Participação de mecanismos angiotensinérgicos do núcleo leito da estria terminal nas respostas autônomas desencadeadas pelo estresse por restrição agudo em ratos.

Araraquara
2016

FLAVIA GONÇALVES DE SANTANA

Participação de mecanismos angiotensinérgicos do núcleo leito da estria terminal nas respostas autônomas 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

Araraquara
2016

Aos meus pais e ao meu irmão, por acreditarem em mim e sempre apoiarem os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida. Por Ele nunca ter me deixado perder a fé e principalmente ter me dado forças nos momentos em que pensei em desistir.

Aos meus pais por toda educação, incentivo e apoio. Por não terem medido esforços para me ajudar a alcançar os meus objetivos. Ao meu irmão, por ser meu verdadeiro companheiro de vida e me guiar nos momentos de decisões.

Ao meu Orientador Carlos César Crestani, que com toda sua dedicação, paciência e inteligência, me despertou uma visão crítica e científica a respeito de situações que vivenciamos até mesmo no nosso cotidiano. Por ter sido muito mais do que um orientador e sim um verdadeiro exemplo de profissional.

A toda minha equipe de laboratório, por terem me auxiliado inúmeras vezes em experimentos, cirurgias e seminários, mas em especial aos meus amigos Lucas e Mariane, que foram muito mais do que simples companhias de laboratórios, mas sim parceiros da vida, não medindo esforços para ajudar quando necessário.

As minhas amigas de república, que souberam ser minha verdadeira família araraquarense, que aguentaram minhas crises e compartilharam dos meus maiores momentos de alegria.

Aos meus amigos-irmãos de turma, Mari, Rone, Rô e Lari, por serem sinônimo de cumplicidade, amizade e lealdade desde o primeiro ano, me fazendo ter plena certeza que sem eles, nada disso seria igual.

E a Cnpq por ter possibilitado a realização desse projeto.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....10

2.OBJETIVO.....12

3.METODOLOGIA.....13

3.1 – Animais.....13

3.2 – Técnica de implante de cânulas guias no sistema nervoso central.....13

3.3 – Canulação da artéria femoral.....15

3.4 – Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....15

3.5 – Registro da temperatura cutânea da cauda.....16

3.6 – Estresse por restrição agudo.....16

3.7 – Drogas utilizadas 16

3.8 – Microinjeção de drogas no NLET.....17

3.9 – Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas.....17

3.10 – Analise Estatística.....17

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....18

5. RESULTADOS.....19

5.1- Efeito do tratamento bilateral do NLET com Captopril sobre as respostas autonômicas ao estresse por restrição agudo em ratos.....19

5.2- Efeito do tratamento do NLET com Saralasina nas respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.....22

6. DISCUSSÃO.....25

7. CONCLUSÕES.....28

8. REFERÊNCIAS.....29

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 20

FIGURA 2 21

FIGURA 3 23

FIGURA 4 24

RESUMO

O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura límbica localizada no prosencéfalo rostral, que está envolvida no circuito neural das respostas comportamentais e fisiológicas a estímulos aversivos. Foi reportado um envolvimento do NLET nas repostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse. Entretanto, os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos no controle das respostas ao estresse pelo NLET ainda são pouco compreendidos. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi investigar o envolvimento da neurotransmissão angiotensinérgica no NLET nas respostas cardiovasculares induzidas pelo estresse por restrição agudo em ratos. Nós observamos que a microinjeção bilateral de captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) no NLET reduziu a resposta de queda da temperatura cutânea da cauda induzida pelo estresse por restrição agudo, porém sem interferir com as respostas de elevação da pressão arterial e frequência cardíaca. O tratamento bilateral do NLET com saralasina (antagonista não-seletivo de receptores da angiotensina II) reduziu a resposta de aumento da pressão arterial e aumentou a resposta de redução da temperatura cutânea da cauda desencadeadas pelo estresse por restrição agudo, porém sem afetar a resposta taquicárdica. Em conjunto, esses dados indicam um envolvimento de mecanismos angiotensinérgicos do NLET nos ajustes hemodinâmicos durante situações de estresse.

INTRODUÇÃO

Todos os indivíduos são, em maior ou menor grau, continuamente expostos a situações de estresse. A sobrevivência de todas as espécies a situações aversivas requer um adequado e coordenado conjunto de respostas fisiológicas (DAMPNEY, et al. 2008; ULRICH- LAI e HERMAN, 2009). O sistema nervoso autônomo promove a resposta imediata ao estresse, que é caracterizada principalmente por alterações na atividade cardiovascular, que incluem: aumento na pressão arterial e frequência cardíaca, redistribuição do fluxo sanguíneo (redução na perfusão cutânea e visceral e aumento na musculatura esquelética) e alteração na atividade do barorreflexo (BARRON e VAN LOON, 1989; DAMPNEY, et al. 2008; CRESTANI et al. 2010). Apesar das respostas autônomas e cardiovasculares ao estresse estarem bem caracterizadas, os mecanismos neurobiológicos envolvidos com estas respostas ainda são pouco compreendidos.

As respostas fisiológicas durante o estresse são mediadas por estruturas límbicas no sistema nervoso central (SNC), através da ação de vários mecanismos neuroquímicos (JOELS e BARAM, 2009; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura límbica localizada no prosencéfalo rostral, no qual está envolvido na modulação da atividade autônoma e neuroendócrina e de respostas comportamentais (DAVIS et al. 2010; CRESTANI et al. 2013). Este núcleo é conectado com diversas estruturas límbicas, tais como o córtex pré-frontal, os núcleos central e medial da amígdala, diversas regiões do hipotálamo, o hipocampo, o núcleo parabraquial, a substância cinzenta periaquedutal e regiões autônomas bulbares (DONG et al, 2001). Neste sentido, tem sido proposto que o NLET é um importante núcleo de integração das respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse (ULRICH-LAI e HERMAN, 2009).

Apesar das evidências do envolvimento do NLET na neurobiologia do estresse, e de seu papel nas respostas comportamentais e neuroendócrinas ao estresse estarem bem caracterizadas (CHOI et al. 2007; DAVIS et al. 2010), um pequeno número de estudos investigaram o papel deste núcleo nas respostas autônomas ao estresse. Neste sentido, apesar de estudos anteriores demonstrarem que o bloqueio sináptico não-seletivo do NLET foi capaz de modular as respostas cardiovasculares ao estresse (RESSTEL et al. 2008; CRESTANI et al. 2009; CRESTANI et al. 2013), informações acerca dos mecanismos neuroquímicos locais no NLET envolvidos no controle destas respostas ainda são escassas.

O estresse por restrição é um estímulo aversivo inescapável e não-condicionado conhecido por provocar alterações autonômicas como, por exemplo, elevação da pressão arterial 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 requisitados 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 neuroendócrinas durante o estresse por restrição são principalmente caracterizados pela ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (CHOI et al. 2007).

Tem sido descrito a presença de um sistema renina-angiotensina (SRA) encefálico, no qual é independente do SRA endócrino (sistêmico) (WRIGHT & HARDING, 2013). Apesar da cascata de síntese e do local de formação (intracelular vs extracelular) das angiotensinas no SNC ainda não estarem totalmente

estabelecidos (GROBE et al, 2008), todos os componentes funcionais do SRA foram identificados no SNC, incluindo o angiotensinogênio, a renina, a enzima conversora de angiotensina (ECA), diversas angiotensinas e todos os subtipos de receptores angiotensinérgicos (GROBE et al, 2008; WRIGHT & HARDING, 2013).

É bem estabelecido o papel da angiotensina II (sistêmica) com ação central no controle de várias funções fisiológicas e comportamentais, tais como a regulação da função autonômica e cardiovascular, da liberação de vasopressina, do balanço hídrico e da sede e dos comportamentos sexuais (PHILLIPS & SUMNERS, 1998). Além disso, estudos recentes tem sugerido um envolvimento da angiotensina II encefálica em diversas respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse (WRIGHT & HARDING, 2013), incluindo os ajustes cardiovasculares desencadeadas por estímulos aversivos (MAYOROV, 2011).

Foram identificados terminais angiotensinérgicos e vários componentes do SRA no NLET, incluindo o angiotensinogênio, a enzima conversora de angiotensina e receptores angiotensinérgicos (CHAI et al. 1987; LYNCH et al. 1987; LENKEI et al. 1997). Entretanto, apesar das evidências da presença de mecanismos angiontensinérgicos no NLET, uma possível participação deste mecanismo neuroquímico local do NLET no controle da função cardiovascular e autônoma nunca foi investigado.

O estresse por restrição é um modelo de estresse não-condicionado e inescapável bem aceito na literatura (BARRON e 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 (CHOI et al. 2007; CRESTANI et al. 2009). As respostas autônomas são caracterizadas por elevação na pressão arterial e frequência cardíaca, modulação da atividade barorreflexa e

redução da temperatura cutânea da cauda (McDOUGALL, et al. 2000; BUSNARDO et al. 2010; CRESTANI et a. 2010). Nós demonstramos em um estudo prévio que o bloqueio sináptico não-seletivo do NLET aumentou a resposta taquicárdica induzida pelo estresse por restrição agudo em ratos, porém sem afetar a resposta pressora observada neste modelo de estresse (CRESTANI et al. 2009). Diante disso, no presente estudo nós testamos a hipótese de que o controle das respostas autônomas ao estresse por restrição agudo exercido pelo NLET é mediado por mecanismos angiontensinérgicos locais.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi estudar o envolvimento de mecanismos angiotensinérgicos presentes no NLET nas respostas autônomas observadas durante o estresse por restrição agudo em ratos. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Estudar o efeito da microinjeção bilateral de captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) no NLET 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.

- Investigar o efeito da microinjeção bilateral de saralasina (antagonista não-seletivo de receptores da angiotensina II) no NLET 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 230-270g. 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 no Uso de Animais (CEUA) da FCFAr-UNESP (protocolo: CEUA/FCF/CAr. 11/2012 e 22/2014).

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 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 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;

Lateral: + 4 mm a partir do bregma;

Vertical: -5,8 mm em relação ao osso;

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

72 horas após a cirurgia de estereotáxia 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 cardiovascular.

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., Midvale, UT, USA). 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 feita através de um software para análise termográfica, e a temperatura foi representada por variações de intensidade de cor (VIANNA e CARRIVE, 2005; BUSNARDO et al, 2013). 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 (BUSNARDO et al, 2013).

3.6. 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 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 captopril (Sigma-Aldrich, EUA) (inibidor da enzima conversora de angiotensina), a saralasina (Sigma-Aldrich, EUA) (antagonista não-seletivo de receptores da angiotensina II), 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.

3.8. Microinjeção de drogas no NLET

As agulhas injetoras (33 G, Small Parts, EUA) que foram utilizadas para microinjeção das drogas no NLET 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 (10%) no NLET no mesmo volume de injeção das drogas (100nl). Em seguida, os cérebros foram retirados da caixa craniana e pós-fixados em formaldeído 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±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 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 cânula guia direcionada 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. Em seguida, grupos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no NLET de veículo (salina) (100nL), captopril (Sigma, EUA) (inibidor da enzima conversora de angiotensina) (10nmol/100nL) ou saralasina (Sigma, EUA) (antagonista não-seletivo de receptores da angiotensina II) (0,25nmol/100nL). Dez minutos após, os animais foram submetidos a uma sessão de 30 minutos de estresse por 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 captopril sobre as respostas autônomas durante o estresse de restrição agudo em ratos.

O tratamento bilateral do NLET com captopril (10nmol/100nl, n=7) (inibidor da enzima conversora de angiotensina) não afetou os parâmetros basais de PAM (105±6 vs 99±3 mmHg, t=0,9, P>0,05), FC (346±15 vs 364±18 bpm, t=0,6, P>0,05) e temperatura cutânea da cauda (28,0±0,6 vs 27,2±0,4 ^{o}C, t=1,2, P>0,05), quando comparado com os animais tratados com salina no NLET (n=6). O estresse por restrição agudo causou aumento na PAM ($F_{(19,220)}$=8, P<0.0001) e FC ($F_{(19,220)}$=14, P<0.0001) e redução da temperatura cutânea da cauda ($F_{(8,99)}$=6, P<0.0001) (Figura 1). A microinjeção de captopril no NLET reduziu a resposta de diminuição da temperatura cutânea da cauda induzida pelo estresse por restrição agudo ($F_{(1,99)}$=38, P<0,0001) (Figura 1). Entretanto, o tratamento local do NLET com o inibidor da ECA não afetou as respostas de elevação da PAM ($F_{(1,220)}$=2, P>0,05) e de FC ($F_{(1,220)}$=0,1, P>0,05) induzidas pelo estresse por restrição (Figura 1). Representação diagramática dos sítios de injeção no NLET de todos os animais utilizados neste protocolo é apresentado na Figura 2.

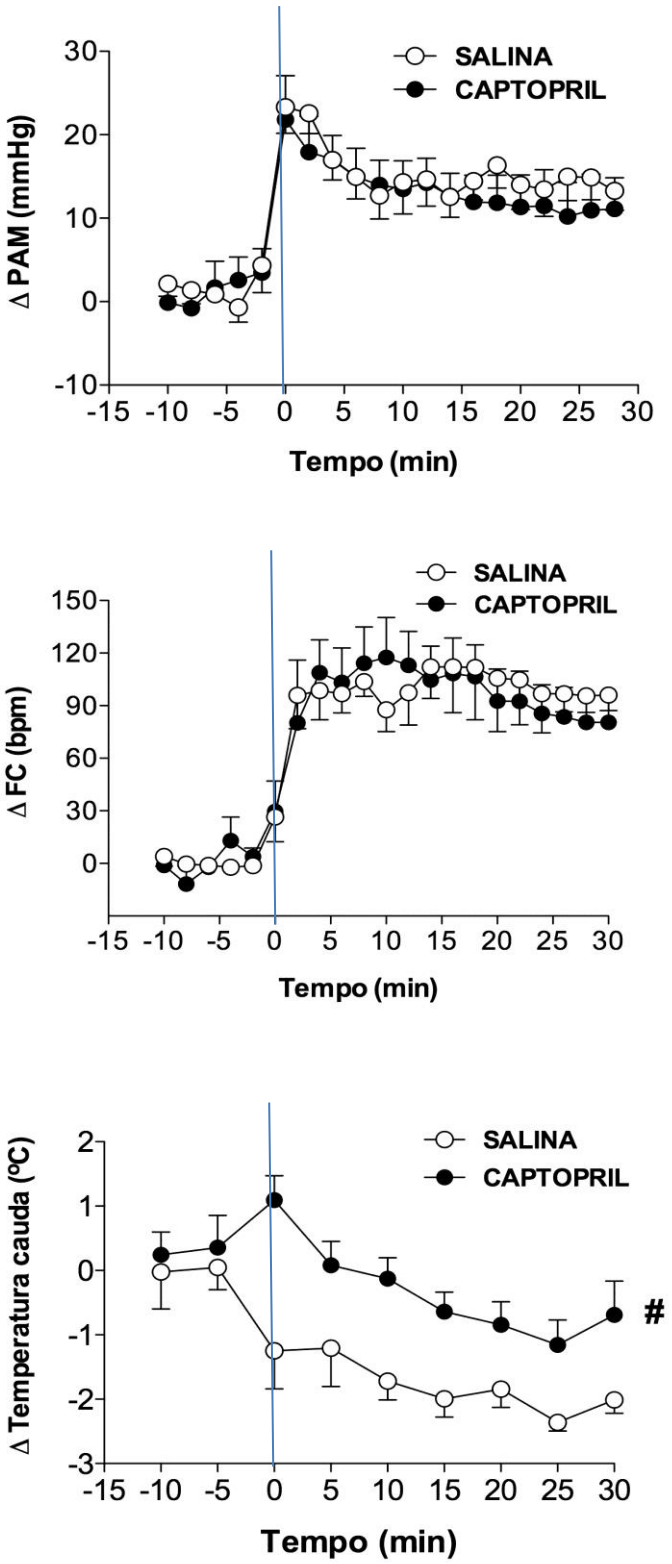


Figura 1

Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura da cauda durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no NLET com veículo (salina, círculos brancos) ou captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) (círculos pretos). O início do estresse foi no t=0. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). O sustenido 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).

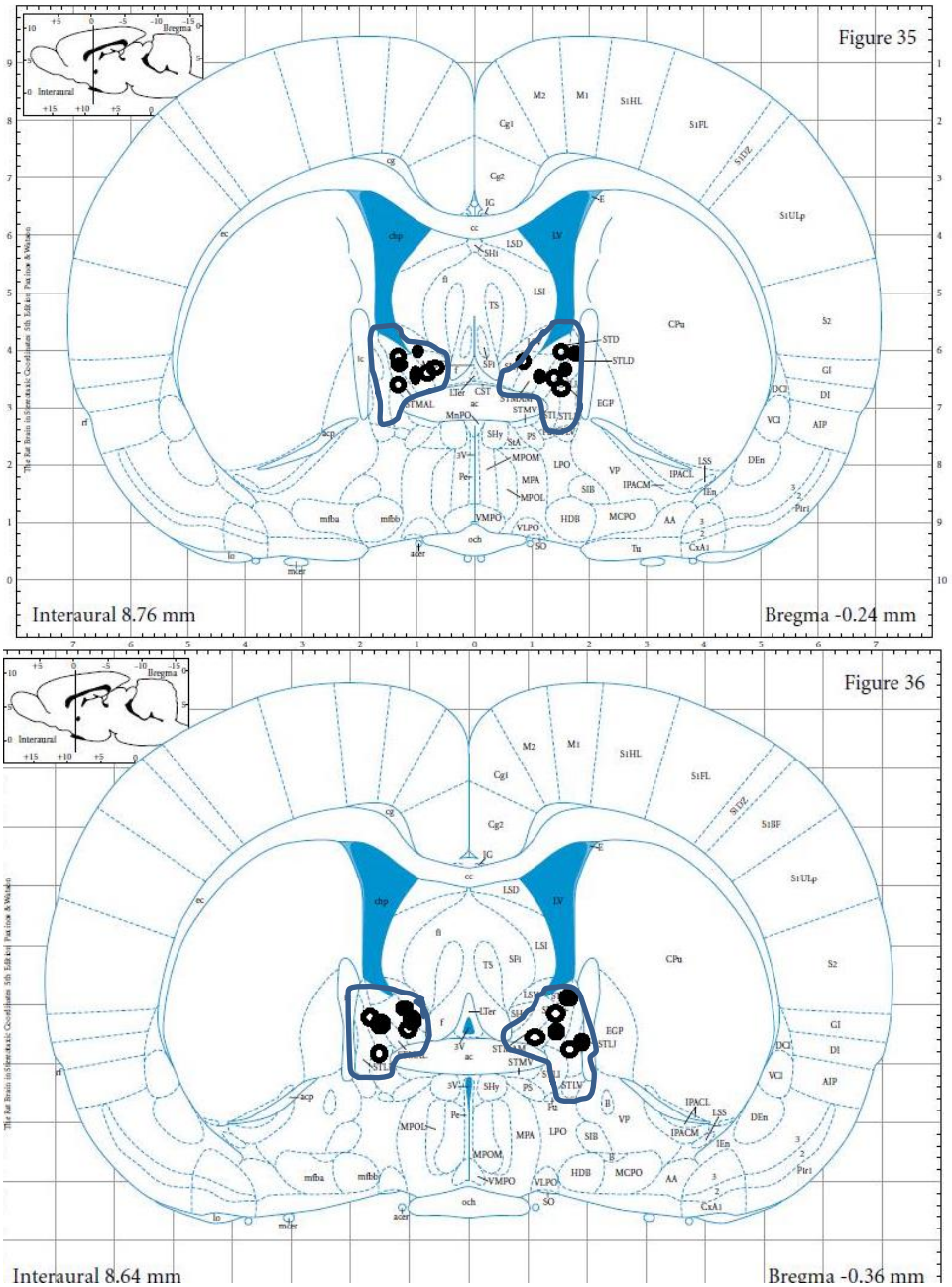


Figura 2

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

5.2. Efeito do tratamento do NLET com saralasina sobre as respostas autônomas durante o estresse de restrição agudo em ratos.

O tratamento bilateral do NLET com saralasina (1nmol/100nl, n=6) (antagonista não-seletivo de receptores da angiotensina II) não afetou os parâmetros basais de PAM (102±2 vs 100±0,5 mmHg, t=1,3, P>0,05), FC (353±10 vs 359±1 bpm, t=0,6, P>0,05) e temperatura cutânea da cauda (28,9±0,3 vs 28,4±0,3 ^{o}C, t=0,9, P>0,05). O estresse por restrição agudo causou aumento na PAM ($F_{(19,200)}$=21, P<0.0001) e FC ($F_{(19,200)}$=35, P<0.0001) e redução da temperatura cutânea da cauda ($F_{(8,90)}$=12, P<0.0001) (Figura 3). O tratamento do NLET com saralasina reduziu a resposta de aumento da PAM ($F_{(19,200)}$=15, P<0.0002) e aumentou a redução da temperatura cutânea da cauda ($F_{(1,90)}$=27, P<0.0001) desencadeadas pelo estresse por restrição agudo (Figura 3). A resposta de aumento da FC não foi afetada pelo bloqueio local de receptores da angiotensina II no NLET ($F_{(19,200)}$=2, 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.

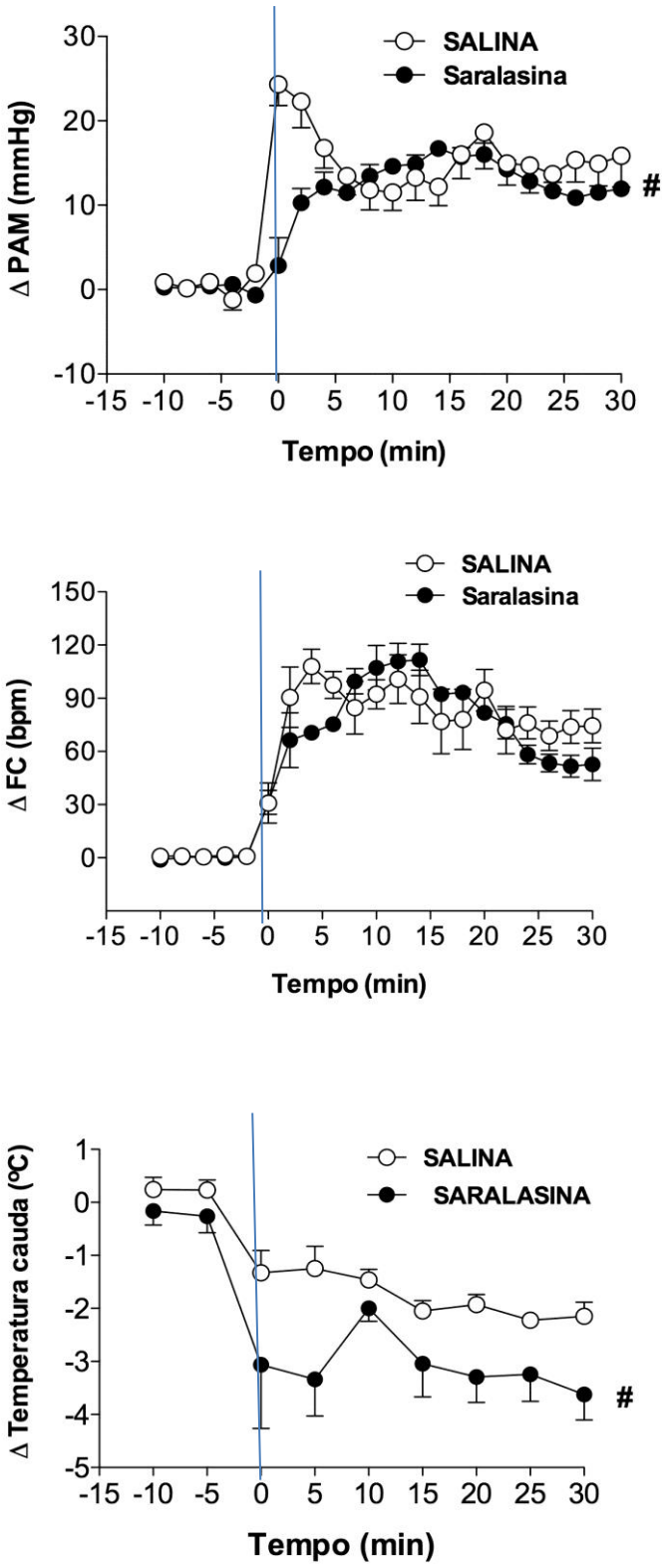
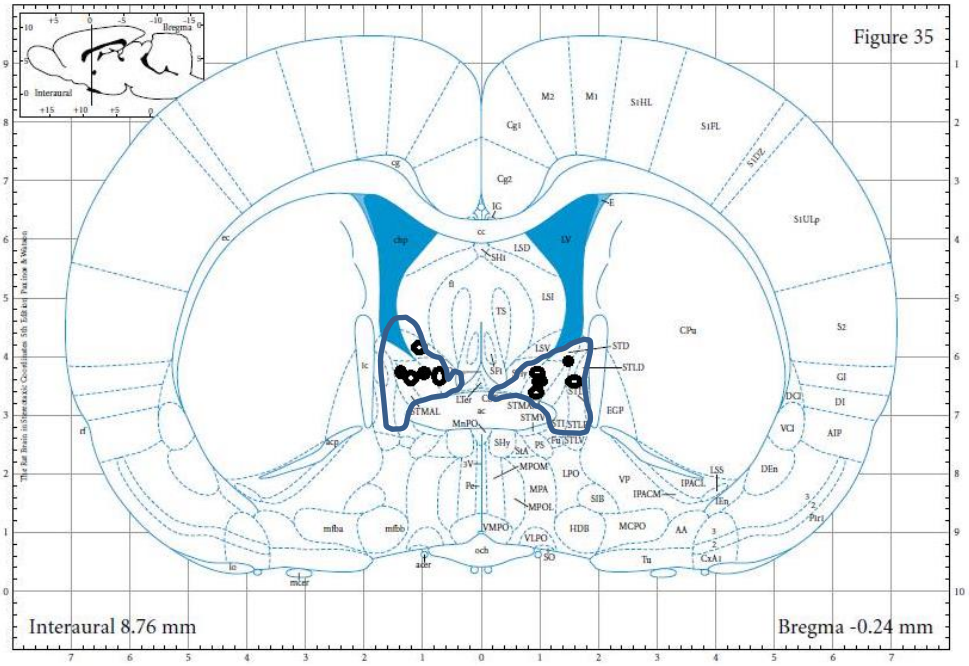


Figura 3

Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no NLET com veículo (salina, círculos brancos) ou saralasina (antagonista não-seletivo de receptores da angiotensina II, círculos pretos). O início do estresse foi no t=0. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). O sustenido 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).



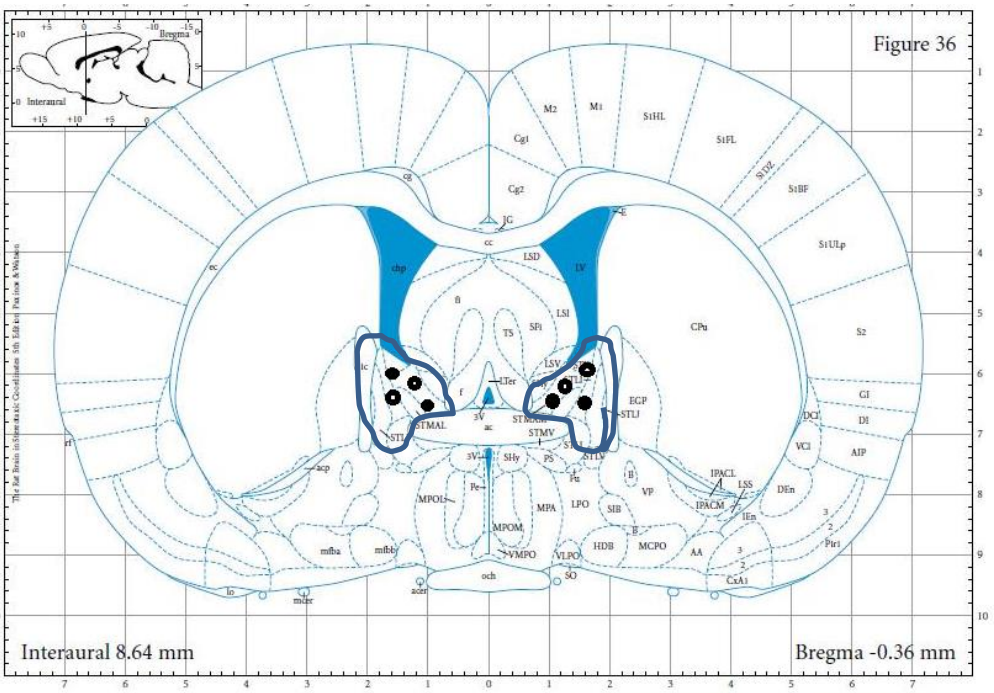


Figura 4

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 saralasina (círculos pretos).

6. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado que núcleos diretamente conectados ao 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 por 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 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 por 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 na geração das respostas cardíacas ao estresse. Entretanto, o mecanismo neuroquímico local envolvido neste controle pelo NLET ainda é pouco compreendido.

A presença de um SRA encefálico independente do endócrino (sistêmico) tem sido demonstrado (WRIGHT & HARDING,2013). Estudos recentes tem sugerido um envolvimento da angiotensina II encefálica nas respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse (WRIGHT & HARDING, 2013), incluindo os ajustes cardiovasculares (MAYOROV, 2011). Foram identificados terminais angiotensinérgicos e vários componentes do SRA no NLET, incluindo o angiotensinogênio, a ECA e receptores angiotensinérgicos (CHAI et al. 1987; LYNCH et al. 1987; LENKEI et al. 1997). Para testar a hipótese da participação desse mecanismo neuroquímico do NLET nas respostas autônomas ao estresse por restrição nós inicialmente microinjetamos captopril (inibidor da ECA) bilateralmente no NLET antes da exposição ao estresse por restrição agudo. O tratamento do

NLET com captopril resultou em redução da temperatura cutânea da cauda desencadeada pelo estresse por restrição. A resposta de elevação da PAM e de FC nos animais tratados com captopril apresentou-se com valores próximos àqueles observados nos animais controle. Uma vez que a resposta de redução da temperatura cutânea reflete uma redução no fluxo sanguíneo da pele (Viana e Carrive, 2005), nossos dados evidenciam um envolvimento de produtos da ECA no NLET nas respostas de vasoconstrição cutânea induzidas pelo estresse por restrição.

A Angiotensina I, sob ação da ECA, é convertida em angiotensina II, na qual age em dois subtipos de receptores, denominados AT_1 e AT_2. Estudos indicam a presença do receptor AT_1 no NLET (GROVE et al. 1991; LENKEI et al. 1997). Dessa forma, de modo a confirmar um envolvimento de mecanismos angiontensinérgicos locais no NLET nas respostas autonômicas ao estresse por restrição, nós investigamos o efeito da microinjeção bilateral no NLET de saralasina, um antagonista não-seletivo de receptores da angiotensina II. Como observado após o tratamento local com captopril, a administração de saralasina não afetou a resposta de elevação da FC induzida pelo estresse por restrição. Entretanto, inesperadamente, diferente da redução na resposta de redução da temperatura cutânea da cauda observada após o tratamento com captopril, a microinjeção de saralasina no NLET resultou em facilitação desta resposta, na qual foi ainda acompanhada de uma redução na resposta de elevação da PAM. As razões para a discrepância nos efeitos observados após o tratamento do NLET com captopril e saralasina não estão claras. No entanto, é importante mencionar que a ECA possui outras ações além da produção da angiotensina II a partir da angiotensina I. Um efeito bem descrito é a inativação do peptídeo bradicinina (TURNER e HOOPER,

2003). Vale ressaltar também que vias independentes da ECA para a formação da angiontensina II no SNC tem sido descrita (por exemplo, através da ação de quimases) (WRIGHT & HARDING, 2013). Deste modo, é possível que os efeitos observados após o tratamento local do NLET com captopril sejam mediados por alterações nos níveis locais de outros mediadores neuroquímicos que não a angiotensina II (por exemplo, a bradicinina), o que pode explicar as diferenças nos efeitos observados após o tratamento com saralasina.

Evidências tem apontado que o receptor AT_1 identificado no NLET é sintetizado em neurônios extrínsecos ao núcleo (LENKEI et al. 1997), e está localizado em terminais noradrenérgicos locais (GROVE et al. 1998). Crestani e colaboradores (2009) reportaram que a microinjeção local no NLET de um antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 facilitou a resposta taquicardíaca ao estresse, porém sem interferir com a elevação da pressão arterial. Deste modo, 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 por restrição (CRESTANI et al. 2009). O possível envolvimento do NLET na resposta de redução da temperatura cutânea não foi investigada neste estudo anterior, e os dados reportados no presente estudo constituem a primeira evidência de um envolvimento do NLET no controle da resposta vascular cutânea a um estímulo aversivo não-condicionado. Entretanto, a facilitação da resposta de redução da temperatura cutânea da cauda observada nos animais tratados com saralasina vai ao encontro dos resultados indicando uma influência inibitória da neurotransmissão noradrenérgica do NLET nas respostas cardiovasculares ao estresse por restrição. Deste modo, considerando as evidências da presença do receptor AT_1 em terminais noradrenérgicos (GROVE et

al. 1998), é possível sugerir que a ação de mecanismos angiotensinérgicos do NLET no controle das respostas autonômicas ao estresse possam ser mediadas por uma modulação nos níveis locais de noradrenalina. No entanto, a ausência de uma modulação angiotensinérgica na resposta de FC se contrapõe aos resultados anteriores demonstrando um envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do NLET nesta resposta (CRESTANI et al. 2009). Deste modo, estudos futuros são necessários para melhor entender uma possível interação entre mecanismos noradrenérgicos e angiotensinérgicos no NLET no controle das respostas autônomas ao estresse.

7. CONCLUSÃO

Em suma, nossos resultados fornecem evidências de um envolvimento da neurotransmissão angiotensinérgica no NLET no controle das respostas autônomas ao estresse. Os dados obtidos indicam uma influência inibitória decorrente da ativação de receptores angiotensinérgicos no NLET na resposta vascular cutânea induzida pelo estresse por restrição, ao passo que a ativação destes receptores medeiam a resposta de elevação da pressão arterial.

8. REFERÊNCIAS

ALLEN AM, CHAI SY, SEXTON PM, LEWIS SJ, VERBENE AJ, JARROTT B, LOUIS WJ, CLEVERS J, McKinley MJ, PAXINOS G, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin converting enzyme in the medulla oblongata. Jun;9(6 Pt 2):III198-205, 1987

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:pii: 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.

DINGLEDINE, 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.

GROVE, K.L.; COOK, V.I.; SPETH, R.C. Angiotensin II receptors in the ventral portion of the bed nucleus of the stria terminalis. Neuroendocrinology. v.53, n.4, p.339-43, 1991.

GROVE, K.L.; SPETH, R.C.; PALMER, A.A.; GANONG, W.F.; STEELE, M,K. Angiotensin II receptor binding sites in the ventral portion of the bed nucleus of the stria terminalis are reduced by interruption of the medial forebrain bundle. Brain Res. v.809, n.1, p.5-11, 1998.

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.

LENKEI Z[1], PALKOVITS M, CORVOL P, LLORENS-CORTÈS C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. Oct;18(4):383-439, 1997

MAYOROV DN. Brain angiotensin AT1 receptors as specific regulators of cardiovascular reactivity to acute psychoemotional stress. Clin Exp Pharmacol Physiol. Feb;38(2):126-35, 2011

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.

PAXINOS, G; WATSON, C. The rat brain in steretaxic 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 córtex. Cereb Cortex., v.18, n.9, p.2027-35, 2008b.

SALOMÉ, N.; NGAMPRAMUAN, S.; NALIVAIKO, 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.

Turner, A.J.; Hooper, N.M. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. Trends Pharmacol Sci. v.23, n.4, p.177-83, 2003.

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.

WILSON SK, LYNCH DR, SYNDER SH. Angiotensin-converting enzyme labeled with [3H]captopril. Tissue localizations and changes in different models of hypertension in the rat. Sep; 80(3): 841–851, 1987

WRIGHT JW, HARDING JW. The brain renin-angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases. Pflugers Arch. Jan; 133-51, 2013

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, de janeiro de 2016

_____

FLAVIA GONÇALVES DE SANTANA

De acordo,

_____

PROF. DR. CARLOS CESAR CRESTANI