

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas
UFSCar/UNESP

Dissertação de Mestrado

Envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do núcleo leito da estria terminal (NLET) nas respostas cardiovasculares ao estresse em ratos: interação com mecanismos glutamatérgicos e noradrenérgicos locais.

Nome: Lucas Barretto de Souza

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-Unesp
Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicológicos
Laboratório de Farmacologia

Orientador: Prof .Dr. Carlos Cesar Crestani

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-Unesp
Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicológicos
Laboratório de Farmacologia

Araraquara

2018

Lucas Barretto de Souza

Envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do núcleo leito da estria terminal (NLET) nas respostas cardiovasculares ao estresse em ratos: interação com mecanismos glutamatérgicos e noradrenérgicos locais.

Dissertação a ser apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Cersar Crestani

Araraquara

2018



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 Lucas Barretto de Souza, realizada em 02/04/2018:

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
UNESP

Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli
USP

Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal
UNESP

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, que me proporcionaram todo apoio durante este percurso e fizeram com que esta conquista fosse possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani, que de forma excepcional me guiou durante toda minha formação e proporcionou um ambiente favorável para meu desenvolvimento.

Aos meus companheiros de laboratório, que em todos os momentos me ajudaram e acompanharam meu percurso.

Ao apoio técnico da Elisabete e Rosangela dentro do laboratório, que de braços abertos me ensinaram muito do que sei atualmente.

Aos amigos de vida, que me apoiaram e continuam apoiando em todos os momentos.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo investigar a interação da neurotransmissão nitrérgica no núcleo leito da estria terminal (NLET) com as neurotransmissões glutamatérgica e noradrenérgica locais no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição aguda em ratos. Para tanto, todos os animais foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas ao NLET para realização do tratamento neurofarmacológico, e de canulação da artéria femoral para registro cardiovascular. Foram avaliadas as respostas de pressão arterial e frequência cardíaca e de queda da temperatura cutânea da cauda causadas pelo estresse por restrição aguda. Todos os animais foram submetidos a uma sessão aguda de 30 minutos de estresse por restrição cinco minutos após os tratamentos farmacológicos no NLET. A microinjeção bilateral de NMDA no NLET facilitou a resposta taquicárdica ao estresse por restrição, porém sem alterar as respostas pressora e de queda da temperatura cutânea da cauda. A facilitação da resposta de frequência cardíaca causada pelo tratamento com NMDA foi revertida em animais pré-tratados com N-propil-L-arginina (NPLA, inibidor seletivo da nNOS) no NLET. A microinjeção bilateral de NOC-9 (doador de NO) no NLET reduziu as respostas pressora e taquicárdica. O pré-tratamento do NLET com WB4101 (antagonista seletivo de adrenoceptores α_1) reverteu o efeito do NOC-9 sobre a resposta de frequência cardíaca, porém não afetou o efeito do NOC-9 sobre a resposta pressora. Por fim, a microinjeção de NPLA em animais pré-tratados com WB4101 no NLET diminuiu a resposta de frequência cardíaca e pressão arterial desencadeada pelo estresse por restrição. Em conjunto, esses resultados indicam que o controle inibitório das respostas cardiovasculares ao estresse pela neurotransmissão nitrérgica no NLET é mediado por uma

facilitação da neurotransmissão noradrenérgica local. Além disso, os nossos achados fornecem evidências do envolvimento da nNOS local no controle facilitatório das respostas ao estresse exercido pelo receptor glutamatérgico NMDA no NLET.

Palavras-Chave: NLET, óxido nítrico, noradrenalina, glutamato, pressão arterial e frequência cardíaca.

ABSTRACT

The aim of the present study was to assess an interaction between nitrenergic neurotransmission within the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) with local glutamatergic and noradrenergic neurotransmissions in control of cardiovascular responses evoked by an acute session of restraint stress in rats. For this, all animals were subjected to surgical procedures for implant of bilateral guide cannulas into the BNST and a catheter into the femoral artery. Bilateral microinjection of NMDA into the BNST increased the restraint-evoked tachycardia, but without affecting the pressor response and the drop in tail skin temperature. Changes on blood pressure, heart rate and tail skin temperature evoked by restraint stress were recorded. The acute 30 min session of restraint stress was performed five minutes following BNST pharmacological treatments. Bilateral microinjection of NMDA into the BNST enhanced the tachycardia to restraint, but without affecting the pressor response and the drop in tail skin temperature. The effect of NMDA on restraint-evoked tachycardia was completely inhibited in animals pretreated with the selective nNOS inhibitor N ω -Propyl-L-arginine (NPLA) into the BNST. Bilateral microinjection of NOC-9 decreased the heart rate and blood pressure increases evoked by restraint stress. The effect of NOC-9 on HR, but not on blood pressure, was inhibited by BNST pretreatment with WB4101. Besides, microinjection of NPLA in animals pretreated with WB4101 into the BNST decreased the HR and blood pressure increases to restraint. Taken together, these results indicate that the inhibitory control of cardiovascular responses to stress by BNST nitrenergic neurotransmission is mediated by a facilitation of local noradrenergic neurotransmission. Also, present data provide evidence of an involvement of local nNOS in facilitatory control of the NMDA receptor within the BNST.

Keywords: autonomic activity, blood pressure, BNST, heart rate, nitric oxide, glutamate, noradrenaline.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Sítios de microinjeção bilateral no NLET.....	27
Figura 2 – Curvas Temporais de variações na pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ tempertura) induzidas pelo estresse de restrição agudo.....	28
Figura 3 - Sítios de microinjeção bilateral no NLET.....	31
Figura 4 - Curvas Temporais de variações na pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ tempertura) induzidas pelo estresse de restrição agudo.....	32
Figura 5 - Sítios de microinjeção bilateral no NLET.....	35
Figura 6 - Curvas Temporais de variações na pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ tempertura) induzidas pelo estresse de restrição agudo.....	36

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	5
1.INTRODUÇÃO.....	8
2.OBJETIVOS.....	13
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Animais.....	14
3.2 Técnica de implante de cânulas guias no NLET.....	14
3.3 Canulação da artéria femoral.....	15
3.4 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	16
3.5 Registro da temperatura cutânea da cauda.....	16
3.6 Estresse por restrição agudo.....	17
3.7 Microinjeção de drogas no NLET.....	17
3.8 Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas.....	17
3.9 Drogas utilizadas.....	18
3.10 Análise estatística.....	18
4.PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	20
4.1 Envolvimento de neurotransmissão noradrenérgica local no controle de respostas cardiovasculares ao estresse de restrição por NO no NLET	20
4.2 Envolvimento da sinalização nitrérgica local no controle de respostas cardiovasculares ao estresse de restrição por NMDA no NLET	21
4.3 Efeito da microinjeção bilateral de NPLA no NLET nas respostas cardiovasculares ao estresse agudo de restrição em ratos pré-tratados com WB4101 no NLET.....	22
5.RESULTADOS.....	23
5.1 Envolvimento de neurotransmissão noradrenérgica local no controle de respostas cardiovasculares ao estresse de restrição por NO no NLET.....	23
5.2 Envolvimento da sinalização nitrérgica local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição por NMDA no NLET.....	27
5.3 Efeito da microinjeção bilateral de NPLA no NLET em respostas cardiovasculares ao estresse agudo de restrição em ratos pré-tratados com WB4101 no NLET.....	31
6.DISSCUSSÃO.....	35
7.CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXO A – Comitê de Ética do Uso de Animais CEUA.....	46
ANEXO B – Folha de aprovação.....	47

1. INTRODUÇÃO

A sobrevivência e a adaptação de todas as espécies à situações de estresse requer um adequado e coordenado conjunto de respostas fisiológicas (Ulrich-Lai & Herman, 2009). As respostas fisiológicas ao estresse são controladas pelo sistema nervoso autônomo e pela ativação do sistema neuroendócrino (Crestani, 2016; Ulrich-Lai & Herman, 2009). O sistema nervoso autônomo promove a resposta imediata ao estresse, que é caracterizada principalmente por alterações na função cardiovascular, incluindo aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, redistribuição do fluxo sanguíneo (redução na perfusão cutânea e visceral e aumento no fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética) e alteração na atividade do barorreflexo (Crestani, Tavares, Alves, Resstel, & Correa, 2010; Schadt & Hasser, 1998; Zhang, Julien, & Barres, 1996). A ativação do sistema neuroendócrino durante o estresse por sua vez, através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), promove aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticoides, que ocorre minutos após o início do estresse (Choi et al., 2007; Kvetnansky, McCarty, Thoa, Lake, & Kopin, 1979). Apesar da importância das respostas fisiológicas durante situações aversivas, os mecanismos envolvidos com essas respostas ainda são pouco compreendidos.

As respostas fisiológicas durante o estresse emocional são mediadas por estruturas límbicas no sistema nervoso central (SNC), através da ação de vários mecanismos neuroquímicos (Joels & Baram, 2009; Ulrich-Lai & Herman, 2009). O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura límbica

localizada no prosencéfalo rostral, no qual está envolvido na modulação da atividade autonômica, neuroendócrina e de respostas comportamentais (Crestani et al., 2013; Davis, Walker, Miles, & Grillon, 2010). Dados demonstram que o controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo NLET é dependente do tipo de estímulo aversivo (Crestani et al., 2013). Neste sentido, estudos prévios do nosso grupo demonstraram que o bloqueio sináptico não-seletivo com cloreto de cobalto do NLET facilitou a resposta taquicárdica evocada pelo estresse por restrição (estímulo aversivo não-condicionado), porém sem alterar a resposta pressora, (Crestani, Alves, Tavares, & Correa, 2009). Por outro lado, as respostas comportamentais e cardiovasculares observadas durante a exposição ao modelo de medo condicionado ao contexto (estímulo aversivo condicionado) foram reduzidas após o bloqueio sináptico não-seletivo do NLET (Resstel et al., 2008). Em relação à ativação do eixo HPA, foi reportado que a lesão química do NLET resultou num aumento dos níveis de glicocorticoides plasmáticos induzida tanto por estímulos aversivos não-condicionados quanto condicionados (Choi et al., 2008; Gray et al., 1993).

Os resultados demonstrando o envolvimento do NLET nas respostas fisiológicas ao estresse, juntamente com evidências neuroanatômicas de conexões com outras estruturas límbicas, permite propor que o NLET seria uma importante região de integração no circuito neural das respostas a estímulos aversivos. De fato, tem sido proposto que o NLET é uma importante estrutura integrando e conectando informações de regiões límbicas como o córtex prefrontal medial (CPFM), hipocampo e amígdala; com núcleos hipotalâmicos e do tronco cerebral envolvidos na geração das respostas cardiovasculares e neuroendócrinas ao estresse (Choi et al., 2007; Crestani et al., 2013; Ulrich-Lai & Herman, 2009). Entretanto, apesar das evidências apresentadas acima,

informações acerca dos mecanismos neuroquímicos locais no NLET envolvidos no controle das respostas cardiovasculares ao estresse ainda são pouco compreendidos.

Estudos recentes têm apontado que a neurotransmissão nitrérgica é um importante mecanismo neuroquímico no SNC envolvido nas respostas fisiológicas e comportamentais a estímulos aversivos (Guimaraes, Beijamini, Moreira, Aguiar, & de Lucca, 2005; Resstel et al., 2008). O óxido nítrico (NO) age no SNC como uma molécula de sinalização, e é considerado um neurotransmissor atípico (Garthwaite, 2008). O NO é sintetizado a partir da L-arginina por três isoformas da enzima sintase do óxido nítrico (NOS), que são denominadas neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) (Alderton, Cooper, & Knowles, 2001). A nNOS é a principal isoforma envolvida na síntese de NO no SNC (Garthwaite, 2008; Huang, Dawson, Bredt, Snyder, & Fishman, 1993).

Foram identificados neurônios no NLET capazes de sintetizar NO (Vincent & Kimura, 1992), e estes neurônios são ativados por estímulos aversivos (Guimaraes et al., 2005). Estudos recentes indicaram que a neurotransmissão nitrérgica, atuando por meio da ativação da nNOS, constitui um proeminente mecanismo neuroquímico local envolvido no controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo NLET (Barretto-de-Souza et al., 2018; Hott et al., 2017). Por exemplo, o bloqueio da nNOS no NLET, bem como dos mecanismos de sinalização relacionados aos efeitos do NO como a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) e a proteína quinase G (PKG), aumentaram a taquicardia e diminuíram a queda da temperatura cutânea da cauda evocadas por uma sessão aguda de estresse de restrição (Barretto-de-Souza et al., 2018). Apesar dessas evidências, os mecanismos locais relacionados com o controle

das respostas cardiovasculares ao estresse pela sinalização nitrérgica no NLET ainda são desconhecidos.

Foi demonstrado que a ativação do receptor glutamatérgico NMDA presente em neurônios pós-sinápticos no SNC resulta na formação de NO, através de um mecanismo dependente de Ca^{+2} (Garthwaite, Charles, & Chess-Williams, 1988). De fato, a enzima nNOS está em íntima proximidade com o receptor glutamatérgico NMDA (Brenman & Bredt, 1997). Baseado nestas evidências, tem sido proposto que a enzima nNOS no encéfalo é ativada em resposta a um influxo de Ca^{+2} decorrente da ativação do receptor glutamatérgico NMDA (Garthwaite, 2008).

O NO tem sido demonstrado ser uma importante molécula de sinalização envolvido no controle da função cardiovascular pelo receptor NMDA no SNC. Por exemplo, foi demonstrado que a inibição da nNOS aboliu as respostas cardiovasculares desencadeadas pela ativação do receptor glutamatérgico NMDA em várias regiões do SNC (Martins-Pinge, Garcia, Zoccal, Crestani, & Pinge-Filho, 2007; Resstel & Correa, 2006). Nesse sentido, em um estudo prévio do nosso grupo observamos que a microinjeção de um antagonista seletivo do receptor NMDA no NLET reduziu a resposta taquicárdica induzida pelo estresse por restrição (Adami, Barretto-de-Souza, Duarte, Almeida, & Crestani, 2017). Esses dados forneceram evidência da participação do receptor NMDA no NLET no controle das respostas cardiovasculares ao estresse. Entretanto, um possível envolvimento da formação local de NO no controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo receptor NMDA no NLET nunca foi investigado. *Desse modo, uma das hipóteses testadas no presente estudo foi a de que o controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição*

agudo pelo receptor glutamatérgico NMDA no NLET é dependente da formação local de NO através da ativação da enzima nNOS.

Ao se observar a neurotransmissão noradrenérgica, dados de Crestani e colaboradores (2009) mostram que a microinjeção de um antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 no NLET facilitou a resposta taquicárdica ao estresse por restrição, porém sem interferir com a elevação da pressão arterial. A microinjeção de antagonistas seletivos de adrenoceptores α_2 ou β não afetaram as respostas cardiovasculares ao estresse por restrição (Crestani et al., 2009). Assim, esses resultados indicaram que a neurotransmissão noradrenérgica no NLET, agindo através da ativação de adrenoceptores α_1 locais, tem uma influência inibitória nas respostas cardíacas ao estresse por restrição (Crestani et al., 2009). Assim como observado após o bloqueio de adrenoceptores α_1 no NLET, os resultados da inibição da enzima nNOS no NLET também evidenciaram um papel inibitório da neurotransmissão nitrérgica no NLET (Barretto-de-Souza et al., 2018). Foi reportado que a ativação do receptor glutamatérgico NMDA no NLET causa um aumento na liberação local de noradrenalina (Aliaga, Bustos, & Gysling, 1995; Forray, Andres, Bustos, & Gysling, 1995). Apesar da ausência de evidências diretas de uma interação entre as neurotransmissões noradrenérgica e nitrérgica no NLET, o aumento na liberação de noradrenalina no NLET decorrente da ativação do receptor NMDA local pode ser mediada por um aumento na formação local de NO (Garthwaite, 2008), o que sugere uma interação entre as neurotransmissões nitrérgica e noradrenérgica no NLET. *Desse modo, uma segunda hipótese testada no presente estudo foi a de que o controle das respostas cardiovasculares pela sinalização nitrérgica no NLET é mediada por um aumento na liberação local de noradrenalina no NLET.*

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi estudar a interação da neurotransmissão nitrérgica no NLET com as neurotransmissões glutamatérgica e noradrenérgica locais no controle das respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse por restrição agudo em ratos. Para tanto, os objetivos específicos foram:

1) Investigar o envolvimento da formação local de NO através da ativação da enzima nNOS no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo pelo receptor glutamatérgico NMDA no NLET.

2) Investigar se o controle das respostas cardiovasculares pela sinalização nitrérgica no NLET é mediada por uma facilitação da neurotransmissão noradrenérgica local.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar com peso corporal variando entre 240-260g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da UNESP de Botucatu, e 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 tiveram acesso livre a ração granulada e água, foram submetidos à alternância de luz (12h claro/ 12h escuro) e foram mantidas em condições controladas de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR/UNESP (processo 37/2016) e estão de acordo com as leis do CONCEA.

3.2. Técnica de implante de cânulas guias no NLET

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg, intraperitoneal). Após a tricotomia, a cabeça do rato foi imobilizada em um aparato estereotáxico (Stoelting, EUA), e foi realizada assepsia do campo cirúrgico com álcool 70%. Para redução do sangramento durante a cirurgia, foi injetado 0,3 ml de solução de lidocaína com vasoconstritor (3% de levoarterenol, Harvey Química Farmacêutica Ind. e Comércio Ltda, Catanduva, SP). A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se completamente o periósteo. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada a 10%. Todas as coordenadas tiveram como referência parâmetros obtidos do atlas do cérebro do rato (Paxinos & Watson, 1997), e foram como segue:

Núcleo leito da estria terminal (NLET):

Ântero-posterior: + 7.8 mm em relação à interaural

Lateral: + 4 mm a partir da linha medial

Ventral: - 5.8 mm em relação ao osso do crânio;

Incisivo: -3,2 mm.

Após o posicionamento da cânula de aço inoxidável foi feito um orifício no crânio com auxílio de uma broca odontológica, por onde foi introduzida a cânula constituída por um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,6 mm, 23G) com 13 mm de comprimento. A cânula foi fixada ao crânio com uma resina acrílica autopolimerisável (Simplex, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ), e pequenos parafusos foram previamente implantados na calota craniana para fixação da resina. Um mandril com 0,2 mm de diâmetro foi introduzido na cânula, evitando a obstrução da mesma durante o período de recuperação. Como medida profilática, ao final da cirurgia o animal recebeu 0,2 mL de pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunixinina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) pela via subcutânea.

3.3. Canulação da artéria femoral

Todos os animais foram anestesiados com tribomoetanol (250 mg/Kg, intraperitoneal), e foi implantado um cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares. O cateter foi constituído por um segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldado a um segmento de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (20 U/mL de

heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal. Após a implantação do cateter, o mesmo foi exteriorizado na região dorsal do animal e fixado à pele por sutura cirúrgica. Ao término da cirurgia os animais receberam 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunixinina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) por via subcutânea para analgesia pós-operatória. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro cardiovascular.

3.4. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., EUA) através de um segmento de polietileno PE-50. 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) e frequência cardíaca (FC), foram obtidos a partir dos sinais da PAP.

3.5. Registro da temperatura cutânea da cauda

Os registros da temperatura cutânea da cauda foram realizados utilizando um termovisor (IRI4010, Inglaterra). A análise foi feita através de um software para análise termográfica, e a temperatura foi representada como variações de intensidade de cor (Busnardo et al., 2013; Vianna & Carrive, 2005). Para a análise das imagens, a medida da temperatura foi realizada em cinco pontos da cauda do animal, e a média foi calculada para cada registro (Busnardo et al., 2013).

3.6. Estresse por restrição agudo

Os animais foram introduzidos em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro=6,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de ½ polegada que preenchem aproximadamente 20% do tubo). Os animais foram mantidos por um período de 30 minutos no tubo de restrição (Choi et al., 2007; Oliveira, Almeida, Benini, & Crestani, 2015). Cada animal foi submetido a apenas uma sessão de restrição para evitar habituação.

3.7. Microinjeção de drogas no NLET

As agulhas injetoras (33 G, Small Parts, EUA) que foram utilizadas para microinjeção das drogas foram 1 mm mais longa do que as cânulas guias fixada ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2 µl (7002KH, Hamilton, EUA).

3.8. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, intraperitoneal) e foi injetado o corante azul de Evan como um marcador do sítio de microinjeção no mesmo volume em que foi realizado o tratamento farmacológico. Em seguida, os encéfalos foram removidos e pós-fixados em formalina 10 % a 4°C por um período de pelo menos 48 horas. Em seguida, secções de 40 micrometros de espessura em série da região do NLET foram realizadas utilizando um criostato (CM1900, Leica, Wetzlar, Alemanha). O posicionamento das agulhas de microinjeção foi determinado de acordo com o atlas do cérebro do rato de Paxinos & Watson (1997)

3.9. Drogas Utilizadas

N ω -Propyl-L-arginine (NPLA) (inibidos seletivo da nNOS) (N5-[Imino(propylamino)methyl]-L-ornithine hydrochloride) (Tocris, Westwoods Business, Park Ellisville, MO, USA), WB4101 (antagonista seletivo de adrenoceptores α_1) (2-[(2,6-Dimethoxyphenoxyethyl)aminomethyl]-1,4-benzodioxane hydrochloride) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA) (agonista seletivo de receptor NMDA) ((R)-2-(Methylamino)succinic acid) (Sigma-Aldrich), tribromoetanol (Sigma-Aldrich) e uretana (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em salina (NaCl 0.9%). NOC-9 (doador de NO) (6-(2-Hydroxy-1-methyl-2-nitrosohydrazino)-N-methyl-1-hexanamine) (Sigma-Alrich) foi dissolvido em solução de 1 M Tris-HCl . A solução de NOC-9 foi preparada em pH 10 para prevenir a liberação de NO antes do contato com o tecido cerebral, uma vez que o NOC-9 é relativamente estável em pH alcalino (>10.0) e libera NO em pH fisiológico (7.4) (Keefer et al., 1996). O pH das outras drogas foi ajustado para 7.4. Flunixin meglumine (Banamine®; Schering-Plough, Cotia, SP, Brazil) e a preparação poli-antibiótica (Pentabiotico®; Fort Dodge, Campinas, SP, Brazil) foram utilizadas como fornecidas pelos fabricantes.

3.10. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O efeito dos tratamentos farmacológicos sobre os valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda foram comparados utilizando ANOVA monofatorial. A ANOVA bifatorial (tratamento vs tempo), com tratamento como medida principal e tempo como medida repetida, acompanhada pelo pós-teste

de Bonferroni foi usada para comparar as curvas temporais de variações da pressão arterial, FC e temperatura cutânea da cauda durante o estresse por restrição agudo. Resultados de testes estatísticos com $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4. Protocolos Experimentais

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas ao NLET, e mantidos em recuperação por no mínimo 3 dias. O experimento foi realizado 24 h após a implantação de um cateter na artéria femoral. Os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação por 60 minutos, para habituação às condições de som e iluminação da sala, antes do início do experimento. A sala de experimento teve a temperatura controlada (24 °C) e foi acusticamente isolada dos outros ambientes. Cada animal recebeu um único tratamento farmacológico e foi submetido a uma única sessão de estresse de restrição agudo. Os registros de pressão arterial e FC foram iniciados 30 minutos antes do início da restrição, e foram realizados durante todo o período de restrição. A temperatura cutânea da cauda foi medida aos 10, 5 e 0 min antes da restrição, e a cada 5 min durante a restrição.

4.1 Envolvimento da sinalização nitrérgica local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pelo receptor glutamatérgico NMDA no NLET

Esse protocolo teve como objetivo investigar o envolvimento da formação local de NO através da ativação da enzima nNOS no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo pelo receptor glutamatérgico NMDA no NLET. Para tanto, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais no NLET de veículo (salina, 100nL) ou N-propil-L-arginina (NPLA, inibidor seletivo da nNOS) (0,2nmol/100nL, dose inefetiva) (Barretto-de-Souza et al., 2018), acompanhado 5 minutos depois pela

microinjeção de NMDA (0,1nmol/100nL, dose efetiva) ou veículo (salina, 100nL) no mesmo sítio (Li, Mayhan, & Patel, 2001; Martins-Pinge, Mueller, Foley, Heesch, & Hasser, 2012). Cinco minutos após o segundo tratamento farmacológico, os animais foram submetidos a uma sessão aguda de 30 minutos de estresse por restrição.

4.2 Envolvimento de neurotransmissão noradrenérgica local no controle de respostas cardiovasculares ao estresse por restrição pela neurotransmissão nitrérgica no NLET

Esse protocolo teve como objetivo de investigar se o controle das respostas cardiovasculares pela sinalização nitrérgica no NLET é mediado por uma facilitação da neurotransmissão noradrenérgica local. Para tanto, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais no NLET de veículo (salina, 100 nL) ou WB4101 (antagonista seletivo de adrenoceptores α_1) (1,5nmol/200nL, dose inefetiva), acompanhado 5 minutos depois pela microinjeção de TRIS-HCL (veículo) (200nL) ou NOC-9 (doador de NO) (75 nmol/200nL, dose efetiva) no mesmo sítio (Hott et al., 2012; Miguel, Gomes, & Nunes-de-Souza, 2012). Cinco minutos após o segundo tratamento farmacológico, os animais foram submetidos a uma sessão aguda de 30 minutos de estresse por restrição.

4.3 Efeito da microinjeção bilateral de NPLA no NLET nas respostas cardiovasculares ao estresse agudo de restrição em ratos pré-tratados com WB4101 no NLET

Para confirmar o envolvimento da nNOS em mecanismos no NLET relacionados ao controle facilitatório das respostas cardiovasculares evocadas pela restrição, nesse protocolo nós investigamos o efeito do bloqueio da nNOS na ausência do mecanismo neuroquímico local relacionado à influência inibitória de nNOS (isto é, neurotransmissão noradrenérgica). Para isso, o inibidor seletivo da nNOS NPLA (0,4 nmol / 100 nL, dose efetiva) ou veículo (salina, 100 nL) foram microinjetados bilateralmente no NLET de animais pré-tratados no NLET com o antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 WB4101 (10 nmol / 100 nL, dose efetiva) (Crestani et al., 2009). Cinco minutos após o segundo tratamento farmacológico do NLET, os animais em todos os grupos experimentais foram submetidos à sessão de 30 minutos de estresse por restrição.

5. Resultados

5.1 Envolvimento de neurotransmissão noradrenérgica local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pela sinalização nitrérgica no NLET

O tratamento bilateral do NLET com o antagonista seletivo de adrenoreceptores α_1 WB4101 e/ou com o doador de NO NOC-9 não afetou os valores basais de frequência cardíaca ou da temperatura cutânea da cauda (Tabela 1). Entretanto, valores elevados de PAM foram identificados em animais que receberam o veículo seguido do NOC -9 (veículo + grupo NOC-9) no NLET (Tabela 1). Além disso, o estresse de restrição agudo provocou um aumento sustentado da PAM ($F_{(19,570)} = 62$, $P < 0,0001$) e FC ($F_{(19,570)} = 22$, $P < 0,0001$) e diminuiu a temperatura cutânea da cauda ($F_{(8,240)} = 35$, $P < 0,0001$) (Fig. 2). A análise também indicou um efeito significativo dos tratamentos farmacológicos do NLET nas respostas pressora ($F_{(3,30)} = 3$, $P < 0,03$) e taquicárdica ($F_{(3,30)} = 5$, $P < 0,006$) ao estresse de restrição, mas sem afetar a queda na temperatura da pele ($F_{(3,30)} = 0,4$, $P > 0,05$) (Fig. 1). Interação significativa entre tratamento e tempo foi identificada para PAM ($F_{(57,570)} = 2$, $P < 0,0001$) e FC ($F_{(57,570)} = 2$, $P < 0,0001$), mas não para a temperatura da pele ($F_{(24,240)} = 0,6$, $P > 0,05$). A análise pós-teste revelou que o tratamento do NLET com NOC-9 (veículo + grupo NOC-9) diminuiu as respostas pressora ($P < 0,05$) e taquicárdica ($P < 0,05$) evocadas pelo estresse de restrição (Fig. 2). O efeito do NOC-9 sobre a resposta de FC ($P > 0,05$), mas não sobre a resposta de aumento da PAM ($P < 0,05$), foi inibida em animais pré-tratados com WB4101 no NLET (grupo WB + NOC-9) (Figura 2). Representações diagramáticas mostrando os sítios de microinjecção no NLET de todos os animais utilizados neste protocolo são apresentada na Figura 1

Tabela 1 –Parametros basais de pressão arterial media (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (T) após o tratamento farmacológico do NLET com WB4101 (WB, antagonista seletivo de adrenoceptores α_1) ou NOC-9 (doador de NO).

Grupos	PAM (mmHg)	FC (bpm)	T(°C)	n
VEI+VEI	107±3	401±14	29.4±0.6	9
WB+VEI	103±2	365±8	29.9±0.7	8
VEI+NOC-9	116±2*	387±15	28.1±0.7	9
WB+NOC-9	110±2	368±14	30.4±0.5	8
	$F_{(3,30)}=6$ $P<0.001$	$F_{(3,30)}=1.5$ $P>0.05$	$F_{(3,30)}=2.5$ $P>0.05$	

Os dados são expressos como média ± EPM. * $P<0.05$ versus o grupo VEI+VEI, ANOVA monofatorial seguido do pós-teste de Bonferroni.

Figura 1 - Representação diagramática baseada no atlas cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjecção no NLET de veículo (círculos cinza), do antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 WB4101 (preto círculos) e do doador de NO NOC9 (círculos negros). 3V - terceiro ventrículo, IA - coordenada interaural; Comissura aérea anterior; f - fornix; ic - cápsula interna; st - stria terminalis.

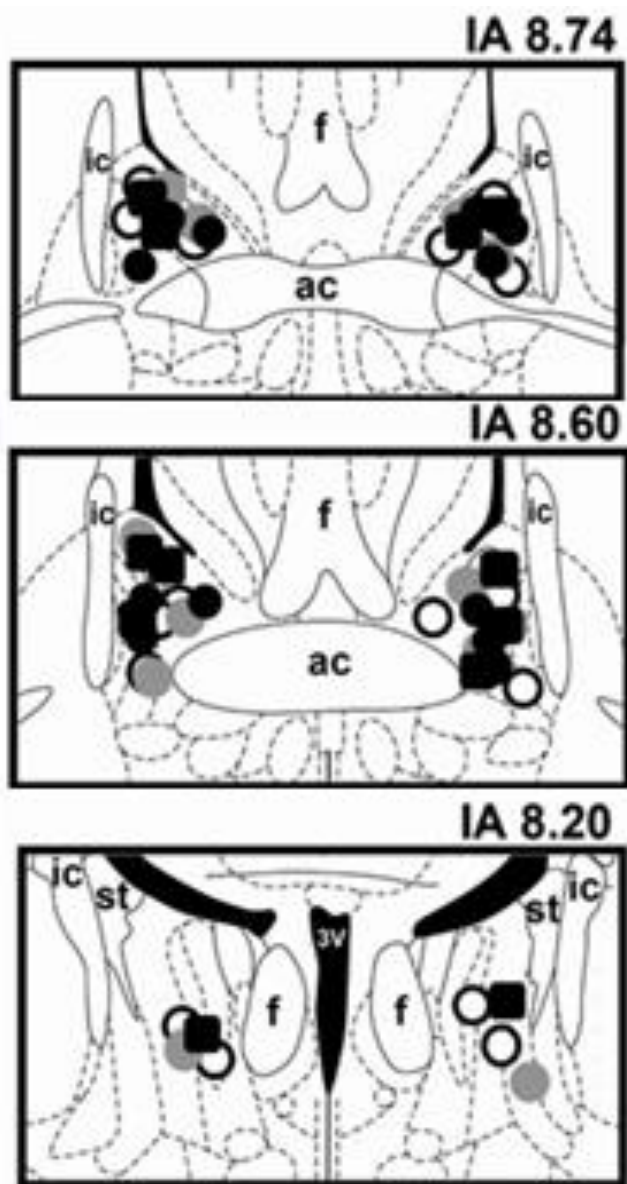
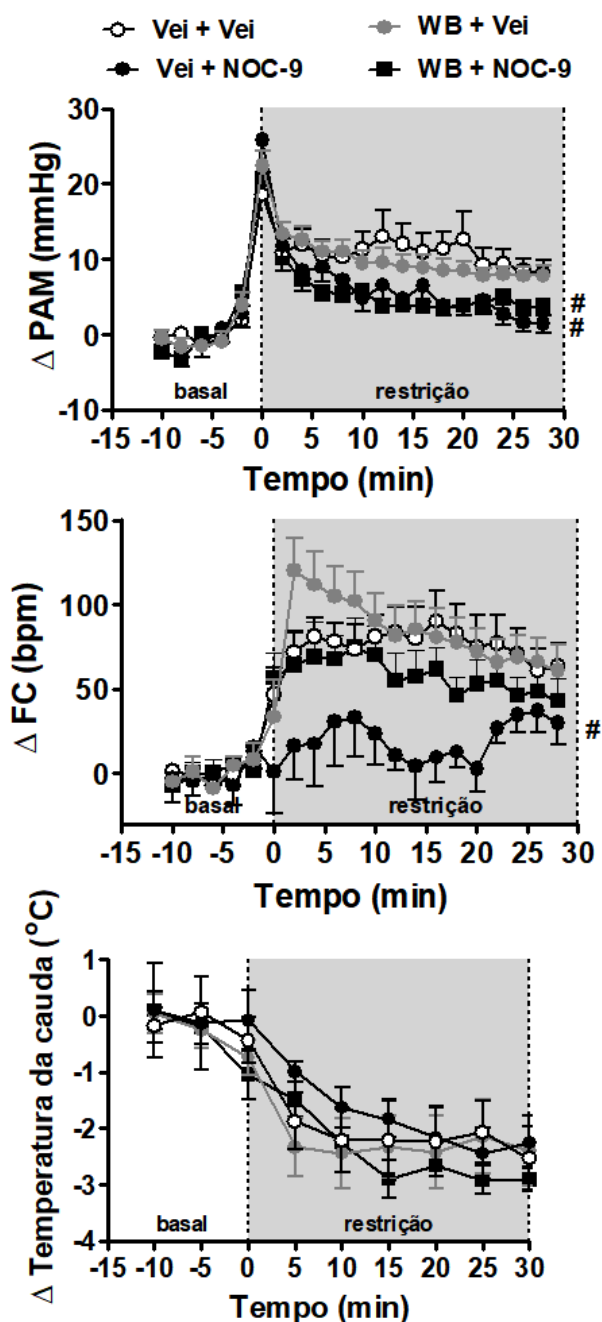


Figura 2 - Efeito do tratamento do NLET com o antagonista seletivo de adrenoreceptores α_1 WB4101 (WB) e/ou com o doador de NO NOC-9 sobre as respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo. Curvas temporais de variaçã da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura da cauda) causadas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados bilateralmente no NLET com Vei + Vei (n = 9) , WB + Vei (n = 8), Vei + NOC-9 (n = 9) ou WB + NOC-9 (n = 8). O início do estresse foi em t = 0. Os círculos representam a média e as barras o SEM. # P <0,05 em todo o período de restrição em comparação ao grupo Vei + Vei, ANOVA bifatorial seguido do pós-teste de Bonferroni.



5.2. Envolvimento da sinalização nitrérgica local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pelo receptor glutamatérgico NMDA no NLET

Microinjeções bilaterais do inibidor seletivo da nNOS NPLA e / ou de NMDA no NLET não afetaram os valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda (Tabela 2). No entanto, o estresse de restrição agudo provocou um aumento da PAM ($F_{(19,418)}=40$, $P<0.0001$) e da FC ($F_{(19,418)}=64$, $P<0.0001$) e diminuiu a temperatura cutânea da cauda ($F_{(8,176)} = 32$, $P <0,0001$) (Fig. 4). Além disso, a análise indicou um efeito significativo dos tratamentos farmacológicos do NLET na taquicardia evocada pelo estresse por restrição ($F_{(3,22)} = 3$, $P <0,03$), mas não nas respostas pressora ($F_{(3,22)} = 0,4$, $P > 0,05$) e de redução da temperatura da pele ($F_{(3,22)} = 0,8$, $P > 0,05$) (Fig. 4). A análise também indicou uma interação entre tratamento e tempo para FC ($F_{(57,418)} = 2$, $P <0,0001$) e PAM ($F_{(57,418)} = 1,5$, $P <0,01$), mas não para a temperatura da pele ($F_{(24,176)} = 1$, $P > 0,05$). A análise pós-teste revelou que a microinjeção bilateral de NMDA no NLET (veículo + grupo NMDA) aumentou a taquicardia evocada pelo estresse por restrição ($P <0,05$), e esse efeito não foi identificado em animais pré-tratados com NPLA no NLET (grupo NPLA + NMDA) ($P > 0,05$) (Fig. 4). A Figura 3 apresenta representações diagramáticas que mostram os sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados neste protocolo.

Tabela 2 –Parametros basais de pressão arterial media (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperature cutânea da cauda (T) após o tratamento farmacológico do NLET com o inibidor seletivo da nNOS NPLA ou com NMDA.

Grupos	PAM (mmHg)	FC (bpm)	T(°C)	n
VEI+VEI	105±3	398±14	26.9±0.6	8
NPLA+VEI	107±2	395±15	27.4±1	6
VEI+NMDA	109±3	389±12	26.3±0.4	6
NPLA+NMDA	106±1	398±11	27.7±0.5	6
	$F_{(3,22)}=0.4$ $P>0.05$	$F_{(3,22)}=0.1$ $P>0.05$	$F_{(3,22)}=0.5$ $P>0.05$	

Os dados são expressos como média ± EPM. ANOVA monofatorial seguido do pós-teste de Bonferroni.

Figura 3 - Representação diagramática baseada no atlas cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os locais de microinjecção no NLET do veículo (círculos cinza), o inibidor seletivo da nNOS NPLA (círculos negros, segundo painel) e o agonista glutamatérgico NMDA (círculos negros). 3V - terceiro ventrículo, IA - coordenada interaural; Comissura aérea anterior; f - fornix; ic - cápsula interna; st - stria terminalis.

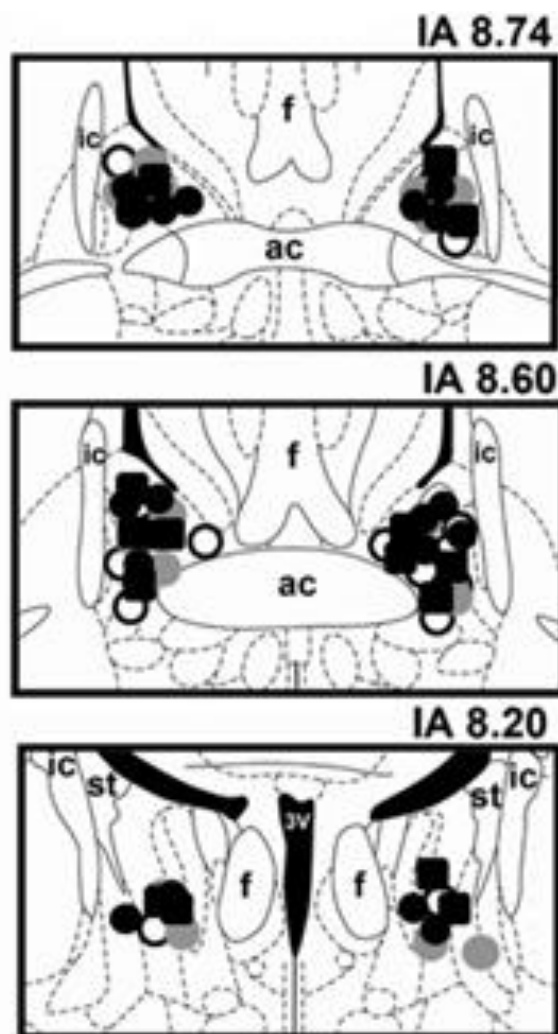
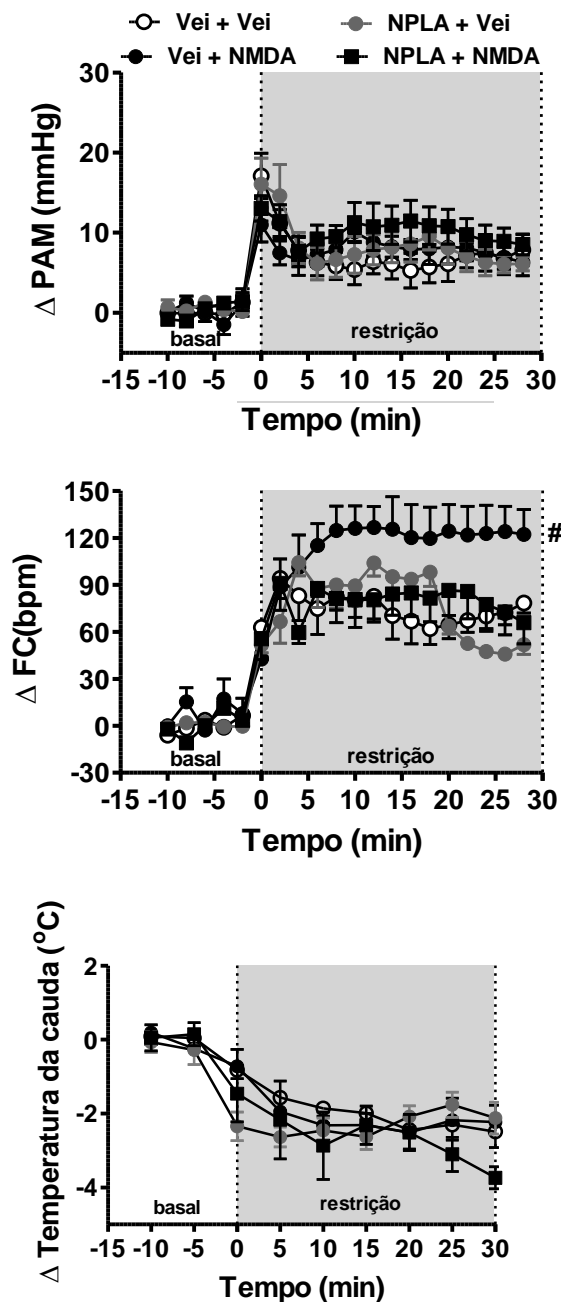


Figura 4 - Efeito do tratamento do NLET com o NPLA, inibidor seletivo da nNOS, e/ou com o agonista glutamatérgico NMDA sobre as respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo. Os gráficos mostram curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura da cauda) causadas pelo estresse agudo de restrição em animais tratados bilateralmente no NLET com Vei + Vei (n = 8), NPLA + Vei (n = 6), Vei + NMDA (n = 6) ou NPLA + NMDA (n = 6). O início do estresse foi em t = 0. Os círculos representam a média e as barras do SEM. # P < 0,05 em todo o período de restrição em comparação com o grupo Vei + Vei, ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.



5.3. Efeito da microinjeção bilateral de NPLA no NLET nas respostas cardiovasculares ao estresse agudo de restrição em ratos pré-tratados com WB4101 no NLET

O tratamento bilateral do NLET com o inibidor seletivo de nNOS NPLA em animais pré-tratados localmente com o antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 WB4101 não afetou os valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda (Tabela 3). No entanto, o estresse de restrição agudo provocou um aumento sustentado da PAM ($F_{(19,323)} = 59, P < 0,0001$) e FC ($F_{(19,323)} = 20, P < 0,0001$), e diminuiu a temperatura cutânea da cauda ($F_{(8,136)} = 20, P < 0,0001$) (Fig. 6). Além disso, a análise indicou que a microinjeção bilateral de NPLA no NLET de animais localmente pré-tratados com WB4101 diminuiu o aumento causado pela restrição na PAM ($F_{(1,17)} = 4, P < 0,06$) e FC ($F_{(1,17)} = 6, P < 0,02$), mas sem afetar a resposta da temperatura da pele ($F_{(1,17)} = 0,1, P > 0,05$) (Fig. 6). A análise também indicou uma interação tratamento x tempo para PAM ($F_{(19,323)} = 3, P < 0,0001$) e FC ($F_{(19,323)} = 3, P < 0,0001$), mas não para a temperatura da pele ($F_{(8,136)} = 1, P > 0,05$). Representações diagramáticas mostrando os sítios de microinjecção no NLET de todos os animais utilizados neste protocolo são apresentadas na Figura 5.

Tabela 3 –Parametros basais de pressão arterial media (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperature cutânea da cauda (T) após o tratamento farmacológico do NLET com o antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 WB4101 e com o inibidor seletivo da nNOS NPLA.

Grupos	PAM (mmHg)	FC (bpm)	T(°C)	n
WB+VEI	103±1	363±9	29.8±0.3	8
WB+NPLA	106±2	360±8	28.8±0.6	11
	<i>t=1.8</i> <i>P>0.05</i>	<i>t=0.3</i> <i>P>0.05</i>	<i>t=1.9</i> <i>P>0.05</i>	

Os dados são expressos como média \pm EPM. ANOVA monofatorial seguido do pós-teste de Bonferroni .

Figura 5 - Representação diagramática baseada no atlas cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjecção no NLET dos grupos WB+VEI (círculos brancos) e WB+NPLA (círculos negros). 3V - terceiro ventrículo, IA - coordenada interaural; Comissura aérea anterior; f - fornix; ic - cápsula interna; st - stria terminalis.

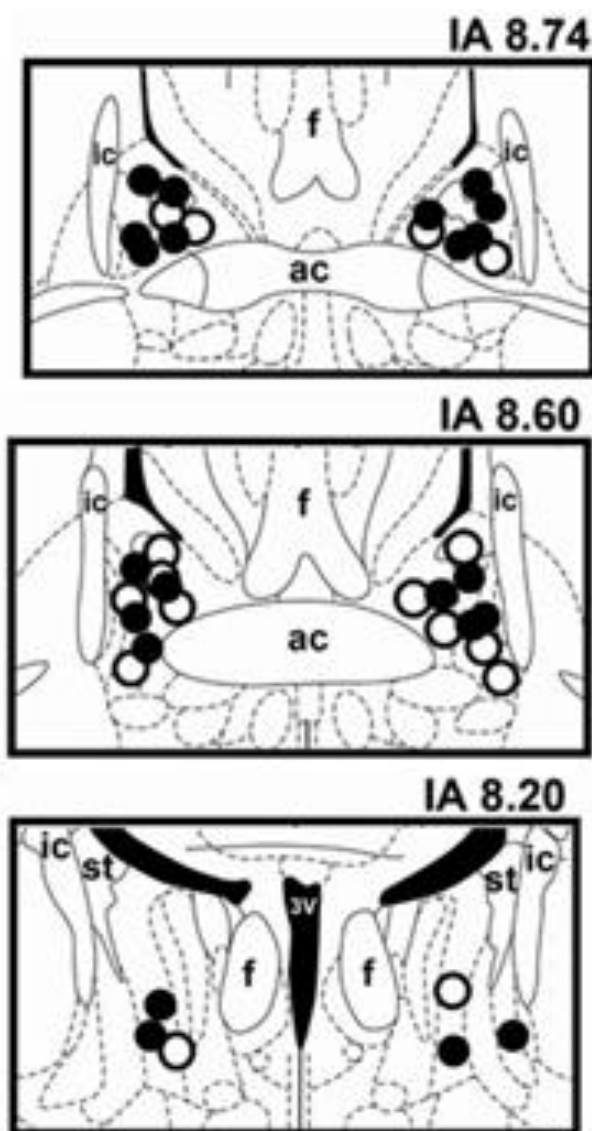
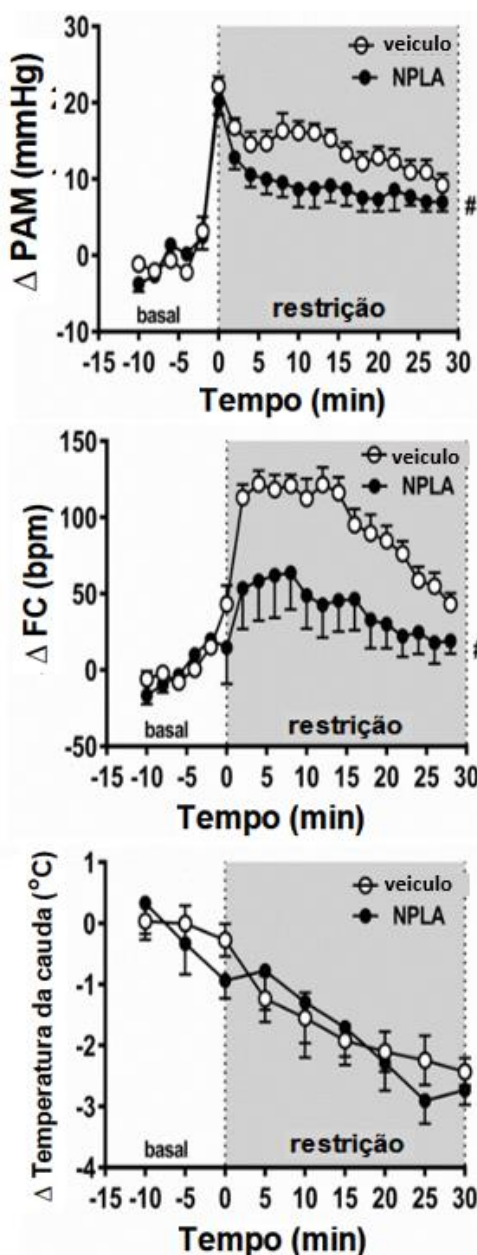


Figura 6 - Efeito do tratamento do NLET com NPLA, inibidor seletivo da nNOS, nas respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo em ratos pré-tratados com o antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 WB4101 no NLET. Os gráficos mostram curvas temporais de variação na pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura da pele da cauda (Δ temperatura da cauda) causadas pelo estresse de restrição agudo em animais previamente pré-tratados com WB4101 e submetidos a microinjeção bilateral de NPLA no NLET (n = 11) ou veículo (n = 8). O início do estresse foi em t = 0. Os círculos representam a média e as barras do SEM. # P < 0,05 em todo o período de restrição em comparação com animais tratados com WB+VEI, ANOVA bifatorial seguido do pós-teste de Bonferroni.



6. Discussão

Este estudo mostra pela primeira vez uma interação da sinalização nitrérgica com as neurotransmissões glutamatérgica e noradrenérgica no NLET. Além disso, os resultados reportados aqui são os primeiros a indicar um papel dual da sinalização nitrérgica no NLET no controle das respostas cardiovasculares evocadas por ameaças aversivas. Observamos que a microinjeção bilateral de NOC-9, doador de NO, no NLET diminuiu a resposta taquicárdica e pressora evocadas pelo estresse de restrição agudo. A influência inibitória do NOC-9 sobre a resposta de FC, mas não na resposta pressora, foi inibida pelo pré-tratamento local do NLET com o antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 WB4101. Além disso, a microinjeção de NMDA no NLET aumentou a resposta taquicárdica à restrição, e este efeito foi abolido pelo pré-tratamento local com o NPLA, um inibidor seletivo de nNOS. Um envolvimento da nNOS do NLET no controle facilitatório das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição foi reforçado ao demonstrarmos que a microinjeção do inibidor de nNOS em animais pré-tratados com o antagonista de adrenoceptores α_1 - *o mecanismo neuroquímico local relacionado à influência inibitória de nNOS* - diminuiu a resposta taquicárdica e pressora evocadas pelo estresse por restrição.

Resultados recentes do nosso grupo revelaram um envolvimento da sinalização nitrérgica do NLET no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição (Barretto-de-Souza et al., 2018). Nós reportamos que a microinjeção de um inibidor não-seletivo da NOS ou de um inibidor seletivo da nNOS no NLET aumentou a resposta de FC evocada pelo estresse por restrição (Barretto-de-Souza et al., 2018). O tratamento local do NLET com inibidores de mecanismos de sinalização relacionados aos efeitos do NO, como a sGC e a

PKG, também aumentou a resposta de FC à restrição (Barretto-de-Souza et al., 2018). Em conjunto, esses resultados evidenciaram um papel inibitório da sinalização nitrérgica no NLET sobre as respostas cardiovasculares ao estresse por restrição. A diminuição das respostas de FC e PA relatada no presente estudo em animais que receberam NOC-9 no NLET fornece evidências adicionais de um papel inibitório da neurotransmissão nitrérgica do NLET nas respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse agudo de restrição. No entanto, mais importante, os achados do presente estudo indicam que o controle inibitório da resposta de FC pela sinalização nitrérgica no NLET é mediado por uma facilitação da neurotransmissão noradrenérgica local atuando por meio de adrenoceptores α_1 locais. Esse achado está em linha com a evidência anterior de que a neurotransmissão noradrenérgica do NLET atuando através de adrenoceptores α_1 desempenha um papel inibitório na taquicardia evocada pela restrição (Crestani et al., 2009). Além disso, nossos resultados são suportados por evidências de que o NO estimula a liberação de noradrenalina em estruturas límbicas como o hipocampo e o córtex cerebral (Ohkuma & Katsura, 2001; Philippu, 2016; Prast & Philippu, 2001). No entanto, os achados reportados aqui constituem a primeira evidência de uma interação entre as neurotransmissões nitrérgica e noradrenérgica no NLET.

A diminuição da resposta da pressão arterial evocada pelo NOC-9 não foi afetada pelo antagonismo de adrenoceptores α_1 no NLET. Esse achado está em linha com dados anteriores que mostraram que a neurotransmissão noradrenérgica do NLET desempenha um papel inibitório na taquicardia evocada pela restrição, mas sem afetar a resposta da pressão arterial (Crestani et al., 2009). Portanto, a modulação da resposta pressora evocada pelo estresse por restrição exercida pela neurotransmissão nitrérgica no NLET parece ser mediada

por mecanismos independentes da neurotransmissão noradrenérgica local. Nesse sentido, estudos anteriores documentaram que a neurotransmissão colinérgica do NLET atuando através de receptores muscarínicos também desempenha uma influência inibitória nas respostas cardiovasculares ao estresse por restrição (Gouveia et al., 2016). Embora haja relatos de uma liberação de acetilcolina induzida por NO em estruturas límbicas como o hipocampo e o córtex pré-frontal (Ohkuma & Katsura, 2001; Prast & Philippu, 2001), uma possível interação entre essas neurotransmissões no NLET nunca foi avaliada. Portanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos relacionados à influência inibitória da neurotransmissão nitrérgica do NLET na resposta pressora ao estresse por restrição.

A ativação da nNOS em resposta ao influxo de Ca^{2+} após a ativação do receptor NMDA é o mecanismo mais bem caracterizado envolvido na síntese de NO no SNC (Garthwaite, 2008, 2016; Prast & Philippu, 2001). No entanto, contrariamente à influência inibitória da neurotransmissão nitrérgica nas respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse por restrição, reportamos recentemente um controle facilitatório do receptor glutamatérgico NMDA no NLET na resposta de FC à restrição, como evidenciado por uma diminuição da taquicardia após o tratamento com um antagonista seletivo do receptor NMDA no NLET (Adami et al., 2017). O aumento da taquicardia relatada no presente estudo após microinjeção de NMDA no NLET reforça a ideia de um papel facilitatório da neurotransmissão glutamatérgica no NLET nas respostas cardíacas ao estresse por restrição. Os resultados presentes fornecem a primeira evidência de um papel da sinalização nitrérgica local no controle das respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse por restrição pelo receptor glutamatérgico NMDA no NLET. Esse achado está em linha com a evidência

anterior de um papel da ativação da nNOS no controle da função cardiovascular pelo receptor NMDA em outras estruturas do SNC (Busnardo, Crestani, Tavares, Resstel, & Correa, 2010; Martins-Pinge et al., 2007; Resstel & Correa, 2006; Santini et al., 2013; Tavares, Resstel, & Correa, 2007). Embora este resultado indique a nNOS como parte da via de sinalização local relacionada à uma influência facilitatória nas respostas cardiovasculares ao estresse, este não é o papel predominante da sinalização nitrérgica uma vez que, como discutido acima, a microinjeção de inibidores da nNOS ou de doadores de NO fornecem evidências de um papel inibitório desse mecanismo neuroquímico no NLET. No entanto, a microinjeção do inibidor da nNOS na ausência do mecanismo neuroquímico local relacionado à influência inibitória da nNOS (ou seja, a neurotransmissão noradrenérgica atuando através de adrenoceptores α_1) desmascarou um papel facilitatório da nNOS, confirmando a existência de ações da nNOS no NLET se opondo à influência inibitória predominante.

A influência inibitória predominante da neurotransmissão nitrérgica do NLET corrobora os relatos de efeitos cardiovasculares protetores da neurotransmissão nitrérgica no SNC (Martins-Pinge et al., 2012; Sharma & Patel, 2017; Stern, Li, & Zhang, 2003). A rede de controle inibitório cerebral de respostas cardiovasculares durante ameaças aversivas é importante porque permite um controle preciso da resposta, assim promovendo um ajuste fino, assim estabilizando o estado funcional do órgão alvo, reduzindo assim a amplitude da resposta (Berntson, Cacioppo, & Quigley, 1991; Paton, Boscan, Pickering, & Nalivaiko, 2005). Portanto, a ativação da nNOS no NLET parece ser um mecanismo importante que se opõe à ativação cardíaca excessiva durante o estresse. O envolvimento da nNOS no controle facilitatório promovido pelo receptor NMDA nas respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse de

restrição está em linha com achados prévios de efeito pró-aversivo do NO no encéfalo (Calixto, Duarte, Moraes, Faria, & De Lima, 2008; Guimaraes et al., 2005; Silva, Aguiar, Diniz, Guimaraes, & Joca, 2012).

Estruturas corticolímbicas como o hipocampo, a amígdala e o CPFM têm poucas conexões anatômicas diretas com regiões efetoras de estresse primário no hipotálamo e no tronco cerebral (Myers, 2017; Ulrich-Lai & Herman, 2009). Eferências dessas regiões convergem para o NLET (Dong, Petrovich, & Swanson, 2001; Myers, Mark Dolgas, Kasckow, Cullinan, & Herman, 2014). Por sua vez, neurônios do NLET conectam-se com os núcleos hipotalâmicos e do tronco encefálico que geram as respostas autonômas ao estresse (Dong, Petrovich, Watts, & Swanson, 2001; Dong & Swanson, 2006). Assim, o NLET é proposto como um centro de integração entre processamento de informações emocionais por estruturas corticolímbicas e elaboração de respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse por regiões hipotalâmicas e do tronco encefálico (Busnardo et al., 2013; Myers, 2017; Ulrich-Lai & Herman, 2009). As aferências límbicas para o NLET são predominantemente glutamatérgicas e GABAérgicas (Myers et al., 2014). O presente estudo fornece a primeira evidência de envolvimento da ativação da nNOS no controle da resposta ao estresse por terminais glutamatérgicos no NLET atuando através do receptor NMDA. Também, o presente estudo fornece evidências de que a sinalização nitrérgica do NLET atua predominantemente na modulação de informações de terminais noradrenérgicos no NLET. Foi relatada uma interação entre neurotransmissões noradrenérgica e glutamatérgica no NLET (Silberman & Winder, 2013), suportando os presente achados que indicam o papel proeminente da sinalização nitrérgica agindo através da facilitação da neurotransmissão

noradrenérgica no processamento de informação límbica no NLET para a ativação de respostas cardiovasculares.

7. Conclusão

Em suma, os resultados do presente estudo fornecem evidências de que a neurotransmissão nitrérgica do NLET desempenha um papel dual no controle das respostas cardiovasculares ao estresse. Uma influência inibitória predominante na resposta de FC é mediada por uma facilitação da neurotransmissão noradrenérgica local atando através de adrenocetores α_1 . No entanto, a inibição da resposta da pressão arterial parece ser mediada por mecanismos diferentes da neurotransmissão noradrenérgica local. Além disso, nossos dados sugerem a síntese de NO local a partir da nNOS como parte da via de sinalização relacionada ao controle facilitatório da resposta de FC ao estresse de restrição pelo receptor glutamatérgico NMDA no NLET.

REFERÊNCIAS

- Adami, M. B., Barretto-de-Souza, L., Duarte, J. O., Almeida, J., & Crestani, C. C. (2017). Both N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *J Psychopharmacol*, 269881117691468. doi: 10.1177/0269881117691468
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357(Pt 3), 593-615.
- Aliaga, E., Bustos, G., & Gysling, K. (1995). Release of endogenous catecholamines from the striatum and bed nucleus of stria terminalis evoked by potassium and N-methyl-D-aspartate: in vitro microdialysis studies. *J Neurosci Res*, 40(1), 89-98. doi: 10.1002/jnr.490400110
- Barretto-de-Souza, L., Adami, M. B., Oliveira, L. A., Gomes-de-Souza, L., Duarte, J. O., Almeida, J., & Crestani, C. C. (2018). Nitric oxide-cGMP-PKG signaling in the bed nucleus of the stria terminalis modulates the cardiovascular responses to stress in male rats. *Eur Neuropsychopharmacol*, 28(1), 75-84. doi: 10.1016/j.euroneuro.2017.11.015
- Berntson, G. G., Cacioppo, J. T., & Quigley, K. S. (1991). Autonomic determinism: the modes of autonomic control, the doctrine of autonomic space, and the laws of autonomic constraint. *Psychol Rev*, 98(4), 459-487.
- Brenman, J. E., & Bredt, D. S. (1997). Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol*, 7(3), 374-378.
- Busnardo, C., Alves, F. H., Crestani, C. C., Scopinho, A. A., Resstel, L. B., & Correa, F. M. (2013). Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*, 23(11), 1611-1622. doi: 10.1016/j.euroneuro.2012.11.002
- Busnardo, C., Crestani, C. C., Tavares, R. F., Resstel, L. B., & Correa, F. M. (2010). Cardiovascular responses to L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus are mediated by a local nitric oxide-guanylate cyclase mechanism. *Brain Res*, 1344, 87-95. doi: 10.1016/j.brainres.2010.05.023
- Calixto, A. V., Duarte, F. S., Moraes, C. K., Faria, M. S., & De Lima, T. C. (2008). Nitric oxide involvement and neural substrates of the conditioned and innate fear as evaluated in the T-maze test in rats. *Behav Brain Res*, 189(2), 341-349. doi: 10.1016/j.bbr.2008.01.018
- Choi, D. C., Evanson, N. K., Furay, A. R., Ulrich-Lai, Y. M., Ostrander, M. M., & Herman, J. P. (2008). The anteroventral bed nucleus of the stria terminalis differentially regulates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to acute and chronic stress. *Endocrinology*, 149(2), 818-826. doi: 10.1210/en.2007-0883
- Choi, D. C., Furay, A. R., Evanson, N. K., Ostrander, M. M., Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2007). Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci*, 27(8), 2025-2034. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4301-06.2007
- Crestani, C. C. (2016). Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. *Front Physiol*, 7, 251. doi: 10.3389/fphys.2016.00251
- Crestani, C. C., Alves, F. H., Gomes, F. V., Resstel, L. B., Correa, F. M., & Herman, J. P. (2013). Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: a review. *Curr Neuropharmacol*, 11(2), 141-159. doi: 10.2174/1570159X11311020002

- Crestani, C. C., Alves, F. H., Tavares, R. F., & Correa, F. M. (2009). Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress*, *12*(3), 268-278. doi: 10.1080/10253890802331477
- Crestani, C. C., Tavares, R. F., Alves, F. H., Resstel, L. B., & Correa, F. M. (2010). Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. *Stress*, *13*(1), 61-72. doi: 10.3109/10253890902927950
- Davis, M., Walker, D. L., Miles, L., & Grillon, C. (2010). Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 105-135. doi: 10.1038/npp.2009.109
- Dong, H. W., Petrovich, G. D., & Swanson, L. W. (2001). Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Brain Res Rev*, *38*(1-2), 192-246.
- Dong, H. W., Petrovich, G. D., Watts, A. G., & Swanson, L. W. (2001). Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. *J Comp Neurol*, *436*(4), 430-455.
- Dong, H. W., & Swanson, L. W. (2006). Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. *J Comp Neurol*, *494*(1), 142-178. doi: 10.1002/cne.20788
- Forray, M. I., Andres, M. E., Bustos, G., & Gysling, K. (1995). Regulation of endogenous noradrenaline release from the bed nucleus of stria terminalis. *Biochem Pharmacol*, *49*(5), 687-692.
- Garthwaite, J. (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci*, *27*(11), 2783-2802. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x
- Garthwaite, J. (2016). From synaptically localized to volume transmission by nitric oxide. *J Physiol*, *594*(1), 9-18. doi: 10.1113/JP270297
- Garthwaite, J., Charles, S. L., & Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, *336*(6197), 385-388. doi: 10.1038/336385a0
- Gouveia, M. K., Miguel, T. T., Busnardo, C., Scopinho, A. A., Correa, F. M., Nunes-de-Souza, R. L., & Crestani, C. C. (2016). Dissociation in control of physiological and behavioral responses to emotional stress by cholinergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. *Neuropharmacology*, *101*, 379-388. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.10.018
- Gray, T. S., Piechowski, R. A., Yracheta, J. M., Rittenhouse, P. A., Bethea, C. L., & Van de Kar, L. D. (1993). Ibotenic acid lesions in the bed nucleus of the stria terminalis attenuate conditioned stress-induced increases in prolactin, ACTH and corticosterone. *Neuroendocrinology*, *57*(3), 517-524. doi: 10.1159/000126400
- Guimaraes, F. S., Beijamini, V., Moreira, F. A., Aguiar, D. C., & de Lucca, A. C. (2005). Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev*, *29*(8), 1313-1322. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.026
- Hott, S. C., Gomes, F. V., Fabri, D. R., Reis, D. G., Crestani, C. C., Correa, F. M., & Resstel, L. B. (2012). Both alpha1- and beta1-adrenoceptors in the bed nucleus of the stria terminalis are involved in the expression of conditioned contextual fear. *Br J Pharmacol*, *167*(1), 207-221. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01985.x
- Hott, S. C., Gomes, F. V., Uliana, D. L., Vale, G. T., Tirapelli, C. R., & Resstel, L. B. (2017). Bed nucleus of the stria terminalis NMDA receptors and nitric oxide modulate contextual fear conditioning in rats. *Neuropharmacology*, *112*(Pt A), 135-143. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.05.022
- Huang, P. L., Dawson, T. M., Bredt, D. S., Snyder, S. H., & Fishman, M. C. (1993). Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*, *75*(7), 1273-1286.

- Joels, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*, *10*(6), 459-466. doi: 10.1038/nrn2632
- Kvetnansky, R., McCarty, R., Thoa, N. B., Lake, C. R., & Kopin, I. J. (1979). Sympatho-adrenal responses of spontaneously hypertensive rats to immobilization stress. *Am J Physiol*, *236*(3), H457-462. doi: 10.1152/ajpheart.1979.236.3.H457
- Li, Y. F., Mayhan, W. G., & Patel, K. P. (2001). NMDA-mediated increase in renal sympathetic nerve discharge within the PVN: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *281*(6), H2328-2336. doi: 10.1152/ajpheart.2001.281.6.H2328
- Martins-Pinge, M. C., Garcia, M. R., Zoccal, D. B., Crestani, C. C., & Pinge-Filho, P. (2007). Differential influence of iNOS and nNOS inhibitors on rostral ventrolateral medullary mediated cardiovascular control in conscious rats. *Auton Neurosci*, *131*(1-2), 65-69. doi: 10.1016/j.autneu.2006.07.004
- Martins-Pinge, M. C., Mueller, P. J., Foley, C. M., Heesch, C. M., & Hasser, E. M. (2012). Regulation of arterial pressure by the paraventricular nucleus in conscious rats: interactions among glutamate, GABA, and nitric oxide. *Front Physiol*, *3*, 490. doi: 10.3389/fphys.2012.00490
- Miguel, T. T., Gomes, K. S., & Nunes-de-Souza, R. L. (2012). Contrasting effects of nitric oxide and corticotropin-releasing factor within the dorsal periaqueductal gray on defensive behavior and nociception in mice. *Braz J Med Biol Res*, *45*(4), 299-307.
- Myers, B. (2017). Corticolimbic regulation of cardiovascular responses to stress. *Physiol Behav*, *172*, 49-59. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.10.015
- Myers, B., Mark Dolgas, C., Kasckow, J., Cullinan, W. E., & Herman, J. P. (2014). Central stress-integrative circuits: forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Struct Funct*, *219*(4), 1287-1303. doi: 10.1007/s00429-013-0566-y
- Ohkuma, S., & Katsura, M. (2001). Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS. *Prog Neurobiol*, *64*(1), 97-108.
- Oliveira, L. A., Almeida, J., Benini, R., & Crestani, C. C. (2015). CRF1 and CRF2 receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Pharmacol Res*, *95-96*, 53-62. doi: 10.1016/j.phrs.2015.03.012
- Paton, J. F., Boscan, P., Pickering, A. E., & Nalivaiko, E. (2005). The yin and yang of cardiac autonomic control: vago-sympathetic interactions revisited. *Brain Res Brain Res Rev*, *49*(3), 555-565. doi: 10.1016/j.brainresrev.2005.02.005
- Paxinos, G., & Watson, C. (1997). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (3 ed.). Sidney, Australia: Academic Press.
- Philippu, A. (2016). Nitric Oxide: A Universal Modulator of Brain Function. *Curr Med Chem*, *23*(24), 2643-2652.
- Prast, H., & Philippu, A. (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol*, *64*(1), 51-68.
- Resstel, L. B., Alves, F. H., Reis, D. G., Crestani, C. C., Correa, F. M., & Guimaraes, F. S. (2008). Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. *Neuroscience*, *154*(3), 869-876. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.04.007
- Resstel, L. B., & Correa, F. M. (2006). Injection of l-glutamate into medial prefrontal cortex induces cardiovascular responses through NMDA receptor - nitric oxide in rat. *Neuropharmacology*, *51*(1), 160-167. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.03.010
- Santini, C. O., Fassini, A., Scopinho, A. A., Busnardo, C., Correa, F. M., & Resstel, L. B. (2013). The ventral hippocampus NMDA receptor/nitric oxide/guanylate cyclase pathway modulates cardiovascular responses in rats. *Auton Neurosci*, *177*(2), 244-252. doi: 10.1016/j.autneu.2013.05.008
- Schadt, J. C., & Hasser, E. M. (1998). Hemodynamic effects of acute stressors in the conscious rabbit. *Am J Physiol*, *274*(3 Pt 2), R814-821.

- Sharma, N. M., & Patel, K. P. (2017). Post-translational regulation of neuronal nitric oxide synthase: implications for sympathoexcitatory states. *Expert Opin Ther Targets*, *21*(1), 11-22. doi: 10.1080/14728222.2017.1265505
- Silberman, Y., & Winder, D. G. (2013). Emerging role for corticotropin releasing factor signaling in the bed nucleus of the stria terminalis at the intersection of stress and reward. *Front Psychiatry*, *4*, 42. doi: 10.3389/fpsy.2013.00042
- Silva, M., Aguiar, D. C., Diniz, C. R., Guimaraes, F. S., & Joca, S. R. (2012). Neuronal NOS inhibitor and conventional antidepressant drugs attenuate stress-induced fos expression in overlapping brain regions. *Cell Mol Neurobiol*, *32*(3), 443-453. doi: 10.1007/s10571-011-9775-1
- Stern, J. E., Li, Y., & Zhang, W. (2003). Nitric oxide: a local signalling molecule controlling the activity of pre-autonomic neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Acta Physiol Scand*, *177*(1), 37-42. doi: 10.1046/j.1365-201X.2003.01045.x
- Tavares, R. F., Resstel, L. B., & Correa, F. M. (2007). Interaction between glutamatergic and nitrenergic mechanisms mediating cardiovascular responses to L-glutamate injection in the diagonal band of Broca in anesthetized rats. *Life Sci*, *81*(10), 855-862. doi: 10.1016/j.lfs.2007.07.028
- Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*, *10*(6), 397-409. doi: 10.1038/nrn2647
- Vianna, D. M., & Carrive, P. (2005). Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *Eur J Neurosci*, *21*(9), 2505-2512. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04073.x
- Vincent, S. R., & Kimura, H. (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, *46*(4), 755-784.
- Zhang, Z. Q., Julien, C., & Barres, C. (1996). Baroreceptor modulation of regional haemodynamic responses to acute stress in rat. *J Auton Nerv Syst*, *60*(1-2), 23-30.

ANEXO A – Comitê de Ética do Uso de Animais CEUA**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que a proposta intitulada "Envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do núcleo leito da estria terminal nas respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo em ratos: interação com mecanismos glutamatérgicos e noradrenérgicos locais", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 37/2016, sob a responsabilidade de Lucas Barretto de Souza e Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em reunião de 07 de julho de 2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Fevereiro de 2018
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	120
Peso/Idade	240 g 8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central UNESP Botucatu

Araraquara, 19 de Julho de 2016.


 Profa Dra ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
 Vice-coordenadora da CEUA

Anexo B – Folha de aprovação

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 Lucas Barretto de Souza, realizada em 02/04/2018:

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
UNESP

Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli
USP

Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal
UNESP