

Willian Costa Ferreira

**Envolvimento do receptor de angiotensina II tipo 1 nas alterações
cardiovasculares induzidas pelo estresse crônico: comparação entre
estressores homotípicos e heterotípicos**

Araraquara

2016

Willian Costa Ferreira

Envolvimento do receptor de angiotensina II tipo 1 nas alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse crônico: comparação entre estressores homotípicos e heterotípicos

Dissertação apresentada ao Programa interinstitucional de pós-graduação em ciências fisiológicas UFSCar/UNESP para a obtenção de Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

Araraquara

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F383e Ferreira, Willian Costa
 Envolvimento do receptor de angiotensina II tipo
 1 nas alterações cardiovasculares induzidas pelo
 estresse crônico : comparação entre estressores
 homotípicos e heterotípicos / Willian Costa Ferreira.
 - São Carlos : UFSCar, 2016.
 55 p.

 Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
 São Carlos, 2016.

 1. Losartana. 2. Barorreflexo. 3. Reatividade
 vascular. 4. Componente autônomo. 5. Estresse crônico.
 I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Willian Costa Ferreira, realizada em 31/03/2016:

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
UNESP

Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz
IFSC/USP

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza
UFSCar

Dedico este trabalho aos meus pais Izaias e Cleonice, a minha irmã Suellen, ao meu Tio/Padrinho Amilton e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

“...Nunca deixem que lhe digam que não vale a pena

Acreditar no sonho que se tem

Ou que seus planos nunca vão dar certo

“Ou que você nunca vai ser alguém...”

Renato Russo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, pois ele tem me dado forças para que eu pudesse ficar longe da família e amigos para que esse sonho pudesse ser realizado. Aos meus pais, Izaias e Cleonice por tudo que tem feito por mim para realização desse sonho e ao meu tio/padrinho Amilton por ter me incentivado e contribuído de diversas formas para que este sonho fosse concretizado.

Aos meus amigos Antônio, Jeferson, Bruno, Hércules, Lorena e Nichole que sempre estiveram comigo nessa jornada. Aos amigos da extinta república Babilônia que me receberam de braços abertos quando eu precisei, e aos meus amigos de laboratório, ao Lucas e Lígia pelos estudos para a prova de mestrado e ao Gessynger pelo companheirismo durante toda essa etapa.

Ao meu orientador Carlos Cesar Crestani por ter me aceito e sido paciente comigo nessa jornada.

Ao apoio técnico da Elisabete e Rosangela, pelos ensinamentos e ajuda na realização dos experimentos.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFar/UNESP) pelo espaço concedido.

Ao programa interinstitucional de pós-graduação em ciências fisiológicas (PIPGCF) pelo auxílio.

A CNPq pelo auxílio financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram, independente do momento, nessa jornada.

RESUMO

Estresse emocional tem sido reconhecido como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No entanto, os mecanismos envolvidos na etiologia das disfunções cardiovasculares evocadas pelo estresse ainda são pouco compreendidos. Assim, no presente estudo nós investigamos o envolvimento da angiotensina II, agindo através do receptor tipo 1 (AT_1), nas disfunções cardiovasculares evocadas por estresse crônico em ratos. Para isso, comparamos o efeito do tratamento crônico com um antagonista AT_1 , losartana (30 mg/kg/dia, p.o.), nas alterações cardiovasculares e autônomas após exposição por 10 dias a dois modelos de estresse crônico: o estresse crônico de variável (ECV, estressor heterotípico) e o estresse de restrição repetido (ERR, estressor homotípico). Nenhum dos protocolos de estresse crônico afetaram os valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca. No entanto, o ERR aumentou o tônus simpático para o coração e diminuiu a atividade parassimpática cardíaca, enquanto o ECV diminuiu a atividade parassimpática cardíaca. Ambos os estressores crônicos também prejudicaram a função do barorreflexo. Todas as alterações na atividade autônoma e a disfunção do barorreflexo foram inibidas pelo tratamento com losartana. Medidas complementares de parâmetros comumente analisados em estudos investigando os efeitos do estresse também demonstraram que o nosso protocolo de ECV reduziu o ganho de peso e aumentou os níveis plasmáticos de corticosterona, porém nenhum destes efeitos foram afetados pelo tratamento com losartana. De fato, a redução no ganho de peso corporal induzida pelo ECV foi acentuada nos animais tratados com losartana. Em conclusão, estes resultados indicam um envolvimento dos receptores AT_1 nas alterações autônomas evocadas pelos estressores homotípico e heterotípico. Além disso, os resultados do presente estudo sugerem que o aumento na corticosterona circulante causada pelo ECV é independente dos receptores AT_1 , enquanto a redução de ganho do peso corporal evocado por este estressor heterotípico é facilitado pelo tratamento com losartana.

Palavras-chave: Losartana, barorreflexo, reatividade vascular, componente autônomo, estresse crônico.

ABSTRACT

Emotional stress has been recognized as a risk factor for cardiovascular diseases. Nevertheless, the mechanisms involved in the etiology of cardiovascular dysfunctions evoked by stress are still poorly understood. Thus, in the present study we investigated the involvement of angiotensin II acting in the type 1 receptor (AT_1) in cardiovascular dysfunctions evoked by chronic stress in rats. For this, we compared the effect of chronic treatment with the AT_1 receptor antagonist losartana (30mg/kg/day, p.o.) in the cardiovascular and autonomic changes following 10 days exposure to chronic variable stress (CVS, heterotypic stressor) and repeated restraint stress (RRS, homotypic stressor). Neither RRS nor CVS affected basal values of arterial pressure and heart rate. However, RRS increased sympathetic tone to the heart and decreased cardiac parasympathetic activity, whereas CVS decreased cardiac parasympathetic activity. Both chronic stressors also impaired the baroreflex function. All alterations in autonomic activity and the baroreflex impairment were inhibited by treatment with losartan. Complementary measurements of parameters commonly analyzed in studies investigating stress effects also indicated that CVS reduced body weight gain and increased circulating corticosterone, but these effects were not affected by losartan. In fact, CVS-evoked body weight change was even higher in losartan-treated animals. In conclusion, these findings indicate an involvement of angiotensin II/ AT_1 receptors in autonomic changes evoked by both homotypic and heterotypic chronic stressors. Additionally, present results suggest that increased circulating corticosterone evoked by CVS is independent of AT_1 receptors, while reduction in body weight gain evoked by this heterotypic stressor is facilitated by treatment with losartan.

Keywords: losartan, baroreflex, vascular reactivity, autonomic component, chronic stress.

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Protocolo de estresse crônico variável | 19 |
| Tabela 2 – Parâmetros derivados da análise de regressão não linear (Ganho, P_1 , P_2 , FC range, e BP_{50}) e linear (inclinação da bradicardia e inclinação da taquicardia) do barorreflexo..... | 35 |
| Tabela 3 - Efeito máximo (E_{max}) e 50% da dose da variação da PAM (ED_{50}) por fenilefrina, acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS) na curva dose-resposta..... | 37 |
| Tabela 4 – Sumário dos efeitos do estresse de restrição repetido e estresse crônico variável em animais tratados com veículo ou losartana..... | 39 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Protocolo experimental para estudo do efeito do tratamento crônico com losartana sobre as alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse crônico..... | 26 |
| Figura 2 – Peso corporal, peso relativo do coração, timo e adrenais, e concentração de corticosterona plasmática..... | 29 |
| Figura 3 – Pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD); e frequência cardíaca (FC)..... | 31 |
| Figura 4 – Frequência cardíaca intrínseca (FCi) e atividade autônoma | 33 |
| Figura 5 – Atividade do barorreflexo..... | 35 |
| Figura 6 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM) evocado pela administração de drogas vasoativas | 38 |

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| AGRADECIMENTOS | iv |
| RESUMO | v |
| ABSTRACT | vi |
| ÍNDICE DE TABELAS | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | viii |
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1. Complicações cardiovasculares induzidas pelo estresse | 11 |
| 1.2. Complicações cardiovasculares induzidas pelo estresse: envolvimento dos receptores de angiotensina II | 14 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 18 |
| 3.1. Animais | 18 |
| 3.2. Soluções e drogas | 18 |
| 3.3. Protocolos de estresse crônico..... | 18 |
| 3.3.1. Estresse por restrição repetido (ERR) | 19 |
| 3.3.2. Estresse crônico variável (ECV) | 19 |
| 3.4. Tratamento farmacológico | 20 |
| 3.5. Canulação da artéria e veia femorais..... | 20 |
| 3.6. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca | 20 |
| 3.7. Infusão de agentes vasoativos | 21 |
| 3.8. Avaliação da atividade barorreflexa..... | 21 |
| 3.9. Análise da reatividade vascular | 22 |
| 3.10. Avaliação da atividade simpática e parassimpática cardíaca | 22 |
| 3.11. Medida de corticosterona plasmática | 23 |
| 4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS | 25 |
| 5. RESULTADOS | 27 |
| 5.1. Efeitos do estresse crônico e do tratamento com losartana sobre parâmetros somáticos e a concentração de corticosterona plasmática | 27 |
| 5.2. Efeitos do estresse crônico e do tratamento com losartana em parâmetros cardiovasculares basais | 30 |
| 5.3. Efeitos do estresse crônico e do tratamento com losartana na atividade autônoma e FC intrínseca | 32 |
| 5.3.1. Atividade simpática cardíaca..... | 32 |
| 5.3.2. Atividade parassimpática cardíaca-..... | 32 |
| 5.3.3. FC intrínseca | 32 |
| 5.3.4. Atividade simpática vascular..... | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 5.4. Efeitos do estresse crônico e do tratamento com losartana na atividade do barorreflexo | 34 |
| 5.5. Efeitos do estresse e tratamento com losartan na reatividade vascular aos agentes vasoativas . | 36 |
| 5.5.1. Fenilefrina | 36 |
| 5.5.2. Acetilcolina | 36 |
| 5.5.3. Nitroprussiato de sódio..... | 36 |
| 6. DISCUSSÃO | 39 |
| 7. CONCLUSÃO | 45 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 46 |
| ANEXO A – CEUA – Protocolo do comitê de ética de uso de animais..... | 55 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Complicações cardiovasculares induzidas pelo estresse

Há muitos anos tem discutidos os efeitos do estresse sobre a função cardiovascular (HARLAN, 1981). Neste sentido, dados da Organização Mundial da Saúde obtidos no período de 2000 a 2012 têm apontado as doenças cardiovasculares como uma das principais causas de morte no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014), e o estresse tem sido apontado como um importante fator associado à crescente incidência dessas doenças (LIMA Jr.; LIMA NETO, 2010). Evidências clínicas e pré-clínicas também tem demonstrado uma correlação positiva entre estresse e a patogênese de complicações cardiovasculares (FORD *et al.*, 1998; GRIPPO; JOHNSON, 2009; HAINES; IMESON; MEADE, 1987; KAWACHI *et al.*, 1994; KNOX; UVNÄS-MOBERG, 1998; KRANTZ *et al.*, 1996).

Estudos em humanos e animais tem demonstrado uma associação entre estresse e diversas patologias cardiovasculares, incluindo arritmias cardíacas, isquemia do miocárdio e hipertensão arterial (GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002; PICKERING, 1990; ROZANSKI; BLUMENTHAL; KAPLAN, 1999). Estudos pré-clínicos tem demonstrado que as alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse estão associadas à disfunções na atividade autonôma e comprometimento da função vascular (CORDELLINI; VASSILIEFF, 1998; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002, 2008; ISINGRINI *et al.*, 2011). Avaliação do balanço autonômico cardíaco e da atividade barorreflexa são medidas importantes empregadas na literatura para o estudo da função autonômica (CRESTANI *et al.*, 2011; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2008; NEGRAO *et al.*, 1992; SANCHES *et al.*, 2009). Com relação ao balanço autonômico cardíaco, tem sido proposto que níveis elevados de atividade parassimpática é um indicador positivo para a função cardíaca, ao passo que alterações no sentido de um aumento da contribuição simpática é considerado um fator de

risco para o desenvolvimento de patologias cardiovasculares (CARNEVALI; SGOIFO, 2014). Estudos em roedores têm demonstrado um aumento da atividade simpática e redução no tônus parassimpático após a exposição a protocolos de estresse crônico (CARNEVALI; SGOIFO, 2014; GRIPPO; BELTZ; JOHNSON, 2003; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002). Deste modo, alterações no controle autonômico cardíaco parece ser um importante mecanismo associado às complicações cardiovasculares induzidas pelo estresse.

Redução na atividade do barorreflexo é comum em indivíduos com hipertensão essencial, e também em diversos modelos experimentais de hipertensão (IRIGOYEN; KRIEGER, 1998). Além disso, diminuição na atividade deste mecanismo reflexo cardiovascular tem sido apontada como fator de risco para o desenvolvimento de arritmias cardíacas e morte súbita em diversas patologias cardiovasculares (FARRELL *et al.*, 1991; TAKASE *et al.*, 1992). Neste sentido, foi demonstrado que ratos submetidos a protocolos de estresse crônico apresentaram redução nas alterações da atividade barorreflexa (CONTI *et al.*, 2001; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2008; PORTER *et al.*, 2004), o que sugere que comprometimento na atividade barorreflexa pode também estar implicada nas alterações cardiovasculares desencadeadas pela exposição prolongada a estímulos aversivos.

Comprometimento na resposta vascular a agentes vasodilatadores e vasoconstritores é um indicador e um marcador de aterosclerose e de alterações na capacidade de contração e relaxamento da musculatura lisa vascular (CRESTANI *et al.*, 2011; HARRISON *et al.*, 1987; RESSTEL *et al.*, 2006). Além disso, alteração na reatividade vascular tem sido proposto como um dos mecanismos fisiopatológicos da hipertensão (CONWAY, 1958; CRESTANI *et al.*, 2011; GHIADONI; TADDEI; VIRDIS, 2012). Estudos *in vitro* em roedores demonstraram que a exposição a protocolos de estresse crônico alteram a reatividade vascular a agentes vasodilatadores e vasoconstritores (CORDELLINI; VASSILIEFF, 1998; D'AUDIFFRET *et al.*, 2010; ISINGRINI *et al.*, 2011). Apesar dos dados

acima fornecerem evidências da reatividade vascular *in vitro*, não existem dados *in vivo* na literatura acerca do efeito da exposição prolongada a situações aversivas sobre a reatividade vascular. A reatividade vascular pode ser testada experimentalmente *in vivo* através do estudo das alterações na pressão arterial decorrente da infusão intravenosa de agentes vasoconstritores e vasodilatadores (CRESTANI *et al.*, 2011; ENGI *et al.*, 2012; RESSTEL *et al.*, 2006).

Estudos pré-clínicos demonstram que as respostas fisiológicas associadas ao estresse dependem da idade, do gênero, do tipo, da duração, da frequência e da intensidade do estímulo aversivo empregado (AGUILERA, 1998; JANKORD; HERMAN, 2008; MAGARIÑOS; MCEWEN, 1995; MARTÍ; MARTÍ; ARMARIO, 1994; NATELSON *et al.*, 1988). Estudos em roedores tem utilizado protocolos de estresse crônico que envolvem a exposição diária ao mesmo tipo de estressor (homotípico) ou a diferente estressores (heterotípico) (CHEN; HERBERT, 1995; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002; MAGARIÑOS; MCEWEN, 1995; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Estudos demonstram que as alterações no ganho de peso corporal, na atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e no comportamento em roedores são mais pronunciadas após a exposição a protocolos de estresse crônico heterotípicos, quando comparado à exposição repetida ao mesmo estressor (MARIN; CRUZ; PLANETA, 2007; ORTIZ *et al.*, 1996), possivelmente devido ao processo de habituação durante a exposição repetida ao mesmo estressor (HERMAN, 2013). Contudo, em uma ampla busca na literatura, nós não encontramos nenhum estudo que tenha comparado, de maneira direta, os efeitos de diferentes protocolos de estresse crônico sobre a função cardiovascular. Entretanto, resultados recentes do nosso grupo demonstraram que tanto o estresse crônico variável (ECV, heterotípico) quanto a exposição repetida ao estresse por restrição (homotípico) causaram hipertensão moderada, que foi acompanhada de comprometimento na atividade barorreflexa e na função vascular (DUARTE

et al., 2015). Estes resultados contrastam com a ideia de habituação durante a exposição a protocolos homotípicos, e indicam que o sistema cardiovascular parece reagir de maneira diferente ao estresse crônico, quando comparado com as respostas comportamentais e as alterações neuroendócrinas induzidas pela exposição prolongada a estímulos aversivos. Entretanto, nós também observamos que somente o ECV causou alterações no balanço autonômico cardíaco no sentido de um aumento na contribuição simpática, no qual acarretou elevação da frequência cardíaca basal (DUARTE *et al.*, 2015).

Os dados apresentados acima claramente evidenciam uma relação entre estresse e comprometimento na função cardiovascular. Entretanto, os mecanismos envolvidos com as complicações cardiovasculares induzidas pela exposição prolongada a situações aversivas ainda são pouco compreendidos, especialmente considerando possíveis diferenças na etiologia de complicações cardiovasculares induzidas por protocolos de estresse crônico homotípicos e heterotípicos.

1.2. Complicações cardiovasculares induzidas pelo estresse: envolvimento dos receptores de angiotensina II.

A angiotensina II é formada na circulação a partir da liberação da renina dos rins na corrente sanguínea, na qual cliva o angiotensinogênio (derivado principalmente da zona pericentral dos lóbulos hepáticos) no decapeptídeo angiotensina I (HALL, 2003). A angiotensina I é hidrolisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (liberada principalmente pelo endotélio capilar dos pulmões) para formar a angiotensina II, um octapeptídeo ativo (HALL, 2003). Também foram descritas vias independentes da ECA para a formação de angiotensina II a partir da angiotensina I, ou diretamente do angiotensinogênio (ZAMAN; OPARIL; CALHOUN, 2002). A angiotensina II é um importante fator neuro-hormonal de controle da pressão arterial (PA) e da homeostase hidroeletrolítica (HEAD,

GEOFFREY A, 1996; MÉNARD, 1993). Foram identificados dois receptores para a angiotensina II, designados como AT₁ e AT₂, porém os efeitos bem conhecidos da angiotensina II no controle cardiovascular e hidroeletrólítico parecem ser mediados principalmente pela ativação do receptor AT₁ (DE GASPARO *et al.*, 2000).

Além da formação sistêmica de angiotensina II, estudos tem demonstrado a presença do sistema renina-angiotensina (SRA) local em vários tecidos, incluindo o encéfalo (WRIGHT; HARDING, 2011). Componentes do SRA (angiotensinogênio, renina, enzima conversora de angiotensina, angiotensina II e outras angiotensinas, e todos os subtipos de receptores angiotensinérgicos) tem sido identificado em regiões encefálicas importantes para o controle das respostas ao estresse (BALI; JAGGI, 2013; WRIGHT; HARDING, 2011). Neste sentido, tem sido demonstrado que estímulos aversivos aumentam os níveis de angiotensina II no encéfalo e na circulação periférica (SAAVEDRA *et al.*, 2005). Deste modo, tem sido proposto que mecanismos angiotensinérgicos desempenham um papel importante no processamento dos ajustes fisiológicos ao estresse e de respostas emocionais (SAAVEDRA *et al.*, 2004; WATANABE *et al.*, 1998). De fato, a angiotensina II tem sido implicada nas alterações comportamentais e nas respostas neuroendócrinas e cardiovasculares observadas durante a exposição a situações aversivas (BALI; JAGGI, 2013; MAYOROV, 2011). Neste sentido, foi demonstrado que o tratamento crônico com antagonistas do receptor AT₁ preveniu vários efeitos deletérios do estresse, como a ulceração gástrica e o aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (ARMANDO *et al.*, 2001; BALI; JAGGI, 2013; SAAVEDRA, JUAN M *et al.*, 2006).

Com relação às respostas cardiovasculares ao estresse, dados clínicos evidenciaram que o tratamento com inibidores da ECA reduziu a resposta pressora observada durante uma sessão aguda de estresse (CARDILLO *et al.*, 1994; KAHAN; ELIASSON, 1999). Este efeito parece estar relacionado com a ativação do receptor AT₁, uma vez que

resultados pré-clínicos em roedores demonstraram que a administração sistêmica ou intracerebroventricular de antagonistas seletivos deste receptor reduziu as respostas de aumento da pressão arterial, frequência cardíaca e catecolamina plasmática observadas durante a exposição aguda a diferentes estímulos aversivos (por exemplo, estresse de restrição e choque nas patas) (BUSNARDO; TAVARES; CORREA, 2014; ERDOS *et al.*, 2010; JEZOVA *et al.*, 1998; KUBO *et al.*, 2001; SAIKI *et al.*, 1997). Apesar das respostas cardiovasculares observadas durante a exposição aguda a sessões de estresse ser parte dos ajustes fisiológicos ao estresse, e constituir uma resposta importante para a manutenção da homeostase durante situações aversivas (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009), um possível envolvimento de mecanismos angiotensinérgicos nas complicações cardiovasculares decorrentes da exposição a protocolos de estresse crônico são pouco compreendidos. Entretanto, foi demonstrado que a exposição a protocolos de estresse crônico alteraram a distribuição e densidade dos receptores da angiotensina II em regiões centrais envolvidas no controle cardiovascular, bem como nos rins e na glândula adrenal (ARMANDO *et al.*, 2001; MCDOUGALL *et al.*, 2000), assim suportando a hipótese de que mecanismos angiotensinérgicos podem mediar as complicações cardiovasculares induzidas por protocolos de estresse crônico.

Deste modo, a hipótese do presente estudo é que as alterações cardiovasculares induzidas pela exposição a protocolos de estresse crônico são mediadas por um aumento na ação da angiotensina II no receptor AT₁, e esta alteração afeta de maneira diferente a função cardiovascular de animais submetidos a protocolos de estresse crônico homotípico e heterotípico. Para testar esta hipótese, nós escolhemos o tratamento com um antagonista seletivo do receptor AT₁, uma vez que, como descrito acima, vias independentes da ECA para a formação de angiotensina II tem sido reportadas (ZAMAN; OPARIL; CALHOUN, 2002).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi investigar o envolvimento da angiotensina II, atuando no receptor AT₁, nas alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse crônico. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- 1) Avaliar os efeitos do tratamento repetido com um antagonista do receptor AT₁ sobre as alterações induzidas pela exposição a um protocolo de estresse crônico homotípico nos parâmetros basais de pressão arterial, frequência cardíaca e corticosterona plasmática; na atividade do barorreflexo; na reatividade vascular a agentes vasoativos; no balanço autonômico cardíaco; e nos pesos corporal, do coração, do timo e das adrenais.
- 2) Investigar os efeitos do tratamento repetido com um antagonista do receptor AT₁ sobre as alterações induzidas pela exposição a um protocolo de estresse crônico heterotípico nos parâmetros basais de pressão arterial, frequência cardíaca e corticosterona plasmática; na atividade do barorreflexo; na reatividade vascular a agentes vasoativos; no balanço autonômico cardíaco; e nos pesos corporal, do coração, do timo e das adrenais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar com 60 dias. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP). Os animais foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP) no mínimo sete dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 7h), com livre acesso a alimento e água. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR/UNESP, protocolo nº: 32/2014.

3.2. Soluções e drogas

Tribromoetanol, (SIGMA, EUA), fenilefrina (SIGMA), nitroprussiato de sódio (SIGMA), acetilcolina (SIGMA), propranolol (SIGMA), metilatropina (SIGMA) e a losartana (SIGMA) foi dissolvido 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.

3.3. Protocolos de estresse crônico

No presente estudo foi realizado, em grupos independentes de animais, dois protocolos de estresse crônico: *o estresse crônico variável (ECV)* (protocolo de estresse crônico heterotípico) e a *exposição repetida ao estresse por restrição (ERR)* (protocolo de estresse crônico homotípico). O ECV e o ERR tiveram início simultaneamente. Os animais controle foram mantidos em suas caixas moradias, exceto no período de limpeza das caixas, no Biotério do Laboratório de Farmacologia da FCFAR/UNESP pelo mesmo período que os animais submetidos aos protocolos de estresse crônico. Todas as sessões de estresse foram realizadas em uma sala separada do Biotério.

3.3.1. Estresse por restrição repetido (ERR)

O estresse por restrição consistiu 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) (BARRON; VAN LOON, 1989; CRESTANI, *et al.*, 2009; CRESTANI, *et al.*, 2010; MCDOUGALL; LAWRENCE; WIDDOP, 2005). Cada animal foi submetido a sessões diárias com duração de uma hora por 10 dias consecutivos (CRUZ *et al.*, 2012; MARIN; CRUZ; PLANETA, 2007). Em todas as sessões o estresse se iniciou às 9:00 horas.

3.3.2. Estresse crônico variável (ECV)

O ECV, modificado de Marin e colaboradores (2007), foi realizado mediante a exposição diária a diferentes estressores, alternando os estressores, durante 10 dias consecutivos. A Tabela 1 apresenta o protocolo completo do estresse crônico variável.

Tabela 1- Protocolo de estresse crônico variável

| Dia | Tipo de estresse e cronograma |
|------------|--|
| 1 | 10:00h restrição, 60 min; 19:00h serragem úmida durante a noite |
| 2 | 15:00h, frio (4 ° C) e isolamento por 60 min; 19:00 h, as luzes acesas durante a noite |
| 3 | 12:00h, luzes apagadas por 180 min; 15:00 h, nado forçado por 4 min |
| 4 | 07:30h, serragem úmida durante todo o dia; 19:00h, privação de alimento/água durante a noite |
| 5 | 13:00 h, nado forçado por 3 min; 19:00 h, isolamento durante a noite |
| 6 | 14:00 h, frio (4 ° C) e isolamento por 15 min; 15:00 h, luzes apagadas por 120 min |
| 7 | 19:00 h, serragem úmida e luz acesa durante a noite |
| 8 | 19:00 h, isolamento e privação de alimentos/água durante a noite |
| 9 | 16:00 h, estresse por restrição por 60 min; 19:00 h, as luzes acesas durante a noite |
| 10 | 09:00 h, nado forçado por 4 min; 10:00 h, estresse por restrição por 60 min |

3.4. Tratamento farmacológico

O tratamento farmacológico com losartana (antagonista seletivo dos receptores AT₁) foi realizado por 10 dias consecutivos, e iniciou-se no primeiro dia uma hora antes dos protocolos de estresse. A losartana foi dissolvida em salina e administrado por via oral (gavagem) na dose de 30mg/kg/dia. A dose de losartana foi escolhida baseada em evidências de que esta dose inibiu os efeitos cardiovasculares e neuroendócrinos decorrentes da administração central e periférica de angiotensina II, além de inibir as alterações neuroendócrinas (aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas e corticosterona) induzidas pelo estresse crônico (CULMAN *et al.*, 1999; URESIN *et al.*, 2004).

3.5. Canulação da artéria e veia femorais

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/Kg, i.p.) e foi implantado um cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares, e outro na veia femoral para infusão de fármacos. Após implantação dos cateteres, estes foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica. Os animais foram mantidos em caixas individuais após a cirurgia. Como medida profilática, após a cirurgia os animais receberam 80.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fontoura-Wyeth, Brasil) aplicados em 0,2 mL (i.m.) e 2,5mg/kg (s.c.) do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil).

3.6. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., EUA). A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada utilizando um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Australia), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML866, ADInstruments, Australia), usando um programa apropriado (Lab Chart PRO,

ADInstruments, Australia). Os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD), bem como a frequência cardíaca, foram obtidos a partir dos sinais da PAP.

3.7. Infusão de agentes vasoativos

Infusão intravenosa de fenilefrina (agonista seletivo dos adrenoreceptores α_1) (50 μ g/mL a 0.32mL/min/Kg), nitroprussiato de sódio (NPS) (doador de óxido nítrico) (70 μ g/mL a 0.8mL/min/Kg) e acetilcolina (10 μ g/mL a 1.2mL/min/Kg) foi realizada utilizando uma bomba de infusão (K.D. Scientific, EUA) (CRESTANI *et al.*, 2011; ENGI *et al.*, 2012). Fenilefrina causa aumento da pressão arterial, ao passo que o NPS e a acetilcolina possuem efeitos depressores.

3.8. Avaliação da atividade barorreflexa

O barorreflexo foi analisado através de alterações na pressão arterial induzidas pela infusão intravenosa de fenilefrina e NPS (CRESTANI *et al.*, 2010). A análise foi feita relacionando a variação de PAM (10, 20, 30 e 40 mmHg) com a resposta reflexa correspondente da FC. Utilizando os pontos obtidos da correlação na variação da PAM e FC, foram traçadas curvas sigmóides, como descritas na literatura. (CRESTANI *et al.*, 2010; HEAD; MCCARTY, 1987). A avaliação da curva sigmoide foi feita com base em cinco parâmetros: 1) platô mínimo da FC (P_1 , bpm); 2) platô máximo da FC (P_2 , bpm); 3) variação da FC (ΔP , diferença entre P_1 e P_2); 4) pressão arterial média (PA_{50} , valor de PAM que promove 50% de variação na FC) e 5) ganho (G, bpm/mmHg, inclinação da porção linear da curva) (CRESTANI *et al.*, 2010; HEAD; MCCARTY, 1987). Além disso, partindo dos mesmos pontos obtidos da correlação dos valores de PAM e FC correspondente, foram traçadas curvas de regressão linear para análise individual da atividade barorreflexa durante o efeito pressor e depressor na pressão arterial (CRESTANI *et al.*, 2011; ENGI *et al.*, 2012).

A atividade barorreflexa durante as flutuações espontâneas da pressão arterial (sem estímulo farmacológico) também foi avaliada utilizando o método de sequência. Para

isso, usando o software Cardioseries v2.4 (disponível no <https://www.sites.google.com/site/cardioseries/home>), valores de PAS e intervalo de pulso (IP) foram analisadas batimento a batimento para a identificação de quatro valores ou mais de sequência consecutivos em que os aumentos da PAS foram associados ao alongamento do IP (sequência para cima) ou diminuições PAS foram associados com encurtamento do IP (sequência para baixo). Uma sequência do barorreflexo só foi usada quando o coeficiente de correlação (r) entre a PAS e o IP foi maior do que 0,8. A sensibilidade do barorreflexo espontâneo foi avaliada pela inclinação (ms/mmHg) da regressão linear entre a PAS e o IP.

3.9. Análise da reatividade vascular

As alterações na PAM causada pelas concentrações crescentes de fenilefrina, NPS e acetilcolina produzida pela infusão intravenosa destes agentes foram utilizadas para gerar curvas dose-resposta (CRESTANI *et al.*, 2011; ENGI *et al.*, 2012; RESSTEL *et al.*, 2006). As curvas dose-resposta foram geradas para cada agente vasoativo usando valores de PAM correspondente ao tempo de registro cumulativo após o início da infusão (a cada 2 s). Curvas de regressão não-linear foram utilizadas para a análise das variações da PAM. A avaliação das curvas foram realizada com base em dois parâmetros: 1) resposta máxima da PAM (E_{max}) e 2) dose que promove 50% da resposta máxima (ED_{50}) (CRESTANI *et al.*, 2011; ENGI *et al.*, 2012).

3.10. Avaliação da atividade simpática e parassimpática cardíaca

A atividade parassimpática e simpática cardíaca, bem como a FC intrínseca, foram avaliadas através da análise do efeito sobre a FC da administração intravenosa de metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) (3 mg/ml/kg) e propranolol (antagonista de adrenoceptores β) (4 mg/ml/kg) (NEGRAO *et al.*, 1992; SANCHES *et al.*, 2009). O protocolo foi realizado em dois dias, conforme descrito previamente (GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002; NEGRAO *et al.*, 1992). No dia 1,

metade dos animais em cada grupo experimental receberam propranolol; e 10 minutos após metilatropina. A outra metade dos animais receberam o mesmo tratamento em ordem invertida (metilatropina depois propranolol). Vinte quatro horas após (dia 2), os animais receberam novamente o tratamento combinado com os bloqueadores autônomos cardíacos, mas na ordem oposta ao tratamento recebido no dia 1. A atividade simpática cardíaca foi determinada através da análise da diferença entre a FC basal e a FC após tratamento com propranolol. A atividade parassimpática cardíaca foi determinada através da análise da diferença entre a FC basal e a FC após tratamento com metilatropina. A FC intrínseca foi analisada no dia 1 e no dia 2 após o tratamento combinado com propranolol e metilatropina, e a média das duas medidas foram calculadas para cada animal.

A análise espectral de potência da PAS foi empregada para analisar a atividade autonômica que controla os vasos sanguíneos (Malliani et al., 1991). Para isso, séries temporais de PAS foram extraídas batimento a batimento do sinal de pressão arterial pulsátil. Usando o software *Cardioseries* v2.4 (disponível no <https://www.sites.google.com/site/cardioseries/home>), a variabilidade global destas séries foi calculada no domínio da frequência (através da transformação rápida de Fourier), e os componentes oscilatórios na faixa de frequência de 0,20 - 0,75 Hz (baixa frequência, BF) foi utilizado como representativo dos efeitos moduladores da atividade simpática no controle do tônus vascular (MALLIANI *et al.*, 1991).

3.11. Medida de corticosterona plasmática

A análise das concentrações plasmáticas de corticosterona foi realizada utilizando a técnica de radioimunoensaio, de acordo com protocolo descrito em Cruz e colaboradores (2005). Brevemente, o sangue (200 μ L) foi colhido através da cânula implantada na artéria femoral em tubos plásticos com 5 μ L de heparina. As amostras foram

centrifugadas a 2.000 x g durante 15 min a 4°C (CRUZ *et al.*, 2012). Em seguida, o plasma foi separado e congelado até o momento da dosagem de corticosterona.

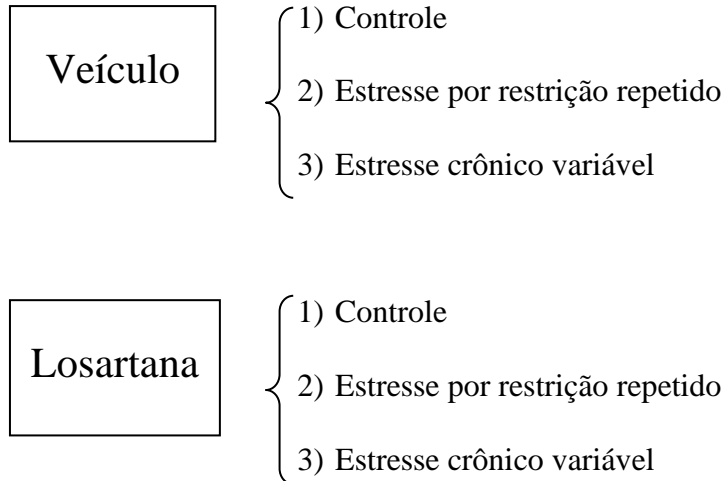
Para o ensaio de radioimunoensaio, o anticorpo para corticosterona liofilizado (Sigma®) foi ressuspenso em 5mL de Tampão Tris pH 8,0 (0,05M Tris-HCl; 0,1M NaCl; 0,1% de Azida Sódica) e separado em alíquotas (solução estoque) e conservado a -20°C. Durante a realização do ensaio a solução estoque foi diluída em tampão Tris na proporção de 1:2. Alíquotas de 20 µl de plasma foram adicionadas em 980 µl de tampão fosfato e incubadas em banho de água a 70°C durante 1 hora para deslocamento da corticosterona ligada à globulina plasmática. Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e alíquotas de 100 µl foram transferidas para tubos ependorff contendo 100 µl da solução 1:2 do anticorpo para corticosterona e 3H-corticosterona (10.000 – 20.000 cpm por tubo de ensaio). As amostras foram incubadas por 12-18 horas a 40°C. Após a incubação, a 3H-corticosterona não ligada foi removida adicionando-se 500 µl de solução de carvão ativado seguido de centrifugação, a 10 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a radioatividade no sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro de cintilação líquida.

3.12. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) bifatorial, com estresse (controle, ECV vs ERR) e tratamento (veículo vs losartana) como fatores independentes. A ANOVA multifatorial, com estresse e tratamento como fatores independentes e tempo como medida repetida, foi utilizada para a análise dos dados de peso corporal. As análises ANOVA bifatorial e multifatorial foram acompanhada do pós-teste de Bonferroni para identificação de variações entre os grupos. Os resultados dos testes estatísticos com $P < 0.05$ foram considerados significantes.

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais, conforme segue:



O tratamento com losartana ou veículo foi realizado por 10 dias consecutivos, e coincidiu com o período de exposição aos protocolos de estresse crônico (tratamento foi iniciado no primeiro dia dos protocolos de estresse). No décimo dia dos protocolos de estresse crônico, após a última sessão de estresse, todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação de cateter na artéria e veia femoral. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas individuais, e os experimentos foram iniciados 24 horas após a cirurgia. No dia do experimento, os animais foram levados em suas respectivas caixas para a sala de experimentação e mantidos por 60 minutos, para habituação às condições de som e iluminação da sala, antes do início dos experimentos. Cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa.

Os testes cardiovasculares foram realizados em dois dias. No primeiro dia, amostras de sangue (200 µL) foram obtidas antes da conexão dos animais ao sistema de registro cardiovascular para análise da corticosterona plasmática. Em seguida, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular e foi realizado o registro dos

parâmetros basais de pressão arterial e frequência cardíaca por um período de no mínimo 30 minutos. Na sequência, foram realizadas infusões randomizadas de fenilefrina, NPS e acetilcolina para determinação da atividade barorreflexa e análise da reatividade vascular a estes agentes vasoativos, como descrito nos itens 3.7 e 3.8. Após a infusão dos agentes vasoativos, os animais foram submetidos ao tratamento randomizado com propranolol e metilatropina para análise da atividade simpática e parassimpática cardíaca (ver item 3.9).

No segundo dia de testes, os animais foram submetidos novamente ao tratamento com os bloqueadores da atividade autônoma cardíaca, porém na ordem inversa ao realizado no primeiro dia de experimento (ver item 3.9). Após o término dos experimentos, os animais foram sacrificados, e o coração, adrenais e timo foram removidos e pesados. A Figura 1 resume todo o protocolo experimental.

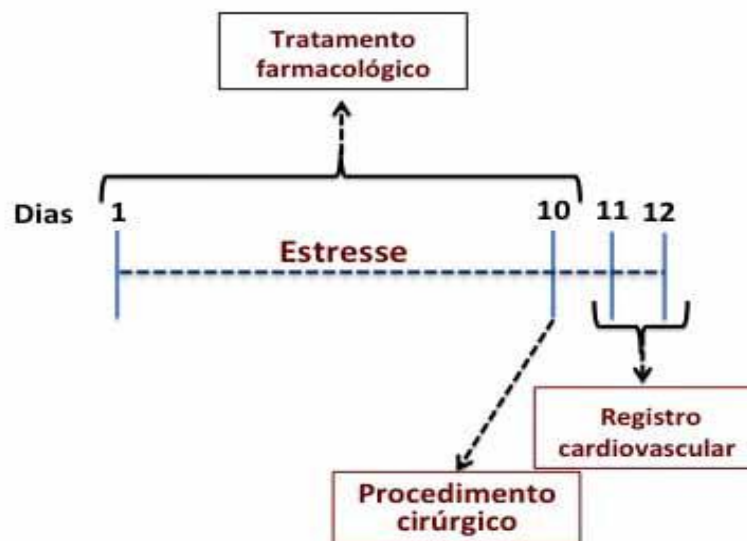


Figura 1 – Protocolo experimental para estudo do efeito do tratamento crônico com losartana sobre as alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse crônico variável e estresse por restrição repetido (ver texto para detalhes).

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos do estresse crônico e do tratamento com losartana sobre parâmetros somáticos e a concentração de corticosterona plasmática

A análise de ganho de peso corporal indicou um efeito do tempo ($F_{(2,96)} = 202,03$, $P < 0,001$) e interação entre estresse x tempo ($F_{(4,96)} = 12,73$, $P < 0,001$), porém sem o efeito do estresse ($F_{(2,48)} = 1,24$, $P > 0,05$) e do tratamento farmacológico com losartana ($F_{(1,48)} = 0,96$, $P > 0,05$) (Figura 2). As interações entre tratamento x tempo ($F_{(2,96)} = 0,52$, $P > 0,05$), estresse x tratamento ($F_{(2,48)} = 0,04$, $P > 0,05$) e estresse x tratamento x tempo ($F_{(4,96)} = 0,64$, $P > 0,05$) também não foram significantes (Figura 2). A análise *post-hoc* revelou que o ECV reduziu o peso corporal dos animais tratados com veículo no dia 10 ($P < 0,01$), bem como em ratos tratados com losartana nos dias 5 ($P < 0,05$) e 10 ($P < 0,01$) (Figura 2). O ERR não afetou o ganho de peso corporal ($P > 0,05$) (Figura 2).

A análise do peso relativo do coração (peso do coração/peso do animal) evidenciou um efeito do estresse ($F_{(2,39)} = 6,13$, $P < 0,004$) e do tratamento ($F_{(1,39)} = 6,70$, $P < 0,01$), mas sem interação entre estresse x tratamento ($F_{(1,39)} = 0,77$, $P > 0,05$) (Fig. 2). A análise *post-hoc* revelou que o ERR e o ECV aumentaram o peso relativo do coração ($P < 0,05$), e este efeito não foi observado nos animais tratados com losartana ($P > 0,05$) (Figura 2).

A análise do peso relativo do timo e das glândulas adrenais não indicaram efeito do estresse (timo: $F_{(2,39)} = 0,28$, $P > 0,05$; glândulas supra-renais: $F_{(2,39)} = 2,18$, $P > 0,05$) ou do tratamento farmacológico com losartana (timo: $F_{(1,39)} = 0,65$, $P > 0,05$; glândulas supra-renais: $F_{(1,39)} = 1,89$, $P > 0,05$) (Figura 2).

A análise de concentração de corticosterona plasmática indicou efeito do estresse ($F_{(2,39)} = 13,96$, $P < 0,0001$), mas sem efeito do tratamento ($F_{(1,39)} = 1,51$, $P > 0,05$) e interação entre estresse x tratamento ($F_{(2,39)} = 0,32$, $P > 0,05$) (Fig. 2). A análise *post-hoc* revelou que o

ECV aumentou a concentração plasmática de corticosterona ($P < 0,05$), e este efeito não foi afetado pelo tratamento com losartana ($P < 0,05$). O ERR não afetou os níveis de corticosterona no plasma ($P > 0,05$) (Figura 2).

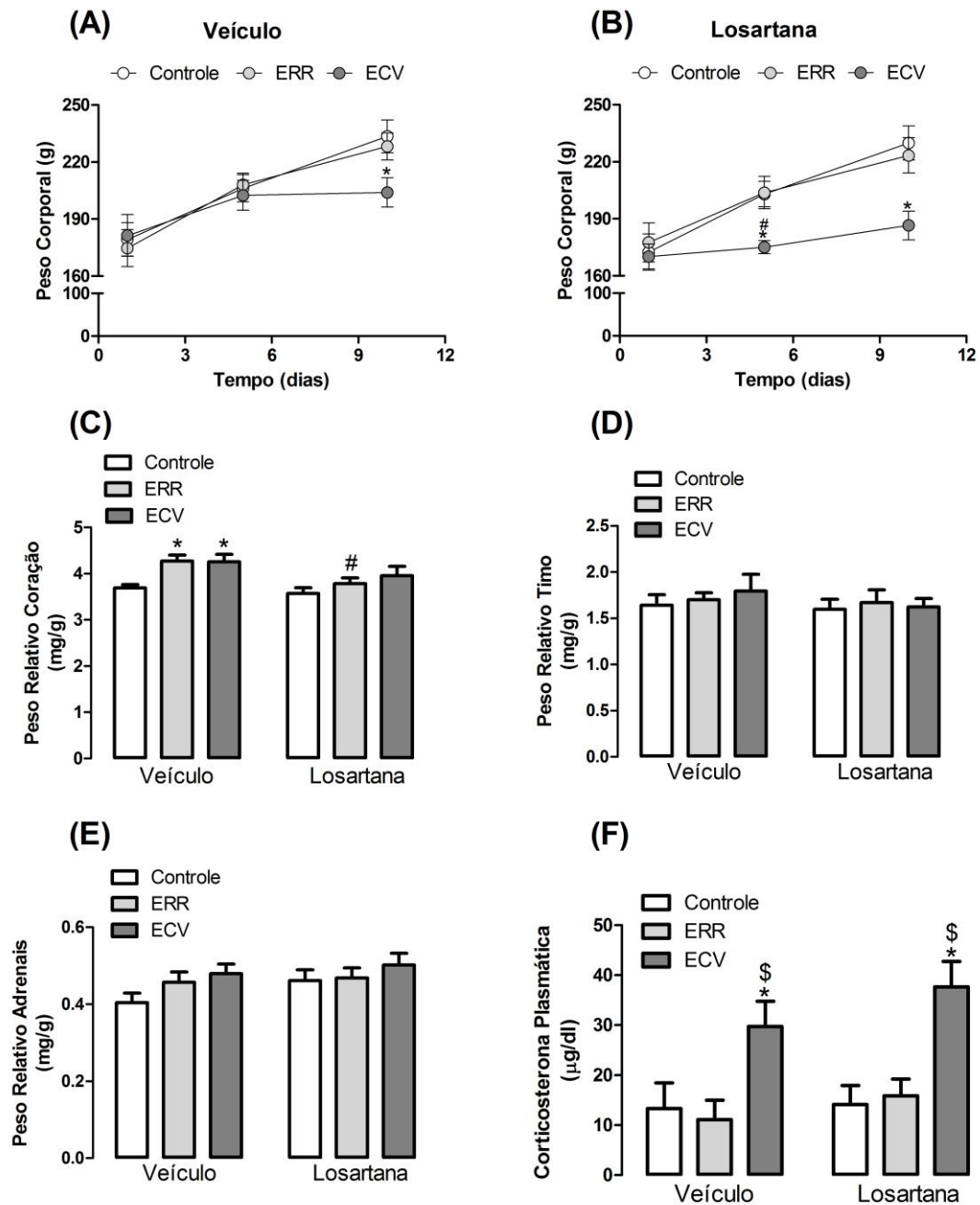


Figura 2 – (A) Peso corporal veículo; (B) peso corporal losartana (C) peso relativo do coração, (D) do timo e (E) das adrenais; e (F) concentração de corticosterona plasmática em animais tratados com veículo ou losartana controles (colunas brancas) e submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR) (colunas cinza claro) ou ao estresse crônico variável (ECV) (colunas cinza escuro). (Gráficos superiores) Ganho de peso corporal. Dados são média \pm EPM. * p <0.05 versus respectivo grupo controle na mesma condição, # p <0.05 versus respectivo grupo veículo. Three-way ANOVA. (Gráficos inferiores). Pesos relativos (peso do órgão/peso corporal) do coração, timo e adrenais; e concentração de corticosterona plasmática. As barras representam a média \pm EPM. * p <0.05 versus respectivo grupo controle com a mesma condição. § p <0.05 ECV versus ERR com a mesma condição. Two-way ANOVA. (controle veículo: $n=6$, controle losartana: $n=8$, ERR veículo: $n=8$, ERR losartana: $n=8$, ECV veículo: $n=8$, ECV losartana: $n=7$).

5.2. Efeitos do estresse crônico e do tratamento com losartana em parâmetros cardiovasculares basais

A análise dos valores basais de FC não indicou efeito do estresse ($F_{(2,39)} = 0,27$, $P > 0,05$) ou do tratamento ($F_{(1,39)} = 2,12$, $P > 0,05$) (Figura 3). No entanto, a análise da PAM, PAS e PAD indicou efeito do tratamento com losartana (PAM: $F_{(1,39)} = 16,71$, $P < 0,05$; PAS: $F_{(1,39)} = 25,97$, $P < 0,05$; PAD: $F_{(1,39)} = 11,07$, $P < 0,05$), porém sem efeito do estresse (PAM: $F_{(2,39)} = 0,19$, $P > 0,05$; PAS: $F_{(2,39)} = 0,17$, $P > 0,05$; PAD: $F_{(2,39)} = 0,09$, $P > 0,05$) e interação entre estresse x tratamento (PAM: $F_{(2,39)} = 0,48$, $P > 0,05$; PAS: $F_{(2,39)} = 0,24$, $P > 0,05$; PAD: $F_{(2,39)} = 0,39$, $P > 0,05$) (Figura 3). A análise *post-hoc* revelou que a losartana reduziu a PAS em todos os grupos experimentais ($P < 0,05$), ao passo que a PAM ($P < 0,05$) e a PAD ($P < 0,05$) foi reduzida pelo tratamento farmacológico somente no grupo controle (Figura 3).

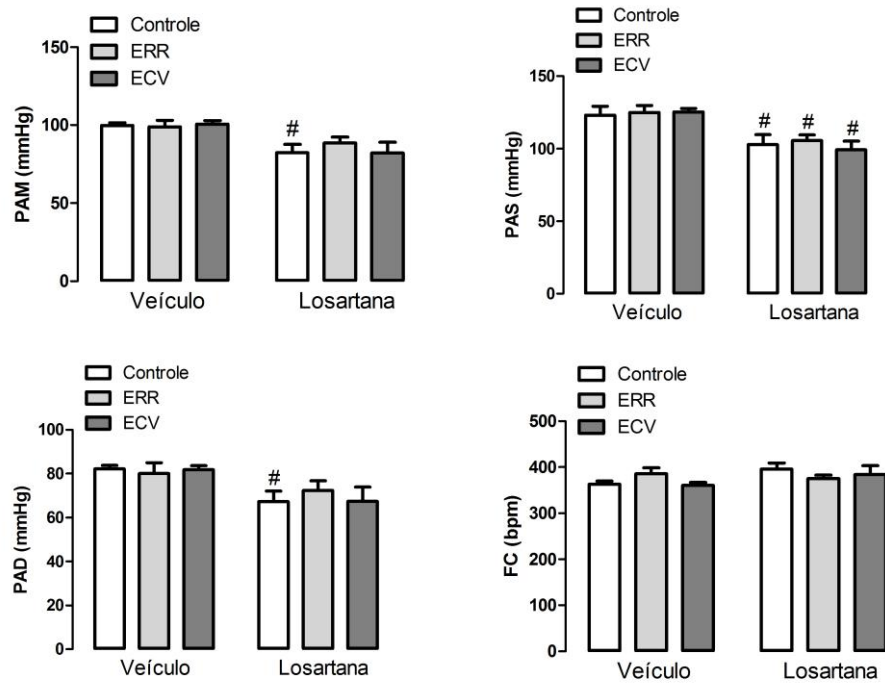


Figura 3 – Pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD); e frequência cardíaca (FC) em animais controles tratados com veículo ou losartana (colunas branca) e submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR) (colunas cinza claro) ou estresse crônico variável (ECV) (colunas cinza escuro). As barras representam média±EPM. # $p < 0,05$ versus respectivo grupo veículo. Two-way ANOVA. (controle veículo: $n=6$, controle losartana: $n=8$, ERR veículo: $n=8$, ERR losartana: $n=8$, ECV veículo: $n=8$, ECV losartana: $n=7$).

5.3. Efeitos do estresse crônico e do tratamento com losartana na atividade autônoma e FC intrínseca

5.3.1. Atividade simpática cardíaca – A análise da variação da FC induzida pela administração intravenosa de propranolol (bloqueador da atividade simpática) indicou um efeito significativo do estresse ($F_{(2,39)} = 3.24$, $P < 0,05$) e do tratamento ($F_{(1,39)} = 4,37$, $P < 0,05$), bem como uma interação entre tratamento x estresse ($F_{(2,39)} = 4,29$, $P < 0,05$) (Figura 4). A análise *post-hoc* revelou que o ERR aumentou a resposta ao propranolol ($P < 0,05$) e este efeito foi inibido pelo tratamento com losartana ($P > 0,05$) (Figura 4).

5.3.2. Atividade parassimpática cardíaca – A análise da variação da FC induzida pela administração intravenosa de metilatropina (bloqueador da atividade parassimpática) não indicou efeito do estresse ($F_{(2,39)} = 1,39$, $P > 0,05$) e do tratamento com losartana ($F_{(1,39)} = 0,05$, $P > 0,05$), nem interação entre estresse x tratamento ($F_{(2,39)} = 2,40$, $P > 0,05$) (Figura 4). No entanto, a análise *post-hoc* revelou que tanto o ERR ($P < 0,05$) quanto o ECV ($P < 0,05$) reduziram a resposta da metilatropina nos animais tratados com veículo, mas não nos ratos tratados com losartana ($P > 0,05$) (Figura 4).

5.3.3. FC intrínseca – A análise dos valores de FC após o tratamento combinado com propranolol e metilatropina (FCi) não indicou efeito do estresse ($F_{(2,39)} = 0,57$, $P > 0,05$) ou do tratamento farmacológico ($F_{(1,39)} = 0,44$, $P > 0,05$) (Figura 4).

5.3.4. Atividade simpática vascular – A análise de oscilações da PAS do intervalo BF não indicou efeito do estresse ($F_{(2,39)} = 1,08$, $P > 0,05$) ou do tratamento ($F_{(1,31)} = 0,04$, $P > 0,05$) (Figura 4).

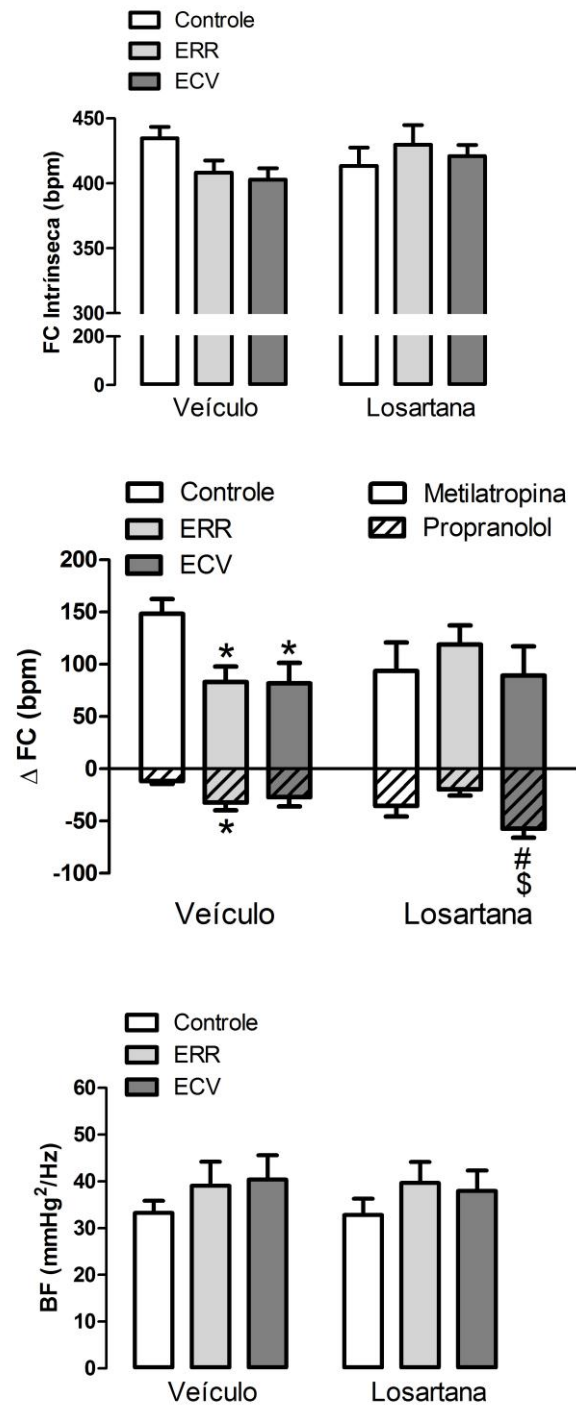


Figura 4 – Frequência cardíaca intrínseca (FCi) e atividade autônoma em animais controle tratados com veículo ou losartana (colunas branca) e submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR) (colunas cinza claro) ou estresse crônico variável (ECV) (colunas cinza escuro). Em cima valores de FC depois do tratamento combinado com propranolol e metil-atropina (FCi). No meio alterações na FC (Δ FC) evocados pela administração de metilatropina (valores positivos, barras lisas) ou propranolol (valores negativos, barras tracejadas). Em baixo a análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS). Gráfico que apresenta os valores oscilatórios de baixa frequência (BF). As barras representam média±EPM. * $p < 0.05$ versus grupo controle na mesma condição. # $p < 0.05$ versus respectivo grupo veículo. \$ $p < 0.05$ ECV versus ERR com a mesma condição. Two-way ANOVA. (controle veículo: $n=6$, controle losartana: $n=8$, ERR veículo: $n=8$, ERR losartana: $n=8$, ECV veículo: $n=8$, ECV losartana: $n=7$).

5.4. Efeitos do estresse crônico e do tratamento com losartana na atividade do barorreflexo

A atividade barorreflexa avaliada pela técnica de análise de sequência não indicou efeitos do estresse (Up: $F_{(2,39)} = 0,14$, $P > 0,05$; Down: $F_{(2,39)} = 0,70$, $P > 0,05$; All: $F_{(2,39)} = 0,12$, $P > 0,05$) ou do tratamento com losartan (Up: $F_{(1,39)} = 0,00$, $P > 0,05$; Down: $F_{(1,39)} = 0,20$, $P > 0,05$; All: $F_{(1,39)} = 0,53$, $P > 0,05$) na respostas das sequencias “up” e “down”, bem como nas sequencias “all” (Figura 5A).

Resultados da análise não-linear e linear da atividade do barorreflexo são apresentados na Tabela 2 e na Figura 5B. A análise não-linear da atividade do barorreflexo indicou efeito do estresse ($F_{(2,39)} = 5,01$, $P < 0,01$) e do tratamento ($F_{(1,39)} = 16,39$, $P < 0,0002$), bem como uma interação entre estresse x tratamento ($F_{(2,39)} = 3,80$, $P < 0,03$) para o parâmetro ganho (G). Além disso, a análise da “FC range” indicou uma interação entre estresse x tratamento ($F_{(2,39)} = 3,30$, $P < 0,04$), mas sem efeito do estresse ($F_{(2,39)} = 2,30$, $P > 0,05$) e do tratamento ($F_{(1,39)} = 2,20$, $P > 0,05$). A análise de parâmetros BP_{50} , P_1 e P_2 não indicam efeito do estresse (P_1 : $F_{(2,39)} = 0,96$, $P > 0,05$; P_2 : $F_{(2,39)} = 2,78$, $P > 0,05$; BP_{50} : $F_{(2,39)} = 0,55$, $P > 0,05$) ou do tratamento (P_1 : $F_{(1,39)} = 3,22$, $P > 0,05$; P_2 : $F_{(1,39)} = 0,01$, $P > 0,05$; BP_{50} : $F_{(1,39)} = 0,15$, $P > 0,05$). A análise *post-hoc* revelou que tanto o ERR ($P < 0,05$) quanto o CVS ($P < 0,05$) reduziram o G, P_2 e “FC range”, e esses efeitos foram inibidos pelo tratamento com losartan ($P > 0,05$).

O efeito da PAM no aumento e diminuição na FC também foi analisado separadamente usando a análise de regressão linear. No entanto, a comparação das respostas de bradicardia e taquicardia reflexas não indicou efeito do estresse (bradicardia: $F_{(2,39)} = 0,38$, $P > 0,05$; taquicardia: $F_{(2,39)} = 0,78$, $P > 0,05$) ou do tratamento farmacológico com losartana (bradicardia: $F_{(1,37)} = 0,29$, $P > 0,05$; taquicardia: $F_{(1,32)} = 0,21$, $P > 0,05$).

Tabela 2 – Parâmetros derivados da análise de regressão não-linear (Ganho, P_1 , P_2 , FC range, and BP_{50}) e linear (inclinação da bradicardia e inclinação da taquicardia) do barorreflexo em animais tratados com veículo ou losartana e submetidos ao ERR ou ao ECV.

| Grupo | Ganho (bpm/mmHg) | P_1 (Δ bpm) | P_2 (Δ bpm) | FC range (bpm) | BP_{50} (Δ mmHg) | Inclinação da Bradicardia (bpm/mmHg) | Inclinação da Taquicardia (bpm/mmHg) |
|------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Veículo | | | | | | | |
| Controle | -2.1±0.2 | -74±5 | 134±8 | 202±6 | -1.3±5 | -2.3±0.2 | -3.2±0.5 |
| ERR | -1.2±0.2* | -59±6 | 94±8* | 157±5* | -4.2±4 | -1.7±0.2 | -2.6±0.4 |
| ECV | -1.2±0.2* | -66±6 | 96±9* | 164±12 | -2.1±3 | -2.4±0.3 | -2.5±0.5 |
| Losartana | | | | | | | |
| Controle | -2.3±0.3 | -78±9 | 109±12 | 187±11 | 1.0±3 | -1.9±0.3 | -2.7±0.6 |
| ERR | -2.6±0.2# | -89±9 | 102±11 | 199±8# | 0.0±2 | -2.6±0.4 | -2.0±0.6 |
| ECV | -1.8±0.2# | -66±9 | 115±12 | 178±18 | -5.4±2 | -2.3±0.3 | -3.0±0.5 |

Valores são expressos em média±EPM (n=6: veículo controle, losartana controle; n=7: losartana ECV; n=8: veículo ERR, veículo ECV, losartana ERR).

*P<0.05 versus grupo controle na mesma condição, #P<0.05 versus respectivo grupo veículo. Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni's *post-hoc*.

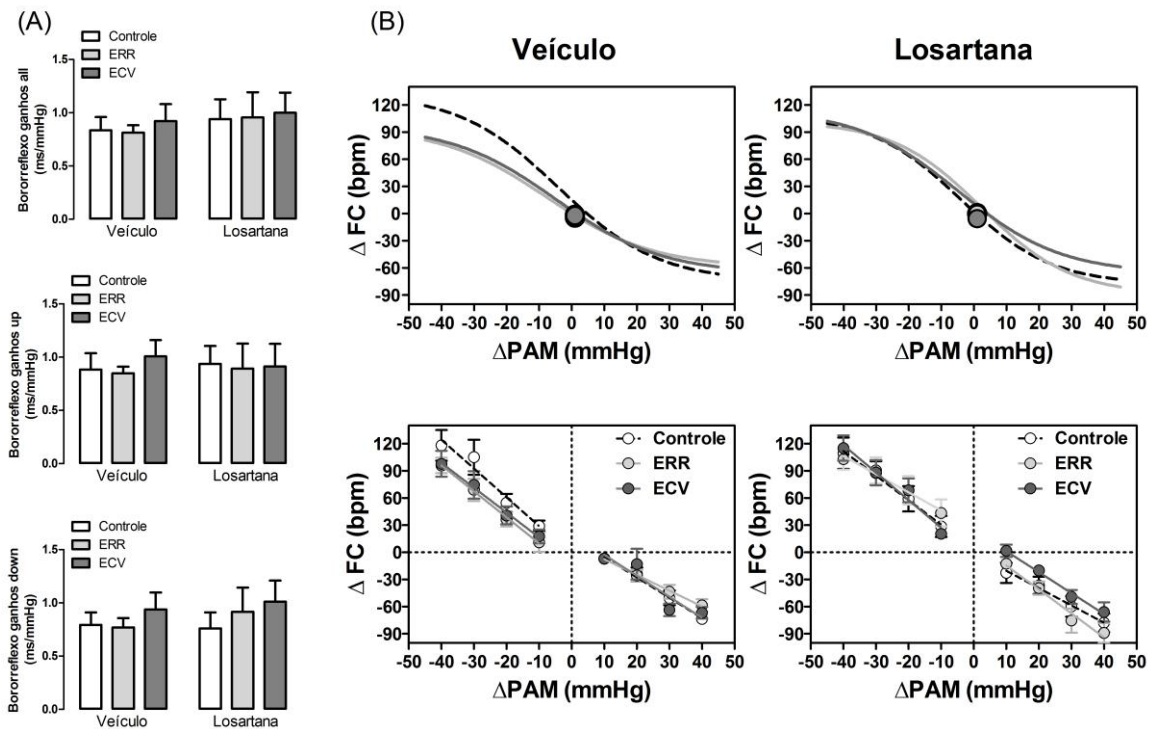


Figura 5 – Atividade do barorreflexo em animais controles tratados com veículo ou losartana (colunas branca) e submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR) (colunas cinza claro) ou estresse crônico variável (ECV) (colunas cinza escuro). **(A)** sensibilidade do barorreflexo espontâneo (SBE) determinado pela técnica de análise de sequência. Os gráficos apresenta a média de todas as inclinações (ganho do barorreflexo all, média das sequências de inclinação “up” e “down”) (em cima) e inclinação das sequências “up” (barorreflexo ganho up, no meio) e “down” (barorreflexo ganho down, em baixo). As barras representam a média±EPM. (controle veículo: n=6, controle losartana: n=8, ERR veículo: n=8, ERR losartana: n=8, ECV veículo: n=8, ECV losartana: n=7). Two-way ANOVA. **(B)** Análise de regressão não-linear (em cima) e linear (em baixo) do barorreflexo correlacionado variação da pressão arterial média (Δ PAM) evocada pela administração intravenosa de fenilefrina e NPS com a resposta reflexa de FC (Δ FC). Símbolos da curva sigmoide indicam a PA_{50} . (controle veículo: n=6, controle losartana: n=8, ERR veículo: n=8, ERR losartana: n=8, ECV veículo: n=8, ECV losartana: n=7).

5.5. Efeitos do estresse e tratamento com losartan na reatividade vascular aos agentes vasoativas

Os resultados da reatividade vascular aos agentes vasoativas são apresentados na Figura 6 e na Tabela 4.

5.5.1. Fenilefrina- Infusão intravenosa de fenilefrina, agonista seletivo de adrenorreceptores α_1 , evocou respostas pressoras em todos os grupos. A análise da $E_{m\acute{a}x}$ e da ED_{50} das curvas dose-resposta não indicou efeito do estresse ($E_{m\acute{a}x}$: $F_{(2,39)} = 0,11$, $P > 0,05$; ED_{50} : $F_{(2,39)} = 0,08$, $P > 0,05$) ou do tratamento ($E_{m\acute{a}x}$: $F_{(1,39)} = 1,16$, $P > 0,05$; ED_{50} : $F_{(1,39)} = 0,85$, $P > 0,05$).

5.5.2. Acetilcolina- Infusão sistêmica de acetilcolina reduziu a pressão arterial em todos os grupos. Comparação dos valores de $E_{m\acute{a}x}$ e ED_{50} das curvas dose-resposta indicou efeito do tratamento ($E_{m\acute{a}x}$: $F_{(1,39)} = 8,21$, $P < 0,01$; ED_{50} : $F_{(1,39)} = 5,11$, $P < 0,05$), mas sem efeito do estresse ($F_{(2,39)} = 0,48$, $P > 0,05$; ED_{50} : $F_{(2,37)} = 0,25$, $P > 0,05$) e interação entre estresse x tratamento ($F_{(2,39)} = 0,39$, $P > 0,05$; ED_{50} : $F_{(2,37)} = 1,09$, $P > 0,05$). No entanto, a análise *post-hoc* não revelou diferenças entre os grupos experimentais.

5.5.3. Nitroprussiato de sódio – A administração intravenosa do doador de óxido nítrico NPS reduziu a pressão arterial em todos os grupos. Comparação do $E_{m\acute{a}x}$ das curvas dose-resposta indicou efeito do tratamento ($F_{(1,39)} = 10,83$, $P < 0,01$) e interação entre estresse x losartan ($F_{(2,39)} = 3,29$, $P < 0,05$), mas sem efeito do estresse ($F_{(2,39)} = 1,99$, $P > 0,05$). A análise dos valores ED_{50} não indicou efeito do estresse ($F_{(2,39)} = 0,12$, $P > 0,05$), do tratamento com losartan ($F_{(1,39)} = 2,29$, $P > 0,05$), ou interação entre estresse x tratamento ($F_{(2,39)} = 1,03$, $p > 0,05$). A análise *post-hoc* não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Tabela 3 - Efeito máximo (E_{max}) e 50% da dose da variação da PAM (ED_{50}) por fenilefrina, acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS) na curva dose-resposta em animais tratados veículos ou submetidos ao ERR e ECV por 10 dias in consecutivos.

| Grupo | n | Fenilefrina | | Ach | | NPS | |
|------------------|---|-------------|-----------|-------------------------|--------------------|-----------|---------------------|
| | | ED_{50} | E_{max} | ED_{50} | E_{max} | ED_{50} | E_{max} |
| Veículo | | | | | | | |
| controle | 6 | 0.68±0.05 | 38±4 | 0.06±0.06 | -25±4 | 1.19±0.04 | -32±4 |
| ERR | 7 | 0.66±0.07 | 36±4 | 0.16±0.03 | -26±2 | 1.26±0.05 | -39±4 |
| ECV | 8 | 0.74±0.04 | 35±3 | 0.08±0.02 ^s | -25±3 | 1.28±0.03 | -42±2 |
| Losartana | | | | | | | |
| controle | 8 | 0.63±0.07 | 33±3 | 0.03±0.02 | -20±2 | 1.22±0.04 | -29±2 |
| ERR | 8 | 0.69±0.07 | 33±4 | -0.01±0.08 [#] | -19±3 | 1.18±0.03 | -34±3 |
| ECV | 7 | 0.61±0.05 | 34±4 | -0.02±0.02 | -15±3 [#] | 1.18±0.06 | -25±3 ^{#s} |

Valores são em média±EPM

* $P<0.05$ versus grupo controle. [#] $P<0.05$ versus respectivo grupo losartana. ^s $P<0.05$ versus respectivo grupo ERR. Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni *post hoc*.

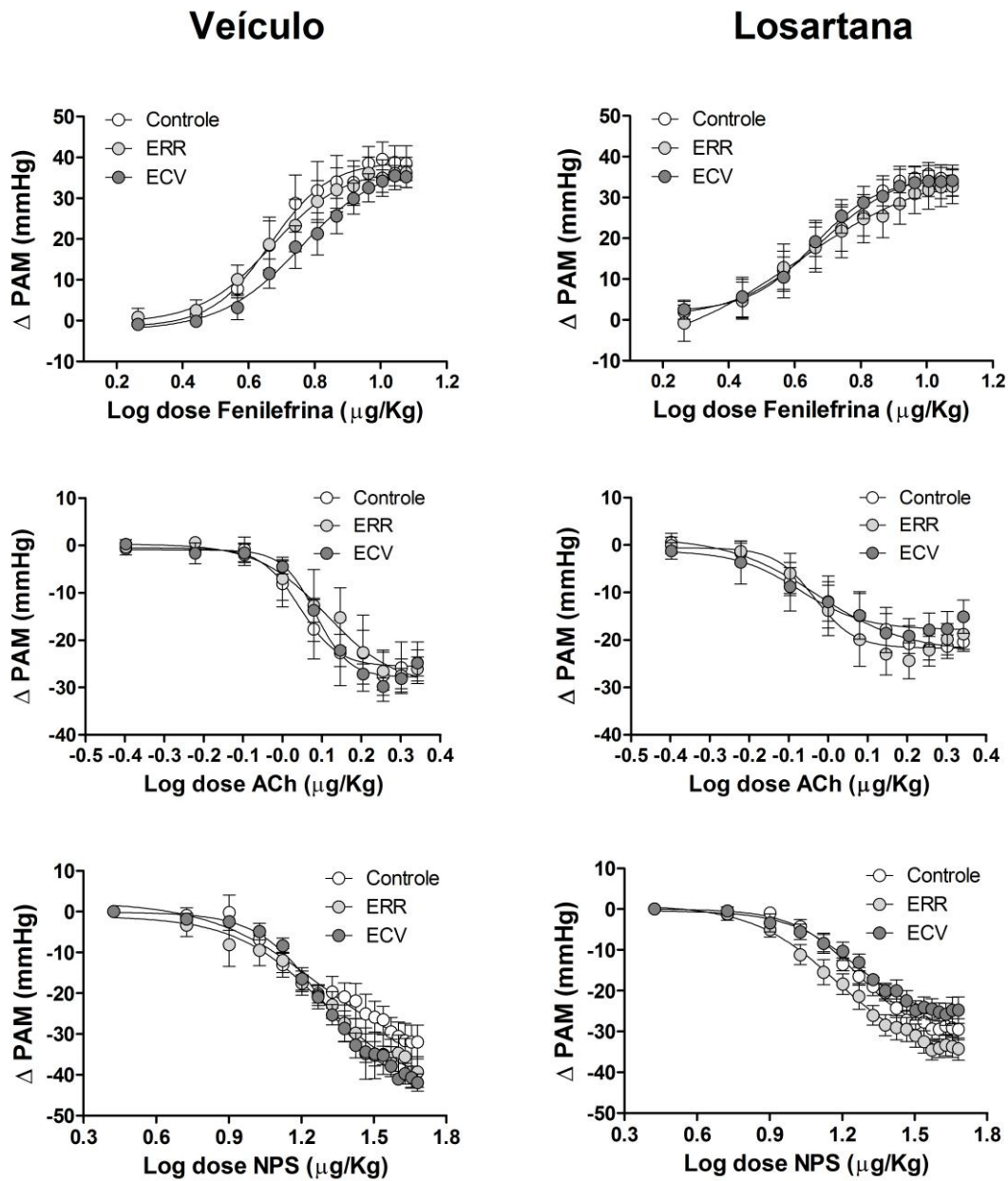


Figura 6 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM) evocado pela administração intravenosa de fenilefrina (em cima), acetilcolina (ACh, no meio) e nitroprussiato de sódio (NPS, em baixo) em animais tratados com veículo (esquerda) e losartana (direita) controle (símbolos brancos) e submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR) (símbolos cinza claro) ou ao estresse crônico variável (ECV) (símbolos cinza escuro). Os círculos representam a média \pm EPM. Análise de regressão não-linear. (controle veículo: n=6, controle losartana: n=8, ERR veículo: n=8, ERR losartana: n=8, ECV veículo: n=8, ECV losartana: n=7).

6. DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro a investigar um envolvimento da Ang II, agindo em receptores AT₁, nas alterações autônomas e cardiovasculares evocadas por protocolos de estresse crônico homotípico e heterotípico. A Tabela 4 sumariza os principais achados relatados no presente estudo.

Tabela 4 – Sumário dos efeitos do estresse de restrição repetido (ERR) e estresse crônico variável (ECV) em animais tratados com veículo ou losartana.

| | Veículo | | | Losartana | | |
|--|----------|-----|-----|-----------|-----|-----|
| | Controle | ERR | ECV | Controle | ERR | ECV |
| Parâmetros somáticos | | | | | | |
| <i>Peso corporal</i> | -- | -- | ↓ | -- | -- | ↓ |
| <i>Peso do coração</i> | -- | ↑ | ↑ | -- | -- | -- |
| <i>Peso das adrenais</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>Peso do timo</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Eixo HPA | | | | | | |
| <i>Corticosterona</i> | -- | -- | ↑ | -- | -- | ↑ |
| Parâmetros Cardiovasculares basais | | | | | | |
| <i>Pressão arterial média</i> | -- | -- | -- | ↓ | -- | -- |
| <i>Pressão arterial diastólica</i> | -- | -- | -- | ↓ | -- | -- |
| <i>Pressão arterial sistólica</i> | -- | -- | -- | ↓ | ↓ | ↓ |
| <i>FC</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Atividade autônoma | | | | | | |
| <i>Atividade simpática cardíaca</i> | -- | ↑ | -- | -- | -- | ↑ |
| <i>Atividade vagal cardíaca</i> | -- | ↓ | ↓ | -- | -- | -- |
| <i>Atividade simpática vascular</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>FC intrínseca</i> | -- | ↓* | ↓* | -- | -- | -- |
| <i>Bradycardia barorreflexa</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>Taquicardia barorreflexa</i> | -- | ↓ | ↓ | -- | -- | -- |
| Função vascular | | | | | | |
| <i>Resposta pressórica a fenilefrina</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>Efeito depressor da acetilcolina</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>Efeito depressor do nitroprussiato de sódio</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

Setas para cima ou para baixo indicam aumento ou diminuição significativo, respectivamente.

*Estatisticamente não significante, porém relevante (diminuição de ~10%).

Os achados de que o peso corporal e a concentração de corticosterona plasmática foram afetados somente pelo ECV está em consonância com evidências anteriores indicando que alterações em parâmetros somáticos e aumento dos níveis de glicocorticóides circulantes são mais frequentemente observados após a exposição a estressores heterotípicos (MAGARIÑOS; MCEWEN, 1995; MARIN; CRUZ; PLANETA, 2007). Habituação significativa do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) ocorre ao longo de repetidas exposições ao mesmo estressor, o que minimiza o impacto dos estressores homotípicos na concentração plasmática basal de corticosterona e parâmetros somáticos (HERMAN, 2013). Curiosamente, a hipersecreção de corticosterona evocada pelo ECV e a diminuição do ganho de peso corporal não foram afetados pelo tratamento com losartana. Na verdade, diminuição do peso corporal foi detectada precocemente nos animais tratados com losartana (dia 5 vs dia 10 nos animais veículo), o que sugere que o tratamento com losartana acentuou o efeito ECV. Uresin et al., (2004) identificou um pequeno aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona em ratos submetidos a um protocolo de ERR, que foi inibido pelo tratamento sistêmico com losartana. Em conjunto com os presentes resultados, esse achado indica um papel específico do receptor AT₁ nas alterações no eixo HPA induzidas por protocolos homotípicos e heterotípicos.

Com relação aos resultados de peso corporal, nossos resultados estão de acordo com um estudo recente que não identificou efeito do tratamento sistêmico com telmisartan, antagonista de receptor AT₁, na redução do peso corporal evocada por um protocolo de ERR (WINCEWICZ; BRASZKO, 2014). No entanto, os nossos resultados fornecem a primeira evidência de um possível papel facilitador do tratamento com antagonistas dos receptores AT₁ nos efeitos do estresse crônico no peso corporal. Foi demonstrado que antagonistas dos receptores AT₁ podem reduzir o ganho de peso através da ativação do receptor “*peroxisome proliferator-activated*” (PPAR) (HE et al., 2010). Especificamente com relação a losartana,

foi demonstrado que o tratamento crônico com essa substância resulta em aumento nos níveis do metabólito EXP3179, que é suficiente para a ativação do receptor PPAR γ (KAPPERT *et al.*, 2009). O PPAR γ é um receptor nuclear altamente expressado em adipócitos que desempenham um papel na diferenciação dos adipócitos (VIDAL-PUIG *et al.*, 1997). De fato, expressão aumentada deste receptor tem sido implicada na obesidade (VIDAL-PUIG *et al.*, 1997). Assim, o efeito facilitador da losartana na redução do ganho de peso corporal evocado pelo ECV parece ser mediada por mecanismos que independentes da ativação do receptor PPAR γ . Desse modo, o efeito facilitador da losartana nas alterações no peso corporal causadas pelo ECV merecem mais investigação.

Nenhum dos protocolos de estresse crônico afetaram os valores basais de pressão arterial. Achados inconsistentes foram relatados sobre o impacto de modelos animais de estresse crônico sobre a pressão arterial (NALIVAICO, 2011), de modo que nossos resultados corroboram com resultados que indicaram ausência de efeito do estresse crônico na pressão arterial basal (BECHTOLD *et al.*, 2009). Resultados consistentes têm demonstrado que o ERR não afeta valores basais de FC (BECHTOLD *et al.*, 2009; DAUBERT *et al.*, 2012; DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015; MCDUGALL, S J *et al.*, 2000), enquanto taquicardia de repouso tem sido documentada após a exposição ao ECV (BOUZINOVA *et al.*, 2012; DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002). No entanto, nossos resultados corroboram com evidências anteriores de que o ECV não afeta a FC basal (ALMEIDA *et al.*, 2015; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA *et al.*, 2010; FLAK *et al.*, 2011; XIE *et al.*, 2012). Foi demonstrado que o tratamento crônico com losartana em doses que variam de 10 a 40 mg/kg diminuiu a pressão arterial basal em ratos normotensos (BEZERRA *et al.*, 2001; KOPRDOVA; CEBOVA; KRISTEK, 2009; LEENEN; WHITE; YUAN, 2001; SACERDOTE *et al.*, 1995; XAVIER *et al.*, 2004), o que suporta os nossos resultados.

Apesar da ausência de alterações na FC basal, um desequilíbrio simpato-vagal cardíaco em direção a predominância simpática foi observada após exposição tanto ao ERR quanto ao ECV. Observou-se uma tendência de diminuição da FCi (~10%) em animais submetidos a ambos os protocolos, sugerindo assim que uma diminuição na atividade de marca-passo cardíaco evitou o surgimento de mudanças na FC basal. O tratamento com losartana inibiu as alterações na atividade autonômica evocada por ambos os protocolos de estresse crônico, indicando assim um papel da Ang II, agindo em receptores AT₁ nestas respostas. Mudanças no equilíbrio autonômico cardíaco em direção a um predomínio simpático têm sido consideradas um importante fator de risco para mortalidade e morbidade cardiovascular (CARNEVALI; SGOIFO, 2014).

A análise farmacológica clássica indicou uma redução na atividade do barorreflexo em animais submetidos ao ERR ou ECV. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios (ALMEIDA *et al.*, 2015; DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002; PORTER *et al.*, 2004). A técnica de análise de seqüência não revelou efeito dos estressores crônicos sobre a atividade do barorreflexo. Os nossos resultados corroboram com evidências recentes que o estresse crônico afeta diferentemente as respostas do barorreflexo geradas durante variações espontâneas e alterações farmacológicas da pressão arterial (ALMEIDA *et al.*, 2015). A ablação de regiões específicas do sistema nervoso central, como o núcleo paraventricular do hipotálamo e o núcleo parabraquial lateral, tem efeitos diferentes sobre as respostas do barorreflexo avaliadas pela abordagem farmacológica clássica e a técnica de análise de seqüência (ANDRADE *et al.*, 2014; CRESTANI *et al.*, 2010), o que sugere a presença de circuitos específicos do barorreflexo gerando respostas reflexas durante as mudanças de pressão arterial espontânea e induzida farmacologicamente. Diminuição da atividade do barorreflexo está associada a hiperatividade do tônus simpático e diminuição da atividade parassimpática cardíaca (GRASSI *et al.*, 2004). Portanto, comprometimento da

função do barorreflexo pode desempenhar um papel importante no desequilíbrio autônomo evocado pelo ERR e pelo ECV.

O tratamento com losartana inibiu as alterações na atividade barorreflexa evocadas pelos dois protocolos de estresse crônico. Esta constatação indica um envolvimento da Ang II, agindo em receptores AT₁, nas alterações do barorreflexo evocadas pelo estresse, além de reforçar a evidência de um envolvimento da Ang II/AT₁ nas alterações autônomas evocados pelo estresse crônico. O estresse crônico aumenta a Ang II no plasma e no encéfalo, além de elevar a expressão de receptores AT₁ em regiões do encéfalo que controlam a atividade autônoma (CASTREN; SAAVEDRA, 1988; MCDOUGALL, S J *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 1993). A ativação dos receptores AT₁ no sistema nervoso central provoca um conjunto de alterações na atividade autônoma, incluindo aumento da atividade simpática, diminuição da atividade parassimpática e inibição da função do barorreflexo (HEAD, G A; MAYOROV, 2001; LINDPAINNER; GANTEN, 1991). Além disso, a Ang II facilita a liberação de noradrenalina nos terminais do nervo simpático cardíaco (LINDPAINNER; GANTEN, 1991). Portanto, a inibição do desequilíbrio simpato-vagal evocado pelo estresse pelo tratamento com losartana pode ser mediada pelo bloqueio do receptor AT₁ central ou periférico. No entanto, tem sido proposto que a modulação da função barorreflexa é principalmente mediada pela ação da Ang II no sistema nervoso central (AVERILL; DIZ, 2000; HEAD, G A; MAYOROV, 2001), indicando, assim, um efeito mais provável da losartana em circuitos do barorreflexo no encéfalo para inibir os efeitos dos estressores crônicos sobre esse mecanismo reflexo cardiovascular.

A losartana atravessa pobremente a barreira hematoencefálica. No entanto, ações no sistema nervoso central podem ocorrer com tratamento prolongado ou condições patológicas (DURON; HANON, 2010; KARNIK *et al.*, 2015). Por exemplo, foram demonstrados que o estresse e a hipertensão são condições patológicas que podem promover aumento na

permeabilidade da barreira hematoencefálica (SKULTÉTYOVÁ; TOKAREV; JEZOVÁ, 1998; UENO *et al.*, 2004), assim facilitando a ação da losartana no encéfalo.

A hipertensão é associada à disfunção vascular (TANG; VANHOUTTE, 2010). Portanto, a resposta semelhante aos agentes vasoativos em animais estressados e não estressados corrobora com a ausência de efeito dos protocolos de estresse crônico sobre a pressão arterial basal. O tônus vasomotor simpático semelhante entre os grupos experimentais (evidenciados pela análise das oscilações da PAS no LF) também suporta a ausência de alterações na pressão arterial no presente estudo. No entanto, nossos resultados estão em contraste com estudos *in vitro* e *in vivo* prévios, nos quais relataram alterações na reatividade vascular a agentes vasodilatadores e vasoconstritores após a exposição ao ERR e ao ECV (ALMEIDA *et al.*, 2015; BAPTISTA *et al.*, 2014; DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015; ISINGRINI *et al.*, 2012; NEVES *et al.*, 2009). Os motivos para a discrepância não são completamente claras. No entanto, no presente estudo os ratos foram tratados diariamente com losartana. Tem sido relatado que o manuseio excessivo pelo experimentador (tais como para o tratamento farmacológico diário) pode minimizar os efeitos do estresse (FONE; PORKESS, 2008). Ainda com relação a reatividade vascular, vale também destacar que o tratamento crônico com losartana não causou qualquer mudança na resposta pressórica aos agentes vasodilatadores e vasoconstritor, o que corrobora com estudos anteriores que demonstraram que o tratamento com losartana não afeta a reatividade vascular a agentes vasoativos (FAILLI *et al.*, 2009).

7. CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo indicam um envolvimento da Angiotensina II agindo nos receptores AT_1 no desequilíbrio simpato-vagal e nas alterações da atividade do barorreflexo evocadas por regimes de estresse crônico homotípico ou heterotípico. Portanto, os nossos resultados fornecem a primeira evidência que a inibição nas alterações da atividade simpática e parassimpática constitui um importante mecanismo relacionado com o efeito protetor do tratamento com antagonistas dos receptores AT_1 nas disfunções cardiovasculares desencadeadas pelo estresse. Os nossos resultados também fornecem evidências de que o aumento nos níveis circulantes de corticosterona causada pelo ECV é independente da Angiotensina II atuando no receptor AT_1 , enquanto que a redução do ganho de peso corporal evocada por estressores heterotípicos pode ser facilitada pelo tratamento com losartana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA, G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 9, n. 8, p. 329–36, 1998.
- ALMEIDA, J. *et al.* Effects of nitric oxide synthesis inhibitor or fluoxetine treatment on depression-like state and cardiovascular changes induced by chronic variable stress in rats. **Stress**, v. 18, n. 4, p. 462–474, 2015.
- ANDRADE, C. A. F. *et al.* Role of Alpha 2-adrenoceptors in the lateral parabrachial nucleus in the control of body fluid homeostasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 1, p. 11–18, 2014.
- ARMANDO, I. *et al.* Peripheral administration of an angiotensin II AT(1) receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation Stress. **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 3880–9, 2001.
- AVERILL, D. B.; DIZ, D. I. Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. **Brain research bulletin**, v. 51, n. 2, p. 119–28, 2000.
- BALI, A.; JAGGI, A. S. Angiotensin as stress mediator: Role of its receptor and interrelationships among other stress mediators and receptors. **Pharmacological Research**, v. 76, p. 49–57, 2013.
- BAPTISTA, R. DE F. F. *et al.* Stress alone or associated with ethanol induces prostanoid release in rat aorta via alpha2-Adrenoceptor. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 102, n. 3, p. 211–8, 2014.
- BARRON, B. A.; VAN LOON, G. R. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 28, n. 2, p. 179–87, 1989.
- BECHTOLD, A. G. *et al.* Chronic blockade of hindbrain glucocorticoid receptors reduces blood pressure responses to novel stress and attenuates adaptation to repeated stress. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 296, n. 5, p. R1445–54, 2009.
- BEZERRA, S. M. M. S. *et al.* Chronic AT 1 Receptor Blockade Alters Autonomic Balance and Sympathetic Responses in Hypertension. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 569–575, 2001.
- BOUZINOVA, E. V. *et al.* Chronic mild stress-induced depression-like symptoms in rats and abnormalities in catecholamine uptake in small arteries. **Psychosomatic medicine**, v. 74, n. 3, p. 278–87, 2012.

- BUSNARDO, C.; TAVARES, R. F.; CORREA, F. M. A. Angiotensinergic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates the pressor response to acute restraint stress in rats. **Neuroscience**, v. 270, n. 6, p. 12–19, 2014.
- CARDILLO, C. *et al.* Effects of benazepril on stress testing blood pressure in essential hypertension. **The American journal of cardiology**, v. 73, n. 5, p. 368–73, 1994.
- CARNEVALI, L.; SGOIFO, A. Vagal modulation of resting heart rate in rats: the role of stress, psychosocial factors, and physical exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 5, 2014.
- CASTREN, E.; SAAVEDRA, J. M. Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in rat paraventricular nucleus and subfornical organ. **Endocrinology**, v. 122, n. 1, p. 370–2, 1988.
- CHEN, X.; HERBERT, J. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. **Neuroscience**, v. 64, n. 3, p. 675–85, 1995.
- CONTI, L. H. *et al.* Repeated restraint stress-induced increase in baroreceptor reflex sensitivity: role of corticotropin-releasing factor. **Neuropeptides**, v. 35, n. 2, p. 71–81, 2001.
- CONWAY, J. Vascular reactivity in experimental hypertension measured after hexamethonium. **Circulation**, v. 17, n. 4, Part 2, p. 807–10, 1958.
- CORDELLINI, S.; VASSILIEFF, V. S. Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats is potentiated by previous chronic stress: nitric oxide involvement. **General pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 79–83, 1998.
- CRESTANI, C. C. *et al.* Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 2-3, p. 527–533, 2011.
- CRESTANI, C. C. *et al.* Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. **Stress: The International Journal on the Biology of Stress**, v. 13, n. 1, p. 61–72, 2010.
- CRESTANI, C. C. *et al.* N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. **Neuroscience research**, v. 67, n. 4, p. 317–26, 2010.
- CRESTANI, C. C. *et al.* Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 12, n. 3, p. 268–78, 2009.
- CRUZ, F. C. *et al.* Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. **International Journal of Developmental**

Neuroscience, v. 30, n. 1, p. 19–23, 2012.

CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A. *et al.* Brain vasopressin V(1) receptors contribute to enhanced cardiovascular responses to acute stress in chronically stressed rats and rats with myocardial infarction. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 298, n. 3, p. R672–80, 2010.

CULMAN, J. *et al.* Effects of systemic treatment with irbesartan and losartan on central responses to angiotensin II in conscious, normotensive rats. **European journal of pharmacology**, v. 367, n. 2-3, p. 255–65, 1999.

D'AUDIFFRET, A. C. *et al.* Depressive behavior and vascular dysfunction: a link between clinical depression and vascular disease? **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 108, n. 5, p. 1041–51, 2010.

DAUBERT, D. L. *et al.* Nucleus of the solitary tract catecholaminergic neurons modulate the cardiovascular response to psychological stress in rats. **The Journal of physiology**, v. 590, n. Pt 19, p. 4881–95, 2012.

DE GASPARO, M. *et al.* International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 3, p. 415–72, 2000.

DUARTE, J. O. *et al.* Stress Vulnerability During Adolescence. **Psychosomatic Medicine**, v. 77, n. 2, p. 186–199, 2015.

DUARTE, J. O.; PLANETA, C. S.; CRESTANI, C. C. Immediate and long-term effects of psychological stress during adolescence in cardiovascular function: Comparison of homotypic vs heterotypic stress regimens. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 40, p. 52–59, 2015.

DURON, E.; HANON, O. Antihypertensive treatments, cognitive decline, and dementia. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 20, n. 3, p. 903–14, 2010.

ENGI, S. A. *et al.* Effect of the Single or Combined Administration of Cocaine and Testosterone on Cardiovascular Function and Baroreflex Activity in Unanesthetized Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 231–240, 2012.

ERDOS, B. *et al.* Hypertensive effects of central angiotensin II infusion and restraint stress are reduced with age. **Journal of Hypertension**, v. 28, n. 6, p. 1, 2010.

FAILLI, P. *et al.* Losartan counteracts the hyper-reactivity to angiotensin II and ROCK1 over-activation in aortas isolated from streptozotocin-injected diabetic rats. **Cardiovascular diabetology**, v. 8, p. 32, 2009.

FARRELL, T. G. *et al.* Baroreflex sensitivity and electrophysiological correlates in patients

- after acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 83, n. 3, p. 945–52, 1991.
- FLAK, J. N. *et al.* Opposing effects of chronic stress and weight restriction on cardiovascular, neuroendocrine and metabolic function. **Physiology & behavior**, v. 104, n. 2, p. 228–34, 2011.
- FONE, K. C. F.; PORKESS, M. V. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 32, n. 6, p. 1087–102, 2008.
- FORD, D. E. *et al.* Depression is a risk factor for coronary artery disease in men: the precursors study. **Archives of internal medicine**, v. 158, n. 13, p. 1422–6, 1998.
- GHIADONI, L.; TADDEI, S.; VIRDIS, A. Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach. **Current vascular pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 42–60, 2012.
- GRASSI, G. *et al.* Sympathetic and baroreflex function in hypertensive or heart failure patients with ventricular arrhythmias. **Journal of hypertension**, v. 22, n. 9, p. 1747–53, 2004.
- GRIPPO, A. J.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, A. K. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. **Physiology & behavior**, v. 78, n. 4-5, p. 703–10, 2003.
- GRIPPO, A. J.; JOHNSON, A. K. Stress, depression and cardiovascular dysregulation: A review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. **Stress: The International Journal on the Biology of Stress**, v. 12, n. 1, p. 1–21, 2009.
- GRIPPO, A. J.; MOFFITT, J. A.; JOHNSON, A. K. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. **American Journal of Physiology**, v. 282, n. 5, p. R1333–R1341, 2002.
- GRIPPO, A. J.; MOFFITT, J. A.; JOHNSON, A. K. Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. **Psychosomatic medicine**, v. 70, n. 4, p. 435–43, 2008.
- HAINES, A. P.; IMESON, J. D.; MEADE, T. W. Phobic anxiety and ischaemic heart disease. **BMJ**, v. 295, n. 6593, p. 297–299, 1987.
- HALL, J. E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. **Molecular biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 27–39, 2003.
- HARLAN, W. R. Physical and psychosocial stress and the cardiovascular system. **Circulation**, v. 63, n. 1, p. 266A–271A, 1981.
- HARRISON, D. G. *et al.* Alterations of vascular reactivity in atherosclerosis. **Circulation**

research, v. 61, n. 5 Pt 2, p. II74–80, 1987.

HE, H. *et al.* Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta-dependent pathways. **Hypertension**, v. 55, n. 4, p. 869–79, 2010.

HEAD, G. A. Proceedings of the Symposium “Angiotensin AT1 Receptors: From Molecular Physiology to Therapeutics”: ROLE OF AT1 RECEPTORS IN THE CENTRAL CONTROL OF SYMPATHETIC VASOMOTOR FUNCTION. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 23, n. S3, p. 93–98, 1996.

HEAD, G. A.; MAYOROV, D. N. Central angiotensin and baroreceptor control of circulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 940, p. 361–79, 2001.

HEAD, G. A.; MCCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 21, n. 2-3, p. 203–13, 1987.

HERMAN, J. P. Neural control of chronic stress adaptation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, n. August, p. 1–12, 2013.

IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 31, n. 9, p. 1213–20, 1998.

ISINGRINI, E. *et al.* Altered aortic vascular reactivity in the unpredictable chronic mild stress model of depression in mice: UCMS causes relaxation impairment to ACh. **Physiology & behavior**, v. 103, n. 5, p. 540–6, 2011.

ISINGRINI, E. *et al.* Fluoxetine effect on aortic nitric oxide-dependent vasorelaxation in the unpredictable chronic mild stress model of depression in mice. **Psychosomatic medicine**, v. 74, n. 1, p. 63–72, 2012.

JANKORD, R.; HERMAN, J. P. Limbic Regulation of Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Function during Acute and Chronic Stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1148, n. 1, p. 64–73, 2008.

JEZOVA, D. *et al.* Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 10, p. 67–72, 1998.

KAHAN, T.; ELIASSON, K. The influence of long-term ACE inhibitor treatment on circulatory responses to stress in human hypertension. **American Journal of Hypertension**,

v. 12, n. 12 Pt 1-2, p. 1188–1194, 1999.

KAPPERT, K. *et al.* Chronic Treatment With Losartan Results in Sufficient Serum Levels of the Metabolite EXP3179 for PPAR Activation. **Hypertension**, v. 54, n. 4, p. 738–743, 2009.

KARNIK, S. S. *et al.* Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 754–819, 2015.

KAWACHI, I. *et al.* Symptoms of anxiety and risk of coronary heart disease. The Normative Aging Study. **Circulation**, v. 90, n. 5, p. 2225–9, 1994.

KNOX, S. S.; UVNÄS-MOBERG, K. Social isolation and cardiovascular disease: an atherosclerotic pathway? **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, n. 8, p. 877–90, 1998.

KOPRDOVA, R.; CEBOVA, M.; KRISTEK, F. Long-term effect of losartan administration on blood pressure, heart and structure of coronary artery of young spontaneously hypertensive rats. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 58, n. 3, p. 327–35, 2009.

KRANTZ, D. S. *et al.* Mental stress as a trigger of myocardial ischemia and infarction. **Cardiology clinics**, v. 14, n. 2, p. 271–87, 1996.

KUBO, T. *et al.* Angiotensin receptor blockade in the anterior hypothalamic area inhibits stress-induced pressor responses in rats. **Brain research bulletin**, v. 56, n. 6, p. 569–74, 2001.

LEENEN, F. H.; WHITE, R.; YUAN, B. Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 281, n. 6, p. H2410–6, 2001.

LIMA JUNIOR, E.; LIMA NETO, E. Hipertensão arterial : aspectos comportamentais – Estresse e migração. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 17, n. 4, p. 210–225, 2010.

LINDPAINTNER, K.; GANTEN, D. The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. **Circulation research**, v. 68, n. 4, p. 905–21, 1991.

MAGARIÑOS, A. M.; MCEWEN, B. S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. **Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 83–8, 1995.

MALLIANI, A *et al.* Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, v. 84, n. 2, p. 482–492, 1991.

MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiology**

& Behavior, v. 90, n. 1, p. 29–35, 2007.

MARTÍ, O.; MARTÍ, J.; ARMARIO, A. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. **Physiology & behavior**, v. 55, n. 4, p. 747–53, 1994.

MAYOROV, D. N. Brain angiotensin AT1 receptors as specific regulators of cardiovascular reactivity to acute psychoemotional stress. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 38, n. 2, p. 126–35, 2011.

MCDOUGALL, S. J. *et al.* Characterisation of vasopressin V(1A), angiotensin AT(1) and AT(2) receptor distribution and density in normotensive and hypertensive rat brain stem and kidney: effects of restraint stress. **Brain research**, v. 883, n. 1, p. 148–56, 2000.

MCDOUGALL, S. J.; LAWRENCE, A. J.; WIDDOP, R. E. Differential cardiovascular responses to stressors in hypertensive and normotensive rats. **Experimental physiology**, v. 90, n. 1, p. 141–50, 2005.

MÉNARD, J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. **Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension**, v. 11, n. 3, p. S3–11, 1993.

NALIVAIKO, E. Animal models of psychogenic cardiovascular disorders: what we can learn from them and what we cannot. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 38, n. 2, p. 115–25, 2011.

NATELSON, B. H. *et al.* Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. **Physiology & behavior**, v. 43, n. 1, p. 41–6, 1988.

NEGRAO, C. E. *et al.* Vagal function impairment after exercise training. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 72, n. 5, p. 1749–53, 1992.

NEVES, V. J. *et al.* Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 12, n. 4, p. 320–7, 2009.

ORTIZ, J. *et al.* Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 6, p. 443–52, 1996.

PICKERING, T. G. Does psychological stress contribute to the development of hypertension and coronary heart disease? **European journal of clinical pharmacology**, v. 39 Suppl 1, p. S1–7, 1990.

PORTER, J. P. *et al.* Effect of chronic stress on the cardiac baroreflex in the post-weanling

rat. **Life sciences**, v. 75, n. 13, p. 1595–607, 2004.

RESSTEL, L. B. M. *et al.* Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. **Life sciences**, v. 78, n. 19, p. 2179–87, 2006.

ROZANSKI, A.; BLUMENTHAL, J. A.; KAPLAN, J. Impact of Psychological Factors on the Pathogenesis of Cardiovascular Disease and Implications for Therapy. **Circulation**, v. 99, n. 16, p. 2192–2217, 1999.

SAAVEDRA, J. M. *et al.* A Centrally Acting, Anxiolytic Angiotensin II AT1 Receptor Antagonist Prevents the Isolation Stress-Induced Decrease in Cortical CRF1 Receptor and Benzodiazepine Binding. **Neuropsychopharmacology**, v. 54, n. 2, p. 271–81, 2006.

SAAVEDRA, J. M. *et al.* Brain angiotensin II, an important stress hormone: regulatory sites and therapeutic opportunities. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1018, p. 76–84, 2004.

SACERDOTE, A. *et al.* Effects of chronic treatment with losartan on blood pressure, endothelin-like immunoreactivity and nitric oxide in normotensive rats. **Journal of hypertension**, v. 13, n. 12 Pt 2, p. 1670–3, 1995.

SAIKI, Y. *et al.* Role of central ANG II receptors in stress-induced cardiovascular and hyperthermic responses in rats. **The American journal of physiology**, v. 272, n. 1 Pt 2, p. R26–33, 1997.

SANCHES, I. C. *et al.* Tonic and reflex cardiovascular autonomic control in trained-female rats. **www.bjournal.com.br Braz J Med Biol Res Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 42, p. 942–948, 2009.

SKULTÉTYOVÁ, I.; TOKAREV, D.; JEZOVÁ, D. Stress-induced increase in blood-brain barrier permeability in control and monosodium glutamate-treated rats. **Brain research bulletin**, v. 45, n. 2, p. 175–8, 1998.

TAKASE, B. *et al.* Heart rate variability in patients with diabetes mellitus, ischemic heart disease, and congestive heart failure. **Journal of electrocardiology**, v. 25, n. 2, p. 79–88, 1992.

TANG, E. H. C.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 459, n. 6, p. 995–1004, 2010.

UENO, M. *et al.* Blood-brain barrier is impaired in the hippocampus of young adult spontaneously hypertensive rats. **Acta Neuropathologica**, v. 107, n. 6, p. 532–538, 2004.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress

- responses. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009.
- URESIN, Y. *et al.* Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS**, v. 5, n. 2, p. 93–6, 2004.
- VIDAL-PUIG, A. J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 10, p. 2416–2422, 1997.
- WATANABE, T. *et al.* Stress and brain angiotensin II receptors. **Critical reviews in neurobiology**, v. 12, n. 4, p. 305–17, 1998.
- WINCEWICZ, D.; BRASZKO, J. J. Telmisartan attenuates cognitive impairment caused by chronic stress in rats. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 3, p. 436–441, 2014.
- WRIGHT, J. W.; HARDING, J. W. Brain renin-angiotensin—A new look at an old system. **Progress in Neurobiology**, v. 95, n. 1, p. 49–67, 2011.
- XAVIER, F. E. *et al.* Contribution of the endothelin and renin-angiotensin systems to the vascular changes in rats chronically treated with ouabain. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 6, p. 794–802, 2004.
- XIE, F. *et al.* Neuropeptide Y reverses chronic stress-induced baroreflex hypersensitivity in rats. **Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 29, n. 3-4, p. 463–74, 2012.
- YANG, G. *et al.* Changes in circulating and tissue angiotensin II during acute and chronic stress. **Biological signals**, v. 2, n. 3, p. 166–72, 1993.
- ZAMAN, M. A.; OPARIL, S.; CALHOUN, D. A. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 1, n. 8, p. 621–36, 2002.

ANEXO A – CEUA – Protocolo do comitê de ética de uso de animais

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 32/2014

Interessado: WILLIAN COSTA FERREIRA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

Projeto: Efeito do tratamento crônico com losartan sobre as alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse crônico: comparação de protocolos de estresse homotípico e heterotípico

Parecer nº 92/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 16 de setembro de 2015, analisou e aprovou o pedido de prorrogação do protocolo para uso de animais na pesquisa "Efeito do tratamento crônico com losartan sobre as alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse crônico: comparação de protocolos de estresse homotípico e heterotípico", apresentado pelo pós-graduando WILLIAN COSTA FERREIRA, sob orientação do Professor Doutor Carlos Cesar Crestani, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicológicos desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MARÇO de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 21 de SETEMBRO de 2015.



Prof^a Dr^a ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
Vice-coordenadora da CEUA