



Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Renata Yuri Kurokawa

**Estudo da participação da neurotransmissão
colinérgica do córtex pré-límbico nas respostas
autônômicas desencadeadas pelo estresse por
restrição agudo em ratos.**

Trabalho de Conclusão de Curso

Araraquara

2013.

Renata Yuri Kurokawa

**Estudo da participação da neurotransmissão colinérgica do córtex
pré-límbico nas respostas autonômicas desencadeadas pelo
estresse por restrição agudo em ratos.**

Monografia apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista como parte dos requisitos para conclusão do curso de graduação em Farmácia- Bioquímica e obtenção do título de Farmacêutica Bioquímica.

Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho

Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani.

Co-orientador: Me. Josiane de Oliveira Duarte.

Araraquara

2013.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus que em todos os anos de minha vida sempre me orientou e me guiou, iluminando o caminho quando ele era tortuoso e me conduzindo quando esse era de alegria e aprendizado.

Agradeço também muito aos meus pais, meu alicerce, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos de felicidade e de dificuldades.

As minhas irmãs, Luciana Ayumi Kurokawa e Paula Tiemi Kurokawa, por toda a paciência e companheirismo. Não posso explicar o quão feliz eu sou por vocês existirem na minha vida!

Aos melhores amigos que poderia encontrar na faculdade e que sempre me apoiaram e me proporcionaram os momentos mais incríveis e divertidos: Heloisa Barbosa, Isabella Santos, Bárbara Kapp, Cindy Nishihara e Arthur Fernandes.

Agradeço a Ivy Ishino Carvalho por me ajudar muito durante toda a minha fase acadêmica, por me ouvir e aconselhar durante todo esse período. Espero que nossa amizade perdure por toda a minha vida.

A minha madrinha Lucy Pires, por ser o exemplo de garra, força e alegria da minha vida. E também as minha primas do coração: Patricia Pires e Beatriz Pires.

Aos meus amigos Daniele Berdusco e Valder Souza por todos esses anos de amizade, apoio, conselhos e risadas.

Não poderia também deixar de agradecer a todos do laboratório que tornaram tudo isso possível. Agradeço as técnicas mais especiais, pacientes e eficientes: Rosana Finoti Pupim Silva e Elizabete Zocal Paro Lepera; e a todos meus

amigos do laboratório: Lucas Barreto, Mariane Adami, Flávia Santana, Elinéia Rosa, Taciane Pollo e Leandro Oliveira.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro.

Por fim, gostaria de expressar o meu agradecimento de uma forma muito especial, ao meu professor orientador Carlos Cesar Crestani, por todos os conhecimentos transmitidos, pelos conselhos, mas principalmente pela paciência e apoio e sou muito grata também a minha co-orientadora, Josiane de Oliveira Duarte, que foi muito mais do que essa denominação pode expressar, foi companheira e amiga!

SUMÁRIO

Resumo

Lista de ilustrações

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

1. Introdução	11
2. Objetivo	16
3. Materiais e métodos	17
3.1. Animais.....	17
3.2. Técnica de implante de cânula guia no sistema nervoso central	17
3.3 Cânulação da artéria femoral	18
3.4. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca	19
3.5. Registro da temperatura cutânea da cauda	19
3.6. Soluções e drogas utilizadas.....	20
3.7. Microinjeção de drogas no sistema nervoso central.....	20
3.8. Estresse por restrição agudo.....	20
3.9. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas.....	21
3.10. Forma de análise dos resultados.....	21
4. Protocolos experimentais	23

4.1. Efeito do pré-tratamento do córtex PL com hemicolínio sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos	23
4.2. Efeito do pré-tratamento do córtex PL com metilatropina sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos	23
5. Resultados	25
5.1. Efeito do pré-tratamento do córtex PL com hemicolínio sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ra tos	25
5.2. Efeito do pré-tratamento do córtex PL com metilatropina sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos	29
6. Discussão	33
7. Referências bibliográficas	38

RESUMO

As respostas fisiológicas e comportamentais durante o estresse emocional são mediadas por estruturas límbicas no sistema nervoso central, através da ação de vários mecanismos neuroquímicos. O córtex pré-frontal medial (CPFM) é uma região límbica envolvida no controle da atividade autonômica. Estudos anteriores demonstraram que sub-regiões da porção ventral do CPFM (CPFMv) parecem ter funções diferentes no controle das respostas ao estresse. Neste sentido, estudos tem sugerido uma função facilitatória do córtex infra-límbico (IL), ao passo que a ativação do córtex pré-límbico (PL) parece ter uma ação inibitória sobre as respostas comportamentais, neuroendócrinas e autônomas induzidas pelo estresse. Apesar das evidências acima indicarem um importante papel do CPFMv na integração das respostas autônomas ao estresse, informações sobre os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos no controle destas respostas ainda são escassos. Foi demonstrado que neurônios colinérgicos que se projetam para o CPFM são ativados por estímulos aversivos. Além disso, estudos anteriores sugerem um envolvimento da neurotransmissão colinérgica do CPFM no controle da atividade cardiovascular. Diante do exposto, o presente estudo teve o objetivo de investigar, em grupos independentes de animais, o efeito da microinjeção bilateral no córtex PL de hemicolínio (inibidor do transportador de colina) ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) sobre as respostas de aumento da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) e redução da temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse por restrição agudo em ratos. A depleção dos estoques de acetilcolina no córtex PL causado pelo tratamento local com hemicolínio reduziu a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse por restrição agudo, sem interferir com as respostas de elevação da pressão arterial e redução da

temperatura cutânea da cauda. Além disso, o tratamento do córtex PL com metilatropina reduziu as respostas pressora e taquicárdica do estresse por restrição, sem interferir com a resposta de temperatura cutânea. Em suma, contrário aos resultados anteriores que relataram uma influência inibitória do córtex PL nas respostas cardiovasculares ao estresse, os resultados obtidos no presente estudo sugerem uma influência facilitatória da neurotransmissão colinérgica da região PL do CPFM nas respostas pressora e taquicárdica desencadeadas pelo estresse por restrição agudo. O efeito sobre a resposta pressora evidenciado pelo tratamento local com metilatropina, porém não observado após a microinjeção local de hemicolínio, sugere que o controle da PA durante o estresse exercido por receptores colinérgicos muscarínicos locais deva ser contraposto por outros mecanismos colinérgicos no córtex PL. Deste modo, futuros estudos são necessário com o intuito de investigar um possível papel de receptores colinérgicos nicotínicos do córtex PL nas respostas autônomas ao estresse por restrição.

Lista de figuras

- Figura 1: Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura da cauda durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no córtex PL com veículo ou hemicolíneo 27
- Figura 2: Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no córtex PL de veículo e hemicolíneo 28
- Figura 3: Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura da cauda durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no córtex PL com veículo ou metilatropina..... 31
- Figura 4: Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no córtex PL de veículo e metilatropina 32

Lista de tabelas

Tabela 1: Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda em animais tratados bilateralmente no córtex PL com hemicolínio ou veículo (LCA)	26
--	----

Tabela 2: Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda em animais tratados bilateralmente no córtex PL com metilatropina ou veículo (LCA)	30
--	----

Lista de abreviaturas e siglas

ACh - Acetilcolina

ANOVA - Análise de variância

Cg1 - Córtex cingular 1

CPFM - Córtex pré-frontal medial

CPFMv - Porção ventral do córtex pré-frontal medial

DP - Córtex peduncular dorsal

FC- Frequência cardíaca

HPA - Hipotálamo-hipófise-adrenal

IL - Córtex infra-límbico

PA - Pressão arterial

PAM - Pressão arterial média

PL - Córtex pré- límbico

1) INTRODUÇÃO

Nos dias atuais o homem sofre diariamente com eventos que desencadeiam situações de maior ou menor nível de estresse. Estudos recentes têm apontado que existe correlação entre o nível de estresse e a incidência de patologias cardiovasculares e psiquiátricas (GRIPPO & JOHNSON, 2009). A sobrevivência e a adaptação de todas as espécies à situações de estresse requer um adequado e coordenado conjunto de respostas fisiológicas (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009). Neste sentido, a manutenção da homeostasia durante situações aversivas depende da ativação coordenada dos sistemas neuroendócrino e autônomo (DAMPNEY et al, 2008; ULRICH-LAI & HERMAN, 2009). O sistema nervoso autônomo promove a resposta imediata ao estresse, que é caracterizada por aumento na pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), redistribuição do fluxo sanguíneo (redução na perfusão cutânea e visceral e aumento no fluxo sanguíneo cardíaco e para a musculatura esquelética) e alteração na atividade do barorreflexo (BARRON & VAN LOON, 1989; DAMPNEY et al, 2008; CRESTANI et al, 2010). A vasoconstrição cutânea causa redução na temperatura cutânea durante o estresse (VIANA & CARRIVE, 2005; BUSNARDO et al, 2010). A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) durante o estresse promove aumento no nível plasmático de glicocorticóide, no qual é importante para a mobilização energética e a retroalimentação negativa do eixo ao atuar no hipotálamo e na adeno-hipófise (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009). Apesar da importância das respostas fisiológicas durante situações aversivas, os mecanismos envolvidos com estas respostas ainda são pouco compreendidos.

As respostas fisiológicas durante o estresse emocional são mediadas por estruturas límbicas no sistema nervoso central, através da ação de vários mecanismos neuroquímicos (JOELS & BARAM, 2009; ULRICH-LAI & HERMAN, 2009). O córtex pré-frontal medial (CPFM) é uma região límbica localizada no telencéfalo, na qual é dividida em córtex cingular 1 e 2 (Cg 1 e Cg 2), córtex pré-límbico (PL), córtex infra-límbico (IL) e córtex peduncular dorsal (DP) (ZILLES & WREE, 1985). Existe na literatura numerosas evidências sugerindo a participação da porção ventral do CPFM (CPFMv) na modulação do sistema cardiovascular (HARDY & HOLMES, 1988; RESSEL & CORREA, 2006b; HANSELAND VON KANEL, 2008). Neste sentido, foi observado que a estimulação elétrica ou química com L-glutamato das regiões do CPFMv identificadas como PL, IL e PD causaram diminuição da pressão arterial em animais anestesiados (HARDY & HOLMES, 1988), na qual foi acompanhada por redução na atividade do nervo simpático esplânico e aumento do fluxo sanguíneo nos leitos renal, mesentérico e ilíaco (VERBENE, 1996; OWENS; VERBENE, 2001). Por outro lado, aumento na pressão arterial foi observada após a ativação do CPFMv de ratos não-anestesiados (RESSEL & CORREA, 2005; TAVARES et al., 2004). Além disso, um envolvimento do CPFM nas respostas cardíacas do barorreflexo tem sido demonstrado (VERBENE et al, 1987; RESSEL et al, 2004). Estudos tem sugerido que o controle da função cardiovascular pelo CPFM envolve vários mecanismos neuroquímicos locais, incluindo mecanismos colinérgicos, glutamatérgicos, nitrérgicos e noradrenérgicos (RESSEL & CORREA, 2006).

O CPFMv possui conexões com outras estruturas límbicas como a amígdala, o septo, o hipocampo, a matéria cinzenta periaqueductal e regiões hipotalâmicas de defesa (VERTES, 2004). Além disso, estudos tem demonstrado a

ativação do CPFM durante situações aversivas (CULLINAN et al, 1995; FIGUEIREDO et al, 2002). Além destas informações, uma série de outras evidências funcionais tem sugerido uma participação importante desta região cortical na integração de respostas cardiovasculares, neuroendócrinas e comportamentais durante situações aversivas (MCDOUGALL et al, 2005; RESSEL & CORREA, 2006; VIDAL-GONZALEZ et al, 2006; ULRICH-LAI & HERMAN, 2009). Um aspecto interessante é que alguns estudos tem sugerido que sub-regiões do CPFMv parecem ter papéis distintos no controle das respostas ao estresse. Neste sentido, foi demonstrado que o bloqueio seletivo do córtex PL aumentou as respostas neuroendócrinas, cardiovasculares e comportamentais induzidas pelo estresse, ao passo que a inibição do córtex IL diminuiu estas respostas (FRYSZTAK & NEAFSEY, 1994; RANDLEY et al, 2006; VIDAL-GONZALEZ et al, 2006; TAVARES et al, 2009). Baseado nestas evidências, tem sido proposto uma regionalização do controle exercido pelo CPFM das respostas ao estresse, com a ativação do córtex PL conferindo inibição e o córtex IL tendo uma função facilitatória (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009). Apesar das evidências acima indicarem um importante papel do CPFM na integração das alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse, informações acerca dos mecanismos neuroquímicos locais envolvidos no controle destas respostas ainda são escassas.

Evidências têm apontado que a neurotransmissão colinérgica, através da ativação de receptores colinérgicos muscarínicos, é um importante mecanismo neuroquímico envolvido no controle das respostas fisiológicas durante o estresse emocional em várias estruturas límbicas (RAMADE e BAYLE, 1989, KUBO et al., 2003, FORTALEZA, et al., 2009). Há evidências também de que neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal que se projetam para o CPFM são ativados por

estímulos comportamentais aversivos (PIRCH et al., 1991), sugerindo assim que os neurônios do CPFM estão envolvidos em processos excitatórios ou de atenção durante situações aversivas. Além disso, mudanças na atividade neuronal do CPFM causadas por um estímulo condicionado foram suprimidas por uma injeção local de atropina (PIRCH et al., 1992), o que reforça a ideia de um envolvimento da transmissão colinérgica do CPFM nestes processos.

Estudos tem apontado que mecanismos colinérgicos no CPFM são importantes no controle da função cardiovascular. Foi observado que injeções de acetilcolina no CPFMv provocam acentuada queda da pressão arterial e taquicardia tanto em ratos anestesiados quanto em ratos não anestesiados, e estas respostas são abolidas pelo tratamento local com atropina (CRIPPA et al., 1999, 2000). A resposta hipotensora observada após a injeção de acetilcolina no CPFM está associada com uma vasodilatação de leitos vasculares que irrigam o trem posterior do animal (CRIPPA et al., 2000). Entretanto, apesar das evidências de um envolvimento da neurotransmissão colinérgica do CPFM no controle da função cardiovascular, não existem dados na literatura acerca de um papel deste mecanismo neuroquímico do CPFM no controle das respostas autonômicas associadas ao estresse.

O estresse por restrição é um modelo de estresse não-condicionado e inescapável bem aceito na literatura (BARRON & VAN LOON, 1989; CHOI, et al, 2007), no qual consiste em colocar o animal em um tubo cilíndrico de contenção. Este modelo causa respostas neuroendócrinas e autônomas caracterizadas por elevação nos níveis plasmáticos de glicocorticóides, aumentos da pressão arterial e frequência cardíaca, modulação da atividade do barorreflexo e redução da temperatura cutânea, nas quais são mantidas durante todo o período de estresse

(BARRON & VAN LOON, 1989; MCDOUGALL, et al, 2000; CHOI, et al, 2007; CRESTANI et al, 2010).

Diante do exposto acima, no presente estudo nós testamos a hipótese de que a neurotransmissão colinérgica na região PL do CPFM, atuando através de receptores colinérgicos muscarínicos, tem uma ação inibitória sobre as respostas autônomas desencadeadas pelo estresse por restrição agudo em ratos.

2) OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi estudar o envolvimento da neurotransmissão colinérgica da região PL do CPFM nas respostas autônomas observadas durante o estresse por restrição agudo em ratos. Para tanto, os objetivos específicos foram:

1) Estudar o efeito da microinjeção bilateral no córtex PL de hemicolínio, inibidor do transportador de colina, sobre as respostas de aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, bem como na redução da temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse por restrição agudo em ratos;

2) Investigar o efeito da microinjeção bilateral no córtex PL de metilatropina, antagonista não-seletivo de receptores colinérgicos muscarínicos, sobre as respostas de aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, bem como na redução da temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse por restrição agudo em ratos.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (230-270 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu-SP). Os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP no mínimo sete dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (24 °C) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 7h), com livre acesso a alimento e água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, com o protocolo número 37/2012.

3.2. Técnica de implante de cânula guia no sistema nervoso central

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol na dose de 250 mg/Kg por via intraperitoneal. Após a tricotomia, a cabeça do rato foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, EUA) e foi realizada assepsia do campo cirúrgico com álcool a 70%. Para redução do sangramento durante a cirurgia, foi injetado 0,3 ml de solução de lidocaína com vasoconstritor (3% de levoarterenol, Harvey Química Farmacêutica Ind. e Comércio Ltda, Catanduva, SP). A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se completamente o periósteo. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada a 10%. Todas as coordenadas tiveram como referência os parâmetros obtidos do Atlas de Paxinos & Watson (1997), ajustados ao peso

corporal do animal (BORGES,1999). O bregma foi utilizado como ponto de referência para as coordenadas.

Córtex Pré-Límbico (PL)

Ântero-posterior: + 3,3 mm em relação ao bregma;

Lateral: + 1,9 mm a partir do bregma;

Ventral: - 2,4 mm em relação à superfície craniana;

Após o posicionamento da cânula de aço inoxidável, foi feito um orifício no crânio com auxílio de broca odontológica, por onde foi introduzida a cânula constituída por um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,6 mm, 23 gauge), com 10 mm de comprimento. A cânula foi fixada ao crânio com uma resina acrílica autopolimerisável (Simplex, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ) e pequenos parafusos foram previamente implantados na calota craniana. Um mandril com 0,2 mm de diâmetro foi introduzido na cânula, evitando a obstrução da mesma durante o período de recuperação do animal. Como medida profilática, ao final da cirurgia os animais receberam 0,2 mL de pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal lunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) por via subcutânea.

3.3. Canulação da artéria femoral

Cinco dias após a implantação das cânulas guias no córtex PL os animais foram anestesiados novamente com tribromoetanol na dose de 250 mg/Kg por via intraperitoneal, e foi implantado um cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares. Este vaso foi dissecado e um cateter de

polietileno foi introduzido até a artéria aorta abdominal inferior. Os cateteres utilizados eram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal. Após a implantação do cateter, o mesmo foi exteriorizado na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica. Ao término da cirurgia os animais receberam 2,5 mg/kg do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil), por via subcutânea, para analgesia pós-operatória. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro da pressão arterial. Todos os dados utilizados dos parâmetros foram transformados em variação dos mesmos.

3.4. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., EUA) através de um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial pulsátil foi registrada utilizando um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Austrália), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML866, ADInstruments, Austrália). Os valores de pressão arterial média (PAM) e FC foram obtidos a partir do sinal de pressão arterial pulsátil.

3.5. Registro da temperatura cutânea da cauda

Os registros da temperatura cutânea da cauda foram feitos por um termovisor (IRI4010, Inglaterra). A análise foi feita através de um software para análise termográfica, e a temperatura foi representada por variações de intensidade

de cor (VIANNA & CARRIVE, 2005; BUSNARDO et al, 2010). Para análise das imagens, a medida de temperatura foi realizada em 5 pontos da cauda do animal, e a média foi calculada para cada registro (Cruz et al, 2012).

3.6. Soluções e drogas utilizadas

O hemicolínio-3 (inibidor do transportador de colina) (Sigma-Aldrich, EUA) (2 nmol/100nL), a metilatropina (Sigma-Aldrich, EUA) (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) (3 nmol/100nL), o tribromoetanol (Sigma-Aldrich, EUA) e a uretana (Sigma-Aldrich, EUA) foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%). O pentabiótico (Fontoura-Wyeth, Brasil) e o anti-inflamatório flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) foram utilizados como fornecido pelos fabricantes.

3.7. Microinjeção de drogas no sistema nervoso central

As agulhas injetoras (33 G, SmallParts, EUA) que foram utilizadas para microinjeção das drogas no córtex PL eram 1 mm mais longa do que a cânula guia fixada ao crânio, e foram conectadas a uma seringa 2 µl (7002KH, Hamilton, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10). As drogas foram injetadas no volume de 100nL (TAVARES et al, 2009).

3.8. Estresse por restrição agudo

O estresse por restrição agudo consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro=6,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de ½ polegada que preenchiam aproximadamente 20% do tubo). No presente estudo, os animais foram mantidos por um período de 30 minutos no tubo

de restrição (CHOI et al, 2007, CRESTANI et al, 2010). Cada animal foi submetido a apenas uma sessão de restrição para evitar habituação.

3.9. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, intraperitoneal). Foi injetado o corante azul de Evan a 1% bilateralmente no córtex PL. Em seguida, os ratos foram submetidos à abertura da caixa torácica para exposição do coração. Para facilitar a perfusão cerebral, a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática. Uma incisão foi feita na aurícula direita para o escoamento do sangue e do perfusado, e uma agulha para perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo. A perfusão foi realizada inicialmente com 20 mL de solução fisiológica de NaCl 0,9%, seguida por 20 mL de solução tamponada de formalina 10%. Posteriormente, os cérebros foram retirados da caixa craniana e pós-fixados na respectiva solução de perfusão. Os cérebros foram seccionados com o auxílio de um criostato (Leica, Alemanha). Foram feitas várias secções da região do CPFM, e o posicionamento dos sítios de injeção foram analisados utilizando-se o Atlas de Paxinos e Watson (1997) como referência.

3.10. Forma de análise dos resultados

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O efeito dos tratamentos farmacológicos sobre os valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda foram comparados utilizando teste t de *Student*. A análise de variância (ANOVA) bifatorial (tratamento vs tempo), com tratamento como medida principal e tempo como medida repetida, foi usada para comparar as

curvas temporais de variações da PAM, FC e temperatura cutânea da cauda durante o estresse por restrição agudo.

4) PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas ao córtex PL e mantidos em recuperação por cinco dias. O experimento foi realizado 24 h após a implantação de um cateter na artéria femoral. Os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação por ao menos 30 minutos antes do início do experimento, para habituação às condições de som e iluminação da sala. Após este período, foi iniciado o registro dos parâmetros cardiovasculares. Um registro de pelo menos 30 minutos foi realizado para determinação dos valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca.

4.1. Efeito do pré-tratamento do córtex PL com hemicolínio sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.

Grupos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no córtex PL de veículo (salina) (100 nL) ou hemicolínio (inibidor do transportador de colina) (2 nmol/100nL). A dose de hemicolínio foi baseada em estudos anteriores do nosso grupo (FORTALEZA et al, 2009). Dez minutos após, os animais foram submetidos ao estresse por restrição agudo. A PA e FC foram registradas durante todo o período de restrição. A temperatura cutânea da cauda foi medida aos 10, 5 e 0 min antes da restrição, e a cada 5 min durante a restrição.

4.2. Efeito do pré-tratamento do córtex PL com metilatropina sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.

Grupos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no córtex PL de veículo (salina) (100 nL) ou metilatropina (antagonista de receptores

muscarínicos) (3nmol/100nL). A dose de metilatropina foi baseada em estudos anteriores do nosso grupo (CRIPPA et al, 1999; FORTALEZA et al, 2009). Dez minutos após, os animais foram submetidos ao estresse por restrição agudo. As medidas cardiovasculares e de temperatura cutânea da cauda foram realizadas como no protocolo anterior (ver item 4.1).

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do pré-tratamento do córtex PL com hemicolínio sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.

O tratamento bilateral do córtex PL com hemicolínio (2nmol/100nL, n=5), inibidor do transportador de colina, não afetou os parâmetros basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda, quando comparado com os animais que receberam veículo no córtex PL (n=6) (Tabela 1). Entretanto, o estresse por restrição agudo causou uma elevação da PAM (fator tempo: $F_{(20,189)}=14$, $P<0,0001$) e FC (fator tempo: $F_{(20,189)}=6$, $P<0,0001$), que foram acompanhados de redução da temperatura cutânea da cauda (fator tempo: $F_{(8,81)}=9$, $P<0,0001$) (Figura 1). Além disso, o tratamento do córtex PL com hemicolínio reduziu a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse por restrição (fator tratamento: $F_{(1,189)}=26$, $P<0,0001$), porém a análise estatística não encontrou interação entre os fatores tempo e tratamento ($F_{(20,189)}=0,8$, $P>0,05$) (Figura 1). As respostas de aumento da PAM (fator tratamento: $F_{(1,189)}=0,8$, $P>0,05$) e de redução da temperatura da cauda (fator tratamento: $F_{(1,81)}=0,1$, $P>0,05$) não foram afetadas pela depleção dos estoques de acetilcolina no córtex PL causado pelo tratamento local com hemicolínio (Figura 1). A análise também não indicou interação entre os fatores tempo e tratamento para as medidas de PAM ($F_{(20,189)}=0,5$, $P>0,05$) e de temperatura cutânea da cauda ($F_{(8,81)}=0,2$, $P>0,05$). Representação diagramática dos sítios de injeção no córtex PL de hemicolínio e veículo de todos os animais utilizados neste estudo é apresentado na Figura 2.

Tabela 1

Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda em animais tratados bilateralmente no córtex PL com hemicolínio ou veículo (salina).

Grupo	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura cutânea da cauda (°C)
Salina	104±2	364±7	27,5±0,7
Hemicolínio	105±3	387±14	26,9±0,4
	<i>t=0,3; P>0.05</i>	<i>t=0,5; P>0.05</i>	<i>t=1,7; P>0.05</i>

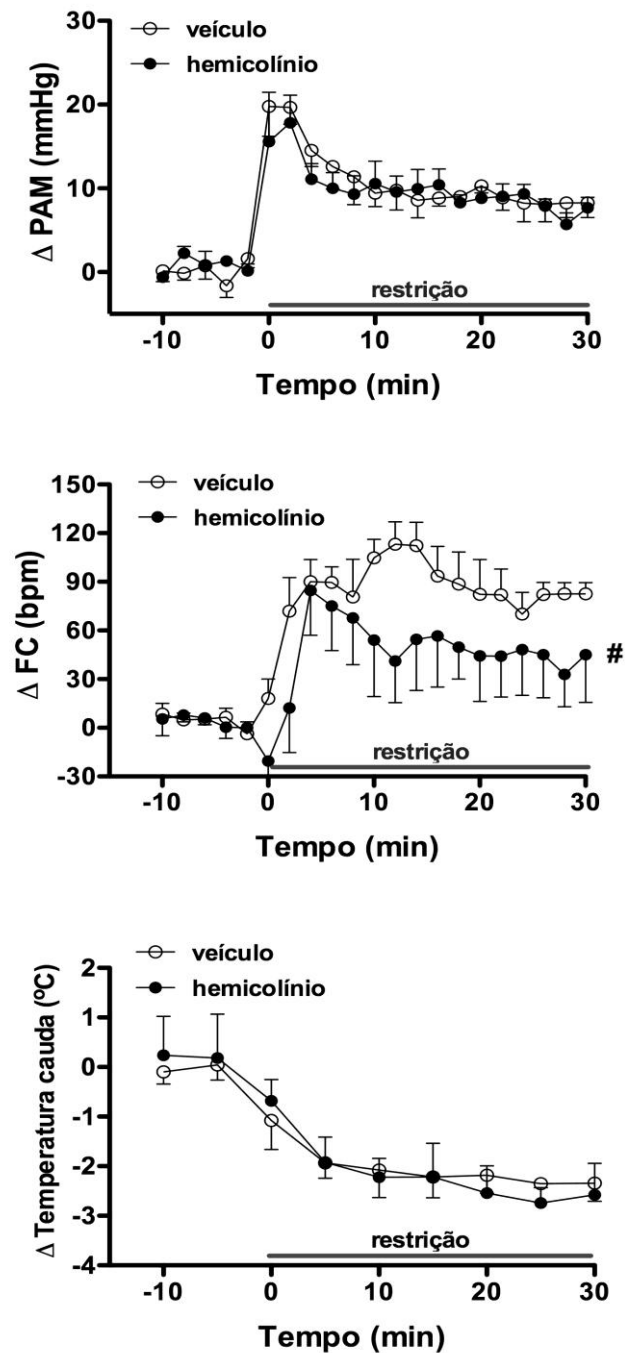


Figura 1

Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura da cauda durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no córtex PL com veículo (salina, 100nL) ou hemicolinio (2nmol/100nL), inibidor do transportador da colina. O início do estresse foi no t=0. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). Símbolo (#) indica efeito significativo do tratamento sobre a resposta durante todo o período de exposição ao estresse por restrição agudo ($P < 0.05$, ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni).

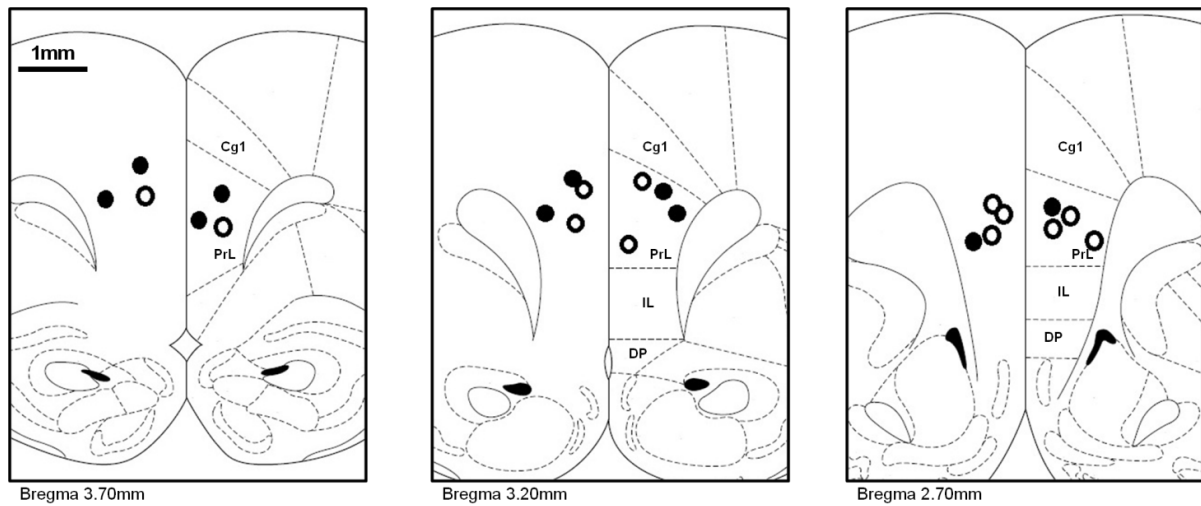


Figura 2

Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no córtex PL de veículo (círculos brancos) e hemicolínio (círculos pretos). Cg1 - córtex cingular 1; DP - córtex peduncular dorsal (DP); IL - córtex infra-límbico; PL - córtex pré-límbico.

5.2. Efeito do pré-tratamento do córtex PL com metilatropina sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.

O tratamento bilateral do córtex PL com metilatropina (3nmol/100nL, n=7), antagonista de receptores muscarínicos, não afetou os parâmetros basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda, quando comparado com os animais que receberam veículo no córtex PL (n=6) (Tabela 2). Entretanto, o estresse por restrição agudo causou uma elevação da PAM (fator tempo: $F_{(20,231)}=15$, $P<0,0001$) e FC (fator tempo: $F_{(20,231)}=9$, $P<0,0001$), que foram acompanhados de redução da temperatura cutânea da cauda (fator tempo: $F_{(8,99)}=8$, $P<0,0001$) (Figura 3). Além disso, o tratamento do córtex PL com metilatropina reduziu as respostas pressora (fator tratamento: $F_{(1,231)}=36$, $P<0,0001$) e taquicárdica (fator tratamento: $F_{(1,231)}=99$, $P<0,0001$) desencadeadas pelo estresse por restrição. A análise estatística encontrou interação entre os fatores tempo e tratamento para as medidas de FC ($F_{(20,231)}=2$, $P<0,03$), porém não para a PAM ($F_{(20,189)}=1$, $P>0,05$) (Figura 3). A resposta de redução da temperatura da cauda não foi afetada pelo bloqueio dos receptores muscarínicos presentes no córtex PL (fator tratamento: $F_{(1,89)}=0,1$, $P>0,05$) (Figura 3). Representação diagramática dos sítios de injeção no córtex PL de metilatropina e veículo de todos os animais utilizados neste estudo é apresentado na Figura 4.

Tabela 2

Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda em animais tratados bilateralmente no córtex PL com metilatropina ou veículo (salina).

Grupo	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura cutânea da cauda (°C)
Salina	106±2	365±7	27,0±0,4
Metilatropina	106±3	392±18	26,7±0,3
	<i>t=0,1; P>0.05</i>	<i>t=1,2; P>0.05</i>	<i>t=0,5; P>0.05</i>

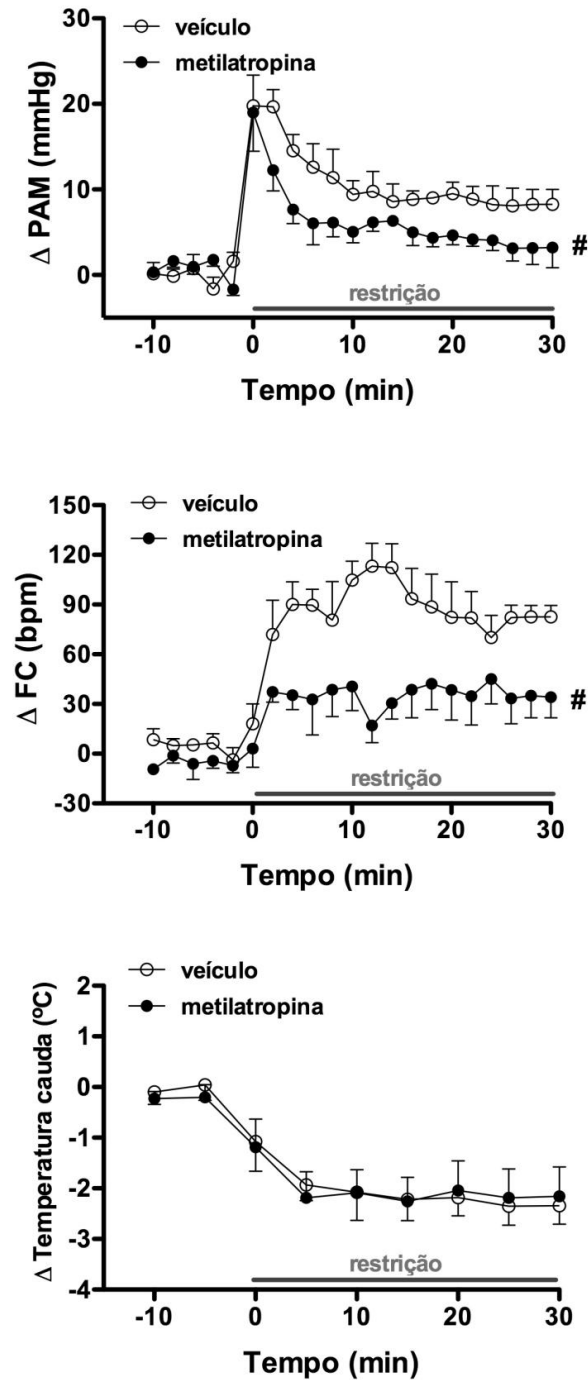
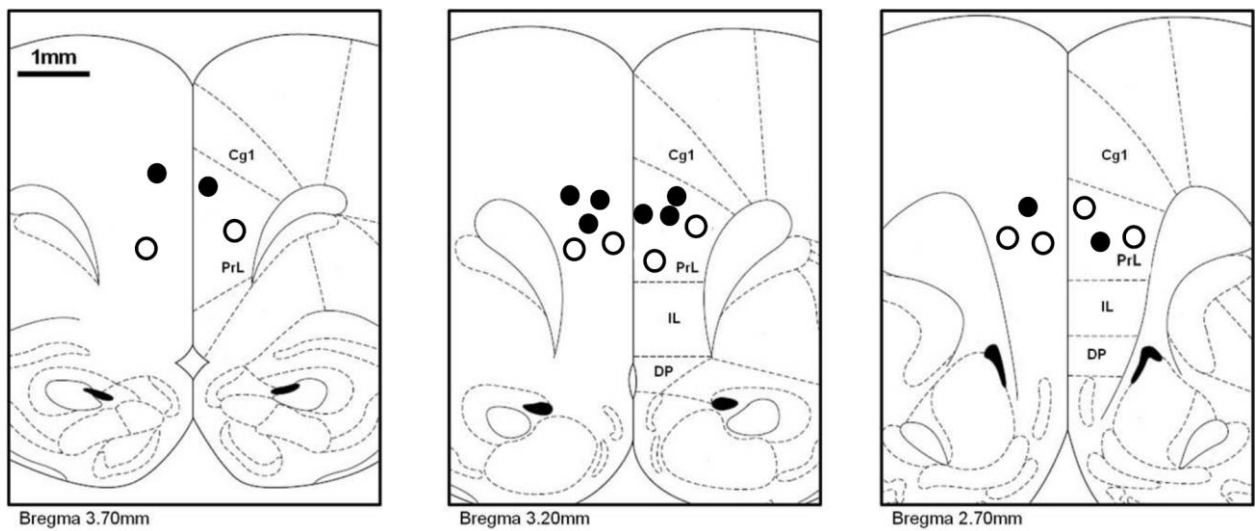


Figura 3

Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura da cauda durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no córtex PL com veículo (salina, 100nL) ou metilotropina (3nmol/100nL), antagonista de receptores muscarínicos. O início do estresse foi no t=0. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). Símbolo (#) indica efeito significativo do tratamento sobre a resposta durante todo o período de exposição ao estresse por restrição agudo ($P < 0.05$, ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni).

Figura 4

Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no córtex PL de veículo (círculos brancos) e metilfenidato (círculos pretos). Cg1 - córtex cingular 1; DP - córtex peduncular dorsal (DP); IL - córtex infra-límbico; PL - córtex pré-límbico.

6) DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que a microinjeção bilateral de hemicolínio no córtex PL reduziu a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse por restrição agudo, sem interferir com as respostas de elevação da pressão arterial e redução da temperatura cutânea da cauda. Além disso, o tratamento do córtex PL com metilatropina reduziu as respostas pressora e taquicárdica do estresse por restrição, sem interferir com a resposta de temperatura cutânea.

Estudos anteriores reportaram que a microinjeção de acetilcolina no CPFM causa acentuada hipotensão e taquicardia tanto em animais anestesiados quanto não-anestesiados (CRIPPA et al., 1999, 2000; RESSEL & CORREA, 2006). No entanto, os sítios de injeção nestes estudos centraram-se nas regiões do CPFM denominadas Cg₁ e Cg₂. Diante disso, do nosso conhecimento, os dados do presente estudo são os primeiros a indicar uma participação de mecanismos colinérgicos em regiões ventrais do CPFM no controle da função cardiovascular.

Tem sido proposto que as regiões PL e IL do CPFM possuem funções opostas no controle das respostas fisiológicas desencadeadas por estímulos aversivos (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009). Neste sentido, foi observado que o bloqueio seletivo do córtex PL aumentou as respostas cardiovasculares e a ativação do eixo HPA induzidas pelo estresse, ao passo que a inibição do córtex IL diminuiu estas respostas (FRYSZTAK & NEAFSEY, 1994; RANDLEY et al, 2006; TAVARES et al, 2009). No caso das alterações cardiovasculares, a influência inibitória do córtex PL e o efeito facilitatório do córtex IL foi evidenciado tanto nas repostas cardiovasculares desencadeadas por estímulos aversivos condicionados quanto não-condicionados (FRYSZTAK & NEAFSEY, 1994; ULRICH-LAI &

HERMAN, 2009), incluindo o estresse por restrição agudo (TAVARES et al, 2009). Vale ressaltar que o bloqueio sináptico não-seletivo do córtex PL e IL afetou somente a resposta taquicárdica ao estresse por restrição agudo, sem interferir com a elevação de pressão arterial que acompanha as respostas cardíacas (TAVARES et al, 2009).

Os resultados obtidos no presente estudo após o tratamento do córtex PL com hemicolínio evidenciaram uma influência seletiva da neurotransmissão colinérgica do córtex PL sobre a resposta cardíaca ao estresse por restrição, assim corroborando com os resultados anteriores obtidos após a inibição sináptica não-seletiva do córtex PL (TAVARES et al, 2009). Entretanto, o tratamento local do córtex PL com metilatropina reduziu tanto a resposta de elevação da FC quanto a resposta pressora desencadeada pelo estresse por restrição. Estes resultados relacionados a FC foram inesperados e sugerem que a influência facilitatória de receptores muscarínicos sobre a resposta de PA deve ser contraposta por outros mecanismos colinérgicos locais, uma vez que uma influência sobre esta resposta não foi evidenciada após a depleção dos estoques de acetilcolina causados pelo tratamento local com hemicolínio. Deste modo, futuros experimentos são necessários para testar o envolvimento de receptores colinérgicos nicotínicos do córtex PL sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição. De qualquer maneira, os resultados da metilatropina fornecem a primeira evidência de que o CPFM modula a resposta pressora induzida pelo estresse por restrição agudo.

Os nossos resultados contrastam com os dados anteriores, que observaram uma influência inibitória do córtex PL sobre a resposta cardíaca ao estresse por restrição agudo após o bloqueio sináptico não-seletivo local (TAVARES et al, 2009). Deste modo, ao contrário da nossa hipótese, nossos dados

evidenciaram uma ação facilitatória da neurotransmissão colinérgica do córtex PL nas respostas autônomas ao estresse por restrição. Deste modo, é possível que a liberação local de acetilcolina module a ação de outro(s) neurotransmissore(s) que estejam envolvidos com a influência inibitória do córtex PL nas respostas cardiovasculares ao estresse. Neste sentido, foi demonstrado o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica, através da ativação de receptores glutamatérgicos NMDA locais, na influência inibitória do córtex PL sobre a resposta taquicárdica do estresse por restrição (TAVARES & CORREA, 2006). A acetilcolina modula a liberação local de glutamato no CPFM (LIVINGSTONE et al, 2009; HUANG & HSU, 2010), além de causar depressão na transmissão sináptica excitatória no córtex PL (CARUANA et al, 2011), o que pode explicar os efeitos opostos de mecanismos glutamatérgicos e colinérgicos do córtex PL no controle das respostas autônomas ao estresse por restrição. Entretanto, futuros estudos são necessários para investigar se os efeitos observados no presente estudo decorrem de uma interação da neurotransmissão colinérgica local com outros neurotransmissores do córtex PL.

O CPFM controla a função cardiovascular através de projeções, diretas e indiretas, para núcleos autonômicos bulbares como o núcleo do trato solitário, o bulbo ventrolateral rostral e o bulbo ventrolateral caudal (OWENS et al, 1999; OWENS & VERBENE, 2000; RESSEL & CORREA, 2006). Bloqueadores simpáticos cardíacos abolem a resposta taquicárdica causada pelo estresse, ao passo que bloqueadores da atividade parassimpáticos cardíaca facilitam a resposta (BAUDRIE et al., 1997; CRESTANI et al., 2009, 2010). Estes dados sugerem uma co-ativação simpática e parassimpática cardíaca durante o estresse. A elevação da pressão arterial durante o estresse decorre de um aumento no tônus simpático vascular e ativação de adrenoreceptores α_1 na musculatura lisa vascular (BAUDRIE et

al, 1997). Foi demonstrado que a influência inibitória do córtex PL na resposta taquicárdica ao estresse por restrição decorre de um aumento na atividade parassimpática cardíaca (TAVARES & CORREA, 2006). Além disso, a estimulação química com L-glutamato das porções do CPFM identificadas como PL, IL e DP causaram elevação da FC, que foi mediada por uma ativação simpática cardíaca (RESSTEL & CORREA, 2005). Diante disso, a influência facilitatória da neurotransmissão colinérgica do córtex PL sobre a resposta taquicárdica observada durante o estresse por restrição agudo pode decorrer de uma facilitação na atividade simpática cardíaca, inibição da atividade parassimpática cardíaca, ou ambos. A influência facilitatória decorrente da ativação de receptores colinérgicos muscarínicos do córtex PL sobre a resposta pressora pode ser mediada pela ativação de vias excitatórias para núcleos simpáticos no tronco encefálico. Entretanto, este efeito parece não depender de alterações na atividade simpática vascular cutânea, uma vez que os tratamentos farmacológicos do córtex PL não afetaram a resposta de redução da temperatura cutânea.

A microinjeção bilateral no córtex PL de hemicolinio ou metilatropina não afetaram os parâmetros cardiovasculares basais. Estes dados corroboram com resultados anteriores demonstrando que a microinjeção bilateral de atropina nas regiões PL e IL do CPFM não alterou os valores basais de pressão arterial e FC (RESSTEL et al, 2005). Foi também demonstrado que a lesão ou o bloqueio químico do CPFM não interferiram com os valores cardiovasculares basais (RESSTEL & CORREA, 2006), o que indica uma ausência de influência do CPFM na manutenção tônica cardiovascular.

Em suma, contrário a nossa hipótese, os resultados obtidos no presente estudo sugerem uma influência facilitatória da neurotransmissão

colinérgica da região PL do CPFM nas respostas pressora e taquicárdica desencadeadas pelo estresse por restrição agudo. Nossos resultados contrastam com dados anteriores sugerindo uma influência inibitória do córtex PL nas respostas fisiológicas ao estresse, o que indica que o controle das respostas autônomas ao estresse pela acetilcolina no córtex PL possa ser mediada por uma modulação na ação de outros neurotransmissores locais (possivelmente a neurotransmissão glutamatérgica). O efeito sobre a resposta pressora evidenciado pelo tratamento local com metilatropina, porém não observado após a microinjeção local de hemicolínio, sugere que o controle da PA durante o estresse exercido por receptores colinérgicos muscarínicos do córtex PL deva ser contraposto por outros mecanismos colinérgicos locais. Deste modo, futuros estudos são necessário com o intuito de investigar um possível papel de receptores colinérgicos nicotínicos do córtex PL nas respostas autônomas ao estresse por restrição.

7) REFERÊNCIAS

- BARRON, B.A. e VAN LOON, G.R. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. J AutonNervSyst, v.28, n.2, Nov, p.179-87. 1989.
- BAUDRIE, V.; TULEN, J.H.; BLANC, J.; ELGHOZI, J.L. Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. JAutonPharmacol v.17, p. 303–309, 1997.
- BUSNARDO, C.; TAVARES, R.F.; CORRÊA, F.M. Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline microinjection into the supraoptic nucleus of unanesthetized rats. AutonNeurosci, v.145, n.1-2, p.63-70, 2009.
- BUSNARDO, C.; TAVARES, R.F.; RESSEL, L.B.; ELIAS, L.L. e CORREA, F.M. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. AutonNeurosci, v.158, n.1-2, Dec 8, p.51-7. 2010.
- CARUANA, D.A.; WARBURTON, E.C.; BASHIR, Z.I. Induction of activity-dependent LTD requires muscarinic receptor activation in medial prefrontal cortex. J Neurosci. v.31, n.50, p.18464-78, 2011.
- CHOI, D.C.; FURAY, A.R.; EVANSON, N.K.; OSTRANDER, M.M.; ULRICH-LAI, Y.M. e HERMAN, J.P. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. J Neurosci, v.27, n.8, p.2025-34. 2007.
- CRESTANI, C.C.; ALVES, F.H.; RESSEL, L.B.; CORRÊA, F.M. Both alpha1 and alpha2-adrenoceptors mediate the cardiovascular responses to noradrenaline microinjected into the bed nucleus of the stria terminal of rats. Br J Pharmacol., v.153, n.3, p.583-90, 2008.

- CRESTANI, C.C.; ALVES, F.H.; TAVARES, R.F. e CORREA, F.M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. Stress, v.12, n.3, p.268-78. 2009.
- CRESTANI, C.C.; TAVARES, R.F.; ALVES, F.H.; RESSEL, L.B. e CORREA, F.M. Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. Stress, v.13, n.1, p.61-72. 2010.
- CRUZ, F.C.; ENGI, S.A.; LEÃO, R.M.; PLANETA, C.S.; CRESTANI, C.C. Influence of the single or combined administration of cocaine and testosterone in autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress. J Psychopharmacol., v. 26, n.10, p.1366-74, 2012.
- CULLINAN, W.E.; HERMAN, J.P.; BATTAGLIA, D.F.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. Neuroscience., v.64, n.2, p.477-505, 1995.
- DAMPNEY, R.A.; HORIUCHI, J. e MCDOWALL, L.M. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. AutonNeurosci, v.142, n.1-2, p.3-10. 2008.
- DIOP, L., BRIERE, R., GRONDIN, L., READER, T.A. Adrenergic receptors and catecholamine distribution in rat cerebral cortex: binding studies with [3H]prazosin, [3H]idazoxan and [3H]dihydroalprenolol. Brain Res, v. 402, p.403–408, 1987.
- FERNANDES, K.B.; CRIPPA, G.E.; TAVARES, R.F.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CORRÊA, F.M. Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline injection into the cingulate cortex of unanesthetized rats. Neuropharmacology, v. 44, n.6, p.757-63, 2003.

- FIGUEIREDO, H.F.; DOLGAS, C.M.; HERMAN, J.P. Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage of estrus. Endocrinology, v.143, n.7, p.2534-40, 2002.
- FRYSZTAK RJ, NEAFSEY EJ. 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, 1994.
- GRESCH, P.J.; SVED, A.F.; ZIGMOND, M.J.; FINLAY, J.M. Local influence of endogenous norepinephrine on extracellular dopamine in rat medial prefrontal cortex. J Neurochem, v.65, p.111-6, 1995.
- GRIPPO, A.J.; JOHNSON, A.K. Stress, depression and cardiovascular dysregulation: a review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. Stress, v.12, n.1, p.1-21, 2009.
- HÄNSEL, A.; VON KÄNEL, R. The ventro-medial prefrontal cortex: a major link between the autonomic nervous system, regulation of emotion, and stress reactivity? Biopsychosoc Med, v.2, p.21, 2008.
- HARDY, S.G.; HOLMES, D.E. Prefrontal stimulus-produced hypotension in rat. Exp Brain Res, v.73, n.2, p.249-55, 1988.
- HUANG, C.C.; HSU, K.S. Activation of muscarinic acetylcholine receptors induces a nitric oxide-dependent long-term depression in rat medial prefrontal cortex. Cereb Cortex, v.20, n.4, p.982-96, 2010.
- JOELS, M. e BARAM, T.Z. The neuro-symphony of stress. Nat Rev Neurosci, v.10, n.6, Jun, p.459-66. 2009.
- KAWAHARA, Y.; KAWAHARA, H.; WESTERINK, B.H. Comparison of effects of hypotension and handling stress on the release of noradrenaline and

dopamine in the locus coeruleus and medial prefrontal cortex of the rat.

NaunynSchmiedebergs Arch Pharmacol., v.360, p. 42-9, 1999.

LIVINGSTONE, P.D.; SRINIVASAN, J.; KEW, J.N.; DAWSON, L.A.; GOTTI, C.; MORETTI, M.; SHOAIB, M.; WONNACOTT, S. $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors modulate dopamine release in vitro and in vivo in the rat prefrontal cortex. Eur J Neurosci. v.29, n.3, p.539-50, 2009.

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

MCDUGALL, S.J.; WIDDOP, R.E.; LAWRENCE, A.J. Central autonomic integration of psychological stressors: focus on cardiovascular modulation. AutonNeurosci., v.123, n.1-2, p.1-11, 2005.

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, p.1331– 1346, 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, p. 86–93, 2000.

OWENS, N.C.; VERBERNE, A.J. Regional haemodynamic responses to activation of the medial prefrontal cortex depressor region. Brain Res., v.919, p.221– 231, 2001.

RADLEY, J.J.; ARIAS, C.M.; SAWCHENKO, P.E. Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. J Neurosci., v.26, n.50, p. 12967-76, 2006.

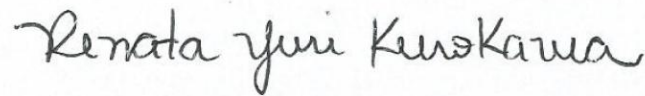
- RADLEY, J.J.; WILLIAMS, B.; SAWCHENKO, P.E. Noradrenergic innervation of the dorsal medial prefrontal cortex modulates hypothalamo-pituitary-adrenal responses to acute emotional stress. J Neurosci., v.28, n.22, p.5806-16, 2008.
- RESSTEL, L.B.; FERNANDES, K.B.; CORREA, F.M. Medial pré-frontal cortex modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. Brain Res., v.1015, p.136– 144, 2004.
- RESSTEL, L.B.; CORREA, F.M. Pressor and tachycardic responses evoked by microinjections of l-glutamate into the medial prefrontal cortex of unanaesthetized rats. Eur. J. Neurosci., v.21, p.2513– 2520, 2005.
- RESSTEL, L.B.; FERNANDES, K.B.; CORRÊA, F.M. alpha-Adrenergic and muscarinic cholinergic receptors are not involved in the modulation of the parasympathetic baroreflex by the medial prefrontal cortex in rats. Life Sci. v.77, n.13, p.1441-51, 2005.
- RESSTEL LB, CORRÊA FM. Involvement of the medial prefrontal cortex in central cardiovascular modulation in the rat. AutonNeurosci., v.126-127, p.130-8, 2006.
- SPENCER SJ, DAY TA. Role of catecholaminergic inputs to the medial prefrontal cortex in local and subcortical expression of Fos after psychological stress. J Neurosci Res. v.78, n.2, p. 279-88, 2004.
- 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, p.613– 620, 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, 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, 2009.
- ULRICH-LAI, Y.M. e HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. Nat Rev Neurosci, v.10, n.6, p.397-409. 2009.
- VERBERNE, A.J.; LEWIS, S.J.; WORLAND, P.J.; BEART, P.M.; JARROTT, B.; CHRISTIE, M.J.; LOUIS, W.J. Medial prefrontal cortical lesions modulate baroreflex sensitivity in the rat. Brain Res. 426, 243– 249, 1987.
- VERBERNE, A.J. Medullary sympathoexcitatory neurons are inhibited by activation of the medial prefrontal cortex in the rat. Am J Physiol., v.270, n4 Pt 2, p.R713-9, 1996.
- VERTES, R.P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. Synapse, v.51, p.32– 58, 2004.
- VIANNA, D.M. e 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, May, p.2505-12. 2005.
- VIDAL-GONZALEZ, I.; VIDAL-GONZALEZ, B.; RAUCH, S.L.; QUIRK, G.J. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. Learn Mem., v.13, n.6, p.728-33, 2006.
- ZILLES, K.; WREE, A. Cortex: area and laminar structure. In: Paxinos, G. (Ed.), The Rat Nervous System. Academic Press, New York, pp. 649– 685, 1985.

De acordo,



Orientador: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani



Aluna: Renata Yuri Kurokawa

Araraquara, 10 de janeiro de 2014.