

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

MARIANE BALDIN ADAMI

**ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA
DO NÚCLEO LEITO DA ESTRIA TERMINAL (NLET) NAS
RESPOSTAS AUTÔNOMAS AO ESTRESSE POR RESTRIÇÃO
AGUDO EM RATOS.**

Araraquara

2015

MARIANE BALDIN ADAMI

**ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA
DO NÚCLEO LEITO DA ESTRIA TERMINAL (NLET) NAS
RESPOSTAS AUTÔNOMAS AO 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-orientador: Josiane Duarte

Araraquara

2015

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Arlete Ap. Baldin Adami e Carlos Roberto Adami, que sempre me ensinaram que nossa maior herança é o conhecimento que adquirimos ao longo de nossas vidas e por isso não mediram esforços pra me promoverem a melhor educação e mais do que isso, me permitiram fazer as melhores escolhas para o meu crescimento. Também faço minha dedicação aos meus irmãos Marcio e Christiane por serem meu exemplo de força e determinação e que me incentivaram aos maiores desafios, me ensinando a não ter medo e a enfrentar qualquer circunstância como uma forma de aprendizado. Minha vontade em me desafiar e agregar conhecimento em minha vida devo a essas pessoas que são os meus pilares e que sempre me deram a estrutura sólida para construir meu caminho e conquistar meus sonhos. Por isso, espero dessa forma, agradecer toda a paciência, carinho, admiração e encantamento por todos esses anos de estudo e trabalho. Que essa dedicatória possa representar a vocês toda a minha gratidão por tê-los como minha família. Vocês me deram as condições para essa conquista. E dedico esse trabalho a vocês, pois foi com essa grande experiência que pude tirar lições de vida, que espero levar comigo, pois foi aqui que aprendi a enfrentar medos, medos esses que ao serem superados me deram força e vontade de permanecer nesse trabalho maravilhoso. Quanto aos conhecimentos científicos ainda espero poder vê-los aplicados, e os conhecimentos de vida levo comigo a lição de que precisamos sempre acreditar naquilo que podemos fazer, que resultados inesperados são mais interessantes do que o previsível, que as maiores respostas vem das perguntas mais simples, que errar te permite acertar e que as mentes mais brilhantes não se passam de grandes curiosos.

“Eu tentei noventa e nove vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo dom da vida e por me guiar em todos os caminhos, permitindo que os siga com coragem e determinação.

Ao meu orientador Carlos Cesar Crestani, por ter sido orientador, professor e amigo, que me suportou por todos esses anos de estudo e trabalho, sempre com muita dedicação e inteligência, me permitindo desenvolver como profissional e pessoa. Com toda a sua paciência e conhecimento e vontade de ensinar, foi responsável por minha motivação e vontade de aprender cada vez mais. Tenho grande admiração pelo seu trabalho e pela pessoa que é. Obrigada, por ter sido esse grande mestre.

Aos meus grandes parceiros de laboratório e da vida, Flavia Santana e Lucas Barretto, que estiveram comigo em todos os momentos, tanto dentro como fora do Laboratório, que foram amigos e companheiros pra que tudo o que planejamos acontecesse obrigada por estarem ao meu lado e por fazerem dessa parceria uma grande família, a nossa "Família FÁrmaco", Esse trabalho também é de vocês.

À Rosana e a Beth, técnicas do Laboratório, que são peças fundamentais para a realização desse trabalho, pois se dedicam para nosso aprendizado, nossa ética e nossa formação.

À Josiane Duarte que foi minha co-orientadora e amiga, que dividiu comigo todas as angústias e medos, mas que com sua paciência e otimismo me fez acreditar que daria certo.

A todos do laboratório de Neuropsicofarmacologia, que contribuíram intensamente para minha formação e para a realização desse trabalho.

Aos meus grandes amigos Flavia Santana, Roberta Mingote, Larissa Polli e Rone De Grandis, por serem minha família Unespiana, por compartilharem comigo das minhas conquistas, alegrias, tristezas e medos, por vivenciarem comigo os melhores anos da minha vida e por manterem nossa amizade tão estável e especial.

À All Pharma Jr. Consultoria Farmacêutica, que foi a experiência mais incrível que vivi durante a graduação, me desafiando a superar obstáculos e me permitindo me tornar uma excelente profissional. Em especial, à Gestão 14/15, que me engrandeceu como pessoa e profissional, mas mais do que isso me proporcionou amigos para toda a vida.

E por fim, a todos aqueles que de forma direta e indireta contribuíram para a minha formação, que torceram por cada momento e que estão ao meu lado sempre.

Obrigada.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1.....	21
FIGURA 2.....	22
FIGURA 3.....	24
FIGURA 4.....	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	13
3. METODOLOGIA.....	14
3.1. Animais.....	14
3.2. Técnica de implante de cânulas guias no NLET	14
3.3. Canulação da artéria femoral.....	15
3.4. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	16
3.5. Registro da temperatura cutânea da cauda	16
3.6. Estresse de restrição aguda	17
3.7. Drogas utilizadas	17
3.8. Microinjeção de drogas no NLET	17
3.9. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas.....	18
3.10. Análise estatística.....	18
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	19
5. RESULTADOS	20
5.1. Efeito do tratamento do NLET com LY235959 nas respostas autônomas durante o estresse de restrição aguda em ratos.	20
Figura 1	21
Figure 2	22
4.2. Efeito do tratamento do NLET com NBQX nas respostas autônomas durante o estresse de restrição aguda em ratos.....	23
Figura 3	24
Figura 4	25
5. DISCUSSÃO.....	26
6. REFERÊNCIAS.....	31

RESUMO

O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura límbica localizada no prosencéfalo rostral, no qual constitui uma importante região no circuito neural das respostas comportamentais e fisiológicas a estímulos aversivos. Estudos anteriores demonstraram o envolvimento do NLET nas respostas cardiovasculares desencadeados por estímulos aversivos. No entanto, os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos nesse controle pelo NLET ainda são pouco compreendidos. O glutamato é um importante neurotransmissor excitatório no SNC, e evidências têm apontado que a neurotransmissão glutamatérgica é um importante mecanismo neuroquímico envolvido no controle das respostas fisiológicas durante o estresse em várias estruturas límbicas. Entretanto, um possível envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica do NLET nas respostas cardiovasculares ao estresse nunca foi investigado. Assim, o objetivo do presente estudo foi estudar o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica no NLET nas respostas autônomas observadas durante o estresse de restrição agudo em ratos. Nós observamos que a microinjeção bilateral no NLET de LY235959 (antagonista seletivo do receptor glutamatérgico NMDA) reduziu a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse de restrição, porém não afetou as respostas pressora e de redução da temperatura cutânea da cauda. O tratamento bilateral do NLET com NBQX (antagonista seletivo de receptores glutamatérgicos não-NMDA) reduziu a resposta taquicárdica e a de redução da temperatura cutânea desencadeadas pelo estresse de restrição, porém sem interferir com a resposta pressora. Dessa forma, nossos dados sugerem que a neurotransmissão glutamatérgica do NLET tem uma influência facilitatória nas respostas taquicárdica e de vasoconstrição cutânea induzidas pelo estresse.

1. INTRODUÇÃO

Estudos têm apontado correlação positiva 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 às situações de estresse requer um adequado e coordenado conjunto de respostas fisiológicas (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009). 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 nos leitos da musculatura esquelética) e alteração na atividade do barorreflexo (BARRON & VAN LOON, 1989; DAMPNEY, et al., 2008). 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 psicológico são mediadas por estruturas límbicas no sistema nervoso central (SNC), através da ação de vários mecanismos neuroquímicos (JOELS & BARAM, 2009; ULRICH-LAI & HERMAN, 2009). O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura localizada no prosencéfalo rostral, no qual forma um contínuo rostralmente à amígdala (WELLER & SMITH, 1982). Tem sido proposto que o NLET é uma importante região no circuito

neural das respostas comportamentais e fisiológicas a estímulos aversivos, no qual integra informações de outras regiões límbicas, como o córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo, e conecta estas regiões a núcleos hipotalâmicos e do tronco cerebral envolvidos no controle da atividade autônoma e neuroendócrina (CHOI et al, 2007; ULRICH-LAI & HERMAN, 2009). A função do NLET nas respostas neuroendócrinas ao estresse está bem descrita na literatura (para revisão ver CRESTANI et al, 2013). Um pequeno número de estudos investigou o papel do NLET nas respostas autônomas ao estresse, porém estes estudos demonstraram que o bloqueio sináptico não-seletivo do NLET é capaz de modular as respostas cardiovasculares ao estresse, e este efeito parece depender do modelo aversivo empregado (RESSTEL et al, 2008a, CRESTANI et al, 2009; CRESTANI et al, 2013). Entretanto, informações acerca dos mecanismos neuroquímicos locais no NLET envolvidos no controle das respostas cardiovasculares ao estresse ainda são escassas.

O glutamato é um importante neurotransmissor excitatório no SNC, no qual atua através da ativação de receptores ionotrópicos e metabotrópicos (HOLLMANN & HEINEMANN, 1994). Os receptores ionotrópicos são classificados como N-Metil-D-Aspartato (NMDA) ou não-NMDA, ampa e cainato, de acordo com a seletividade a agonistas (DINGLELINE et al, 1999).

Evidências têm apontado que a neurotransmissão glutamatérgica é um importante mecanismo neuroquímico envolvido no controle das respostas fisiológicas durante o estresse em várias estruturas límbicas (ZIEGLER & HERMAN, 2000; RESSTEL et al, 2008b; JOELS & BARAM, 2009). Foram identificados terminais e receptores glutamatérgicos no NLET (WALKER & DAVIS, 1997; WEITLAUF et al, 2004). Além disso, estudos eletrofisiológicos demonstraram que a liberação de glutamato no NLET causa correntes pós-sinápticas excitatórias através

da ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (EGLI & WINDER, 2003). A microinjeção de agonistas glutamatérgicos no NLET de ratos anestesiados causou redução na pressão arterial e frequência cardíaca (CIRIELLO & JANSSEN 1993), que foram mediadas pela co-ativação de receptores NMDA e não-NMDA (HATAM & NASIMI 2007). Além disso, a neurotransmissão glutamatérgica no NLET modula a atividade do barorreflexo de maneira similar àquela observada durante o estresse (ALVES et al, 2009). Apesar das evidências acima indicarem o envolvimento de mecanismos glutamatérgicos do NLET no controle da atividade cardiovascular, e de estudos indicarem que vias glutamatérgicas no SNC estão envolvidas nas respostas cardiovasculares ao estresse, não existem evidências na literatura acerca da participação da neurotransmissão glutamatérgica do NLET nas respostas autônomas do estresse.

O estresse de restrição agudo é um modelo de estresse não-condicionado e inescapável bem aceito na literatura (BARRON & VAN LOON, 1989; CHOI, et al, 2007). O modelo consiste em colocar o animal em um tubo cilíndrico de contenção. Este modelo causa respostas neuroendócrinas e autônomas (BARRON & VAN LOON, 1989; CHOI et al, 2007). As respostas autônomas são caracterizadas por elevação na pressão arterial e frequência cardíaca, modulação da atividade barorreflexa e redução da temperatura cutânea devido a uma redução no fluxo sanguíneo local (MCDOUGALL, et al, 2000; BUSNARDO et al, 2010; CRESTANI et a., 2010). O presente estudo é uma continuação de um estudo prévio do nosso grupo em que nós observamos que o bloqueio sináptico não-seletivo do NLET aumentou a resposta taquicárdica induzida pelo estresse de restrição aguda, porém sem interferir com a resposta de aumento da pressão arterial (CRESTANI et al, 2009). Diante disso, o presente estudo tem como hipótese que a neurotransmissão

glutamatérgica do NLET tem ação inibitória sobre as respostas autônomas induzidas pelo estresse de restrição agudo em ratos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi estudar o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica do NLET nas respostas autônomas observadas durante o estresse de restrição agudo em ratos. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Estudar o efeito da microinjeção bilateral no NLET de LY235959, antagonista seletivo do receptor glutamatérgico NMDA, nas respostas de pressão arterial e frequência cardíaca, bem como na temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse de restrição agudo em ratos;

- Investigar o efeito da microinjeção bilateral no NLET de NBQX, antagonista seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos não-NMDA, nas respostas de pressão arterial e frequência cardíaca, bem como na temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse de restrição agudo em ratos.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar de peso corporal variando entre 240-260g. 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 no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR-UNESP (protocolo: CEUA/FCF/CAr. 11/2012).

3.2. Técnica de implante de cânulas guias no NLET

Cinco dias antes dos experimentos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (intraperitoneal, 250 mg/kg). Após a tricotomia, a cabeça do rato foi imobilizada em um estereotáxico (STOELTING, EUA) e foi realizada assepsia do campo cirúrgico com álcool 70%. Para redução do sangramento durante a cirurgia, foi injetado por via subcutânea 0,3 ml de solução de lidocaína com vasoconstritor (3% de levoarterenol, Harvey Química Farmacêutica Ind. e Comércio Ltda, Catanduva, SP) na cabeça do animal. A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se completamente o perióstio. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada 10%. Todas as coordenadas tiveram como referência os parâmetros obtidos do Atlas de PAXINOS & WATSON (1997), ajustados ao peso corporal do animal (BORGES,1999). A interaural foi utilizada como ponto de referência para as coordenadas.

Núcleo Leito da Estria Terminal (NLET)

Ântero-posterior: +7,7 mm em relação a interaural;

Médio-Lateral/Dorso Ventral: + 4 mm a partir do bregma;

Vertical: -5,8 mm em relação ao osso;

Incisivo = -3,2.

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 13 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 (intraperitoneal, 250 mg/kg) para implantação de um cateter na artéria femoral para registro cardiovascular. 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. Ao final da cirurgia, o animal recebeu 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) pela 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.

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. 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. Registro da temperatura cutânea da cauda

Os registros da temperatura cutânea da cauda foram realizados utilizando 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.

3.6. Estresse por restrição agudo

O estresse de 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 preenchem 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.

3.7. Drogas utilizadas

O LY235959 (antagonista seletivo do receptor glutamatérgico NMDA) (Sigma-Aldrich, EUA), o NBQX (antagonista seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos não-NMDA), o tribromoetanol e a uretana 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.

3.8. Microinjeção de drogas no NLET

As agulhas injetoras (33 gauge, Small Parts, EUA), que foram utilizadas para microinjeção das drogas no SNC, foram um mm mais longa do que as cânulas guias fixada ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2 µl (7002-KH,

Hamilton, EUA). O volume das drogas injetadas foi de 100nL (CRESTANI 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 Evans 1% no NLET no mesmo volume de injeção das drogas (100nl). Em seguida, os cérebros foram retirados da caixa craniana e pós-fixados em solução formalina por no mínimo 48 horas. Então, os cérebros foram seccionados com o auxílio de um criostato. Foram feitas várias secções da região do NLET, e o posicionamento dos sítios de injeção foram analisados utilizando-se o Atlas de PAXINOS & WATSON (1997) como referência.

3.10. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O efeito do tratamento do NLET com LY235959 ou NBQX sobre os valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda foram comparados utilizando teste t de Student. A 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 de restrição agudo.

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias direcionadas ao NLET, 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 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.

Grupos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no NLET de veículo (salina) (100nL), LY235959 (1nmol/100nL) ou NBQX (1nmol/100nL) (ALVES et al, 2009; BUSNARDO et al, 2013). Dez minutos após as microinjeções, os animais foram submetidos a uma sessão de 30 minutos de estresse de restrição. O registro de pressão arterial e frequência cardíaca foram iniciados pelo menos 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 min antes da restrição, e a cada 5 min durante a restrição.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do tratamento do NLET com LY235959 nas respostas autônomas durante o estresse de restrição agudo em ratos.

O tratamento bilateral do NLET com LY235959 (1nmol/100nl, n=6), não afetou os parâmetros basais de PAM (108 ± 5 vs 104 ± 2 mmHg, $t=0,7$, $P>0,05$), FC (360 ± 13 vs 378 ± 8 bpm, $t=1,0$, $P>0,05$) e temperatura cutânea da cauda ($27,9 \pm 0,3$ vs $28,3 \pm 0,3$ °C, $t=0,8$, $P>0,05$). O estresse de restrição aguda causou aumento na PAM ($F_{(19,200)}=5$, $P<0,0001$) e FC ($F_{(19,200)}=8$, $P<0,0001$) e redução da temperatura cutânea da cauda ($F_{(8,90)}=12$, $P<0,0001$) (Figura 1). O tratamento do NLET com LY235959 reduziu a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse de restrição ($F_{(1,200)}=80$, $P<0,0001$), e a análise identificou interação entre os fatores tempo e tratamento para esta medida ($F_{(19,200)}=2$, $P<0,02$) (Figura 1). As respostas de aumento da PAM ($F_{(1,200)}=0,2$, $P>0,05$) e de redução da temperatura da cauda ($F_{(1,90)}=0,8$, $P>0,05$) não foram afetadas pelo bloqueio de receptores NMDA no NLET (Figura 1). Representação diagramática dos sítios de injeção no NLET de todos os animais utilizados neste protocolo é apresentado na Figura 2.

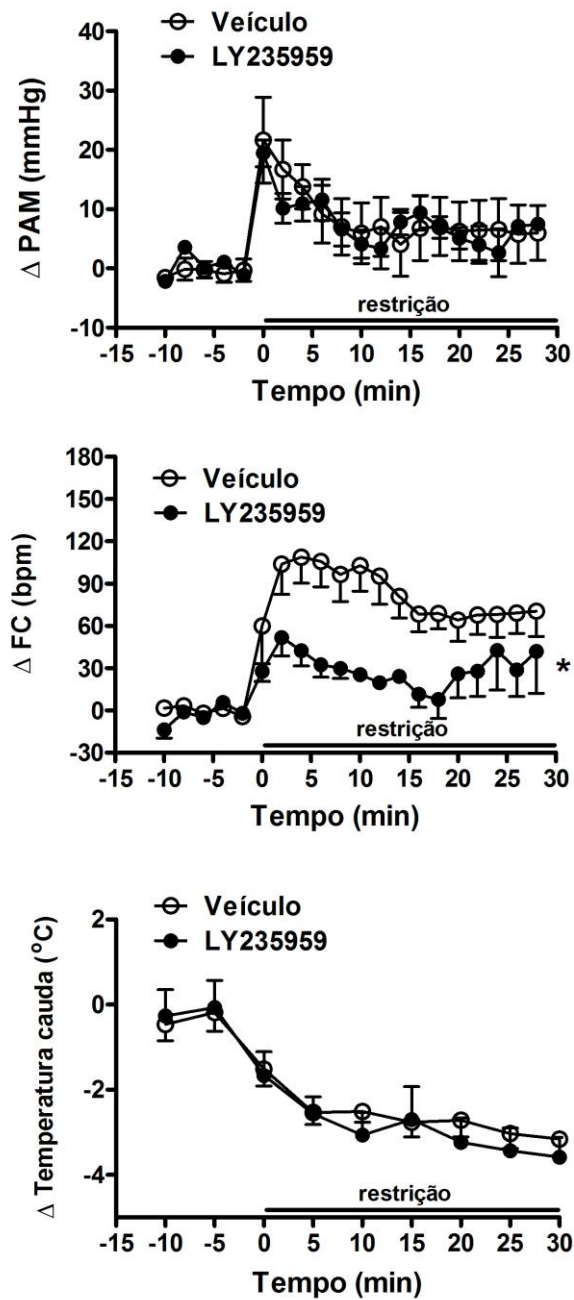


Figura 1

Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda durante o estresse de restrição agudo em animais tratados bilateralmente no NLET com veículo (círculos brancos) ou LY235959 (círculos pretos). 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 de restrição agudo ($P < 0,05$, ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni).

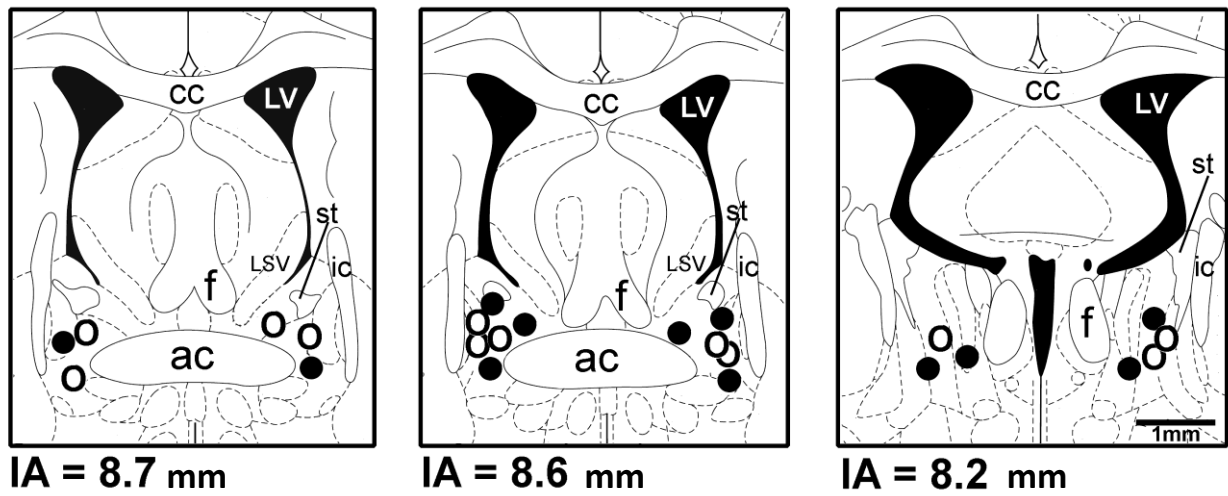


Figura 2

Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de PAXINOS & WATSON (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET de veículo (círculos brancos) e LY235959 (círculos pretos).

Legenda

ac: comissura anterior

f: fornix

LV: Ventrículo Lateral

cc: corpo caloso

ic: cápsula interna

LSV: Área Septal Ventral

4.2. Efeito do tratamento do NLET com NBQX nas respostas autônomas durante o estresse de restrição agudo em ratos.

O tratamento bilateral do NLET com NBQX (1nmol/100nl, n=8), não afetou os parâmetros basais de PAM (109 ± 4 vs 110 ± 2 mmHg, $t=0,3$, $P>0,05$), FC (361 ± 14 vs 375 ± 6 bpm, $t=1,1$, $P>0,05$) e temperatura cutânea da cauda ($28,9\pm 0,3$ vs $28,4\pm 0,3$ °C, $t=0,9$, $P>0,05$). O estresse de restrição agudo causou aumento na PAM ($F_{(19,240)}=8$, $P<0,0001$) e FC ($F_{(19,240)}=11$, $P<0,0001$) e redução da temperatura cutânea da cauda ($F_{(8,108)}=6$, $P<0,0001$) (Figura 3). O tratamento do NLET com NBQX reduziu a resposta taquicárdica ($F_{(1,240)}=21$, $P<0,0001$) e de redução da temperatura cutânea ($F_{(1,108)}=9$, $P<0,005$) desencadeadas pelo estresse de restrição (Figura 3). A análise não identificou interação entre os fatores tempo e tratamento para as medidas de FC ($F_{(19,240)}=0,8$, $P>0,05$) e temperatura cutânea ($F_{(8,108)}=0,3$, $P>0,05$). A resposta de aumento da PAM não foi afetada pelo bloqueio de receptores não-NMDA no NLET ($F_{(19,240)}=3$, $P>0,05$) (Figura 3). Representação diagramática dos sítios de injeção no NLET de todos os animais utilizados neste protocolo é apresentado na Figura 4.

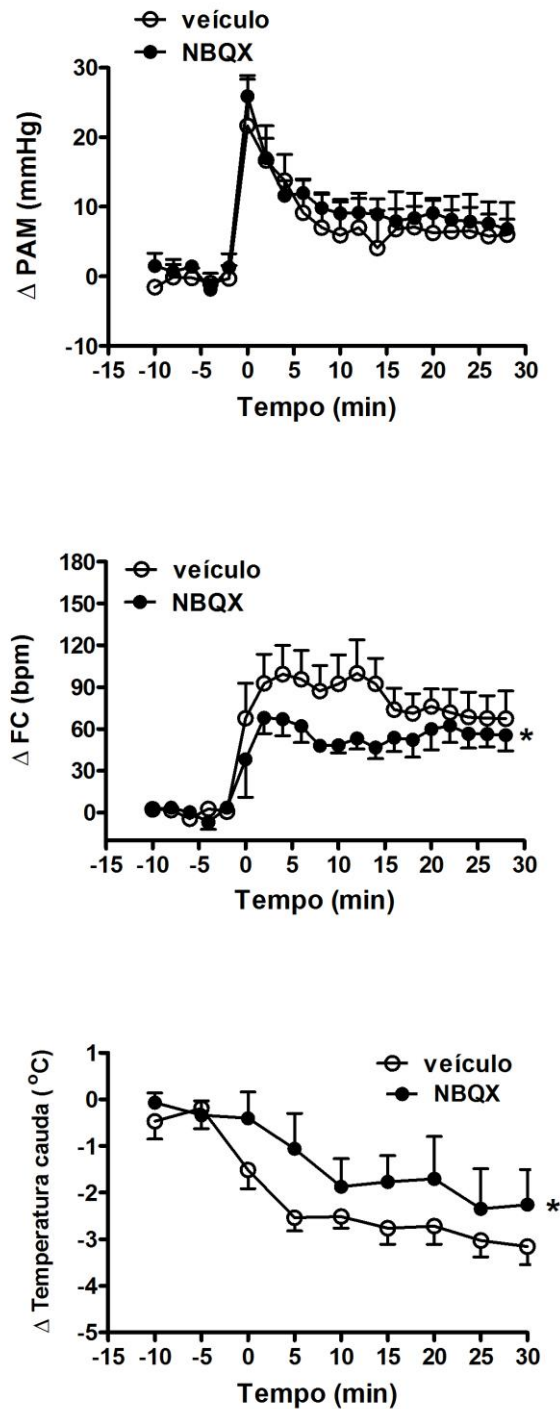


Figura 3

Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda durante o estresse de restrição agudo em animais tratados bilateralmente no NLET com veículo (círculos brancos) ou NBQX (círculos pretos). 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).

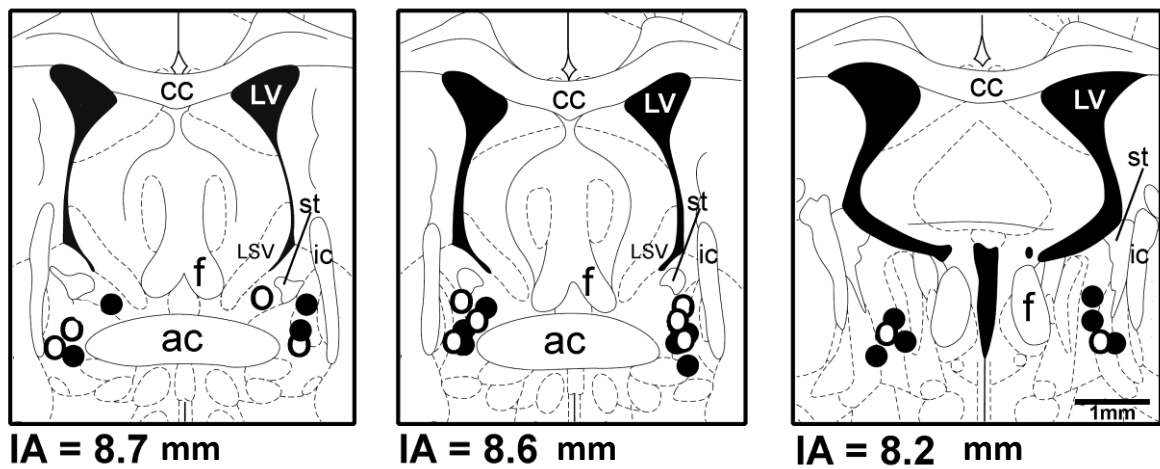


Figura 4

Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de PAXINOS & WATSON (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET de veículo (círculos brancos) e NBQX (círculos pretos).

Legenda

ac: comissura anterior

f: fornix

LV: Ventrículo Lateral

cc: corpo caloso

ic: cápsula interna

LSV: Área Septal Ventral

5. DISCUSSÃO

O estresse de restrição é um estímulo aversivo inescapável e não condicionado conhecido por provocar alterações autonômicas como, por exemplo, elevação da PA e FC e modulação da atividade barorreflexa (BARRON E VAN LOON, 1989; MCDOUGALL *et al.* 2000; CRESTANI *et al.*, 2010). Além disso, durante o estresse o aporte sanguíneo diminui em alguns leitos vasculares (por exemplo, cutâneo e mesentérico) para aumentar o fluxo sanguíneo para regiões mais requisitadas durante as respostas defensivas (por exemplo, a musculatura esquelética) (ZHANG *et al.*, 1996). A redução do fluxo sanguíneo cutâneo durante o estresse por restrição acarreta uma redução na temperatura da pele (BUSNARDO *et al.*, 2010, 2013). Os ajustes neuroendócrinos durante o estresse por restrição são principalmente caracterizados pela ativação do eixo HPA (CHOI *et al.*, 2007). Dessa forma, como esperado, nós observamos que uma sessão aguda de estresse de restrição causou elevação da PA e FC e diminuição da temperatura cutânea da cauda.

Diversos estudos têm demonstrado que núcleos diretamente conectados com o NLET, como o córtex pré-frontal medial (CPFM), a amígdala e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), estão envolvidos nas respostas fisiológicas desencadeadas pelo estresse de restrição (TAVARES E CORREA 2006; SALOMÉ *et al.*, 2007; BUSNARDO *et al.*, 2010). Estes resultados sugerem um envolvimento do NLET no controle das respostas autônomas ao estresse. Neste sentido, em um estudo prévio publicado pelo nosso grupo nós observamos que o bloqueio não-seletivo de sinapses no NLET através da microinjeção local de CoCl_2 facilitou a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse de restrição agudo, porém sem interferir com a resposta de elevação da pressão arterial (CRESTANI *et al.*, 2009).

Estes resultados sugeriram uma influência inibitória do NLET nas respostas cardíacas ao estresse de restrição. Entretanto, o mecanismo neuroquímico local envolvido neste controle pelo NLET ainda é pouco compreendido.

A neurotransmissão glutamatérgica no NLET é um importante mecanismo envolvido no controle da função cardiovascular (CRESTANI et al, 2013). Para testar a hipótese da participação desse mecanismo neuroquímico do NLET nas respostas autônomas ao estresse, nós inicialmente microinjetamos LY235959 (antagonista seletivo do receptor glutamatérgico NMDA) bilateralmente no NLET antes da exposição ao estresse de restrição agudo. O tratamento do NLET com LY235959 resultou em redução da resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse de restrição. A resposta de elevação da pressão arterial e de redução da temperatura cutânea nos animais tratados com LY235959 apresentou-se com valores próximos àqueles observados nos animais controle. Estes resultados sugerem que a ativação de receptores NMDA no NLET medeia a resposta taquicárdica induzida pelo estresse de restrição, mas não a variação da PA e temperatura cutânea da cauda.

O glutamato também age em receptores ionotrópicos AMPA e cainato, que são designados como não-NMDA. Dessa forma, nós investigamos o efeito da microinjeção bilateral no NLET de NBQX, um antagonista seletivo de receptores glutamatérgicos não-NMDA. Assim, como observado após o tratamento local com LY235959, a administração de NBQX não afetou as respostas de pressão arterial. No entanto, o tratamento do NLET com NBQX resultou em redução da resposta de elevação da FC e de redução da temperatura cutânea. Uma vez que a resposta de temperatura cutânea reflete uma alteração no fluxo sanguíneo cutâneo (VIANA E CARRIVE, 2005), nossos dados evidenciam um envolvimento de receptores não-NMDA nas respostas cardíacas e vasculares induzidas pelo estresse de restrição.

Esses dados são os primeiros a evidenciar o controle das respostas vasculares ao estresse de restrição pelo NLET.

Os efeitos sobre as respostas cardiovasculares ao estresse de restrição observados após bloqueio de receptores glutamatérgicos no NLET foram opostos àqueles observados anteriormente após o bloqueio não seletivo de sinapses nesta estrutura induzido pelo tratamento local com CoCl_2 (CRESTANI *et al*, 2009). No entanto, Crestani e colaboradores (2009) relataram que a microinjeção local no NLET de um antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 (WB4101) causou efeitos similares àqueles observados após o tratamento local com CoCl_2 , ao facilitar a resposta taquicárdica ao estresse sem interferir com a elevação da pressão arterial. O efeito do bloqueio de outros adrenoceptores no NLET também foi estudado neste mesmo estudo, porém a microinjeção bilateral local de um antagonista seletivo de adrenoceptores α_2 (RX821002) ou β (propranolol) não afetou as respostas cardiovasculares do estresse de restrição. Deste modo, baseado nestes resultados, foi sugerido que a neurotransmissão noradrenérgica, agindo através da ativação de adrenoceptores α_1 , é um importante mecanismo local envolvido na influência inibitória do NLET na resposta cardíaca ao estresse de restrição.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, e estudos eletrofisiológicos tem demonstrado que este neurotransmissor tem ação excitatória sobre a atividade de neurônios do NLET (CASADA E DAFNY, 1993). Por outro lado, estudos mostram que a noradrenalina tem ação pós-sináptica inibitória sobre a atividade de neurônios do NLET (SAWADA E YAMAMOTO, 1981). Além disso, a noradrenalina inibe a liberação de glutamato e despolariza terminais locais contendo o neurotransmissor inibitório GABA (FORRAY E GYSLING, 2004), o que reforça a

sua influência inibitória no NLET. A partir das evidências de que o bloqueio sináptico inespecífico com CoCl_2 ou o antagonismo de adrenoceptores α_1 no NLET causam efeitos similares sobre as respostas cardiovasculares ao estresse por restrição (CRESTANI et al, 2009), ao passo que o tratamento local com antagonistas de receptores glutamatérgicos influencia de maneira oposta estas respostas, pode-se sugerir que a noradrenalina tem um papel proeminente no controle das respostas autônomas pelo NLET, de modo que mecanismos glutamatérgicos locais teriam uma ação modulatória sobre os efeitos da noradrenalina. Esta ação modulatória parece não decorrer de uma influência direta do glutamato na neurotransmissão noradrenérgica, pois tem sido demonstrado que mecanismos glutamatérgicos facilitam a liberação local de noradrenalina no NLET (FORRAY E GYSLING, 2004). Deste modo, é mais provável que esta interação decorra dos efeitos opostos da noradrenalina (inibitória) e do glutamato (excitatório) sobre a atividade de neurônios do NLET.

As respostas taquicárdicas e pressoras durante o estresse são mediadas por uma ativação simpática, uma vez que são bloqueadas pelo tratamento sistêmico com antagonistas de adrenoceptores β e α , respectivamente (CARRIVE, 2006; CRESTANI et al, 2010). Além disso, o tratamento com bloqueadores parassimpáticos aumenta a resposta cardíaca durante o estresse (BAUDRIE et al, 1997; CARRIVE et al, 2006; CRESTANI et al, 2009), o que evidencia uma co-ativação simpática e parassimpática cardíaca durante o estresse. O NLET envia projeções diretas para estruturas bulbares envolvidas no controle da atividade autonômica, assim como o núcleo do trato solitário, o núcleo ambíguo e a região ventrolateral do bulbo (GRAY E MAGNUSON, 1987; DONG E SWANSON, 2004). Foi demonstrado que a microinjeção de glutamato no NLET causa alterações na PA

e FC (CIRIELLO E JANSSEN, 1993; HATAM E NASIMI, 2007), que são mediadas por alterações na atividade simpática vascular e cardíaca (CIRIELLO E JANSSEN, 1993) através de conexões com o bulbo ventrolateral caudal (BVLC) (GIANCOLA et al, 1993). Além disso, foi demonstrado que a influência inibitória da neurotransmissão noradrenérgica do NLET sobre a resposta cardíaca ao estresse por restrição decorre de uma facilitação da atividade parassimpática cardíaca (CRESTANI et al, 2009). Deste modo, a influência facilitatória dos receptores glutamatérgico NMDA e não-NMDA no NLET sobre a resposta taquicárdica ao estresse de restrição pode decorrer da facilitação de vias que estimulam a atividade simpática e/ou inibem a atividade parassimpática cardíaca. O controle da resposta de pressão arterial por receptores não-NMDA do NLET também deve decorrer da facilitação de vias que estimulam a atividade simpática.

Em suma, nossos dados sugerem que a neurotransmissão glutamatérgica do NLET, atuando através da ativação de receptores ionotrópicos NMDA e não NMDA locais tem uma influência facilitatória sobre a resposta taquicárdica induzida pelo estresse de restrição agudo. Os presentes resultados também indicam a participação de receptores não-NMDA no NLET na vasoconstrição cutânea durante o estresse por restrição. Os nossos resultados contrastam com aqueles observados previamente em animais sujeitos ao bloqueio sináptico não-seletivo do NLET, e indicam que mecanismos glutamatérgico no NLET tenha um papel modulatório sobre a ação de outros mecanismos neuroquímicos locais.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, F.H.; CRESTANI, C.C.; RESSTEL, L.B.; CORREA, F.M. Bed nucleus of the stria terminalis N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide modulate the baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. *J Neurosci Res.*, v.87, n.7, p.1703-11, 2009.
- 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.
- BAUDRIE, V.; TULEN, J. H.; BLANC, J.; ELGHOZI, J. L. Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. *J Auton Pharmacol*, v. 17, n. 5, p. 303-9, 1997.
- 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.
- BUSNARDO C, ALVES FH, CRESTANI CC, SCOPINHO AA, RESSTEL LB, CORREA FM. Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. In press: doi:pil: S0924-977X(12)00314-8, 2013.
- CARRIVE, P. Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 33, n. 12, p. 1251-4, 2006.
- CASADA JH, DAFNY N. Responses of neurons in bed nucleus of the stria terminalis to microiontophoretically applied morphine, norepinephrine and acetylcholine. *Neuropharmacology*. 32(3):279-84, 1993.
- 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, Feb 21, p.2025-34. 2007.

- CIRIELLO, J.; JANSSEN, S.A. Effect of glutamate stimulation of bed nucleus of the stria terminalis on arterial pressure and heart rate. *Am J Physiol.*, v.265, n.5 Pt 2, p.H1516-22, 1993.
- 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.; RESSTEL, 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.
- CRESTANI, C. C.; ALVES, F.H.F.; GOMES, F. V.; RESSTEL, L. B. M.; CORREA, F. M. A.; HERMAN, J. P. Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: a review. *Curr Neuropharmacol.* v. 11, p. 141-159, 2013.
- CULLINAN, W.E.; HERMAN, J.P.; BATTAGLIA, D.F.; AKIL, H. e WATSON, S.J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*, v.64, n.2, Jan, p.477-505. 1995.
- 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, Nov 3, p.3-10. 2008.
- DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S.F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.*, v. 51, p. 7–61, 1999.
- DONG, H.W.; SWANSON, L.W. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. *J Comp Neurol*, v.468, p.277–298, 2004.
- EGLI, R.E.; WINDER, D.G. Dorsal and ventral distribution of excitable and synaptic properties of neurons of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurophysiol.*, v.90, p.405-14, 2003.
- FORRAY MI, GYSLING K. Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res Brain Res Rev.* 47(1-3):145-60, 2004.
- GIANCOLA, S.B.; RODER, S.; CIRIELLO, J. Contribution of caudal ventrolateral medulla to the cardiovascular responses elicited by activation of bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res.*, v.606, n.1, p.162-6, 1993.

- GRAY, T.S.; MAGNUSON, D.J. Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. *J Comp Neurol*, v.262, p.365–374, 1987.
- GRIPPO AJ; JOHNSON AK. Stress, depression and cardiovascular dysregulation: a review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Stress*. 12(1):1-21, 2009.
- HATAM, M.; NASIMI, A. Glutamatergic systems in the bed nucleus of the stria terminalis, effects on cardiovascular system. *Exp Brain Res.*, v.178, n.3, p.394-401, 2007.
- HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.*, v. 17, p.31-108, 1994.
- JOELS, M. e BARAM, T.Z. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*, v.10, n.6, Jun, p.459-66. 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.
- PAXINOS, G; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. third edition, Sydney: Academic Press, 1997.
- RESSTEL, L.B.; ALVES, F.H.; REIS, D.G.; CRESTANI, C.C.; CORRÊA, F.M. GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. *Neuroscience.*, v.154, n.3, p. 869-76, 2008.
- RESSTEL, L.B.; CORRÊA, F.M.; GUIMARÃES, F.S. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex.*, v.18, n.9, p.2027-35, 2008b.
- SALOMÉ, N.; NGAMPAMUAN, S.; NALIVAICO, E. Intra-amygdala injection of GABAA agonist, muscimol, reduces tachycardia and modifies cardiac sympatho-vagal balance during restraint stress in rats. *Neuroscience.*, v.148, n.2, p.335-41, 2007.
- SAWADA, S.; YAMAMOTO, C. Postsynaptic inhibitory actions of catecholamines and opioid peptides in the bed nucleus of the stria terminalis. *Exp. Brain Res.* 41: 264–270, 1981.

- TAVARES RF, CORRÊA FM. Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. *Neuroscience*. 143(1):231-40, 2006.
- ULRICH-LAI, Y.M. e HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*, v.10, n.6, Jun, p.397-409. 2009.
- 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.
- WALKER DL, DAVIS M. Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J Neurosci*, v. 17, p. 9375–9383, 1997.
- WEITLAUF, C.; EGLI, R.E.; GRUETER, B.A.; WINDER, D.G. High-frequency stimulation induces ethanol-sensitive long-term potentiation at glutamatergic synapses in the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis *J Neurosci*, v.24, p.5741–5747, 2004.
- WELLER, K.L. e SMITH, D.A. Afferent connections to the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res*, v.232, n.2, Jan 28, p.255-70. 1982.
- ZHANG ZQ, JULIEN C, BARRÈS C. Baroreceptor modulation of regional haemodynamic responses to acute stress in rat. *J Auton Nerv Syst*. v.60, n.1-2, p.23-30, 1996.
- ZIEGLER, D.R.; HERMAN, J.P. Local integration of glutamate signaling in the hypothalamic paraventricular region: regulation of glucocorticoid stress responses. *Endocrinology*., v.141, n.12, p.4801-4, 2000.

Araraquara, 14 de Janeiro, de 2016.

Mariane Baldin Adami

De acordo

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani