

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
UFSCar/UNESP

**Envolvimento de neurotransmissões angiotensinérgicas no
núcleo medial da amígdala nas respostas cardiovasculares e
ansiogênicas ao estresse de restrição em ratos**

Willian Costa Ferreira

Araraquara

2020

Willian Costa Ferreira

Envolvimento de neurotransmissões angiotensinérgicas no núcleo medial da amígdala nas respostas cardiovasculares e ansiogênica ao estresse de restrição em ratos

Tese apresentada ao Programa interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP para a obtenção de Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

Araraquara

2020



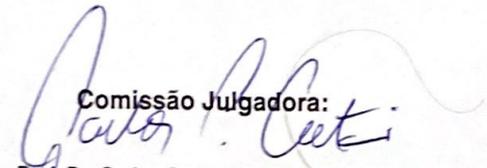
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

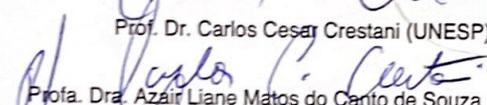
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

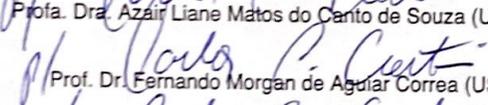
Folha de Aprovação

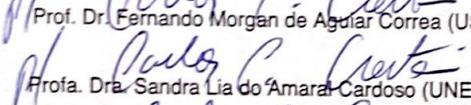
Defesa de Tese de Doutorado do candidato Willian Costa Ferreira, realizada em 04/09/2020.

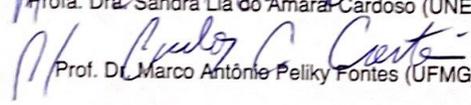
Comissão Julgadora:


Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani (UNESP)


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


Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Correa (USP)


Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso (UNESP)


Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes (UFMG)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

DEDICATÓRIA

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

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.

À minha noiva Fernanda por ter suportado a distância e ter sido paciente e forte durante esses três anos difíceis em nosso relacionamento, mas que foram de grande crescimento e companheirismo entre nós.

Aos meus amigos Antônio, Jeferson e Bruno, que mesmo distantes sempre estiveram comigo nos momentos ruins e bons dessa jornada.

Ao meu amigo Lucas Gomes pelo apoio incondicional durante essa etapa, por ser minha família durante todo esse período, pelas discussões, companheirismo, amizade verdadeira, suporte nos momentos bons e ruins, e por todos os momentos que estivemos juntos dentro e fora do laboratório, meu muito obrigado.

Agradeço ao “Zé da prancha” por todo carinho e recepção em Matão nos dias que precisei. Ao Gessynger e Larissa pelo companheirismo e amizade ao longo desses 3 anos dessa etapa.

Ao meu orientador Carlos Cesar Crestani por ter me aceito e sido paciente comigo e aos colegas de laboratório por todo apoio durante essa jornada.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFar/UNESP) pelo espaço concedido e ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) pelo auxílio.

Agradeço ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (processo nº 2016/05218-2) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

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

EPÍGRAFE

*“...Nunca deixem que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem...”*

Renato Russo

RESUMO

Estruturas límbicas participam do controle de respostas fisiológicas relacionadas ao estresse, e o núcleo medial (AMe) foi demonstrado como uma área encefálica envolvida no controle dessas respostas. A angiotensina II, atuando no receptor AT₁, foi demonstrado ser um importante mecanismo de sinalização no sistema nervoso central envolvido nas alterações comportamentais e nos ajustes fisiológicos observados durante situações aversivas, ao passo que o receptor AT₂ e a neurotransmissão angiotensina 1-7/receptor Mas atuam como um mecanismo contra-regulatórios para os efeitos pró-estresse do receptor AT₁. Assim, a hipótese de nosso trabalho foi que as alterações cardiovasculares e ansiogênica ao estresse de restrição (ER) sejam moduladas pelas neurotransmissões angiotensina II/receptores AT₁ e AT₂ e angiotensina 1-7/receptor Mas no AMe. Na caracterização do papel das neurotransmissões angiotensinérgicas no AMe no controle da atividade barorreflexa em animais não-estressados indicaram que o receptor AT₂ no AMe desempenha um papel inibitório na resposta de taquicardia reflexa, mas sem afetar a bradicardia reflexa, ao passo que o receptor Mas exerce uma influência facilitatória tanto na taquicardia quanto na bradicardia reflexa. No experimento da função cardiovascular após exposição a 10 dias de ER, houve aumento da pressão arterial basal, facilitação da taquicardia reflexa e prejuízo na atividade barorreflexa espontânea. Animais tratados com losartana atenuaram a taquicardia reflexa, ao passo que as demais alterações não foram afetadas pelos tratamentos. No experimento que comparamos os efeitos dos tratamentos farmacológicos do AMe com agonistas e antagonistas de receptores angiotensinérgicos sobre as respostas cardiovasculares durante uma sessão aguda e a 10^o sessão de ER, identificamos que a exposição repetida ao ER aboliu a facilitação da resposta taquicárdica causada pelo tratamento do AMe com angiotensina II e losartana nos animais estressados agudamente. A redução da taquicardia causada pelo A-779 e da resposta pressora nos animais tratados com PD123319 em animais estressados agudamente, foi inibida após a exposição repetida ao ER. Além disso, a exposição repetida ao ER inverteu a redução na resposta taquicárdica causada pelo tratamento do AMe com PD123319 em animais estressados agudamente. Não foi observado efeito da facilitação da resposta taquicárdica após exposição repetida ao ER pela microinjeção de angiotensina 1-7 no AMe. A redução da temperatura cutânea da cauda foi maior nos animais estressados cronicamente, e somente o tratamento com PD123319 inibiu essa facilitação. Na resposta ansiogênica, animais que passaram por uma sessão aguda apresentaram comportamento do tipo ansiogênico, e os tratamentos com angiotensina II, losartana e angiotensina 1-7 inibiram esse efeito. Efeito ansiogênico também foi observado 24h após a 9^o sessão de restrição, e sem efeito adicional cinco minutos após a 10^o

sessão de restrição. Além disso, os tratamentos não causaram nenhuma alteração comportamental no LCE nos animais expostos repetidamente ao ER. Por fim, nós identificamos que a exposição repetida ao ER aumentou a expressão do receptor AT_1 e diminuiu a expressão do receptor Mas no AMe. Em suma, nossos dados suportam um envolvimento dos SRA presentes no AMe no controle de respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse, e esse controle parece ser influenciado pela experiência prévia ao agente estressor.

ABSTRACT

Limbic structures participate in the control of physiological responses related to stress, and the medial amigdaloid nucleus (MeA) has been demonstrated as an area of the central nervous system involved in the control these responses. The angiotensin II, acting on the AT₁ receptor, has been shown to be an important signaling mechanism in the central nervous system involved in the etiology of behavioral changes and in the physiological adjustments observed during aversive situations, whereas the AT₂ receptor and the angiotensin 1-7/Mas receptor neurotransmission acts as a mechanism against regulation of the AT₁ receptor. Thus, the hypothesis of our work was that cardiovascular and anxiogenic changes to restraint stress (RS) are modulated by angiotensin II/ AT₁ receptor, AT₂ and angiotensin 1-7 / Mas receptor neurotransmission in the AMe. In the characterization the role of angiotensinergic neurotransmissions in the MeA in the baroreflex control activity in non-stressed animals indicated that the AT₂ receptor in MeA plays an inhibitory role in the tachycardia reflex response, but without affecting bradycardia reflex; whereas the Mas receptor has a facilitating influence on both tachycardia and bradycardia reflex. In experiments on cardiovascular function of exposure to a 10-days of RS, this protocol caused an increase in arterial pressure baseline, facilitated tachycardic reflex and impaired spontaneous baroreflex activity. The animals treated with losartan attenuated tachycardia reflex, whereas the other changes were not affected by treatments. In the experiment comparing the effects of the MeA pharmacological treatments with angiotensinergic receptors agonists and antagonists on cardiovascular responses during an acute session and the 10th RS session, we found that repeated exposure to RS abolished facilitation of tachycardic response caused by the treatment of the MeA with angiotensin II and losartan in acute stressed animals. The tachycardic reduction caused by A-779 and the pressor response in animals treated with PD123319 in animals that were acutely stressed, was inhibited after repeated exposure to RS. In addition, repeated exposure to RS reversed the reduction in tachycardic response caused by MeA treatment with PD123319 seen in acutely stressed animals. Was not observed effect on facilitation of the tachycardic response after repeated exposure to RS by angiotensin 1-7 microinjection in the MeA. The reduction in the skin's tail temperature was greater in chronically stressed animals, and only treatment with PD123319 inhibited this facilitation. In the anxiogenic response, animals that went through an acute session showed behavioral of the anxiogenic type, and treatments with angiotensin II, losartan and angiotensin 1-7 inhibited this effect. Anxiogenic effect was also observed 24h after the 9th restraint session, and without additional five minutes after the 10th restraint session. In addition, the pharmacological treatments of the MeA did not cause any behavioral changes in

the EPM in animals repeatedly exposed to RS. Finally, we identified that repeated exposure to RS increased the expression of the AT₁ receptor and decreased the expression of the Mas receptor in the MeA. In short, our data support an involvement of RAS present in MeA in the control of cardiovascular and behavioral responses to stress, and this control seems to be influenced by previous experience with the stressor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Protocolo experimental para análise da função barorreflexa do AMe.	32
Figura 2: Protocolo experimental para análise da função barorreflexa do AMe em animais submetidos ao estresse por restrição durante 10 dias.	33
Figura 3: Protocolos experimentais: Efeito do tratamento na AMe nas respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo e restrição repetido.....	35
Figura 4: Protocolos experimentais: Efeito do tratamento na AMe na resposta comportamental ansiogênica ao estresse de restrição agudo e repetido.....	36
Figura 5: (Superior) representação diagramática baseada no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no núcleo medial da amígdala (AMe).	38
Figura 6: Atividade barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica em animais que receberam microinjeção bilateral no núcleo medial amigdalóide (AMe).	40
Figura 7: Atividade barorreflexa avaliada pela método de sequência em animais que receberam microinjeção bilateral no núcleo medial da amígdala (AMe).	42
Figura 8: (Superior) Representação diagramática baseada no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no núcleo medial da amígdala (AMe).	45
Figura 9: Atividade barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica clássica em animais que receberam microinjeção bilateral no núcleo medial amigdalóide (AMe).	47
Figura 10: Análise de regressão linear da função barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica em animais não-estressados e submetidos ao estresse por restrição repetido (ERR).....	49
Figura 11: Atividade barorreflexa avaliada pela método de sequência em animais não-estressado ou submetidos ao estresse por restrição repetido (ERR).....	50
Figura 12: (Superior) Representação diagramática baseada no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no núcleo medial da amígdala (AMe) 52	
Figura 13: Avaliação do envolvimento da neurotransmissão da angiotensina II no AMe nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição	55
Figura 14: Avaliação do envolvimento da neurotransmissão da angiotensina 1-7 no AMe nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição	59
Figura 15: Avaliação do envolvimento das neurotransmissões angiotensinérgicas do AMe na resposta ansiogênica desencadeada pelo estresse de restrição	62
Figura 16: Percentual de receptores AT1 e Mas em animais submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR) comparado ao grupo controle.....	64
Figura 17: Membranas do receptor AT1 e Mas da análise de western blotting.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores basais da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos que receberam microinjeção bilateral no núcleo medial da amígdala (AMe).....	39
Tabela 2: Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos controle e submetidos ao ERR e que receberam microinjeção bilateral no núcleo medial da amígdala (AMe)....	44
Tabela 3: Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (TCC) após o tratamento farmacológico do AMe	54

LISTA DE ABREVEATURAS

SRA – Sistema Renina Angiotensina

Ang II – Angiotensina II

Ang 1-7 – Angiotensina 1-7

AMe – Núcleo Medial da Amígdala

FC – Frequência Cardíaca

TCC – Temperatura Cutânea da Cauda

PAM – Pressão Arterial Média

ERR – Estresse de Restrição Repetido

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Animais.....	24
3.2. Implante de cânulas guias direcionadas ao núcleo medial da amígdala.....	24
3.3. Protocolos de estresse.....	25
3.3.1 <i>Estresse de restrição agudo</i>	25
3.3.2 <i>Estresse por restrição repetido</i>	25
3.4. Canulação da artéria e veia femoral	25
3.5. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca	26
3.6. Registro da temperatura cutânea da cauda.....	26
3.7. Análise comportamental no labirinto em cruz elevado (LCE).....	26
3.8. Avaliação da atividade barorreflexa	27
3.8.1. <i>Método farmacológico</i>	27
3.8.2. <i>Método de análise de sequência</i>	27
3.9. Soluções e Drogas	28
3.10. Microinjeção de drogas no AMe.....	28
3.11. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas.....	28
3.12. Medidas dos níveis proteicos dos receptores AT ₁ e Mas no AMe	29
3.13. Análise estatística	30
3.13.1. <i>Participação do AMe na modulação do barorreflexo</i>	30
3.13.2. <i>Participação do AMe na modulação do barorreflexo pelo estresse de restrição repetido</i>	30
3.13.3. <i>Envolvimento do AMe nas alterações cardiovasculares desencadeadas pelo ERR</i>	30
3.13.4. <i>Participação do AMe no controle da resposta ansiogênica</i>	30
3.13.5. <i>Efeito da exposição repetida ao estresse de restrição sobre os níveis proteicos dos receptores AT₁ e Mas</i>	31
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	32
4.1. Caracterização do papel dos receptores AT ₁ , AT ₂ e Mas no AMe no controle das respostas cardíacas do barorreflexo	32
4.2. Estudo do envolvimento dos receptores AT ₁ , AT ₂ e Mas no AMe nas alterações cardíacas do barorreflexo induzidas pelo estresse por restrição repetido (ERR).....	33
4.3. Estudo do envolvimento das sinalizações de angiotensina II/receptores AT ₁ e AT ₂ e angiotensina 1-7/receptor Mas no AMe nas respostas cardiovasculares aos estresse por restrição agudo e durante a 10 ^o sessão de estresse por restrição	34
4.4. Estudo do envolvimento das sinalizações angiotensina II/receptores AT ₁ e AT ₂ angiotensina 1-7/receptor Mas no AMe no efeito ansiogênico após uma sessão aguda e 10 sessões de estresse de estresse de restrição.....	35

4.5. Estudo do efeito da exposição repetida ao estresse por restrição sobre os níveis proteicos dos receptores AT ₁ e Mas	37
5. RESULTADOS	38
5.1. Caracterização do papel dos receptores AT ₁ , AT ₂ e Mas no AMe no controle das respostas cardíacas do barorreflexo	38
5.1.1. Efeito do tratamento farmacológico do AMe com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos nos parâmetros basais da pressão arterial e frequência cardíaca	39
5.1.2. Efeitos do tratamento farmacológico no AMe com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos na função barorreflexa	39
5.2. Estudo do envolvimento dos receptores AT ₁ , AT ₂ e Mas no AMe nas alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse de restrição repetido (ERR).....	43
5.2.1. Efeito do tratamento farmacológico no AMe com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos nos parâmetros basais da pressão arterial e frequência cardíaca em animais controle e submetidos ao ERR.....	43
5.2.2. Efeitos do tratamento farmacológico do AMe com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos na função barorreflexa de animais controle e submetidos ao ERR.....	46
5.3. Efeito da exposição repetida prévia ao estresse de restrição no controle das respostas cardiovasculares e ansiogênica a esse estressor pelas neurotransmissões angiotensinérgicas do AMe	51
5.3.1. Efeito da exposição repetida prévia ao estresse de restrição no controle da resposta ansiogênica a esse estressor pelas neurotransmissões angiotensinérgicas do AMe	62
5.4. Efeito da exposição repetida ao estresse de restrição sobre os níveis proteicos dos receptores AT ₁ e Mas.....	64
6. DISCUSSÃO	65
6.1. Papel e efeito dos receptores angiotensinérgicos no AMe no controle da função barorreflexa de animais submetidos ou não ao estresse por restrição repetido (ERR).....	65
6.1.1. Papel dos receptores angiotensinérgicos no AMe no controle da função barorreflexa.....	66
6.1.2. Efeitos do tratamento farmacológico no AMe com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos na função barorreflexa de animais submetidos ao estresse por restrição repetido.....	69
6.2. Efeito da exposição repetida prévia ao estresse de restrição no controle das respostas cardiovasculares e ansiogênica a esse estressor pelas neurotransmissões angiotensinérgicas do AMe	72
6.3. Efeito da exposição repetida ao estresse por restrição sobre os níveis proteicos dos receptores AT ₁ e Mas.....	77
7. CONCLUSÃO.....	78
8. REFERÊNCIAS.....	79
ANEXOS	90
ANEXO 1 – Artigo publicado com os primeiros dados deste trabalho intitulado “AT ₂ and MAS (but not AT ₁) angiotensinergic receptors in the medial amygdaloid nucleus modulate the baroreflex activity in rats”.....	90

1. INTRODUÇÃO

Há anos tem sido discutido a relação entre estresse e função cardiovascular (HARLAN, 1981). Neste sentido, dados da Organização Mundial da Saúde obtidos no período de 2000 a 2012 apontaram 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 JUNIOR; LIMA NETO, 2010). Estudos em humanos e animais demonstraram diversas patologias cardiovasculares associadas ao estresse, dentre elas arritmias cardíacas, isquemia do miocárdio e hipertensão arterial (PICKERING, 1990; ROZANSKI; BLUMENTHAL; KAPLAN, 1999; SGOIFO; CARNEVALI; GRIPPO, 2014). Essas alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse estão associadas às disfunções autônomas e comprometimentos da função vascular e cardíaca (CORDELLINI; VASSILIEFF, 1998; COSTA-FERREIRA et al., 2016; DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002, 2008; ISINGRINI et al., 2011).

Durante situações aversivas um conjunto coordenado de respostas fisiológicas, incluindo alterações na atividade autônoma e neuroendócrina, são geradas com o objetivo de manutenção da homeostasia (DAMPNEY; HORIUCHI; MCDOWALL, 2008; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). As respostas decorrentes da ativação do sistema nervoso autônomo são caracterizadas principalmente por alterações na função cardiovascular, que incluem: aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, redistribuição do fluxo sanguíneo (redução da perfusão cutânea e visceral e aumento do fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética) e alteração na atividade barorreflexa (CRESTANI *et al.*, 2010a; DAMPNEY; HORIUCHI; MCDOWALL, 2008; KVETNANSKY *et al.*, 1979; ZHANG; JULIEN; BARRÈS, 1996). A diminuição do fluxo sanguíneo reduz a temperatura cutânea durante situações aversivas (BUSNARDO *et al.*, 2013; VIANNA; CARRIVE, 2005). Essas respostas são adaptativas a curto prazo (STERLING, 2012), porém a ativação repetida ou prolongada durante, por exemplo, a exposição a protocolos de estresse crônico pode causar disfunções cardiovasculares (MCEWEN, 2007). De fato, estudos em roedores demonstraram diversas alterações na função cardiovascular após a exposição repetida a estímulos estressores (i.e., estresse crônico), incluindo: aumento nos valores basais de pressão arterial, alterações no balanço da atividade simpática e parassimpática cardíaca, comprometimento na atividade do barorreflexo e disfunção vascular (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2015; CONTI et al., 2001; CORDELLINI; VASSILIEFF, 1998; COSTA-FERREIRA et al., 2016; DAUBERT et al., 2012; DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015; PORTER et al., 2004).

Estudos clínicos e pré-clínicos também demonstraram uma associação entre a exposição a eventos estressores e o desenvolvimento de vários transtornos psiquiátricos, incluindo a ansiedade (CAMPOS et al., 2013). De fato, estudos em roedores evidenciaram que a exposição tanto a eventos estressores agudos quanto crônicos aumentaram a expressão de comportamentos relacionados à ansiedade (BUSNARDO *et al.*, 2013; KORTE; DE BOER, 2003; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000; SEVGI; OZEK; EROGLU, 2006). Transtornos afetivos e de ansiedade são considerados fatores de risco para a morbidade e mortalidade cardiovascular, ao passo que doenças cardiovasculares podem aumentar a incidência de quadros de depressão e ansiedade (GLASSMAN, 2007; HARE et al., 2014; ROZANSKI; BLUMENTHAL; KAPLAN, 1999; SGOIFO; CARNEVALI; GRIPPO, 2014; THURSTON; REWAK; KUBZANSKY, 2013). Essas evidências indicam uma possível relação entre as alterações comportamentais e as disfunções cardiovasculares induzidas pelo estresse.

Apesar da importância das respostas cardiovasculares e comportamentais durante sessões agudas de estresse, bem como das disfunções observadas após a exposição crônica a eventos estressores, os mecanismos neurobiológicos envolvidos nessas respostas ainda são pouco compreendidos.

1.1. Núcleo medial da amígdala e as respostas cardiovasculares e ansiogênica ao estresse

As respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse são mediadas por estruturas límbicas no encéfalo (DAMPNEY, 2015; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Uma das estruturas ativadas durante o estresse é o complexo amigdalóide (CULLINAN et al., 1995; FURLONG et al., 2014). A amígdala é uma estrutura subcortical do sistema límbico envolvida no controle de respostas autonômicas, comportamentais e neuroendócrinas (FORTALEZA; SCOPINHO; CORRÊA, 2011; FORTALEZA, *et al.*, 2015; MA; MORILAK, 2005; PRICE; RUSSCHEN; AMARAL, 1987; SAH *et al.*, 2003). Essa estrutura localiza-se no lobo temporal entre a capsula externa e o hipotálamo, e possui cerca de 13 subnúcleos (PITKÄNEN; SAVANDER; LEDOUX, 1997; PRICE; RUSSCHEN; AMARAL, 1987; SAH et al., 2003). Baseado em sua citoarquitetura, quimioarquitetura e conexões, os subnúcleos são divididos em 3 grupos: 1) grupo profundo ou basolateral, que inclui os núcleos lateral, basal e o basal acessório; 2) grupo superficial ou cortical, no qual inclui o núcleo cortical e o núcleo do trato olfativo lateral; e 3) o grupo centromedial, composto pelos núcleos central e medial (PITKÄNEN; SAVANDER; LEDOUX, 1997; PRICE; RUSSCHEN; AMARAL, 1987; SAH et al., 2003).

O núcleo medial da amígdala (AMe) é um dos subnúcleos do complexo amigdalóide ativado durante o estresse (CRANE; FRENCH; BULLER, 2005; CULLINAN *et al.*, 1995; FURLONG *et al.*, 2014; KUBO *et al.*, 2004), e esse parece ser o subnúcleo amigdalóide mais intensamente ativado (DAVERN; HEAD, 2011). O AMe possui conexões com regiões hipotalâmicas e do tronco cerebral envolvidas na geração das respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse (DAMPNEY, 1994; DAVIS *et al.*, 2010; OHTA; WATANABE; UEKI, 1991; ROSEN; DONLEY, 2006; SCOTT *et al.*, 1997). De fato, foi demonstrado um envolvimento do AMe na modulação das respostas cardiovasculares durante sessões agudas de estresse (FORTALEZA; SCOPINHO; CORRÊA, 2012a, b; FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009; KUBO *et al.*, 2004). Por exemplo, a microinjeção de muscimol (agonista GABA_A) no AMe atenuou a resposta de aumento da pressão arterial evocada pelo estresse de restrição agudo (KUBO *et al.*, 2004), ao passo que facilitação da resposta taquicárdica induzida pelo mesmo estressor foi observado após o bloqueio sináptico não-seletivo no AMe causado pelo tratamento local com CoCl₂ (FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009). Estudos também evidenciaram o envolvimento da AMe nas respostas comportamentais do tipo ansiogênicas induzidas pela exposição ao estresse de restrição (EBNER *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2014).

Apesar dos relatos de um envolvimento do AMe no controle das respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas por sessões agudas de estresse, os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos nesse controle ainda são pouco compreendidos. Estudos demonstraram o envolvimento de mecanismos noradrenérgicos, colinérgicos e histaminérgicos locais nas respostas cardiovasculares (DE ALMEIDA *et al.*, 2015; FORTALEZA; SCOPINHO; CORRÊA, 2012a, 2012b; FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009); ao passo que um envolvimento da melanocortina-4 e substância P foram reportados na resposta ansiogênica (EBNER *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2014). Entretanto, a possível participação de outros neurotransmissores e neuromoduladores nunca foram investigados.

Além dessas respostas, foi proposto que o AMe participa de uma rede central que modula as respostas barorreflexas. Nesse sentido, um estudo recente identificou uma influência inibitória do AMe na resposta de bradicardia reflexa causada por aumento da pressão arterial (FORTALEZA *et al.*, 2015). Outros estudos indicaram um papel local dos neurotransmissores ocitocina, somatostatina, histamina, glutamato, GABA e angiotensina II no controle das respostas barorreflexas exercido pelo AMe (NECKEL *et al.*, 2012; QUAGLIOTTO *et al.*, 2008, 2014). Nesse sentido, dados prévios do nosso grupo demonstraram que a exposição ao estresse

crônico causou comprometimento na atividade do barorreflexo (COSTA-FERREIRA et al., 2016; DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015), porém o papel específico do AMe nas alterações dos parâmetros das respostas cardíacas barorreflexas desencadeadas por estressores crônicos ainda não é compreendido.

Outro aspecto relevante são as evidências de que a exposição repetida a eventos estressores causa alterações morfológicas e neuroquímicas, além de aumentar a excitabilidade neuronal no AMe (BENNUR et al., 2007; GRAY; BINGHAM; VIAU, 2010; MOZHUI et al., 2010). Esses dados indicam que a exposição crônica prévia a eventos aversivos pode alterar o perfil de controle das respostas ao estresse por esse núcleo, além de indicar um envolvimento do AMe nas disfunções causadas pela exposição a estressores crônicos. Entretanto, um possível envolvimento do AMe nas alterações cardiovasculares e comportamentais causadas por estressores crônicos nunca foi investigado.

1.2. Núcleo medial da amígdala e as respostas cardiovasculares e ansiogênica ao estresse: sistema renina-angiotensina (SRA)

Foi demonstrado que estímulos aversivos aumentam os níveis de angiotensina II (Ang II) no encéfalo e na circulação periférica (SAAVEDRA, *et al.*, 2006). Nesse sentido, mecanismos angiotensinérgicos foram propostos desempenhar um papel importante no processamento dos ajustes fisiológicos ao estresse e de respostas emocionais (FONTES; MARTINS LIMA; SANTOS, 2016; SAAVEDRA, *et al.*, 2004; WATANABE *et al.*, 1998).

A via clássica de formação de Ang II na circulação ocorre 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; KARNIK et al., 2015). A angiotensina I é hidrolisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (liberada principalmente pelo endotélio capilar dos pulmões) para formar a Ang II, um octapeptídeo ativo (HALL, 2003; KARNIK et al., 2015). Foram também descritas vias independentes da ECA para a formação de Ang II a partir da angiotensina I, como também a partir do angiotensinogênio (KARNIK et al., 2015; ZAMAN; OPARIL; CALHOUN, 2002). Foram identificados dois receptores para a Ang II, designados como AT₁ e AT₂, porém os efeitos bem conhecidos da Ang II no controle cardiovascular e hidroeletrólítico, bem como das respostas ao estresse, parecem ser mediados principalmente pela ativação do receptor AT₁ (DE GASPARO *et al.*, 2000; FONTES; MARTINS LIMA; SANTOS, 2016; FRAGA-SILVA; FERREIRA; DOS SANTOS, 2013).

Além da formação sistêmica de Ang II, estudos demonstraram a presença do sistema renina-angiotensina (SRA) local em vários tecidos, incluindo o encéfalo (WRIGHT; HARDING, 2011). Componentes do SRA (angiotensinogênio, renina, ECA, Ang II e outras angiotensinas, e todos os subtipos de receptores angiotensinérgicos) foram identificados em regiões encefálicas importantes no controle das respostas ao estresse (BALI; JAGGI, 2013; WRIGHT; HARDING, 2011). Nesse sentido, resultados pré-clínicos em roedores demonstraram que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de antagonistas seletivos do receptor AT₁ reduziu as respostas de aumento da pressão arterial, FC e catecolaminas plasmáticas observadas durante a exposição aguda a diferentes estímulos aversivos (por exemplo, estresse de restrição e choque nas patas) (ERDOS et al., 2010; JEZOVA et al., 1998; SAIKI et al., 1997). A ativação do receptor AT₁ pela Ang II foi implicada em comportamentos relacionados à ansiedade em roedores (KRAUSE *et al.*, 2011; PAVEL *et al.*, 2008; SAAVEDRA, *et al.*, 2006), porém em uma ampla busca na literatura nós não encontramos nenhum estudo que tenha investigado o envolvimento da Ang II na resposta ansiogênica ao estresse no AMe.

Apesar das evidências da ação pró-estresse da sinalização Ang II/receptor AT₁ (BALI; JAGGI, 2013; FONTES; MARTINS LIMA; SANTOS, 2016), os sítios específicos no encéfalo onde a Ang II age para controlar as respostas ao estresse não são completamente conhecidos. Estudos prévios reportaram o envolvimento de núcleos hipotalâmicos (por exemplo: os núcleos anterior, dorsomedial e paraventricular) (BUSNARDO; TAVARES; CORREA, 2014; DE MATTEO; HEAD; MAYOROV, 2006; KUBO *et al.*, 2001) e bulbares (por exemplo, a região ventrolateral rostral do bulbo) (MAYOROV; HEAD, 2003) nas respostas cardiovasculares ao estresse, porém o envolvimento de estruturas prosencefálicas nunca foi investigado.

Terminais angiotensinérgicos e componentes do SRA, incluindo o angiotensinogênio e receptores da Ang II, foram identificados no AMe (LENKEI et al., 1997; LYNCH; HAWELU-JOHNSON; GUYENET, 1987; VON BOHLEN UND HALBACH, 2005). Além disso, foi reportado que o número de neurônios ativados no AMe por um estímulo aversivo agudo foi maior em animais *knockout* para o receptor AT₁ (DAVERN et al., 2009). Nesse sentido, foi proposto que a Ang II seja um neuromodulador inibitório no AMe durante situações aversivas (DAVERN; HEAD, 2011). Em conjunto, esses resultados fornecem evidências de que o AMe seja um sítio de ação da Ang II durante situações aversivas. *Assim, considerando as evidências prévias de que o AMe tenha uma influência inibitória na resposta taquicárdica e*

facilitatória na resposta pressora ao estresse de restrição (FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009; KUBO et al., 2004) e de que a Ang II tenha uma ação ansiogênica (BALI; JAGGI, 2013), uma das hipóteses testada no presente estudo é a de que a Ang II no AMe, atuando no receptor AT₁, tenha uma influência facilitatória na resposta de frequência cardíaca e inibitória no aumento da pressão arterial, além de estar envolvida no efeito ansiogênico induzidos pelo estresse de restrição agudo.

São escassos os estudos que investigaram o efeito do eixo Ang II/receptor AT₂ nas alterações cardiovasculares e ansiogênica ao estresse. Com base em estudos prévios que demonstraram que a ativação do receptor AT₂ pode agir como um mecanismo contra-regulatório para alguns dos efeitos do receptor AT₁ (DE GASPARO et al., 2000; KARNIK et al., 2015; MILLER; ARNOLD, 2018), e considerando as evidências prévias das ações desencadeadas pelo receptor AT₁, nós também testamos no presente estudo a hipótese de que a Ang II no AMe, atuando no receptor AT₂, tenha um papel oposto àqueles do receptor AT₁ nas alterações cardiovasculares e no efeito ansiogênico induzido pelo estresse de restrição agudo.

A exposição a protocolos de estresse crônico altera a distribuição e densidade dos receptores da Ang II em regiões centrais envolvidas no controle cardiovascular (ARMANDO et al., 2001; MCDOUGALL et al., 2000b). Em uma ampla busca na literatura nós não encontramos nenhum estudo que tenha investigado o efeito do estresse crônico sobre o SRA no AMe. Entretanto, foi reportado que a exposição repetida ao estresse de restrição reduz a ativação de neurônios no AMe induzida pelo estresse (GRAY; INNALA; VIAU, 2014). Além disso, como mencionado acima, alterações morfológicas e neuroquímicas, além de aumento na excitabilidade neuronal, foi identificada no AMe após a exposição repetida a eventos estressores (BENNUR et al., 2007; GRAY; BINGHAM; VIAU, 2010; MOZHUI et al., 2010). Desse modo, outra hipótese testada no presente estudo é que a exposição repetida ao estresse de restrição cause alterações na sinalização Ang II/receptores AT₁ e AT₂ no AMe, e essas alterações estejam envolvidas nas disfunções cardiovasculares induzidas por esse estímulo estressor, além de alterar o controle das respostas cardiovasculares e ansiogênica ao estresse por restrição por esse mecanismo neuroquímico no AMe.

Além da Ang II, o SRA também possui outros peptídeos biologicamente ativos, como a angiotensina III, a angiotensina IV e a angiotensina 1-7 (BADER, 2010; KARNIK et al., 2015). A angiotensina 1-7 (Ang 1-7) é sintetizada a partir da ação de uma enzima análoga à ECA, denominada ECA-2 (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000). A formação de Ang 1-7 é principalmente dependente da hidrólise da Ang II pela ECA-2 (KARNIK et al., 2015;

SANTOS et al., 2013), mas pode também ser formada a partir da angiotensina I através de outras peptidases, que incluem prolil-endopeptidase, neutro-endopeptidase e tymeth-oligopeptidase (BADER, 2010; SANTOS et al., 2013). Carboxipeptidases e prolil-endopeptidases também podem contribuir para a formação de Ang 1-7 a partir da Ang II (BADER, 2010; PASSOS-SILVA; BRANDAN; SANTOS, 2015). Os efeitos da Ang 1-7 são mediados pela ativação de um receptor específico, denominado receptor Mas, no qual é acoplado à proteína G (isto é, receptor metabotrópico) (SANTOS et al., 2003).

Os efeitos da Ang 1-7 sobre o sistema cardiovascular (vasodilatação, inibição do estresse oxidativo, efeito anti-hipertrofico e anti-fibrótico) são opostos àqueles da Ang II atuando no receptor AT₁. De fato, foi observado que animais *knockout* para o receptor Mas apresentaram disfunção cardíaca, síndrome metabólica, aumento da pressão arterial, disfunção endotelial, diminuição da atividade barorreflexa e aumento da trombogênese (DE MOURA et al., 2010; FRAGA-SILVA et al., 2008; SANTOS et al., 2006; XU et al., 2008). Resultados similares foram observados em animais com deficiência na expressão da enzima ECA-2 (CRACKOWER et al., 2002; JIN et al., 2012; YAMAMOTO et al., 2006), o que mostra a grande importância da via ECA-2/Ang 1-7/receptor Mas na prevenção de diversas complicações fisiopatológicas. Baseado nessas evidências, foi proposto a subdivisão do SRA em dois eixos: o eixo clássico ECA/ Ang II/receptor AT₁; e o eixo contra-regulatório ECA-2/Ang 1-7/receptor Mas (FRAGA-SILVA; FERREIRA; DOS SANTOS, 2013).

A presença da Ang 1-7 e do receptor Mas foi identificado em estruturas encefálicas envolvidas nas respostas ao estresse (BECKER et al., 2007; BUNNEMANN et al., 1990; CHAPPELL et al., 1989; FREUND; WALTHER; VON BOHLEN UND HALBACH, 2012). Nesse sentido, assim como a ativação do receptor AT₂ pela Ang II, a Ang 1-7 parece também ser uma via contra-regulatória para os efeitos pró-estresse do receptor AT₁ no encéfalo (FONTES; MARTINS LIMA; SANTOS, 2016). Por exemplo, contrário aos efeitos facilitatórios da Ang II atuando no receptor AT₁ sobre as respostas cardiovasculares ao estresse (ERDOS et al., 2010; JEZOVA et al., 1998; SAIKI et al., 1997), foi reportado que a injeção i.c.v. de Ang 1-7 atenuou as respostas de taquicardia, bem como o aumento nos níveis plasmáticos de Ang II, corticosterona e noradrenalina induzidos por estressores agudos (MARTINS LIMA et al., 2013; ZHU et al., 2014). Dados mais recentes mostraram que a injeção de Ang 1-7 na amígdala basolateral também atenuou as respostas cardiovasculares a um estressor agudo, e esse efeito foi abolido após o tratamento local com um antagonista do receptor Mas (OSCAR et al., 2015). Estudos prévios evidenciaram uma ação ansiolítica da Ang

1-7 (BILD; CIOBICA, 2013; FONTES; MARTINS LIMA; SANTOS, 2016), porém uma possível influência nas alterações comportamentais induzidas pelo estresse nunca foi investigada. Um estudo recente também demonstrou que o estresse diminuiu os níveis de Ang 1-7 e a expressão do receptor Mas em diversas estruturas límbicas, incluindo a amígdala (ZHU et al., 2014), o que sugere que esse mecanismo de sinalização pode estar envolvido nas disfunções causadas pelo estresse. De fato, a injeção i.c.v. de Ang 1-7 reduziu as lesões gástricas induzidas pelo estresse (ZHU et al., 2014).

Esses dados suportam o envolvimento da via ECA-2/ Ang 1-7/receptor Mas no controle das respostas cardiovasculares e ansiogênica induzidas pelo estresse. Entretanto, os sítios específicos no sistema nervoso central envolvido com as ações desse mecanismo neuroquímico ainda são pouco compreendidos. Baseado na evidência da presença do receptor Mas no AMe de roedores (FREUND; WALTHER; VON BOHLEN UND HALBACH, 2012), uma última hipótese testada no presente estudo foi a de que a Ang 1-7 no AMe tem um papel oposto ao da Ang II atuando via receptor AT₁ local no controle das respostas cardiovasculares e do efeito ansiogênico ao estresse de restrição agudo. Além disso, nós investigamos um envolvimento dessa via de sinalização no AMe nas alterações cardiovasculares induzidas pela exposição repetida ao estresse de restrição, além de avaliar se a exposição repetida prévia ao estresse de restrição altera o controle das respostas cardiovasculares e ansiogênica a esse estressor pela Ang 1-7 no AMe.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a participação das neurotransmissões angiotensina II/receptor AT₁, angiotensina II/receptor AT₂ e angiotensina 1-7/receptor Mas presentes no AMe nas respostas cardiovasculares e ansiogênica ao estresse de restrição em ratos. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- 1) Investigar o envolvimento das neurotransmissões angiotensina II/receptor AT₁, angiotensina II/receptor AT₂ e angiotensina 1-7/receptor Mas no AMe nas alterações nos parâmetros cardiovasculares basais e na atividade do barorreflexo induzidas pela exposição repetida ao estresse de restrição em ratos.
- 2) Investigar o envolvimento das neurotransmissões angiotensina II/receptor AT₁, angiotensina II/receptor AT₂ e angiotensina 1-7/receptor Mas no AMe nas respostas cardiovasculares e ansiogênica observadas durante uma sessão aguda estresse de restrição em ratos.
- 3) Avaliar o efeito da exposição repetida prévia ao estresse de restrição no controle das respostas cardiovasculares e ansiogênica a esse estressor pelas neurotransmissões angiotensina II/receptor AT₁, angiotensina II/receptor AT₂ e angiotensina 1-7/receptor Mas no AMe em ratos.
- 4) Avaliar o efeito da exposição repetida ao estresse de restrição sobre os níveis proteicos dos receptores AT₁, AT₂ e Mas no AMe de ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos com peso corporal variando entre 240-260g. 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 acesso livre a alimento e água. Todos os protocolos e procedimentos executados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR/UNESP (*protocolo nº 62/2015*).

3.2. Implante de cânulas guias direcionadas ao núcleo medial da amígdala

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

Ântero-posterior: +5.6 mm em relação à interaural

Lateral: +3.4 mm a partir da linha medial

Ventral: -8.4 mm em relação ao osso do crânio

Incisivo: -3,2 mm

Após o posicionamento da cânula de aço inoxidável, foram feitos orifícios no crânio com auxílio de broca odontológica, por onde foram introduzidas cânulas bilaterais constituídas por um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,6 mm, 23G) com 15 mm de comprimento. As cânulas foram fixadas ao crânio com uma resina acrílica auto-polimerizável (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 nas cânulas para evitar a sua obstrução durante o período de recuperação do animal. Como medida

profilática, ao final da cirurgia o animal recebeu 0,2 mL de pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunixinina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) pela via subcutânea.

3.3. Protocolos de estresse

No presente estudo realizamos, em grupos independentes de animais, uma sessão aguda de estresse de restrição ou a exposição repetida a esse estressor.

3.3.1 Estresse de restrição agudo

O estresse de restrição agudo consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro=6,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de ½ polegada que preencham aproximadamente 20% do tubo). No protocolo de estresse agudo os animais foram mantidos por um período de 60 minutos no tubo de restrição (CRESTANI et al., 2009; FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009), e cada animal foi submetido a apenas uma sessão de restrição para evitar habituação.

3.3.2. Estresse por restrição repetido

Para o estresse de restrição repetido (ERR), os animais foram submetidos a sessões diárias de uma hora de estresse de restrição, como descrito na seção 3.3.1, por 10 dias consecutivos (COSTA-FERREIRA et al., 2016; DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015). Todas as sessões o estresse foram iniciadas às 9:00 horas. Animais controle foram mantidos em repouso, exceto no período de limpeza das caixas, no Biotério do Laboratório de Farmacologia da FCFAr/UNESP pelo mesmo período que os animais submetidos ao protocolo de estresse.

3.4. Canulação da artéria e veia femoral

Os animais foram anestesiados com tribomoetanol (250 mg/Kg, intraperitoneal), e foi implantado um cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares, e, quando necessário, outro na veia femoral para infusão de fármacos. Os cateteres foram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (20 U/mL de heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal. Após a implantação dos cateteres, os mesmos foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica. Ao término da cirurgia, os animais receberam 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal

flunixin 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.

3.5. 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 de frequência cardíaca (FC) foram obtidos a partir dos sinais de PAP.

3.6. Registro da temperatura cutânea da cauda

Os registros da temperatura cutânea da cauda foram realizados utilizando um termovisor (IRI4010, Inglaterra). A análise foi 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).

3.7. Análise comportamental no labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) foi utilizado para avaliação dos efeitos do estresse de restrição sobre comportamentos relacionados à ansiedade. O aparato utilizado para o teste consistiu em dois braços abertos e dois braços fechados, de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura cada um, unidos perpendicularmente e elevados 50 cm do solo. Os braços fechados possuíam paredes de madeira de 40 cm de altura que os circundam, e os braços abertos possuíam uma borda lateral de acrílico de 1 cm para evitar a queda dos animais. Os roedores evitam os braços abertos, e fármacos ansiolíticos normalmente aumentam a exploração dos braços abertos, sem interferir com o número de entradas nos braços fechados (PELLOW *et al.*, 1985). No intervalo entre os testes de cada animal, o labirinto foi limpo com uma solução de álcool (20%). O comportamento foi gravado por uma câmera de vídeo (MICROSOFT LIFECAM CINEMA HD) por um período de 5 minutos. Os filmes foram analisados em tempo

real pelo programa de rastreamento comportamental ANY-Maze (Stoelting, EUA). Como medidas comportamentais, foram registrados o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados.

3.8. Avaliação da atividade barorreflexa

A atividade do barorreflexo foi avaliada utilizando dois métodos: 1) método farmacológico e 2) análise de sequência.

3.8.1. Método farmacológico

Esse método avalia a atividade barorreflexa através de alterações na pressão arterial induzidas pela infusão intravenosa de fenilefrina (agonista seletivo dos adrenoreceptores α_1) (50 μ g/mL a 0,34 mL/min/kg) e de nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico) (70 μ g/mL/kg a 0,8 mL/min/kg), utilizando uma bomba de infusão (K.D. Scientific, EUA) (CRESTANI *et al.*, 2010b). Felinefrina e NPS causam aumento e redução na pressão arterial, respectivamente.

A análise foi feita relacionando as variações da PAM (10, 20, 30 e 40mmHg) causadas pelas infusões de felinefrina e NPS com a resposta reflexa correspondente da FC. Utilizando os pontos obtidos da correlação na variação da pressão arterial e FC foram traçadas curvas sigmóides como descritas na literatura (CRESTANI *et al.*, 2010b). A avaliação da curva sigmoide foi feita com base em cinco parâmetros: 1- platô mínimo de frequência cardíaca (P_1 , bpm); 2-platô máximo de frequência cardíaca (P_2 , bpm); 3- variação da FC (ΔP , bpm, diferença entre P_1 e P_2); 4-pressão arterial média (PA_{50} , mmHg, 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.*, 2010b). Além disso, partindo dos mesmos pontos obtidos da correlação dos valores de pressão arterial e FC correspondente, foram traçadas curvas de regressão linear para a análise individual da atividade barorreflexa durante o efeito pressor e depressor na pressão arterial (CRESTANI *et al.*, 2010b).

3.8.2. Método de análise de sequência

Além da abordagem farmacológica, a função barorreflexa também foi avaliada utilizando a técnica de análise de sequência. No método de sequência, a atividade do barorreflexo foi avaliada durante flutuações espontâneas da pressão arterial, sem nenhuma manipulação farmacológica. Para tanto, a pressão arterial sistólica (PAS) e o intervalo pulso (IP) foram avaliados batimento-a-batimento para a identificação de sequências na qual

aumentos da PAS foram acompanhados de aumento no IP (sequência UP) ou quedas da PAS associadas à diminuição do IP (sequência DOWN). Uma sequência barorreflexa foi utilizada apenas quando o coeficiente de correlação (r) entre a PAS e o PI foi superior a 0,8. A sensibilidade espontânea ao barorreflexo foi avaliada com base na inclinação (isto é, ganho em ms / mmHg) da regressão linear entre o SAP e o PI. O índice de efetividade do barorreflexo (IEB), no qual consiste no número de alterações na PAS que efetivamente resultaram em alterações reflexas do IP, também foi calculado.

3.9. Soluções e Drogas

Angiotensina 1-7 (Tocris, EUA), A-779 (antagonista seletivo do receptor Mas (Sigma-Aldrich, EUA), angiotensina II (Tocris, EUA), losartana (antagonista seletivo do receptor AT₁) (Sigma-Aldrich, EUA), PD123319 (antagonista seletivo de receptores AT₂) (Tocris, EUA), tribromoetanol (Sigma-Aldrich) e uretana (Sigma-Aldrich, EUA) foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%). O pentabiótico (Fontoura-Wyeth, Brasil) e o anti-inflamatório flunixinina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) foram utilizados como fornecidos pelos fabricantes.

3.10. Microinjeção de drogas no AMe

As agulhas injetoras (33G, Small Parts, EUA) utilizadas para a microinjeção das drogas no AMe foram um mm mais longas do que as cânulas guias fixada ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2 µL (7002KH, Hamilton, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10). As drogas foram injetadas no volume de 100nL (FORTALEZA et al., 2015; FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009).

3.11. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.p.), e 100nL do corante azul de Evan (10%) foi microinjetado bilateralmente para determinação do sítio de injeção. Em seguida, os cérebros foram removidos, pós-fixados e posteriormente seccionados em cortes frontais de 40µm de espessura para análise dos sítios de injeção. Os sítios de microinjeção foram determinados de acordo com Atlas de Paxinos & Watson, (1997).

3.12. Medidas dos níveis protéicos dos receptores AT₁ e Mas no AMe

Os animais foram eutanasiados por decapitação, e tiveram seus encéfalos rapidamente removidos, congelados em isopentano sobre gelo seco (-20°C) e armazenados em freezer -80°C até a dissecação da AMe. Amostras de cerca de 1mm de espessura do AMe foram obtidas a partir do encéfalo posicionado em um criostato (-20°C) (CM1900, Leica, Alemanha) utilizando-se uma agulha de ponta chata de 14G. As amostras foram obtidas a partir das coordenadas de -2,12mm a -3,14 mm em relação ao bregma, de acordo com parâmetros obtidos do Atlas de Paxinos & Watson (1997). Após a dissecação, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise por *Western Blotting*.

O *Western blotting* foi realizado de acordo com técnica padronizada em nosso laboratório (MARIN et al., 2009). Brevemente, as amostras do AMe foram homogeneizada por meio de ondas de ultrassom em solução de RIPA, e tiveram o conteúdo de proteínas determinado para posterior ajuste da quantidade de proteínas (kit Bio-Rad DC protein assay, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA-EUA). Em seguida, as amostras foram desnaturadas e submetidas à eletroforese em gel de SDS poliacrilamida 9%. Ao final da separação, as proteínas no gel foram transferidas para uma membrana PVDF-FL. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas das ligações inespecíficas por meio de solução TBS-T com 5% de Soro Albumina Bovina. Após a fase de bloqueio, as membranas foram incubadas por 18 horas (“overnight”) com os anticorpos primários contra o receptor AT₁ (polyclonal antibody, rabbit anti-AT1 receptor antibody, Santa Cruz, EUA) na diluição de 1:500, ou o receptor Mas (polyclonal antibody, rabbit anti-Mas1 antibody; Novus Biologicals, EUA) na diluição de 1:1000. As diluições dos anticorpos foram determinadas em ensaios preliminares. Após a lavagem em tampão TBS-T por cinco minutos, as membranas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado fluoróforo (Goat-Rabbit IgC-Cy3; GE Healthcare). Após isto, protegidas da luz, as membranas foram secas em papel de filtro e a fluorescência das bandas foram detectadas diretamente a partir das membranas utilizando o escaner Syngene® por meio do Software *Genesys Image Acquisition*. Após a revelação, a quantidade total de proteínas nas membranas foi quantificada por meio da coloração com Azul de Coomassie para controle da quantidade de amostra nas membranas. Em seguida, as membranas foram lavadas em solução TBS-T e incubadas com anticorpo secundário por uma hora. As membranas foram então secas em papel filtro e a revelação foi efetuada no escaner Syngene® pelo Software *Genesys Image Acquisition*.

3.13. Análise estatística

3.13.1. Participação do AMe na modulação do barorreflexo

A análise estatística e os gráficos foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 7 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA-EUA). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. Os dados foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) monofatorial. Quando a ANOVA indicou efeito significativo, o pós-teste de Bonferroni foi utilizado para a identificação das diferenças específicas entre os grupos experimentais. Resultados estatísticos com $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3.13.2. Participação do AMe na modulação do barorreflexo pelo estresse de restrição repetido

A análise estatística e os gráficos foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 7 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA-EUA). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. Os dados foram analisados utilizando a ANOVA bifatorial, com os fatores tratamento e estresse como medidas principais. Quando a ANOVA indicou efeito significativo, o pós-teste de Bonferroni foi utilizado para a identificação de diferenças específicas entre os grupos experimentais. Resultados estatísticos com $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3.13.3. Envolvimento do AMe nas alterações cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo e repetido

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa Statistica 7.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK-EUA) e os gráficos foram elaborados no programa GraphPad Prism 7 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA-EUA). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. Os dados foram analisados utilizando a ANOVA trifatorial, com os fatores tratamento e estresse como medidas principais e tempo como medida repetida. Quando a ANOVA indicou efeito significativo, uma análise de comparações não planejadas foi utilizada para a identificação das diferenças específicas entre os grupos experimentais. Resultados estatísticos com $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3.13.4. Participação do AMe no controle da resposta ansiogênica

A análise estatística e os gráficos foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 7 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA-EUA). Todos os valores foram

expressos como média \pm EPM. Os dados foram analisados utilizando a ANOVA bifatorial, com os fatores tratamento e estresse como medidas principais. Quando a ANOVA indicou efeito significativo, o pós-teste de Bonferroni foi utilizado para a identificação de diferenças específicas entre os grupos experimentais. Resultados estatísticos com $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3.13.5. Efeito da exposição repetida ao estresse de restrição sobre os níveis proteicos dos receptores AT_1 e Mas

A análise estatística e os gráficos foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 7 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA-EUA). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. Os resultados foram analisados utilizando o teste *t* de *Student*. Resultados estatísticos com $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1. Caracterização do papel dos receptores AT₁, AT₂ e Mas no AMe no controle da atividade barorreflexa

Este protocolo teve o objetivo de caracterizar o papel dos receptores AT₁, AT₂ e Mas no AMe nas respostas de FC do barorreflexo. Para tanto, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas ao AMe, e mantidos em recuperação por 4 dias. Os experimentos foram realizados 24 horas após a implantação de cateteres na artéria e veia femorais, que foram utilizados para registro dos parâmetros cardiovasculares e infusão das drogas vasoativas, respectivamente (*ver seção 3.8*).

No dia do experimento, todos os animais foram levados em caixas individuais para a sala de experimentação, e mantidos em repouso por 60 minutos, para habituação às condições da sala. Em seguida, cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa, e um registro de pelo menos 30 minutos foi realizado para determinação dos valores basais de pressão arterial e FC. Então, grupos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no AMe de losartana (antagonista seletivo do receptor AT₁, 1nmol/100nL), PD123319 (antagonista seletivo do receptor AT₂, 5nmol/100nL), A-779 (antagonista seletivo do receptor Mas, 0,1nmol/100nL) ou veículo (NaCl 0,9%, 100nL) (BUSNARDO; TAVARES; CORREA, 2014; MICHELINI; BONAGAMBA, 1990; OSCAR et al., 2015). Quinze minutos após o tratamento farmacológico do AMe, foram realizadas infusões randomizadas de fenilefrina e nitroprussiato de sódio para determinação da atividade barorreflexa por meio da abordagem farmacológica (**Figura 1**). A atividade barorreflexa espontânea foi acessada nos últimos 5 minutos antes da infusão das drogas vasoativas (isto é, no período de 10-15 minutos após os tratamentos do AMe).

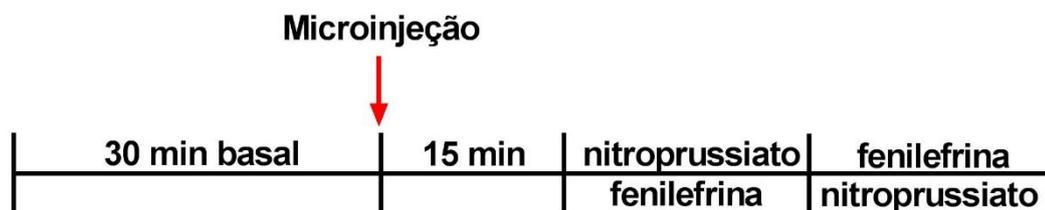


Figura 1: Protocolo experimental para análise da função barorreflexa.

4.2. Estudo do envolvimento dos receptores AT₁, AT₂ e Mas no AMe nas alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse de restrição repetido (ERR)

Estudos prévios demonstraram que a exposição repetida ao estresse de restrição pode causar aumento da pressão arterial e alterações na atividade do barorreflexo (COSTA-FERREIRA et al., 2016; DAUBERT et al., 2012; DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015). Desse modo, este protocolo teve o objetivo de investigar o envolvimento dos receptores AT₁, AT₂ e Mas no AMe nessas alterações cardiovasculares. Para tanto, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas ao AMe, e mantidos em recuperação por 4 dias. Após este período, os ratos foram submetidos a sessões diárias de 60 minutos de estresse por restrição por 10 dias consecutivos (*ver seção 3.3*). Após o término da 10^o sessão de estresse, foi realizada a cirurgia para implantação de cateteres na artéria e veia femorais, que foram utilizados para registro dos parâmetros cardiovasculares e infusão das drogas vasoativas, respectivamente (**Figura 2**).

No dia do experimento (24 horas após a cirurgia de canulação dos vasos femorais), todos os animais foram levados em caixas individuais para a sala de experimentação, e mantidos em repouso por 60 minutos, para habituação às condições da sala. Em seguida, cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa, e um registro de pelo menos 30 minutos foi realizado para determinação dos valores basais de pressão arterial e FC. Então, grupos independentes de animais submetidos ao protocolo de ERR e controle receberam microinjeção bilateral no AMe de losartana (antagonista seletivo do receptor AT₁, 1nmol/100nL), PD123319 (antagonista seletivo do receptor AT₂, 5nmol/100nL), A-779 (antagonista seletivo do receptor Mas, 0,1nmol/100nL) ou veículo (NaCl 0,9%, 100nL). Quinze minutos após o tratamento farmacológico do AMe, foram realizadas infusões randomizadas de fenilefrina e nitroprussiato de sódio para determinação da atividade barorreflexa por meio da abordagem farmacológica (**Figura 1**). A atividade barorreflexa espontânea foi acessada nos últimos 5 minutos antes da infusão das drogas vasoativas (isto é, no período de 10-15 minutos após os tratamentos do AMe).

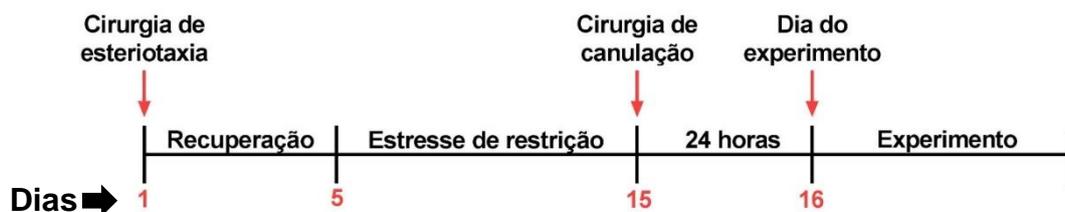


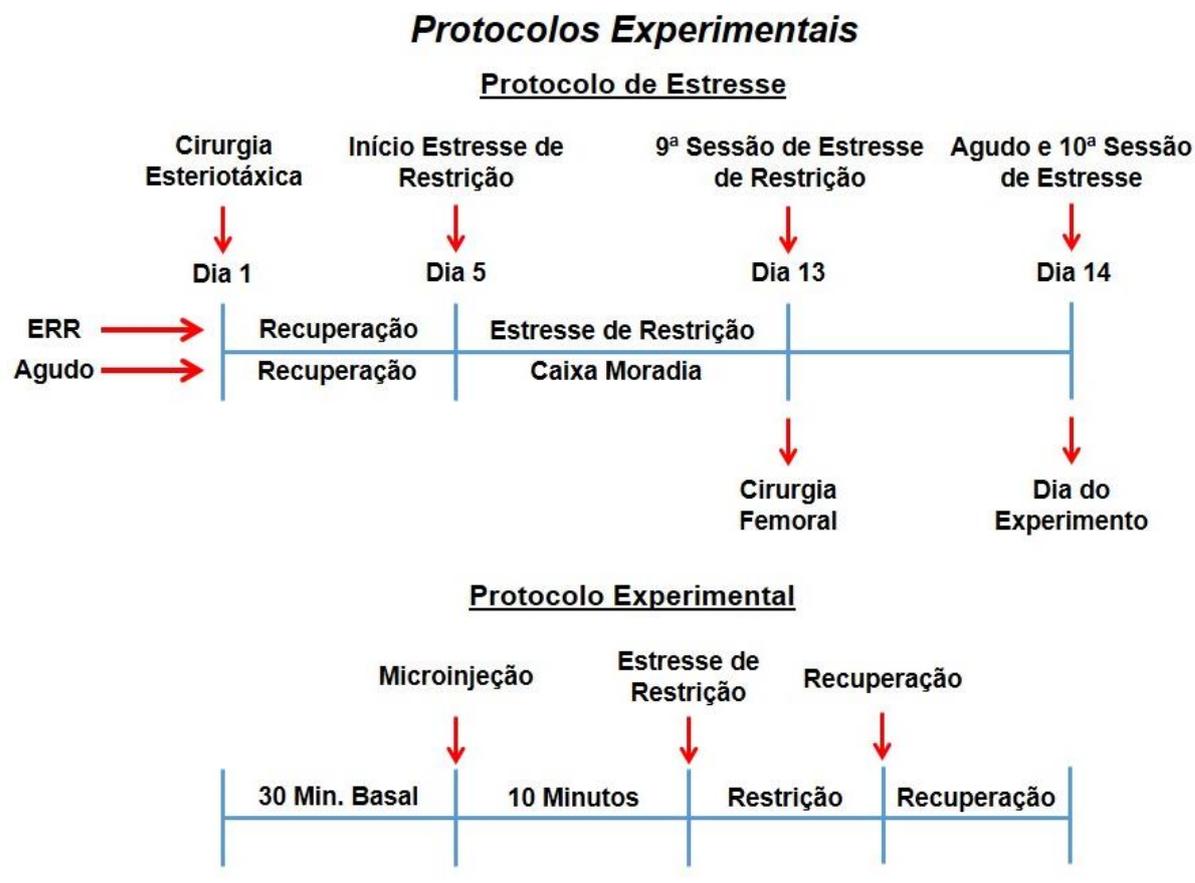
Figura 2: Protocolo experimental para análise da função barorreflexa do AMe em animais submetidos ao estresse por restrição durante 10 dias.

4.3. Estudo do envolvimento das neurotransmissões angiotensina II/receptores AT₁ e AT₂ e angiotensina 1-7/receptor Mas no AMe nas respostas cardiovasculares durante a 1^o (estresse agudo) e a 10^o sessão (estresse repetido) de estresse de restrição

Este protocolo teve os objetivos de investigar o envolvimento das neurotransmissões angiotensina II/receptores AT₁ e AT₂ e angiotensina 1-7/receptor Mas no AMe nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo, além de avaliar se a exposição repetida prévia ao estresse de restrição altera o controle das respostas cardiovasculares a esse estressor pelas neurotransmissões angiotensina II/receptor AT₁ e AT₂ e angiotensina 1-7/receptor Mas no AMe. Para tanto, todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionada ao AMe, e mantidos em recuperação por no mínimo 4 dias. Após este período, grupos independentes os ratos foram submetidos a sessões diárias de 60 minutos de estresse por restrição por 9 dias consecutivos, enquanto os animais do grupo agudo permaneceram em repouso no biotério. Após a 9^a sessão de estresse, todos os animais dos grupos agudo e repetido foram submetidos a cirurgia de canulação para implantação de cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares, e os experimentos foram realizados 24 horas após a cirurgia.

No dia do experimento, os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação por 60 minutos antes do início do experimento, para habituação às condições da sala. Após este período, foi iniciado o registro dos parâmetros cardiovasculares. Um registro de 30 minutos foi realizado para determinação dos valores basais de PAM e FC. Em seguida, grupos independentes de animais dos grupos estresse agudo e estresse repetido receberam microinjeções bilaterais no AMe de angiotensina II (0,05nmol/100nL), losartana (antagonista seletivo do receptor AT₁, 1nmol/100nL), PD123319 (antagonista seletivo do receptor AT₂, 5nmol/100nL), angiotensina 1-7 (0,05nmol/100nL), A-779 (antagonista seletivo do receptor Mas, 0,1nmol/100nL) ou veículo (NaCl 0,9%) (100nL) (BUSNARDO; TAVARES; CORREA, 2014; MICHELINI; BONAGAMBA, 1990; OSCAR *et al.*, 2015). Dez minutos após o tratamento farmacológico do AMe, os animais dos grupos agudo (1^o sessão) e repetido (10^o sessão) foram submetidos a uma sessão de 60 minutos de estresse de restrição. Os registros de pressão arterial e FC foram iniciados pelo menos 30 minutos antes do início do estresse, 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 nos tempos 10, 20, 30 40, 50 e 60 minutos durante a restrição (*ver item 3.6.*) (BUSNARDO *et al.*, 2013). Após a sessão de 60 minutos de estresse, os animais

foram retornados às suas caixas moradias, e os registros da pressão arterial, FC e temperatura cutânea foram realizados por mais 60 minutos. A **Figura 3** ilustra o protocolo experimental completo.



Cauda faltou, arrumar dias, corrigir 60 minutos rest e rec.

Figura 3: Protocolos experimentais: Efeito do tratamento na AMe nas respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo e restrição repetido (ver texto para detalhes).

4.4. Estudo do envolvimento das neurotransmissões angiotensina II/receptores AT₁ e AT₂ angiotensina 1-7/receptor Mas no AMe no efeito ansiogênico após a 1^o (estresse agudo) e a 10^o (estresse repetido) sessão de estresse de restrição

Esse protocolo teve o objetivo de investigar o envolvimento das neurotransmissões angiotensina II/receptores AT₁ e AT₂ e angiotensina 1-7/receptor Mas no AMe na resposta comportamental ansiogênica induzida por uma sessão aguda e após a 10^a sessão (estresse repetido) de estresse de restrição. Para tanto, os animais foram submetidos à cirurgia estereotóxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas ao AMe, e mantidos em recuperação por 4 dias. Após este período, grupos independentes de ratos foram submetidos a

sessões diárias de 60 minutos de estresse por restrição por 9 dias consecutivos, enquanto os animais do grupo agudo permaneceram em suas caixas. No dia do experimento, os animais foram levados para a sala de experimentação e mantidos em caixas individuais na sala de experimentação por 60 minutos antes do início do experimento, para habituação às condições da sala. Em seguida, grupos independentes de animais dos grupos agudo e repetido receberam microinjeções bilaterais no AMe de angiotensina II (0,05nmol/100nL), losartana (antagonista seletivo do receptor AT₁, 1nmol/100nL), angiotensina 1-7 (0,05nmol/100nL), A-779 (antagonista do receptor Mas, 0,1nmol/100nL) ou veículo (NaCl 0,9%, 100nL). Cinco minutos após o tratamento farmacológico do AMe, os animais foram submetidos a uma sessão de 60 minutos (10^a sessão ou sessão aguda) de estresse de restrição. Imediatamente após o término da sessão de estresse (Korte & De Boer, 2003), cada animal foi colocado individualmente no LCE por 5 minutos para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade. Animais *naive* (controle não-estressado) foram avaliados no LCE sem passarem pela sessão de estresse de restrição. A **Figura 4** ilustra o protocolo experimental completo.

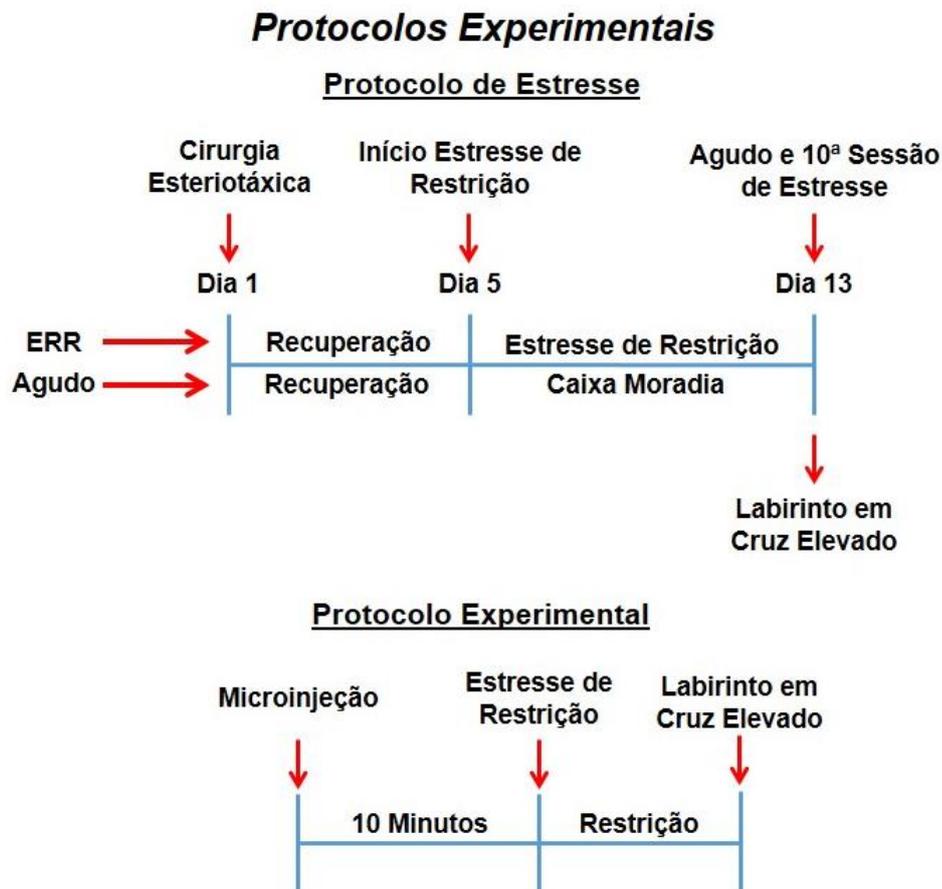


Figura 4: Protocolos experimentais: Efeito do tratamento na AMe na resposta comportamental ansiogênica ao estresse de restrição agudo e repetido (ver texto para detalhes).

4.5. Estudo do efeito da exposição repetida ao estresse de restrição sobre os níveis proteicos dos receptores AT₁ e Mas

Este protocolo teve o objetivo de investigar o efeito da exposição repetida ao estresse de restrição sobre a expressão dos receptores AT₁ e Mas no AMe. Para tanto, os animais foram submetidos a sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição por 10 dias consecutivos. Vinte quatro horas após a última sessão de estresse, os animais foram sacrificados por decapitação e os encéfalos foram removidos e estocados em freezer -80°C para futuro processamento. Animais controle foram mantidos no biotério sem serem perturbados, exceto no período de limpeza das caixas, pelo mesmo período que os animais submetidos às sessões de estresse por restrição, e foram decapitados juntamente com os animais estressados. O AMe de todos os animais foi coletado por microdissecção para quantificação dos níveis proteicos dos receptores AT₁ e Mas (*para detalhes, ver seção 3.12.*).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização do papel dos receptores AT₁, AT₂ e Mas no AMe no controle das respostas cardíacas do barorreflexo

A **Figura 5** mostra representações diagramáticas baseadas no atlas de Paxinos & Watson, (1997) indicando os sítios de injeção de todos os animais utilizados nesse protocolo. A **Figura 5** também mostra fotomicrografia de um corte histológico coronal indicando os sítios de microinjeção bilateral no AMe de um animal representativo.

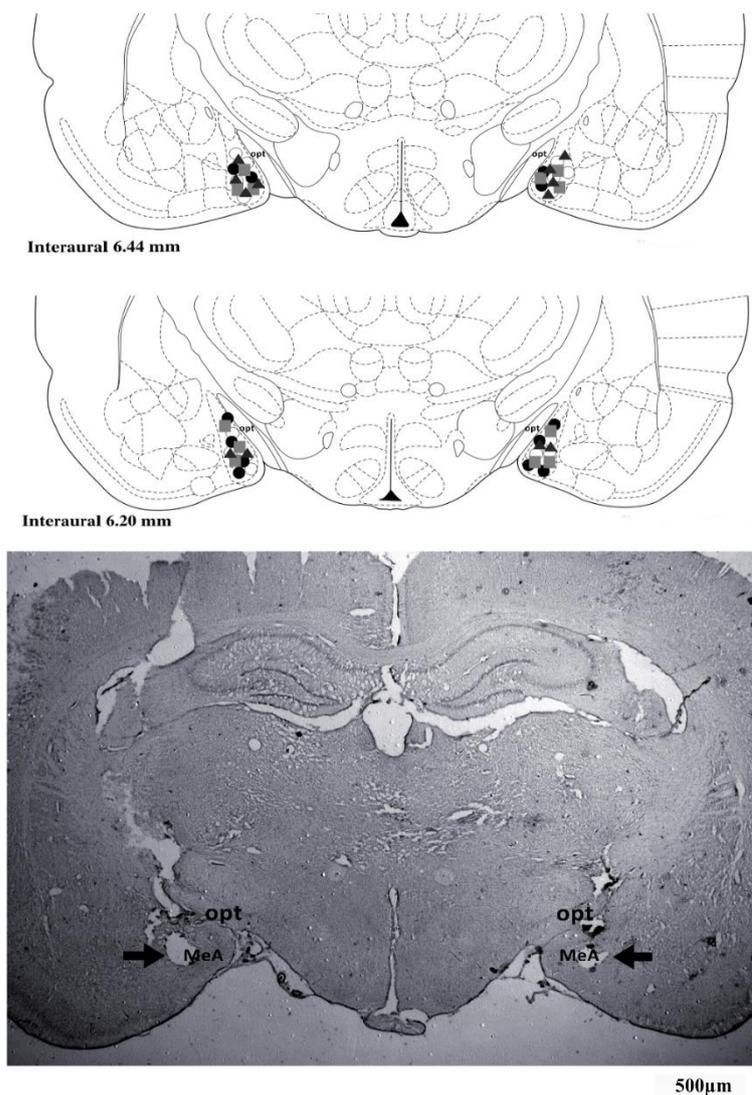


Figura 5: (**Superior**) representação diagramática baseada no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no núcleo medial da amígdala (AMe). Os símbolos indicam os sítios de microinjeção de salina (círculos brancos), losantana (círculos pretos), A-779 (quadrados cinzas) e PD123319 (triângulos pretos). (**Inferior**) Fotomicrografia de um corte histológico coronal ilustrando os sítios de injeção bilateral no AMe de um animal representativo. As setas indicam o sítio de microinjeção na AMe. AMe – amígdala medial; opt – trato ótico.

5.1.1. Efeito do tratamento farmacológico do AMe com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos nos parâmetros basais da pressão arterial e frequência cardíaca

A microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor AT₁ losartana (1nmol / 100nL, n = 6), do antagonista seletivo do receptor Mas A-779 (0,1nmol / 100nL, n = 6) ou do antagonista seletivo do receptor AT₂ PD123319 (5nmol / 100nL, n = 6) no AMe não afetou os parâmetros basais de PAM e FC, quando comparados com animais tratados localmente com veículo (salina, 100nL, n = 7) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Valores basais da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos que receberam microinjeção bilateral no núcleo medial da amígdala (AMe) do antagonista seletivo do receptor AT₁ losartana, do antagonista seletivo do receptor AT₂ PD123319, do antagonista seletivo do receptor Mas A-779 ou veículo.

Tratamento	FC	PAM	n
<i>Veículo</i>	413±20	112±3	7
<i>Losartana</i>	382±28	107±4	6
<i>PD123319</i>	392±22	108±2	6
<i>A-779</i>	409±14	108±2	6
	<i>F=0.48</i>	<i>F=0.67</i>	
	<i>P>0.05</i>	<i>P>0.05</i>	

Valores são a média ± EPM, ANOVA monofatorial.

5.1.2. Efeitos do tratamento farmacológico no AMe com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos na função barorreflexa

Abordagem Farmacológica - A análise não-linear da função barorreflexa (curvas sigmóides) indicou efeitos dos tratamentos farmacológicos no AMe nos parâmetros P₂ (i.e., platô superior) (F_(3,21) = 3,55, P < 0,03), ΔP (i.e., variação entre P₁ e P₂) (F_(3,21) = 3,50, P < 0,03) e ganho (F_(3,21) = 6,90, P < 0,002) das curvas barorreflexas. No entanto, a análise dos parâmetros P₁ (i.e., platô inferior) (F_(3,21) = 0,89, P > 0,05) e PA₅₀ (F_(3,21) = 2,27, P > 0,05) não indicou efeito dos tratamentos no AMe (**Figura 6A**). A análise *post hoc* revelou que a microinjeção de A-779 no AMe diminuiu o ganho (P < 0,003), enquanto o PD123319 aumentou o parâmetro P₂ (P < 0,05) (**Figura 6A**).

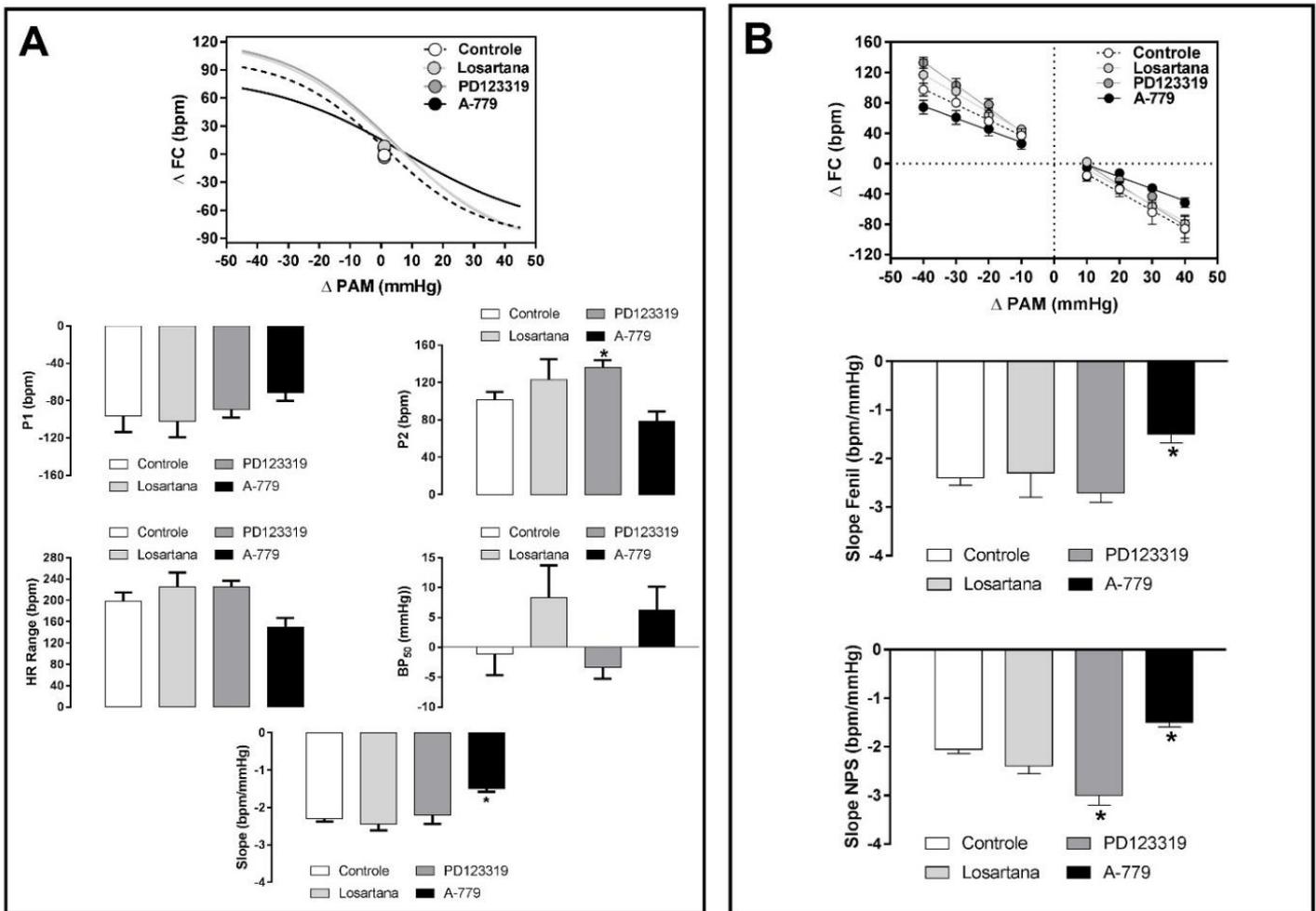


Figura 6: Atividade barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica em animais que receberam microinjeção bilateral no núcleo medial amigdaloide (AMe) do antagonista seletivo do receptor AT₁ losartana (1nmol / 100nL), o antagonista seletivo do receptor MAS A-779 (0,1nmol / 100 nL), o antagonista seletivo do receptor AT₂ PD123319 (5 nmol / 100 nL) ou veículo (solução salina, 100 nL). **(A)** Análise de regressão não linear (curva sigmoide) da função barorreflexa correlacionando as alterações da PAM (ΔPAM) causadas pela infusão intravenosa de fenilefrina (agente pressor) e nitroprussiato de sódio (NPS, agente depressor) e as respostas reflexas da FC (ΔFC). Os símbolos nas curvas sigmóides indicam a BP₅₀. Na parte inferior são apresentados os parâmetros derivados da análise de regressão não linear para avaliação da função barorreflexa. As barras representam a média \pm SEM. * P < 0,05 vs grupo de veículo, ANOVA monofatorial seguido por teste post hoc de Bonferroni. **(B)** Análise de regressão linear da função barorreflexa correlacionando as ΔPAM com as ΔFC causadas pela infusão venosa dos agentes vasoativos. Na parte inferior é apresentada a inclinação (ou seja, ganho) das linhas de regressão. Os círculos nas curvas e barras representam a média \pm EPM. * P < 0,05 vs grupo de veículo, ANOVA monofatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

Os dados obtidos utilizando a abordagem farmacológica também foram avaliados por meio de análise de regressão linear para avaliação individual das respostas reflexas durante os efeitos pressor e depressor. A análise da inclinação das linhas de regressão para a bradicardia causada pelo aumento da pressão arterial evocado pela infusão intravenosa de fenilefrina indicou efeito dos tratamentos farmacológicos ($F_{(3,21)} = 3,14, P < 0,04$) (**Figura 6B**). A análise *post-hoc* revelou que a microinjeção de A-779 no AMe diminuiu o ganho da bradicardia reflexa ($P < 0,003$) (**Figura 6B**). A análise da inclinação das linhas de regressão para a taquicardia causada pela diminuição da pressão arterial evocada pela infusão intravenosa de NPS indicou efeito dos tratamentos ($F_{(3,21)} = 20,37, P < 0,0001$) (**Figura 6B**). A análise *post-hoc* revelou que o PD123319 no AMe aumentou o ganho da taquicardia reflexa ($P < 0,0002$), enquanto o tratamento do AMe com A-779 diminuiu essa resposta barorreflexa ($P < 0,02$) (**Figura 6B**).

Método de análise da sequência - A análise da atividade barorreflexa utilizando o método de de sequência indicou efeito dos tratamentos farmacológicos no AMe no índice de efetividade do barorreflexo (IEB) ($F_{(3,21)} = 7,90, P < 0,001$) e sequências up ($F_{(3,21)} = 4,22, P < 0,01$), mas sem afetar as sequências down ($F_{(3,21)} = 0,73, P > 0,05$) e a média de todas as seqüências (i.e., média das sequências up e down) ($F_{(3,21)} = 2,15, P > 0,05$) (**Figura 7**). A análise *post-hoc* revelou que a microinjeção bilateral de PD123319 no AMe aumentou o IEB ($P < 0,01$), enquanto o A-779 diminuiu esse parâmetro ($P < 0,05$) (**Figura 7A**).

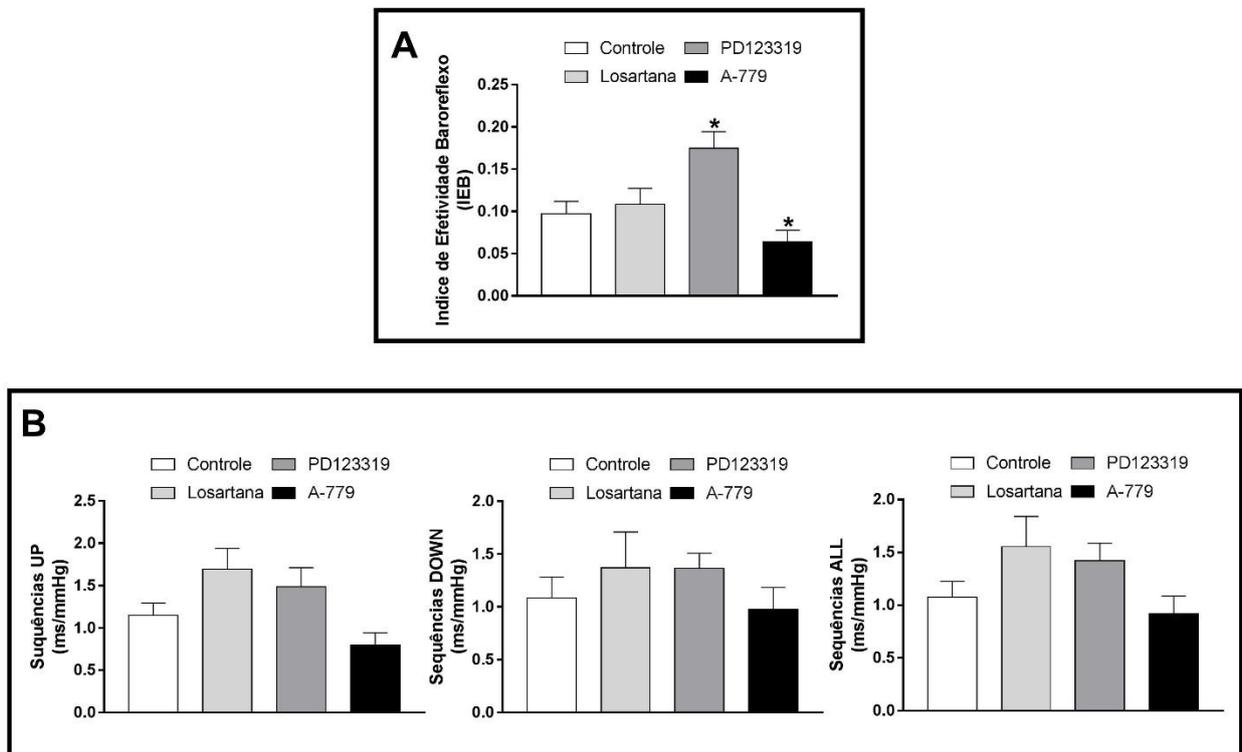


Figura 7: Atividade barorreflexa avaliada pela método de sequência em animais que receberam microinjeção bilateral no núcleo medial da amígdala (AMe) do antagonista seletivo do receptor AT_1 losartana (1nmol / 100nL), antagonista seletivo do receptor Mas A-779 (0,1nmol / 100 nL), antagonista seletivo do receptor AT_2 PD123319 (5 nmol / 100 nL) ou veículo (solução salina, 100 nL). **(A)** Índice de efetividade do barorreflexo (IEB). As barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs grupo de veículo, ANOVA monofatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. **(B)** Barorreflexo espontâneo (ou seja, atividade barorreflexa durante flutuações espontâneas da pressão arterial sem manipulação farmacológica com drogas vasoativas para induzir alterações na pressão arterial) durante aumentos (sequência up, gráfico à esquerda) e decréscimos (sequência down, gráfico do meio) da PAS, assim como a média de todas as sequências (média das sequencias up e down, gráfico à direita). As barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs grupo de controle, ANOVA monofatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

5.2. Estudo do envolvimento dos receptores AT₁, AT₂ e Mas no AMe nas alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse de restrição repetido (ERR)

A **Figura 8** mostra representações diagramáticas baseadas no atlas de Paxinos & Watson, (1997) indicando os sítios de microinjeção no AMe de todos os animais utilizados nesse protocolo. A **Figura 8** também mostra fotomicrografia de um corte histológico coronal indicando os sítios de microinjeção bilateral no AMe de um animal representativo.

5.2.1. Efeito do tratamento farmacológico no AMe com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos nos parâmetros basais da pressão arterial e frequência cardíaca em animais controle e submetidos ao ERR

A análise dos parâmetros basais de PAM de ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de ERR e controle tratados no AMe com os antagonistas dos receptores angiotensinérgicos indicou efeito do estresse ($F_{(1,46)} = 14,44$; $P < 0,05$), porém sem influência do tratamento ($F_{(3,46)} = 1,61$; $P = 0,19$) ou interação entre estresse e tratamento ($F_{(3,46)} = 1,20$; $P = 0,32$) (**Tabela 2**). A análise dos parâmetros basais de FC não indicou efeito do tratamento ($F_{(3,46)} = 0,91$; $P = 0,44$) e do estresse ($F_{(1,46)} = 0,50$; $P = 0,48$), nem interação entre tratamento e estresse ($F_{(3,46)} = 0,61$; $P = 0,61$) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos controle e submetidos ao ERR e que receberam microinjeção bilateral no núcleo medial da amígdala (AMe) do antagonista seletivo do receptor AT₁ losartana, do antagonista seletivo do receptor AT₂ PD123319, do antagonista seletivo do receptor Mas A-779 ou veículo.

Não estressados					Estressados			
	Veículo	Losartana	PD123319	A-779	Veículo	Losartana	PD123319	A-779
FC	408±18	381±24	392±19	398±16	386±17	387±18	361±12	409±17
n	8	7	7	7	6	6	6	7
Interação: F_(3,46) = 0,61; P = 0,61 Estresse: F_(1,46) = 0,50; P = 0,48 Tratamento: F_(3,46) = 0,91; P = 0,44								
PA	111±3	106±3	106±2	110±2	116±3 [#]	110±2 [#]	121±5 [#]	118±3 [#]
n	8	7	7	7	6	6	6	7
Interação: F_(3,46) = 1,20; P = 0,32 Estresse: F_(1,46) = 14,44; P < 0,05 Tratamento: F_(3,46) = 1,61; P = 0,19								

Valores são média ± EPM, ANOVA bifatorial. # P<0.05, indicando efeito principal do fator estresse.

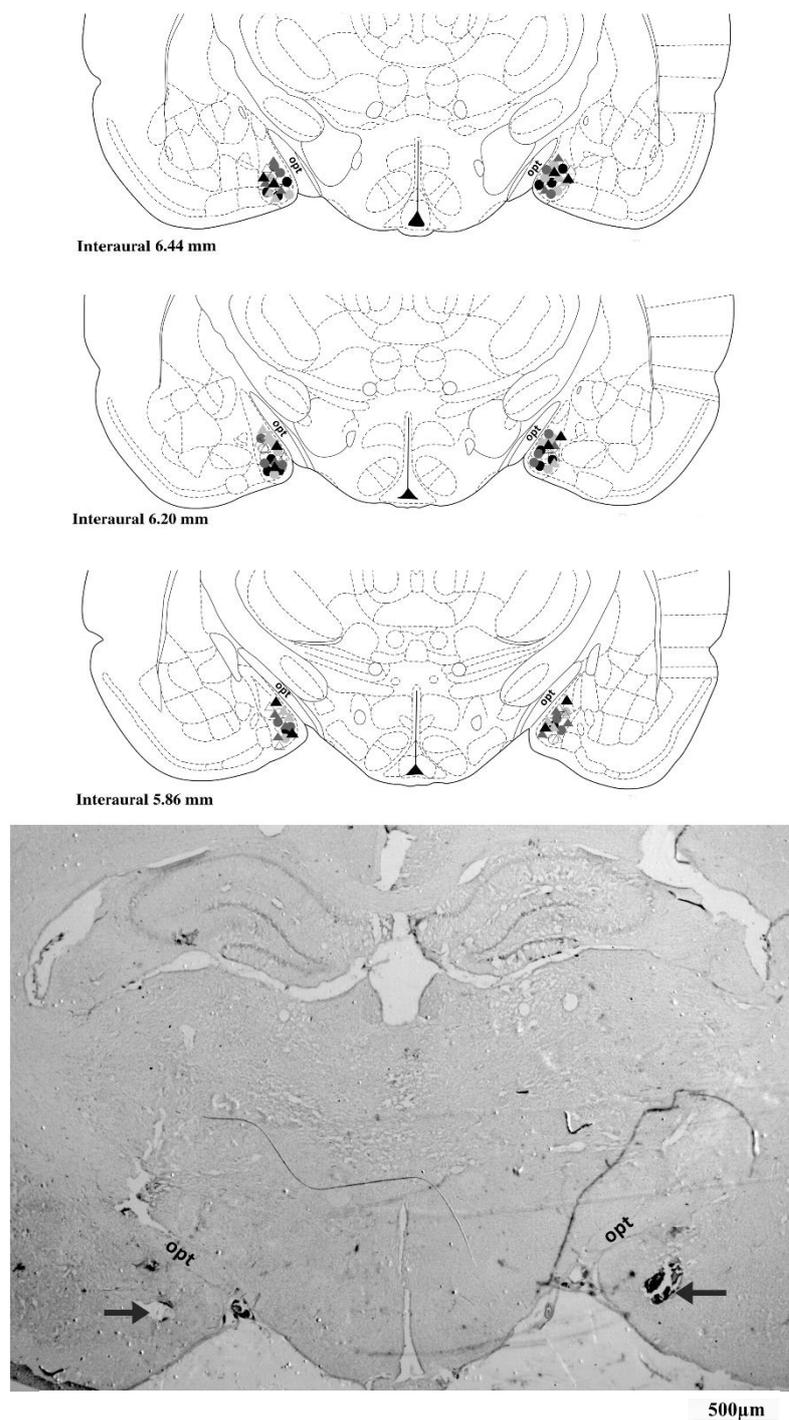


Figura 8: (Superior) Representação diagramática baseada no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no núcleo medial da amígdala (AMe) (três painéis superiores). Os símbolos indicam os sítios de microinjeção de animais não estressados salina (círculos brancos), losantana (círculos cinza claro), PD123319 (círculos cinza escuro), A-779 (círculos pretos), animais submetidos aos estresse por restrição repetido (ERR) salina (triângulos brancos), losantana (triângulos cinza claro), PD123319 (triângulos cinza escuro) e A-779 (triângulos pretos). **(Inferior)** Fotomicrografia de um corte histológico coronal mostrando os sítios de injeção bilateral no AMe de um animal representativo. As setas indicam o sítio de microinjeção no AMe. opt – trato óptico.

5.2.2. Efeitos do tratamento farmacológico do AMe com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos na função barorreflexa de animais controle e submetidos ao ERR

Abordagem Farmacológica - A análise não-linear da função barorreflexa dos parâmetros P_1 , P_2 e PA_{50} indicou efeito do estresse (P_1 : $F_{(1,45)} = 4,36$, $P < 0,05$; P_2 : $F_{(1,45)} = 10,77$, $P < 0,002$; BP_{50} : $F_{(1,44)} = 18,78$, $P < 0,0001$), porém sem efeito dos tratamentos farmacológicos no AMe (P_1 : $F_{(3,45)} = 1,53$, $P > 0,05$; P_2 : $F_{(3,45)} = 2,60$, $P > 0,05$; BP_{50} : $F_{(3,44)} = 0,45$, $P > 0,05$) e interação entre os parâmetros estresse e tratamento (P_1 : $F_{(3,45)} = 0,27$, $P > 0,05$; P_2 : $F_{(3,45)} = 0,27$, $P > 0,05$; BP_{50} : $F_{(3,44)} = 1,39$, $P > 0,05$) (**Figura 9**). A análise do parâmetro ganho indicou efeito do tratamento ($F_{(3,45)} = 7,32$, $P < 0,001$), mas sem efeito do estresse ($F_{(1,45)} = 0,18$, $P > 0,05$) ou interação entre os parâmetros estresse e tratamento ($F_{(3,45)} = 0,07$, $P > 0,05$) (**Figura 9**). A análise do ΔP não indicou efeito do estresse ($F_{(1,45)} = 0,01$, $P > 0,05$) e do tratamento ($F_{(3,45)} = 2,59$, $P > 0,05$), nem interação entre os parâmetros tratamento e estresse ($F_{(3,45)} = 1,72$, $P > 0,05$) (**Figura 9**). A análise *post-hoc* revelou diferenças no parâmetro PA_{50} ($P < 0,01$) entre os grupos não-estressado A-779 e estressado A-779 (**Figura 9**).

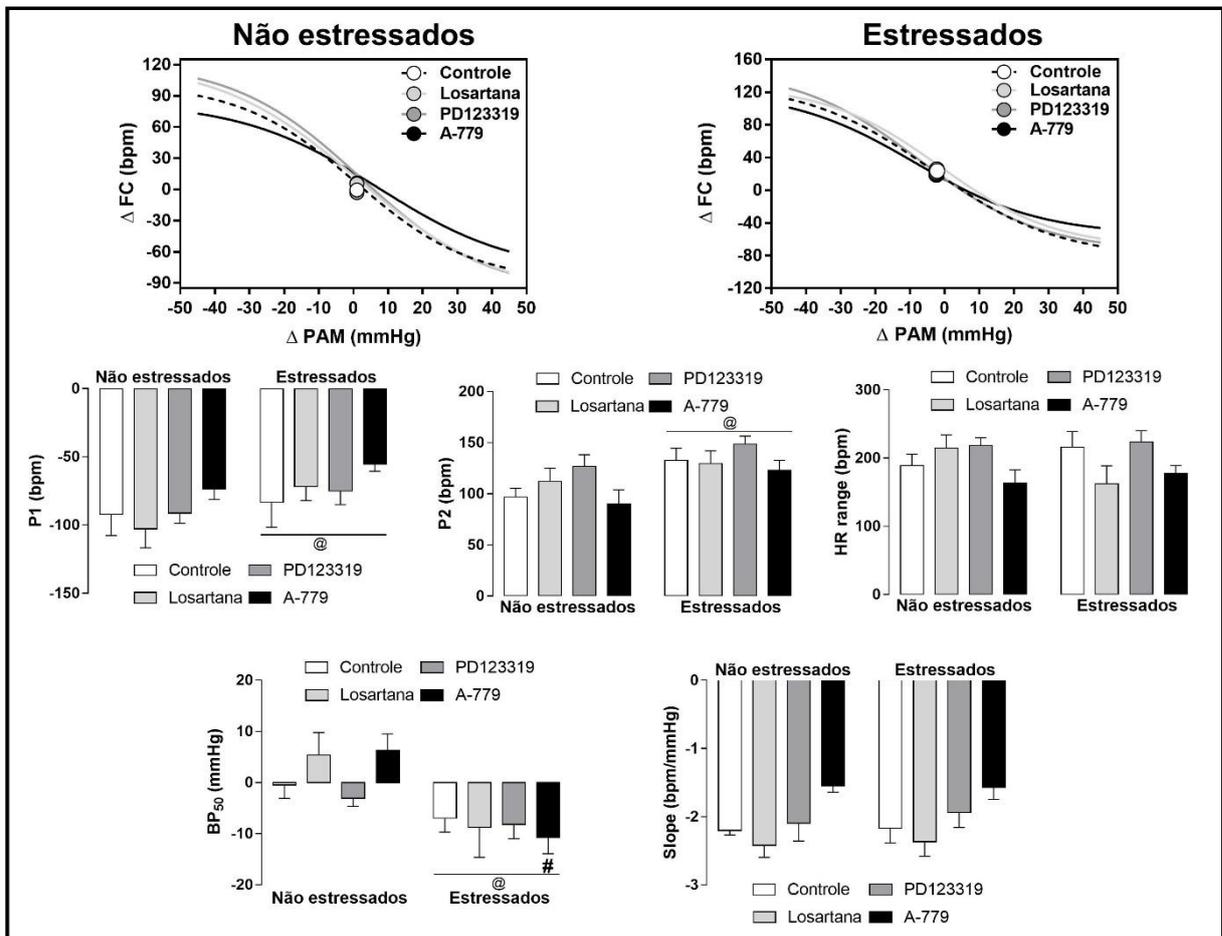


Figura 9: Atividade barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica clássica em animais que receberam microinjeção bilateral no núcleo medial amigdaloide (AMe) do antagonista seletivo do receptor AT₁ losartana (1nmol / 100nL), o antagonista seletivo do receptor Mas A-779 (0,1nmol / 100 nL), o antagonista seletivo do receptor AT₂ PD123319 (5 nmol / 100 nL) ou veículo (solução salina, 100 nL) em animais não-estressados e submetidos ao estresse por restrição repetido (ERR) (estressados). **(Superior)** Análise de regressão não linear (curva sigmoide) da função barorreflexa correlacionando as alterações da PAM (ΔPAM) causadas pela infusão intravenosa de fenilefrina (agente pressor) e nitroprussiato de sódio (NPS, agente depressor) e as respostas reflexas da FC (ΔFC). Os símbolos nas curvas sigmoides indicam a BP₅₀. **(Inferior)** Parâmetros derivados da análise de regressão não linear para avaliação da função barorreflexa. As barras representam a média \pm SEM. * P < 0,05 vs grupo veículo, # P < 0,05 vs grupo respectivo grupo não estressado, @ P < 0,05 indicando efeito principal do fator estresse, ANOVA bifatorial seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni.

Os dados obtidos utilizando a abordagem farmacológica também foram avaliados por meio de análise de regressão linear para avaliação individual das respostas reflexas durante os efeitos pressor e depressor. A análise das linhas de regressão para a bradicardia causada pelo aumento da pressão arterial evocado por infusão intravenosa de fenilefrina não indicou efeito do estresse ($F_{(1,45)} = 3,67, P > 0,05$) e do tratamento farmacológico ($F_{(3,45)} = 2,13, P > 0,05$), nem interação entre os parâmetros estresse e tratamento ($F_{(3,45)} = 1,04, P > 0,05$) (**Figura 10**). No entanto, a análise da inclinação das linhas de regressão para a taquicardia causada pela diminuição da pressão arterial evocada por infusão intravenosa de NPS indicou efeito do estresse ($F_{(1,45)} = 91,65, P < 0,0001$) e do tratamento farmacológico ($F_{(3,45)} = 26,89, P < 0,0001$), porém sem interação entre os fatores estresse e tratamento ($F_{(3,45)} = 2,14, P > 0,15$) (**Figura 10**). A análise *post hoc* revelou que a microinjeção de PD123319 no AMe aumentou o ganho da taquicardia reflexa nos animais não-estressados ($P < 0,01$) e estressados ($P < 0,03$) (**Figura 10**). Além disso, o grupo tratado com veículo e sujeito ao ERR apresentou aumento da resposta reflexa de taquicardia em comparação ao respectivo grupo não-estressado ($P < 0,001$). Animais submetidos ao ERR que receberam PD123319 ($P < 0,02$) e A-779 ($P < 0,0007$) no AMe apresentaram aumento da resposta de taquicardia reflexa em comparação com seus respectivos grupos não-estressados (**Figura 10**).

Método de análise da sequência - A análise da atividade barorreflexa utilizando o método de sequência indicou efeito do estresse ($F_{(1,46)} = 8,18, P < 0,01$) e do tratamento farmacológico ($F_{(3,46)} = 2,94, P < 0,05$), porém sem interação entre os parâmetros estresse e tratamento ($F_{(3,46)} = 0,46, P > 0,05$) para as sequências *up* (**Figura 11B**). A análise das sequências *down* e da média de todas as sequências indicou efeito do estresse (*down*: $F_{(1,46)} = 11,93, P < 0,01$; média: $F_{(1,44)} = 8,43, P < 0,01$), mas sem efeito do tratamento farmacológico (*down*: $F_{(3,46)} = 1,24, P > 0,05$; média: $F_{(3,44)} = 1,46, P > 0,05$) e interação entre tratamento e estresse (*down*: $F_{(3,46)} = 0,15, P > 0,05$; média: $F_{(3,44)} = 0,26, P > 0,05$) (**Figura 11B**).

A análise do índice de efetividade do barorreflexo (IEB) indicou efeito do tratamento farmacológico do AMe ($F_{(3,47)} = 15,1, P < 0,0001$), porém sem efeito do estresse ($F_{(1,47)} = 2,73, P > 0,05$) e interação entre tratamento e estresse ($F_{(3,47)} = 1,37, P > 0,05$) (**Figura 11A**). A análise *post hoc* revelou que a microinjeção de PD123319 no AMe dos animais não-estressados aumentou o IEB ($P < 0,004$) (**Figura 11A**).

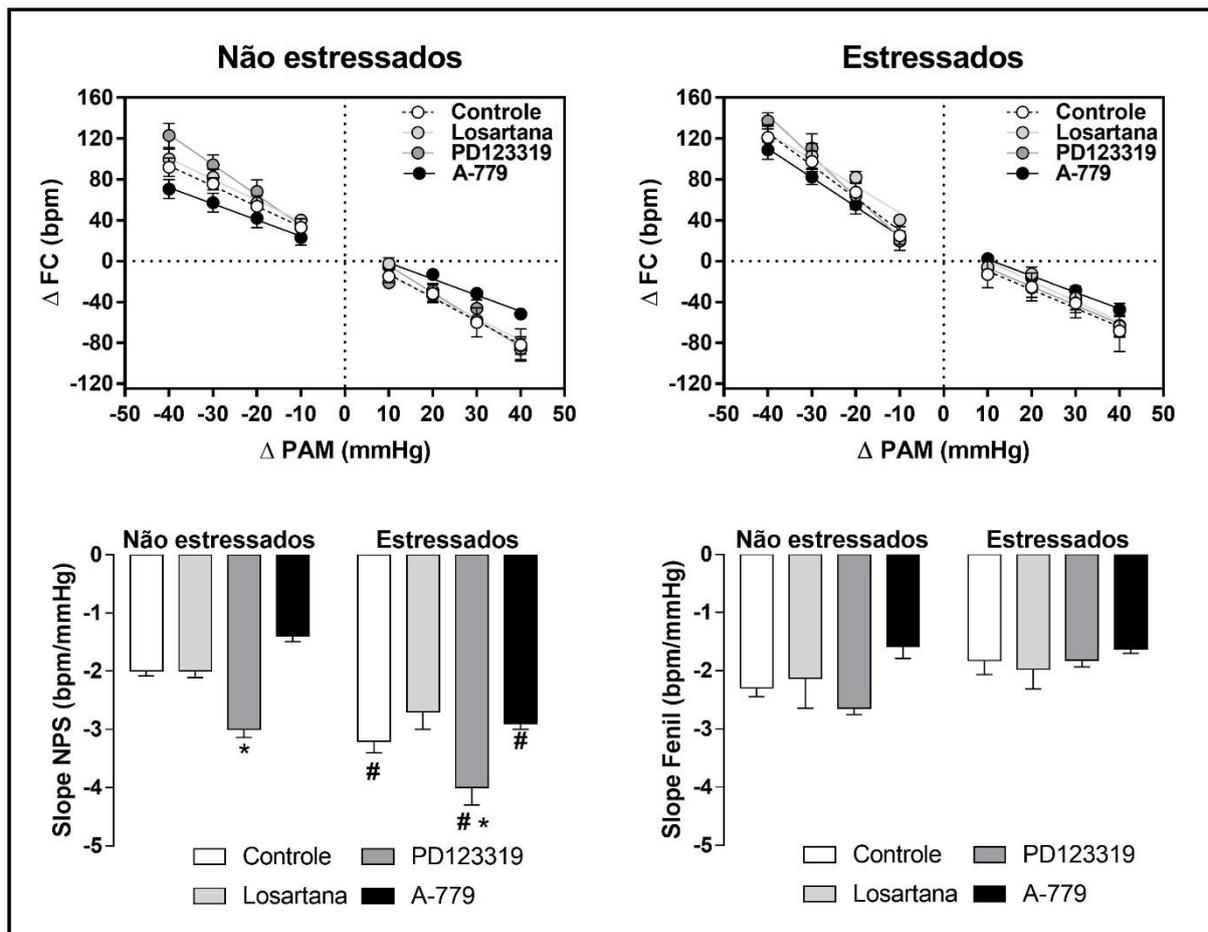


Figura 10: Análise de regressão linear da função barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica em animais não-estressados e submetidos ao estresse por restrição repetido (ERR) (estressados) que receberam microinjeção bilateral no núcleo medial amigdaloide (AMe) do antagonista seletivo do receptor AT_1 losartana (1nmol / 100nL), do antagonista seletivo do receptor Mas A-779 (0,1nmol / 100 nL), do antagonista seletivo do receptor AT_2 PD123319 (5 nmol / 100 nL) ou de veículo (solução salina, 100 nL). (**Superior**) Análise de regressão linear correlacionando o ΔPAM com ΔFC causado pela infusão venosa dos agentes vasoativos. (**Inferior**) Inclinação (ou seja, ganho) das linhas de regressão para a diminuição da FC causada pelo aumento da PAM (painel inferior direito) e o aumento da FC evocado pela diminuição da PAM (painel inferior esquerdo). Os círculos nas curvas e barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs grupo de veículo, # $P < 0,05$ vs respectivo grupo não-estressado, ANOVA bifatorial seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni.

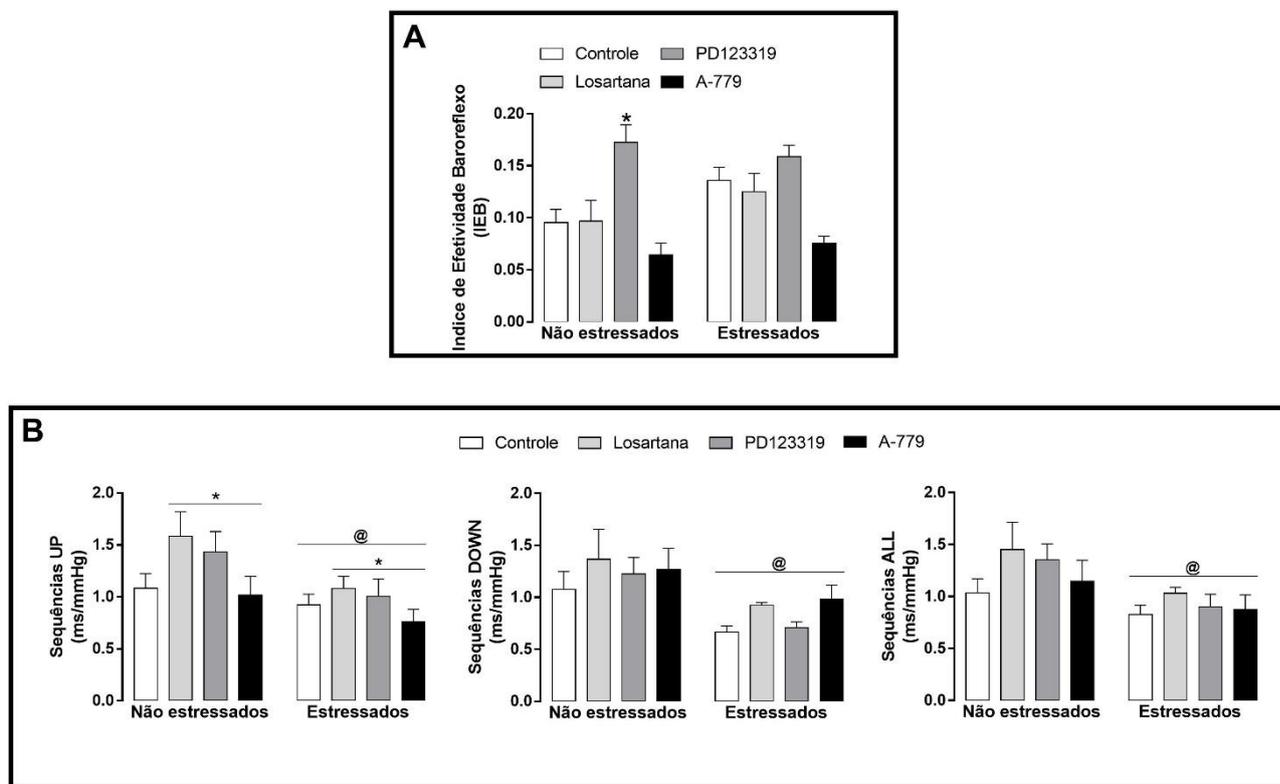


Figura 11: Atividade barorreflexa avaliada pela método de seqüência em animais não-estressado ou submetidos ao estresse por restrição repetido (ERR) (estressados) que receberam microinjeção bilateral no núcleo medial da amígdala (AMe) do antagonista seletivo do receptor AT_1 losartana (1nmol / 100nL), do antagonista seletivo do receptor Mas A-779 (0,1nmol / 100 nL), do antagonista seletivo do receptor AT_2 PD123319 (5 nmol / 100 nL) ou de veículo (solução salina, 100 nL). **(A)** Índice de efetividade do barorreflexo (IEB). As barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs grupo veículo, ANOVA bifatorial seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni. **(B)** Barorreflexo espontâneo (ou seja, atividade barorreflexa durante flutuações espontâneas da pressão arterial sem manipulação farmacológica com drogas vasoativas para induzir alterações na pressão arterial) durante aumentos (sequência *up*, gráfico à esquerda) e diminuição (sequência *down*, gráfico do meio) da PAS, assim como a média de todas as sequências (média das sequencias *up* e *down*, gráfico à direita). As barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ 05 indicando efeito principal do fator tratamento, @ $P < 0,05$ indicando efeito principal do fator estresse. ANOVA bifatorial seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni.

5.3. Estudo do envolvimento das neurotransmissões angiotensina II/receptores AT₁ e AT₂ e angiotensina 1-7/receptor Mas no AMe nas respostas cardiovasculares durante a 1^o (estresse agudo) e a 10^o sessão (estresse repetido) de estresse de restrição

A **Figura 12** mostra representações diagramáticas baseadas no atlas de Paxinos & Watson, (1997) indicando os sítios de microinjeção no AMe de todos os animais utilizados nesse protocolo. A **Figura 12** também mostra fotomicrografia de um corte histológico coronal indicando os sítios de microinjeção bilateral no AMe de um animal representativo.

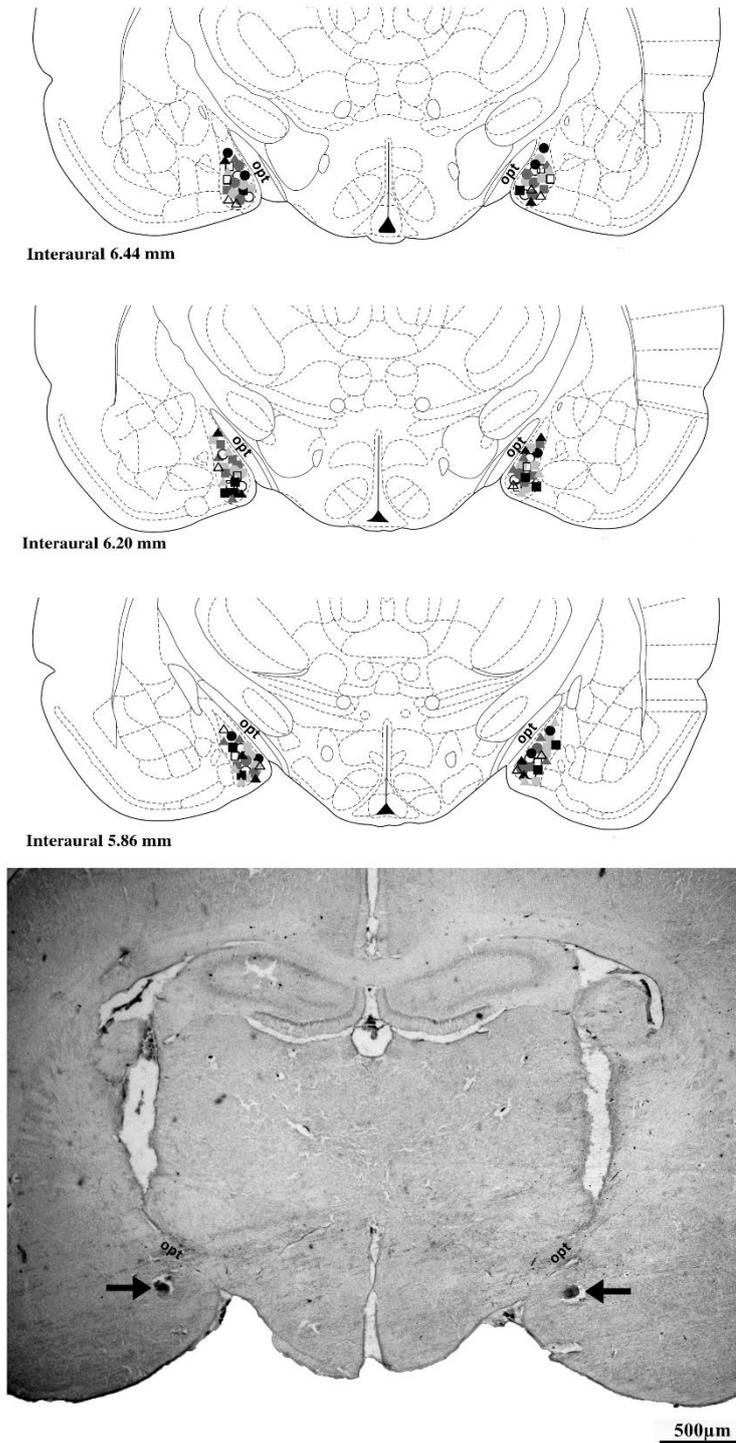


Figura 12: (Superior) Representação diagramática baseada no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no núcleo medial da amígdala (AMe) (três painéis superiores) de animais submetidos a uma sessão aguda de estresse ou avaliados na 10ª sessão de estresse por restrição (ERR). Os símbolos indicam os sítios de microinjeção de animais agudo veículo (círculos brancos), agudo Ang II (círculos cinza claro), agudo losartana (círculos cinza escuro), agudo PD123319 (círculos pretos), agudo Ang 1-7 (quadrados brancos), agudo A-779 (quadrados cinza claro), ERR veículo (triângulos brancos), ERR Ang II (triângulos cinza claro), ERR losartan (triângulos cinza escuro), ERR PD123319 (triângulos pretos), ERR Ang 1-7 (quadrados cinza escuro) e ERR A-779 (quadrados pretos). **(Inferior)** Fotomicrografia de um corte histológico coronal mostrando os sítios de injeção bilateral no AMe de um animal representativo. As setas indicam o sítio de microinjeção no AMe. opt – trato ótico.

A **Tabela 3** mostra os valores basais PAM, FC e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico do AMe com Ang II, losartana (antagonista seletivo do receptor AT₁), PD123319 (antagonista seletivo do receptor AT₂), Ang 1-7 e A-779 (antagonista seletivo do receptor Mas) em animais submetidos ao estresse agudo e ao ERR. A análise dos valores basais de PAM indicou efeito do estresse ($F_{(1, 67)} = 11,74$; $P < 0,05$), mas sem efeito do tratamento ($F_{(5, 67)} = 2,04$; $P > 0,05$) ou interação entre estresse e tratamento ($F_{(5, 67)} = 0,71$; $P > 0,05$). Em relação aos valores basais de FC, os resultados não indicaram efeito do estresse ($F_{(1, 67)} = 0,82$; $P > 0,05$), tratamento ($F_{(5, 67)} = 1,36$; $P > 0,05$) e interação entre estresse e tratamento ($F_{(5, 67)} = 1,31$; $P > 0,05$). A análise dos parâmetros basais de temperatura cutânea da cauda também não indicaram efeito do estresse ($F_{(1, 67)} = 0,97$; $P > 0,05$), tratamento ($F_{(5, 67)} = 1,82$; $P > 0,05$) ou mesmo interação entre estresse e tratamento ($F_{(5, 67)} = 0,57$; $P > 0,05$).

Tabela 3: Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (TCC) após o tratamento farmacológico do AME com angiotensina II (Ang II), losartana (antagonista seletivo do receptor AT₁), PD123319 (antagonista seletivo do receptor AT₂), angiotensina 1-7 (Ang 1-7) e A-779 (antagonista seletivo do receptor Mas) em animais submetidos ao estresse de restrição agudo (agudo) e estresse de restrição repetido (ERR).

Agudo							ERR					
	Veículo	Ang II	Losartana	PD123319	Ang 1-7	A-779	Veículo	Ang II	Losartana	PD123319	Ang 1-7	A-779
FC	358±11	354±14	356±10	379±6	369±5	381±6	371±10	366±9	376±10	355±9	379±9	381±9
n	7	7	7	6	7	7	6	6	6	6	7	7
<p style="text-align: center;">Interação: $F_{(5, 67)} = 1,31; P > 0,05$ Estresse: $F_{(1, 67)} = 0,82; P > 0,05$ Tratamento: $F_{(5, 67)} = 1,36; P > 0,05$</p>												
PAM	102±5	103±4	98±5	112±2	103±2	106±2	109±3	111±3	107±2	111±1	111±3	115±2
n	7	7	7	6	7	7	6 [#]	6 [#]	6 [#]	6 [#]	7 [#]	7 [#]
<p style="text-align: center;">Interação: $F_{(5, 67)} = 0,71; P > 0,05$ Estresse: $F_{(1, 67)} = 11,74; P < 0,05$ Tratamento: $F_{(5, 67)} = 2,04; P > 0,05$</p>												
TCC	29,8±0,4	29,5±0,4	28,9±0,6	29,3±0,5	29,3±0,4	29,9±0,3	30,5±0,6	29,4±0,8	28,7±0,3	28,3±0,1	28,7±0,6	29,1±0,8
n	7	7	7	6	7	7	6	6	6	6	7	7
<p style="text-align: center;">Interação: $F_{(5, 67)} = 0,57; P > 0,05$ Estresse: $F_{(1, 67)} = 0,97; P > 0,05$ Tratamento: $F_{(5, 67)} = 1,82; P > 0,05$</p>												

Valores em média ± EPM, ANOVA bifatorial. # P<0.05, indicando efeito principal do fator estresse.

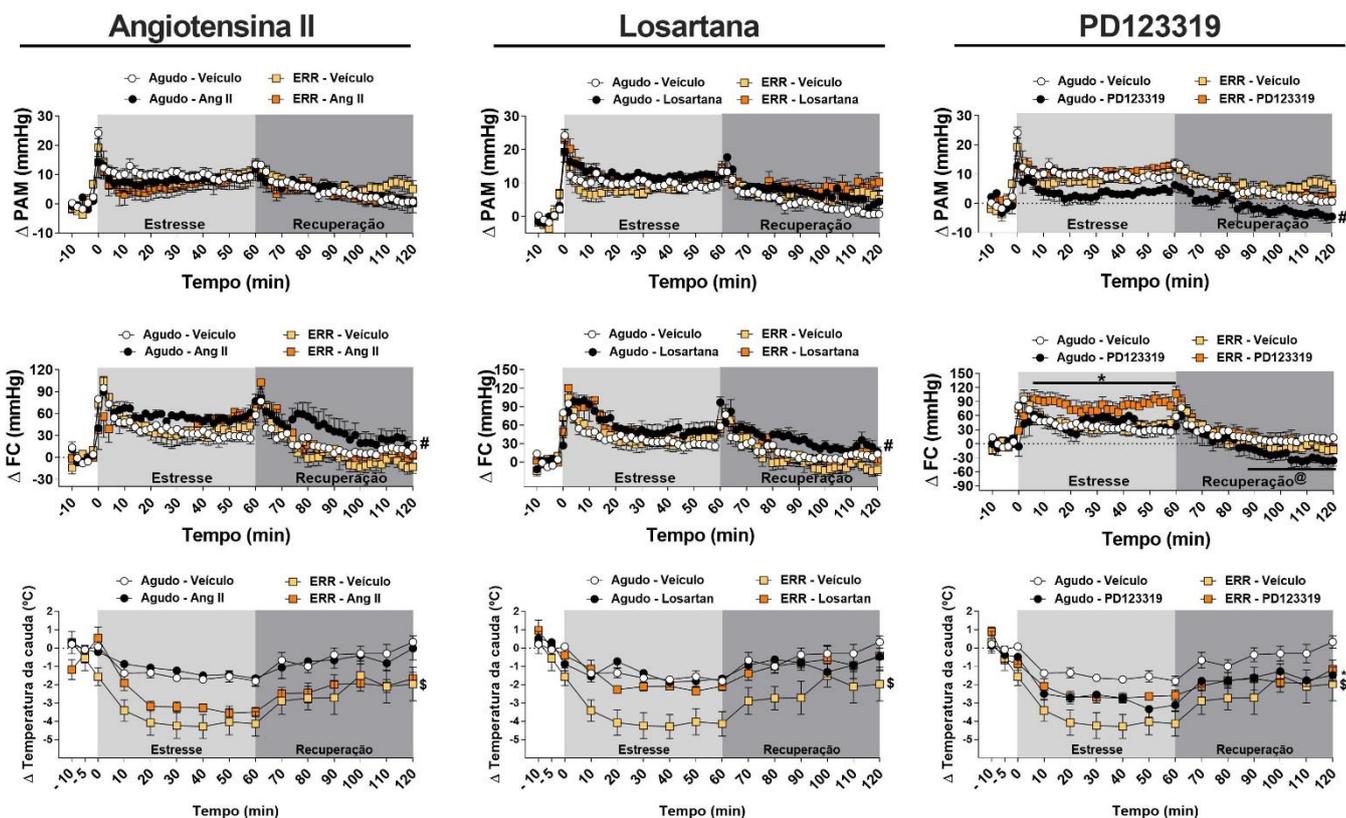


Figura 13: Avaliação do envolvimento da neurotransmissão da angiotensina II no AMe nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição. Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (TCC) durante uma sessão aguda ou a 10ª sessão (ERR) de 60 minutos de estresse de restrição e 60 minutos de recuperação em animais tratados com angiotensina II (Ang II, 0,05nmol/100nL), losartana (antagonista seletivo do receptor AT_1 , 1nmol/100nL), PD123319 (antagonista seletivo do receptor AT_2 , 5nmol/100nL) ou veículo (salina, 100nL) no AMe. # $P < 0,05$ agudo droga vs agudo veículo indicando efeito durante todo o período de estresse e recuperação, * $P < 0,05$ ERR droga vs ERR veículo, @ $P < 0,05$ agudo droga vs agudo veículo, \$ $P < 0,05$ agudo veículo vs ERR veículo. ANOVA trifatorial acompanhado do teste *post-hoc* de Bonferroni.

Angiotensina II - A análise das curvas temporais de variação da FC nos animais tratados com Ang II (0,05nmol/100nL) no AMe não indicou efeito do estresse ($F_{(1,23)} = 2,03$; $P > 0,05$), do tratamento ($F_{(1,23)} = 3,02$; $P > 0,05$) ou interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,23)} = 1,05$; $P > 0,05$). No entanto, a análise indicou efeito do tempo ($F_{(65, 1495)} = 20,35$; $P < 0,05$), interação entre tempo e estresse ($F_{(65, 1495)} = 1,55$; $P < 0,05$) e interação entre tempo e tratamento ($F_{(65, 1495)} = 1,36$; $P < 0,05$). Entretanto, não houve interação entre tempo, estresse e tratamento ($F_{(65, 1495)} = 0,50$; $P > 0,05$).

A análise das curvas temporais de variação da PAM não indicou efeito do estresse ($F_{(1,23)} = 0,05$; $P > 0,05$), do tratamento ($F_{(1,23)} = 0,63$; $P > 0,05$) ou interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,23)} = 0,15$; $P > 0,05$). Entretanto, a análise indicou efeito do tempo ($F_{(65, 1495)} = 22,05$; $P < 0,05$) e interação entre tempo e estresse ($F_{(65, 1495)} = 1,46$; $P < 0,05$), mas sem

interação entre tempo e Ang II ($F_{(65, 1495)} = 1,19; P > 0,05$) e interação entre tempo, estresse e Ang II ($F_{(65, 1495)} = 0,73; P > 0,05$).

A análise das curvas temporais de variação da temperatura cutânea da cauda indicou efeito do estresse ($F_{(1,23)} = 19,13; P < 0,05$), mas sem efeito do tratamento ($F_{(1,23)} = 0,15; P > 0,05$) ou interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,23)} = 0,15; P > 0,05$). Além disso, a análise indicou efeito do tempo ($F_{(14, 322)} = 31,67; P < 0,05$), interação entre tempo e estresse ($F_{(14, 322)} = 3,60; P < 0,05$) e interação entre tempo e tratamento ($F_{(14, 322)} = 1,88; P < 0,05$). Entretanto, não houve interação entre tempo, estresse e tratamento ($F_{(14, 322)} = 1,59; P > 0,05$).

As análises de comparações do teste *post-hoc* revelou que o tratamento do AMe com Ang II causou uma facilitação da resposta de taquicardia, que permaneceu ao longo do período de recuperação, quando comparado ao grupo agudo veículo ($P < 0,05$) (**Figura 13**). Em relação à temperatura cutânea da cauda, os animais que foram submetidos ao ERR e receberam veículo tiveram uma redução maior da TCC em relação ao respectivo grupo agudo ($P < 0,05$) (**Figura 13**).

Losartana - A análise das curvas temporais de variação da FC nos animais tratados com losartana (antagonista seletivo do receptor AT₁, 1nmol/100nL) no AMe não indicou efeito do estresse ($F_{(1,23)} = 1,13; P > 0,05$) ou interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,23)} = 0,44; P > 0,05$), mas houve efeito do tratamento ($F_{(1,23)} = 4,84; P < 0,05$). Além disso, os resultados indicaram efeito do tempo ($F_{(65, 1495)} = 28,25; P < 0,05$), interação entre tempo e estresse ($F_{(65, 1495)} = 1,32; P < 0,05$) e interação entre tempo e tratamento ($F_{(65, 1495)} = 1,62; P < 0,05$). Entretanto, não houve interação entre tempo, estresse e losartana ($F_{(65, 1495)} = 0,88; P > 0,05$).

A análise das curvas temporais de variação da PAM não indicou efeito do estresse ($F_{(1,23)} = 0,03; P > 0,05$), do tratamento ($F_{(1,23)} = 2,43; P > 0,05$) ou interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,23)} = 0,01; P > 0,05$). Entretanto, a análise indicou efeito do tempo ($F_{(65, 1495)} = 28,88; P < 0,05$) e interação entre tempo e estresse ($F_{(65, 1495)} = 2,45; P < 0,05$), mas sem interação entre tempo e tratamento ($F_{(65, 1495)} = 1,18; P > 0,05$) interação entre tempo, estresse e tratametno ($F_{(65, 1495)} = 0,72; P > 0,05$).

A análise das curvas temporais de variação da temperatura cutânea da cauda indicou efeito do estresse ($F_{(1,23)} = 8,05; P < 0,05$) e interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,23)} = 5,32; P < 0,05$), mas sem efeito do tratamento ($F_{(1,23)} = 3,17; P > 0,05$). Além disso, a análise indicou efeito do tempo ($F_{(14, 322)} = 26,44; P < 0,05$) e interação entre tempo e estresse ($F_{(14, 322)} = 2,59;$

$P < 0,05$), porém sem interação entre tempo e tratamento ($F_{(14, 322)} = 1,12; P > 0,05$) e interação entre tempo, estresse e tratamento não houve efeito significativo ($F_{(14, 322)} = 0,84; P > 0,05$).

As análises de comparações do teste *post-hoc* revelou que o tratamento do AMe com losartana causou facilitação da resposta de taquicardia durante a sessão aguda de restrição, na qual permaneceu ao longo do período de recuperação, quando comparado ao grupo agudo veículo ($P < 0,05$) (**Figura 13**). Em relação à temperatura cutânea da cauda, os animais que foram submetidos ao ERR e receberam veículo no AMe tiveram uma redução maior da TCC, que permaneceu ao longo do período de recuperação, quando comparado ao grupo agudo veículo ($P < 0,05$) (**Figura 13**).

PD123319 - A análise das curvas temporais de variação da FC nos animais tratados com PD123319 (antagonista seletivo do receptor AT_2 , 5nmol/100nL) no AMe não indicou efeito do estresse ($F_{(1,22)} = 3,84; P > 0,05$) e do tratamento ($F_{(1,22)} = 0,02; P > 0,05$), mas houve interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,22)} = 5,06; P < 0,05$). Além disso, os resultados mostraram que houve efeito do tempo ($F_{(65, 1430)} = 23,14; P < 0,05$), interação entre tempo e estresse ($F_{(65, 1430)} = 1,53; P < 0,05$) e interação entre tempo e tratamento ($F_{(65, 1430)} = 2,70; P < 0,05$). Entretanto, a análise não indicou interação entre tempo, estresse e tratamento ($F_{(65, 1430)} = 1,09; P > 0,05$).

A análise das curvas temporais de variação da PAM indicou efeito do estresse ($F_{(1,22)} = 6,09; P < 0,05$) e interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,22)} = 4,87; P < 0,05$), mas sem efeito do tratamento ($F_{(1,22)} = 4,27; P > 0,05$). Além disso, os resultados indicaram efeito do tempo ($F_{(65, 1430)} = 30,44; P < 0,05$), interação entre tempo e estresse ($F_{(65, 1430)} = 1,94; P < 0,05$) e interação entre tempo e tratamento ($F_{(65, 1430)} = 1,89; P < 0,05$). Entretanto, não houve interação entre tempo, estresse e tratamento ($F_{(65, 1430)} = 1,90; P < 0,05$).

A análise das curvas temporais de variação da temperatura cutânea da cauda indicou efeito do estresse ($F_{(1,22)} = 5,50; P < 0,05$) e interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,22)} = 6,40; P < 0,05$), mas sem efeito do tratamento ($F_{(1,22)} = 0,36; P > 0,05$). Além disso, os resultados indicaram efeito do tempo ($F_{(14, 308)} = 41,30; P < 0,05$) e interação entre tempo e estresse ($F_{(14, 308)} = 1,82; P < 0,05$), porém sem interação entre tempo e tratamento ($F_{(14, 308)} = 0,90; P > 0,05$) e interação entre tempo, estresse e tratamento ($F_{(14, 308)} = 1,69; P > 0,05$).

As análises de comparações do teste *post-hoc* revelou que a microinjeção de PD123319 no AMe reduziu o aumento da PAM durante a sessão aguda de estresse, quando comparado ao grupo agudo veículo, e esse efeito permaneceu ao longo do período de recuperação ($P < 0,05$) (**Figura 13**). Em relação à FC, a microinjeção de PD123319 no AMe

no grupo ERR facilitou a resposta de taquicardia, quando comparado ao grupo ERR veículo ($P < 0,05$) (**Figura 13**). Além disso, o grupo agudo tratado com PD123319 apresentou recuperação mais rápida das respostas de taquicardia durante o período de recuperação, quando comparado ao grupo agudo veículo ($P < 0,05$) (**Figura 13**). Em relação à temperatura cutânea da cauda, os animais que receberam PD123319 apresentaram uma redução maior da temperatura cutânea da cauda durante o período de estresse da sessão aguda, e esse efeito permaneceu ao longo do período de recuperação, quando comparado ao grupo agudo veículo ($P < 0,05$) (**Figura 13**). Além disso, os animais que foram submetidos ao ERR e receberam veículo no AMe tiveram uma redução maior da TCC quando comparado ao grupo agudo veículo ($P < 0,05$).

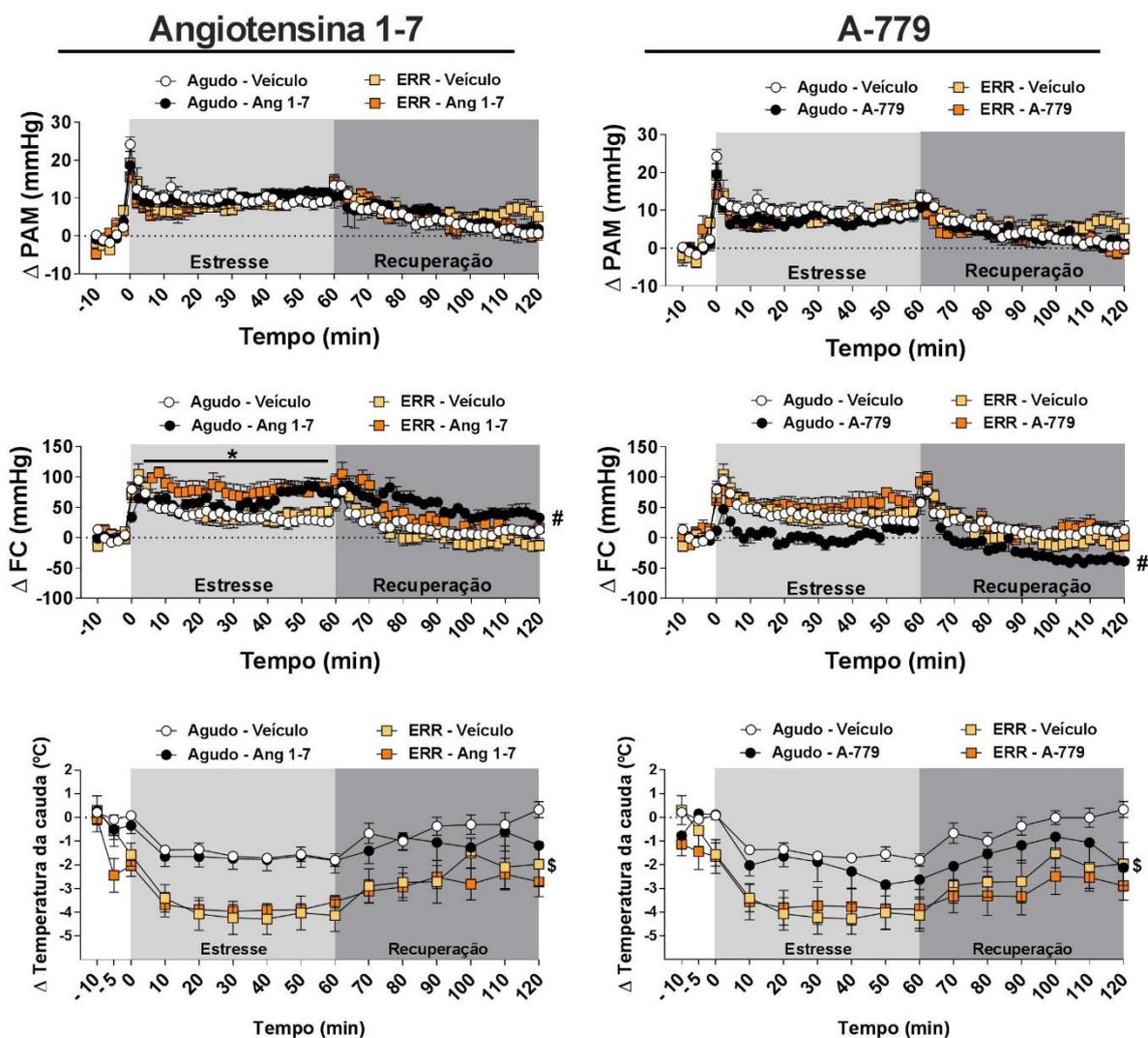


Figura 14: Avaliação do envolvimento da neurotransmissão da angiotensina 1-7 no AME nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição. Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (TCC) durante uma sessão aguda ou a 10ª sessão (ERR) de 60 minutos de estresse de restrição e 60 minutos de recuperação em animais tratados com angiotensina 1-7 (Ang 1-7, 0,05nmol/100nL), A-779 (antagonista do receptor Mas, 0,1nmol/100nL) ou veículo no AME. # $P < 0,05$ agudo droga vs agudo veículo indicando efeito durante todo o período de estresse e recuperação, * $P < 0,05$ RRS droga vs RRS veículo, \$ $P < 0,05$ agudo veículo vs ERR veículo. ANOVA trifatorial acompanhado do teste *post-hoc* de Bonferroni.

Angiotensina 1-7 - A análise das curvas temporais de variação da FC nos animais tratados com Ang 1-7 (0,05nmol/100nL) não indicou efeito do estresse ($F_{(1,24)} = 0,02$; $P > 0,05$) e interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,24)} = 0,04$; $P > 0,05$), porém indicou efeito do tratamento ($F_{(1,24)} = 12,84$; $P < 0,05$). Além disso, os resultados revelaram efeito do tempo ($F_{(65, 1560)} = 28,84$; $P < 0,05$), interação entre tempo e estresse ($F_{(65, 1560)} = 3,64$; $P < 0,05$), interação entre tempo e tratamento ($F_{(65, 1560)} = 3,30$; $P < 0,05$) e interação entre tempo, estresse e tratamento ($F_{(65, 1560)} = 1,54$; $P < 0,05$).

A análise das curvas temporais de variação da PAM não indicou efeito do estresse ($F_{(1,24)} = 0,01$; $P > 0,05$), do tratamento ($F_{(1,24)} = 0,01$; $P > 0,05$) ou interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,24)} = 0,09$; $P > 0,05$). Entretanto, os resultados indicaram efeito do tempo ($F_{(65, 1560)} = 32,36$; $P < 0,05$), interação entre tempo e estresse ($F_{(65, 1560)} = 2,06$; $P < 0,05$) e interação tempo e tratamento ($F_{(65, 1560)} = 1,45$; $P < 0,05$); porém sem interação entre tempo, estresse e tratamento ($F_{(65, 1560)} = 1,24$; $P > 0,05$).

A análise das curvas temporais de variação da temperatura cutânea da cauda indicou efeito do estresse ($F_{(1,24)} = 17,94$; $P < 0,05$), mas sem efeito do tratamento ($F_{(1,24)} = 1,20$; $P > 0,05$) e interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,24)} = 0,03$; $P > 0,05$). Além disso, os resultados indicaram efeito do tempo ($F_{(14, 336)} = 32,30$; $P < 0,05$), interação entre tempo e estresse ($F_{(14, 336)} = 3,08$; $P < 0,05$) e interação entre tempo e tratamento ($F_{(14, 336)} = 1,84$; $P < 0,05$); porém sem interação entre tempo, estresse e tratamento ($F_{(14, 336)} = 0,63$; $P > 0,05$).

As análises de comparações do teste *post-hoc* revelou que na FC que a microinjeção de Ang 1-7 no AMe causou facilitação da resposta de taquicardia durante a sessão aguda, que permaneceu ao longo do período de recuperação, quando comparado ao grupo agudo veículo ($P < 0,05$) (**Figura 14**). Os animais do grupo ERR que receberam a microinjeção de Ang 1-7 também tiveram uma facilitação da resposta de taquicardia ($P < 0,05$) (**Figura 14**). Em relação à temperatura cutânea da cauda, os animais que foram submetidos ao ERR e receberam veículo tiveram uma redução maior da TCC durante a 10ª sessão de estresse por restrição, que permaneceu ao longo do período de recuperação, quando comparado ao grupo agudo veículo ($P < 0,05$) (**Figura 14**).

A-779 - A análise das curvas temporais de variação da FC nos animais tratados com A-779 (antagonista seletivo do receptor Mas, 0,1nmol/100nL) indicou efeito do estresse ($F_{(1,24)} = 8,89$; $P < 0,05$) e interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,24)} = 11,37$; $P < 0,05$), porém sem efeito do tratamento ($F_{(1,24)} = 2,77$; $P > 0,05$). Além disso, os resultados indicaram efeito do tempo

($F_{(65, 1560)} = 25,71; P < 0,05$), interação entre tempo e estresse ($F_{(65, 1560)} = 1,43; P < 0,05$), interação entre tempo e tratamento ($F_{(65, 1560)} = 1,43; P < 0,05$) e interação entre tempo, estresse e tratamento ($F_{(65, 1560)} = 1,31; P < 0,05$).

A análise das curvas temporais de variação da PAM não indicou efeito do estresse ($F_{(1,24)} = 0,03; P > 0,05$), do tratamento ($F_{(1,24)} = 1,59; P > 0,05$) ou interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,24)} = 0,01; P > 0,05$). Entretanto, a análise indicou efeito do tempo ($F_{(65, 1560)} = 32,35; P < 0,05$), interação entre tempo e estresse ($F_{(65, 1560)} = 1,98; P < 0,05$) e interação entre tempo, estresse e A-779 ($F_{(65, 1560)} = 1,64; P < 0,05$); mas sem interação entre tempo e tratamento ($F_{(65, 1560)} = 1,05; P > 0,05$).

A análise das curvas temporais de variação da temperatura cutânea da cauda indicou efeito do estresse ($F_{(1,24)} = 9,84; P < 0,05$), mas sem efeito do tratamento ($F_{(1,24)} = 1,77; P > 0,05$) e interação entre estresse e tratamento ($F_{(1,24)} = 0,04; P > 0,05$). Além disso, a análise indicou efeito do tempo ($F_{(14, 336)} = 24,87; P < 0,05$) e interação entre tempo e estresse ($F_{(14, 336)} = 1,85; P < 0,05$), mas sem interação entre tempo e tratamento ($F_{(14, 336)} = 1,68; P > 0,05$) e interação entre tempo, estresse e tratamento ($F_{(14, 336)} = 0,80; P > 0,05$).

As análises de comparações do teste *post-hoc* revelou que a microinjeção de A-779 no AMe atenuou a resposta de taquicardia durante a sessão aguda de estresse, que permaneceu ao longo do período de recuperação, quando comparado ao grupo agudo veículo ($P < 0,05$) (**Figura 14**). Em relação à temperatura cutânea da cauda, os animais que foram submetidos ao ERR e receberam veículo tiveram uma redução maior da TCC, que permaneceu ao longo do período de recuperação, quando comparado ao grupo agudo veículo ($P < 0,05$) (**Figura 14**).

5.3.1. Estudo do envolvimento das neurotransmissões angiotensina II/receptores AT₁ e AT₂ e angiotensina 1-7/receptor Mas no AMe na resposta ansiogênica após uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição

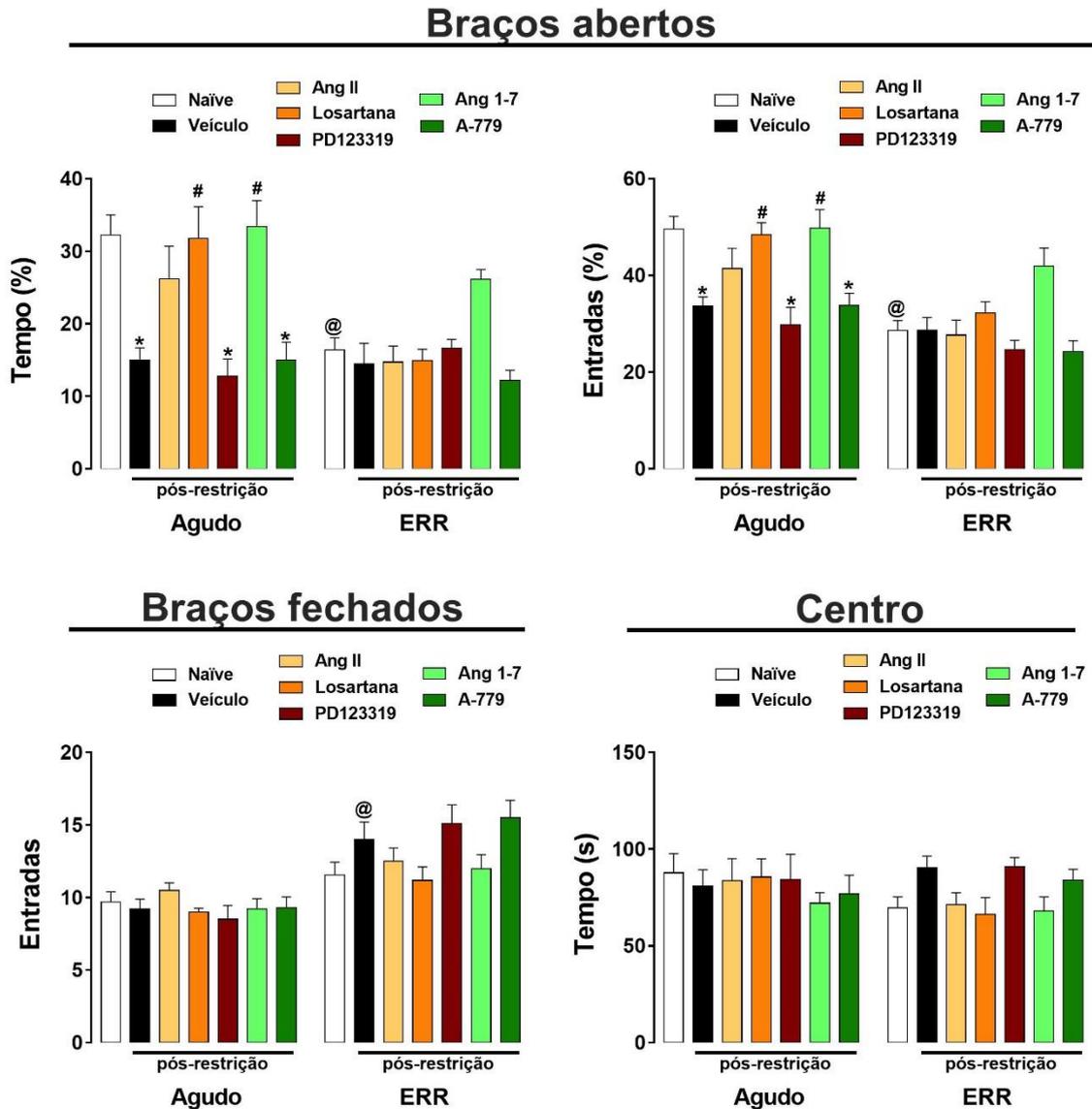


Figura 15: Avaliação do envolvimento das neurotransmissões angiotensinérgicas do AMe na resposta ansiogênica desencadeada pelo estresse de restrição. Parâmetros comportamentais avaliados durante a exploração do labirinto em cruz elevado (LCE) por cinco minutos em animais não-estressados (naive) e cinco minutos após uma sessão aguda ou a 10^o sessão (ERR) de 60 minutos de estresse de restrição em animais tratados com angiotensina II (Ang II, 0,05nmol/100nL), losartana (antagonista seletivo do receptor AT₁, 1nmol/100nL), PD123319 (antagonista seletivo do receptor AT₂, 5nmol/100nL), angiotensina 1-7 (Ang 1-7, 0,05nmol/100nL), A-779 (antagonista do receptor Mas, 0,1nmol/100nL) ou veículo (salina, 100nL) no AMe. O grupo “ERR – controle” foi exposto a 9 sessões de estresse de restrição, mas não foi estressado no dia de avaliação comportamental no LCE. * P<0,05 vs grupo naïve; # P<0,05 vs grupo veículo, @ P<0,05 vs respectivo grupo agudo. ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

Com relação à avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE) (**Figura 15**), a análise do percentual de tempo de exploração dos braços abertos indicou efeito do estresse ($F_{(1, 129)} = 26,93$; $P < 0,05$), tratamento ($F_{(6, 129)} = 10,66$; $P < 0,05$) e interação entre estresse e tratamento ($F_{(6, 129)} = 4,50$; $P < 0,05$). A análise do percentual de entradas nos braços abertos também indicou efeito do estresse ($F_{(1, 129)} = 52,93$; $P < 0,05$), tratamento ($F_{(6, 129)} = 10,87$; $P < 0,05$) e interação entre estresse e tratamento ($F_{(6, 129)} = 2,20$; $P < 0,05$). A análise *post-hoc* revelou que a exposição ao estresse de restrição diminuiu a exploração dos braços abertos do LCE (i.e., efeito ansiogênico) nos animais tratados com veículo ($P < 0,05$), e esse efeito ansiogênico foi inibido pelo tratamento do AMe com angiotensina II ($P < 0,05$), losartana ($P < 0,05$) ou angiotensina 1-7 ($P < 0,05$). O tratamento do AMe com PD123319 ou A-779 não afetaram a resposta ansiogênica induzida pela sessão aguda de restrição ($P > 0,05$) (**Figura 15**). Nos animais expostos ao ERR, nós identificamos um efeito ansiogênico da exposição repetida ao estresse de restrição 24 horas após a última sessão ($P < 0,05$) (**Figura 15**, grupo ERR - controle), em relação ao grupo naive. Entretanto, a análise do comportamento no LCE 5 minutos após a 10ª sessão de restrição em animais tratados com veículo no AMe não revelou efeito ansiogênico em relação ao grupo ERR – naive ($P > 0,05$) (**Figura 15**, grupos ERR). Além disso, nós não identificamos nenhum efeito dos tratamentos farmacológicos nos comportamentos avaliados no LCE dos animais ERR ($P > 0,05$) (**Figura 15**).

Em relação ao número de entrada nos braços fechados, a análise indicou efeito do estresse ($F_{(1, 129)} = 61,64$; $P < 0,05$) e interação entre estresse e tratamento ($F_{(6, 129)} = 2,59$; $P < 0,05$), mas sem efeito do tratamento ($F_{(6, 129)} = 1,64$; $P < 0,05$). A análise *post-hoc* revelou que a exposição ao ERR aumentou a exploração dos braços fechados do LCE no grupo tratado com veículo ($P < 0,05$), quando comparado ao respectivo grupo agudo (**Figura 15**).

A análise do tempo de permanência no centro do LCE não indicou efeito do estresse ($F_{(1, 129)} = 61,64$; $P > 1,00$), do tratamento ($F_{(6, 129)} = 61,64$; $P > 1,00$) ou interação entre estresse e tratamento ($F_{(6, 129)} = 1,11$; $P > 0,05$) (**Figura 15**).

5.4. Efeito da exposição repetida ao estresse de restrição sobre os níveis proteicos dos receptores AT₁ e Mas

Os resultados dos níveis proteicos dos receptores AT₁ e Mas no AMe de animais controle e submetidos ao ERR são mostrados na **Figura 16**. Fotos representativas das membranas do *Western Blotting* são apresentados na **Figura 17**.

Em relação ao receptor AT₁ (**Figura 16A**), a exposição ao ERR aumentou significativamente os níveis proteicos desse receptor no AMe, quando comparado com o grupo controle ($t= 2,98$; $P = 0,008$). De maneira contrária, a expressão do receptor Mas (**Figura 16B**) foi reduzida pelo ERR, quando comparada com os animais controle ($t= 2,18$; $P = 0,042$).

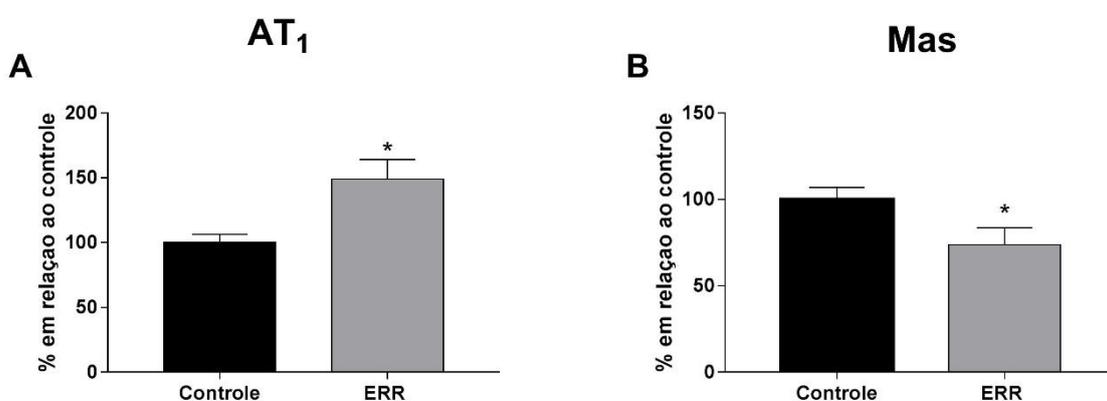


Figura 16: Percentual de expressão de receptores AT₁ e Mas em animais controle e submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR). **(A)** expressão do receptor AT₁. **(B)** Expressão do receptor Mas. Os animais foram submetidos ao ERR por 1 hora por 10 dias consecutivos. Animais controle permaneceram em suas caixas moradia pelos 10 dias. As barras representam a média + EPM. * $P < 0,05$, teste *t* de Student.



Figura 17: Marcações representativas da análise de *Western Blotting* do receptor AT₁ e Mas obtida de animal controle e submetido ao ERR (estresse). **(A)** membrana do receptor AT₁. **(B)** Membrana do receptor Mas.

6. DISCUSSÃO

6.1. Papel dos receptores angiotensinérgicos no AMe nas alterações da função cardiovascular e da atividade barorreflexa induzidas pelo estresse de restrição repetido (ERR)

Antes da avaliação do envolvimento das neurotransmissões angiotensinérgica do AMe nas alterações cardiovasculares e na atividade barorreflexa induzidas pelo ERR, nós realizamos experimentos para caracterização do papel dos receptores angiotensinérgicos presentes no AMe no controle da atividade barorreflexa. Os resultados obtidos constituem a primeira evidência de um envolvimento de mecanismos angiotensinérgicos no AMe no controle das respostas barorreflexas. De fato, a análise da função barorreflexa pela abordagem farmacológica indicou uma influência inibitória do receptor AT_2 no AMe na resposta de taquicardia observada durante a diminuição da pressão arterial, enquanto o receptor Mas no AMe desempenhou um papel facilitatório tanto na taquicardia reflexa quanto na redução da FC evocada pelo aumento da pressão arterial. O papel oposto dos receptores AT_2 (inibitório) e Mas (facilitatório) na função barorreflexa foi também evidenciado pelo IEB obtido no método de análise de sequência da função barorreflexa. Nem a abordagem farmacológica nem o método de análise de sequência da atividade barorreflexa indicaram um papel do receptor AT_1 no AMe nas respostas barorreflexas.

Com relação ao experimento que avaliou o envolvimento dos receptores angiotensinérgicos presentes no AMe nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ERR, a análise da função barorreflexa via abordagem farmacológica indicou que o ERR melhorou a taquicardia reflexa em resposta à diminuição da pressão arterial, como evidenciado pela diferença entre os grupos controle e RRS tratados com veículo no AMe. Essa alteração causada pelo ERR não foi identificada nos animais que receberam losartana no AMe, o que indica um envolvimento dos receptores AT_1 no AMe. A microinjeção do antagonista seletivo do receptor AT_2 (PD123319) ou do antagonista do receptor Mas (A-779) no AMe não afetou a alteração de taquicardia barorreflexa evocada pelo ERR. Além disso, a microinjeção de PD123319 no AMe aumentou a resposta taquicárdica reflexa nos animais controle e ERR, indicando uma influência inibitória do receptor AT_2 no AMe nessa resposta reflexa, que é independente da exposição ao estresse. A análise da função barorreflexa usando a técnica de análise de sequência indicou um comprometimento da função barorreflexa que não foi afetada pelos tratamentos farmacológicos no AMe com os antagonistas dos receptores angiotensinérgicos. No entanto, a microinjeção de PD123319 no AMe aumentou a IEB em animais controle, reforçando os dados da abordagem

farmacológica, indicando um papel inibitório do receptor AT₂ no AMe na função barorreflexa. Os dados também indicaram que ERR aumentou a pressão arterial basal, mas esse efeito não foi afetado pelos tratamentos farmacológicos no AMe.

6.1.1. Papel dos receptores angiotensinérgicos no AMe no controle da função barorreflexa

Dados anteriores identificaram que a inibição aguda do AMe causada pelo tratamento local com o bloqueador sináptico não-seletivo CoCl₂ aumentou a resposta bradicárdica reflexa durante aumentos na pressão arterial causada pela infusão i.v. de fenilefrina, porém sem alterar a taquicardia reflexa durante diminuições da pressão arterial causadas pela infusão i.v. de NPS (FORTALEZA et al., 2015). Esses resultados indicaram um papel inibitório do AMe na resposta reflexa da FC durante aumentos da pressão arterial (FORTALEZA et al., 2015). Nesse sentido, o papel facilitatório do receptor Mas no AMe identificado no presente estudo na bradicardia reflexa indica que esse receptor age modulando a ação de outros neurotransmissores que medeiam o controle inibitório dessa resposta reflexa pelo AMe. Assim, estudos prévios identificaram que a microinjeção de glutamato e GABA no AMe diminuiu o ganho do barorreflexo (NECKEL et al., 2012), o que indica que o receptor Mas pode atuar modulando a ação desses neurotransmissores no AMe durante aumentos da pressão arterial.

Em relação à taquicardia reflexa causada pela diminuição da pressão arterial, embora o bloqueio sináptico não-seletivo causado pelo tratamento do AMe com CoCl₂ não tenha alterado essa resposta (FORTALEZA et al., 2015), identificamos que o tratamento local do AMe com antagonistas dos receptores AT₂ ou Mas afetou essa resposta barorreflexa. Uma explicação para a discrepância pode ser a presença de mecanismos neuroquímicos facilitatórios e inibitórios no AMe que controlam as respostas reflexas durante diminuições da pressão arterial, de modo que o bloqueio não-seletivo causado pelo CoCl₂ não é capaz de revelar o papel específico dos diferentes mecanismos locais. Os nossos achados indicando papel oposto do receptor AT₂ (inibitório) e Mas (facilitador) na resposta de FC durante a diminuição da pressão arterial suporta essa ideia. Nossos dados são ainda suportados por evidências anteriores de uma influência inibitória da neurotransmissão GABAérgica local no AMe na resposta taquicárdica reflexa evocada pela diminuição da pressão arterial (NECKEL et al., 2012).

Expressão dos receptores AT₂ e Mas foi identificada no AMe (BECKER et al., 2007; FREUND; WALTHER; VON BOHLEN UND HALBACH, 2012; LENKEI et al., 1997; LYNCH; HAWELU-JOHNSON; GUYENET, 1987; VON BOHLEN UND HALBACH, 2005), o que suporta os presentes achados. Embora estudos prévios que realizaram a

microinjeção intracerebroventricular de agonistas e antagonistas seletivos dos receptores AT₂ e Mas evidenciaram que ambos os receptores angiotensinérgicos exercem uma influência facilitatória na função barorreflexa (ABDULLA; JOHNS, 2014; BRITTO et al., 1997; CAMPAGNOLE-SANTOS et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1996), nossos achados indicam que o receptor AT₂ no AMe inibe as respostas barorreflexas. No entanto, nossos achados estão de acordo com evidências anteriores que indicaram um papel inibitório na função barorreflexa do receptor AT₂ em estruturas do tronco cerebral (LIN; CHAN; CHAN, 1997; LUOH; CHAN, 1998), o que indica que o controle da função barorreflexa pelo receptores de angiotensina é sítio-específico. Em relação aos mecanismos locais relacionados ao papel oposto do receptor AT₂ e Mas no AMe no controle da função barorreflexa, a ativação do receptor AT₂ pela AngII pode causar aumento e diminuição na taxa de disparo de neurônios na amígdala, e o efeito inibitório parece ser mediado pela ativação da neurotransmissão GABAérgica local (ALBRECHT; NITSCHKE; VON BOHLEN UND HALBACH, 2000). Tanto aumento quanto diminuição na taxa de disparo de neurônios foram também relatados após a ativação do receptor Mas no prosencéfalo e em regiões do tronco cerebral controlando a função cardiovascular (BARNES; KNOWLES; FERRARIO, 1990; FELIX et al., 1991; XING et al., 2012). Nesse sentido, embora os efeitos dos receptores AT₂ e Mas na atividade de neurônios no AMe nunca tenham sido avaliados, uma possibilidade de explicação para os diferentes papéis desses receptores no controle das respostas barorreflexas pode ser que eles tenham efeitos opostos nos neurônios AMe envolvidos no controle da atividade barorreflexa. Além disso, a Ang (1-7) tem sido relatada como um neuromodulador, de modo que os efeitos via receptor Mas são frequentemente mediados pela modulação na liberação e ação de outros neurotransmissores (GIRONACCI et al., 2013). Portanto, outra possibilidade para os diferentes papéis dos receptores AT₂ e Mas no controle do barorreflexo é a interação com outros mecanismos neuroquímicos locais no AMe. De qualquer forma, os mecanismos locais relacionados ao papel oposto dos receptores AT₂ e Mas no controle da função barorreflexa necessitam de mais estudos para serem elucidados.

A resposta bradicárdica do barorreflexa é predominantemente mediada pela estimulação parassimpática cardíaca, enquanto a resposta taquicárdica reflexa durante diminuição da pressão arterial está relacionada principalmente à ativação da atividade simpática cardíaca (CRESTANI et al., 2008, 2010a; GLICK; BRAUNWALD; LEWIS, 1965; SULLEBARGER et al., 1990). Assim, a influência inibitória do receptor AT₂ no AMe na resposta taquicárdica reflexa pode ser mediada pela inibição de vias facilitatórias ou ativação

de projeções inibitórias para neurônios pré-motores simpáticos, enquanto mecanismos opostos medeiam a influência facilitatória do receptor Mas. Além disso, a influência facilitatória do receptor Mas na resposta bradicárdica ao aumento da pressão arterial pode ser mediada tanto pela ativação de vias facilitatórias quanto pela inibição de projeções inibitórias para os neurônios parassimpáticos bulbares. No entanto, o AMe não possui projeções diretas para estruturas bulbares e hipotalâmicas envolvidas no controle tônico da atividade autonômica (MYERS, 2017; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Nesse sentido, foi proposto que o controle da função cardiovascular e da atividade autonômica pelo AMe seja mediado por projeções para a área pré-óptica mediana (APOm), o hipotálamo posterior (HP) e o núcleo leito da estria terminal (NLET); que por sua vez projetam-se para neurônios efetores autônomos no tronco cerebral e na coluna intermediolateral (IML) (MYERS, 2017). Assim, o controle da função barorreflexa pela neurotransmissão angiotensinérgica no AMe está possivelmente relacionado a conexões indiretas com estruturas do tronco cerebral e IML (MYERS, 2017; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). De acordo, estruturas que recebem projeções do AMe, como a APOm, o NLET e o HP, foram descritas como parte do circuito central envolvido nas respostas barorreflexas (BAUER et al., 1988; CRESTANI et al., 2006, 2008; INUI et al., 1995).

Não foram identificados efeitos da administração intra-AMe dos antagonistas dos receptores angiotensinérgicos nos valores basais de pressão arterial ou FC. Nossos achados estão de acordo com evidências anteriores de que a microinjeção bilateral de antagonistas dos receptores noradrenérgicos e colinérgicos no AMe não afetou os parâmetros cardiovasculares basais (FORTALEZA; SCOPINHO; CORRÊA, 2012a, 2012b; FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009). Mesmo a inibição não-seletiva do AMe via tratamento local com CoCl_2 ou muscimol não afetou os valores cardiovasculares basais (FORTALEZA et al., 2015; FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009; KUBO et al., 2004). Assim, apesar da evidência do AMe como parte do circuito central envolvido no controle de respostas cardiovasculares a ameaças aversivas (FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009; KUBO et al., 2004) e respostas barorreflexas (FORTALEZA et al., 2015; NECKEL et al., 2012; QUAGLIOTTO et al., 2008, 2014), o AMe parece não estar envolvido na manutenção tônica da pressão arterial e da FC.

6.1.2. Efeitos do tratamento farmacológico no AMe com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos na função cardiovascular e atividade barorreflexa de animais submetidos ao ERR

Estudos mostraram aumento dos valores da pressão arterial basal, sem alterações na FC, em roedores após exposição a protocolos de ERR (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2012, 2015; DAUBERT et al., 2012; DUARTE et al., 2015; HABIB et al., 2015; YANG et al., 2014). Embora haja alguma inconsistência na literatura (ver revisão, (CRESTANI, 2016; NALIVAIKO, 2011)), os estudos acima mencionados apoiam o aumento da pressão arterial identificada no presente estudo em animais submetidos ao ERR. Os resultados aqui relatados também estão em linha com evidências anteriores de que a exposição a protocolos de ERR interfere na atividade barorreflexa (CONTI et al., 2001; COSTA-FERREIRA et al., 2016; DUARTE et al., 2015; FIRMINO et al., 2019; PORTER et al., 2004). De fato, o aumento da taquicardia reflexa causada por diminuição da pressão arterial identificado no presente estudo em ratos submetidos ao ERR corrobora com evidências anteriores de que o ERR aumenta as respostas de FC mediadas por barorreflexo (CONTI et al., 2001; DUARTE et al., 2015; FIRMINO et al., 2019; VIEIRA et al., 2018). Respostas taquicárdicas exacerbadas têm sido propostas como um importante fator de risco para infarto agudo do miocárdio, o que pode levar à morte (DYER et al., 1980; PALATINI; JULIUS, 1997). A facilitação das respostas taquicárdicas pode estar relacionada à hiper-responsividade simpática ou ao prejuízo no controle parassimpático cardíaco, que são alterações consideradas como mau prognóstico para doenças cardiovasculares (GRASSI et al., 2004). Portanto, como elevações a longo prazo da pressão arterial tão baixas como 5 mmHg já estão associadas ao aumento do risco de acidente vascular cerebral e doenças cardíacas (COLLINS et al., 1990), as alterações da pressão arterial e do barorreflexo evocadas pelo ERR podem ser consideradas fatores de risco importantes para a morbidade e mortalidade cardiovascular.

Ao contrário da facilitação das respostas barorreflexas identificadas pela abordagem farmacológica, a análise da função barorreflexa usando a técnica de análise de sequência indicou um comprometimento nesse controle reflexo em animais submetidos ao ERR. Nossos achados corroboram com evidências anteriores de que o estresse crônico afeta diferentemente as respostas barorreflexas evocadas durante variações espontâneas e alterações mais pronunciadas da pressão arterial (ALMEIDA et al., 2015; COSTA-FERREIRA et al., 2016; FIRMINO et al., 2019). Além disso, embora algumas evidências tenha indicado que o ERR não tenha afetado a atividade barorreflexa avaliada pelo método de sequência (COSTA-FERREIRA

et al., 2016; DAUBERT et al., 2012; DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015), os resultados documentados aqui estão em linha com trabalhos recentes que relatam que o ERR diminuiu o ganho do barorreflexo espontâneo (Firmino et al., 2019). As diferenças no efeito do ERR na função barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica (isto é, facilitação) versus método de sequência (isto é, comprometimento) são também suportados por evidências reportadas recentemente (FIRMINO et al., 2019), e podem ser explicadas pela possibilidade de que diferentes redes neurais regulam as respostas cardíacas reflexas dentro da faixa estreita de variações fisiológicas e durante variações mais pronunciadas da pressão arterial (CRESTANI, 2016). Os resultados do presente estudo fornecem novas evidências em apoio a essa ideia (veja a discussão abaixo).

Estudos anteriores demonstraram que o tratamento intracerebroventricular ou sistêmico (intraperitoneal) com losartana (antagonista do receptor AT_1) impediu completamente as alterações barorreflexas evocadas pelo ERR (COSTA-FERREIRA et al., 2016; PORTER et al., 2004). Os achados relatados no presente estudo fornecem evidências do AMe como um sítio cerebral no qual a angiotensina II ativa os receptores AT_1 para alterar a função barorreflexa em animais submetidos ao ERR. Curiosamente, estudos anteriores indicaram um papel do AMe na rede central que controla a função barorreflexa (FORTALEZA et al., 2015), e os nossos dados em animais não-estressados indicaram que esse controle pelo AMe é mediado pela ativação de receptores locais AT_2 e Mas. De fato, nós observamos no protocolo anterior (ver discussão acima) que o tratamento do AMe de ratos não estressados com o losartana não afetou a função barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica ou pela técnica de análise de sequência. Em conjunto com os dados obtidos no presente protocolo, parece que a exposição ao ERR induz a expressão de receptores AT_1 em neurônios da AMe envolvidos na rede central que controla a função barorreflexa, o que, por sua vez, facilita as respostas barorreflexas. Essa ideia é suportada pelos nossos achados de aumento na expressão do receptor AT_1 no AMe em animais expostos ao ERR. Esses resultados são suportados por evidências anteriores de que a exposição ao ERR aumenta expressão de receptor AT_1 em estruturas do tronco cerebral que controlam a função cardiovascular, bem como no núcleo paraventricular hipotalâmico, eminência mediana e órgão subfornical (LEONG et al., 2002; MCDUGALL et al., 2000b). Este aumento na expressão do receptor AT_1 pode ser mediado pela ativação de receptores glicocorticoides (CASTREN; SAAVEDRA, 1989; GUO et al., 1995).

É interessante notar que embora nossos resultados indiquem um papel dos receptores AT₁ no AMe nas mudanças das respostas reflexas da FC durante a variação da pressão arterial (ou seja, resultados da abordagem farmacológica), o comprometimento das respostas reflexas durante uma faixa estreita de variações fisiológicas da pressão arterial (isto é, dados do método de sequência) parece ser independente dos receptores angiotensinérgicos no AMe. Em conjunto com evidências do protocolo anterior de que o tratamento com losartana no AMe não afetou o ganho espontâneo do barorreflexo em ratos não estressados, os achados desse estudo fornecem evidências adicionais de que a ausência da influência do receptor AT₁ no AMe nas respostas reflexas durante as alterações espontânea da pressão arterial são independentes do estresse. Como afirmado acima, o impacto diferente do ERR na função barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica e o método de sequência indicam que diferentes circuitos medeiam as respostas reflexas durante variações espontâneas e alterações mais pronunciadas da pressão arterial. Nesse sentido, a evidência de que os receptores AT₁ no AMe estão envolvidos seletivamente na alteração evocada pelo ERR nas respostas reflexas durante alterações pronunciadas da pressão arterial fornece mais evidências de diferentes vias centrais que medeiam as respostas reflexas avaliadas pela abordagem farmacológica e pelo método de sequência (CRESTANI, 2016).

Não identificamos o efeito do tratamento com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos no AMe nos parâmetros basais da pressão arterial ou FC. Os dados aqui relatados são suportados por evidências prévias de que a microinjeção bilateral de antagonistas dos receptores noradrenérgicos ou colinérgicos no AMe não afetou a pressão arterial basal e os valores de FC (FORTALEZA; SCOPINHO; CORRÊA, 2012a; FORTALEZA; SCOPINHO; CORRÊA, 2012b; FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009). Mesmo a inibição não seletiva no AMe evocada pelo tratamento local com CoCl₂ ou muscimol não afetou os parâmetros cardiovasculares basais (FORTALEZA et al., 2015; FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009; KUBO et al., 2004). Assim, o AMe parece não mediar a manutenção tônica da pressão arterial e da FC. Nesse sentido, o presente estudo fornece evidências adicionais de que mesmo alterações nos parâmetros cardiovasculares basais evocados por estressores crônicos não são mediadas pelo AMe. Além disso, os resultados do presente estudo indicam um papel do receptor AT₁ na facilitação das respostas taquicárdicas reflexas evocadas pela diminuição da pressão arterial, mas não no aumento da pressão arterial basal, o que sugere que essas alterações não estão relacionadas. No entanto, o aumento da pressão arterial pode estar relacionado ao comprometimento da função barorreflexa identificado durante alterações

fisiológicas na pressão arterial. De fato, a diminuição da função barorreflexa tem sido proposta como um mecanismo fisiopatológico proeminente da hipertensão (GRASSI et al., 2006; HONZÍKOVÁ; FISER, 2009). No entanto, mais estudos são necessários para abordar os mecanismos relacionados às mudanças na pressão arterial e nas respostas barorreflexas durante variações espontâneas da pressão arterial.

6.2. Envolvimento de neurotransmissões angiotensinérgicas do AMe no controle das respostas cardiovasculares e ansiogênica durante uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição

Os resultados desse protocolo objetivaram avaliar o envolvimento das neurotransmissões Ang II/receptores AT₁ e AT₂ e Ang 1-7/receptor Mas nas respostas cardiovasculares e ansiogênica durante uma sessão aguda de estresse de restrição, bem como investigar se a exposição repetida prévia afeta o controle das cardiovasculares e ansiogênica a esse estressor pelas neurotransmissões angiotensinérgicas no AMe. Com relação à investigação do envolvimento da neurotransmissão da Ang II do AMe no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição, nós identificamos que a microinjeção de Ang II ou losartana (antagonista seletivo do receptor AT₁) no AMe aumentou a resposta de taquicardia durante uma sessão aguda de restrição (**Figura 13**). De maneira interessante, nós não identificamos efeitos dos tratamentos farmacológicos do AMe com Ang II ou losartana nas respostas cardiovasculares durante a 10^o sessão de restrição (**Figura 13**). Devido à similaridade de efeito dos tratamentos com Ang II e losartana, nós decidimos investigar o papel do receptor AT₂ no AMe. Assim, foi realizado a microinjeção bilateral de PD123319 (antagonista seletivo do receptor AT₂) no AMe, no qual reduziu as respostas pressora e taquicárdica durante a sessão aguda de restrição (**Figura 13**). Entretanto, o tratamento do AMe com o antagonista AT₂ aumentou a resposta taquicárdica na 10^o sessão de restrição (**Figura 13**). Assim como observado com os tratamentos com Ang II e losartana na resposta taquicárdica, o efeito do PD123319 observado na resposta de pressão arterial dos animais estressados agudamente não foi observado na 10^o sessão de restrição (**Figura 13**). Além disso, nossos resultados evidenciaram que durante a 10^o sessão de restrição a resposta da temperatura cutânea da cauda (TCC) foi maior comparado aos animais que passaram por uma sessão de estresse e receberam veículo (**Figura 13**), e a microinjeção de PD123319 aumentou a resposta de redução da TCC durante a sessão de estresse de restrição (**Figura 13**).

Nossos achados mostram que não houve habituação da resposta de FC e pressão arterial durante a 10ª sessão de estresse de restrição em comparação com uma única sessão de estresse. Esses dados estão em linha com estudos anteriores em que a exposição repetida ao mesmo estressor não causou habituação das respostas cardiovasculares (CONTI et al., 2001; DAUBERT et al., 2012; MCDOUGALL et al., 2000a). Entretanto, observamos queda maior da temperatura cutânea da cauda durante a 10ª sessão de restrição em relação aos animais estressados agudamente. Do nosso conhecimento, esses são os primeiros dados a evidenciar facilitação da resposta de vasoconstrição cutânea em um protocolo de estresse homotípico. De fato, estudo recente do nosso laboratório não indicou alterações na resposta de temperatura cutânea durante uma sessão aguda e o 10ª sessão de restrição (BENINI et al., 2019). Desse modo, estudos futuros são necessários para uma melhor caracterização dessa resposta e investigação dos mecanismos e relevância fisiológica.

Com relação aos tratamentos, estudos prévios identificaram que o bloqueio sináptico não-seletivo do AMe por meio do tratamento local com cloreto de cobalto (CoCl_2) promoveu aumento da resposta taquicárdica durante o estresse de restrição, porém sem afetar a resposta de aumento da pressão arterial (FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009). Esses achados evidenciaram um papel inibitório do AMe no controle da resposta de FC durante situações aversivas (FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009). Efeito semelhante sobre a resposta taquicárdica (isto é, facilitação) foi observado após o tratamento local do AMe com antagonistas de receptores colinérgicos muscarínicos ou antagonista seletivo de adrenoreceptores α_2 ou β_2 (FORTALEZA; SCOPINHO; CORRÊA, 2012a; FORTALEZA; SCOPINHO; CORRÊA, 2012b; FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009), o que sugeriu um envolvimento das neurotransmissões colinérgica e noradrenérgica no controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo AMe. Nesse sentido, os resultados de aumento da resposta de FC durante a sessão aguda de estresse de restrição agudo nos animais tratados com losartana reportados no presente estudo fornecem novas evidências de que a neurotransmissão angiotensinérgica, agindo via ativação do receptor AT_1 , também está envolvida no controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo AMe.

De maneira inesperada, nós identificamos que o tratamento do AMe com losartana ou Ang II tiveram efeito similar sobre a resposta de FC ao estresse de restrição agudo. Considerando evidências de que a Ang II tem afinidade 15 a 33 vezes maior pelo receptor AT_2 em relação ao receptor AT_1 (BOSNYAK et al., 2011), bem como os dados indicando que o receptor AT_2 é um mecanismo contra-regulatório para os efeitos decorrentes do receptor AT_1

(DE GASPARO et al., 2000), nós hipotetizamos que o efeito identificado no presente estudo após o tratamento com Ang II fosse mediado pela ativação do receptor AT₂. Desse modo, realizamos experimento no qual objetivou avaliar o papel do receptor AT₂ no AMe nas respostas cardiovasculares ao estresse. Confirmando nossa hipótese, nós identificamos que o tratamento do AMe com o antagonista do receptor AT₂ (PD123319) teve um efeito oposto ao da Ang II e da losartana, assim reduzindo a resposta de FC durante o estresse de restrição agudo.

De maneira interessante, o antagonista AT₂ foi o único fármaco que afetou a resposta de aumento da pressão arterial durante o estresse de restrição, bem como a queda da temperatura cutânea da cauda. Esses achados são suportados por dados anteriores que evidenciaram redução na resposta de pressão arterial após a inibição do AMe por meio do tratamento local com muscimol (agonista do receptor GABA_A) (KUBO et al., 2004). Dados anteriores indicaram o envolvimento da neurotransmissão histaminérgica local no controle da resposta de pressão arterial ao estresse por restrição pelo AMe (DE ALMEIDA et al., 2015). Outro aspecto a ser levantado é que o aumento da resposta de redução da temperatura cutânea da cauda pode estar relacionada à diminuição da resposta de pressão arterial pelo tratamento com PD123319. Desse modo, nossos dados fornecem novas evidências ao indicar o envolvimento da neurotransmissão angiotensinérgica local, agindo via receptor AT₂, no controle da resposta de pressão arterial e temperatura cutânea pelo AMe.

Em relação aos dados obtidos durante a 10^a sessão de estresse de restrição, nós observamos que os efeitos do tratamento com Ang II e losartana durante a sessão aguda foram abolidos após a exposição repetida ao agente estressor. A exposição a 10 sessões de estresse de restrição aumentou a expressão do receptor AT₁ e reduziu os níveis proteicos do receptor Mas (**Figura 15**). O aumento na expressão do receptor AT₁ contrasta com a observação de que o efeito do tratamento com losartana identificado na sessão agudo foi abolido na 10^o sessão de restrição. Em conjunto, esses dados indicam que o aumento na expressão do receptor AT₁ ocorreu possivelmente em uma população de neurônios diferentes daquelas envolvidas no controle das respostas cardiovasculares durante o estresse. Desse modo, o aumento na expressão do receptor AT₁ deve estar relacionado com outras alterações decorrentes da exposição repetida ao estresse de restrição. De fato, os dados apresentados na sessão anterior fornecem evidências de que esse aumento pode estar envolvido nas alterações da atividade do barorreflexo induzidas pelo ERR. Assim, a ausência de efeito do tratamento com losartana sobre as respostas cardiovasculares durante a 10^o sessão de restrição está possivelmente relacionada com alterações funcionais e/ou morfológicas que resultam em diminuição na excitabilidade dos

neurônios do AMe relacionados com o controle das respostas cardiovasculares durante o estresse. Essa ideia é suportada pelo relato de diminuição na expressão de sinaptofisina (proteína de membrana vesicular sináptica), o que indica redução em sinapses ativas, e na densidade de espinhas dendríticas no AMe (BENNUR et al., 2007; GILABERT-JUAN et al., 2011). Além disso, foi reportado redução no número de neurônios ativos no AMe na 10^o sessão de restrição em relação à ativação após uma sessão aguda (CHEN; HERBERT, 1995). Entretanto, nós não podemos descartar a influência de uma diminuição na expressão do receptor AT₁ especificamente na população de neurônios envolvidas no controle das respostas cardiovasculares durante o estresse. De qualquer modo, estudos futuros serão necessários para elucidar esse mecanismo. Com relação ao receptor AT₂, os experimentos para avaliação do efeito da exposição a 10 sessões de ERR sobre a expressão desse receptor não foram finalizados e nós ainda não concluímos os ensaios de *Western blotting*.

A investigação do papel da neurotransmissão da Ang 1-7 (**Figura 14**) indicou que a microinjeção bilateral de A-779 (antagonista seletivo do receptor Mas) na AMe reduziu a taquicardia durante a sessão aguda de restrição, ao passo que o tratamento com Ang 1-7 aumentou essa resposta. Nenhum efeito do tratamento do AMe com o A-779 foi identificado na 10^o sessão de restrição. Entretanto, assim como observado nos animais estressados agudamente, a Ang 1-7 no AMe facilitou a resposta taquicárdica na 10^o sessão de restrição (**Figura 14**). Nesse sentido, a inibição do efeito do tratamento do AMe com o antagonista do receptor Mas sobre a resposta taquicárdica após a exposição repetida prévia ao estresse de restrição pode estar relacionada com a diminuição na expressão do receptor Mas no AMe

Assim como observado com o tratamento com o antagonista AT₂, os dados obtidos nos animais que receberam A-779 e Ang 1-7 no AMe evidenciaram um papel oposto do receptor Mas (facilitatório) em relação ao receptor AT₁ (inibitório) no controle da resposta de FC ao estresse por restrição agudo. Assim como o receptor AT₂, o eixo ECA-2/angiotensina 1-7/receptor Mas é proposto como um mecanismo contra-regulatório para os efeitos sobre as respostas ao estresse decorrente da ativação do receptor AT₁ pela Ang II (FONTES; MARTINS LIMA; SANTOS, 2016). Estudos anteriores reportaram atenuação da resposta de FC durante estresse de restrição após o tratamento do AMe com antagonista de adrenoceptores α_1 ou β_1 (FORTALEZA; SCOPINHO; CORRÊA, 2012a; FORTALEZA; SCOPINHO; CORRÊA, 2012b), um efeito oposto à facilitação da resposta taquicárdica observada após o bloqueio sináptico não-seletivo com CoCl₂ do AMe (FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009). Em conjunto, esses resultados forneceram evidências de mecanismos contra-regulatórios locais no

AMe no controle das respostas cardiovasculares ao estresse. Desse modo, os receptores AT₂ e Mas parecem não constituir somente mecanismos que se opõe especificamente aos efeitos do receptor AT₁, mas aparentemente a ativação deles parece ser parte de um mecanismo contra-regulatório de controle das respostas ao estresse presente no AMe, no qual a neurotransmissão noradrenérgica também está envolvida.

O SRA no sistema nervoso central é implicado como um neuromodulador que controla a liberação de outros neurotransmissores (VEERASINGHAM; RAIZADA, 2003). De fato, foi demonstrado um aumento pela Ang II (via ativação do receptor AT₁) e diminuição pela Ang 1-7 na liberação de noradrenalina central (GIRONACCI et al., 2013; STADLER et al., 1992). Nesse sentido, os efeitos similares sobre a resposta taquicárdica ao estresse de restrição reportados em estudos prévios após o tratamento do AMe com antagonistas seletivos de adrenoceptores α_2 ou β_2 (FORTALEZA; SCOPINHO; CORRÊA, 2012a; FORTALEZA; SCOPINHO; CORRÊA, 2012b) em relação ao efeito observado no presente estudo com o tratamento com losartana, bem como o papel oposto do receptor Mas, sugere que o controle pelo receptor AT₁ e Mas pode ser mediado por uma modulação da liberação local de noradrenalina. Entretanto, estudos futuros são necessários para investigar a possível interação entre esses mecanismos neuroquímicos no controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo AMe.

Com relação à avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade (**Figura 15**), nós observamos que a exposição ao estresse de restrição diminuiu a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) (i.e., efeito ansiogênico) nos animais tratados com veículo, e esse efeito ansiogênico foi inibido pelo tratamento do AMe com Ang II, losartana ou Ang 1-7. O tratamento com PD123319 ou A-779 não afetaram a resposta ansiogênica induzida pela sessão aguda de restrição. Nos animais expostos ao ERR, nós identificamos um efeito ansiogênico 24 horas após a 9^o sessão de restrição (**Figure 15, grupo ERR - controle**), e a análise do comportamento no LCE 5 minutos após a 10^o sessão de restrição em animais tratados com veículo no AMe não revelou efeito ansiogênico em relação ao grupo ERR - controle (**Figura 15, grupos ERR**). Além disso, nós não identificamos nenhum efeito dos tratamentos farmacológicos em nenhum dos comportamentos avaliados do LCE nos animais ERR (**Figura 15**).

Com relação à avaliação do efeito do ERR sobre o comportamento no LCE, a identificação de efeito ansiogênico após a exposição a nove sessões de restrição está de acordo com evidências prévias de alterações comportamentais do tipo ansiogênicas após a exposição

a diferentes protocolos de ERR (BOWMAN et al., 2009; CHOTIWAT; HARRIS, 2006; KIM; LEEM, 2014; LEE, 2012; LIU et al., 2018; VIEIRA et al., 2018; VYAS et al., 2002). De maneira interessante, nós não identificamos uma resposta ansiogênica adicional em relação ao grupo ERR – controle nos animais tratados com veículo no AMe e avaliados no LCE 5 minutos após a exposição à 10^o sessão de restrição. Esse achado pode estar relacionado com um “efeito doi tipo teto” na resposta ansiogênica, de modo que uma resposta ansiogênica pós-estresse não é observada nos animais que já apresentam um nível aumentado de ansiedade pré-estresse. Quanto à ausência de efeito dos tratamentos farmacológicos do AMe nos parâmetros comportamentais no LCE dos ratos ERR, para os tratamentos com os antagonistas AT₁ e Mas os mecanismos discutidos acima para as respostas cardiovasculares também podem contribuir (ou seja, diminuição na excitabilidade dos neurônios no AMe para o tratamento com losartana e diminuição na expressão do receptor Mas para o tratamento com A-779). Os efeitos relacionados ao receptor AT₂ serão compreendidos melhor após a análise do efeito do ERR sobre a expressão desse receptor (aguardando fim da pandemia). Além disso, a ausência de efeito ansiogênico dos animais ERR pós-restrição (i.e., 5 minutos após a 10^o sessão de restrição) em relação ao grupo ERR – controle também pode contribuir para a ausência de efeito dos tratamentos farmacológicos.

6.3. Efeito da exposição repetida ao estresse de restrição sobre os níveis proteicos dos receptores AT₁ e Mas

Nossos resultados obtidos indicaram aumento na expressão de receptores AT₁ no AMe em animais submetidos ao ERR, ao passo que a expressão do receptor Mas no AMe foi reduzida nos animais estressados. Componentes do SRA foram identificados em estruturas encefálicas envolvidas nas respostas ao estresse, inclusive no AMe (LENKEI et al., 1997; LYNCH; HAWELU-JOHNSON; GUYENET, 1987; VON BOHLEN UND HALBACH, 2005). Nesse sentido, foi reportado que a exposição aguda a eventos aversivos aumentou a expressão gênica (RNA mensageiro) do receptor AT₁ em áreas envolvidas no controle das respostas ao estresse (AGUILERA; KISS; LUO, 1995). Em situações aversivas crônicas, foi reportado aumento no RNAm e nos níveis proteicos do receptor AT₁ em estruturas encefálicas de animais submetidos a protocolos de estresse crônico variável, estresse crônico de choque nas patas e ERR (LEONG et al., 2002; MILIK; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA; SZCZEPANSKA-SADOWSKA, 2016). Apesar das evidências acima suportarem os nossos achados, do nosso conhecimento, os dados

reportados no presente estudo são os primeiros a evidenciar um efeito do estresse crônico na expressão do receptor AT₁ no AMe.

Com relação ao receptor Mas, os resultados reportados corroboram com achados de um estudo que mostrou redução na expressão do receptor Mas no encéfalo após uma sessão aguda de estresse de restrição a 4°C (ZHU et al., 2014). Entretanto, os nossos dados são os primeiros a evidenciar um efeito do estresse crônico na expressão desse receptor no AMe. Além disso, cabe destacar o relato de ausência de alteração na expressão do receptor Mas no núcleo ventrolateral rostral do bulbo (RVLM), uma das áreas bulbares envolvidas no controle tônico cardiovascular, após a exposição crônica ao estresse de choque nas patas (DU et al., 2013), o que sugere que os efeitos na expressão do receptor Mas no encéfalo pode depender do tipo de estressor e da área encefálica.

7. CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo indicam um envolvimento da neurotransmissão angiotensinérgica no AMe nas respostas cardíacas do barorreflexo. Além disso, os dados obtidos também evidenciaram que a exposição ao ERR alterou a resposta reflexa do barorreflexo. O prejuízo nas respostas barorreflexas espontâneas e o aumento na pressão arterial causados pelo ERR parece ser independente de mecanismos angiotensinérgicos no AMe.

Os nossos resultados também evidenciaram que a exposição ao ERR afeta o controle das respostas cardiovasculares e ansiogênica a esse estressor exercido pelas neurotransmissões da Ang II e da Ang 1-7 do AMe. Por fim, os resultados também indicaram que a exposição ao ERR alterou a expressão de receptores AT₁ e receptor Mas no AMe, o que mostra que a exposição ao ERR altera a densidade dos receptores de angiotensina no AMe.

8. REFERÊNCIAS

- ABDULLA, M. H.; JOHNS, E. J. Nitric oxide impacts on angiotensin AT₂ receptor modulation of high-pressure baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in anaesthetized rats. **Acta Physiologica**, v. 210, n. 4, p. 832–844, abr. 2014.
- AGUILERA, G.; KISS, A.; LUO, X. Increased expression of type 1 angiotensin II receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoid administration. **Journal of neuroendocrinology**, v. 7, n. 10, p. 775–83, out. 1995.
- ALBRECHT, D.; NITSCHKE, T.; VON BOHLEN UND HALBACH, O. Various effects of angiotensin II on amygdaloid neuronal activity in normotensive control and hypertensive transgenic [TGR(mREN-2)27] rats. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 7, p. 925–931, maio 2000.
- 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, 4 jul. 2015.
- ARMANDO, I. et al. Peripheral administration of an angiotensin II AT₁ receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation Stress. **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 3880–9, set. 2001.
- BADER, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 50, p. 439–65, 2010.
- 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.
- BARNES, K. L.; KNOWLES, W. D.; FERRARIO, C. M. Angiotensin II and angiotensin (1–7) excite neurons in the canine medulla in vitro. **Brain Research Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 275–280, fev. 1990.
- BAUER, R. M. et al. A GABAergic mechanism in the posterior hypothalamus modulates baroreflex bradycardia. **Brain Research Bulletin**, v. 20, n. 5, p. 633–641, maio 1988.
- BECKER, L. K. et al. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 293, n. 3, p. H1416-24, set. 2007.
- BENINI, R. et al. Habituation of the cardiovascular responses to restraint stress in male rats: influence of length, frequency and number of aversive sessions. **Stress**, v. 22, n. 1, p. 151–161, 2 jan. 2019.
- BENNUR, S. et al. Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue-plasminogen activator. **Neuroscience**, v. 144, n. 1, p. 8–16, 5 jan. 2007.
- BILD, W.; CIOBICA, A. Angiotensin-(1-7) central administration induces anxiolytic-like effects in elevated plus maze and decreased oxidative stress in the amygdala. **Journal of affective disorders**, v. 145, n. 2, p. 165–71, 20 fev. 2013.
- BOSNYAK, S. et al. Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT₁ and AT₂ receptors. **Clinical Science**, v. 121, n. 7, p. 297–303, 2011.
- BOWMAN, R. E. et al. Sex-dependent changes in anxiety, memory, and monoamines following one week of stress. **Physiology & Behavior**, v. 97, n. 1, p. 21–29, abr. 2009.
- BRITTO, R. R. et al. Role of Angiotensin-(1-7) in the Modulation of the Baroreflex in

- Renovascular Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 549–556, set. 1997.
- BRUDER-NASCIMENTO, T. et al. Estresse crônico melhora a função miocárdica sem alterar a atividade do canal-L para Ca²⁺ em ratos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 99, n. 4, p. 907–914, out. 2012.
- BRUDER-NASCIMENTO, T. et al. Chronic Stress Improves NO- and Ca²⁺ Flux-Dependent Vascular Function: A Pharmacological Study. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2015.
- BUNNEMANN, B. et al. Autoradiographic localization of mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. **Neuroscience letters**, v. 114, n. 2, p. 147–53, 3 jul. 1990.
- BUSNARDO, C. et al. Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 11, p. 1611–22, nov. 2013.
- 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, jun. 2014.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. et al. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 263, n. 1, p. R89–R94, jul. 1992.
- CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, p. S101–S111, 2013.
- CASTREN, E.; SAAVEDRA, J. M. Angiotensin II receptors in paraventricular nucleus, subfornical organ, and pituitary gland of hypophysectomized, adrenalectomized, and vasopressin-deficient rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 2, p. 725–729, 1 jan. 1989.
- CHAPPELL, M. C. et al. Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 28, p. 16518–23, 5 out. 1989.
- 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, fev. 1995.
- CHOTIWAT, C.; HARRIS, R. B. S. Increased anxiety-like behavior during the post-stress period in mice exposed to repeated restraint stress. **Hormones and Behavior**, v. 50, n. 3, p. 489–495, set. 2006.
- COLLINS, R. et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. **The Lancet**, v. 335, n. 8693, p. 827–838, abr. 1990.
- 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, abr. 2001.
- 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, jan. 1998.
- COSTA-FERREIRA, W. et al. Involvement of Type 1 Angiotensin II Receptor (AT1) in

- Cardiovascular Changes Induced by Chronic Emotional Stress: Comparison between Homotypic and Heterotypic Stressors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 18 ago. 2016.
- CRACKOWER, M. A. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**, v. 417, n. 6891, p. 822–8, 20 jun. 2002.
- CRANE, J. W.; FRENCH, K. R.; BULLER, K. M. Patterns of neuronal activation in the rat brain and spinal cord in response to increasing durations of restraint stress. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 8, n. 3, p. 199–211, set. 2005.
- CRESTANI, C. C. et al. The bed nucleus of the stria terminalis modulates baroreflex in rats. **NeuroReport**, v. 17, n. 14, p. 1531–1535, out. 2006.
- CRESTANI, C. C. et al. Bed nucleus of the stria terminalis α 1-adrenoceptor modulates baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. **Brain Research**, v. 1245, p. 108–115, dez. 2008.
- 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**, v. 12, n. 3, p. 268–278, 7 jan. 2009.
- 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, jan. 2010a.
- 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, ago. 2010b.
- CRESTANI, C. C. Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. **Frontiers in Physiology**, v. 7, 24 jun. 2016.
- CULLINAN, W. E. et al. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, v. 64, n. 2, p. 477–505, jan. 1995.
- DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological reviews**, v. 74, n. 2, p. 323–64, abr. 1994.
- DAMPNEY, R. A. L. Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 309, n. 5, p. R429-43, set. 2015.
- DAMPNEY, R. A. L.; HORIUCHI, J.; MCDOWALL, L. M. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 142, n. 1–2, p. 3–10, 3 nov. 2008.
- 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, 1 out. 2012.
- DAVERN, P. J. et al. Role of angiotensin II type 1A receptors in cardiovascular reactivity and neuronal activation after aversive stress in mice. **Hypertension**, v. 54, n. 6, p. 1262–1268, 2009.
- DAVERN, P. J.; HEAD, G. A. Role of the medial amygdala in mediating responses to aversive stimuli leading to hypertension. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 38, n. 2, p. 136–43, fev. 2011.
- DAVIS, M. et al. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American**

College of Neuropsychopharmacology, v. 35, n. 1, p. 105–35, jan. 2010.

DE ALMEIDA, D. O. et al. Hypertensive response to stress: The role of histaminergic H1 and H2 receptors in the medial amygdala. **Physiology & Behavior**, v. 144, p. 95–102, 15 maio 2015.

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

DE MATTEO, R.; HEAD, G. A.; MAYOROV, D. N. Angiotensin II in dorsomedial hypothalamus modulates cardiovascular arousal caused by stress but not feeding in rabbits. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 290, n. 1, p. R257-64, jan. 2006.

DE MOURA, M. M. et al. Altered cardiovascular reflexes responses in conscious Angiotensin-(1-7) receptor Mas-knockout mice. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1934–9, out. 2010.

DONOGHUE, M. et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation research**, v. 87, n. 5, p. E1-9, 1 set. 2000.

DU, D. et al. The effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) in the rostral ventrolateral medulla of rats on stress-induced hypertension. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e70976, 2013.

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, fev. 2015.

DYER, A. R. et al. HEART RATE AS A PROGNOSTIC FACTOR FOR CORONARY HEART DISEASE AND MORTALITY: FINDINGS IN THREE CHICAGO EPIDEMIOLOGIC STUDIES. **American Journal of Epidemiology**, v. 112, n. 6, p. 736–749, dez. 1980.

EBNER, K. et al. Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 12, p. 4280–5, 23 mar. 2004.

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, mar. 2010.

FELIX, D. et al. Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 17, n. 6_pt_2, p. 1111–1114, jun. 1991.

FIRMINO, E. M. S. et al. Effect of chronic stress on cardiovascular and ventilatory responses activated by both chemoreflex and baroreflex in rats. **The Journal of Experimental Biology**, v. 222, n. 20, p. jeb204883, 15 out. 2019.

FONTES, M. A. P.; MARTINS LIMA, A.; SANTOS, R. A. S. DOS. Brain angiotensin-(1-7)/Mas axis: A new target to reduce the cardiovascular risk to emotional stress. **Neuropeptides**, 26 out. 2016.

FORTALEZA, E. A. T. et al. The medial amygdaloid nucleus modulates the baroreflex activity in conscious rats. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 193, p. 44–50, dez. 2015.

- FORTALEZA, E. A. T.; SCOPINHO, A. A.; CORRÊA, F. M. A. β -Adrenoceptors in the medial amygdaloid nucleus modulate the tachycardiac response to restraint stress in rats. **Neuroscience**, v. 227, p. 170–179, 27 dez. 2012a.
- FORTALEZA, E. A. T.; SCOPINHO, A. A.; CORRÊA, F. M. DE A. α 1 and α 2-adrenoceptors in the medial amygdaloid nucleus modulate differently the cardiovascular responses to restraint stress in rats. **Pharmacological Research**, v. 66, n. 2, p. 154–162, ago. 2012b.
- FORTALEZA, E. A. T.; SCOPINHO, A. A.; DE AGUIAR CORRÊA, F. M. Cardiovascular responses to microinjection of noradrenaline into the medial amygdaloid nucleus of conscious rats result from α 2-receptor activation and vasopressin release. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 9, p. 1677–1684, 2011.
- FORTALEZA, E. A. T.; TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A. The medial amygdaloid nucleus modulates cardiovascular responses to acute restraint in rats. **Neuroscience**, v. 159, n. 2, p. 717–726, 17 mar. 2009.
- FRAGA-SILVA, R. A. et al. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 14, n. 1–2, p. 28–35, 2008.
- FRAGA-SILVA, R. A.; FERREIRA, A. J.; DOS SANTOS, R. A. S. Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor pathway in hypertension. **Current hypertension reports**, v. 15, n. 1, p. 31–8, fev. 2013.
- FREUND, M.; WALTHER, T.; VON BOHLEN UND HALBACH, O. Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1-7) receptor Mas in the murine forebrain. **Cell and tissue research**, v. 348, n. 1, p. 29–35, abr. 2012.
- FURLONG, T. M. et al. The effect of air puff stress on c-Fos expression in rat hypothalamus and brainstem: central circuitry mediating sympathoexcitation and baroreflex resetting. **The European journal of neuroscience**, v. 39, n. 9, p. 1429–38, maio 2014.
- GILABERT-JUAN, J. et al. Chronic stress induces changes in the structure of interneurons and in the expression of molecules related to neuronal structural plasticity and inhibitory neurotransmission in the amygdala of adult mice. **Experimental Neurology**, v. 232, n. 1, p. 33–40, nov. 2011.
- GIRONACCI, M. M. et al. Neuromodulatory role of angiotensin-(1–7) in the central nervous system. **Clinical Science**, v. 125, n. 2, p. 57–65, 1 jul. 2013.
- GLASSMAN, A. H. Depression and cardiovascular comorbidity. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 9–17, 2007.
- GLICK, G.; BRAUNWALD, E.; LEWIS, R. M. Relative Roles of the Sympathetic and Parasympathetic Nervous Systems in the Reflex Control of Heart Rate. **Circulation Research**, v. 16, n. 4, p. 363–375, abr. 1965.
- 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, set. 2004.
- GRASSI, G. et al. Baroreflex Function in Hypertension: Consequences for Antihypertensive Therapy. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 48, n. 6, p. 407–415, maio 2006.
- GRAY, M.; BINGHAM, B.; VIAU, V. A comparison of two repeated restraint stress paradigms on hypothalamic-pituitary-adrenal axis habituation, gonadal status and central

neuropeptide expression in adult male rats. **Journal of neuroendocrinology**, v. 22, n. 2, p. 92–101, fev. 2010.

GRAY, M.; INNALA, L.; VIAU, V. Central vasopressin V1A receptor blockade alters patterns of cellular activation and prevents glucocorticoid habituation to repeated restraint stress exposure. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 17, n. 12, p. 2005–15, dez. 2014.

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, maio 2008.

GUO, D.-F. et al. Identification of a cis -Acting Glucocorticoid Responsive Element in the Rat Angiotensin II Type 1A Promoter. **Circulation Research**, v. 77, n. 2, p. 249–257, ago. 1995.

HABIB, M. et al. The Effects of Antidepressants “Fluoxetine and Imipramine” on Vascular Abnormalities and Toll Like Receptor-4 Expression in Diabetic and Non-Diabetic Rats Exposed to Chronic Stress. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120559, 31 mar. 2015.

HALL, J. E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. **Molecular biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 27–39, maio 2003.

HARE, D. L. et al. Depression and cardiovascular disease: a clinical review. **European heart journal**, v. 35, n. 21, p. 1365–72, 1 jun. 2014.

HARLAN, W. R. Physical and psychosocial stress and the cardiovascular system. **Circulation**, v. 63, n. 1, p. 266A–271A, jan. 1981.

HONZÍKOVÁ, N.; FISER, B. Baroreflex sensitivity and essential hypertension in adolescents. **Physiological Research**, v. 58, n. 5, p. 605–12, 2009.

INUI, K. et al. Facilitation of the arterial baroreflex by the preoptic area in anaesthetized rats. **J Physiol**, v. 488 (Pt 2, p. 521–531, 1995.

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, 6 jul. 2011.

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.

JIN, H.-Y. et al. ACE2 deficiency enhances angiotensin II-mediated aortic profilin-1 expression, inflammation and peroxynitrite production. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38502, 2012.

KARNIK, S. S. et al. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 754–819, 27 ago. 2015.

KIM, M. H.; LEEM, Y. H. Chronic exercise improves repeated restraint stress-induced anxiety and depression through 5HT1A receptor and cAMP signaling in hippocampus. **Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry**, v. 18, n. 1, p. 97–104, mar. 2014.

KORTE, S. M.; DE BOER, S. F. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated

- behaviour in the elevated plus-maze. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 163–75, 28 fev. 2003.
- KRAUSE, E. G. et al. Blood-borne angiotensin II acts in the brain to influence behavioral and endocrine responses to psychogenic stress. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 42, p. 15009–15, 19 out. 2011.
- 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.
- KUBO, T. et al. Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats. **Neuroscience Letters**, v. 354, n. 1, p. 84–86, 2 jan. 2004.
- KVETNANSKY, R. et al. Sympatho-adrenal responses of spontaneously hypertensive rats to immobilization stress. **The American journal of physiology**, v. 236, n. 3, p. H457-62, mar. 1979.
- LEE, B. Bupleurum falcatum Prevents Depression and Anxiety-Like Behaviors in Rats Exposed to Repeated Restraint Stress. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 422–430, 28 mar. 2012.
- LENKEI, Z. et al. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 18, n. 4, p. 383–439, out. 1997.
- LEONG, D. S. et al. Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT(1A), AT(1B) and AT(2) receptors. **Neuroendocrinology**, v. 75, n. 4, p. 227–40, abr. 2002.
- 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.
- LIN, K. S.; CHAN, J. Y.; CHAN, S. H. Involvement of AT2 receptors at NRVL in tonic baroreflex suppression by endogenous angiotensins. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 272, n. 5, p. H2204–H2210, maio 1997.
- LIU, H.-Y. et al. Chronic minocycline treatment reduces the anxiety-like behaviors induced by repeated restraint stress through modulating neuroinflammation. **Brain Research Bulletin**, v. 143, p. 19–26, out. 2018.
- LIU, J. et al. Melanocortin-4 receptor in the medial amygdala regulates emotional stress-induced anxiety-like behaviour, anorexia and corticosterone secretion. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 16, n. 1, p. 105–20, fev. 2014.
- LUOH, H. .; CHAN, S. H. . Participation of AT1 and AT2 receptor subtypes in the tonic inhibitory modulation of baroreceptor reflex response by endogenous angiotensins at the nucleus tractus solitarii in the rat. **Brain Research**, v. 782, n. 1–2, p. 73–82, jan. 1998.
- LYNCH, K. R.; HAWELU-JOHNSON, C. L.; GUYENET, P. G. Localization of brain angiotensinogen mRNA by hybridization histochemistry. **Brain research**, v. 388, n. 2, p. 149–58, jul. 1987.
- MA, S.; MORILAK, D. A. Norepinephrine release in medial amygdala facilitates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to acute immobilisation stress. **Journal of neuroendocrinology**, v. 17, n. 1, p. 22–8, jan. 2005.

- MARIN, M. T. et al. Context-specific modulation of cocaine-induced locomotor sensitization and ERK and CREB phosphorylation in the rat nucleus accumbens. **The European journal of neuroscience**, v. 30, n. 10, p. 1931–40, nov. 2009.
- MARTINS LIMA, A. et al. Activation of angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis attenuates the cardiac reactivity to acute emotional stress. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 305, n. 7, p. H1057-67, 1 out. 2013.
- MAYOROV, D. N.; HEAD, G. A. AT1 receptors in the RVLM mediate pressor responses to emotional stress in rabbits. **Hypertension**, v. 41, n. 5, p. 1168–73, maio 2003.
- MCDOUGALL, S. J. et al. Restraint Stress : Differential Cardiovascular Responses in Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 126–129, 2000a.
- MCDOUGALL, S. J. et al. Characterisation of vasopressin V1A, angiotensin AT1 and AT2 receptor distribution and density in normotensive and hypertensive rat brain stem and kidney: effects of restraint stress11Published on the World Wide Web on 2 October 2000. **Brain Research**, v. 883, n. 1, p. 148–156, 10 nov. 2000b.
- MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiological reviews**, v. 87, n. 3, p. 873–904, jul. 2007.
- MICHELINI, L. C.; BONAGAMBA, L. G. Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats. **Hypertension**, v. 15, n. 2 Suppl, p. I45-50, fev. 1990.
- MILIK, E.; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A.; SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E. Effect of Chronic Mild Stress on AT1 Receptor Messenger RNA Expression in the Brain and Kidney of Rats. **Psychosomatic Medicine**, v. 78, n. 2, p. 208–220, 2016.
- MILLER, A. J.; ARNOLD, A. C. The renin–angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications. **Clinical Autonomic Research**, 9 nov. 2018.
- MOZHUI, K. et al. Strain differences in stress responsivity are associated with divergent amygdala gene expression and glutamate-mediated neuronal excitability. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 15, p. 5357–67, 14 abr. 2010.
- MYERS, B. Corticolimbic regulation of cardiovascular responses to stress. **Physiology & Behavior**, v. 172, p. 49–59, abr. 2017.
- NALIVAIKO, E. Animal models of psychogenic cardiovascular disorders: what we can learn from them and what we cannot. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 38, n. 2, p. 115–125, fev. 2011.
- NECKEL, H. et al. Glutamate and GABA in the medial amygdala induce selective central sympathetic/parasympathetic cardiovascular responses. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 90, n. 5, p. 525–536, maio 2012.
- OHTA, H.; WATANABE, S.; UEKI, S. Cardiovascular changes induced by chemical stimulation of the amygdala in rats. **Brain research bulletin**, v. 26, n. 4, p. 575–81, abr. 1991.
- OLIVEIRA, D. R. et al. Changes in the Baroreflex Control of Heart Rate Produced by Central Infusion of Selective Angiotensin Antagonists in Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 27, n. 6, p. 1284–1290, jun. 1996.

- OSCAR, C. G. et al. Angiotensin-(1-7) in the basolateral amygdala attenuates the cardiovascular response evoked by acute emotional stress. **Brain research**, v. 1594, p. 183–9, 12 jan. 2015.
- PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 33, n. 1, p. 79–83, jan. 2000.
- PALATINI, P.; JULIUS, S. Association of tachycardia with morbidity and mortality: pathophysiological considerations. **Journal of human hypertension**, v. 11 Suppl 1, p. S19–27, ago. 1997.
- PASSOS-SILVA, D. G.; BRANDAN, E.; SANTOS, R. A. S. Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. **Trends in pharmacological sciences**, v. 36, n. 5, p. 310–20, maio 2015.
- PAVEL, J. et al. Peripherally administered angiotensin II AT1 receptor antagonists are anti-stress compounds in vivo. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1148, p. 360–6, dez. 2008.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Sidney, Australia: Academic Press n. 3**, v. 3 ed., 1997.
- PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–67, ago. 1985.
- 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.
- PITKÄNEN, A.; SAVANDER, V.; LEDOUX, J. E. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. **Trends in neurosciences**, v. 20, n. 11, p. 517–23, nov. 1997.
- 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, 13 ago. 2004.
- PRICE, J. L. .; RUSSCHEN, F. T. .; AMARAL, D. G. The limbic region. II. The amygdaloid complex. **Handbook of chemical neuroanatomy**, v. 5, p. 279–388, 1987.
- QUAGLIOTTO, E. et al. Histamine in the posterodorsal medial amygdala modulates cardiovascular reflex responses in awake rats. **Neuroscience**, v. 157, n. 4, p. 709–719, dez. 2008.
- QUAGLIOTTO, E. et al. Neuropeptides in the posterodorsal medial amygdala modulate central cardiovascular reflex responses in awake male rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 128–139, 21 nov. 2014.
- ROSEN, J. B.; DONLEY, M. P. Animal studies of amygdala function in fear and uncertainty: relevance to human research. **Biological psychology**, v. 73, n. 1, p. 49–60, jul. 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, 27 abr. 1999.
- 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, jun. 2004.

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, 5 out. 2006.

SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 803–34, jul. 2003.

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, jan. 1997.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8258–63, 8 jul. 2003.

SANTOS, R. A. S. et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. **Hypertension**, v. 47, n. 5, p. 996–1002, maio 2006.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. **The Journal of endocrinology**, v. 216, n. 2, p. R1–R17, fev. 2013.

SCOTT, S. K. et al. Impaired auditory recognition of fear and anger following bilateral amygdala lesions. **Nature**, v. 385, n. 6613, p. 254–7, 16 jan. 1997.

SEVGI, S.; OZEK, M.; EROGLU, L. L-NAME prevents anxiety-like and depression-like behavior in rats exposed to restraint stress. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 95–9, mar. 2006.

SGOIFO, A.; CARNEVALI, L.; GRIPPO, A. J. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 39, p. 51–60, 2014.

STADLER, T. et al. Angiotensin II evokes noradrenaline release from the paraventricular nucleus in conscious rats. **Brain Research**, v. 569, n. 1, p. 117–122, jan. 1992.

STERLING, P. Allostasis: a model of predictive regulation. **Physiology & behavior**, v. 106, n. 1, p. 5–15, 12 abr. 2012.

SULLEBARGER, J. T. et al. Comparison of phenylephrine bolus and infusion methods in baroreflex measurements. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 69, n. 3, p. 962–7, set. 1990.

THURSTON, R. C.; REWAK, M.; KUBZANSKY, L. D. An anxious heart: anxiety and the onset of cardiovascular diseases. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 55, n. 6, p. 524–37, 2013.

TIPNIS, S. R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33238–43, 27 out. 2000.

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.

VEERASINGHAM, S. J.; RAIZADA, M. K. Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 2, p. 191–202, maio 2003.

- VIANNA, D. M. L.; CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. **The European journal of neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 2505–12, maio 2005.
- VIEIRA, J. O. et al. Sex differences in cardiovascular, neuroendocrine and behavioral changes evoked by chronic stressors in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 426–437, fev. 2018.
- VON BOHLEN UND HALBACH, O. The renin-angiotensin system in the mammalian central nervous system. **Current protein & peptide science**, v. 6, n. 4, p. 355–71, 1 ago. 2005.
- VYAS, A. et al. Chronic Stress Induces Contrasting Patterns of Dendritic Remodeling in Hippocampal and Amygdaloid Neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6810–6818, 1 ago. 2002.
- WATANABE, T. et al. Stress and brain angiotensin II receptors. **Critical reviews in neurobiology**, v. 12, n. 4, p. 305–17, 1998.
- 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, set. 2011.
- XING, J. et al. Angiotensin-(1-7) inhibits neuronal activity of dorsolateral periaqueductal gray via a nitric oxide pathway. **Neuroscience Letters**, v. 522, n. 2, p. 156–161, ago. 2012.
- XU, P. et al. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 574–80, fev. 2008.
- YAMAMOTO, K. et al. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. **Hypertension**, v. 47, n. 4, p. 718–26, abr. 2006.
- YANG, H. J. et al. Effects of *Salvia sclarea* on chronic immobilization stress induced endothelial dysfunction in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 396, 14 dez. 2014.
- 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, ago. 2002.
- ZHANG, Z. Q.; JULIEN, C.; BARRÈS, C. Baroreceptor modulation of regional haemodynamic responses to acute stress in rat. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 60, n. 1–2, p. 23–30, 27 ago. 1996.
- ZHU, D. et al. Angiotensin (1-7) protects against stress-induced gastric lesions in rats. **Biochemical pharmacology**, v. 87, n. 3, p. 467–76, 1 fev. 2014.

ANEXOS

ANEXO 1 – Artigo publicado com os primeiros dados deste trabalho intitulado “*AT₂ and MAS (but not AT₁) angiotensinergic receptors in the medial amygdaloid nucleus modulate the baroreflex activity in rats*”.

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology (2019) 471:1173–1182
<https://doi.org/10.1007/s00424-019-02301-3>

INTEGRATIVE PHYSIOLOGY



AT₂ and MAS (but not AT₁) angiotensinergic receptors in the medial amygdaloid nucleus modulate the baroreflex activity in rats

Willian Costa-Ferreira^{1,2} · Lucas Gomes-de-Souza^{1,2} · Carlos C. Crestani^{1,2} 

Received: 8 May 2019 / Revised: 26 July 2019 / Accepted: 1 August 2019 / Published online: 8 August 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

The medial amygdaloid nucleus (MeA) is a limbic structure that has been demonstrated to be part of the central circuitry regulating baroreflex function. However, the local neurochemical mechanisms involved in baroreflex control by this forebrain structure is poorly understood. Thus, in the present study, we investigated the specific role of AT₁, AT₂, and MAS angiotensinergic receptors within the MeA in baroreflex responses in unanesthetized rats. For this, the baroreflex function was assessed using both the pharmacological approach via intravenous infusion of vasoactive agents and the sequence analysis technique. Using the pharmacological approach, we observed that bilateral microinjection of the selective AT₂ receptor antagonist PD123319 into the MeA increased the tachycardia evoked by blood pressure decrease, but without affecting the reflex bradycardia caused by blood pressure increase. Besides, bilateral microinjection of the selective MAS receptor antagonist A-779 decreased both tachycardic and bradycardic responses of the baroreflex. The sequence analysis technique indicated that PD123319 into the MeA increased baroreflex effectiveness index while A-779 had an opposite effect. Treatment of the MeA with the selective AT₁ receptor antagonist losartan did not affect baroreflex function assessed by either the pharmacological approach or sequence analysis technique. Overall, these findings provide evidence that MAS receptor within the MeA plays a facilitatory role in baroreflex function, whereas local AT₂ receptor inhibits cardiac baroreflex responses. Results also indicate that AT₁ receptor within the MeA is not involved in the control of baroreflex function.

Keywords Amygdala · Losartan · PD123319 · A-779 · AT₂ receptor · MAS receptor · Blood pressure · Heart rate