

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TACIANA RESENDE SIQUEIRA POLLO

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA DO
CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL NAS RESPOSTAS AUTONÔMICAS
DESENCADEADAS PELO ESTRESSE POR RESTRIÇÃO AGUDO EM RATOS.**

Araraquara
2013

TACIANA RESENDE SIQUEIRA POLLO

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA DO
CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL NAS RESPOSTAS AUTONÔMICAS
DESENCADEADAS PELO ESTRESSE POR RESTRIÇÃO AGUDO EM RATOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica

Orientador : Prof. Dr. Carlos César Crestani

Co-orientadora: Josiane de Oliveira Duarte

Araraquara
2013

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Carlos César Crestani pelo papel desempenhado com muita dedicação e paciência durante todo o estágio de iniciação científica, sua empolgação e motivação pelo trabalho que exerce, sendo responsável pela minha admiração pessoal a área acadêmica e pelo meu desempenho na iniciação científica.

À minha co-orientadora e amiga Josiane Duarte pela atenção especial dispendida durante todo esse período para meu aprendizado, ao querido Tarciso Miguel que nos ajudou a vencer os obstáculos. As técnicas de laboratório Elisabete Zocal Paro Lepera e Rosana Finoti Pupim Silva que foram responsáveis por todo meu desenvolvimento dentro de um laboratório. Aos meus pais Carlos Augusto Pollo e Maria Cecília Resende Siqueira Pollo pelo apoio durante toda a minha graduação e em todos os meus desafios, tornando mais fácil a conclusão do curso.

Aos meus irmãos e amigos que durante todos esses anos direta ou indiretamente influenciaram na condução e concepção desse trabalho, em especial, Ana Paula Carrillo Trindade de Ávila, Cínthia Yuka Satake, Helen Martins, Larissa Almeida e Paulo Vinícius de Oliveira.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	07
2.OBJETIVO.....	11
3.METODOLOGIA.....	12
3.1 – Animais.....	12
3.2 – Técnica de implante de cânulas guias no sistema nervoso central.....	12
3.3 – Canulação da artéria femoral.....	13
3.4 – Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	14
3.5 – Drogas utilizadas.....	14
3.6 – Registro da temperatura cutânea da cauda.....	15
3.7 – Estresse por restrição agudo.....	15
3.8 – Microinjeção de drogas no córtex IL.....	15
3.9 – Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas.....	15
3.10 – Análise estatística.....	16
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	17
5. RESULTADOS.....	18
5.1- Efeito do pré-tratamento do córtex IL com WB4101 sobre as respostas autonômicas ao estresse por restrição agudo em ratos.....	18
5.2- Efeito do pré-tratamento do córtex IL com RX821002 sobre as respostas autonômicas ao estresse por restrição agudo em ratos.....	20
5.3- Efeito do pré-tratamento do córtex IL com propranolol sobre as respostas autonômicas ao estresse por restrição agudo em ratos.....	22
6. DISCUSSÃO.....	25
7. CONCLUSÕES.....	29
8. REFERÊNCIAS.....	30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.....	19
FIGURA 2.....	20
FIGURA 3.....	21
FIGURA 4.....	22
FIGURA 5.....	24
FIGURA 6.....	25

RESUMO

O córtex pré-frontal medial (CPFM) é uma região límbica envolvida no controle da atividade autonômica e cardiovascular. Foi demonstrado que a inibição da região infra-límbica (IL) do CPFM reduziu as repostas comportamentais, neuroendócrinas e autônomas induzidas por estímulos aversivos. Entretanto, apesar das evidências de um importante papel do córtex IL na integração das respostas ao estresse, informações sobre os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos no controle destas respostas ainda são escassos. Diante disso, o presente estudo teve o objetivo de investigar um possível envolvimento de mecanismos noradrenérgicos do córtex IL nas respostas autonômicas ao estresse por restrição agudo em ratos. Para tanto, nós investigamos, em grupos independentes de animais, o efeito da microinjeção bilateral no córtex IL de veículo (salina, 100nL), WB4101 (antagonista seletivo de adrenoreceptores α_1), RX821002 (antagonista seletivo de adrenoreceptores α_2) e propranolol (antagonista não-seletivo de adrenoreceptores β , 10nmol/100nL), 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 microinjeção bilateral de WB4101, RX821002 e propranolol no córtex IL não afetou os parâmetros basais de PA, FC e temperatura cutânea da cauda, o que indica uma ausência de influência na manutenção tônica do sistema cardiovascular. Entretanto, o bloqueio de adrenoreceptores α_1 no córtex IL diminuiu a resposta taquicárdica induzida pelo estresse por restrição, sem afetar as respostas pressora e de redução da temperatura cutânea da cauda. O bloqueio de adrenoreceptores α_2 no córtex IL reduziu todos os parâmetros analisados e o bloqueio de adrenoreceptores β no córtex IL atenuou a resposta de redução da temperatura cutânea induzida pelo estresse por restrição. As respostas de elevação da PA e FC

não foram afetadas pelo tratamento com propranolol. Em suma, os nossos resultados indicam um envolvimento de adrenoreceptores α_2 no córtex IL na resposta pressora do estresse por restrição agudo, ao passo que a resposta taquicárdica parece ser mediada pela coativação de adrenoreceptores α_1 e α_2 na mesma região. Os dados do presente estudo fornecem ainda evidência do envolvimento de adrenoreceptores α e β do córtex IL na resposta de vasoconstrição cutânea desencadeada pelo estresse por restrição agudo.

1. INTRODUÇÃO

Estudos têm apontado correlação positiva entre o nível de estresse e a incidência de patologias cardiovasculares e psiquiátricas (Grippe & Johnson, 2009). A sobrevivência e a adaptação de todas as espécies a situações de estresse requer um adequado e coordenado conjunto de respostas fisiológicas (Ulrich-Lai & Herman, 2009). A manutenção da homeostasia durante situações aversivas requer a 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 alteração na atividade do barorreflexo (Barron & Van Loon, 1989; Dampney, et al, 2008; Crestani et al, 2010). A vasoconstrição cutânea causa redução na temperatura da pele 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 (Cg₁) e 2 (Cg₂), córtex pré-límbico (PL), córtex infra-límbico (IL) e córtex peduncular dorsal (PD) (Zilles & Wree, 1985). Há na

literatura numerosas evidências sugerindo a participação da porção ventral do CPFM (CPFMv) na modulação do sistema cardiovascular (Hardyand Holmes, 1988; Ressteland Correa, 2006; 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, na qual foi acompanhada por redução na atividade do nervo simpático esplânico e aumento do fluxo sanguíneo nos leitos renal, mesentérico e ilíaco (Verberne, 1996; Owens and Verberne, 2001). Por outro lado, aumento na pressão arterial foi observada após a ativação do CPFMv de ratos não-anestesiados (Ressteland Correa, 2005; Tavares et al., 2004). Além disso, um envolvimento do CPFM nas respostas cardíacas do barorreflexo tem sido demonstrado (Verberne et al, 1987; Resstel 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 (Ressteland 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 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; Resstel & Correa, 2006; Vidal-Gonzalez et al, 2006; Ulrich-Lai& Herman, 2009). Estudos tem demonstrado 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 (Fryszak & Neafsey, 1994; Randley et al, 2006; Vidal-Gonzalez et al, 2006; Tavares et al, 2009). Baseado nestas evidências, tem sido proposto uma regionalização no controle exercido pelo CPFM das respostas ao estresse, com a ativação do córtex PL conferindo inibição e o córtex IL tendo uma função facilitatória sobre as respostas à estímulos aversivos (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 noradrenérgica é um importante mecanismo neuroquímico envolvido no controle das respostas induzidas pelo estresse emocional em várias estruturas límbicas (Crestani et al, 2009; Joels & Baram, 2009). Noradrenalina e adrenoceptores foram identificados em várias regiões corticais, incluindo o córtex pré-frontal (Diop et al, 1987). A microinjeção de noradrenalina no CPFM causou alterações cardiovasculares caracterizadas por aumento na pressão arterial e bradicardia (Fernandes et al, 2003). Estímulos aversivos aumentaram os níveis extracelulares de noradrenalina no CPFM (Gresch et al, 1995; Kawahara et al, 1999). Foi demonstrado que a lesão de terminais catecolaminérgicos no CPFM inibiu a ativação neuronal local induzida pelo estresse, bem como a de outras estruturas sub-corticais envolvidas no controle de respostas fisiológicas e comportamentais durante situações aversivas (Spencer & Day, 2004). Além disso, a ablação de terminais noradrenérgicos do CPFM atenuou a ativação do eixo HPA induzida por um estímulo aversivo (Randley et al, 2008). Entretanto,

apesar das evidências acima indicarem um envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do CPFM no controle da atividade cardiovascular, e de estudos indicarem que mecanismos noradrenérgicos no CPFM são ativados durante o estresse e modulam as respostas neuroendócrinas durante situações aversivas, em nossa busca na literatura nós não encontramos evidências acerca do envolvimento de adrenoreceptores do CPFM nas respostas autônomas 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, no presente estudo nós nos propomos a testar a hipótese de que a neurotransmissão noradrenérgica no córtex IL tem uma função facilitatória 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 noradrenérgica do córtex IL nas respostas autônomas observadas durante o estresse por restrição agudo em ratos. Para tanto, o objetivo específico foi:

1) Estudar o efeito da microinjeção bilateral no córtex IL de WB4101, antagonista seletivo de adrenoreceptores α_1 , nas 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 IL de RX821002, antagonista seletivo de adrenoreceptores α_2 , nas 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) Estudar o efeito da microinjeção bilateral no córtex IL de propranolol, antagonista não-seletivo de adrenoreceptores β , nas 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. METODOLOGIA

3.1- Animais

Foram utilizados ratos Wistar de peso corporal variando entre 240-270g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UNESP (Botucatu/SP). Os animais tiveram acesso livre a ração granulada e água e foram submetidos à alternância de luz (12h claro/ 12h escuro). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-UNESP (protocolo: CEP/FCF/CAr. 10/2012).

3.2-Técnica de implante de cânulas guias no sistema nervoso central

Cinco dias antes dos experimentos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, 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 infra-límbico (IL)

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

Lateral: + 2,7 mm a partir do bregma;

Ventral = -3,2 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 (26x0,6 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 o animal recebeu 0,2 mL de pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) pela via subcutânea.

3.3-Canulação da artéria femoral

Vinte e quatro horas antes dos experimentos, os animais foram anestesiados com tribomoetanol (250 mg/kg, intraperitoneal) para implantação de cateteres na artéria femoral. Este vaso foi dissecado e um cateter de polietileno foi introduzido até a artéria aorta abdominal inferior. Os cateteres foram 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 implantação

dos cateteres, os mesmos foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica.

O cateter da artéria femoral foi utilizado para registro da pressão arterial e frequência cardíaca. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro dos parâmetros cardiovasculares.

3.4-Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

Antes do início dos registros, 0,1 ml de solução salina com heparina (15 U/ml) foi injetada no interior dos cateteres para desobstrução dos mesmos. O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., EUA). 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), usando um programa apropriado (Lab Chart PRO, ADInstruments, Austrália). Os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos a partir dos sinais da pressão arterial pulsátil.

3.5- Drogas utilizadas

O WB4101 (antagonista seletivo de adrenoreceptores α_1) (Tocris, EUA), RX821002 (antagonista seletivo de adrenoreceptores α_2) (Tocris, EUA), propranolol (antagonista não-seletivo de adrenoreceptores β) (Sigma-Aldrich, EUA), 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) serão utilizados como fornecido pelos fabricantes.

3.6- Registro da temperatura cutânea da cauda

Os registros da temperatura cutânea da cauda foram feitos por um termovisor (IRI4010, Inglaterra). A análise foi realizada através de um software para análise termográfica, e a temperatura foi representada por variações de intensidade de cor (VIANNA e CARRIVE, 2005). 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.

3.7- Estresse por restrição agudo

O estresse por restrição agudo consiste na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro = 6,5 cm, comprimento = 15 cm, ventilados por aberturas de ½ polegada que preencham aproximadamente 20% do tubo), por um período de 30 min (CHOI, *et al.*, 2007, CRESTANI, *et al.*, 2010). Cada animal foi submetido a apenas uma sessão de restrição para evitar habituação.

3.8-Microinjeção de drogas no córtex IL

As drogas administradas foram dissolvidas em salina (NaCl 0,9%). As agulhas injetoras (33 G, Small Parts, EUA) que foram utilizadas para microinjeção das drogas no SNC foram um milímetro (mm) mais longa do que as cânulas guias fixada ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2 µl (7002KH, Hamilton, EUA). As drogas foram injetadas no volume de 100nL (Tavares et al, 2009).

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% no local

da microinjeção da droga. 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 encéfalos foram retirados da caixa craniana e pós-fixados na respectiva solução de perfusão. Os encéfalos 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- Análise estatística

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 IL, e mantidos em recuperação por quatro 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 um período de no mínimo 60 minutos antes do início dos 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. Em seguida, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais no córtex IL de veículo (salina) (100nL, n=7), WB4101 (antagonista de adrenoceptores α_1) (10nmol/100nl, n=6), RX821002 (antagonista de adrenoceptores α_2) (10nmol/100nl, n=6) ou propranolol (antagonista de adrenoceptores β) (10 nmol/100nL, n=6). As doses foram selecionadas baseadas em estudos anteriores do nosso grupo (Crestani et al, 2008, 2009; Busnardo et al, 2009). Dez minutos após o tratamento farmacológico do córtex IL, os animais foram submetidos a uma sessão de 30 minutos de estresse por restrição agudo.

O registro de pressão arterial e frequência cardíaca foram iniciados 30 minutos antes do início da restrição, e foram realizados durante todo o período de restrição. A temperatura cutânea da cauda foi medida aos 10, 5 e 0 minutos antes da restrição, e a cada 5 minutos durante a restrição.

5. RESULTADOS

5.1 - Efeito do tratamento do córtex IL com WB4101 sobre as respostas autonômicas ao estresse por restrição agudo em ratos.

O tratamento bilateral do córtex IL com WB4101 (antagonista seletivo de adrenoreceptores α_1 (10nmol/100nL, n=6) não afetou os parâmetros basais de PAM (107 ± 4 vs 105 ± 3 mmHg; $t=0,40$, $P>0.05$), FC (369 ± 8 vs 396 ± 11 bpm; $t=1,9$, $P>0.05$) e temperatura cutânea da cauda ($28,2 \pm 0,8$ vs $27,9 \pm 0,6$ °C; $t=0,3$, $P>0.05$), quando comparado aos animais tratados com veículo no córtex IL (100nL, n=7). O estresse por restrição agudo causou elevação da PAM (fator tempo: $F_{(20,231)}=14$, $P<0.0001$) e FC (fator tempo: $F_{(20,231)}=6$, $P<0.0001$) e redução da temperatura cutânea da cauda (fator tempo: $F_{(8,99)}=9$, $P<0.0001$) (Figura 1). O tratamento do córtex IL com WB4101 reduziu a resposta de aumento da FC desencadeada pelo estresse por restrição (fator tratamento: $F_{(1,231)}=21$, $P<0.0001$), porém a análise estatística não encontrou interação entre os fatores tempo e tratamento ($F_{(20,231)}=0,6$, $P>0.05$) (Figura 1). As respostas pressora (fator tratamento: $F_{(1,231)}=0,9$, $P>0.05$) e de redução da temperatura cutânea da cauda (fator tratamento: $F_{(1,99)}=0,2$, $P>0.05$) não foram afetadas pelo bloqueio de receptores α_1 no córtex IL (Figura 1). Representação diagramática dos sítios de injeção no córtex IL de WB4101 e veículo de todos os animais utilizados neste estudo é apresentado na Figura 2.

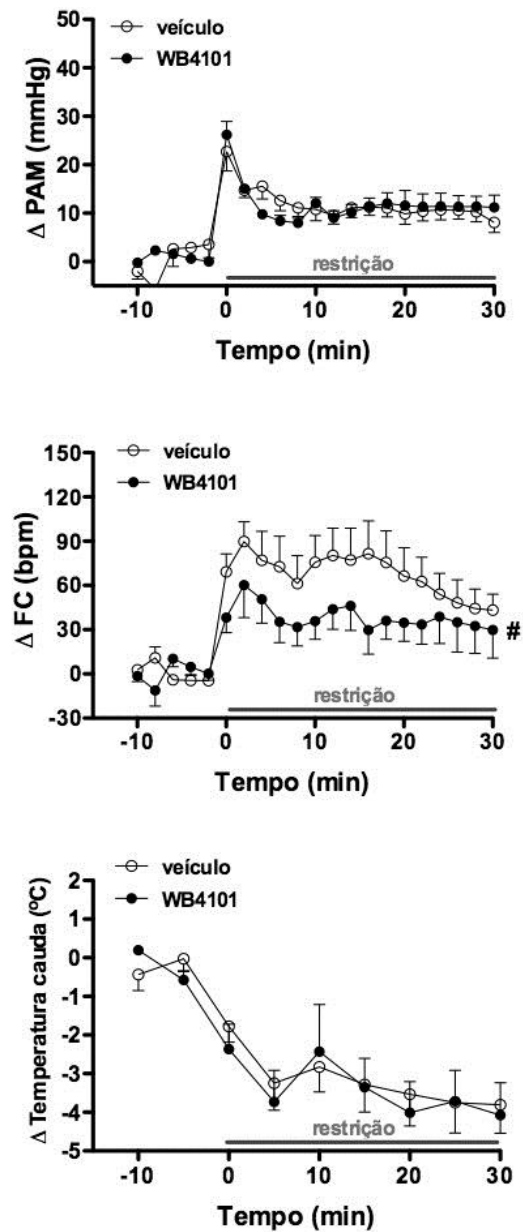


Figura 1

Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no córtex IL com veículo (salina, 100nL, n=7) ou WB4101 (antagonista seletivo de adrenoreceptores α_1 , 10 nmol/100nL, n=6). O início do estresse foi no t=0. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). Asterisco 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).

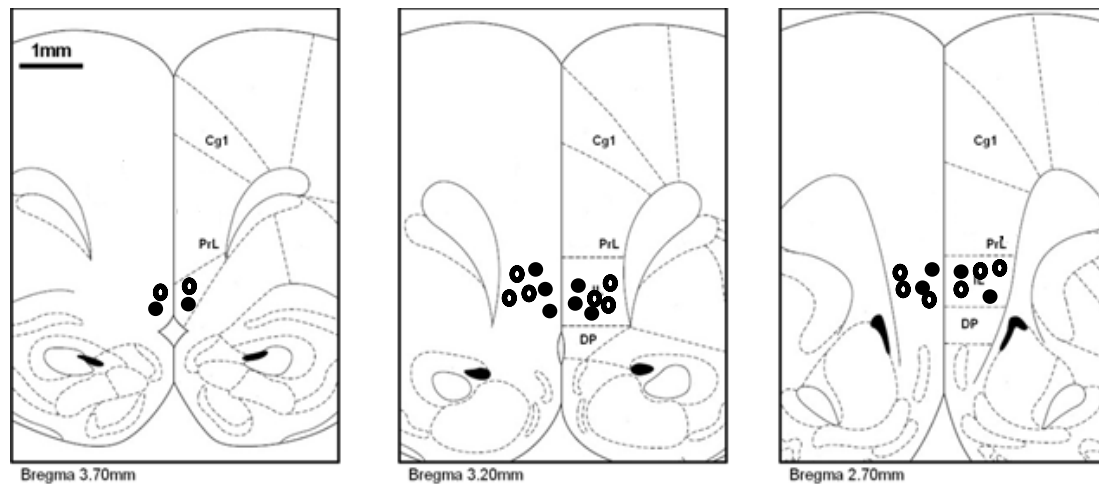


Figura 2

Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no córtex IL de veículo (círculos brancos) e WB4101 (círculos pretos). Cg1 - córtex cingular 1; DP - córtex peduncular dorsal (DP); IL - córtex infra-límbico; PL - córtex pré-límbico.

5.2 - Efeito do tratamento do córtex IL com RX821002 sobre as respostas autonômicas ao estresse por restrição agudo em ratos.

O tratamento bilateral do córtex IL com RX821002 (antagonista seletivo de adrenoreceptores α_2) (10 nmol/100nL, n=6) não afetou os parâmetros basais de PAM (107 ± 4 vs 108 ± 3 mmHg; $t=0,15$, $P>0.05$), FC (369 ± 8 vs 361 ± 3 bpm; $t=0,8$, $P>0.05$) e temperatura cutânea da cauda ($28,2 \pm 0,8$ vs $27,4 \pm 0,3$ °C; $t=0,7$, $P>0.05$), quando comparado aos animais tratados com veículo no córtex IL (100nL, n=7). O estresse por restrição agudo causou elevação da PAM (fator tempo: $F_{(20,231)}=6$, $P<0.0001$) e FC (fator tempo: $F_{(20,231)}=3$, $P<0.0001$) e redução da temperatura cutânea da cauda (fator tempo: $F_{(8,99)}=6$, $P<0.0001$) (Figura 3). O tratamento do córtex IL com RX821002 reduziu as respostas pressora (fator tratamento: $F_{(1,231)}=119$, $P<0.0001$), taquicárdica (fator tratamento: $F_{(1,231)}=141$, $P<0.0001$) e de redução da temperatura cutânea da cauda (fator tratamento: $F_{(1,99)}=42$, $P<0.0001$) (Figura 3). A análise indicou interação entre os fatores para as medidas de PAM ($F_{(20,231)}=3$, $P<0.0008$) e FC ($F_{(20,231)}=3$, $P<0.0006$), mas não para a temperatura

cutânea ($F_{(8,99)}=1,6$, $P>0.05$). Representação diagramática dos sítios de injeção no córtex IL de propranolol e veículo de todos os animais utilizados neste estudo é apresentado na Figura 4.

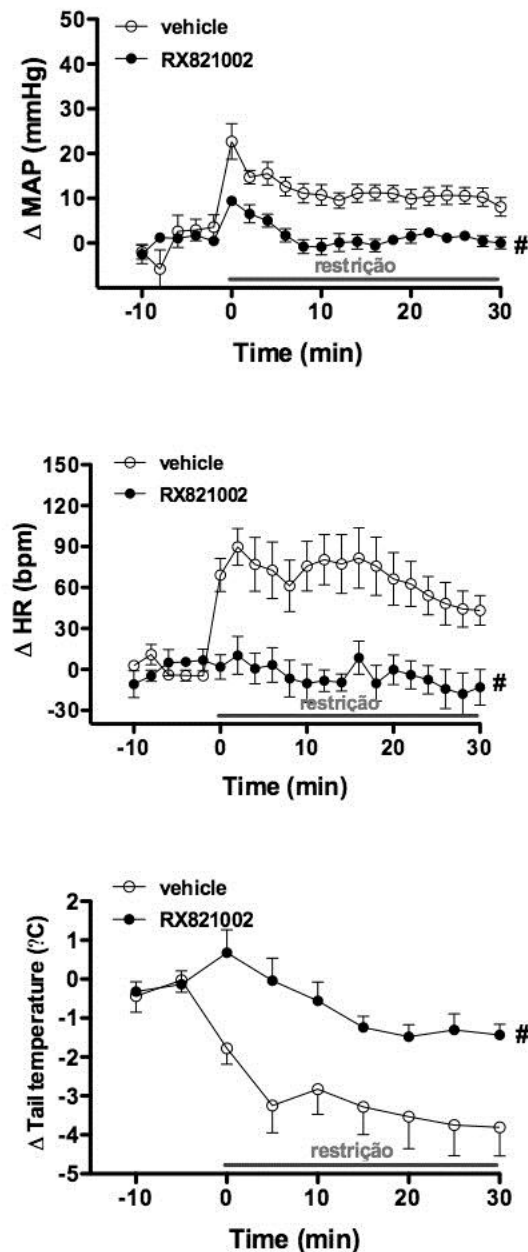


Figura 3

Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no córtex IL com veículo (salina, 100nL, n=7) ou RX821002 (antagonista seletivo de adrenoreceptores α_2 , 10 nmol/100nL, n=6). O início do estresse foi no t=0. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). Asterisco 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)

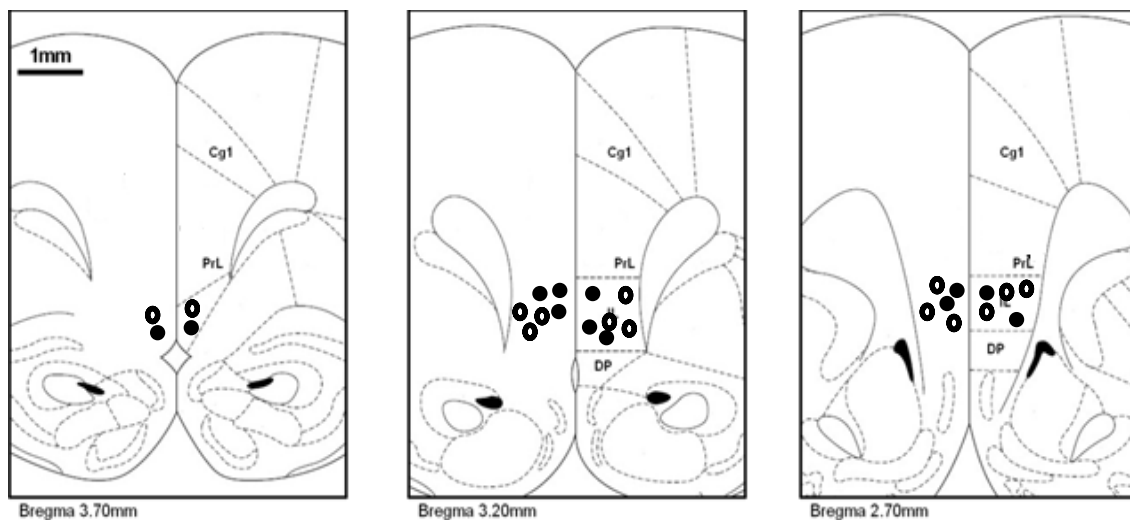


Figura 4

Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no córtex IL de veículo (círculos brancos) e RX821002 (círculos pretos). Cg1 - córtex cingular 1; DP - córtex peduncular dorsal (DP); IL- córtex infra-límbico; PL - córtex pré-límbico

5.3 - Efeito do pré-tratamento do córtex IL com propranolol sobre as respostas autonômicas ao estresse por restrição agudo em ratos.

O tratamento bilateral do córtex IL com propranolol (antagonista não-seletivo de adrenoreceptores β) (10 nmol/100nL, n=6) não afetou os parâmetros basais de PAM (107 ± 4 vs 108 ± 3 mmHg; $t=0,15$, $P>0.05$), FC (369 ± 8 vs 361 ± 3 bpm; $t=0,8$, $P>0.05$) e temperatura cutânea da cauda ($28,2 \pm 0,8$ vs $27,4 \pm 0,3$ °C; $t=0,7$, $P>0.05$), quando comparado aos animais tratados com veículo no córtex IL (100nL, n=7). O estresse por restrição agudo causou elevação da PAM (fator tempo: $F_{(20,231)}=14$, $P<0.0001$) e FC (fator tempo: $F_{(20,231)}=9$, $P<0.0001$) e redução da temperatura cutânea da cauda (fator tempo: $F_{(8,99)}=11$, $P<0.0001$) (Figura 5). O tratamento do córtex IL com propranolol reduziu a resposta de redução da temperatura cutânea da cauda desencadeada pelo estresse por restrição (fator tratamento: $F_{(1,99)}=26$, $P<0.0001$), porém a análise estatística não encontrou interação entre os fatores tempo e tratamento ($F_{(8,99)}=1,5$, $P>0.05$) (Figura 5). As

respostas pressora (fator tratamento: $F_{(1,231)}=3$, $P>0.05$) e taquicárdica (fator tratamento: $F_{(1,231)}=1$, $P>0.05$) não foram afetadas pelo bloqueio de receptores β no córtex IL (Figura 5). Representação diagramática dos sítios de injeção no córtex IL de propranolol e veículo de todos os animais utilizados neste estudo é apresentado na Figura 6.

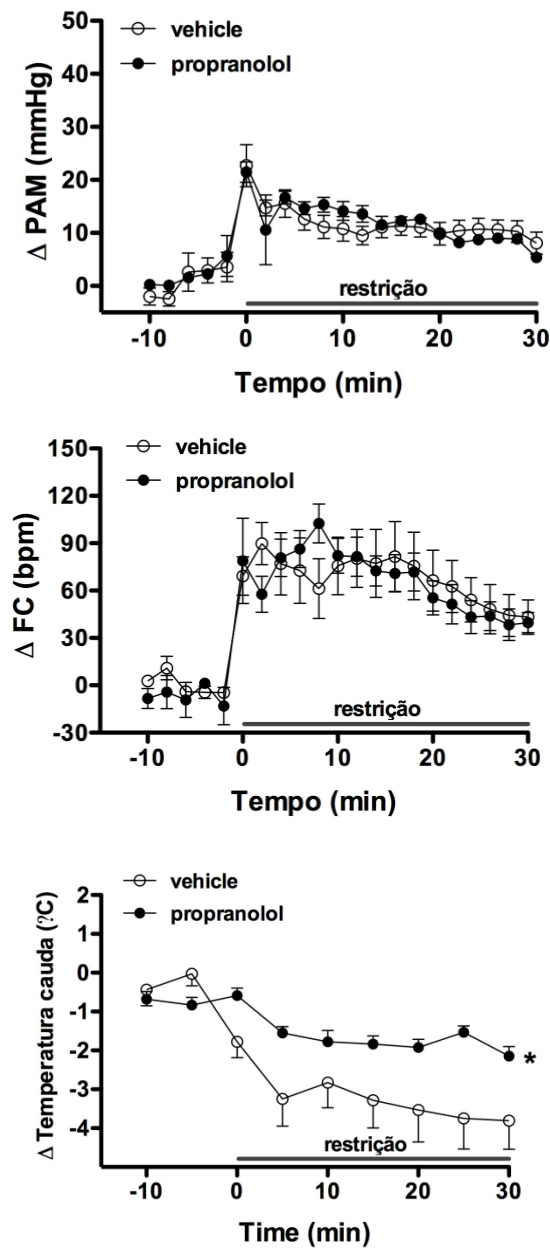


Figura 5

Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no córtex IL com veículo (salina, 100nL, n=7) ou propranolol (antagonista não-seletivo de adrenoreceptores β , 10 nmol/100nL, n=6). O início do estresse foi no t=0. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). Asterisco 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).

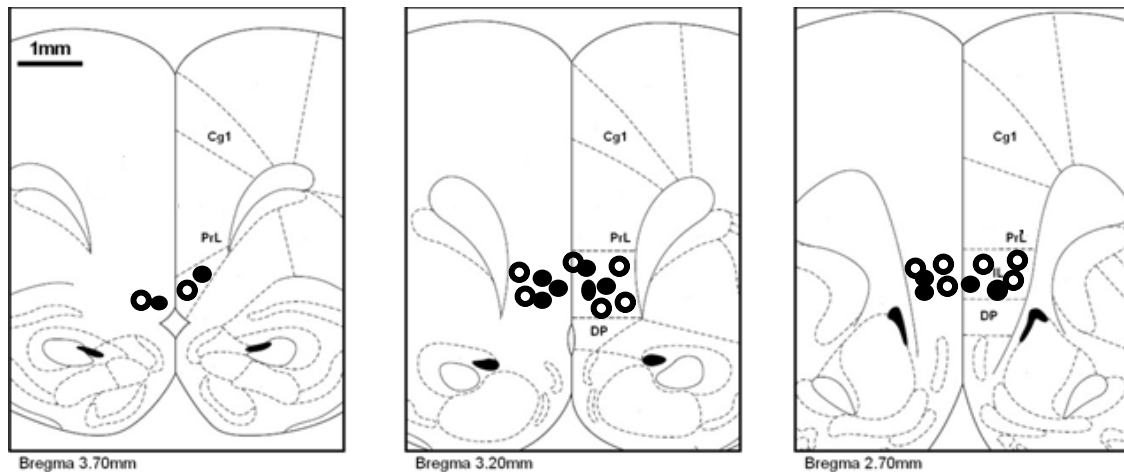


Figura 6

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

6. DISCUSSÃO

O estresse por restrição é um estímulo aversivo inevitável e não-condicionado conhecido por provocar alterações autonômicas (elevação da PA e FC, redistribuição do fluxo sanguíneo e modulação da atividade barorreflexa), neuroendócrinas (ativação do eixo HPA) e comportamentais (redução na exploração dos braços abertos no labirinto em cruz elevado) (BARRON e VAN LOON 1989; IRVINE et al. 1997; MCDUGALL *et al.* 2000; CHOI *et al.*, 2007; CRESTANI *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2011). Assim, conforme esperado, observamos elevação da PAM e FC e redução da temperatura cutânea da cauda durante uma sessão aguda de contenção.

Diversos estudos tem demonstrado que núcleos diretamente conectados com o CPFM, tais como o núcleo leito da estria terminal (NLET), a amígdala e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), estão envolvidos nas respostas autônomas desencadeadas pelo estresse por restrição (SALOMÉ *et al.*, 2007; CRESTANI et al, 2009; FORTALEZA et al, 2009; BUSNARDO *et al.*, 2010). Em

relação ao CPFM, foi demonstrado que bloqueio sináptico não-seletivo do córtex IL reduziu a resposta de FC do estresse por restrição sem afetar a resposta pressora, ao passo que a inibição do córtex PL teve efeitos opostos sobre a resposta taquicárdica (TAVARES e CORREA 2006; Tavares et al, 2009). Baseado nestes resultados, e em outros estudos que investigaram o papel do CPFM no controle das respostas comportamentais e neuroendócrinas ao estresse (Fryszak & Neafsey, 1994; Randley et al, 2006), tem sido proposto que as regiões PL e IL do CPFM possuem funções opostas no controle das respostas a estímulos aversivos, sendo o córtex PL uma região inibitória e o córtex IL uma região facilitatória no controle das respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse (Ulrich-Lai & Herman, 2009).

Apesar dos resultados apresentados acima forneceram evidências de um papel facilitatório do córtex IL nas respostas autonômicas associadas ao estresse, os possíveis neurotransmissores locais envolvidos neste controle ainda não foram completamente elucidados. Para testar uma possível participação da neurotransmissão noradrenérgica local no controle das respostas autonômicas ao estresse pelo córtex IL, nós microinjetamos WB4101, RX821002 e propranolol bilateralmente no córtex IL antes da exposição dos ratos ao tubo de contenção, com o intuito de bloquear os adrenocetores α_1 , α_2 e β locais, respectivamente. O tratamento com WB4101 não afetou as respostas de elevação da PA e redução da temperatura cutânea da cauda. No entanto, o bloqueio de adrenocetores α_1 no córtex IL reduziu a resposta de aumento da FC induzida pelo estresse por restrição. O tratamento com RX821002 reduziu todas as respostas investigadas. O tratamento com propranolol não afetou as repostas de elevação da PA e FC. No entanto, o bloqueio de adrenocetores β no córtex IL reduziu a resposta de redução da temperatura cutânea da cauda induzida pelo estresse por restrição. Os nossos

dados corroboram as evidências anteriores indicando um papel facilitatório do córtex IL nas respostas ao estresse, e sugerem um envolvimento de mecanismos noradrenérgicos locais. A resposta de vasoconstrição cutânea induzida pelo estresse por restrição envolve a coativação de adrenoreceptores α e β do córtex IL. Vale ressaltar que os estudos anteriores avaliaram o papel das regiões PL e IL do CPFM somente no controle das respostas de PA e FC ao estresse por restrição, sendo os resultados do presente estudo os primeiros a demonstrar um papel do CPFM na resposta de temperatura cutânea. Os resultados apresentados no presente estudo evidenciam ainda que a resposta pressora ao estresse por restrição é mediada pela ativação de adrenoreceptores α_2 do córtex IL, ao passo que a ativação de adrenoreceptores α_1 e α_2 estão envolvidos na resposta taquicárdica.

O CPFM controla a função cardiovascular através de projeções, diretas e indiretas, para núcleos autonômicos bulbares, que incluem: o núcleo do trato solitário, o bulbo ventrolateral rostral e o bulbo ventrolateral caudal (Owens et al, 1999; Owens & Verberne, 2000; Resstel & Correa, 2006). Estudos tem sugerido uma co-ativação simpática e parassimpática cardíaca durante situações aversivas (Baudrie et al., 1997; Carrive, 2006). Neste sentido, foi demonstrado que bloqueadores simpáticos cardíacos abolem a resposta taquicárdica causada pelo estresse, ao passo que o bloqueio parassimpático cardíaco facilita esta resposta durante situações aversivas (Baudrie et al., 1997; Carrive, 2006; Crestani et al., 2009, 2010). A elevação da pressão arterial e a redução no fluxo sanguíneo cutâneo durante o estresse decorrem de um aumento no tônus simpático vascular e ativação de adrenoreceptores α_1 na musculatura lisa vascular (Baudrie et al, 1997; Blessing, 2003). Apesar do pequeno número de trabalhos na literatura relatando o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do córtex IL no controle da

função cardiovascular, foi demonstrado que a estimulação química com L-glutamato das porções do CPFM identificadas como PL, IL e DP causou elevação da pressão arterial, na qual foi mediada por elevação da FC decorrente de uma ativação simpática cardíaca (Resstel & Correa, 2005). Uma ativação simpática vascular, com consequente elevação da pressão arterial, também foi evidenciada após a estimulação elétrica do CPFM (Tavares et al, 2004). Além disso, foi demonstrado que o controle pelo CPFM da resposta taquicárdica causada pelo estresse por restrição agudo foi mediado por uma modulação da atividade parassimpática cardíaca (Tavares & Correa, 2006). Diante disso, a influência facilitatória da neurotransmissão noradrenérgica do córtex IL 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. Os efeitos sobre a pressão arterial evidenciados podem decorrer de um aumento na atividade simpática vascular, como evidenciada pelo efeito na temperatura cutânea vascular (medida indireta da vasoconstrição dos leitos vasculares cutâneos), ou da influência sobre a FC.

A microinjeção bilateral no córtex IL de antagonistas de adrenoceptores não afetou os parâmetros cardiovasculares basais. Estes dados corroboram resultados anteriores demonstrando que a microinjeção bilateral de antagonistas de adrenoceptores α nas regiões PL e IL do CPFM não alteraram 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.

Estudos anteriores reportaram que a microinjeção de noradrenalina no CPFM causa elevação na PA e redução da FC (Fernandes et al, 2003). No entanto, os sítios de injeção nestes estudos centraram-se na região PL do CPFM. Diante disso, do nosso conhecimento, os dados do presente estudo são os primeiros a indicar uma participação de mecanismos noradrenérgicos do córtex IL no controle da função cardiovascular.

7. CONCLUSÕES

Os nossos resultados indicam um envolvimento de adrenocetores α_2 no córtex IL na resposta pressora do estresse por restrição agudo, ao passo que a resposta taquicárdica do estresse por restrição é mediada pela coativação de adrenocetores α_1 e α_2 na mesma região. Os dados do presente estudo fornecem ainda evidência do envolvimento de adrenocetores α e β do córtex IL na resposta de vasoconstrição cutânea desencadeada pelo estresse por restrição agudo.

8. REFERÊNCIAS

- (1) BARRON, B.A. e VAN LOON, G.R. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. *J Auton Nerv Syst*, v.28, n.2, Nov, p.179-87. 1989.
- (2) BUSNARDO, C.; TAVARES, R.F.; CORRÊA, F.M. Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline microinjection into the supraoptic nucleus of unanesthetized rats. *Auton Neurosci*, v.145, n.1-2, p.63-70, 2009.
- (3) BUSNARDO, C.; TAVARES, R.F.; RESSTEL, L.B.; ELIAS, L.L. e CORREA, F.M. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. *Auton Neurosci*, v.158, n.1-2, Dec 8, p.51-7. 2010.
- (4) 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.
- (5) CRESTANI, C.C.; ALVES, F.H.; RESSTEL, 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.
- (6) 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.

- (7) 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.
- (8) 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.
- (9) DAMPNEY, R.A.; HORIUCHI, J. e MCDOWALL, L.M. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. *Auton Neurosci*, v.142, n.1-2, p.3-10. 2008.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) 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.

- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) HARDY, S.G.; HOLMES, D.E. Prefrontal stimulus-produced hypotension in rat. *Exp Brain Res.*, v.73, n.2, p.249-55, 1988.
- (18) JOELS, M. e BARAM, T.Z. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*, v.10, n.6, Jun, p.459-66. 2009.
- (19) 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. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, v.360, p. 42-9, 1999.
- (20) MCDOUGALL, 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.
- (21) MCDOUGALL, S.J.; WIDDOP, R.E.; LAWRENCE, A.J. Central autonomic integration of psychological stressors: focus on cardiovascular modulation. *Auton Neurosci.*, v.123, n.1-2, p.1-11, 2005.

- (22) 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.
- (23) 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.
- (24) 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.
- (25) 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.
- (26) 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.
- (27) RESSTEL LB, CORRÊA FM. Involvement of the medial prefrontal cortex in central cardiovascular modulation in the rat. *Auton Neurosci.*, v.126-127, p.130-8, 2006.
- (28) 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.
- (29) 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.

- (30) 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.
- (31) 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.
- (32) 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.
- (33) 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.
- (34) VERTES, R.P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, v.51, p.32– 58, 2004.
- (35) 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.
- (36) 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.
- (37) 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.

Araraquara, de outubro de 2013.

Taciana Resende Siqueira Pollo

De acordo,

Prof. Dr. Carlos César Crestani

