

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

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

Araraquara

2013

ELINÉIA APARECIDA ROSA

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO
NORADRENÉRGICA DO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO 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 “Júlio de
Mesquita Filho”, para obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica. Departamento de
Princípios Ativos Naturais e Toxicologia,
laboratório de Farmacologia, área de
Neurofarmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos César Crestani

Co-orientadora: Josiane de Oliveira Duarte

Araraquara

2013

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Carlos César Crestani pela paciência durante todo o período do estágio de iniciação científica, sempre muito solícito e dedicado, sendo o responsável pelo conhecimento que adquiri nesta iniciação à pesquisa e pela realização deste estudo.

À minha co-orientadora Josiane de Oliveira Duarte pela ajuda durante os experimentos, pelas canulações nas artérias femorais dos meus animais, bem como, por todo o auxílio e atenção dispendida durante este período.

Às técnicas Elisabete Zocal Paro Lepera e Rosana Finoti Pupim Silva pela atenção e disposição em explicar e ensinar como se deve trabalhar em um laboratório, preparo das drogas, dentre tantos outros ensinamentos que foram essenciais para o meu desenvolvimento dentro do laboratório e para a minha organização.

Aos meus pais Célia Barbieri Rosa e Clóvis Rosa por todo o suporte e apoio durante o período da graduação e, também, por toda educação, por serem os responsáveis pela pessoa que sou. Devo todas as minhas conquistas a vocês.

Ao meu irmão Leandro Rosa por todo o auxílio durante as minhas dúvidas e dificuldades com relação à tecnologia e programas de computadores, pela ajuda na formatação de relatórios, bem como, deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	11
3. METODOLOGIA	12
3.1- Animais	12
3.2- Técnica de implante de cânulas guias no córtex pré-límbico (PL)	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 pré-límbico (PL)	15
3.9- Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas	16
3.10- Análise estatística	16
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	17
4.1- Efeito do tratamento do PL com WB4101 sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos	17
4.2- Efeito do tratamento do PL com RX821002 sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos	18
4.3- Efeito do tratamento do PL com propranolol sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos	18
5. RESULTADOS	19
5.1- Efeito do tratamento do PL com WB4101 sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos	19

5.2- Efeito do tratamento do PL com RX821002 sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.....	22
5.3- Efeito do tratamento do PL com propranolol sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.....	25
6. DISCUSSÃO.....	28
7. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

RESUMO

As respostas fisiológicas durante o estresse emocional são mediadas por estruturas límbicas no sistema nervoso central através da ação de vários mecanismos neuroquímicos. O córtex pré-frontal medial (CPFM) é uma região límbica envolvida na integração de respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse. Estudos anteriores demonstraram que as sub-regiões do CPFM denominadas pré-límbica (PL) e infra-límbica (IL) parecem ter funções diferentes no controle das respostas ao estresse. Neste sentido, estudos tem sugerido uma função inibitória do córtex PL, ao passo que a ativação do córtex IL parece ter uma ação facilitatória sobre as respostas comportamentais, cardiovasculares e neuroendócrinas ao estresse. Apesar das evidências de um importante papel do CPFM na integração das respostas ao estresse, informações acerca dos mecanismos neuroquímicos locais, envolvidos no controle destas respostas, ainda são escassos. Diante disso, o presente estudo teve o objetivo de investigar, em grupos independentes de animais, o efeito da microinjeção bilateral no córtex PL de WB4101 (antagonista seletivo de adrenoceptores α_1), RX821002 (antagonista seletivo de adrenoceptores α_2) ou propranolol (antagonista não-seletivo de adrenoceptores β) nas 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 no córtex PL tanto de WB4101 quanto de RX821002 reduziram as respostas de elevação da PA e FC e a redução na temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse por restrição. O tratamento local do córtex PL com propranolol reduziu a resposta de temperatura cutânea da cauda, sem afetar os demais parâmetros investigados. Assim, os nossos

resultados sugerem que a neurotransmissão noradrenérgica no PL tem uma ação facilitatória sobre as respostas pressora, taquicárdica e de redução de temperatura cutânea desencadeada pelo estresse por restrição agudo. Os efeitos sobre a pressão arterial e frequência cardíaca parecem decorrer principalmente da ativação de adrenocetores α no córtex PL, ao passo que o efeito na temperatura cutânea é mediado pela ativação de adrenocetores α e β locais.

Palavras – chave: córtex pré-límbico, neurotransmissão noradrenérgica, respostas autônomas.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.....	20
FIGURA 2.....	21
FIGURA 3.....	23
FIGURA 4.....	24
FIGURA 5.....	26
FIGURA 6.....	27

1. INTRODUÇÃO

Todos os indivíduos são, em maior ou menor grau, continuamente expostos a situações de estresse. A sobrevivência e a adaptação de todas as espécies à situações aversivas requer um adequado e coordenado conjunto de respostas fisiológicas (Dampney, et al., 2008; Ulrich-Lai & Herman, 2009). O sistema nervoso autônomo promove a resposta imediata ao estresse, que é caracterizada por alterações na atividade cardiovascular, que incluem: aumento na pressão arterial e frequência cardíaca (FC), redução do fluxo sanguíneo na pele e vísceras e alteração na atividade do barorreflexo (Barron & Van Loon, 1989; Dampney, et al, 2008; Crestani et al, 2010). A diminuição no fluxo sanguíneo da pele causa redução na temperatura cutânea durante o estresse (Vianna & Carrive, 2005; Busnardo et al, 2010). A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) durante o estresse promove aumento no nível plasmático de glicocorticóide, com valores máximos plasmáticos do hormônio observados alguns minutos após o início do estresse (Ulrich-Lai & Herman, 2009). Apesar da importância das respostas fisiológicas durante reações defensivas, 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 (SNC), 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, que é dividida em córtex cingulado 1 (Cg 1) e 2 (Cg 2), córtex pré-límbico (PL), córtex infra-límbico (IL) e córtex peduncular dorsal (DP) (Zilles & Wree, 1985; Resstel & Correa, 2006). Estudos anteriores demonstraram que a lesão seletiva do córtex PL aumentou as respostas neuroendócrinas e cardiovasculares

induzidas pelo estresse, ao passo que a lesão do córtex IL diminuiu as respostas fisiológicas desencadeadas por estímulos aversivos (Fryszak & Neafsey, 1994; Randley et al, 2006; Tavares et al, 2009). Baseado nestas evidências tem sido proposto uma regionalização no controle exercido pelo CPFM das respostas defensivas, com a ativação do córtex PL conferindo inibição e o córtex IL tendo uma função facilitatória sobre estas respostas (Ulrich-Lai & Herman, 2009). Apesar das evidências acima indicarem um importante papel do CPFM na integração das respostas fisiológicas ao estresse, informações acerca dos mecanismos neuroquímicos locais envolvidos nestas respostas ainda são escassos.

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 aumentam os níveis extracelulares de noradrenalina no CPFM (Gresch et al, 1995; Kawahara et al, 1999). Além disso, foi demonstrado que a lesão de terminais catecolaminérgicos no CPFM inibiu a ativação neuronal local induzida pelo estresse, bem como a de outras estruturas subcorticais envolvidas no controle de respostas fisiológicas e comportamentais durante situações aversivas (Spencer & Day, 2004). 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, não existem evidências na literatura acerca do envolvimento de adrenoceptores do CPFM nas respostas cardiovasculares 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; Busnardo et al, 2013; Crestani, et al, 2010). Diante do exposto, o presente estudo tem como hipótese que a neurotransmissão noradrenérgica no córtex PL tem uma função inibitória sobre as respostas autônomas desencadeadas pelo estresse por restrição agudo em ratos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é estudar o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do córtex PL nas respostas autônomas observadas durante o estresse por restrição agudo em ratos. Para tanto, os objetivos específicos são:

- 1) Estudar o efeito da microinjeção bilateral no córtex PL de WB4101, antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 (10nmol/100nL), 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 PL de RX821002, antagonista seletivo de adrenoceptores α_2 (10nmol/100nL), 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 PL de propranolol, antagonista não-seletivo de adrenoceptores β (10nmol/100nL), 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 com peso corporal variando entre 240-260g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - UNESP (Botucatu/SP). Os animais tiveram acesso livre a ração granulada e água, exceto durante o experimento, 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 FCF-UNESP (protocolo: CEUA/FCF/CAr. 10/2012).

3.2- Técnica de implante de cânulas guias no córtex pré-límbico (PL)

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 a 70%. Para redução do sangramento durante a cirurgia, foi injetado 0,3 ml de solução de lidocaína com vasoconstritor (3% de levoarterenol, Harvey Química Farmacêutica Ind. e Comércio Ltda, Catanduva, SP). A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se completamente o periósteo. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada a 10%. Todas as coordenadas tiveram como referência os parâmetros obtidos do Atlas de Paxinos & Watson (1997), ajustados ao peso corporal do animal (Borges, 1999). O bregma foi utilizado como ponto de referência para as coordenadas.

Córtex Pré-Límbico (PL)

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

Lateral: + 1,9 mm a partir da linha média;

Vertical: - 2,4 mm em relação ao osso;

Ângulo: 24°

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 G) com 11 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 tribromoetanol (intraperitoneal, 250 mg/kg) para implantação de catéteres na artéria femoral, no qual foi utilizado para registro da pressão arterial. Este vaso foi dissecado e um catéter de polietileno foi introduzido até a artéria aorta abdominal inferior. Os catéteres 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 catéteres, os mesmos foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica. 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 catéteres para desobstrução dos mesmos. O catéter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., Midvale, UT, USA). A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada utilizando um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Austrália), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizados (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 (PAP).

3.5- Drogas utilizadas

O WB4101 (antagonista seletivo de adrenoceptores α_1) (Tocris, EUA), RX821002 (antagonista seletivo de adrenoceptores α_2) (Tocris, EUA), propranolol (antagonista não-seletivo de adrenoceptores 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 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 & 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.

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 buracos de ½ polegada, que preencham, 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.

3.8- Microinjeção de drogas no córtex pré-límbico (PL)

As agulhas injetoras (33 G, Small Parts, EUA), que foram utilizadas para microinjeção das drogas no SNC, eram um milímetro mais longa do que as cânulas guias fixadas ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2 µl utilizando um fio de polietileno PE-10 (7002-KH, Hamilton, EUA). As drogas foram injetadas no volume de 100 nL.

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 cérebros foram retirados da caixa craniana e pós-fixados na respectiva solução de perfusão. Os cérebros foram seccionados com o auxílio de um criostato. Foram feitas várias secções da região do córtex PL 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±erro padrão da média (EPM). O efeito dos tratamentos farmacológicos sobre os valores basais de pressão arterial, frequência cardíaca 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 de pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura cutânea da cauda durante o estresse por restrição agudo.

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas ao córtex PL e, mantidos em recuperação por, no mínimo, três dias. O experimento foi realizado 24 horas após a implantação de um catéter na artéria femoral. Os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação por 60 minutos antes do início do experimento, para habituação às condições de som e iluminação da sala. Após este período, foi iniciado o registro dos parâmetros cardiovasculares. Um registro de pelo menos 30 minutos foi realizado para determinação dos valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca.

4.1- Efeito do tratamento do PL com WB4101 sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.

Grupos diferentes de animais receberam microinjeção bilateral no PL de veículo (salina, 100nl, n=7) ou WB4101 (antagonista seletivo de adrenoceptores α_1) (10 nmol/100nL, n=6) no córtex PL. A dose de WB4101 foi baseada em estudos anteriores (Crestani et al., 2009, Fortaleza et al., 2012a). Dez minutos após o tratamento do córtex PL, os animais foram submetidos a uma sessão de 30 minutos de estresse por restrição. O registro de pressão arterial e frequência cardíaca foram iniciados 30 minutos antes do início da sessão de estresse e realizado durante todo o período de restrição. A temperatura cutânea da cauda foi medida aos 10, 5 e 0 minuto antes da restrição, e a cada 5 minutos durante a restrição.

4.2- Efeito do tratamento do PL com RX821002 sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.

Grupos diferentes de animais receberam microinjeção bilateral no PL de veículo (salina, 100 nL, n=7) ou RX821002 (antagonista seletivo de adrenoceptores α_2) (10 nmol/100nL, n=6). A dose de RX821002 foi baseada em estudos anteriores (Crestani et al., 2009, Fortaleza et al., 2012a). Dez minutos após o tratamento do córtex PL, os animais foram submetidos a uma sessão de 30 minutos de estresse por restrição. O registro de pressão arterial e frequência cardíaca foram iniciados 30 minutos antes do início da sessão de estresse, e realizado durante todo o período de restrição. A temperatura cutânea da cauda foi medida aos 10, 5 e 0 minuto antes da restrição, e a cada 5 minutos durante a restrição.

4.3- Efeito do tratamento do PL com propranolol sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.

Grupos diferentes de animais receberam microinjeção bilateral no PL de veículo (salina, 100 nL, n=7) ou propranolol (antagonista não-seletivo de adrenoceptores β) (10 nmol/100 nL, n=6). A dose de propranolol foi baseada em estudos anteriores (Crestani et al., 2009, Fortaleza et al., 2012b). Dez minutos após o tratamento farmacológico do córtex PL, os animais foram submetidos a uma sessão de 30 minutos de estresse por restrição. O registro de pressão arterial e frequência cardíaca foram iniciados 30 minutos antes do início da sessão de estresse, e realizado durante todo o período de restrição. A temperatura cutânea da cauda foi medida aos 10, 5 e 0 minuto antes da restrição, e a cada 5 minutos durante a restrição.

5. RESULTADOS

5.1- Efeito do tratamento do PL com WB4101 sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.

O tratamento bilateral do PL com WB4101 (10nmol/100nL, n=6), antagonista seletivo de adrenoreceptores α_1 , não afetou os parâmetros basais de PAM (105 ± 6 vs 102 ± 7 mmHg, $t=0,3$, $P>0,05$), FC (365 ± 8 vs 379 ± 14 bpm, $t=0,8$, $P>0,05$) e temperatura cutânea da cauda ($29,1\pm 0,6$ vs $28,0\pm 0,3$ °C, $t=1,6$, $P>0,05$). O estresse por restrição agudo causou aumento na PAM ($F_{(20,231)}=9$, $P<0.0001$) e FC ($F_{(20,231)}=5$, $P<0.0001$) e redução da temperatura cutânea da cauda ($F_{(8,99)}=9$, $P<0.0001$) (Figura 1). Além disso, o tratamento do córtex PL com WB4101 reduziu as respostas pressora ($F_{(1,231)}=29$, $P<0.0001$), taquicárdica ($F_{(1,231)}=14$, $P<0.0003$) e de redução da temperatura cutânea da cauda ($F_{(1,99)}=20$, $P<0.0001$) desencadeadas pelo estresse por restrição (Figura 1). A análise não identificou interação entre os fatores tempo e tratamento para as medidas de PAM ($F_{(20,231)}=1$, $P>0.05$), FC ($F_{(20,231)}=0,9$, $P>0.05$) e temperatura cutânea ($F_{(8,99)}=1$, $P>0.05$). Representação diagramática dos sítios de injeção no córtex PL de todos os animais utilizados neste protocolo é apresentada na Figura 2.

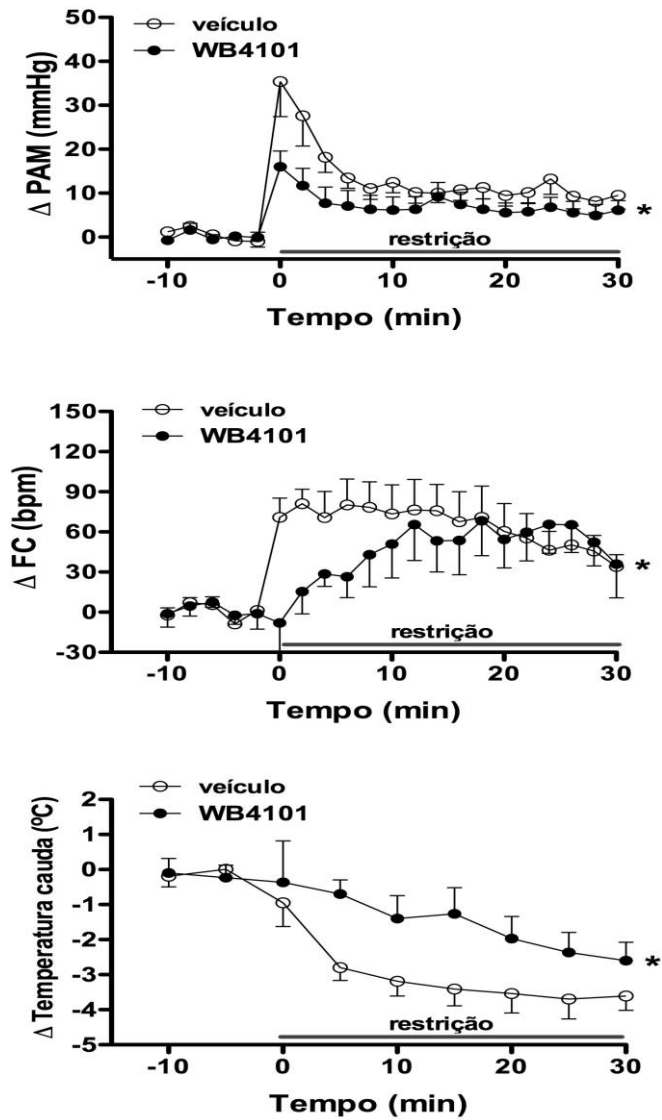


Figura 1

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 PL com veículo (salina, 100nL) ou WB4101 (10nmol/100nL), antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 . 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).

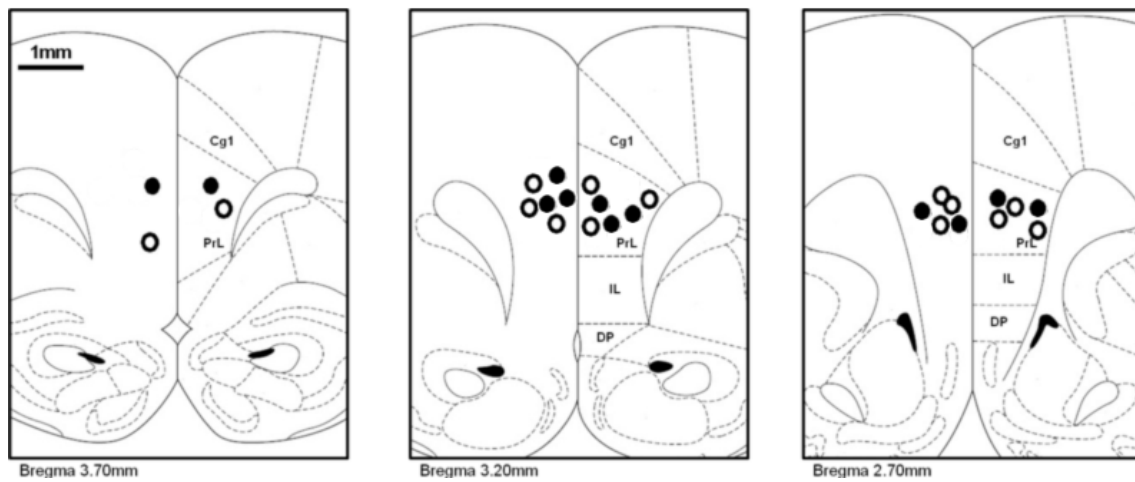


Figura 2

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

5.2- Efeito do tratamento do PL com RX821002 sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.

O tratamento bilateral do PL com RX821002 (10nmol/100nL, n=6), antagonista seletivo de adrenoceptores α_2 , não afetou os parâmetros basais de PAM (105 ± 6 vs 108 ± 2 mmHg, $t=0,5$, $P>0,05$), FC (365 ± 8 vs 370 ± 11 bpm, $t=0,4$, $P>0,05$) e temperatura cutânea da cauda ($29,1\pm 0,6$ vs $27,5\pm 0,5$ °C, $t=2,0$, $P>0,05$). O estresse por restrição agudo causou aumento na PAM ($F_{(20,231)}=8$, $P<0.0001$) e FC ($F_{(20,231)}=5$, $P<0.0001$) e redução da temperatura cutânea da cauda ($F_{(8,99)}=18$, $P<0.0001$) (Figura 3). Além disso, o tratamento do córtex PL com RX821002 reduziu as respostas pressora ($F_{(1,231)}=105$, $P<0.0001$), taquicárdica ($F_{(1,231)}=88$, $P<0.0001$) e de redução da temperatura cutânea da cauda ($F_{(1,99)}=50$, $P<0.0001$) desencadeadas pelo estresse por restrição (Figura 3). A análise identificou interação entre os fatores tempo e tratamento para as medidas de PAM ($F_{(20,231)}=3,5$, $P<0.0001$) e temperatura cutânea ($F_{(8,99)}=2,5$, $P<0.01$), porém não para a FC ($F_{(20,231)}=1$, $P>0.05$). Representação diagramática dos sítios de injeção no córtex PL de todos os animais utilizados neste protocolo é apresentada na Figura 4.

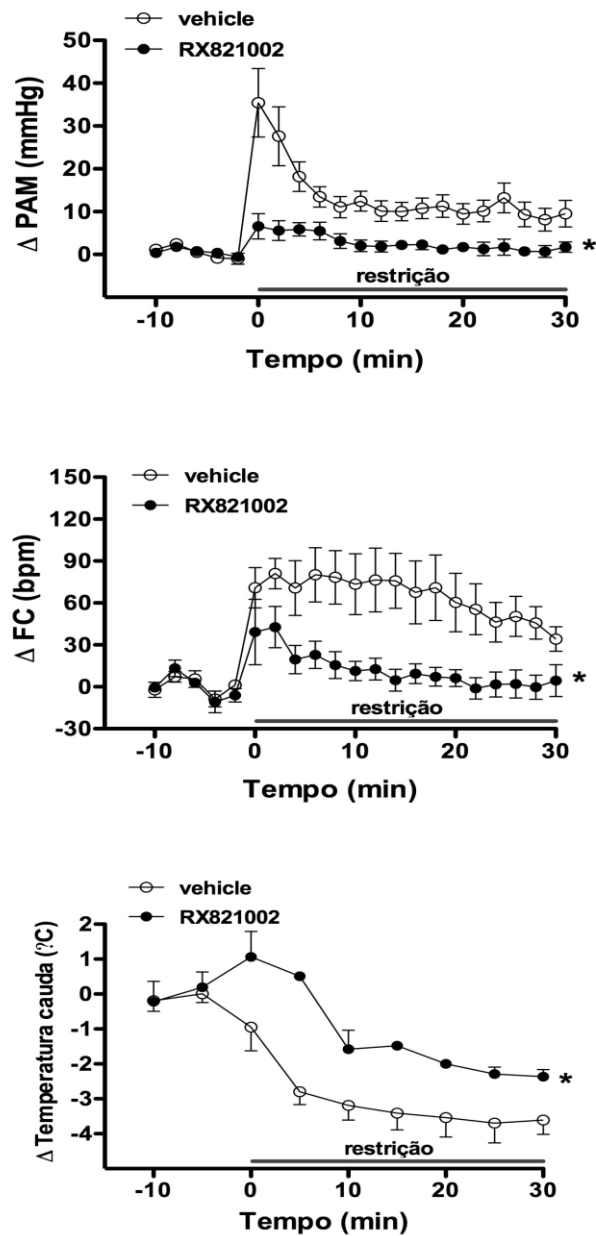


Figura 3

Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura da cauda durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no PL com veículo (salina, 100nL) ou RX821002 (10nmol/100nL), antagonista seletivo de adrenoceptores α_2 . 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).

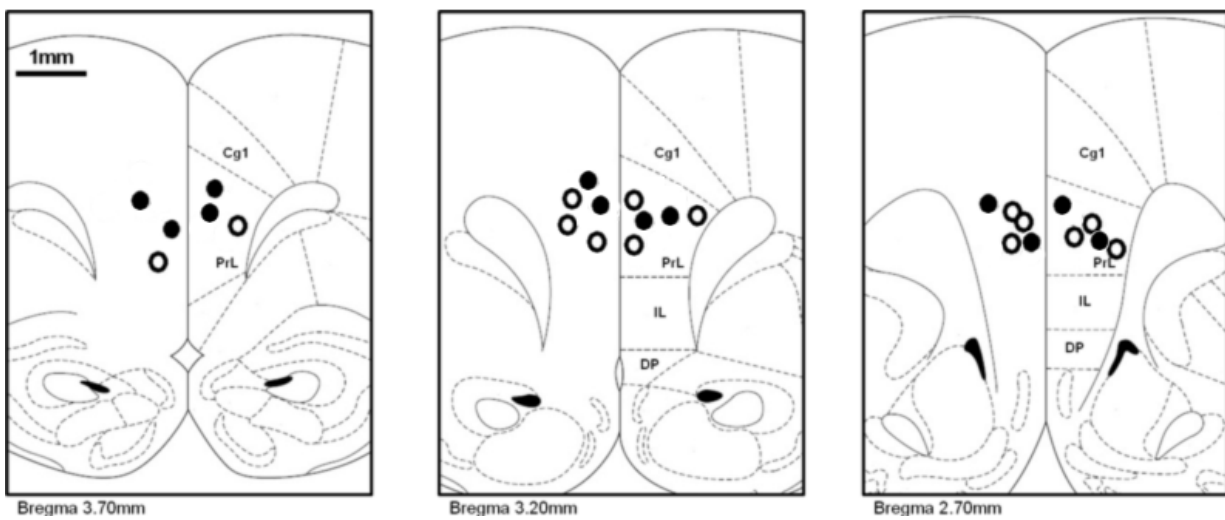


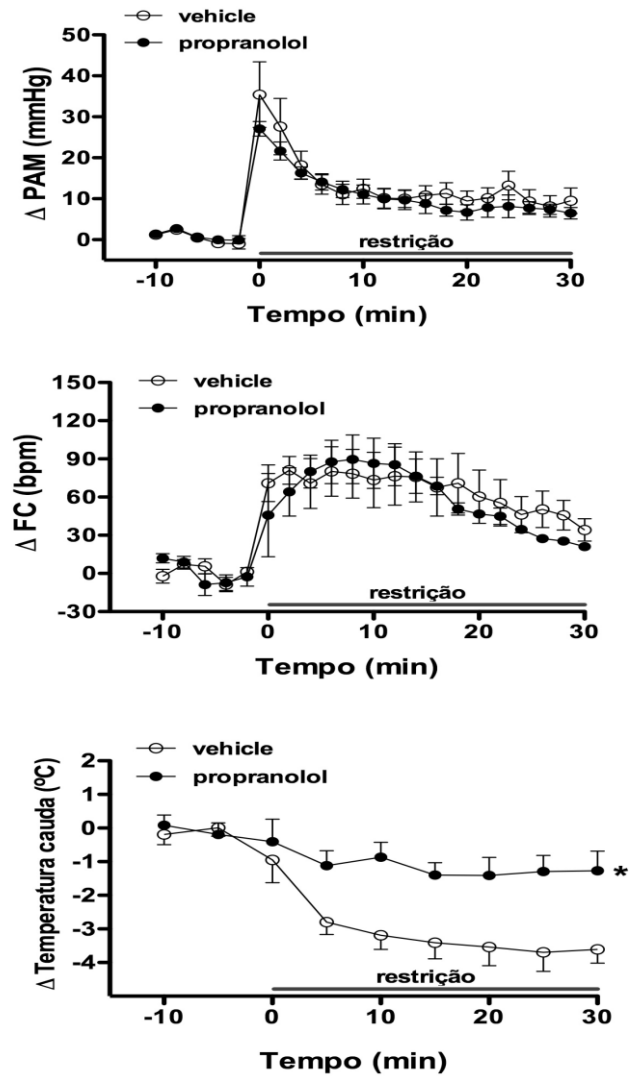
Figura 4

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

5.3- Efeito do tratamento do PL com propranolol sobre as respostas autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.

O tratamento bilateral do PL com propranolol (10nmol/100nL, n=6), antagonista não-seletivo de adrenoceptores β , não afetou os parâmetros basais de PAM (105 ± 6 vs 106 ± 4 mmHg, $t=0,2$, $P>0,05$), FC (365 ± 8 vs 360 ± 5 bpm, $t=0,5$, $P>0,05$) e temperatura cutânea da cauda ($29,1\pm 0,6$ vs $27,3\pm 0,5$ °C, $t=2,0$, $P>0,05$). O estresse por restrição agudo causou aumento na PAM ($F_{(20,210)}=14$, $P<0.0001$) e FC ($F_{(20,210)}=9$, $P<0.0001$) e, redução da temperatura cutânea da cauda ($F_{(8,90)}=10$, $P<0.0001$) (Figura 5). Além disso, o tratamento do córtex PL com propranolol reduziu a resposta de redução da temperatura cutânea da cauda desencadeada pelo estresse por restrição ($F_{(1,90)}=43$, $P<0.0001$) (Figura 5). Entretanto, as respostas pressora ($F_{(1,210)}=3$, $P>0.05$) e taquicárdica ($F_{(1,210)}=1$, $P>0.05$) não foram afetadas pelo bloqueio de adrenoceptores β locais no córtex PL. A análise identificou ainda interação entre os fatores tempo e tratamento a medida de temperatura cutânea ($F_{(8,90)}=2,2$, $P<0.03$). Representação diagramática dos sítios de injeção no córtex PL de todos os animais utilizados neste protocolo é apresentada na Figura 6.

Title

**Figura 5**

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 PL com veículo (salina, 100nL) ou propranolol (10nmol/100nL), antagonista não-seletivo de adrenoceptores β . 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).

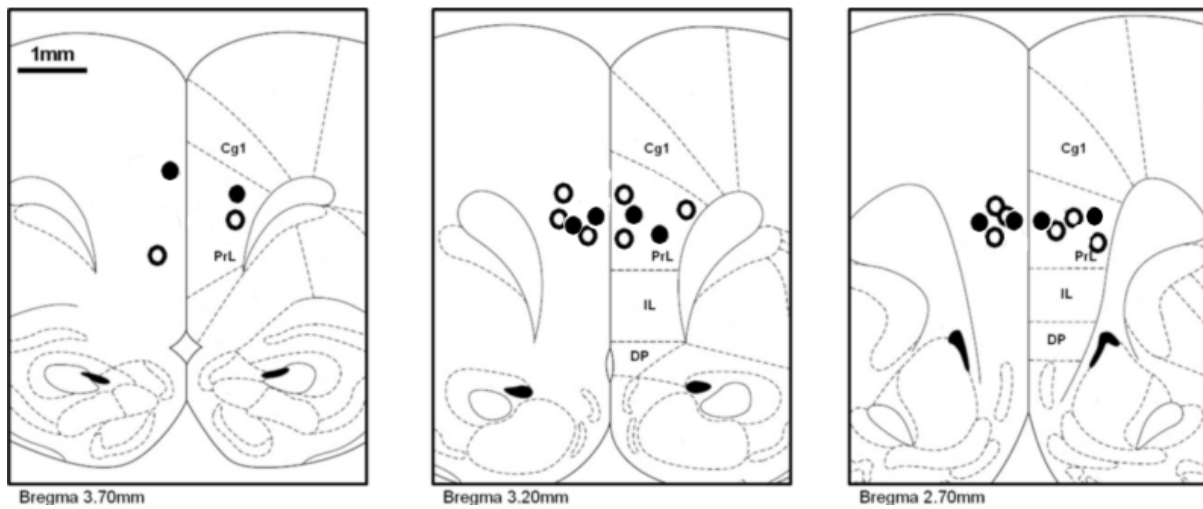


Figura 6

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

6. DISCUSSÃO

O estresse por restrição é um estímulo aversivo inescapável e não-condicionado, conhecido por provocar alterações autonômicas (por exemplo: elevação da PA e FC e modulação da atividade barorreflexa), neuroendócrinas (ativação do eixo HPA) e comportamentais (diminuição na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado) (Barron e Van Loon, 1989; Irvine et al, 1997; McDougall et al. 2000; Crestani et al, 2010; Busnardo et al, 2013). Além disso, durante o estresse o fluxo sanguíneo diminui em alguns leitos vasculares (tais como: cutâneo e mesentérico) para aumentar o aporte sanguíneo para regiões mais requisitadas durante as respostas defensivas (por exemplo: musculatura esquelética e coração) (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). Deste modo, como esperado, nós observamos que uma sessão aguda de estresse por restrição causou elevação da PA e FC e redução da temperatura cutânea da cauda.

Estudos anteriores mostraram que o bloqueio sináptico não-seletivo do córtex PL através do tratamento local com CoCl_2 aumentou a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse por restrição agudo, sem interferir com a resposta pressora (Tavares & Correa, 2006; Tavares et al, 2009). Estes resultados sugeriram uma influência inibitória da região PL do CPFM nas respostas cardíacas ao estresse por restrição. Entretanto, os mecanismos neuroquímicos locais no córtex PL envolvidos no controle da função cardíaca durante o estresse por restrição ainda são pouco compreendidos.

Circuitos noradrenérgicos centrais são rapidamente ativados durante situações aversivas (Joels et al, 2009). Além disso, foi demonstrado que a neurotransmissão noradrenérgica no CPFM é um importante mecanismo envolvido no controle da função cardiovascular (Fernandes et al, 2003; Resstel & Correa, 2006). Neste sentido, no presente estudo nós investigamos um possível envolvimento de mecanismos noradrenérgicos do córtex PL no controle das respostas autônomas ao estresse por restrição. Para tanto, nós, inicialmente, microinjetamos WB4101 bilateralmente no córtex PL antes da exposição dos ratos ao estresse por restrição, com intuito de bloquear os adrenocetores α_1 locais. O pré-tratamento do córtex PL com WB4101 reduziu as respostas pressora, taquicárdica e de redução da temperatura cutânea induzidas pelo estresse por restrição agudo.

Nós também investigamos um possível envolvimento dos adrenocetores α_2 através da microinjeção bilateral de RX821002 no córtex PL. O efeito do tratamento com RX821002 foi semelhante ao observado com o WB4101, uma vez que as respostas de PAM, FC e temperatura da pele foram atenuadas após o tratamento do córtex PL com este fármaco. Além dos adrenocetores α , também foi investigado o efeito do bloqueio de adrenocetores β no córtex PL por meio do tratamento local com propranolol (antagonista não-seletivo de adrenocetores β). Diferente do observado após o antagonismo dos adrenocetores α , o tratamento com propranolol afetou somente a resposta de redução da temperatura cutânea, sem interferir com as respostas pressora e taquicárdica. Esses resultados evidenciam que mecanismos noradrenérgicos no córtex PL, atuando através de adrenocetores α_1 e α_2 , medeiam as respostas pressora e taquicárdica ao estresse por restrição; ao passo que a resposta de redução da temperatura cutânea parece

dependem da ativação de adrenoreceptores α e β no córtex PL. Vale ressaltar que estes são os primeiros resultados a mostrar um papel do CPFM no controle das respostas vasculares e de pressão arterial durante o estresse por restrição, uma vez que os estudos anteriores somente evidenciaram uma influência do córtex PL no controle das respostas cardíacas ao estresse por restrição.

Os efeitos sobre as respostas autonômicas ao estresse por restrição observados após bloqueio de receptores noradrenérgicos no córtex PL foram opostos àqueles observados anteriormente após o bloqueio não-seletivo de sinapses nesta estrutura induzido pelo tratamento local com CoCl_2 (Tavares & Correa, 2006; Tavares et al, 2009). No entanto, Tavares e Correa (2006) relataram que a microinjeção local no córtex PL de um antagonista seletivo do receptor glutamatérgico NMDA (LY235959) na região PL do CPFM causou efeitos similares àqueles observados após o tratamento local com CoCl_2 , ao facilitar a resposta taquicárdica do estresse por restrição sem interferir com a elevação da pressão arterial. O efeito do bloqueio de receptores glutamatérgicos não-NMDA também foi verificado neste mesmo estudo, porém a microinjeção bilateral no córtex PL de um antagonista seletivo destes receptores (NBQX) não afetou as respostas cardiovasculares do estresse por restrição. Deste modo, baseado nestes resultados, foi sugerido que a neurotransmissão glutamatérgica, agindo através da ativação do receptor NMDA, é um importante mecanismo local envolvido na influência inibitória do córtex PL na resposta cardíaca ao estresse por restrição (Tavares & Correa, 2006).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, e estudos eletrofisiológicos tem demonstrado que este neurotransmissor tem ação excitatória sobre a atividade de neurônios do córtex PL

(Wallace et al, 2013). Por outro lado, foi demonstrado que a estimulação do locus coeruleus (principal origem dos terminais noradrenérgicos do córtex PL) ou a microinjeção local de noradrenalina tem uma influência inibitória sobre a atividade de neurônios do CPFM (Bunney e Aghajanian, 1976; Mantz et al, 1988; Thierry et al, 1992; Wallace et al, 2013). A partir das evidências de que o bloqueio sináptico inespecífico com CoCl_2 ou o antagonismo do receptor glutamatérgico NMDA no córtex PL causam efeitos similares sobre as respostas cardiovasculares ao estresse por restrição (Tavares & Correa, 2006), ao passo que o tratamento local com antagonistas de receptores noradrenérgicos influencia de maneira oposta estas respostas, pode-se sugerir que o glutamato tem um papel proeminente no controle das respostas autônomas pelo córtex PL, de modo que mecanismos noradrenérgicos locais teriam uma ação modulatória sobre os efeitos do glutamato. Esta ação modulatória parece não decorrer de uma influência direta da noradrenalina na neurotransmissão glutamatérgica, pois tem sido demonstrado que mecanismos noradrenérgicos facilitam a liberação local de glutamato no córtex PL (Flint et al, 1985; Marek & Aghajanian, 1999).

As respostas taquicárdicas e pressoras durante o estresse são mediadas por aumento na atividade 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 córtex PL envia projeções diretas para estruturas bulbares envolvidas no controle da atividade autonômica (Vertes, 2004). Neste sentido, foi demonstrado que alterações na atividade simpática

são um importante mecanismo envolvido no controle da função cardiovascular pelo CPFM (Resstel & Correa, 2006). Além disso, a influência inibitória da neurotransmissão glutamatérgica do córtex PL sobre a resposta cardíaca ao estresse por restrição decorre de uma facilitação da atividade parassimpática cardíaca (Tavares & Correa, 2006). Deste modo, a influência facilitatória dos adrenoceptores α_1 e α_2 no córtex PL sobre a resposta taquicárdica ao estresse por 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 e do fluxo sanguíneo cutâneo por mecanismos noradrenérgicos no córtex PL também deve decorrer da facilitação de vias que estimulam a atividade simpática.

7. CONCLUSÃO

Os nossos resultados sugerem que a neurotransmissão noradrenérgica no PL tem uma ação facilitatória sobre as respostas pressora, taquicárdica e de redução de temperatura cutânea desencadeadas pelo estresse por restrição agudo. Os efeitos sobre a pressão arterial e frequência cardíaca parecem decorrer, principalmente, da ativação de adrenocetores α no córtex PL, ao passo que o efeito na temperatura cutânea é mediado pela ativação de adrenocetores α e β locais.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BORGES, R.F.B. **Ajustes de coordenadas estereotáxicas para ratos com pesos variáveis**. 1999. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.
- BUNNEY, B.S.; AGHAJANIAN, G.K. Dopamine and norepinephrine innervated cells in the rat prefrontal cortex: pharmacological differentiation using microiontophoretic techniques. **Life Sci.**, v.19, n.11, p.1783-9, 1976.
- BUSNARDO, C.; ALVES, F.H.; CRESTANI, C.C.; SCOPINHO, A.A.; RESSTEL, L.B.; CORREA, F.M. Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **Eur Neuropsychopharmacol.**, in press, doi: 10.1016/j.euroneuro.2012.11.002.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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]dihidroalprenolol. **Brain Res**, v. 402, p. 403-408, 1987.

FERNANDES, K.B.; CRIPPA, G.E.; TAVARES, R.F.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CORRÊA, F.M. Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline injection into the cingulate cortex of unanesthetized rats. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 6, p. 757-63, 2003.

FLINT, R.S.; MURPHY, J.M.; CALKINS, P.M.; MCBRIDE, W.J. Monoamine, amino acid and cholinergic interactions in slices of rat cerebral cortex. **Brain Res Bull.**, v.15, n.2, p.197-202, 1985.

FORTALEZA, E.A.; SCOPINHO, A.A.; DE AGUIAR CORRÊA, F.M. α_1 and α_2 -adrenoceptors in the medial amygdaloid nucleus modulate differently the cardiovascular responses to restraint stress in rats. **Pharmacol Res.**, v.66, n.2, p.154-62, 2012a.

FORTALEZA, E.A.; SCOPINHO, A.A.; CORRÊA, F.M. Beta-adrenoceptors in the medial amygdaloid nucleus modulate the tachycardiac response to restraint stress in rats. **Neuroscience**, v.227, p.170-9, 2012b.

FRYSZTAK, R.J.; NEAFSEY, E.J. The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. **Brain Res.** v.643, n. 1-2, p. 181-93, 1994.

GRESCH, P.J.; SVED, A.F.; ZIGMOND, M.J.; FINLAY, J.M. Local influence of endogenous norepinephrine on extracellular dopamine in rat medial prefrontal cortex. **J Neurochem.**, v.65, p. 111-6, 1995.

IRVINE, R. J.; WHITE, J.; CHAN, R. The influence of restraint on blood pressure in the rat. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 38, n. 3, p. 157-62, 1997.

JOELS, M. e BARAM, T.Z. The neuro-symphony of stress. **Nat Rev Neurosci**, v.10, n.6, Jun, p.459-66. 2009.

KAWAHARA, Y.; KAWAHARA, H.; WESTERINK, B.H. Comparison of effects of hypotension and handling stress on the release of noradrenaline and dopamine in the locus coeruleus and medial prefrontal cortex of the rat. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, v.360, p. 42-9, 1999.

MANTZ, J.; MILLA, C.; GLOWINSKI, J.; THIERRY A.M. Differential effects of ascending neurons containing dopamine and noradrenaline in the control of spontaneous activity and of evoked responses in the rat prefrontal cortex **Neuroscience**, v.27, p. 517–526, 1988.

MAREK, G.J.; AGHAJANIAN, G.K. 5-HT_{2A} receptor or α ₁-adrenoceptor activation induces excitatory postsynaptic currents in layer V pyramidal cells of the medial prefrontal cortex. **Eur. J. Pharmacol.**, v.367, p. 197–206, 1999.

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.

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.

RESSTEL, L.B.; CORRÊA, F.M. Involvement of the medial prefrontal cortex in central cardiovascular modulation in the rat. **Auton Neurosci.**, v.126-127, p.130-8, 2006.

RESSTEL, L.B.M.; JOCA, S.R.L.; GUIMARÃES, F.G.; CORRÊA, F.M.A. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. **Neuroscience.**, v.143, p. 377-385, 2006.

SPENCER, S.J.; DAY, T.A. Role of catecholaminergic inputs to the medial prefrontal cortex in local and subcortical expression of Fos after psychological stress. **J Neurosci Res.** v.78, n.2, p. 279-88, 2004.

TAVARES, R.F.; CORRÊA, F.M. Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. **Neuroscience.**, v.143, n.1, p.231-40, 2006.

TAVARES, R.F.; CORREA, F.M.; RESSTEL, L.B. Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. **J Neurosci Res**, v. 87, n.11, p.2601-7, 2009.

THIERRY, A.M.; MANTZ, J.; GLOWINSKI J. Influence of dopaminergic and noradrenergic afferents on their target cells in the rat medial prefrontal cortex. **Adv. Neurol.**, v. 57, p. 545–554, 1992.

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.

VERTES, R.P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse.**, v. 51, n.1, p.32-58, 2004.

VIANNA, D.M. e CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. **Eur J Neurosci**, v.21, n.9, May, p.2505-12. 2005.

WALLACE, J.; JACKSON, R.K.; SHOTTON, T.L.; MUNJAL, I.; MCQUADE, R.; GARTSIDE, S.E. Characterization of electrically evoked field potentials in the medial prefrontal cortex and orbitofrontal cortex of the rat: Modulation by monoamines. **Eur Neuropsychopharmacol.**, in press, doi: 10.1016/j.euroneuro.2013.07.005, 2013.

ZHANG, Z.Q.; JULIEN, C.; BARRÈS, C. Baroreceptor modulation of regional haemodynamic responses to acute stress in rat. **J Auton Nerv Syst.**, Aug, 1996.

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.*