita com salina e água oxigenada a 10%. Todas as coordenadas tiveram como referência o Atlas de Paxinos e Watson.

Coordenadas do hipocampo dorsal:

- Ântero-posterior: -4.0 mm em relação ao Bregma
- Lateral: + 2,8 mm em relação à sutura sagital
- Vertical: - 2,1 mm em relação à estrutura óssea da calota craniana
- Incisivo: - 2,5 mm

Com o auxílio da broca odontológica foi feita a trepanação do crânio e por este orifício foram unilateralmente ou bilateralmente introduzidas cânulas guia no HD. As cânulas foram

constituídas por um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,6 mm, 33 gauge), com 11 mm de comprimento. Elas foram fixadas ao crânio com resina acrílica autopolimerizável e por um parafuso rosqueado à calota craniana. Um mandril (0,2 mm de diâmetro externo) foi inserido nas cânulas com o objetivo de se evitar uma possível obstrução durante o período de recuperação do rato. Para prevenção, ao final da cirurgia o animal recebeu 0,2 mL de Pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, BR) por via intramuscular e 0,3 mL de Banamine (Schering-Plough Veterinária, Brasil), analgésico administrado subcutâneo.

3. Canulação da artéria e veia femoral

Após quatro dias da cirurgia para implante das cânulas guias, os animais foram novamente anestesiados com tribromo-cloro-etanol, e foi implantado um catéter na artéria femoral e quando necessário para a infusão sistêmica de fármacos, também foi implantado um catéter na veia femoral. O catéter foi introduzido na artéria femoral até a artéria aorta abdominal inferior. Os cateteres foram constituídos de segmentos de polietileno PE-10 (4 - 5 cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12 - 13 cm), que antes foram preenchidos com uma solução de salina e anticoagulante (heparina), e obstruídos com pino de metal. O registro da PA e da FC foi medido através desses cateteres, 24 h após a cirurgia.

4. Técnica para microinjeção de drogas no cérebro

As drogas foram dissolvidas em líquido cefalorraquidiano artificial (CSF) (NaCl 100 mM; Na₃PO₄ 2 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 1,0 mM; NaHCO₃ 27 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH = 7,4) ou solução fisiológica (NaCl 0,9%) e administradas diretamente no HD. Quando necessário, após a dissolução o pH foi ajustado para 7,4. Para as administrações, utilizamos uma seringa de 2,0 µL modelo KH7001 (Hamilton, USA) conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha microinjetora de metal (gauge 33). A agulha microinjetora era 1,5 mm mais longa do que a cânula guia.

5. Drogas utilizadas

- Veículos: solução fisiológica (NaCl 0,9%) e líquido cefalorraquidiano artificial;
- Tribromo-cloro-etanol (Aldrich-Sigma, USA);
- Uretana (Sigma, USA);
- L-glutamato (L-glu; TOCRIS, USA);
- Prazosin (Pfizer, USA)
- Atenolol (SIGMA, USA)
- DL-AP7 (AP-7; TOCRIS, USA);
- *N^o-Propyl-L-Arginine* (N-Propyl; TOCRIS, USA);
- *Carboxy-PTIO(S)-3-carboxy-4-hydroxyphenylglycine* (c-PTIO; RBI);

6. Medidas cardiovasculares e estresse por restrição

Vinte e quatro horas após a cirurgia de implante de catéter na artéria femoral os animais foram levados individualmente em suas caixas para uma sala para registro da atividade cardiovascular. Após período de habituação, o catéter arterial, previamente heparinizado, foi conectado a um transdutor de pressão, acoplado a um amplificador de sinais (HP 7754-A, Hewlett Packard, USA), por sua vez conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (MP-100, Biopac, USA). A PA e FC foram continuamente registradas em um computador, para posterior análise. Após um período de registro para aquisição dos valores basais de pressão arterial média (PAM) e FC, os animais foram colocados em um tubo de contenção forçada constituído por um cilíndrico de plástico

medindo 15 cm de comprimento e 6,5 cm de diâmetro. A PAM e FC foram registradas continuamente por um período de 1 h de permanência no tubo.

7. Registro da temperatura cutânea

Além dos parâmetros cardiovasculares, as variações de temperatura cutânea também foram registradas. A temperatura da cauda, variável da temperatura cutânea, foi registrada manualmente com uma câmera térmica digital (Multi-Purpose Thermal Imager IRI 4010, InfraRed Integrated Systems Ltd Park Circle, Tithe Barn Way Swan Valley Northampton, USA) a uma distância de 50 cm a cada 3 min durante os 10 min anteriores ao início da restrição e a cada 5 min durante o período de 1 h de permanência no tubo.

8. Determinação anatômica do local de injeção

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/ Kg i.p.) e o corante Azul de Evan a 1% foi administrado no local da microinjeção das drogas. Os ratos foram submetidos à abertura da caixa torácica para exposição do coração e posterior perfusão. A artéria aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática, para uma melhor perfusão cerebral. A aurícula direita sofreu uma incisão para escoamento do sangue e do perfusado e uma agulha para perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo. Inicialmente, 20 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) foram administrados e logo a seguir 20 mL de solução tamponada de formalina a 10%.

Após este procedimento, os cérebros foram retirados da caixa craniana e colocados em solução de formalina a 10% para fixação. Decorridas 48 horas, os cérebros foram seccionados (em cortes frontais) com auxílio de um criostato.

9. Protocolos experimentais

Parte 01 - Estudo dos efeitos cardiovasculares causados pela estimulação do sistema glutamatérgico no HD.

Com a utilização de agonistas e antagonistas, os protocolos experimentais descritos a seguir tiveram como objetivo estudar os efeitos da estimulação farmacológica do HD sobre a PA e FC de ratos não anestesiados.

Uma cânula guia foi implantada no HD dos ratos. Após quatro dias da cirurgia de implante da cânula guia, foi feita a canulação da artéria femoral, e quando necessário também foi canulada a veia femoral. No dia seguinte foi realizado o experimento. Os animais estavam em livre movimentação durante todo o experimento, e as drogas foram injetadas após a estabilização da PA e FC.

9.1. Efeitos da administração de L-glu no HD sobre a PA e FC de ratos não anestesiados

Foi construída uma curva dose-resposta com a administração unilateral de L-glu (agonista glutamatérgico) no HD com diferentes doses (5; 15; 25; 50; 250 nmol; doses baseadas no trabalho de Resstel e Correa, 2005), com o objetivo de avaliar seu efeito sobre a PAM e FC em ratos não anestesiados. Para a construção das curvas de PAM e FC, cada animal recebeu no mínimo duas e no máximo três doses de L-glu, em ordem variada.

9.2. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo α_1 -adrenérgico prazosin sobre as respostas cardiovasculares causadas pela administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados

O objetivo do presente experimento foi verificar se as respostas cardiovasculares produzidas pela administração de L-glu no HD ocorrem com a participação de receptores α_1 -

adrenérgicos vasculares. Inicialmente os animais receberam L-glu (250 nmol/ 0,5 µL) no HD. Após 20 minutos da administração de L-glu, os animais receberam a administração i.v. (1 mL/ Kg) de salina ou prazosin (5 mg/ Kg, dose baseada em (Tavares *et al.*, 2002). Passado o tempo necessário para a estabilização da PA e FC, os animais receberam uma nova administração de L-glu no HD.

9.3. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo β_1 -adrenérgico atenolol sobre as respostas cardiovasculares causadas pela administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados

O objetivo do presente experimento foi verificar se as respostas cardiovasculares produzidas pela administração de L-glu no HD ocorrem com a participação de receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos. Inicialmente os animais receberam L-glu (250 nmol/ 0,5 µL) no HD. Após 20 minutos da administração de L-glu, os animais receberam a administração i.v. (1 mL/ Kg) de salina ou atenolol (1,5 mg/ Kg, dose baseada em Resstel e Correa, 2005). Passado o tempo necessário para a estabilização da PA e FC, os animais receberam uma nova administração de L-glu no HD.

9.4. Efeito da administração de um antagonista glutamatérgico de receptores do tipo NMDA (AP7) no HD sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados

O objetivo do presente experimento foi investigar o envolvimento de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA sobre as respostas cardiovasculares desencadeadas pela administração de L-glu no HD. Para tanto, os animais desse grupo receberam administração de L-glu (250 nmol/ 0,5 µL) no HD antes e após da microinjeção local de AP7 (10 nmol/ 0,5 µL, doses baseadas no trabalho de Resstel *et al.*, 2008a) ou salina.

9.5. Efeito da administração de um inibidor da síntese de óxido nítrico (N-Propyl) no HD sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados

O objetivo do presente experimento foi investigar o envolvimento da síntese de NO via nNOS sobre as respostas cardiovasculares desencadeadas pela administração de L-glu no HD. Para tanto, os animais desse grupo receberam administração de L-glu (250 nmol/ 0,5 µL) no HD e após 20 minutos do final dos efeitos cardiovasculares da administração do L-glu, foi administrado N-Propyl (0,1 nmol/ 0,5 µL, doses baseadas no trabalho de Resstel *et al.*, 2008a) ou salina. Depois de 10 minutos, foi novamente administrado L-glu.

9.6. Efeito da administração do sequestrador de óxido nítrico (c-PTIO) no HD sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo L-glu no HD de ratos não anestesiados

O objetivo do presente experimento foi verificar o efeito da administração de um sequestrador de NO, c-PTIO, no HD para observar o envolvimento do NO formado nas respostas cardiovasculares desencadeadas pela administração de L-glu no HD. Para tanto, os animais desse grupo receberam L-glu (250 nmol/ 0,5 µL) no HD e após 20 minutos do final dos efeitos cardiovasculares da administração do L-glu, foi administrado c-PTIO (2 nmol/ 0,5 µL, doses baseadas no trabalho de Resstel *et al.*, 2008a) ou salina. Depois de 10 minutos, foi novamente administrado L-glu.

Parte 02 - Estudo do envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica do HD sobre as respostas autonômicas causadas pelo ER.

Para a realização dos protocolos que avaliaram a atividade autonômica (PAM, FC e temperatura cutânea) durante a restrição, os animais foram levados em suas respectivas caixas à sala de experimentação onde permaneceram por 60 min para ambientação. Cada animal foi

conectado ao sistema de registro da atividade cardiovascular, em sua respectiva caixa, para registro dos valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda por 10 min. Foram feitas administrações bilaterais de droga ou veículo no HD e após 10 min, o rato foi transferido para o tubo de restrição, onde permaneceu por 60 min.

9.7. Efeitos da administração de antagonista de receptores NMDA sobre as respostas autonômicas ao ER

Este protocolo teve por objetivo determinar se receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no HD estão envolvidos nas respostas autonômicas causadas pelo ER. Os animais foram divididos em dois grupos. Em um grupo foi microinjetado 0,5 µL de veículo, enquanto que no segundo grupo os animais receberam 10 nmol/ 0,5 µL de AP-7 (Resstel et al., 2008a). Após 10 min, os animais foram submetidos ao ER.

9.8. Detecção dos níveis hipocampais de nitrito e nitrato (NO_x) após o ER

O objetivo desse experimento foi quantificar os níveis de NO_x gerados no HD pelo ER. Para a realização dos protocolos, os animais (que não foram submetidos a nenhum dos procedimentos cirúrgicos) foram levados a uma sala onde permaneceram por 60 min para ambientação e em outra sala foram submetidos ao ER. Foram divididos em 4 grupos: não estressados e estressados por 10, 30 e 60 minutos.

9.8.1. Coleta e preparo das amostras

Em seguida ao ER, os animais foram anestesiados com uretana, decapitados e o hipocampo dissecado e separado em regiões ventral e dorsal. O tecido foi homogeneizado em tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, pH = 7,6; NaCl 0,9%, glicerol 10%) e centrifugado a 20.000 g por 15 min, 4°C. O sobrenadante foi coletado e submetido à quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford e de NO_x pelo método de Griess.

9.8.2. Quantificação das proteínas totais

As proteínas totais foram quantificadas pela reação colorimétrica de Bradford (Bradford, 1976; Sapan *et al.*, 1999), na qual o reagente de Bradford (1X; Bio Rad) é adicionado à uma alíquota das amostras ou ao padrão de proteínas (soroalbumina bovina, BSA, Sigma) purificado. A coloração produzida pela ligação corante-proteína foi quantificada a 595nm (espectrofotômetro VictorX3, Perkin Elmer, USA). A equação da reta fornecida para a curva padrão (BSA) foi utilizada para calcular a quantidade de proteínas totais presente em cada amostra.

9.8.3. Determinação dos níveis hipocâmpais de NO₂/ NO₃

As amostras para quantificação dos níveis de NO₂/ NO₃ (produtos provenientes da oxidação espontânea do NO em condições fisiológicas, usados como uma medida indireta da produção de NO) foram incubadas (na proporção de 1:1, v/v) *overnight* a 37°C na presença de nitrato redutase e NADPH (0,4 U/ mL e 1 mg/ mL, respectivamente, diluídos em tampão KH₂PO₄ 0,2 M, pH = 7,5) para conversão do NO₃ em NO₂. Posteriormente, o NO₂ presente nestas amostras foi quantificado através da reação colorimétrica de Griess que se baseia na reação do NO₂ com uma amina primária aromática em meio ácido, formando um sal diazônio. Este por sua vez reage com um composto aromático formando um azo composto que pode ser detectado espectrofotometricamente a 540 nm. Foi utilizado o kit para determinação de nitrito (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante.

Os resultados foram calculados com base na curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) e foram expressos em porcentagem em relação ao grupo não estressado.

9.9. Efeitos da administração de um inibidor da síntese de óxido nítrico sobre as respostas autonômicas ao ER

Este protocolo teve por objetivo determinar se a nNOS presente no HD está envolvida nas respostas autonômicas causadas pelo ER. Os animais foram divididos em dois grupos. Em

um grupo foi microinjetado 0,5 μ L de veículo, enquanto que no segundo grupo os animais receberam 0,1 nmol/ 0,5 μ L de N-Propyl (Resstel et al., 2008a). Após 10 min, os animais foram submetidos ao ER.

9.10. Efeitos da administração do sequestrador de óxido nítrico sobre as respostas autonômicas ao ER

Este protocolo teve por objetivo confirmar a participação do NO formado no HD nas respostas autonômicas causadas pelo ER. Os animais foram divididos em dois grupos. Em um grupo foi microinjetado 0,5 μ L de veículo, enquanto que no segundo grupo os animais receberam 2 nmol/ 0,5 μ L de c-PTIO (Resstel et al., 2008a). Após 10 min, os animais foram submetidos ao ER.

10. Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. Nos animais que foram tratados com L-glu, as variações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm) foram medidas, simultaneamente em cada animal a cada 10 s antes e durante o experimento.

Nos animais que foram submetidos ao ER, as variações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) frequência cardíaca (Δ FC, bpm) e temperatura cutânea (Δ Temperatura, $^{\circ}$ C) foram medidas, simultaneamente em cada animal a cada 3 min antes e durante o experimento. Posteriormente foi calculada a média da variação de PAM e FC para cada grupo experimental, sendo analisada utilizando a análise de variância (ANOVA) de duas vias com tratamento, administração de veículo ou droga no HD, como principal fator e o tempo como medida repetida. Em caso de interação significativa entre os fatores foi realizado o pós-teste de Bonferroni para comparar a variação em cada tempo.

RESULTADOS

1. Efeitos cardiovasculares causados pela administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados

A figura 01 mostra uma foto micrografia representativa do HD de um animal com implante da cânula guia e diagramas indicando os sítios de injeção de todos os ratos usados nos protocolos da primeira parte do trabalho. A microinjeção de diferentes doses L-glu (5; 15; 25; 50; 250 nmol, n=9) no HD de ratos não anestesiados (Figura 02), desencadeou respostas pressoras ($F_{6,756}=82$, $P<0,001$) e respostas taquicárdicas ($F_{6,756}=123$, $P<0,001$) de forma dose-dependente (PAM: $r^2 = 0,9630$; $df = 16$ e FC: $r^2 = 0.9436$; $df = 16$) comparado aos animais que receberam veículo (n=6)(Figura 02). A dose de 250 nmol foi escolhida para ser utilizada nos experimentos subseqüentes.

Figura 01 – Superior: Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um animal representativo mostrando o sítio da microinjeção unilateral. Inferior: Representação diagramática baseada no atlas de Paxinos e Watson (1997), indicando os sítios de injeção do Veículo (●), AP-7 (○), N-Propyl (■) e c-PTIO (□), no HD de ratos não anestesiados.

Figura 02 – (A) Variações da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após administração de veículo ($n=6$) ou doses crescentes de L-glu no HD de ratos não anestesiados ($n=9$). As administrações foram feitas no tempo 0 (zero). Os símbolos representam a média $\pm$ EPM. **(B)** Efeito da administração de diferentes doses (log das doses) de L-glu no HD sobre a Δ PAM e Δ FC. As doses de L-glu administradas foram: 5; 15; 25; 50 e 250 nmol. Os círculos representam a variação média após a administração de L-glu e as barras representam o EPM.

2. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo α_1 -adrenérgico prazosin sobre as respostas cardiovasculares causadas pela administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados

O pré-tratamento sistêmico com prazosin (n= 5) reduziu os níveis basais de PAM (antes = 102 ± 3 e depois = 80 ± 3 , $t=4,3$, $P<0,05$) sem afetar os níveis basais de FC (antes = 371 ± 22 e depois = 411 ± 20 , $t=1,3$, $P>0,05$). A administração de L-glu promoveu aumento de PAM ($F_{35, 288} = 13.44$, $P < 0,05$) e FC ($F_{35, 288} = 14.5$, $P < 0,05$). Porém o antagonismo de receptores α_1 -adrenérgicos na periferia, promovido pela administração de prazosin, promoveu uma redução do aumento de PAM ($F_{1, 288} = 181$, $P < 0.001$) sem alterar o aumento de FC ($F_{1, 288} = 0,4$, $P > 0,05$) provocados pela administração de L-glu no HD (Figura 03).

3. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo β_1 -adrenérgico atenolol sobre as respostas cardiovasculares causadas pela administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados

O pré-tratamento sistêmico com atenolol (n= 5) não afetou os níveis basais de PAM (antes = 99 ± 2 e depois = 97 ± 2 , $t=0,6$, $P>0,05$) e de FC (antes = 348 ± 6 e depois = 329 ± 6 , $t=2.175$; $P>0,05$). A administração de L-glu promoveu aumento de PAM ($F_{35, 288} = 12.4$, $P < 0,05$) e FC ($F_{35, 288} = 12.7$, $P < 0,01$). Porém o antagonismo de receptores β_1 -adrenérgicos na periferia, promovido pela administração de atenolol, promoveu uma redução do aumento de FC ($F_{1, 288} = 102$, $P < 0.001$) sem alterar o aumento de PAM ($F_{1, 288} = 0,8$, $P > 0,05$) provocados pela administração de L-glu no HD (Figura 04). A administração sistêmica com veículo não alterou as respostas cardiovasculares promovidas pela administração de L-glu no HD (PAM: $P>0,05$ e FC: $P>0,5$, n=5).

Figura 03 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo causadas pela administração de 250 nmol/ 0,5 uL de L-glu no HD antes e após o tratamento com 5 mg/ Kg de prazosin (n=5). As administrações de L-glu foram feitas no tempo 0 (zero). Os símbolos representam a média $\pm$ EPM, * $P < 0,001$, two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

Figura 04 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo causadas pela administração de 250 nmol/ 0,5 uL de L-glu no HD antes e após tratamento com 1,5 mg/ Kg de atenolol (n=5). As administrações de L-glu foram feitas no tempo 0 (zero). Os símbolos representam a média $\pm$ EPM, * $P < 0,001$, two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

4. Efeito da administração de AP7, antagonista dos receptores NMDA, no HD sobre as respostas cardiovasculares causadas pela administração de L-glu

A microinjeção de AP7 (n= 6), no HD não afetou os níveis basais de PAM (antes = 101 ± 2 e depois = 98 ± 3 , $t = 0,7$, $P > 0.05$) e de FC (antes = 368 ± 16 e depois = 349 ± 12 , $t = 1.75$; $P > 0.05$). A administração de L-glu no HD promoveu aumento de PAM ($F_{35, 360} = 32.4$, $P < 0,05$) e FC ($F_{35, 360} = 22.5$, $P < 0,01$) quando administradas após a administração de veículo no HD (n=6). Porém o antagonismo de receptores NMDA no HD, promovido pela administração de AP7, promoveu uma redução do aumento de PAM ($F_{1, 360} = 68$, $P < 0.01$) e de FC ($F_{1, 360} = 48$, $P < 0,05$) provocados pela administração de L-glu no HD quando comparado aos animais que receberam veículo (n=6) (Figura 05).

Figura 05 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo causadas pela administração de 250 nmol/ 0,5 uL de L-glu no HD após a administração local no HD 0,5 uL de veículo (n=6) ou 10 nmol/ 0,5 uL de AP7 (n=5). As administrações de L-glu foram feitas no tempo 0 (zero). Os símbolos representam a média $\pm$ EPM, * $P < 0,001$, two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

5. Efeito da administração de N-Propyl, um inibidor da síntese de óxido nítrico, sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados

A microinjeção de N-Propyl ($n = 6$) no HD não afetou os níveis basais de PAM (antes = 100 ± 3 e depois = 97 ± 3 , $t=0,8$, $P>0.05$) e de FC (antes = 378 ± 12 e depois = 379 ± 11 , $t=1.05$; $P>0.05$). A administração de L-glu no HD promoveu aumento de PAM ($F_{35, 360} = 73$, $P < 0,05$) e FC ($F_{35, 360} = 11$, $P < 0,05$) quando administradas após a administração de veículo no HD ($n=6$). Porém a inibição da isoforma neuronal da NOS no HD, promovido pela administração de N-Propyl, promoveu uma redução do aumento de PAM ($F_{1, 360} = 80$, $P < 0.01$) e de FC ($F_{1,360} = 51$, $P < 0,05$) provocados pela administração de L-glu no HD quando comparado aos animais que receberam veículo ($n=6$) (Figura 06).

6. Efeito da pré-administração de c-PTIO, seqüestrador de NO, sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados

A microinjeção de c-PTIO ($n= 6$) no HD não afetou os níveis basais de PAM (antes = 93 ± 6 e depois = 97 ± 4 , $t=0,9$, $P>0.05$) e de FC (antes = 368 ± 11 e depois = 389 ± 12 , $t=0.95$; $P>0.05$). A administração de L-glu no HD promoveu aumento de PAM ($F_{35, 360} = 81$, $P < 0,05$) e FC ($F_{35, 360} = 9$, $P < 0,05$) quando administradas após a administração de veículo no HD ($n=6$). Porém a redução nos níveis de NO no HD, promovido pela administração de c-PTIO, promoveu uma redução do aumento de PAM ($F_{1, 360} = 113$, $P < 0.01$) e de FC ($F_{1,360} = 47$, $P < 0,05$) provocados pela administração de L-glu no HD quando comparado aos animais que receberam veículo ($n=6$) (Figura 07).

Figura 06 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo causadas pela administração de 250 nmol/ 0,5 uL de L-glu no HD após a administração local no HD 0,5 uL de veículo (n=6) ou 0,1 nmol/ 0,5 uL de N-Propyl (n=6). As administrações de L-glu foram feitas no tempo 0 (zero). Os símbolos representam a média $\pm$ EPM, * $P < 0,001$, two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

Figura 07 - Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo causadas pela administração de 250 nmol/ 0,5 uL de L-glu no HD após a administração local no HD 0,5 uL de veiculo (n=6) ou 2 nmol/ 0,5 uL de c-PTIO (n=6). As administrações de L-glu foram feitas no tempo 0 (zero). Os símbolos representam a média $\pm$ EPM, * $P < 0,001$, two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

7. Efeitos da administração de AP-7, antagonista de receptores NMDA, no HD sobre as respostas autonômicas causadas pelo ER

A figura 08 mostra uma foto micrografia representativa do HD de um animal com implante bilateral de cânulas guia e diagramas indicando os sítios de injeção de todos os ratos usados nos protocolos da segunda parte do trabalho. Na figura 09 registro representativo das respostas cardiovasculares de um animal submetido ao ER. A figura 10 mostra fotos termográficas de um animal antes, na *home box*, e durante o ER.

O ER foi capaz de promover aumento de PAM ($F_{35, 360} = 4$, $P < 0,05$) e FC ($F_{35, 360} = 3,6$, $P < 0,05$) e queda da temperatura cutânea ($F_{16, 170} = 9,3$, $P < 0,05$). Porém o antagonismo de receptores NMDA ($n = 6$) no HD, promovido pela administração de AP7, inibiu o aumento de PAM ($F_{1, 360} = 274$, $P < 0,01$) de FC ($F_{1, 360} = 236$, $P < 0,01$) e a queda da temperatura cutânea ($F_{1, 170} = 180$, $P < 0,01$) provocados pelo ER quando comparado aos animais que receberam veículo ($n=6$) (Figura 11).

Figura 08 – Superior: Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um animal representativo mostrando os sítios das microinjeções bilaterais no HD. Inferior: Representação diagramática baseada no atlas de Paxinos e Watson (1997), indicando os sítios de injeção do AP-7 (●), N-Propyl (●) e c-PTIO (○) no HD de ratos submetidos ao ER.

Figura 09 – Traçados de pressão arterial (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo, 10 min antes e durante o estresse por restrição (ER) por 60 minutos.

Figura 10 – Foto termográfica mostrando variação da temperatura cutânea, em particular da cauda, de um rato representativo. **A:** Foto antes do início do ER, animal na *home box*. **B:** Foto da cauda do animal colocado no tubo de restrição ao final de 60 min do início do ER.

Figura 11 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ Temperatura) ao longo do tempo antes e durante o ER após a administração local no HD 0,5 uL de veículo (n=6) ou 10 nmol/ 0,5 uL de AP7 (n=6). O ER teve início no tempo 0 (zero) e durou 60 min. Os símbolos representam a média $\pm$ EPM, * P < 0,001, *two-way* ANOVA.

8. Detecção dos níveis hipocampais de NO_x

Quando comparados aos animais controle (n= 6), os animais submetidos ao ER tiveram um aumento dos níveis de NO_x no HD ($F_{3, 17} = 27$, $P < 0.01$). Porém esses aumentos foram detectados apenas aos 10 (n= 5, $P < 0,05$) e 30 (n= 5, $P < 0,05$) min. Ao final de 60 min de estresse não ocorreram diferenças significativas nas concentrações de NO_x (n= 5; $P > 0,05$)(Figura 12).

9. Efeitos da administração do N-Propyl, um inibidor da síntese de óxido nítrico, no HD sobre as respostas autonômicas ao ER

O ER foi capaz de promover aumento de PAM ($F_{35, 360} = 6,5$, $P < 0,05$) e FC ($F_{35, 360} = 9$, $P < 0,05$) e queda da temperatura cutânea ($F_{16, 170} = 8$, $P < 0,05$). Porém a inibição da isoforma neuronal da NOS (n= 6) no HD, promovido pela administração de N-Propyl, inibiu o aumento de PAM ($F_{1, 360} = 334$, $P < 0.01$) de FC ($F_{1, 360} = 523$, $P < 0,01$) e a queda da temperatura cutânea ($F_{1, 170} = 72$, $P < 0,01$) provocados pelo ER quando comparado aos animais que receberam veículo (n=6) (Figura 13).

10. Efeitos da administração do c-PTIO, um seqüestrador de óxido nítrico, no HD sobre as respostas autonômicas ao ER

O ER foi capaz de promover aumento de PAM ($F_{35, 360} = 5,8$, $P < 0,05$) e FC ($F_{35, 360} = 3,6$, $P < 0,05$) e queda da temperatura cutânea ($F_{16, 170} = 12,7$, $P < 0,05$). Porém a redução nos níveis de NO no HD (n= 6), promovido pela administração de c-PTIO, inibiu o aumento de PAM ($F_{1, 360} = 235$, $P < 0.01$) de FC ($F_{1, 360} = 421$, $P < 0,01$) e a queda da temperatura cutânea ($F_{1, 170} = 12$, $P < 0,01$) provocados pelo ER quando comparado aos animais que receberam veículo (n=6) (Figura 14).

Figura 12 - Variação das concentrações de nitrito e nitrato (NO_x) no HD após o 10, 30 e 60 minutos de ER em relação ao grupo não estressado. As barras representam a média $\pm$ EPM, * $P < 0,01$, *one-way ANOVA*, *Dunnetts pos-test*, comparado ao grupo não estressado.

Figura 13 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ Temperatura) ao longo do tempo antes e durante o ER após a administração local no HD 0,5 uL de veículo (n=6) ou 0,1 nmol/ 0,5 uL de N-Propyl (n=6). O ER teve início no tempo 0 (zero) e durou 60 min. Os símbolos representam a média $\pm$ EPM, * $P < 0,01$, two-way ANOVA.

Figura 14 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ Temperatura) ao longo do tempo antes e durante o ER após a administração local no HD 0,5 μ L de veículo (n=6) ou 2 nmol/ 0,5 μ L de c-PTIO (n=6). O ER teve início no tempo 0 (zero) e durou 60 min. Os símbolos representam a média $\pm$ EPM, * P < 0,01, two-way ANOVA.

DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo foram: 1) A via NMDA/NO está envolvida nas respostas cardiovasculares provocadas pela administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados; 2) o HD modula as respostas autonômicas decorrentes do ER pela via NMDA/NO.

Tanto a estimulação elétrica quanto a farmacológica do HD de ratos são capazes de promover alterações cardiovasculares (Ruit e Neafsey, 1988; Wang e Ingenito, 1992). Além disso, estudos utilizando ligantes marcados demonstraram a presença de receptores glutamatérgicos no HD de ratos (Baudry e Lynch, 1979; Monaghan e Cotman, 1985). Esses dados sugerem que o HD pode modular o sistema cardiovascular através da ativação de receptores glutamatérgicos.

Apesar dos relatos de que a administração farmacológica de agonistas glutamatérgicos no HD provoca resposta depressora e bradicárdica em ratos anestesiados (Ruit e Neafsey, 1988), os seus efeitos em ratos não anestesiados ainda não haviam sido bem descritos e a possível via de ação não fora determinada. Dessa forma, para avaliar as consequências da anestesia nas respostas cardiovasculares decorrentes da estimulação do sistema glutamatérgico no HD, foram administradas doses variadas de L-glu no HD de ratos não anestesiados. Nossos resultados mostraram que a administração de L-glu no HD de ratos não anestesiados causa aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca de forma dose-dependente. Esse conjunto de dados, portanto, nos permite sugerir que estas discrepâncias de respostas entre o presente resultado e os de Ruit e Neafsey (1988), devem estar relacionadas com o uso de anestésico.

De fato, foi descrito que a anestesia pode ser um fator que interfere com o padrão das repostas cardiovasculares desencadeadas por estimulação de áreas localizadas no sistema

nervoso central. Evidências sugerem que a anestesia pode inverter respostas pressoras, mediadas pelo sistema nervoso central, em resposta hipotensoras, tal como aquelas causadas pela microinjeção de L-glu no núcleo paraventricular (NPV) ou no núcleo do trato solitário (NTS) (Kannan *et al.*, 1989; Machado e Bonagamba, 1992) ou mesmo bloquear essas respostas, como no caso da injeção intracerebroventricular de angiotensina II e noradrenalina na área septal lateral (ASL) e no núcleo leito da estria terminal (NLET) (Crestani *et al.*, 2007; Hoffman e Phillips, 1976; Scopinho *et al.*, 2006; Severs e Daniels-Severs, 1973). Outra diferença de nosso trabalho com o de Ruit e Neafsey (1988) é que o grupo em que os animais não foram anestesiados e receberam apenas a eletroestimulação, esses animais também tiveram uma queda da PA e da FC. Esse resultado diferem do nosso, possivelmente pelo fato de que a eletroestimulação promova respostas indiscriminada dos neurônios no HD e fibras de passagens, ao contrário da administração de L-glu, que ativa apenas neurônios que tenham receptores glutamatérgicos.

Durante atividades físicas e em situações de estresse ocorre aumento da PA que não é acompanhada pela bradicardia reflexa e sim por uma taquicardia (Michelini, 1998). Este aumento na FC ocorre para que seja possível manter o débito cardíaco e auxiliar a manutenção dos níveis de PA. Sabe-se que o barorreflexo encontra-se atenuado durante reações de defesa, favorecendo as respostas cardiovasculares decorrentes do estímulo aversivo (aumento de PA e FC) (Neafsey, 1990; Nosaka e Murata, 1989; Nosaka *et al.*, 1991). O presente trabalho demonstrou que a administração de L-glu promove aumento da PA associada a uma taquicardia e não a uma bradicardia reflexa, sugerindo que essa resposta cardiovascular ocorra por aumentar a ativação do sistema autônomo simpático.

Para testarmos essa hipótese, estudamos os mecanismos periféricos envolvidos nas respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de L-glu no HD. Para isso, nós administramos sistemicamente prazosin, antagonista dos α_1 -adrenoceptores, ou atenolol,

antagonista dos β_1 -adrenoceptores, antes da administração de L-glu no HD. A administração periférica do prazosin bloqueou a resposta pressora decorrente da administração de L-glu no HD, mas não alterou a resposta taquicárdica. Além disso, a administração de atenolol bloqueou a resposta taquicárdica sem alterar a resposta pressórica. Portanto, podemos afirmar que a ativação do HD de ratos não anestesiados através da microinjeção de L-glu causa respostas cardiovasculares por aumentar a atividade simpática tanto nos vasos através de α_1 -adrenoceptores, como no coração através de β_1 -adrenoceptores. Nossos dados são semelhantes a trabalhos prévios onde a administração de L-glu em outras estruturas como a banda diagonal de Broca (BDB), córtex pré-frontal medial (CPFM) e NPV (Busnardo *et al.*, 2007; Resstel e Correa, 2005; Tavares *et al.*, 2007) de ratos não anestesiados promoveram um aumento da PA e da FC decorrente a um aumento da ativação do sistema simpático.

O glutamato é um neurotransmissor excitatório abundante no SNC, capaz de causar respostas cardiovasculares quando microinjetado em várias estruturas como já mencionado (Busnardo *et al.*, 2007; Busnardo *et al.*, 2010; Resstel e Correa, 2005; Tavares e de Aguiar Correa, 2003). O HD não apenas apresenta receptores glutamatérgicos como durante eventos estressores ocorre aumento da liberação de glutamato nesta área (Moghaddam, 1993), sugerindo a existência de um sistema glutamatérgico funcional nesta estrutura. Além disso, o HD apresenta conexões com o córtex infralímbico e pré-límbico do CPFM (Ferino *et al.*, 1987; Swanson, 1981). Essas regiões corticais enviam projeções diretas ao NTS, o núcleo visceral aferente primário no bulbo, e também são capazes de modular o sistema cardiovascular (Resstel *et al.*, 2004; Resstel e Correa, 2005; Resstel *et al.*, 2006; Terreberry e Neafsey, 1983; Terreberry e Neafsey, 1987; van der Kooy *et al.*, 1982). Dessa forma, o HD poderia compor uma via envolvida diretamente com a modulação da atividade do sistema nervoso autônomo, em particular do sistema cardiovascular.

Além dos mecanismos periféricos, também investigamos quais os receptores glutamatérgicos estariam envolvidos nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo L-glu. A administração de AP7, antagonista dos receptores NMDA, no HD reduziu significativamente o aumento da PA e FC desencadeados pelo L-glu, sugerindo a participação desses receptores nestas respostas. Esta bem descrito na literatura a existência de interação entre receptores NMDA e a nNOS no SNC (Garthwaite et al., 1988; Garthwaite et al., 1989). Receptores NMDA estão localizados próximos à nNOS (Brenman e Bredt, 1997) e a geração de NO tem sido descrita após a ativação de receptores NMDA (Garthwaite et al., 1988).

O NO, um radical livre gerado pela nNOS, Ca^{2+} /calmodulina-dependente, atua como um mensageiro que se difunde através do SNC e está envolvido em diversas respostas neuronais (Garthwaite e Boulton, 1995; Hawkins *et al.*, 1998). Blackshaw *et al.* (2003) demonstrou a expressão de enzimas de nNOS no HD de ratos. Assim para investigar a participação da nNOS presente no HD nas resposta cardiovasculares decorrentes da administração de L-glu, foram avaliados os efeitos do pré-tratamento do HD com um inibidor seletivo da nNOS, o *N^ω-Propyl-L-arginine* (N-Propyl). A inibição seletiva da nNOS pelo N-Propyl no HD reduziu as respostas de aumento da PA e FC decorrentes da administração de L-glu. Assim, tanto o AP7 quanto o N-Propyl foram eficientes em inibir os efeitos cardiovasculares decorrentes da administração de L-glu no HD.

Para investigar a participação do NO gerado apartir da ativação da nNOS no HD nas respostas cardiovasculares decorrentes da administração de L-glu, foi feito a pré-administração intra-hipocampal de *carboxy-PTIO(S)-3-Carboxy-4-hydroxyphenylglycine* (c-PTIO), um sequestrador de NO que atravessa membras biológicas. A administração de c-PTIO reduziu as respostas cardiovasculares decorrentes da administração de L-glu. Uma vez que o c-PTIO não é capaz de entrar na célula (Ko e Kelly, 1999), podemos sugerir que o NO necessita sair da célula onde foi gerado para promover seu efeito. Em conjunto, esses

resultados sugerem que o NO local é gerado após ativação da nNOS e assim medeia a resposta pressora e taquicárdica causada pelo L-glu no HD, reforçando uma interação entre os receptores NMDA e NO. Interação similar entre mecanismos glutamatérgicos e nitrérgicos na modulação do sistema cardiovascular foi observada em outras estruturas do sistema nervoso central, dentre elas a porção rostroventrolateral do bulbo, CPFM, NLET e BDB (Alves et al., 2009; Martins-Pinge et al., 2007; Resstel et al., 2006; Tavares et al., 2007).

Esses resultados favorecem a hipótese da existência de interação entre receptores NMDA e o NO no HD sobre modulação do sistema cardiovascular. Corroborando com esse resultado, Lourenço *et al* (2010) desenvolveram uma técnica utilizando-se de microeletrodos de fibras de carbono acoplados a um gravador eletroquímico para caracterizar a dinâmica da produção de NO no HD de ratos *in vivo* nas respostas da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Nesse estudo os autores observaram que após a administração de L-glu no HD houve um aumento na concentração de NO e essa resposta foi bloqueada pela administração de um antagonista de receptores NMDA ou de um inibidor da nNOS, sugerindo que a ativação de receptores do tipo NMDA ativa a nNOS com conseqüente aumento a produção de NO no HD.

O HD, assim como outras estruturas do sistema límbico, está envolvido na modulação de respostas comportamentais, relacionadas a situações aversivas, tais como na exposição ao modelo do labirinto em cruz elevado (LCE), no ER, no teste do nado forçado, no desamparo aprendido e no medo condicionado ao contexto (Joca *et al.*, 2003; Joca e Guimaraes, 2006; Padovan e Guimaraes, 2000; Resstel *et al.*, 2008b). As respostas autonômicas provocadas por situações de estresse são moduladas por estruturas límbicas, como por exemplo, o CPFM (Resstel et al., 2006), amígdala (Kuniecki et al., 2002) e o NLET (Nijsen et al., 2001). O HD possui extensas conexões com essas estruturas límbicas (Carr e Sesack, 1996; Davis *et al.*,

1997; Herman *et al.*, 1994; Pacak *et al.*, 1995; Swanson, 1981) e o mesmo poderia ter um papel na modulação das respostas autonômicas durante as situações de estresse.

Reforçando essa hipótese, Del Bel *et al.* (1998), demonstraram aumento da ativação do HD de ratos que foram submetidos ao ER. Esses dados nos sugerem que o HD pode estar envolvido com a modulação de reações de defesa. Portanto, na segunda parte do nosso estudo, nós investigamos o possível envolvimento dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico presentes no HD na modulação de respostas autonômicas desencadeadas pelo ER.

O ER é uma modelo de estresse inescapável conhecido por induzir respostas autonômicas como o aumento da PA, aumento da FC e queda da temperatura cutânea (Busnardo *et al.*, 2010; Tavares e Correa, 2006; Tavares *et al.*, 2009). Moghaddam (1993) relatou que em modelos de estresse como o ER, há um aumento da liberação glutamato no HD. Estudos demonstraram que a inativação de receptores glutamatérgico do tipo NMDA através da administração do antagonista AP-7 no HD de ratos promove uma anti-aversiva, caracterizada por um afeito do tipo ansiolítico, no LCE vinte e quatro horas após o ER (Padovan *et al.*, 2000). Além disso, a inibição da nNOS através da administração de 7NI no HD de ratos também promove uma resposta anti-aversiva no modelo do nado forçado (Joca e Guimaraes, 2006). Finalmente, dados de nosso laboratório também demonstraram que o bloqueio agudo e reversível do HD com cloreto de cobalto, reduz tanto o aumento de PA e FC desencadeados pela re-exposição ao ambiente aversivo no modelo de medo condicionado ao contexto, indicando assim uma possível participação do HD na modulação das respostas autonômicas associadas às reações defensivas (Resstel *et al.*, 2008b).

Diante das evidências descritas acima, investigamos a participação do sistema glutamatérgico via receptores NMDA do HD na modulação das respostas autonômicas durante o ER. A administração de AP-7 promoveu uma redução das respostas pressórica,

taquicárdica e de queda da temperatura cutânea decorrentes do ER, mostrando que a ativação dos receptores NMDA presentes no HD é importante para a ocorrência dessas respostas autonômicas durante o ER.

O NO é um gás que se difunde facilmente, sendo convertido em nitrito e nitrato dentro de segundos. Estas características dificultam as determinações diretas das mudanças de suas concentrações nos sistemas biológicos. No entanto, medidas das formas mais estáveis dos produtos do NO, nitrito e nitrato (NO_x), provem uma medida qualitativa da atividade da NOS e produção de NO (Marzinzig *et al.*, 1997). Assim, como demonstrado anteriormente, a ativação de receptores glutamatérgicos no HD promove respostas cardiovasculares, e esse aumento da PA e da FC se assemelha ao que ocorre durante o ER. Também demonstramos anteriormente, que as respostas cardiovasculares decorrentes da administração de L-glu no HD dependem da via NMDA/NO e como o bloqueio com o AP-7 promoveu uma redução das respostas autonômicas decorrentes ao ER, nós averiguamos se durante a restrição ocorre um aumento do NO através da quantificação das concentrações de NO_x no HD. Nossos dados demonstraram que ocorre um aumento das concentrações de NO_x aos 10 e 30 min nos animais submetidos ao ER, mas não houve diferença significativa após 60 min de estresse. Moghaddam (1993) relatou que durante o ER há um aumento dos níveis de glutamato no HD de ratos que se mantém em torno de 40 minutos, mas aos 60 minutos já ocorre uma normalização da liberação de glutamato. Assim, uma vez que a ativação da nNOS, e conseqüente síntese de NO, depende do glutamato ativar receptores do tipo NMDA, os níveis de NO tendam a reduzir em função da liberação do glutamato no HD dos ratos.

Como discutido anteriormente, a nNOS atua na modulação de respostas cardiovasculares no HD e depende da ativação de receptores NMDA. Blackshaw *et al.* (2003) demonstraram que a ativação de receptores NMDA com agonista seletivo no HD, promove aumento da expressão de proteínas marcadas para a nNOS em camundongos. Assim, com

base nos estudos acima citados e nas nossas observações com os níveis de NOx, investigamos a participação da nNOS no HD nas respostas autonômicas durante o ER. A inibição da nNOS no Hd causada pela administração de N-Propyl promoveu uma redução das respostas pressórica, taquicárdica e de queda da temperatura cutânea decorrentes do ER, demonstrando que a ativação da nNOS presente no HD modula essas respostas autonômicas. Além disso, investigamos a participação do NO gerado no HD sobre modulação das respostas autonômicas geradas pelo ER. A administração intrahipocampal de c-PTIO também causou redução das respostas pressora e taquicárdica e de queda da temperatura cutânea causadas pelo ER. Nossos achados sugerem que os sistemas glutamatérgico e nitrérgico do HD tem um papel facilitatório na modulação das respostas autonômicas em situações aversivas. Tais dados corroboram achados de nosso laboratório que demonstram que o bloqueio desta via NMDA-NO no HD reduz as respostas autonômicas e comportamentais decorrente do modelo de medo condicionado ao contexto (Fabri et al, dados não publicados).

O HD possui conexões com o NLET e para a ASL, que são estruturas conhecidas por modularem respostas cardiovasculares durante o ER (Crestani *et al.*, 2009; Kubo *et al.*, 2002). O NLET envia projeções para áreas do tronco cerebral que estão envolvidas com a regulação autonômica como o núcleo dorsal do vago (Gray e Magnuson, 1987), a medula ventrolateral caudal (Giancola *et al.*, 1993) e o NTS (Gray e Magnuson, 1987; Holstege *et al.*, 1985). O hipocampo também envia projeções para o CPFM, uma importante estrutura límbica que atua nas respostas de aprendizado, memória e modulação comportamental e autonômica (Conde *et al.*, 1998; Resstel *et al.*, 2004; Resstel e Correa, 2006; Sesack *et al.*, 1989; Takagishi e Chiba, 1991). A lesão do CPFM reduz as respostas cardiovasculares tanto da eletroestimulação quanto da administração de L-glu no hipocampo (Ruit e Neafsey, 1988), sugerindo que tais respostas necessitem da participação desta área. Sabe-se que o CPFM está envolvido na modulação de respostas cardiovasculares e de reações defensivas (Resstel e Correa, 2005;

Resstel *et al.*, 2006; Resstel *et al.*, 2008a; Tavares e Correa, 2006) e assim como o NLET, o CPFM também manda projeções para estruturas bulbares envolvidas na modulação autonômica cardiovascular (Fisk e Wyss, 2000; Vertes, 2004), sugerindo que o HD atua modulando as respostas autonômicas através da modulação de outras estruturas envolvidas com a regulação cardiovascular.

A temperatura cutânea nos ratos, depende do fluxo sanguíneos e do tônus vasoconstritor simpático das artérias da pele (Blessing, 2003; Garcia *et al.*, 2001; Vianna e Carrive, 2005). Estudos mostraram que estímulos aversivos causam uma redução do fluxo sanguíneo da cauda de ratos ocorridos pelos fortes efeitos no fluxo vasoconstritor simpático para as artérias da pele (Blessing, 2003; Blessing e Seaman, 2003; Vianna e Carrive, 2005). Foi relatado que estruturas relacionadas a modulação a comportamental e cardiovascular, como o PVN e amígdala, estão envolvidas na modulação de respostas do controle da temperatura cutânea da cauda (Blessing, 2003; Busnardo *et al.*, 2007), e o HD possui conexões com estas áreas. Blessing (2003) relatou que a redução de atividade de ondas de ritmo theta no hipocampo estava relacionada com a redução de fluxo sanguíneo cutâneo em coelhos. Esses dados corroboram com os nossos achados. O bloqueio da via NMDA-NO no HD durante o ER reduziu as quedas de temperatura cutânea da cauda dos ratos, sugerindo que o HD tem um papel facilitatório nas respostas de vasoconstricção das artérias da pele, e na promoção da queda da temperatura cutânea na cauda do rato.

Assim, podemos sugerir que a ativação do sistema glutamatérgico e nitrérgico do HD de ratos anestesiados causa respostas cardiovasculares. Além disso, nós mostramos que o HD faz parte de um circuito de estruturas límbicas que são responsáveis pela modulação de respostas autonômicas associadas ao estresse e que os sistemas glutamatérgico e nitrérgico dessa estrutura participam dessa modulação.

CONCLUSÃO

A administração de L-glu no HD causa respostas cardiovasculares através da via NMDA-NO. Além disso, o bloqueio da via NMDA-NO no HD reduz as respostas autonômicas decorrentes do ER, indicando que ocorre a liberação de glutamato no HD durante o ER, a ativação de receptores do tipo NMDA e produção de óxido nítrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, F.H., Crestani, C.C., Resstel, L.B., Correa, F.M., 2009. Bed nucleus of the stria terminalis N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide modulate the baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. *J Neurosci Res.* 87, 1703-11.
- Amaral, D.G., Witter, M.P., 1995. Hippocampal formation, Vol., Academic Press, San Diego, CA.
- Anand, B.K., Dua, S., 1956. Circulatory and respiratory changes induced by electrical stimulation of limbic system (visceral brain). *J Neurophysiol.* 19, 393-400.
- Andy, O.J., Akert, K., 1953. Electrically induced seizure discharges from Ammon's formation, fornix, thalamus and cingulate gyrus in the cat and monkey. *Electroencephalogram Clinic Neurophysiology.* 5, 320.
- Andy, O.J., Akert, K., 1955. Seizure patterns induced by electrical stimulation of hippocampal formation in the cat. *J Neuropathol Exp Neurol.* 14, 198-213.
- Baudry, M., Lynch, G., 1979. Two glutamate binding sites in rat hippocampal membranes. *Eur J Pharmacol.* 57, 283-5.
- Blackshaw, S., Eliasson, M.J., Sawa, A., Watkins, C.C., Krug, D., Gupta, A., Arai, T., Ferrante, R.J., Snyder, S.H., 2003. Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. *Neuroscience.* 119, 979-90.
- Blessing, W.W., 2003. Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. *Cell Mol Neurobiol.* 23, 527-38.
- Blessing, W.W., Seaman, B., 2003. 5-hydroxytryptamine(2A) receptors regulate sympathetic nerves constricting the cutaneous vascular bed in rabbits and rats. *Neuroscience.* 117, 939-48.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.
- Brenman, J.E., Bredt, D.S., 1997. Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol.* 7, 374-8.

- Brodal, P., 1998. The cerebral cortex and limbic structures. The hippocampal formation: learning and memory In: The central nervous system: structure and function., Vol., ed.^eds. Oxford University Press, pp. 568-579.
- Busnardo, C., Tavares, R.F., Antunes-Rodrigues, J., Correa, F.M., 2007. Cardiovascular effects of L-glutamate microinjection in the supraoptic nucleus of unanaesthetized rats. *Neuropharmacology*. 52, 1378-84.
- Busnardo, C., Tavares, R.F., Correa, F.M., 2009. Role of N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors in the cardiovascular effects of L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus of unanesthetized rats. *J Neurosci Res*. 87, 2066-77.
- Busnardo, C., Tavares, R.F., Resstel, L.B., Elias, L.L., Correa, F.M., 2010. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. *Auton Neurosci*. 158, 51-7.
- Carlson, H.B., Gellhorn, E., Darrow, C.W., 1941. Representation of the sympathetic and parasympathetic nervous systems in the forebrain of the cat. *Archive Neurologic Psycology*. 45, 105-116.
- Carr, D.B., Sesack, S.R., 1996. Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals. *J Comp Neurol*. 369, 1-15.
- Chen, Y., Fenoglio, K.A., Dube, C.M., Grigoriadis, D.E., Baram, T.Z., 2006. Cellular and molecular mechanisms of hippocampal activation by acute stress are age-dependent. *Mol Psychiatry*. 11, 992-1002.
- Conde, G.L., Renshaw, D., Lightman, S.L., Harbuz, M.S., 1998. Serotonin depletion does not alter lipopolysaccharide-induced activation of the rat paraventricular nucleus. *J Endocrinol*. 156, 245-51.
- Conti, L.H., Shannon, M.H., Murry, J.D., Printz, M.P., 2001. Repeated restraint stress-induced increase in baroreceptor reflex sensitivity: role of corticotropin-releasing factor. *Neuropeptides*. 35, 71-81.
- Cotman, C.W., Monaghan, D.T., Ottersen, O.p., Storm-Mathisen, J., 1987. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci*. 10, 273-280.
- Crestani, C.C., Alves, F.H., Resstel, L.B., Correa, F.M., 2007. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjection in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat brain. *J Neurosci Res*. 85, 1592-9.

- Crestani, C.C., Alves, F.H., Tavares, R.F., Correa, F.M., 2009. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress*. 12, 268-78.
- Crestani, C.C., Alves, F.H., Resstel, L.B., Correa, F.M., 2010. The bed nucleus of the stria terminalis modulates exercise-evoked cardiovascular responses in rats. *Exp Physiol*. 95, 69-79.
- Davis, M., Walker, D.L., Lee, Y., 1997. Roles of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. Possible relevance to PTSD. *Ann N Y Acad Sci*. 821, 305-31.
- Dedovic, K., Duchesne, A., Andrews, J., Engert, V., Pruessner, J.C., 2009. The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *Neuroimage*. 47, 864-71.
- Del Bel, E.A., Silveira, M.C., Graeff, F.G., Garcia-Cairasco, N., Guimaraes, F.S., 1998. Differential expression of c-fos mRNA and Fos protein in the rat brain after restraint stress or pentylentetrazol-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol*. 18, 339-46.
- Fagg, G.E., Foster, A.C., 1983. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience*. 9, 701-19.
- Ferino, F., Thierry, A.M., Glowinski, J., 1987. Anatomical and electrophysiological evidence for a direct projection from Ammon's horn to the medial prefrontal cortex in the rat. *Exp Brain Res*. 65, 421-6.
- Fisk, G.D., Wyss, J.M., 2000. Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. *Brain Res*. 859, 83-95.
- Fortaleza, E.A., Tavares, R.F., Correa, F.M., 2009. The medial amygdaloid nucleus modulates cardiovascular responses to acute restraint in rats. *Neuroscience*. 159, 717-26.
- Garcia, J.N., Pedersen, N.P., Nalivaiko, E., Blessing, W.W., 2001. Tail artery blood flow measured by chronically implanted Doppler ultrasonic probes in unrestrained conscious rats. *J Neurosci Methods*. 104, 209-13.
- Garthwaite, J., Charles, S.L., Chess-Williams, R., 1988. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*. 336, 385-8.

- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M., Moncada, S., 1989. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol.* 172, 413-6.
- Garthwaite, J., Boulton, C.L., 1995. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 57, 683-706.
- Giancola, S.B., Roder, S., Ciriello, J., 1993. Contribution of caudal ventrolateral medulla to the cardiovascular responses elicited by activation of bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res.* 606, 162-6.
- Gray, T.S., Magnuson, D.J., 1987. Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. *J Comp Neurol.* 262, 365-74.
- Guimaraes, F.S., Del Bel, E.A., Padovan, C.M., Netto, S.M., de Almeida, R.T., 1993. Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. *Behav Brain Res.* 58, 133-9.
- Hawkins, R.D., Son, H., Arancio, O., 1998. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res.* 118, 155-72.
- Herman, J.P., Cullinan, W.E., Watson, S.J., 1994. Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. *J Neuroendocrinol.* 6, 433-42.
- Herman, J.P., Ostrander, M.M., Mueller, N.K., Figueiredo, H., 2005. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29, 1201-13.
- Hodges, G.J., Jackson, D.N., Mattar, L., Johnson, J.M., Shoemaker, J.K., 2009. Neuropeptide Y and neurovascular control in skeletal muscle and skin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 297, R546-55.
- Hoffman, W.E., Phillips, M.I., 1976. A prolonged pressor response to intraventricular angiotensin II following bilateral nephrectomy. *Life Sci.* 19, 1323-9.
- Holstege, G., Meiners, L., Tan, K., 1985. Projections of the bed nucleus of the stria terminalis to the mesencephalon, pons, and medulla oblongata in the cat. *Exp Brain Res.* 58, 379-91.

- Jacobson, L., Sapolsky, R., 1991. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev.* 12, 118-34.
- Joca, S.R., Padovan, C.M., Guimaraes, F.S., 2003. Activation of post-synaptic 5-HT(1A) receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. *Brain Res.* 978, 177-84.
- Joca, S.R., Guimaraes, F.S., 2006. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl)*. 185, 298-305.
- Kaada, B.R., 1951. Somato-motor, autonomic and electrocorticographic responses to electrical stimulation of rhinencephalic and other structures in primates, cat, and dog; a study of responses from the limbic, subcallosal, orbito-insular, piriform and temporal cortex, hippocampus-fornix and amygdala. *Acta Physiol Scand Suppl.* 24, 1-262.
- Kaada, B.R., Jasper, H., 1952. Respiratory responses to stimulation of temporal pole, insula, and hippocampal and limbic gyri in man. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 68, 609-19.
- Kaada, B.R., Jansen, J., Jr., Andersen, P., 1953. Stimulation of the hippocampus and medial cortical areas in unanesthetized cats. *Neurology.* 3, 844-57.
- Kannan, H., Hayashida, Y., Yamashita, H., 1989. Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *Am J Physiol.* 256, R1325-30.
- Kennett, G.A., Dickinson, S.L., Curzon, G., 1985. Central serotonergic responses and behavioural adaptation to repeated immobilisation: the effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. *Eur J Pharmacol.* 119, 143-52.
- Kennett, G.A., Dourish, C.T., Curzon, G., 1987. Antidepressant-like action of 5-HT1A agonists and conventional antidepressants in an animal model of depression. *Eur J Pharmacol.* 134, 265-74.
- Ko, G.Y., Kelly, P.T., 1999. Nitric oxide acts as a postsynaptic signaling molecule in calcium/calmodulin-induced synaptic potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 19, 6784-94.
- Kubo, T., Kanaya, T., Numakura, H., Okajima, H., Hagiwara, Y., Fukumori, R., 2002. The lateral septal area is involved in mediation of immobilization stress-induced blood pressure increase in rats. *Neurosci Lett.* 318, 25-8.

- Kuniecki, M., Coenen, A.M., Kaiser, J., 2002. Correlation between long latency evoked potentials from amygdala and evoked cardiac response to fear conditioned stimulus in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 62, 85-92.
- Liberson, W.T., Akert, K., 1955. Hippocampal seizure states in guinea pig. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 7, 211-22.
- Lourenco, C.F., Santos, R., Barbosa, R.M., Gerhardt, G., Cadenas, E., Laranjinha, J., 2010. In vivo modulation of nitric oxide concentration dynamics upon glutamatergic neuronal activation in the hippocampus. *Hippocampus*.
- Machado, B.H., Bonagamba, L.G., 1992. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Res*. 576, 131-8.
- Maclean, P.D., 1952. Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 4, 407-18.
- Maclean, P.D., Delgado, J.M., 1953. Electrical and chemical stimulation of frontotemporal portion of limbic system in the waking animal. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 5, 91-100.
- Maclean, P.D., 1957. Chemical and electrical stimulation of hippocampus in unrestrained animals. I. Methods and electroencephalographic findings. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 78, 113-27.
- Martins-Pinge, M.C., Garcia, M.R., Zoccal, D.B., Crestani, C.C., Pinge-Filho, P., 2007. Differential influence of iNOS and nNOS inhibitors on rostral ventrolateral medullary mediated cardiovascular control in conscious rats. *Auton Neurosci*. 131, 65-9.
- Marzinzig, M., Nussler, A.K., Stadler, J., Marzinzig, E., Barthlen, W., Nussler, N.C., Beger, H.G., Morris, S.M., Jr., Bruckner, U.B., 1997. Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols. *Nitric Oxide*. 1, 177-89.
- McEwen, B.S., Conrad, C.D., Kuroda, Y., Frankfurt, M., Magarinos, A.M., McKittrick, C., 1997. Prevention of stress-induced morphological and cognitive consequences. *Eur Neuropsychopharmacol*. 7 Suppl 3, S323-8.
- Mechiel Korte, S., De Boer, S.F., 2003. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol*. 463, 163-175.

- Michelini, L.C., 1998. Endogenous vasopressin and the central control of heart rate during dynamic exercise. *Braz J Med Biol Res.* 31, 1185-95.
- Moghaddam, B., 1993. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem.* 60, 1650-7.
- Monaghan, D.T., Cotman, C.W., 1985. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[³H]glutamate-binding sites in rat brain. *J Neurosci.* 5, 2909-19.
- Neafsey, E.J., 1990. Prefrontal cortical control of the autonomic nervous system: anatomical and physiological observations. *Prog Brain Res.* 85, 147-65; discussion 165-6.
- Nijssen, M.J., Croiset, G., Diamant, M., De Wied, D., Wiegant, V.M., 2001. CRH signalling in the bed nucleus of the stria terminalis is involved in stress-induced cardiac vagal activation in conscious rats. *Neuropsychopharmacology.* 24, 1-10.
- Nosaka, S., Murata, K., 1989. Somatosensory inhibition of vagal baroreflex bradycardia: afferent nervous mechanisms. *Am J Physiol.* 257, R829-38.
- Nosaka, S., Murase, S., Murata, K., 1991. Arterial baroreflex inhibition by gastric distension in rats: mediation by splanchnic afferents. *Am J Physiol.* 260, R985-94.
- Pacak, K., Palkovits, M., Kopin, I.J., Goldstein, D.S., 1995. Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. *Front Neuroendocrinol.* 16, 89-150.
- Pacak, K., Palkovits, M., 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev.* 22, 502-48.
- Padovan, C.M., Del Bel, E.A., Guimaraes, F.S., 2000. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 67, 325-30.
- Padovan, C.M., Guimaraes, F.S., 2000. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res.* 33, 79-83.
- Pajolla, G.P., Pelosi, G.G., Correa, F.M., 2005. Involvement of NMDA receptors in the hypotensive response to the injection of L-glutamate into the lateral hypothalamus of unanesthetized rats. *Brain Res.* 1053, 19-26.

- Papez, J.W., 1995. A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 7, 103-12.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Vol., Academic, Los Angeles.
- Resstel, L.B., Fernandes, K.B., Correa, F.M., 2004. Medial prefrontal cortex modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. *Brain Res.* 1015, 136-44.
- Resstel, L.B., Correa, F.M., 2005. Pressor and tachycardic responses evoked by microinjections of L-glutamate into the medial prefrontal cortex of unanaesthetized rats. *Eur J Neurosci.* 21, 2513-20.
- Resstel, L.B., Correa, F.M., 2006. Injection of l-glutamate into medial prefrontal cortex induces cardiovascular responses through NMDA receptor - nitric oxide in rat. *Neuropharmacology.* 51, 160-7.
- Resstel, L.B., Joca, S.R., Guimaraes, F.G., Correa, F.M., 2006. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience.* 143, 377-85.
- Resstel, L.B., Correa, F.M., Guimaraes, F.S., 2008a. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* 18, 2027-35.
- Resstel, L.B., Joca, S.R., Correa, F.M., Guimaraes, F.S., 2008b. Effects of reversible inactivation of the dorsal hippocampus on the behavioral and cardiovascular responses to an aversive conditioned context. *Behav Pharmacol.* 19, 137-44.
- Ruit, K.G., Neafsey, E.J., 1988. Cardiovascular and respiratory responses to electrical and chemical stimulation of the hippocampus in anesthetized and awake rats. *Brain Res.* 457, 310-21.
- Sapan, C.V., Lundblad, R.L., Price, N.C., 1999. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem.* 29 (Pt 2), 99-108.
- Scopinho, A.A., Resstel, L.B., Antunes-Rodrigues, J., Correa, F.M., 2006. Pressor effects of noradrenaline injected into the lateral septal area of unanesthetized rats. *Brain Res.* 1122, 126-34.
- Selye, H., 1998. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 10, 230-1.

- Sesack, S.R., Deutch, A.Y., Roth, R.H., Bunney, B.S., 1989. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol.* 290, 213-42.
- Severs, W.B., Daniels-Severs, A.E., 1973. Effects of angiotensin on the central nervous system. *Pharmacol Rev.* 25, 415-49.
- Sevgi, S., Ozek, M., Eroglu, L., 2006. L-NAME prevents anxiety-like and depression-like behavior in rats exposed to restraint stress. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 28, 95-9.
- Siegel, A., Flynn, J.P., 1968. Differential effects of electrical stimulation and lesions of the hippocampus and adjacent regions upon attack behavior in cats. *Brain Res.* 7, 252-67.
- Smith, W.K., 1944. The results of stimulation of the uncus and adjacent portions of the hippocampal gyrus. *Fed Proc.* 3, 43.
- Swanson, L.W., 1981. A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Res.* 217, 150-4.
- Takagishi, M., Chiba, T., 1991. Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Res.* 566, 26-39.
- Tavares, R.F., Peres-Polon, V.L., Correa, F.M., 2002. Mechanisms involved in the water intake-related pressor response in the rat. *J Hypertens.* 20, 295-302.
- Tavares, R.F., de Aguiar Correa, F.M., 2003. Pressor effects of L-glutamate injected into the diagonal band of Broca of unanesthetized rats. *Brain Res.* 959, 312-9.
- Tavares, R.F., Correa, F.M., 2006. Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. *Neuroscience.* 143, 231-40.
- Tavares, R.F., Resstel, L.B., Correa, F.M., 2007. Interaction between glutamatergic and nitrgergic mechanisms mediating cardiovascular responses to L-glutamate injection in the diagonal band of Broca in anesthetized rats. *Life Sci.* 81, 855-62.
- Tavares, R.F., Pelosi, G.G., Correa, F.M., 2009. The paraventricular nucleus of the hypothalamus is involved in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress.* 12, 178-85.

- Taylor, J., Harris, N., Krieman, M., Vogel, W.H., 1989. Effects of buspirone on plasma catecholamines, heart rate, and blood pressure in stressed and nonstressed rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 34, 349-53.
- Terreberry, R.R., Neafsey, E.J., 1983. Rat medial frontal cortex: a visceral motor region with a direct projection to the solitary nucleus. *Brain Res.* 278, 245-9.
- Terreberry, R.R., Neafsey, E.J., 1987. The rat medial frontal cortex projects directly to autonomic regions of the brainstem. *Brain Res Bull.* 19, 639-49.
- van der Kooy, D., McGinty, J.F., Koda, L.Y., Gerfen, C.R., Bloom, F.E., 1982. Visceral cortex: a direct connection from prefrontal cortex to the solitary nucleus in rat. *Neurosci Lett.* 33, 123-7.
- Vertes, R.P., 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse.* 51, 32-58.
- Vianna, D.M., Carrive, P., 2005. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *Eur J Neurosci.* 21, 2505-12.
- Wang, J.Q., Ingenito, A.J., 1992. Centrally mediated cardiovascular actions of dynorphin A(1-8) on rat hippocampal formation. *J Pharmacol Exp Ther.* 261, 678-85.
- Wang, J.Q., Ingenito, A.J., 1994. Receptors mediating depressor responses to intrahippocampal injection of L-glutamate and dynorphin-A(1-8) in conscious, spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 24, 999-1003.
- Yoshino, K., Hayakawa, M., Niki, E., Matsuoka, K., 2005. Closed-loop analysis of cardiovascular variability in rats under restraint stress. *Auton Neurosci.* 119, 61-6.