

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ALINE FASSINI

**Envolvimento da neurotransmissão opioidérgica do córtex pré-
frontal medial na mediação das respostas cardiovasculares
causadas pelo estresse de restrição em ratos**

RIBEIRÃO PRETO

2013

ALINE FASSINI

**Envolvimento da neurotransmissão opioidérgica do córtex pré-
frontal medial na mediação das respostas cardiovasculares
causadas pelo estresse de restrição em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de concentração: Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar
Corrêa

RIBEIRÃO PRETO

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto/USP

Fassini, Aline.

Envolvimento da neurotransmissão opioiédrgica do córtex pré-frontal medial na mediação das respostas cardiovasculares causadas pelo estresse de restrição em ratos. Ribeirão Preto, 2013.

93p.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Corrêa, Fernando Morgan de Aguiar

1. opióide. 2. córtex pré-frontal medial. 3. estresse por restrição.
4. cardiovascular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Aline Fassini

Título: Envolvimento da neurotransmissão opioidérgica do córtex pré-frontal medial na mediação das respostas cardiovasculares causadas pelo estresse de restrição em ratos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: __/__/2013

Banca examinadora

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa

Instituição: FMRP-USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Instituição: FMRP-USP Assinatura: _____

Prof. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes

Instituição: UEL Assinatura: _____

Aos meus pais, por me ensinarem que o conhecimento é o maior tesouro que o homem possui, por não medirem forças para que eu conquistasse todos os meus objetivos e realizasse os meus sonhos,

aos meus irmãos, por apoiarem minhas escolhas, por serem meus companheiros e principalmente por abrirem mão de algumas coisas para que eu pudesse realizar meus sonhos,

ao meu namorado, por me ensinar que a distância não separa dois corações, por todo amor e paciência, e acima de tudo por me entender, não julgar meus desejos, por ser simplesmente, o melhor companheiro.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa, pela orientação, respeito, paciência em ensinar, e acima de tudo, pela sua conduta profissional e pessoal, sendo para nós, um exemplo a ser seguido.

Aos membros da banca examinadora, Prof Dr. Gislane Garcia Pelosi Gomes e Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, pela avaliação e pelas sugestões dedicadas a este trabalho que contribuíram para o seu aprimoramento.

Ao Prof. Dr. Cleber Douglas Lucínio Ramos, por me “apresentar” a farmacologia, por todo o incentivo de fazer pós-graduação, muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel, por todos os ensinamentos que contribuíram para a minha formação, se tornando meu segundo orientador.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que contribuíram para a minha formação durante todo esse período. Em especial ao Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior, pela assessoria prestada a este trabalho.

A Idália I.B. Aguiar, Ivanilda A.C. Fortunato e Laura Camargo, pela dedicação e amizade, pelas conversas e ensinamentos técnicos que foram muito importantes em todas as etapas deste trabalho.

A Simone S. Guilhaume, pela atenção, carinho e disponibilidade durante todo esse tempo.

Aos funcionários Sônia Andrade, José Waldik Ramon e Fátima Petean, por toda competência e atenção com a qual atendem nossas necessidades burocráticas.

A Eliana, Marquinhos e Orlandinho, pela amizade e por cuidarem com carinho dos animais do biotério.

A Diva, pela amizade e alegria e pelo cuidado com o nosso material.

Aos amigos e companheiros de laboratório:

- A América Scopinho, pela sua paciência, por me atender em qualquer horário, sanar minhas dúvidas, saiba que sem você eu não conseguiria ter feito esse trabalho, Sou grata por tudo o que você fez e faz por mim, por ser minha amiga, minha conselheira,

- Ao Leandro Antero, pela sua alegria contagiante e por me aguentar todo esse tempo,

- A Cristiane Busnardo, pela sua amizade incondicional,

- A Sabrina Lisboa, pelo auxílio estatístico,

- A Alessandra, Bruna, Daniel, Dani, Davi, Eduardo, Fernando, Gabi, Josi, Milena, Nilson, Sara, Silvana e Téo, pela amizade e companherismo.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

FASSINI, A. **Envolvimento da neurotransmissão opioidérgica do córtex pré-frontal medial na mediação das respostas cardiovasculares causadas pelo estresse de restrição em ratos**. 2013. 93p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O córtex pré-frontal medial ventral (CPFMv) é uma estrutura límbica que está envolvida em respostas autonômicas associadas a reações aversivas. O CPFMv é dividido em córtex pré-límbico (PL), córtex infralímbico (IL) e córtex dorsopeduncular (DP). A estimulação elétrica ou química destas regiões causa respostas defensivas e alterações autonômicas tais como respostas cardiovasculares, dependendo da sub-região estimulada. O estresse de restrição (ER) causa alterações hormonais e respostas autonômicas, tais como aumento de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC). A ativação de neurônios presentes no CPFMv durante essa situação aversiva, assim como os resultados da inibição farmacológica das sinapses presentes no PL e IL sugerem o envolvimento destas estruturas na modulação das respostas cardiovasculares causadas pelo ER. Entretanto, os possíveis neurotransmissores presentes no vCPFM, envolvidos nesta modulação, ainda não foram elucidados. O sistema opioidérgico central modula o sistema cardiovascular inclusive durante situações aversivas, sendo que tanto receptores quanto peptídeos opióides estão presentes no CPFMv. Considerando o exposto acima, a hipótese a ser testada no presente trabalho foi que a neurotransmissão opioidérgica do PL e IL está envolvida na modulação das respostas cardiovasculares de aumento da PA e FC desencadeadas pelo ER. Assim, a administração de naloxona (antagonista não-seletivo de receptores opióides) no PL ou IL reduziu a resposta pressora e taquicárdica induzida pelo ER, sendo o perfil da curva dose-inibição em forma de U-invertido. A administração de CTAP (antagonista dos receptores opióides μ) ou nor-BNI (antagonista dos receptores opióides κ) no PL também reduziu a resposta pressora e taquicárdica induzida pelo ER, de forma semelhante à naloxona, sugerindo o envolvimento desses receptores na modulação das respostas cardiovasculares desencadeadas pelo ER, enquanto que no IL, apenas a administração de nor-BNI reduziu a resposta cardiovascular induzida pelo ER. O tratamento com naltrindole (antagonista δ -seletivo) em ambas as estruturas não alterou a resposta pressora e taquicárdica gerada pelo ER. A administração de UPF-101 (antagonista ORL-1) no PL potencializou a resposta taquicárdica, sem alterar a resposta pressora enquanto a administração no IL não gerou efeito. Em resumo, os resultados indicam que o sistema opioidérgico, presente no PL e IL, desempenha papel facilitatório sobre as respostas cardiovasculares induzidas pelo ER, enquanto o sistema nociceptina/orfanina FQ apresentaria papel inibitório.

Palavras-chave: opióide, córtex pré-frontal medial, estresse por restrição, cardiovascular.

ABSTRACT

FASSINI, A. **Involvement of opioid neurotransmission of the medial prefrontal cortex in the mediation of cardiovascular responses caused by restraint stress in rats.** 2013. 93p. Master's Degree Work – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The ventral medial prefrontal cortex (vMPFC) is a limbic structure involved in the mediation of autonomic responses associated to aversive situations. The vMPFC is divided into prelimbic cortex (PL), infralimbic cortex (IL) and dorsal peduncular cortex (DP). The electrical or chemical stimulation of these regions cause defensive responses and autonomic changes, such as cardiovascular responses, depending on the subregion stimulated. The restraint stress (RS) evokes hormonal and autonomic responses, as well as arterial pressure and heart rate increases. Neuronal activation in the vMPFC was reported during this aversive situation, and the pharmacological inhibition of synapses in the PL and IL has suggested the involvement of these structures in the modulation of cardiovascular responses caused by RS. However, the possible neurotransmitters present in vMPFC that are involved in this modulation have not yet been identified. Opioid peptides and their receptors are present in the vMPFC. Furthermore, the central opioid system is known to modulate the cardiovascular system, even during aversive situations. Therefore, the hypothesis of this study was that PL and IL opioid neurotransmission is involved in the modulation of cardiovascular responses caused by RS. Naloxone (opioid nonselective antagonist) administration in PL or IL reduced the pressure and tachycardiac response evoked by RS, with the dose-inhibition curve having an U-inverted shape. Similar to naloxone, the selective μ -opioid antagonist CTAP and the selective κ -opioid antagonist nor-BNI when administered into the PL also reduced the pressor and tachycardiac response induced by RS, thus suggesting an involvement of these receptors in the modulation of cardiovascular responses evoked by RS, while in the IL, only administration of nor-BNI reduced the cardiovascular response induced by RS. In both structures, the treatment with the selective δ -opioid antagonist naltrindole did not affect the pressor and tachycardiac response caused by RS. The pretreatment of the PL with the selective ORL-1 antagonist UPF-101 increased the tachycardiac response, without affecting the RS-evoked pressor, while the administration of UPF-101 into the IL did not affect the RS-evoked cardiovascular response. In summary, the opioid system in PL and IL appear to play a facilitatory role on the cardiovascular responses induced by RS, while the system nociceptin / orphanin FQ would have an inhibitory role on these responses.

Keywords: opioid, medial prefrontal cortex, restraint stress, cardiovascular.

LISTA DE ABREVIATURAS

Cg1 – córtex cíngulo 1

Cg2 – córtex cíngulo 2

CPF – córtex préfrontal

CPFM – córtex préfrontal medial

CPFMv – córtex préfrontal medial ventral

CVLM – núcleo caudoventrolateral

DP – córtex dorsopeduncular

ER – estresse de restrição

FC – frequência cardíaca

i.c.v – intracerebroventricular

IL – córtex infralímbico

i.v. - intravenosa

LCA – líquido cefalorraquidiano artificial

nal - naloxona

NTS – núcleo trato solitário

PA – pressão arterial

PAM – pressão arterial média

PL – córtex pré-límbico

POMC – pré-próopiomelanocortina

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

RVLM – núcleo rostroventrolateral

SNC – sistema nervoso central

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	19
MATERIAIS E MÉTODOS	21
1) Animais	22
2) Técnica de implante de cânula-guia no PL ou IL.....	22
3) Canulação da artéria femoral.....	23
4) Registro da pressão arterial e frequência cardíaca	24
5) Técnica para microinjeção de drogas no PL e IL.....	24
6) Estresse por Restrição	24
7) Drogas utilizadas.....	24
8) Determinação anatômica do sítio de injeção.....	25
9) Análise estatística.....	26
PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS	28
1) Efeito da microinjeção de antagonista não seletivo dos receptores opióides no PL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER.....	29
2) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores μ -opióide no PL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER.....	29
3) Efeito da administração de antagonista dos receptores κ -opióide no PL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER.....	30
4) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores δ -opióide no PL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER.....	30
5) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores κ -opióide + antagonista dos receptores μ -opióide no PL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER.....	30
6) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores ORL-1 no PL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER.....	31
7) Efeito da microinjeção de antagonista não seletivo dos receptores opióides no IL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER.....	31
8) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores μ -opióide no IL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER.....	31
9) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores κ -opióide no IL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER.....	32
10) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores δ -opióide no IL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER.....	32
11) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores ORL-1 no IL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER.....	32

RESULTADOS	33
1) Córtex pré-límbico	34
1.1) Efeito da microinjeção bilateral de naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides) no PL sobre as respostas cardiovasculares induzidas pelo ER.....	34
1.2) Efeito da microinjeção bilateral de CTAP, antagonista μ -seletivo, no PL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER.	44
1.3) Efeito da microinjeção bilateral de nor-BNI, antagonista κ -seletivo, no PL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER.....	46
1.4) Efeito da microinjeção bilateral de naltrindole, antagonista δ -seletivo, no PL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER.....	48
1.5) Efeito da microinjeção bilateral de CTAP (antagonista μ -seletivo) + nor-BNI (antagonista κ -seletivo) no PL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER.	50
1.6) Efeito da microinjeção bilateral de UPF-101, antagonista ORL-1 seletivo, no PL sobre a PA e FC durante o ER.	53
2) Córtex infralímbico	56
2.1) Efeito da microinjeção bilateral de naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides) no IL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER.	56
2.2) Efeito da microinjeção bilateral de CTAP, antagonista μ -seletivo, no IL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER.	64
2.3) Efeito da microinjeção bilateral de nor-BNI, antagonista κ -seletivo, no IL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER.	66
2.4) Efeito da microinjeção bilateral de naltrindole, antagonista δ -seletivo, no IL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER.....	68
2.5) Efeito da microinjeção bilateral de UPF-101, antagonista ORL-1 seletivo, no IL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER.....	70
DISCUSSÃO	73
CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular possui um importante papel na manutenção da homeostasia, promovendo o fluxo sanguíneo e distribuição de nutrientes adequados a todos os tecidos. Mecanismos reflexos neurais, entre outros, estão envolvidos na regulação do sistema cardiovascular, possibilitando a modulação de variáveis como frequência cardíaca (FC), volume sistólico, resistência periférica e, conseqüentemente, a pressão arterial (PA) (SPYER, 1990).

Regiões específicas do sistema nervoso central (SNC), incluindo regiões bulbares e suprabulbares, estão envolvidas no controle do sistema cardiovascular. Centros bulbares, tais como o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo ambíguo, núcleo dorsal do vago e os núcleos rostroventrolateral (RVLM) e caudoventrolateral (CVLM) são responsáveis pela manutenção do tônus pressórico geral e pelo controle instantâneo da pressão arterial e da frequência cardíaca (CHALMERS e PILOWSKY, 1991; GOLDSTEIN, 1991). Os neurônios do RVLM determinam a frequência de descarga dos neurônios pré-ganglionares simpáticos envolvidos na manutenção do tônus vascular (GUYENET *et al.*, 1990; VERBERNE e OWENS, 1998) e medeiam os componentes simpáticos dos reflexos cardiovasculares (GUYENET *et al.*, 1990). Os núcleos dorsal do vago e ambíguo são responsáveis pela atividade parassimpática eferente (MCALLEN e SPYER, 1976), compondo os reflexos cardiovasculares, tais como o barorreflexo arterial, o quimiorreflexo e o reflexo cardiopulmonar, os quais permitem ajustes instantâneos da pressão arterial em respostas a alterações posturais, respiratórias e de volume sanguíneo (GOLDSTEIN, 1991; TAYLOR *et al.*, 1999).

A modulação dos neurônios bulbares pode ocorrer por ativação de áreas prosencefálicas, devido a conexões recíprocas entre essas estruturas (HILTON, 1966; LOEWY, 1981; DAMPNEY *et al.*, 1987; LOEWY, 1991; VERBERNE, 1995; 1996; VERBERNE e OWENS, 1998). O controle do sistema cardiovascular, exercido por estruturas prosencefálicas, ocorre principalmente em situações comportamentais. Dentre estas estruturas

se destacam o hipotálamo, amígdala, área septal e em particular, regiões específicas do córtex cerebral (LOEWY e MCKELLAR, 1980; LOEWY, 1991; DAMPNEY, 1994).

O córtex pré-frontal (CPF) de ratos pode ser dividido em três regiões distintas (LEONARD, 1969; KRETTEK e PRICE, 1977; SARTER e MARKOWITSCH, 1983; 1984; GROENEWEGEN, 1988; SESACK *et al.*, 1989). A primeira, chamada córtex pré-frontal medial (CPFM), constitui a maior porção do CPF; a segunda é chamada de córtex pré-frontal orbital, e a terceira, é conhecida como córtex pré-frontal lateral ou córtex agranular insular. Em particular, o CPFM foi dividido em córtex pré-límbico (PL), córtex infralímbico (IL) e córtex dorsopeduncular (DP), que formam o córtex pré-frontal medial ventral (CPFMv), e córtex cingulado 1 e 2 (Cg1 e Cg2)(PAXINOS, 2007). O CPFM tem sido descrito estar envolvido na modulação do sistema nervoso autônomo, devido a conexões extensas entre o CPFM e estruturas envolvidas na regulação de funções autônomas, associadas a reações defensivas (NEAFSEY, 1990; HURLEY *et al.*, 1991; FRYSZTAK e NEAFSEY, 1994; MCDONALD *et al.*, 1996; VERBERNE e OWENS, 1998; VERTES, 2004).

Uma série de trabalhos na literatura relata que a estimulação do CPFM causa alterações cardiovasculares (FISK e WYSS, 1997; OWENS *et al.*, 1999; FISK e WYSS, 2000; OWENS e VERBERNE, 2000; ISHIKAWA e NAKAMURA, 2003). A estimulação elétrica do CPFMv causou resposta pressora em ratos não anestesiados, a qual foi bloqueada pelo tratamento intravenoso com um bloqueador ganglionar, sugerindo que o CPFMv possui ações funcionais excitatórias sobre o sistema nervoso simpático (TAVARES *et al.*, 2004). Os efeitos gerados pela estimulação elétrica dessa área sobre o sistema cardiovascular não são decorrentes da estimulação de fibras de passagem, uma vez que a estimulação química do mesmo sítio também causa respostas cardiovasculares. A microinjeção de noradrenalina no CPFMv tem sido relatada por evocar respostas pressoras, as quais são mediadas por liberação de vasopressina, enquanto a estimulação de receptores NMDA com glutamato causa aumento

de PA e FC decorrente da ativação do sistema simpático (FERNANDES *et al.*, 2003; RESSTEL e CORREA, 2006a). Além disso, foi mostrado que o CPFMV está envolvido na modulação da atividade do barorreflexo, tanto do componente simpático, como do parassimpático (RESSTEL *et al.*, 2004; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2012). Esse conjunto de dados sugere que o CPFMV está envolvido na modulação do sistema cardiovascular.

O CPFMV, como parte do sistema límbico, integra respostas do sistema nervoso autônomo a estímulos emocionais (NEAFSEY, 1990; FRYSZTAK e NEAFSEY, 1994; RESSTEL e CORREA, 2006b; TAVARES e CORREA, 2006). O estresse de restrição (ER) foi padronizado na literatura como uma situação aversiva que causa aumento da PA e da FC, e queda da temperatura cutânea (BARRON e VAN LOON, 1989; KRIEMAN *et al.*, 1992; IRVINE *et al.*, 1997; BHATNAGAR *et al.*, 1998; MCDUGALL *et al.*, 2000; BUSNARDO *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2011). Ratos submetidos ao ER apresentam aumento da atividade neuronal no CPFM, sugerindo o envolvimento desta estrutura na modulação de respostas ocasionadas por exposição a este modelo aversivo (IMAKI *et al.*, 1993; YOKOYAMA e SASAKI, 1999).

Um estudo comparativo dos efeitos da inibição farmacológica da neurotransmissão do PL e IL sobre o aumento da PA e FC causada pelo ER mostrou que o bloqueio de sinapses no PL aumentava a taquicardia sem afetar a hipertensão. Todavia, o bloqueio sináptico do IL reduziu a taquicardia sem afetar a resposta pressora, sugerindo que o PL e IL exerçam papéis opostos sobre a resposta cardíaca evocada pelo ER (TAVARES e CORREA, 2006; TAVARES *et al.*, 2009a). Outros autores também sugeriram que as subdivisões PL e IL do CPFM modulam respostas cardiovasculares e comportamentais durante situações defensivas de forma diferente (JASKIW e WEINBERGER, 1990; JINKS e MCGREGOR, 1997).

Embora os resultados descritos acima demonstrem o envolvimento do CPFMV na modulação de respostas cardiovasculares durante o ER, ainda não se sabe quais os possíveis neurotransmissores envolvidos nesta modulação.

O sistema opioidérgico central está envolvido no controle de respostas cardiovasculares (BOLME *et al.*, 1978; PFEIFFER *et al.*, 1983a; PFEIFFER *et al.*, 1983b; KIRITSY-ROY *et al.*, 1986; FLORENTINO *et al.*, 1987; MARSON *et al.*, 1989; JIMENEZ *et al.*, 1990; PAAKKARI *et al.*, 1992; BACHELARD e PITRE, 1995; HOUDI *et al.*, 1996; HILL *et al.*, 2002; RAO *et al.*, 2003); sendo constituído por três famílias de peptídeos opióides clássicos já identificados: as encefalinas, endorfinas e dinorfinas, com distribuição anatômica e precursores distintos. A β -endorfina é derivada da pré-próopiomelanocortina (POMC), produzida principalmente em células do núcleo arqueado e núcleo do trato solitário que se projetam amplamente para áreas límbicas, tronco cerebral e medula espinhal (LIOTTA *et al.*, 1984; LE MERRER *et al.*, 2009). As encefalinas derivam da pré-proencefalina e, a pré-prodinorfina é precursora da dinorfina A, dinorfina B e da neoendorfina, sendo que esses precursores estão distribuídos amplamente pelo SNC e em geral coexistem em um mesmo neurônio (WEIHE *et al.*, 1988; LE MERRER *et al.*, 2009). Recentemente, outro peptídeo opióide foi clonado, sendo denominado nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) (MEUNIER *et al.*, 1995; REINSCHIED *et al.*, 1995). Foi demonstrada a presença de peptídeos opióides e de seus precursores no córtex cerebral (SIMANTOV *et al.*, 1977; GOLDSTEIN e GHAZAROSSIAN, 1980; WEBER *et al.*, 1982; CONE *et al.*, 1983; ZAMIR *et al.*, 1984; NEAL *et al.*, 1999; LERICHE *et al.*, 2007), sugerindo a existência de um sistema opioidérgico funcional no córtex.

O sistema opioidérgico apresenta uma grande variedade de receptores. Inicialmente foram identificados os receptores μ , κ , e δ (HUGHES *et al.*, 1975; MARTIN *et al.*, 1976). Recentemente foi clonado o receptor ORL1- receptor como de opióide tipo 1 (BUNZOW *et*

al., 1994; MOLLEREAU *et al.*, 1994). Além desses receptores, outros subtipos foram propostos com base em bioensaios utilizando diferentes animais, sendo designados ϵ (SCHULZ *et al.*, 1979), ζ (ZAGON *et al.*, 1989), ι (OKA, 1980), λ (GREVEL e SADEE, 1983). Há evidências da presença de receptores opióides μ , δ , κ e ORL-1 no córtex (MANSOUR *et al.*, 1987; JOMARY *et al.*, 1988; DEPAOLI *et al.*, 1994; GEORGE *et al.*, 1994; ARDATI *et al.*, 1997; PRADHAN e CLARKE, 2005; MCDONALD e LAMBERT, 2010).

Em 1978, Bolme e colaboradores relataram que a administração de diferentes peptídeos endógenos, via intracisterna magna, em ratos anestesiados, causava respostas pressoras ou depressoras, dependendo do peptídeo microinjetado. Além disso, outro trabalho demonstrou que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de DAMGO (agonista μ) em animais anestesiados causava tanto aumento quanto diminuição da PA, dependendo da dose utilizada, enquanto a administração i.c.v. de dinorfina (κ agonista) causava diminuição da PA, e o bloqueio com antagonista μ não competitivo irreversível, β -funaltrexamina - β -FNA causava diminuição da PA e o bloqueio com antagonista κ , nor-BNI, causava aumento da PA (RAO *et al.*, 2003). Todos esses resultados sugerem a participação de múltiplos receptores opióides presentes no SNC na modulação do sistema cardiovascular.

Florentino *et al.* (1987) demonstraram que administração intraperitoneal de naloxona em ratos submetidos a diferentes estímulos estressantes (por exemplo: frio, privação social, choque na pata) reduziu a resposta cardiovascular ao estímulo. A resposta hipertensiva à privação social foi antagonizada pela administração i.c.v. de naloxona (JIMENEZ *et al.*, 1990). Marson *et al.* (1989), demonstraram que a administração i.c.v. de DAGO (agonista μ -seletivo) ou DPDPE (agonista δ -seletivo) diminui os aumentos da FC e PA induzidos pelo ER, sendo esta diminuição bloqueada pela administração intra-arterial de naloxona, mas não por administração i.c.v. de ICI 174864 (antagonista δ -seletivo). Todos esses resultados

sugerem que o sistema opioide central também estaria envolvido no controle cardiovascular durante situações aversivas.

Baseado nos fatos descritos acima, que revelam que as subdivisões PL e IL do CPFMV estão envolvidas na modulação de respostas cardiovasculares durante o ER,;que o CPFMV apresenta receptores e peptídeos opióides, e que o sistema opioide central modula o sistema cardiovascular, inclusive durante situações aversivas, a hipótese do presente trabalho é que a neurotransmissão opioide do PL e/ou IL está envolvida na modulação das respostas autonômicas desencadeadas pelo ER.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

1) Avaliar a participação do sistema opioidérgico do córtex PL e IL na mediação das respostas cardiovasculares de aumento de PA e FC induzidas pelo ER, através da administração local de naloxona (antagonista opióide não-seletivo).

2) Determinar farmacologicamente quais os subtipos de receptores opioidérgicos, presentes no PL e IL, estão envolvidos na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pelo ER, através da microinjeção local de antagonistas seletivos para os receptores μ , δ , κ e ORL-1.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Animais

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar com peso variando entre 240-290 g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da USP de Ribeirão Preto sendo mantidos em caixas individuais, com alimentação de ração e água. Os animais foram submetidos à alternância de luz (12 h claro/12 h escuro). O protocolo para uso de animais em experimentação seguiu as normas da comissão de ética em experimentação animal (CETAE) e esteve de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA), nº 173/2011.

2) Técnica de implante de cânula-guia no PL ou IL

O anestésico utilizado para este procedimento cirúrgico foi o tribromo-cloro-etanol (Aldrich Chemical Co. Inc.) na dose de 250 mg/Kg via intraperitoneal. A cabeça do animal foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, USA) e após tricotomia, foi feita assepsia do local com álcool a 70%. A seguir, foram injetados 0,3 mL de lidocaína com vasoconstritor subcutaneamente para anestesia local do escalpo. A calota craniana foi exposta pela incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se todo o periósteo. A assepsia local foi feita com salina e água oxigenada a 10%. As coordenadas utilizadas foram determinadas a partir do Atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 2007):

Córtex pré-límbico (PL):

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

Lateral: + 1,9 mm em relação à sutura sagital

Vertical: - 2,4 mm em relação à estrutura óssea da calota craniana

Inclinação lateral: 22°

Incisivo: + 3,2 mm

Córtex infralímbico (IL):

Antero-posterior: + 3,3 mm em relação ao bregma

Lateral: + 2,7 mm em relação à sutura sagital

Vertical: - 3,2 mm em relação à estrutura óssea da calota craniana

Inclinação lateral: 22°

Incisivo: + 3,2 mm

Com o auxílio de broca odontológica, foi realizada a trepanação do crânio e as cânulas guia foram introduzidas bilateralmente no PL ou IL. As cânulas são constituídas de segmentos de agulha hipodérmica com 11 mm de comprimento e 0,55 mm de diâmetro externo, 24G. Elas foram fixadas ao crânio com resina acrílica autopolimerizável e um pequeno parafuso foi fixado na calota craniana. Mandris com 0,2 mm de diâmetro externo e 11 mm de comprimento foram introduzidos nas cânulas, com o objetivo de se evitar sua obstrução durante o período de recuperação pós-cirurgia. Ao final da cirurgia, os animais receberam 0,3 mL de Pentabiótico veterinário (White, Brasil) por via intramuscular e 2,5 mg/Kg do analgésico e antiinflamatório flunixinina meglumina (Banamine, Schering-Plough, Brasil) por via subcutânea.

3) Canulação da artéria femoral

Após 72 h da cirurgia para implante da cânula-guia no crânio, os animais foram novamente anestesiados com tribromo-cloro-etanol e uma cânula de polietileno foi implantada na artéria femoral, sendo introduzida até a aorta abdominal inferior. A cânula foi constituída por segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) fundido a segmento de polietileno PE-50 (14-15 cm), sendo preenchida com salina (NaCl a 0,9%) contendo anticoagulante (solução a 0,25%, 5U/mL de heparina) e obstruída com um pino de metal. Os registros de PA e FC foram realizados através dessa cânula femoral, 24h após a cirurgia com os animais não anestesiados.

4) Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

A cânula implantada na artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão arterial (Hewlett Packard, USA) por meio de um segmento de polietileno PE-50. A PA e FC foram registradas por meio de um pré-amplificador de um polígrafo HP7754-A (Hewlett Packard, USA) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (MP-100, Biopac, USA).

5) Técnica para microinjeção de drogas no PL e IL

A drogas foram dissolvidas em líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) (NaCl 100mM; Na₃PO₄ 2mM; KCl 2,5mM; MgCl₂ 1,0mM; NaHCO₃ 27mM; CaCl₂ 2,5mM; pH=7,4), e administradas diretamente no PL ou IL. Para as microinjeções de drogas foi utilizada uma seringa de 1 µL, modelo KH-7001 (Hamilton, USA) conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha microinjetora de metal (33 G) 1,0 mm mais longa do que a cânula-guia. Todas as microinjeções foram realizadas no volume de 100 nL, bilateralmente.

6) Estresse por Restrição

O tubo de restrição é constituído por um tubo cilíndrico de plástico, medindo 15 cm de comprimento e 6,5 cm de diâmetro. O rato permaneceu no tubo por 1 h, caracterizando um estresse agudo, e a PA e FC registradas continuamente durante a sua permanência no tubo.

7) Drogas utilizadas

-Cloridrato de Naloxona (Tocris, USA): antagonista não seletivo de receptores opióides μ , δ e κ .

-CTAP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂-Tocris,USA): antagonista de receptores opióides μ .

-Cloridrato de Naltrindole (Tocris, USA): antagonista de receptores opióides δ .

- Nor-BNI - Dicloridrato de nor-binaltorfimina (Tocris, USA): antagonista de receptores opióides κ .

-UPF-10 ([Nphe(1),Arg(14),Lys(15)]N/OFQ-NH(2) - Tocris, USA): antagonista de receptores ORL-1.

Todos os antagonistas foram diluídos em líquido cefalorraquidiano artificial (LCA).

-Uretana (Sigma, USA), anestésico utilizado para a perfusão dos animais.

-Tribromoetanol (Aldrich Chemical Co. Inc., USA), anestésico utilizado para os procedimentos cirúrgicos.

-Pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, Brasil), antibiótico administrado como profilático.

-Banamine (Schering-Plough Veterinária, Brasil), analgésico administrado como profilático.

8) Determinação anatômica do sítio de injeção

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2g/kg i.p., Sigma, USA). O corante azul de Evan a 1% foi injetado no local da microinjeção das drogas, para determinação do sítio de injeção. Em seguida, os ratos foram submetidos à perfusão cerebral. Para isso, abriu-se a caixa torácica para exposição do coração, e em seguida a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática. Uma agulha para perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo, e uma incisão foi feita na aurícula direita para o escoamento do sangue e do perfusado. A perfusão foi realizada inicialmente com 20 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%), seguida por 20mL de solução tamponada de formalina a 10%. Posteriormente, os cérebros foram retirados da caixa craniana e pós-fixados em solução de perfusão. Os cérebros foram seccionados com o auxílio de um criostato (à 40 micras).

Foram feitas várias secções da área do PL e IL, coradas com cresil violeta a 0,5% e analisadas utilizando-se o atlas (PAXINOS e WATSON, 2007) como referência.

9) Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa Prism (GraphPad, USA). O teste t de Student pareado foi utilizado para comparar os valores basais de PA e FC antes e após os tratamentos farmacológicos. As alterações cardiovasculares foram analisadas pelo teste de análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) utilizando-se os fatores de tratamento (controle ou droga) e o tempo como medida repetida. Para o tratamento com o antagonista não-seletivo em ambas as estruturas, utilizou-se o programa SPSS (Statistical Analyse, USA). No caso de evidenciar diferenças entre o tratamento e tempo, foi utilizada Two-way ANOVA. Em caso de interação positiva, fez-se uma análise de variância de uma via (One-way ANOVA) para evidenciar diferenças entre os tratamentos, seguido do pós-teste de Duncan.

Os valores de PA e FC foram continuamente registrados por 10 min antes (basal) e 60 min durante a restrição. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) das variações de PAM ou das variações da FC da linha basal (Δ PA e Δ FC), de onde foi coletado com uma amostragem de 1 ponto por minuto. Para propósito estatístico, as curvas de 70 pontos foram reconstruídas com seis pontos, correspondentes ao número de animais por grupo: o 1º ponto foi obtido fazendo-se uma média aritmética de pontos entre -10 a -6min, o 2º ponto entre -5 a -1min, o 3º ponto será obtido no minuto 0, o 4º ponto entre 2 a 16 min, o 5º ponto entre 17 a 31 min e o 6º ponto entre 32 a 60 min. Os dois primeiros pontos correspondem ao período basal que antecede o início da restrição, enquanto os quatros últimos correspondem ao período de restrição.

Foram considerados como significativos os resultados que apresentaram $P < 0,05$. Porém, para a representação no gráfico, as curvas de 70 pontos foram reamostradas em 35 pontos.

Para a construção da curva dose-inibição, foi calculada a área sob a curva individualmente para cada animal, e a partir desses valores, admitimos que a média da área sob a curva dos animais pertencentes ao grupo controle correspondia a 100% do efeito, calculamos a porcentagem de efeito de cada animal obteve, e conseqüentemente, a porcentagem de inibição gerada pelo tratamento. Com base na porcentagem de inibição, foi gerada uma curva de regressão não-linear, do tipo *sine-wave*.

PROCOLOS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos, os animais foram levados em suas respectivas caixas à sala de experimentação. Os animais permaneceram 1h para adaptação as condições da sala experimental, como som e iluminação. A sala experimental foi acusticamente isolada e possui ruído de fundo constante produzido por um exaustor de ar. Cada animal foi conectado ao sistema de registro da pressão arterial, em sua caixa, para registro da PA e FC por 10 min. Em seguida, foi realizada uma microinjeção bilateral da droga ou veículo em cada animal, aplicada 10 min antes da restrição. O animal, ainda conectado ao sistema de registro da pressão arterial, foi transferido para o tubo de restrição, onde permaneceu por 1 h. A PA e FC foram registradas durante todo o período de restrição. Cada animal foi submetido a uma seção de restrição para evitar a habituação.

1) Efeito da microinjeção de antagonista não seletivo dos receptores opióides no PL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER

Este protocolo teve por objetivo determinar se o sistema opioidérgico presente no córtex PL está envolvido na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pelo ER. Foi microinjetado bilateralmente 100 nL de veículo ou naloxona, um antagonista de receptores opióides μ , δ e κ não seletivo, nas doses de 30; 3; 0,3; 0,03 ou 0,003nmol/100nL (KIRITSY-ROY *et al.*, 1986; KIM *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001) e 10 min após, os animais foram submetidos ao ER.

2) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores μ -opióide no PL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER

Este protocolo teve por objetivo determinar se os receptores μ -opióide do PL estão envolvidos na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pelo ER. Foi microinjetado bilateralmente 100 nL de veículo (LCA) ou 0,3 nmol/100nL de CTAP (dose

calculada com base no K_i do antagonista não-seletivo, naloxona) e 10 min após, os animais foram submetidos ao ER.

3) Efeito da administração de antagonista dos receptores κ -opióide no PL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER

Este protocolo teve por objetivo determinar se os receptores κ -opióide do PL estão envolvidos na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pelo ER. Foi microinjetado bilateralmente 100 nL de veículo (LCA) ou 0.003 nmol/100nL de nor-BNI (dose calculada com base no K_i do antagonista não-seletivo, naloxona) e 10 min após, os animais foram submetidos ao ER.

4) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores δ -opióide no PL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER

Este protocolo teve por objetivo determinar se os receptores δ -opióide do PL estão envolvidos na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pelo ER. Foi microinjetado bilateralmente 100 nL de veículo (LCA) ou 0,3 nmol/100nL de naltrindole (dose calculada com base no K_i do antagonista não-seletivo, naloxona) e 10 min após, os animais foram submetidos ao ER.

5) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores κ -opióide + antagonista dos receptores μ -opióide no PL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER

Este protocolo teve por objetivo determinar se os receptores κ e μ -opióide do PL são os receptores efetadores da atenuação da taquicardia e aumento de pressão arterial evocados pelo ER causado pela administração de 0,3nmol de naloxona. Foi microinjetado bilateralmente 100 nL de veículo (LCA) ou 0,003 nmol de nor-BNI + 0,3nmol de CTAP / 100nL, e 10 min após, os animais foram submetidos ao ER.

6) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores ORL-1 no PL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER

Este protocolo teve por objetivo determinar se os receptores ORL-1 do PL estão envolvidos na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pelo ER. Foi microinjetado bilateralmente 100 nL de veículo (LCA) ou 0,3 nmol/100nL de UFP-101 (dose calculada com base no K_i do antagonista não-seletivo, naloxona) e 10 min após, os animais foram submetidos ao ER.

7) Efeito da microinjeção de antagonista não seletivo dos receptores opióides no IL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER

Este protocolo teve por objetivo determinar se o sistema opioidérgico presente no córtex IL está envolvido na modulação das respostas cardiovasculares durante o ER. Foi microinjetado bilateralmente 100 nL de veículo (LCA) ou naloxona, um antagonista de receptores opióides μ , δ e κ não-seletivo, nas doses de 3; 0,3 ou 0,03nmol/100nL (KIRITSY-ROY *et al.*, 1986).

8) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores μ -opióide no IL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER

Este protocolo teve por objetivo determinar se os receptores μ -opióide do IL estão envolvidos na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pelo ER. Foi microinjetado bilateralmente 100 nL de veículo (LCA) ou 0,3 nmol/100nL de CTAP (dose calculada com base no K_i do antagonista não-seletivo, naloxona) e 10 min após, os animais foram submetidos ao ER.

9) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores κ -opióide no IL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER

Este protocolo teve por objetivo determinar se os receptores κ -opióide do IL estão envolvidos na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pelo ER. Foi microinjetado bilateralmente 100 nL de veículo (LCA) ou 0,03 nmol/100nL de nor-BNI (dose calculada com base no K_i do antagonista não-seletivo, naloxona) e 10 min após, os animais foram submetidos ao ER.

10) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores δ -opióide no IL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER

Este protocolo teve por objetivo determinar se os receptores δ -opióide do IL estão envolvidos na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pelo ER. Foi microinjetado bilateralmente 100 nL de veículo (LCA) ou 0,3 nmol/100nL de naltrindole (dose calculada com base no K_i do antagonista não-seletivo, naloxona) e 10 min após, os animais foram submetidos ao ER.

11) Efeito da microinjeção de antagonista dos receptores ORL-1 no IL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER

Este protocolo teve por objetivo determinar se os receptores opióide ORL-1 do IL estão envolvidos na modulação das respostas cardiovasculares induzida pelo ER. Foi microinjetado bilateralmente 100 nL de veículo (LCA) ou 0,3 nmol/100nL de UFP-101 (dose calculada com base no K_i do antagonista não-seletivo, naloxona) e 10 min após, os animais foram submetidos ao ER.

RESULTADOS

1) Córtex pré-límbico

1.1) Efeito da microinjeção bilateral de naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides) no PL sobre as respostas cardiovasculares induzidas pelo ER

A microinjeção bilateral de 100 nL de veículo (LCA) ou naloxona (0,003; 0,03; 0,3; 3 e 30nmol/100nL) no PL não alterou os valores basais de PA e FC (Tabela 1 e 2, respectivamente).

A análise de variância, two-way ANOVA, demonstrou que o tratamento com naloxona no PL reduziu a elevação da PA e FC provocada pelo ER quando comparada ao grupo que recebeu veículo (PAM – Tempo: $F_{5,31}=88,284$, $p<0,001$; Tratamento $F_{5,35}=9,309$, $p<0,001$; Interação: $F_{25,147}=3,442$, $p<0,001$; FC – Tempo: $F_{5,31}=57,197$, $p<0,001$; Tratamento $F_{5,35}=5,665$, $p<0,001$; Interação: $F_{25,147}=1,941$, $p<0,001$). A análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Duncan demonstrou que o tratamento do PL com as doses de 0,03, 0,3 e 3 nmol de naloxona atenuaram as respostas pressora e taquicárdica induzidas pelo ER. No ponto 3 a dose de 0,3nmol de naloxona ($F_{5,35}=2,301$, $p=0,66$, Duncan), nos pontos 4, 5 e 6 as doses de 0,03, 0,3 e 3nmol de naloxona foram capazes de atenuar o aumento de PA (Ponto 4 – $F_{5,35}=7,41$, $p<0,001$, Ponto 5 – $F_{5,35}=14,613$, $p<0,001$, Ponto 6 – $F_{5,35}=6,531$, $p<0,001$, Duncan). Em relação a FC, no ponto 4, 5 e 6 as doses de 0,03, 0,3 e 3nmol de naloxona foram capazes de atenuar a resposta taquicárdica (Ponto 4 – $F_{5,35}=4,592$, $p=0,003$, Ponto 5 – $F_{5,35}=7,131$, $p<0,001$, Ponto 6 – $F_{5,35}=5,027$, $p<0,001$, Duncan), figura 1-5.

A análise da regressão não-linear gerou uma curva de inibição do tipo U-invertido, tanto para a PA ($r^2=0,65$, $df=29$, $p<0,05$) quanto para FC ($r^2=0,46$, $df=29$, $p<0,05$), figura 6.

As respostas pressoras e taquicárdicas causadas pelo ER não diferiram entre os animais tratados com veículo no PL ou com 3nmol de naloxona em áreas adjacentes ao PL

(PAM – Interação: $F_{5,84}=0,53$, $P=0,74$; Tratamento: $F_{1,84}=0,86$, $P=0,35$; Tempo: $F_{5,84}=42,51$, $P<0,0001$; FC – Interação: $F_{5,84}=1,1$, $P=0,36$; Tratamento: $F_{1,84}=0,95$, $P=0,33$; Tempo: $F_{5,84}=25,93$, $P<0,0001$, ANOVA de 2 fatores).

A representação diagramática indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de veículo ou naloxona no cérebro dos ratos utilizados nesse protocolo e fotomicrografia representativa de secção coronal do cérebro de um rato demonstrando sítios bilaterais estão apresentadas na Figura 7 e 8, respectivamente.

Tabela 1 – Valores basais de pressão arterial media (PAM) antes e depois da microinjeção de veículo ou diferentes doses de naloxona (antagonista não-seletivo de receptores opióides) no PL de ratos.

Naloxona (nmol/100nL)	Antes (PAM) ± EPM (mmHg)	Depois (PAM) ± EPM (mmHg)	t=	n=
0	94,8 ± 3,1	92,2 ± 3,3	2,2	8
0,003	90,1 ± 3,3	89,4 ± 3,0	1,26	6
0,03	90,2 ± 2,1	91,2 ± 2,6	1,07	6
0,3	100,8 ± 3,5	101,4 ± 4,0	0,68	6
3	96,7 ± 1,8	95,62 ± 1,7	2,34	8
30	85,9 ± 1,7	85,8 ± 1,1	0,07	7

Tabela 2 – Valores basais de frequência cardíaca (FC) antes e depois da microinjeção de veículo ou diferentes doses de naloxona (antagonista não-seletivo de receptores opióides) no PL de ratos.

Naloxona (nmol/100nL)	Antes (FC) ± EPM (bpm)	Depois (FC) ± EPM (bpm)	t=	n=
0	354,8 ± 9,8	356,7 ± 12,5	0,35	8
0,003	382,5 ± 11,7	379,2 ± 13,2	1,03	6
0,03	384,1 ± 6,6	382,5 ± 6,2	1,22	6
0,3	371,3 ± 9,8	372,1 ± 10,3	0,27	6
3	368,9 ± 6,9	367,7 ± 5,3	0,52	8
30	357,3 ± 13,9	356,6 ± 12,1	0,3	7

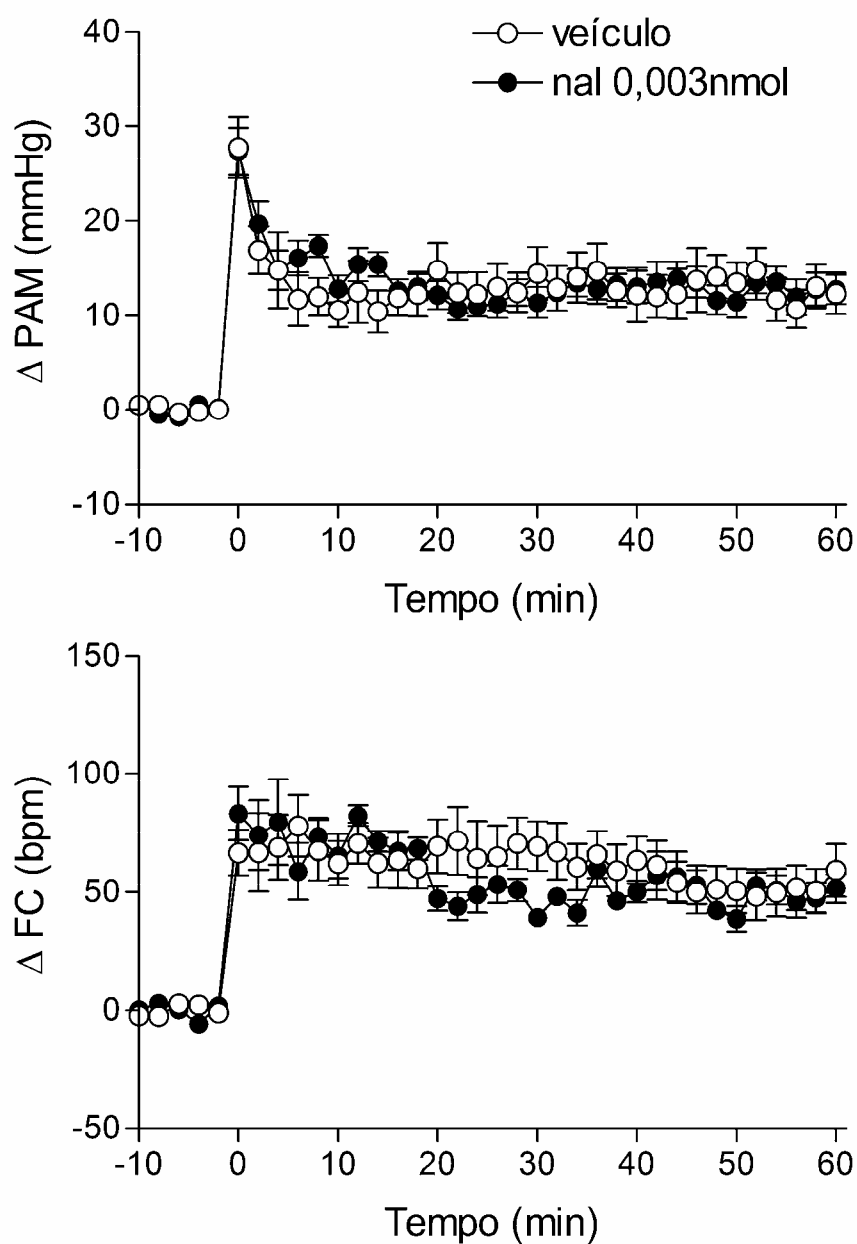


Figura 1. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=8) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,003nmol/100nL de naloxona (n=6) no PL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM.

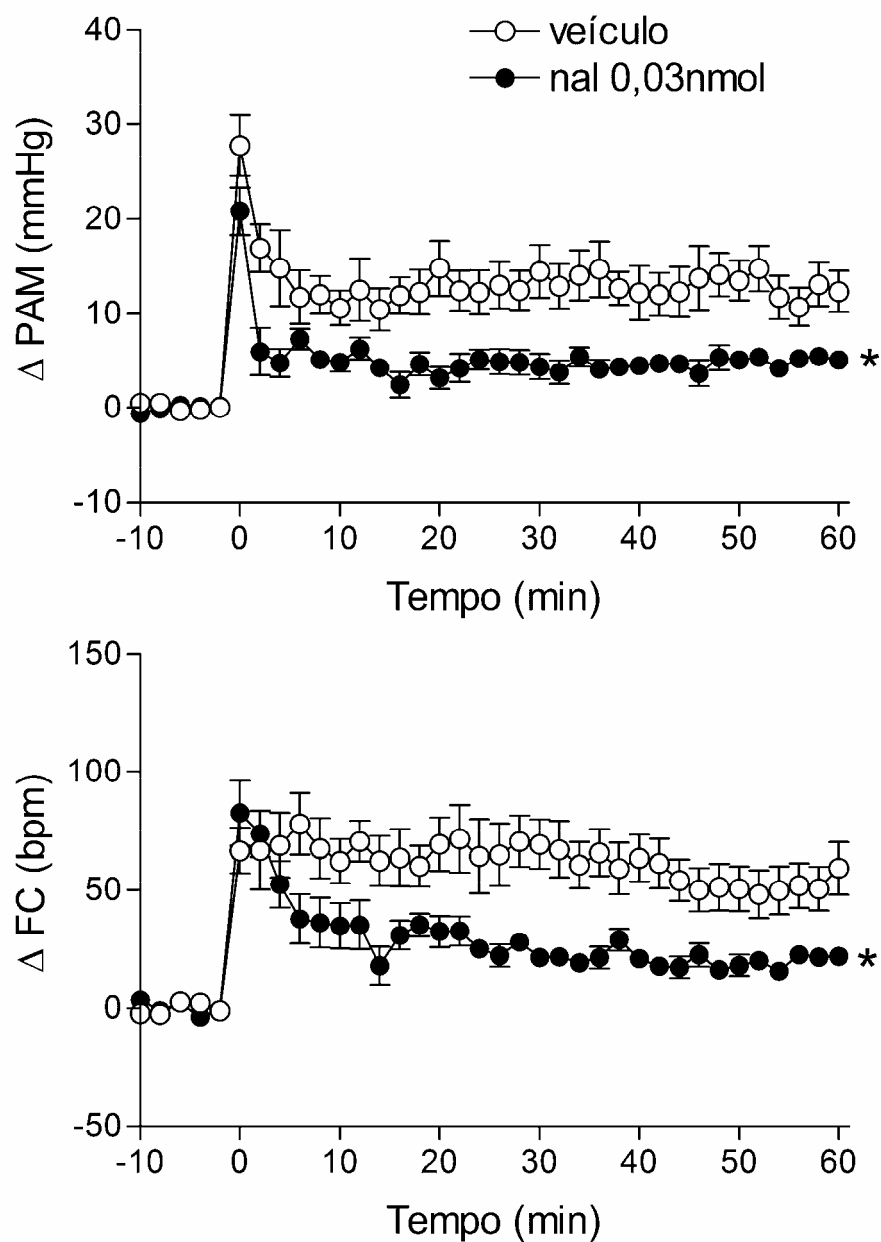


Figura 2. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=8) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,03nmol/100nL de naloxona (n=6) no PL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM. * P<0,05 Two-way ANOVA.

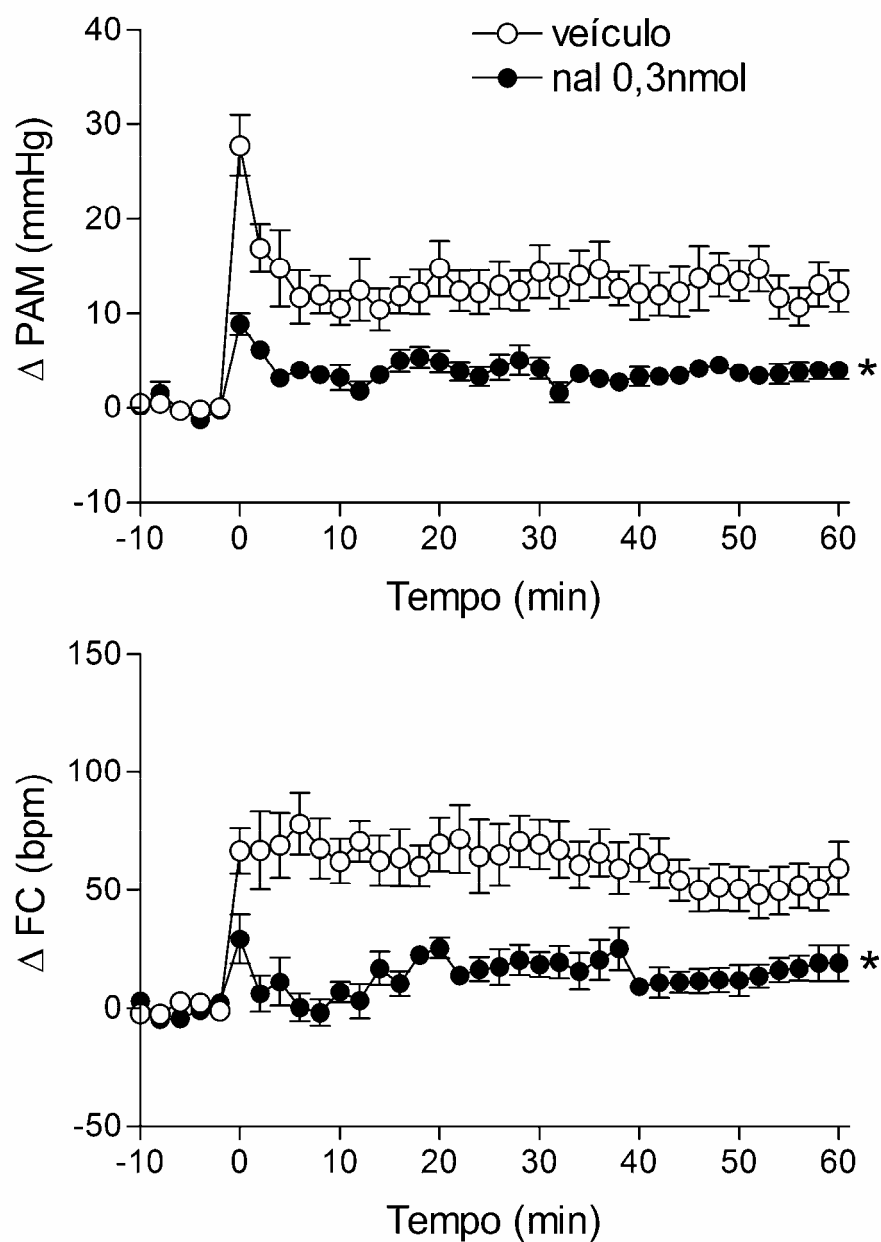


Figura 3. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=8) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,3nmol/100nL de naloxona (n=6) no PL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM. * P<0,05 Two-way ANOVA.

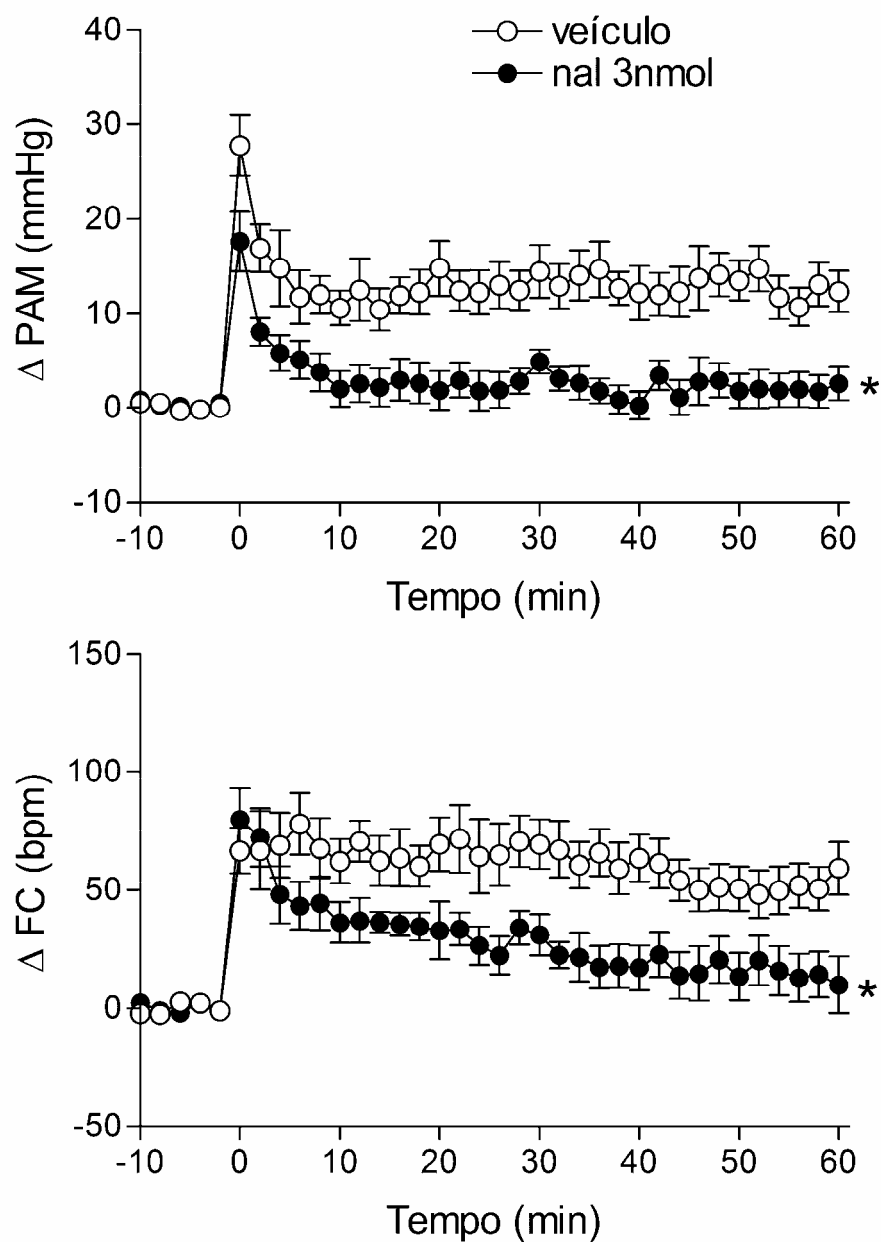


Figura 4. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=8) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 3nmol/100nL de naloxona (n=8) no PL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM. * P<0,05 Two-way ANOVA.

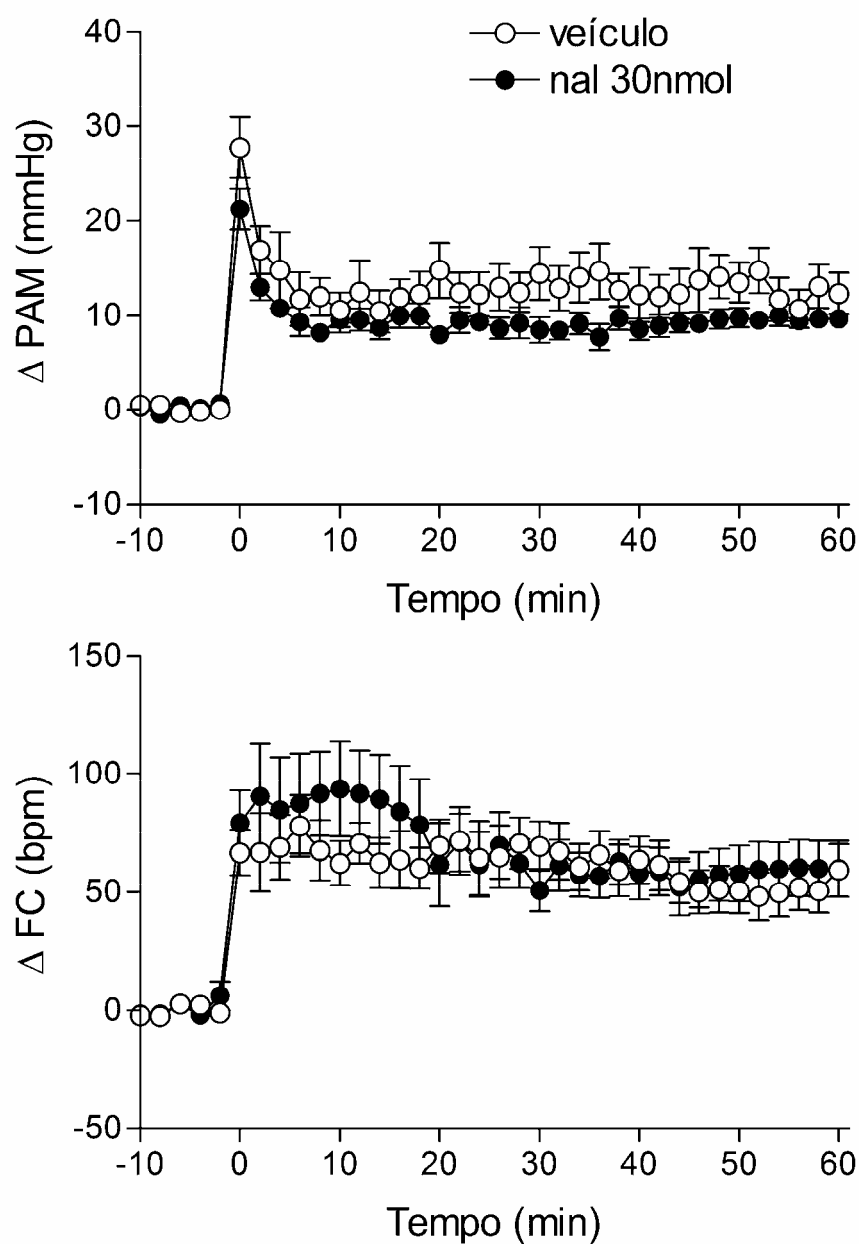


Figura 5. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=8) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 30nmol/100nL de naloxona (n=7) no PL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM.

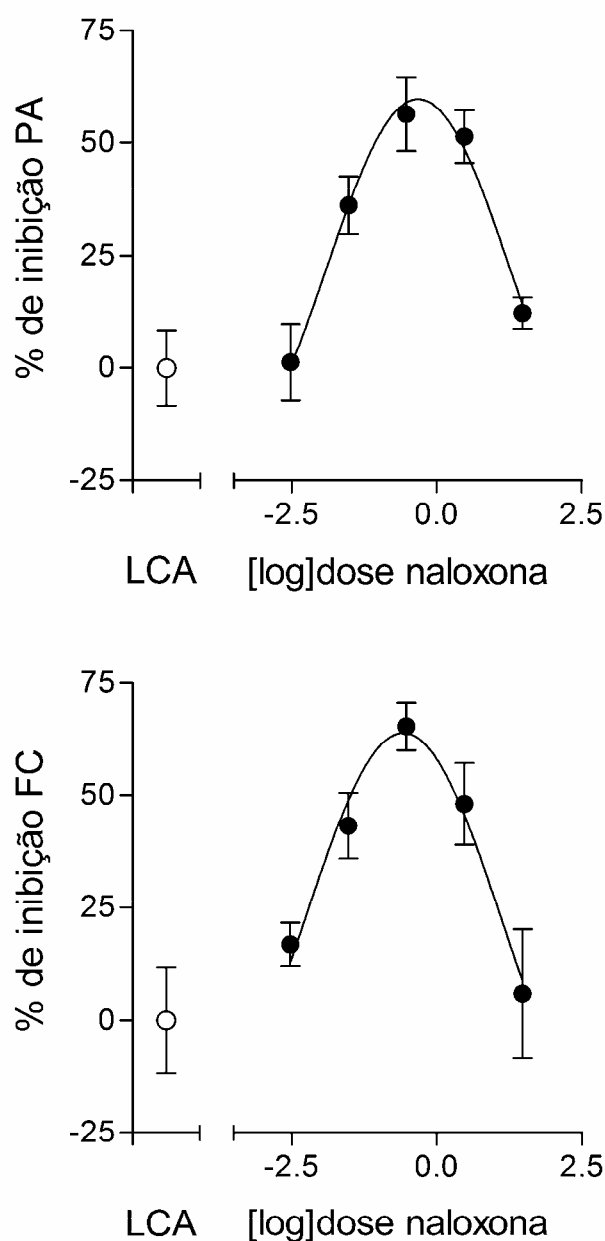


Figura 6. Curva dose-inibição representando os efeitos de diferentes doses de naloxona administradas bilateralmente no PL sobre a elevação da pressão arterial (PA) ou da frequência cardíaca (FC) causada pelo ER. Os círculos brancos correspondem ao grupo controle que recebeu veículo (LCA) e os círculos pretos correspondem aos grupos que receberam naloxona nas doses de 0,003; 0,03; 0,3; 3 e 30nmol, respectivamente. Símbolos representam as médias e as barras o EPM.

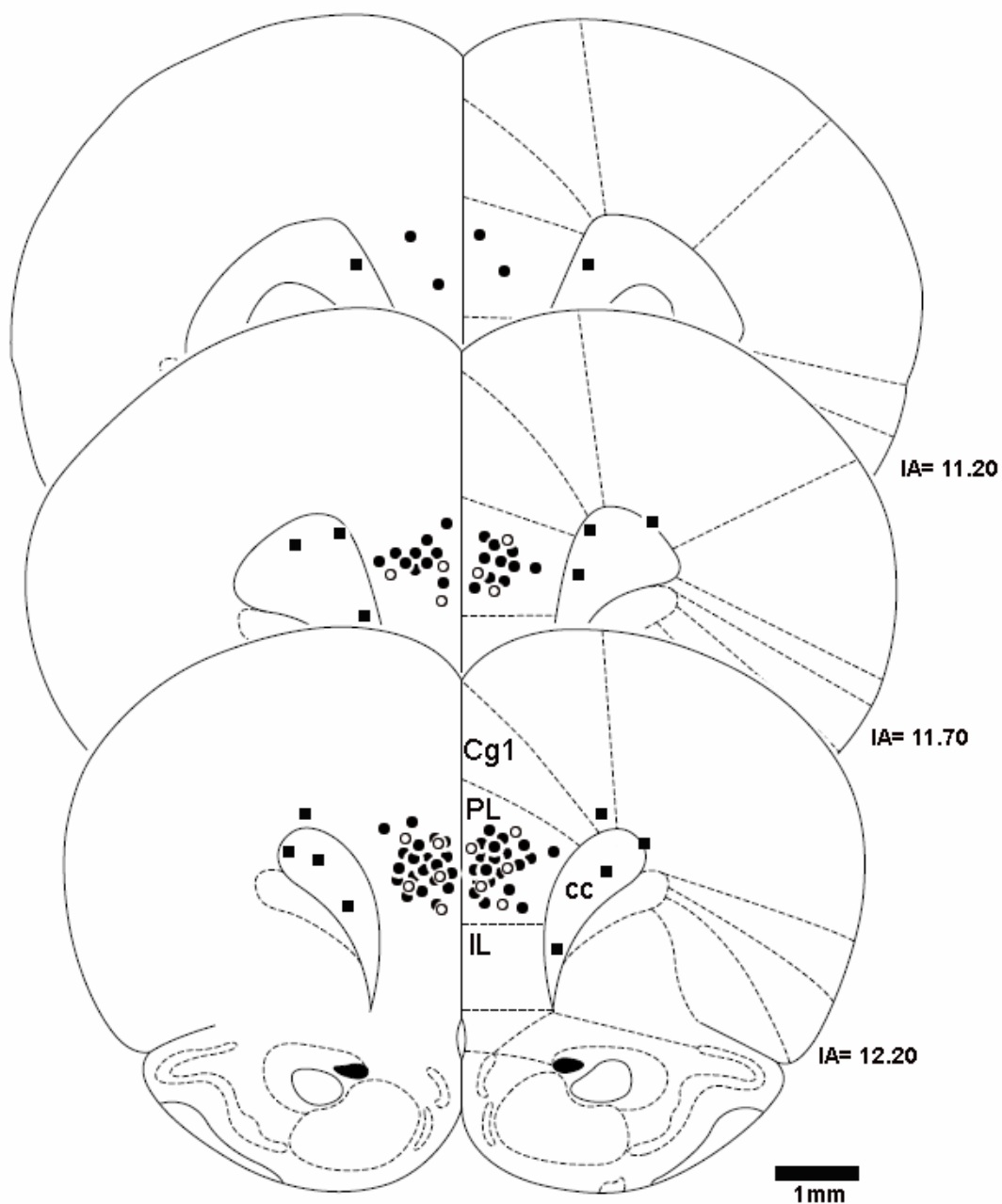


Figura 7. Representação diagramática dos sítios de microinjeção do veículo (círculos brancos), naloxona (círculos pretos) e naloxona em regiões adjacentes (quadrados pretos) no PL, modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1997). PL- córtex pré-límbico, IL- córtex infralímbico, Cg1- córtex cíngulo 1, cc- corpo caloso, IA- interaural.

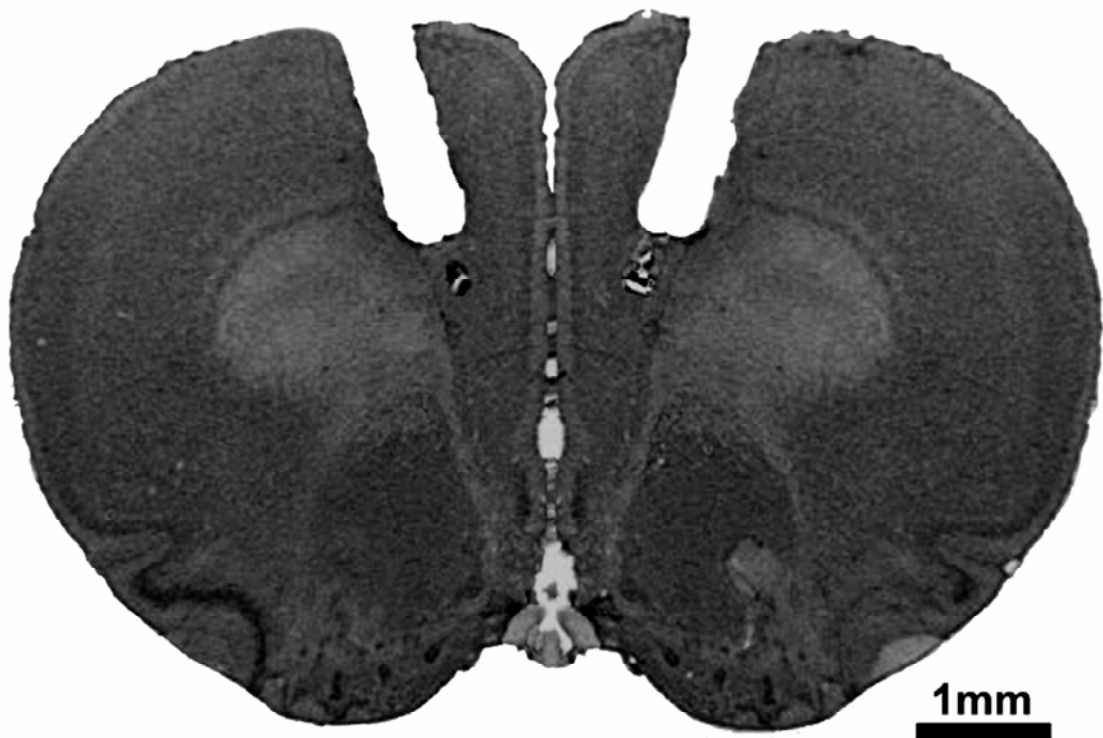


Figura 8. Fotomicrografia representativa de uma secção coronal do cérebro de rato demonstrando os sítios da microinjeção bilateral no córtex pré-límbico.

1.2) Efeito da microinjeção bilateral de CTAP, antagonista μ -seletivo, no PL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER

A microinjeção bilateral de 100 nL de veículo (LCA, n=7) ou 0,3nmol/100nL de CTAP (n=7) no PL não alterou os valores basais de PA (10 min antes da droga=94,5 \pm 2,36 mmHg e imediatamente antes do ER=94,6 \pm 2,6 mmHg, t=0,22, p=0,83) e FC (10 min antes da droga=385,4 \pm 5,1 bpm e imediatamente antes do ER=386,5 \pm 7,2 bpm, t=0,27, p=0,79).

A administração de 0,3nmol de CTAP reduziu a elevação da PA e FC provocadas pelo ER quando comparada ao grupo que recebeu veículo (PAM – Interação: $F_{5,72}=1,8$, $P=0,12$; Tratamento: $F_{1,72}=15,81$, $P=0,0002$; Tempo: $F_{5,72}=31,06$, $P<0,0001$; FC – Interação: $F_{5,72}=2,15$, $P=0,06$; Tratamento: $F_{1,72}=18,85$, $P<0,0001$; Tempo: $F_{5,72}=21,93$, $P<0,0001$), figura 9.

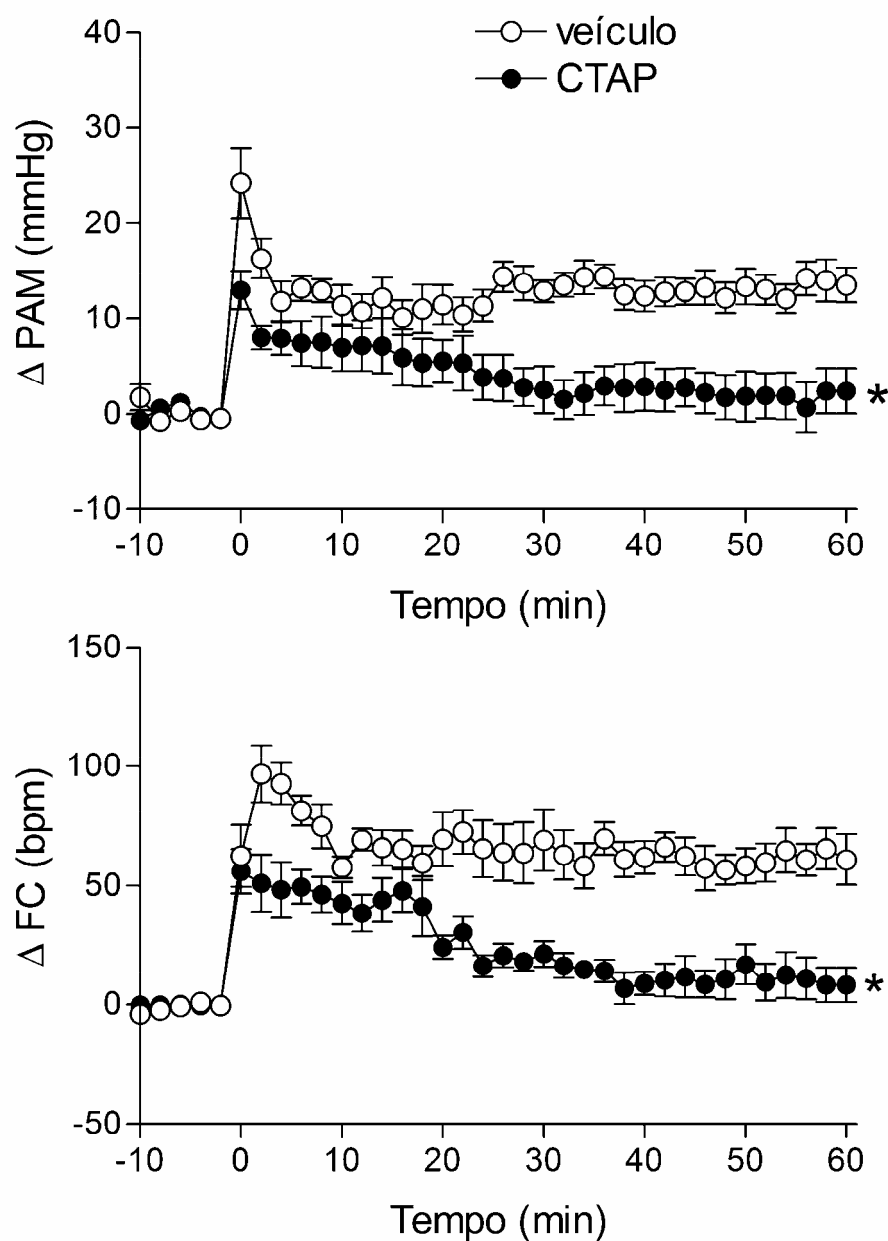


Figura 9. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=7) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,3nmol/100nL de CTAP (antagonista μ -seletivo, n=7) no PL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM. * $P < 0,05$ Two-way ANOVA.

1.3) Efeito da microinjeção bilateral de nor-BNI, antagonista κ -seletivo, no PL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER

A microinjeção bilateral de 100 nL de veículo (LCA, n=7) ou 0,003nmol/100nL de nor-BNI (n=6) no PL não alterou os valores basais de PA (10 min antes da droga=93,1 \pm 2,3 mmHg e imediatamente antes do ER=93 \pm 2,42 mmHg, t=0,15, p=0,88) e FC (10 min antes da droga=371,7 \pm 6,9 bpm e imediatamente antes do ER=370,2 \pm 4,9 bpm, t=0,46, p=0,65).

A administração de 0,003nmol de nor-BNI reduziu a elevação da PA e FC provocadas pelo ER quando comparada ao grupo que recebeu veículo (PAM – Interação: $F_{5,66}=1,87$, $P=0,1$; Tratamento: $F_{1,66}=17,67$, $P<0,0001$; Tempo: $F_{5,66}=37,05$, $P<0,0001$; FC – Interação: $F_{5,66}=0,96$, $P=0,44$; Tratamento: $F_{1,66}=6,4$, $P=0,01$; Tempo: $F_{5,66}=27,08$, $P<0,0001$), figura 10.

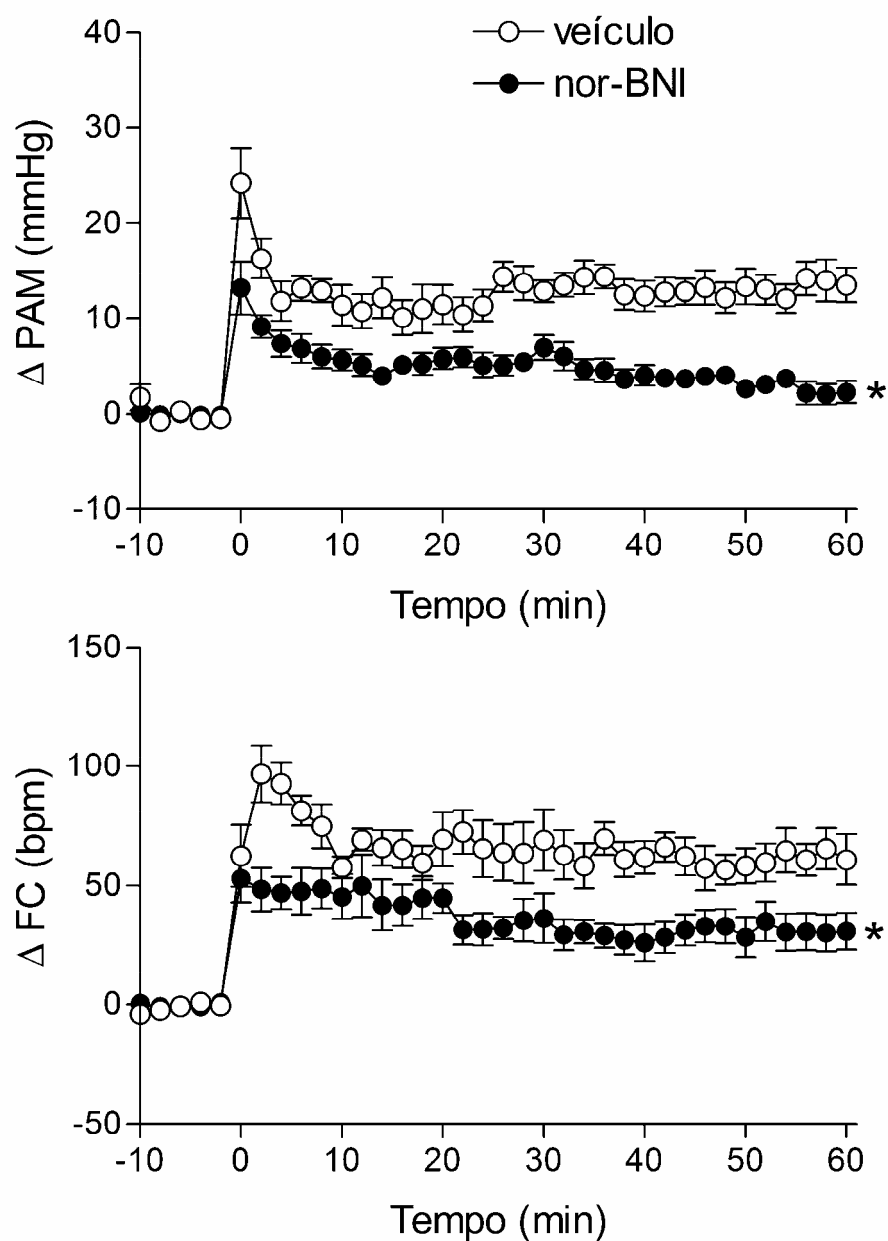


Figura 10. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=7) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,003nmol/100nL de nor-BNI (antagonista κ -seletivo, n=6) no PL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM. * P<0,05 Two-way ANOVA.

1.4) Efeito da microinjeção bilateral de naltrindole, antagonista δ -seletivo, no PL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER

A microinjeção bilateral de 100 nL de veículo (LCA, n=7) ou 0,3nmol/100nL de naltrindole (n=6) no PL não alterou os valores basais de PA (10 min antes da droga= $91,4 \pm 3,1$ mmHg e imediatamente antes do ER= $92,9 \pm 2,8$ mmHg, $t=2,03$, $p=0,09$) e FC (10 min antes da droga= $378,2 \pm 7,9$ bpm e imediatamente antes do ER= $379,1 \pm 8,3$ bpm, $t=0,25$, $p=0,8$).

As respostas pressoras e taquicárdicas causadas pelo ER não diferiram entre os animais tratados com veículo ou 0,3 nmol de naltrindole no PL (PAM – Interação: $F_{5,66}=0,06$, $P=0,99$; Tratamento: $F_{1,66}=0,37$, $P=0,54$; Tempo: $F_{5,66}=41,41$, $P<0,0001$; FC – Interação: $F_{5,66}=0,05$, $P=0,9$; Tratamento: $F_{1,66}=0,005$, $P=0,94$; Tempo: $F_{5,66}=19,72$, $P<0,0001$), figura 11.

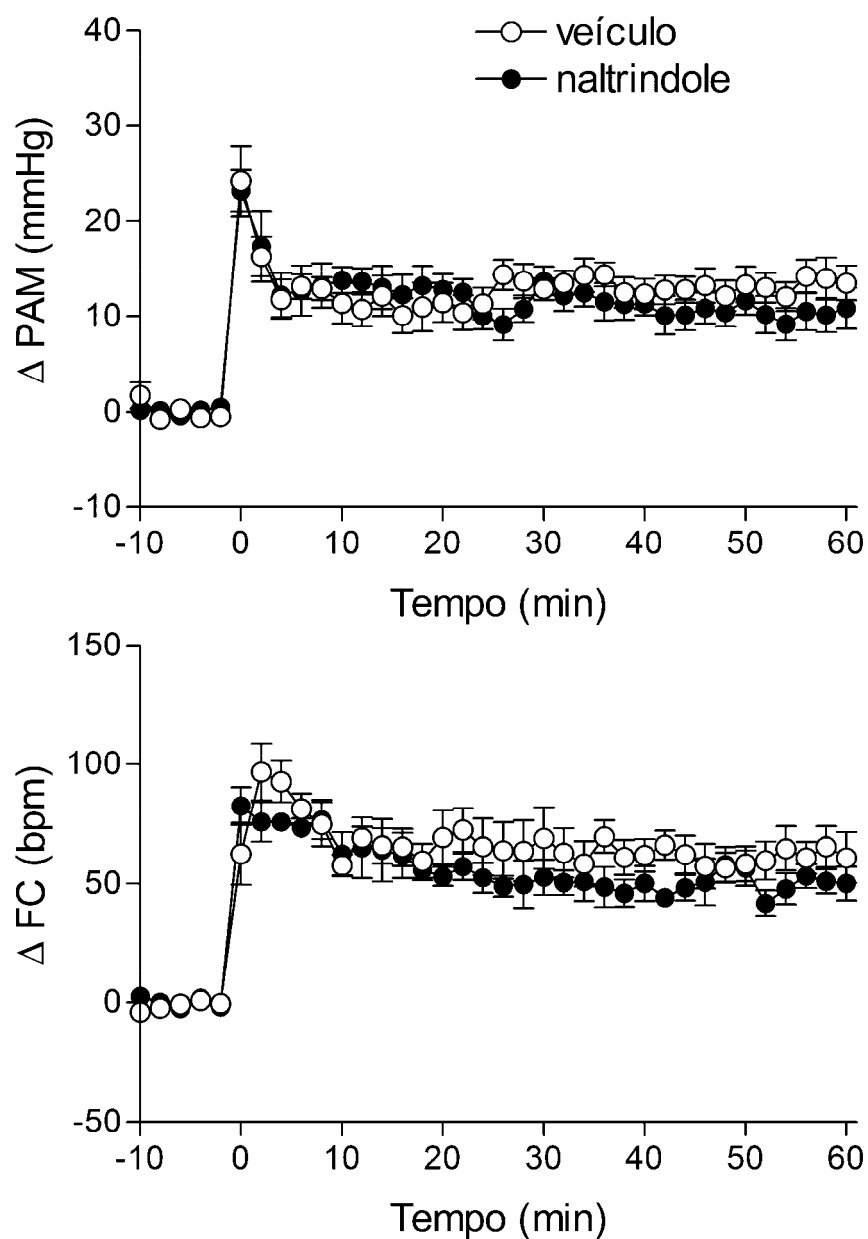


Figura 11. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,3nmol/100nL de naltrindole (antagonista δ -seletivo) no PL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM.

1.5) Efeito da microinjeção bilateral de CTAP (antagonista μ -seletivo) + nor-BNI (antagonista κ -seletivo) no PL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER

A microinjeção bilateral de 100 nL de veículo (n=7) ou da combinação composta por 0,3nmol de CTAP + 0,003nmol de nor-BNI (n=6) no PL não alterou os valores basais de PA (10 min antes da droga= $96,8 \pm 3,1$ mmHg e imediatamente antes do ER= $95,2 \pm 1,5$ mmHg, $t=0,77$, $p=0,47$) e FC (10 min antes da droga= $339,5 \pm 11,7$ bpm e imediatamente antes do ER= $349,2 \pm 5,8$ bpm, $t=1,29$, $p=0,25$).

A administração da combinação de CTAP e nor-BNI reduziu a elevação da PA e FC provocada pelo ER quando comparada ao grupo que recebeu veículo (PAM – Interação: $F_{5,66}=2,59$, $P=0,03$; Tratamento: $F_{1,66}=30,22$, $P<0,0001$; Tempo: $F_{5,66}=35,63$, $P<0,0001$; FC – Interação: $F_{5,66}=2,92$, $P=0,01$; Tratamento: $F_{1,66}=21,04$, $P<0,0001$; Tempo: $F_{5,66}=15,73$, $P<0,0001$), figura 12. Porém, a combinação de 0,3nmol de CTAP + 0,003nmol de nor-BNI não diferiu da dose de naloxona de 0,3nmol – dose responsável pela maior porcentagem de inibição da resposta cardiovascular evocada pelo ER (PAM – Interação: $F_{5,60}=1,65$, $P=0,15$; Tratamento: $F_{1,60}=0,14$, $P=0,7$; Tempo: $F_{5,60}=21,99$, $P<0,0001$; FC – Interação: $F_{5,60}=1,38$, $P=0,24$; Tratamento: $F_{1,60}=0,15$, $P=0,69$; Tempo: $F_{5,60}=12,08$, $P<0,0001$), figura 13.

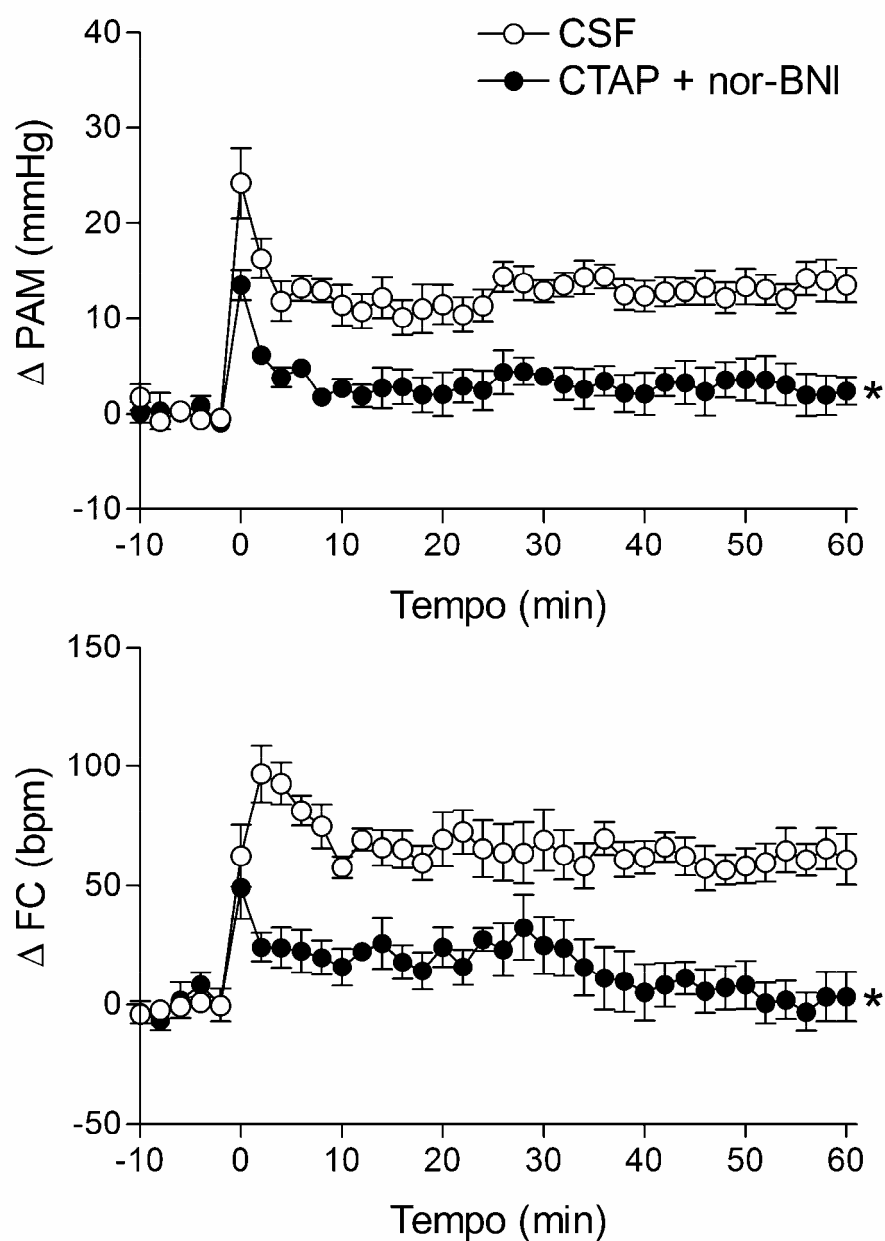


Figura 12. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,3 nmol de CTAP (antagonista μ -seletivo) + 0,003nmol de nor-BNI (antagonista κ -seletivo) /100nL no PL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM. * $P < 0,05$ Two-way ANOVA.

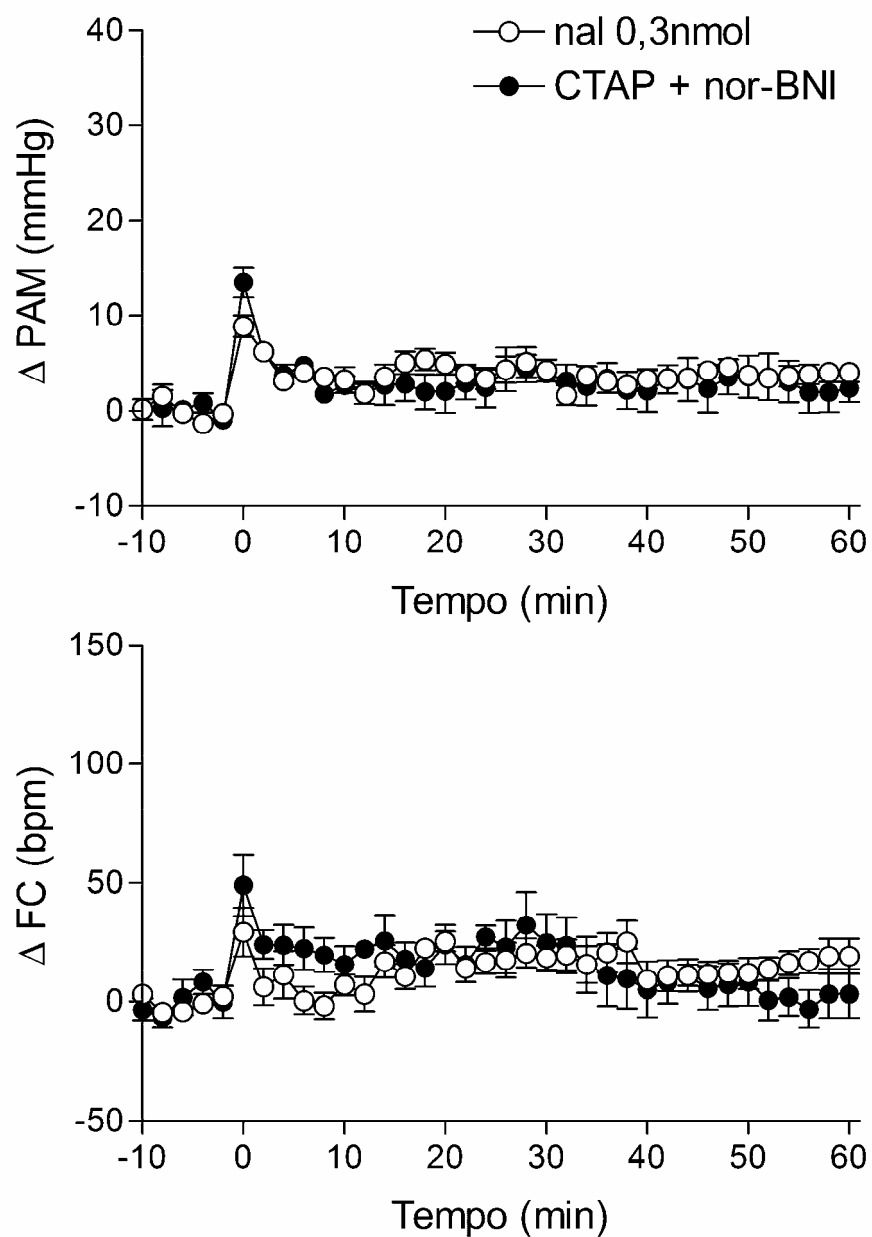


Figura 13. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 0,3nmol/100nL de naloxona e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,3 nmol de CTAP (antagonista μ -seletivo) + 0,003nmol de nor-BNI (antagonista κ -seletivo) /100nL no PL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM.

1.6) Efeito da microinjeção bilateral de UPF-101, antagonista ORL-1 seletivo, no PL sobre a PA e FC durante o ER

A microinjeção bilateral de 100 nL de veículo (LCA, n=7) ou 0,3 nmol/100nL de UPF-101 no PL (n=5) não alterou os valores basais de PA (10 min antes da droga=93,6 ± 2,4 mmHg e imediatamente antes do ER=93,1 ± 2,1 mmHg, t=1,23, p=0,28), FC (10 min antes da droga= 356,8 ± 7 bpm e imediatamente antes do ER=358 ± 6,6 bpm, t=0,55, p=0,6).

A resposta pressora provocada pelo ER não diferiu entre os animais tratados com veículo ou 0,3nmol de UPF-101 (PAM – Interação: $F_{5,60}=2,06$, $P=0,08$; Tratamento: $F_{1,60}=2,1$, $P=0,15$; Tempo: $F_{5,60}=55,58$, $P<0,0001$), porém exacerbou a resposta taquicárdica (Interação: $F_{5,60}=4,42$, $P=0,001$; Tratamento: $F_{1,60}=45,97$, $P<0,0001$; Tempo: $F_{5,60}=42,12$, $P<0,0001$), figura 14.

A representação diagramática indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de veículo, CTAP, nor-BNI, naltrindole, do mix CTAT + nor-BNI ou UPF-101 no cérebro dos ratos utilizados nos protocolos descritos acima, estão apresentados na figura 15.

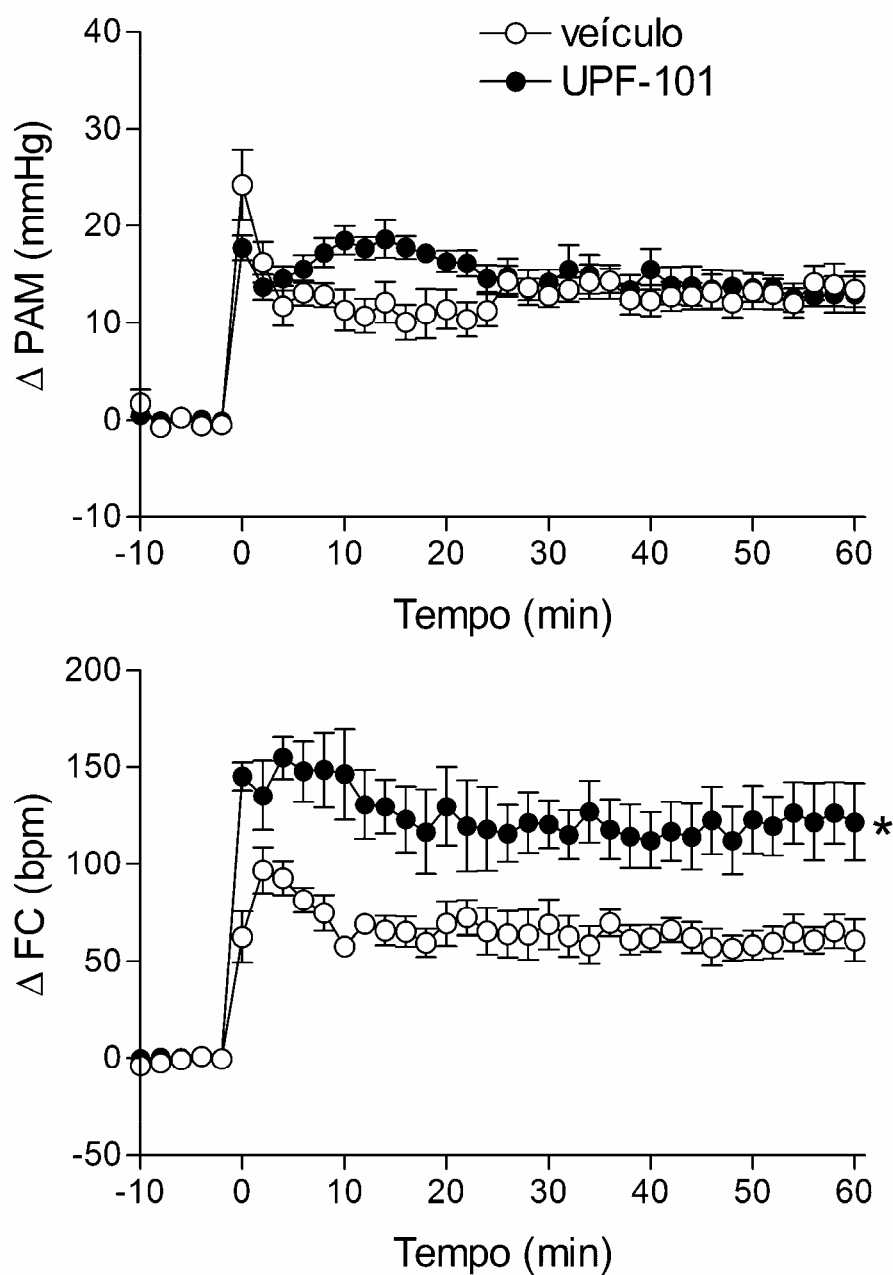


Figura 14. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,3 nmol/100nL de ORL-1 (antagonista ORL-1 seletivo) no PL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM. * $P < 0,05$ Two-way ANOVA.

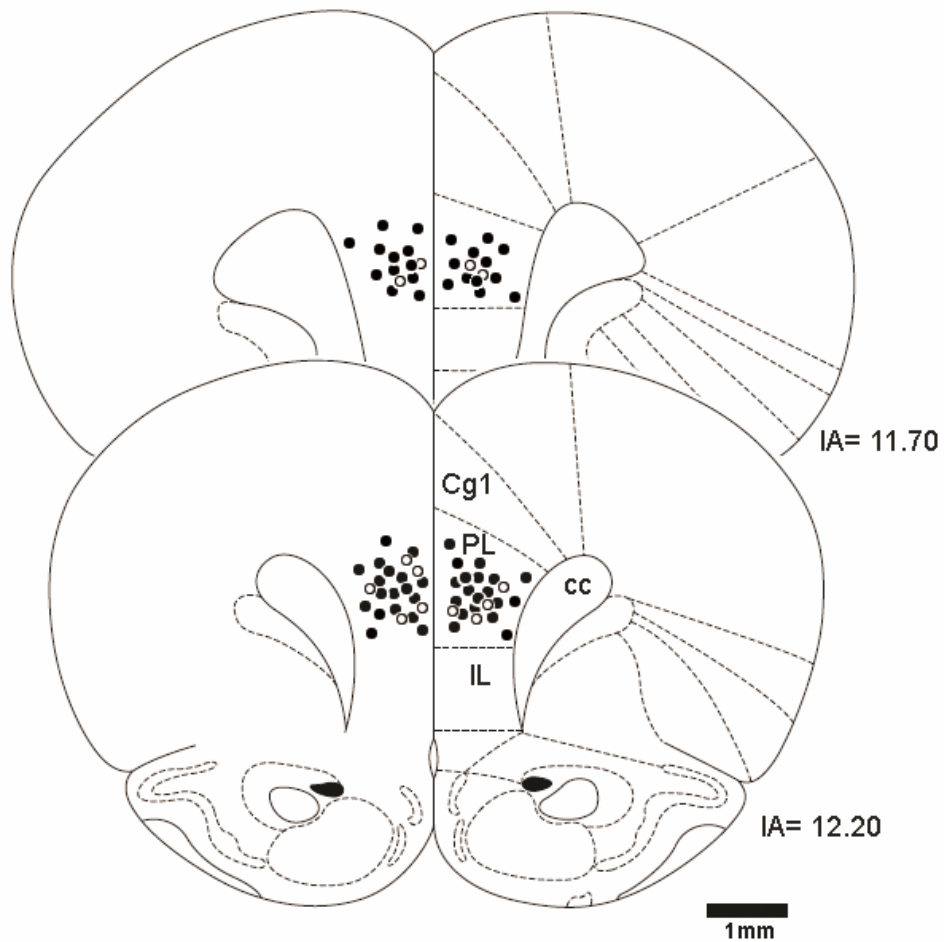


Figura 15. Representação diagramática dos sítios de injeção do veículo (círculos brancos) e antagonistas seletivos (círculos pretos) no PL, modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1997). PL- córtex pré-límbico, IL- córtex infralímbico, Cg1- córtex cíngulo 1, cc- corpo caloso, IA- interaural.

2) Córtex infralímbico

2.1) Efeito da microinjeção bilateral de naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides) no IL sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER

A microinjeção bilateral de 100 nL de veículo ou naloxona (0,03; 0,3 e 3nmol/100nL) no IL não alterou os valores basais de PA e FC (Tabela 3 e 4, respectivamente).

A análise de variância, two-way ANOVA, demonstrou que o tratamento com naloxona no IL reduziu a elevação da PA provocada pelo ER quando comparada ao grupo que recebeu veículo (Tempo: $F_{5,19}=25,533$, $p<0,001$; Tratamento: $F_{3,23}=5,9$, $p=0,004$; Interação: $F_{15,53}=1,711$, $p=0,77$) sem alterar a resposta taquicárdica (Tempo: $F_{5,19}=28,857$, $p<0,001$; Tratamento $F_{3,23}=2,338$, $p=0,1$; Interação: $F_{15,53}=1,249$, $p=0,267$). A análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Duncan demonstrou que o tratamento do IL com a dose de 0,3nmol de naloxona atenuou a resposta pressora induzidas pelo ER (Ponto 4 – $F_{3,23}=3,864$, $p=0,023$, Ponto 5 – $F_{3,23}=2,573$, $p<0,029$, Ponto 6 – $F_{3,23}=5,524$, $p=0,005$, Duncan), figura 16-18.

A análise da regressão não linear gerou uma curva de inibição do tipo U-invertido, tanto para a PA ($r^2=0,59$, $df=15$, $p<0,05$) quanto para FC ($r^2=0,32$, $df=15$, $p<0,05$), figura 19.

A representação diagramática indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de veículo ou naloxona no cérebro dos ratos utilizados nesse protocolo e fotomicrografia representativa de secção coronal do cérebro de um rato demonstrando sítios bilaterais estão apresentadas na Figura 20 e 21, respectivamente.

Tabela 3 – Valores basais de pressão arterial media (PAM) antes e depois da microinjeção de veículo ou diferentes doses de naloxona (antagonista não-seletivo de receptores opióides) no IL de ratos.

Naloxona (nmol/100nL)	Antes (PAM) ± EPM (mmHg)	Depois (PAM) ± EPM (mmHg)	t=	n=
0	97 ± 2,1	94,4 ± 2,6	2,04	8
0,03	91 ± 3,4	91,3 ± 3,7	0,13	6
0,3	95,5 ± 2,8	94,2 ± 3,2	1,14	6
3	95,6 ± 2,5	93,9 ± 2,9	1,09	7

Tabela 4 – Valores basais da frequência cardíaca (FC) antes e depois da microinjeção de veículo ou diferentes doses de naloxona (antagonista não-seletivo de receptores opióides) no IL de ratos.

Naloxona (nmol/100nL)	Antes (FC) ± EPM (bpm)	Depois (FC) ± EPM (bpm)	t=	n=
0	352,1 ± 8,6	353,7 ± 10,9	0,28	8
0,03	373,4 ± 5,6	374,3 ± 6	0,78	6
0,3	383,8 ± 5,7	387,3 ± 4,8	2,2	6
3	351,5 ± 11,3	354,4 ± 11,8	1,1	7

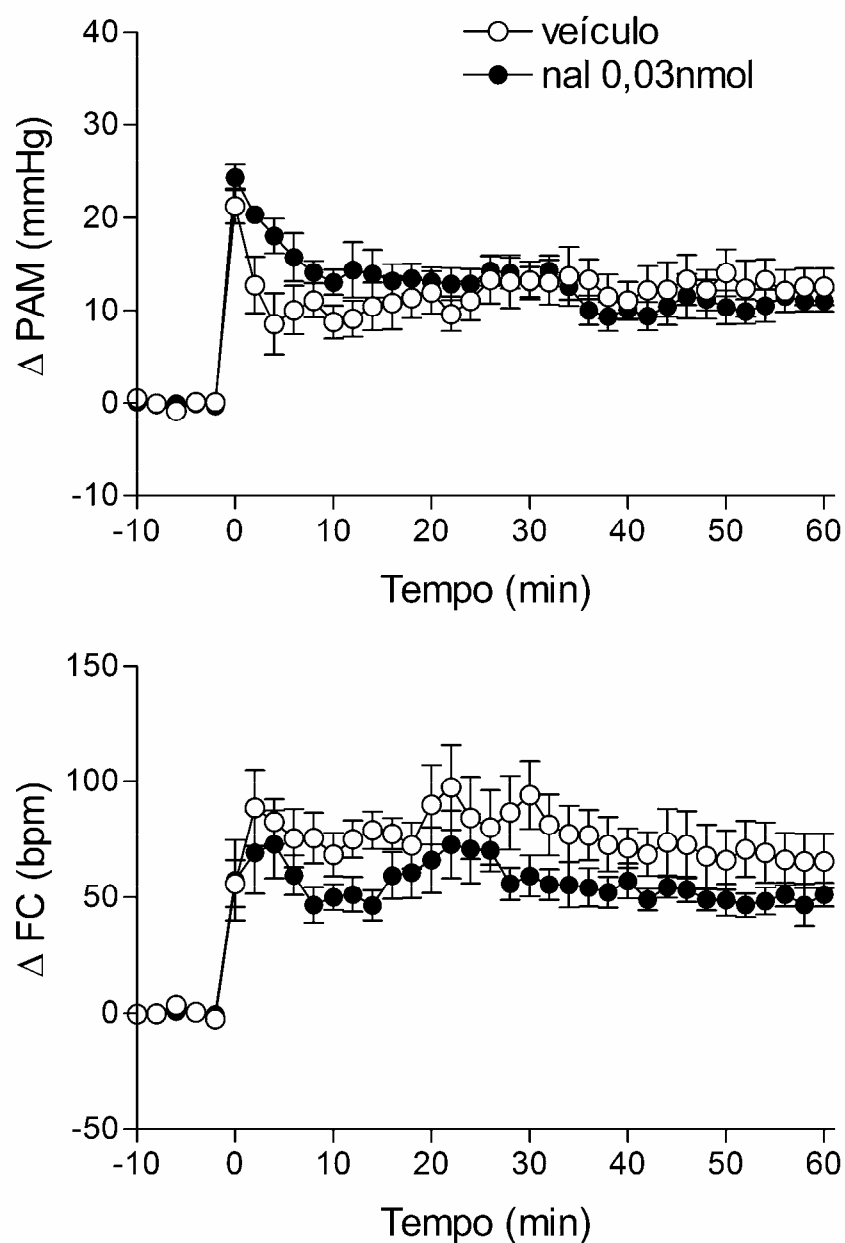


Figura 16. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=8) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,03nmol/100nL de naloxona (n=6) no IL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM.

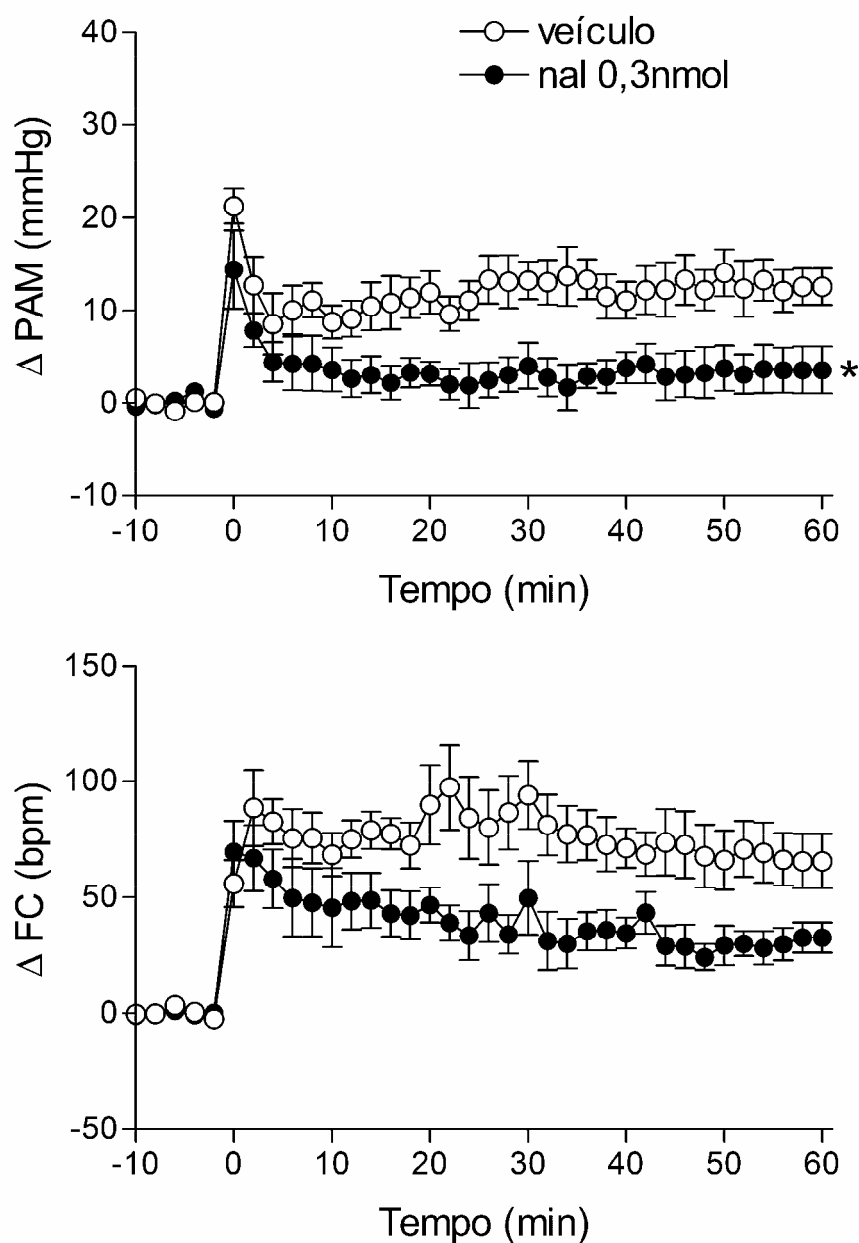


Figura 17. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=8) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,3nmol/100nL de naloxona (n=6) no IL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM. * P<0,05 Two-way ANOVA.

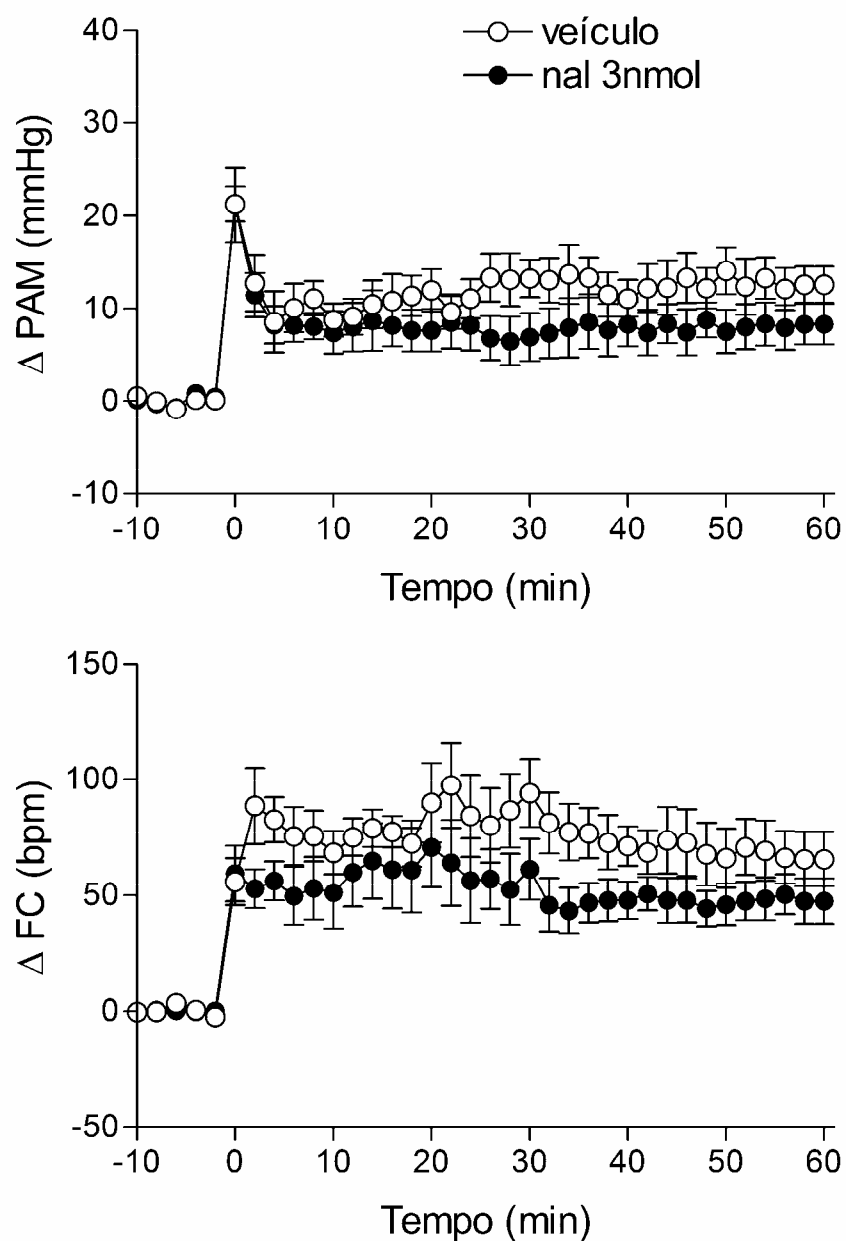


Figura 18. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=8) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 3nmol/100nL de naloxona (n=7) no IL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM.

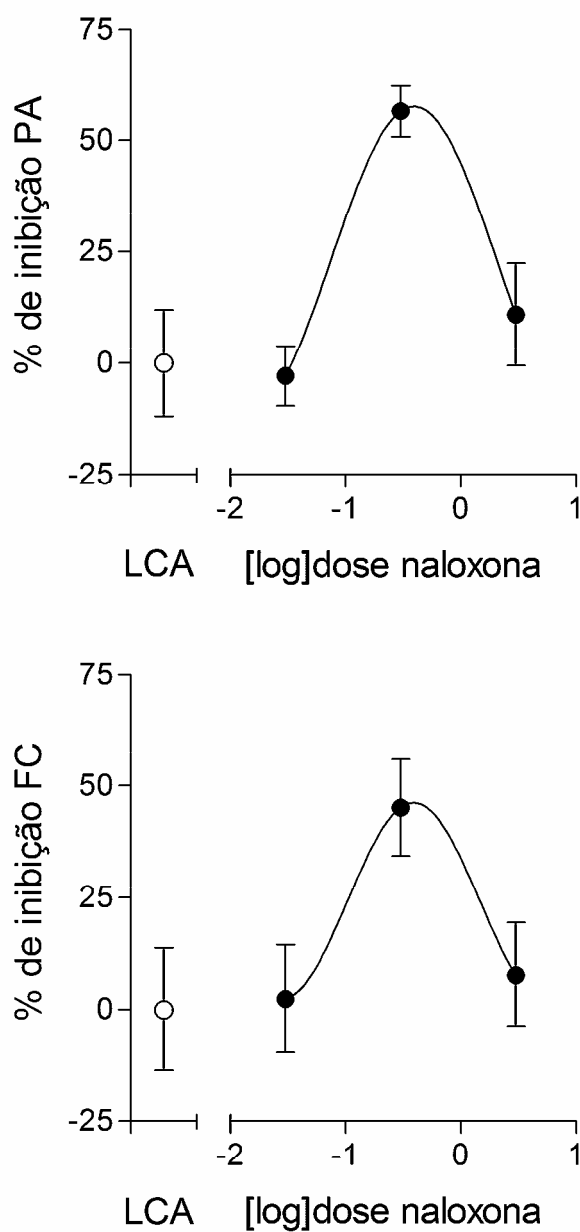


Figura 19. Curva dose-inibição representando os efeitos de diferentes doses de naloxona administradas bilateralmente no IL sobre as respostas de aumento da pressão arterial (PA) ou de frequência cardíaca (FC) causada pelo ER. Os círculos abertos correspondem ao grupo controle que recebeu veículo (LCA) e os círculos fechados correspondem aos grupos que receberam naloxona nas doses de 0,03; 0,3 e 3nmol, respectivamente. Símbolos representam as médias e as barras o EPM.

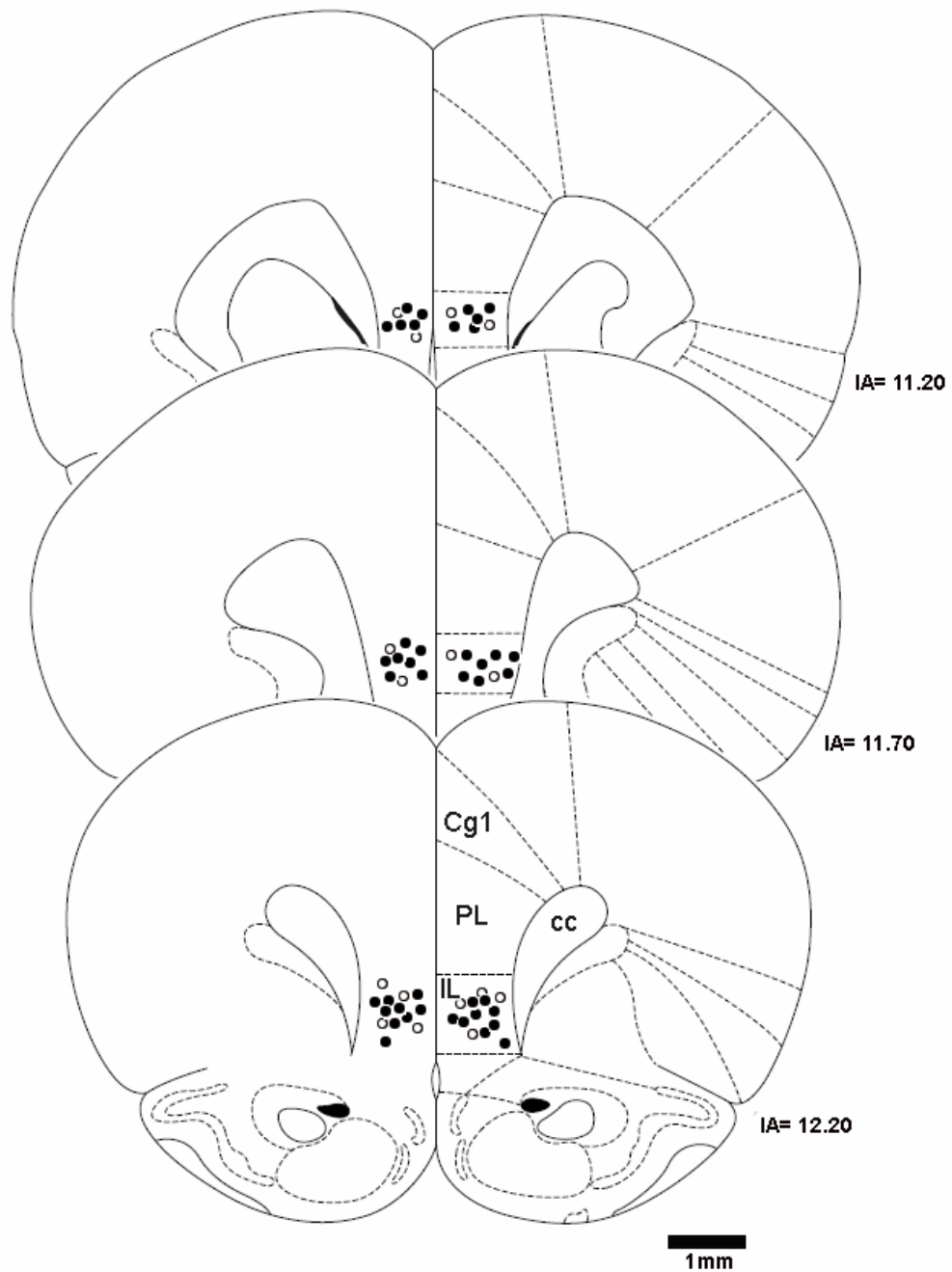


Figura 20. Representação diagramática dos sítios de injeção do veículo (círculos brancos) e naloxona (círculos pretos) no IL, modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1997). PL- córtex pré-límbico, IL- córtex infralímbico, Cg1- córtex cíngulo 1, cc- corpo caloso, IA- interaural.

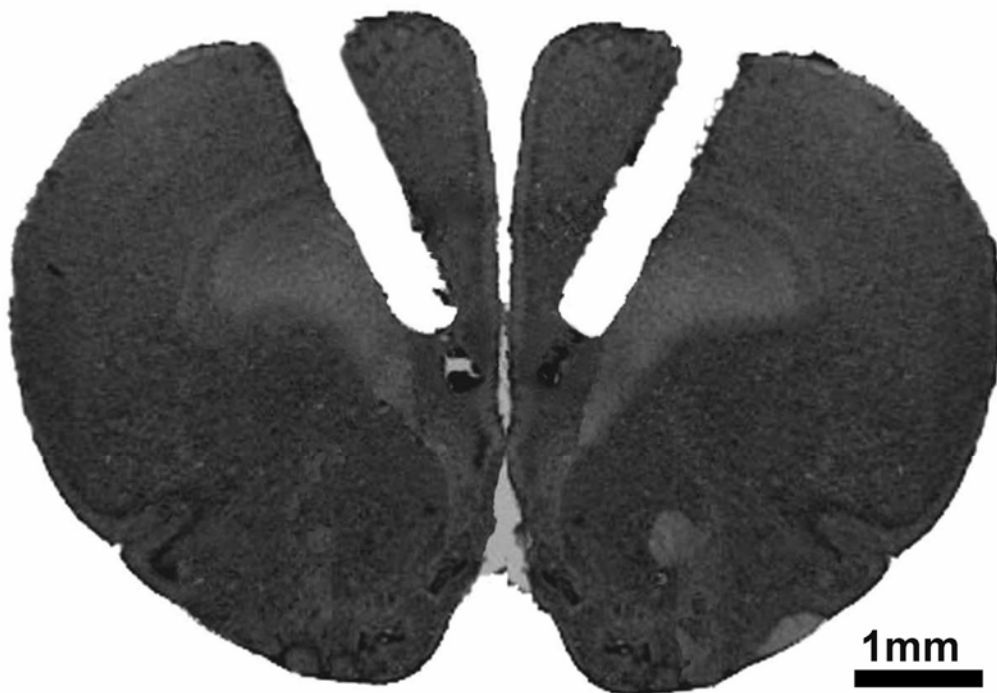


Figura 21. Fotomicrografia representativa de uma secção coronal do cérebro de rato demonstrando os sítios da microinjeção bilateral no córtex infralímbico.

2.2) Efeito da microinjeção bilateral de CTAP, antagonista μ -seletivo, no IL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER

A microinjeção bilateral de 100 nL de veículo (n=7) ou 0,3nmol/100nL de CTAP (n=7) no PL não alterou os valores basais de PA (10 min antes da droga= $92,5 \pm 3,3$ mmHg e imediatamente antes do ER= $90,7 \pm 3,3$ mmHg, $t=1,89$, $p=0,1$) e FC (10 min antes da droga= $372,8 \pm 6,8$ bpm e imediatamente antes do ER= $375,4 \pm 7,4$ bpm $t=0,46$, $p=0,66$).

As respostas pressoras e taquicárdicas causadas pelo ER não diferiram entre os animais tratados com veículo ou 0,3 nmol de CTAP no IL (PAM – Interação: $F_{5,72}=1,42$, $P=0,22$; Tratamento: $F_{1,72}=0,31$, $P=0,54$; Tempo: $F_{5,72}=62,31$, $P<0,0001$; FC – Interação: $F_{5,72}=0,85$, $P=0,51$; Tratamento: $F_{1,72}=2,38$, $P=0,1$; Tempo: $F_{5,72}=19,12$, $P<0,0001$), figura 22.

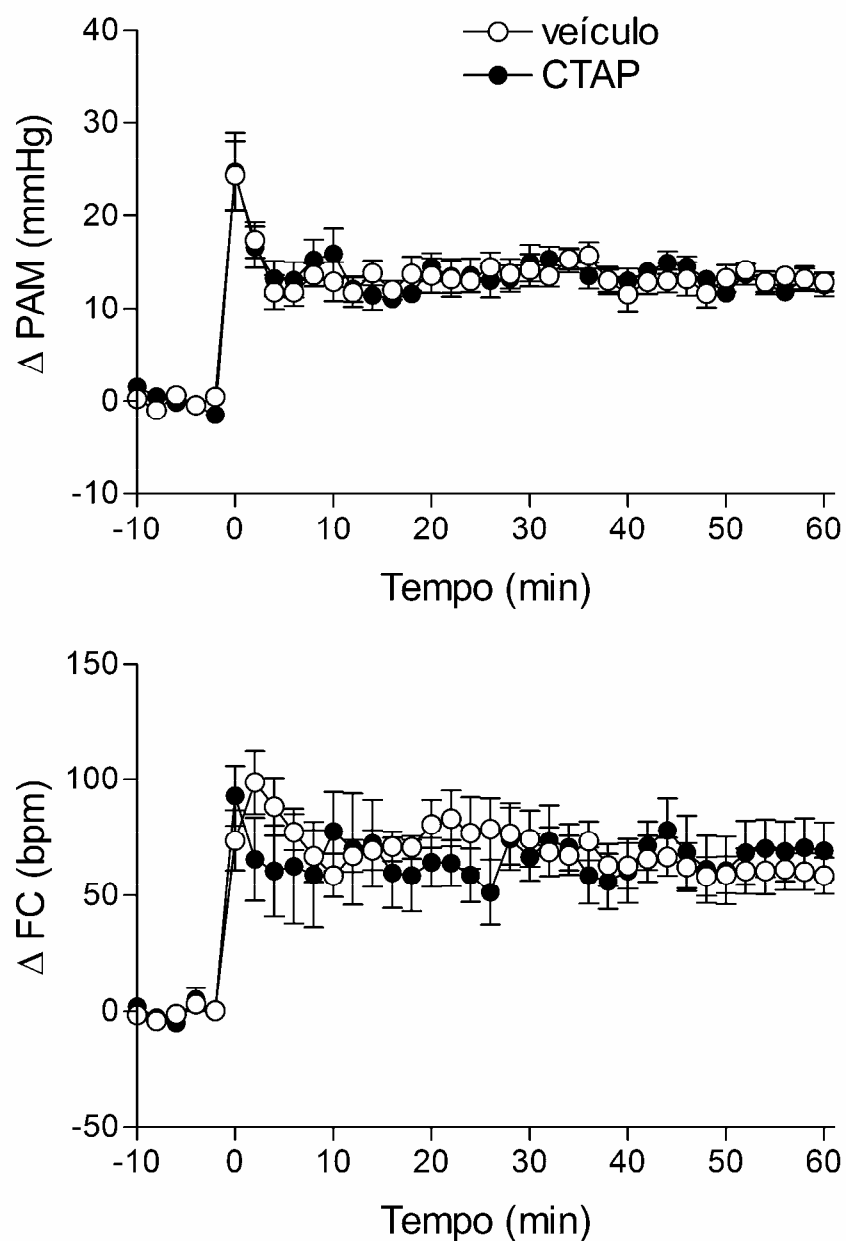


Figura 22. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=7) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,3nmol/100nL de CTAP (antagonista μ -seletivo, n=7) no IL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM.

2.3) Efeito da microinjeção bilateral de nor-BNI, antagonista κ -seletivo, no IL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER

A microinjeção bilateral de 100 nL de veículo (n=7) ou 0,03nmol/100nL de nor-BNI (n=6) no IL não alterou os valores basais de PA (10 min antes da droga=94,1 \pm 5,5 mmHg e imediatamente antes do ER=94,7 \pm 6,1 mmHg, t=0,75, p=0,48) e FC (10 min antes da droga=370,7 \pm 8,3 bpm e imediatamente antes do ER=374,4 \pm 12 bpm, t=0,77, p=0,47).

A administração de 0,3nmol de nor-BNI reduziu a elevação da PA e FC provocada pelo ER quando comparada ao grupo que recebeu veículo (PAM – Interação: $F_{5,66}=0,69$, $P=0,63$; Tratamento: $F_{1,66}=8,15$, $P=0,005$; Tempo: $F_{5,66}=25,22$, $P<0,0001$; FC – Interação: $F_{5,66}=1,003$, $P=0,42$; Tratamento: $F_{1,66}=9,68$, $P=0,002$; Tempo: $F_{5,66}=8,77$, $P<0,0001$), figura 23.

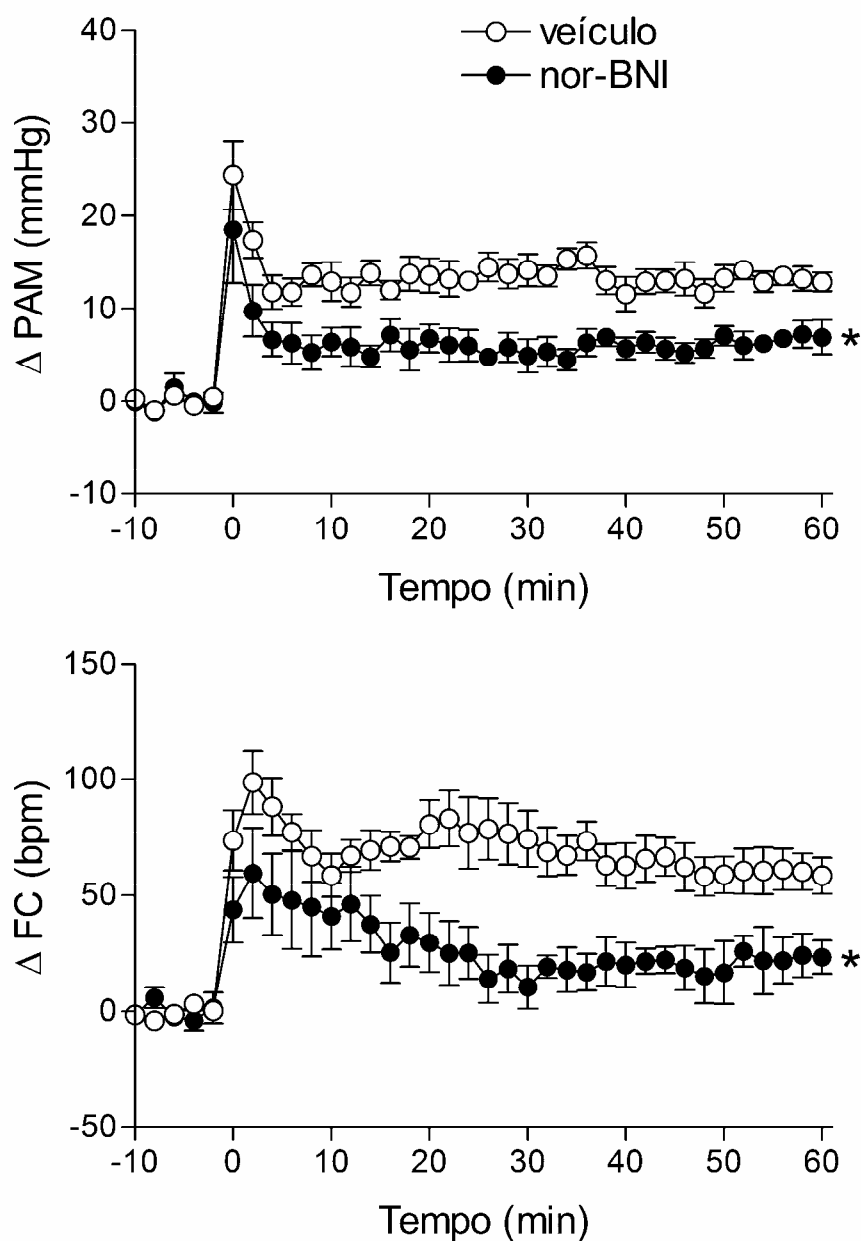


Figura 23. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=7) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,3nmol/100nL de nor-BNI (antagonista κ -seletivo, n=6) no IL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM. * P<0,05 Two-way ANOVA.

2.4) Efeito da microinjeção bilateral de naltrindole, antagonista δ -seletivo, no IL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER

A microinjeção bilateral de 100 nL de veículo (n=7) ou 0,3nmol/100nL de naltrindole (n=8) no IL não alterou os valores basais de PA (10 min antes da droga=92,1 \pm 5,08 mmHg e imediatamente antes do ER=91 \pm 4,5 mmHg, t=1,19, p=0,27) e FC (10 min antes da droga=370,2 \pm 6,9 bpm e imediatamente antes do ER=371,7 \pm 4,3 bpm, t=0,31, p=0,76).

As respostas pressoras e taquicárdicas causadas pelo ER não diferiram entre os animais tratados com veículo ou 0,3 nmol de naltrindole no IL (PAM – Interação: $F_{5,78}=0,35$, $P=0,88$; Tratamento: $F_{1,78}=0,52$, $P=0,46$; Tempo: $F_{5,78}=76,94$, $P<0,0001$; FC – Interação: $F_{5,78}=0,21$, $P=0,95$; Tratamento: $F_{1,78}=0,15$, $P=0,69$; Tempo: $F_{5,78}=15,63$, $P<0,0001$), figura 24.

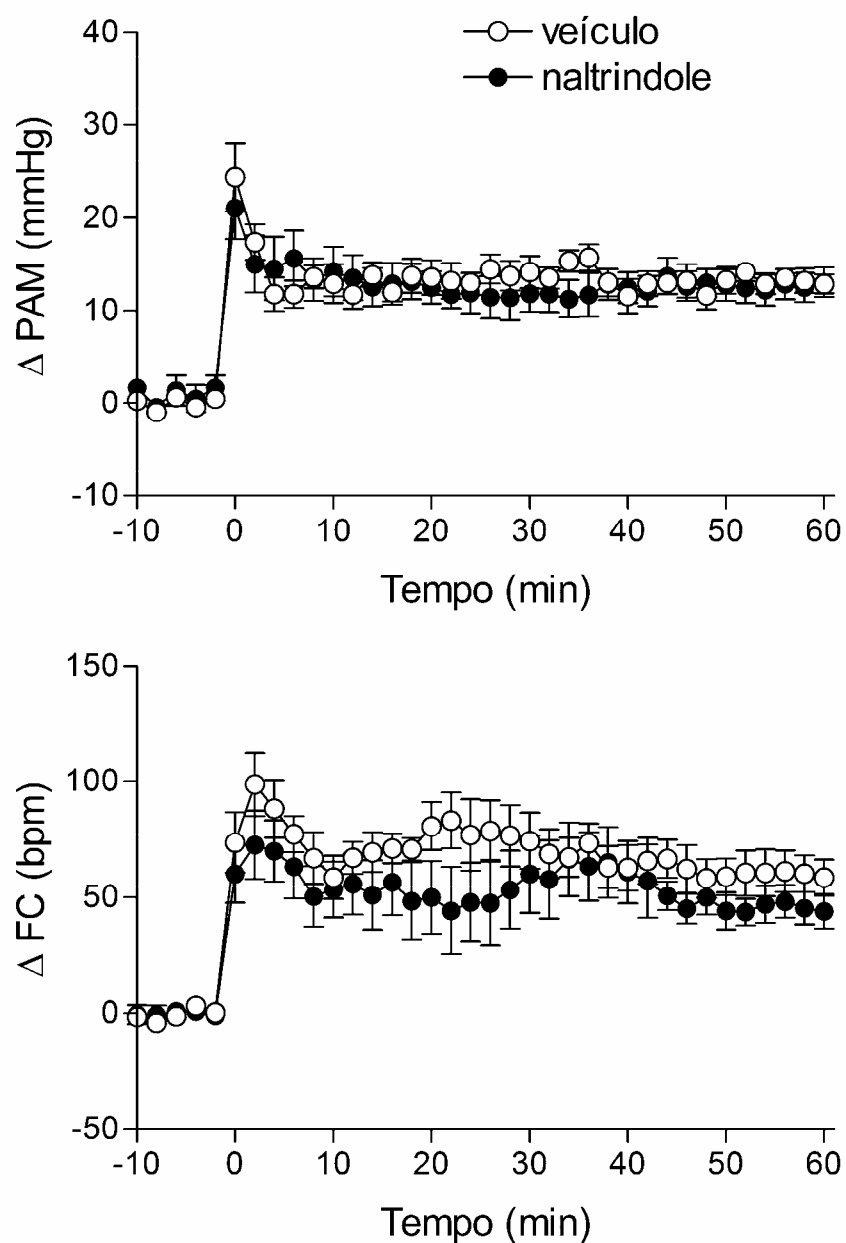


Figura 24. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=7) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,3nmol/100nL de naltrindole (antagonista δ -seletivo, n=8) no IL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM.

2.5) Efeito da microinjeção bilateral de UPF-101, antagonista ORL-1 seletivo, no IL sobre as respostas cardiovasculares causadas pelo ER

A microinjeção bilateral de 100 nL de veículo (n=7) ou 0,3 nmol/100nL de UPF-101 (n=7) no PL não alterou os valores basais de PA (10 min antes da droga=91,3 ± 4 mmHg e imediatamente antes do ER=90 ± 4,3 mmHg, t=1,08, p= 0,31), FC (10 min antes da droga=375 ± 7,4 bpm e imediatamente antes do ER=376,3 ± 6, bpm, t=0,35, p=0,73).

As respostas pressoras e taquicárdicas causadas pelo ER não diferiram entre os animais tratados com veículo ou 0,3 nmol de UPF-101 no IL (PAM – Interação: $F_{5,72}=0,1$, $P=0,9$; Tratamento: $F_{1,72}=0,67$, $P=0,4$; Tempo: $F_{5,72}=61,49$, $P<0,0001$; FC – Interação: $F_{5,72}=0,54$, $P=0,73$; Tratamento: $F_{1,72}=2,92$, $P=0,09$; Tempo: $F_{5,78}=16,81$, $P<0,0001$), figura 23.

A representação diagramática indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de veículo, CTAP, nor-BNI, naltrindole ou UPF-101 no cérebro dos ratos utilizados nos protocolos descritos acima, estão apresentados na figura 25.

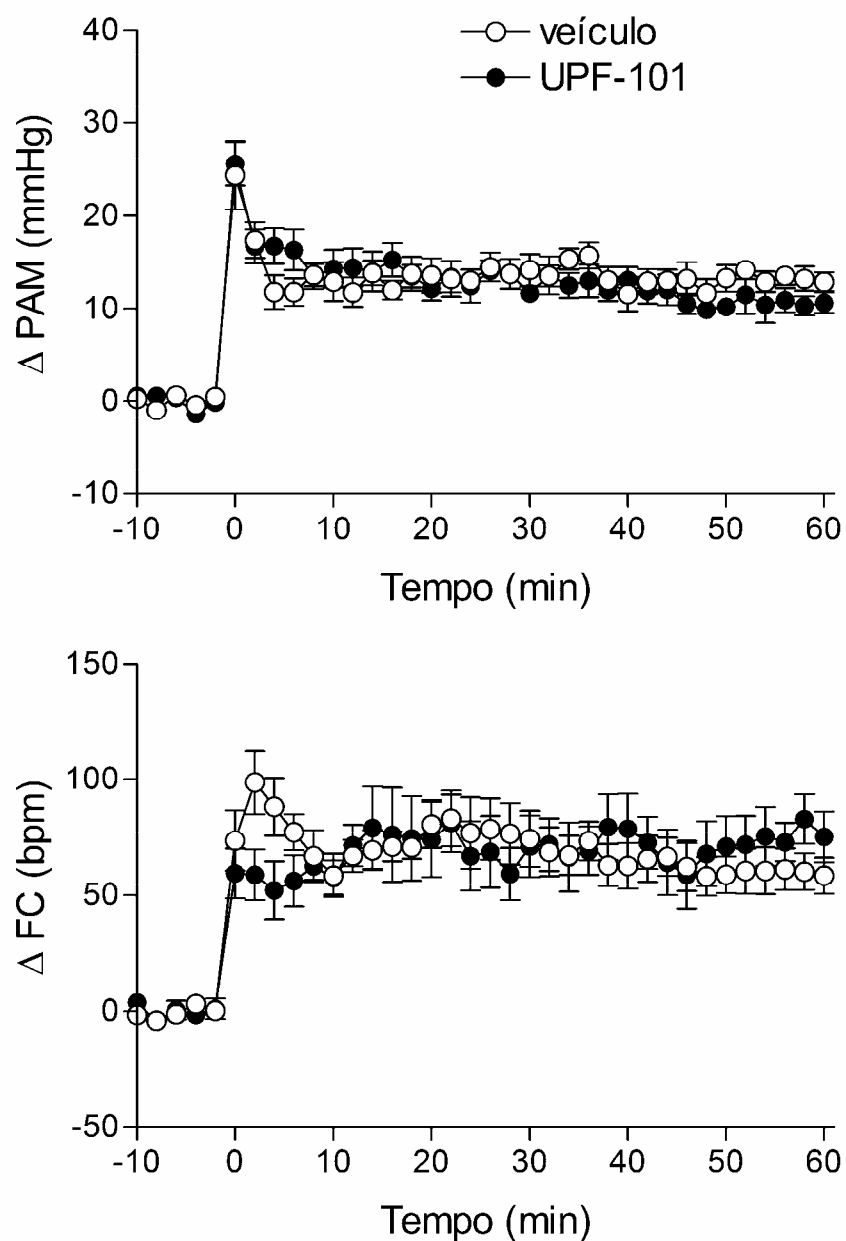


Figura 25. Curvas temporais mostrando as alterações na Δ PAM e Δ FC observadas durante o ER. Os círculos brancos correspondem aos animais que receberam 100nL de veículo (LCA, n=7) e os círculos pretos correspondem aos animais que receberam o tratamento com 0,3nmol/100nL de UPF-101 (antagonista seletivo ORL-1, n=7) no IL. Símbolos representam as médias e as barras o EPM. * P<0,05 Two-way ANOVA.

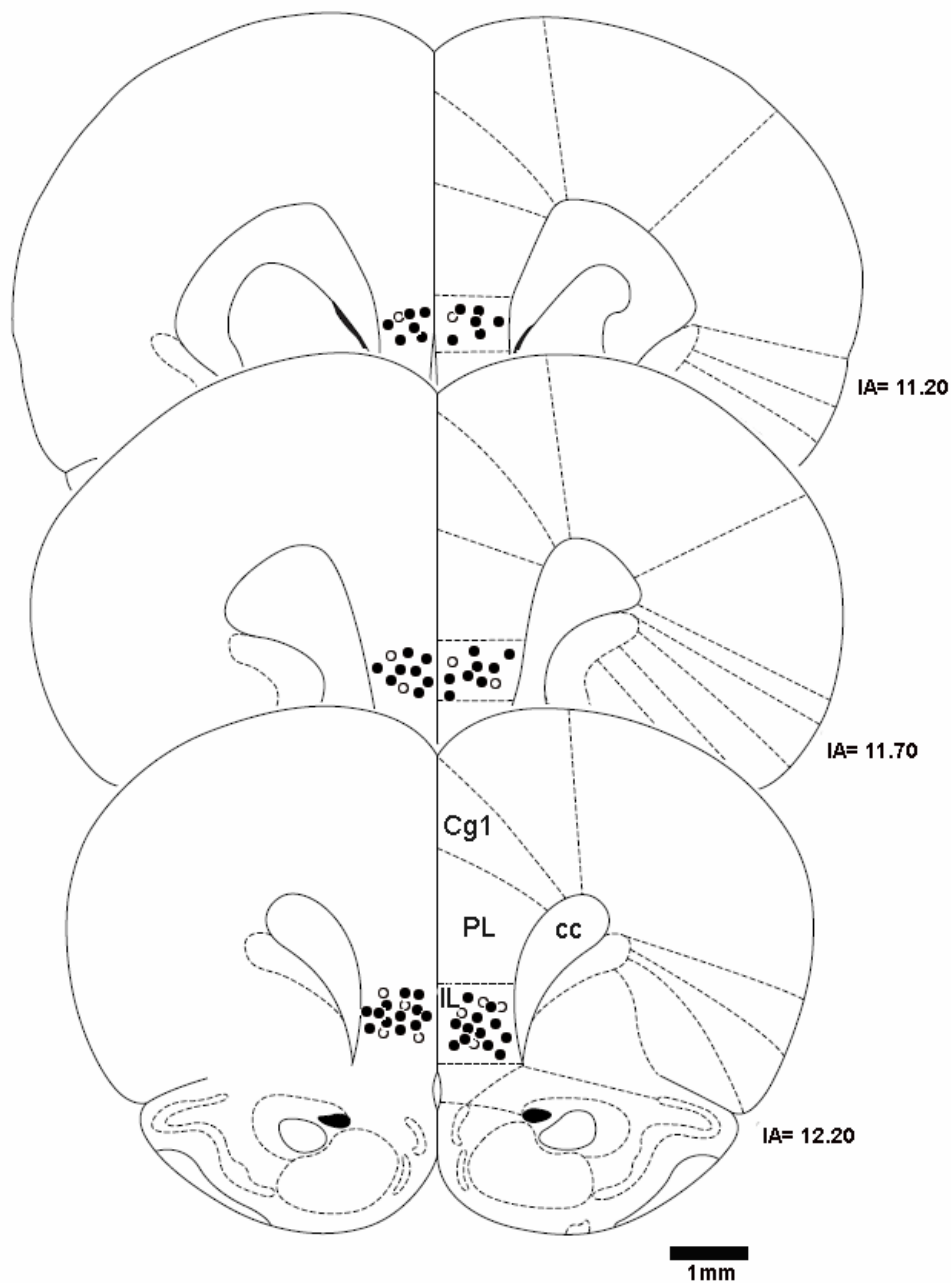


Figura 26. Representação diagramática dos sítios de injeção do veículo (círculos brancos) e antagonistas seletivos (círculos pretos) no IL, modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1997). PL- córtex pré-límbico, IL- córtex infralímbico, Cg1- córtex cíngulo 1, cc- corpo caloso, IA- interaural.

DISCUSSÃO

O bloqueio da neurotransmissão opioidérgica do PL e IL reduziu as respostas pressoras e taquicárdicas induzidas pelo ER. No entanto, essa redução das respostas cardiovasculares é modulada de forma distinta nas duas áreas estudadas: por receptores μ e κ na porção PL e apenas por receptores κ na porção IL. Além disso, o bloqueio seletivo dos receptores ORL-1 do PL exacerbou a taquicardia sem afetar a resposta da PA, enquanto no IL o bloqueio desses receptores não modificou a resposta cardiovascular observada durante essa situação aversiva, sugerindo que o PL e IL modulam as respostas cardiovasculares induzidas pelo mesmo estímulo aversivo desencadeando mecanismos diferentes.

O ER é um modelo de estresse agudo caracterizado como sendo um estímulo aversivo inescapável, que causa respostas autonômicas e hormonais. A elevação da PA e FC observada durante o ER é mantida devido a uma mudança no *set-point* do baroreflexo para valores mais altos de PA, devido a uma facilitação da resposta barorreflexa taquicárdica e de redução da resposta bradicárdica reflexa (CRESTANI *et al.*, 2010). Além disso, ocorre uma mudança no fluxo sanguíneo para órgãos importantes em uma reação de luta ou fuga, como cérebro e músculos, resultando em uma queda da temperatura cutânea e aumento da temperatura corporal (BARRON e VAN LOON, 1989; LONG *et al.*, 1990; IRVINE *et al.*, 1997; MCDOUGALL *et al.*, 2000; HSU *et al.*, 2007; FORTALEZA *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2009b; BUSNARDO *et al.*, 2010; AYDIN *et al.*, 2011). Estruturas suprabulbares estão envolvidas na mediação das respostas cardiovasculares observadas durante o ER, facilitando ou inibindo tanto a resposta simpática quanto a parassimpática (TAVARES e CORREA, 2006; CRESTANI *et al.*, 2009; FORTALEZA *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2009b; ALVES *et al.*, 2010; BUSNARDO *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2011).

Foi descrito o papel do CPFMV no controle cardiovascular durante situações aversivas (FRYSZTAK e NEAFSEY, 1994; RESSTEL e CORREA, 2006b; RESSTEL *et al.*, 2006; TAVARES e CORREA, 2006; RESSTEL *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2009a), assim como

o aumento da atividade neuronal nessa estrutura quando o animal é submetido ao ER (IMAKI *et al.*, 1993; YOKOYAMA e SASAKI, 1999).

A administração bilateral de naloxona no PL diminuiu tanto a resposta pressora quanto a resposta taquicárdica observada nesse modelo de estresse. Essa inibição foi observada em uma ampla faixa de dose – 0,03 nmol a 3nmol, sendo a curva dose-inibição da naloxona em forma de U-invertido. Esse padrão de resposta foi observado quando se analisou situações comportamentais durante manipulações no sistema nervoso central (GUIMARAES *et al.*, 1994; MOREIRA *et al.*, 2007). Sugere-se que esse perfil de resposta deve-se a modulação da atividade sináptica de neurotransmissores tanto excitatórios quanto inibitórios. Corroborando com essa hipótese, estudos *in-vitro* em tecido cortical demonstram que agonistas opióides influenciam a liberação tanto de glutamato quanto de GABA, os quais são respectivamente neurotransmissores excitatório e inibitório (NICOL *et al.*, 1996a; NICOL *et al.*, 1996b; SBRENNNA *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2004; NAKAMURA, 2011). Uma possível explicação para o fato da curva dose-inibição da naloxona ser em formato de U-invertido é que nas diferentes doses administradas ela module a funcionalidade de diferentes receptores. A diminuição da resposta cardiovascular ao ER causada pela administração de naloxona no PL decorreria de uma ação nos receptores μ e κ , pois observamos respostas similares quando foram administrados antagonistas seletivos para estes receptores.

Apesar do antagonismo dos receptores μ e κ gerarem respostas semelhantes à da naloxona, a magnitude da inibição induzida por 0,3nmol de naloxona foi maior do que àquela causada pelos antagonistas μ e κ seletivos, quando estes foram administrados separadamente. Sabendo que a naloxona é um antagonista não-seletivo e que sua constante de inibição é próxima para os receptores opióides μ , κ ou δ (MAGNAN *et al.*, 1982; LEWANOWITSCH e IRVINE, 2003), possivelmente a resposta de maior magnitude observada pela dose de 0,3 nmol deve-se ao bloqueio concomitante dos receptores μ e κ . Para confirmar isso, foi

realizada a administração conjunta de antagonistas μ e κ -seletivos, e observamos a similaridade da resposta. Semelhante às respostas observadas após bloqueio dos receptores μ e κ no PL durante o ER, o bloqueio da via NMDA/óxido nítrico reduziu as respostas cardiovasculares de aumento de PA e FC induzida pelo medo condicionado ao contexto (RESSTEL *et al.*, 2008).

A inibição seletiva dos receptores ORL-1 no PL potencializou a resposta taquicárdica induzida pelo ER, sem alterar a PA, demonstrando que o sistema opióide e o sistema nociceptina/orfanina FQ podem modular de formas distintas o mesmo contexto. Alguns trabalhos sugerem que a nociceptina/orfanina FQ seja um peptídeo anti-opióide funcional (MOGIL *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 2001). A administração i.c.v. do agonista ORL-1 induz bradicardia e hipotensão (KAPUSTA *et al.*, 1999), mesma resposta observada após a administração i.v. (GIULIANI *et al.*, 1997). Esses resultados sugerem que os receptores ORL-1 possuem um efeito depressor sobre a função cardiovascular, por inibição indireta do sistema simpático, concomitantemente com a ativação parassimpática. Respostas semelhantes à inibição dos receptores ORL-1 foram observadas quando o cloreto de cobalto (CoCl_2) foi administrado no PL. O CoCl_2 , inibidor não-seletivo de sinapses, potencializou a resposta taquicárdica evocada pelo ER, sem afetar a resposta pressora, sugerindo um papel inibitório do PL na elevação da FC durante o ER (TAVARES e CORREA, 2006; TAVARES *et al.*, 2009a). O bloqueio local dos receptores glutamatérgicos NMDA produz uma resposta semelhante à observada com CoCl_2 , sendo que a administração periférica de metilbrometo de atropina bloqueia a potencialização da taquicardia observada após o bloqueio dos receptores NMDA, demonstrando que essa influência inibitória do PL está relacionada com estimulação parassimpática (TAVARES e CORREA, 2006). Nós também sugerimos que a inibição dos receptores ORL-1 do PL, durante o ER, possa reduzir a atividade parassimpática e/ou aumentar a atividade simpática cardiovascular.

Diferentes neurotransmissões podem participar de neurocircuitos distintos e desempenhar papéis específicos nas respostas desencadeadas pelo estresse. Apesar da resposta observada após o antagonismo dos receptores ORL-1 no PL serem semelhantes aos resultados relatados em trabalhos prévios publicados pelo grupo, o bloqueio seletivo dos receptores μ e κ dessa estrutura reduzem tanto a resposta taquicárdica quanto a resposta pressora induzida pelo ER, resultados estes discordantes dos observados previamente com CoCl_2 ou o bloqueio de receptores glutamatérgicos NMDA (TAVARES e CORREA, 2006; TAVARES *et al.*, 2009a). Quando o bloqueio de sinapses é feito com CoCl_2 , todas as neurotransmissões da estrutura são inibidas. Quando se bloqueia uma neurotransmissão ou um grupo específico de receptores, as outras neurotransmissões presentes na estrutura continuam funcionais. Assim, nós sugerimos que a inibição dos receptores μ e κ no PL, durante o ER possa reduzir a atividade simpática e/ou aumentar a atividade parassimpática cardiovascular.

Apesar de vários trabalhos sugerirem que o córtex PL e IL exerçam papéis opostos no controle cardiovascular durante situações aversivas (FRYSZTAK e NEAFSEY, 1994; JINKS e MCGREGOR, 1997; TAVARES *et al.*, 2009a), nosso trabalho demonstra que o sistema opioidérgico presente em ambas estruturas modula de forma semelhante a resposta cardiovascular frente ao ER, sendo que essa modulação envolve mecanismos distintos.

O pré-tratamento do IL com naloxona na dose de 0,3nmol/100nL diminuiu tanto a resposta pressora quanto a resposta taquicárdica observada durante o ER, gerando uma curva dose-inibição em forma de U-invertido. Apesar do padrão de resposta observado após o tratamento do IL com naloxona ser semelhante ao observado no PL, apenas a administração de antagonista κ -seletivo foi capaz de induzir uma resposta similar à naloxona.

Concordando com os nossos resultados, trabalhos na literatura sugerem a participação dos receptores μ e κ nas respostas cardiovasculares frente a situações estressoras. Jiménez e colaboradores (1990) demonstraram que a administração i.c.v. de β -FNA (antagonista μ não

competitivo irreversível), em ratos hipertensos devido à privação social, reduz os valores de PA, enquanto o tratamento com ICI 174864 (antagonista δ -seletivo) não difere do grupo controle, demonstrando a participação dos receptores μ , sendo que os receptores δ parecem não ter papel nesse controle. Em situações não estressantes, a estimulação química dos receptores μ no NPV aumenta o fluxo simpático, a PA e FC (KIRITSY-ROY *et al.*, 1986), essa resposta pressora e taquicárdica também foi observada após administração i.c.v de baixas doses de agonista μ (RAO *et al.*, 2003), bem como após administração na porção ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (KEAY *et al.*, 1997). Apesar dos nossos resultados sugerirem que os receptores μ e κ modulem de forma similar as respostas cardiovasculares durante o ER, há trabalhos demonstrando papéis opostos desses receptores na mediação de respostas cardiovasculares (KEAY *et al.*, 1997; RAO *et al.*, 2003). Porém, a injeção intra-hipocampal de agonista κ é capaz de reduzir a resposta hipertensiva resultante do estresse de isolamento (SHEN e INGENITO, 1999), semelhantemente aos nossos resultados.

A inibição não-seletiva de sinapses no IL reduz o aumento da FC induzido pelo ER (TAVARES *et al.*, 2009a), sem alterar a resposta pressora observada durante essa situação estressante. Nossos resultados indicam que, além de modular a FC durante o ER, os receptores κ presentes nessa estrutura são capazes de modular também a PA. Semelhante aos nossos resultados, no modelo de estresse por jato de ar, Müller-Ribeiro e colaboradores (2012) demonstraram que a estimulação de receptores glutamatérgicos NMDA no IL foi capaz de reduzir a resposta cardiovascular induzida por esse modelo de estresse, enquanto o pré-tratamento com o agonista gabaérgico muscimol não diferiu do grupo controle. Como no caso do PL, nós sugerimos que os receptores κ presentes no IL facilitam a atividade simpática e/ou reduzem a atividade parassimpática cardiovascular.

Corroborando com nossos resultados, trabalhos sugerem que tanto o córtex PL quanto o IL exerçam papéis similares no controle da resposta cardiovascular frente a estímulos

estressores (RESSTEL *et al.*, 2006; RESSTEL *et al.*, 2008). No modelo de medo condicionado ao contexto, o bloqueio sináptico do PL ou IL com CoCl_2 reduziu tanto a resposta pressora quanto a resposta taquicárdica induzida pela re-exposição do rato ao contexto aversivo (RESSTEL *et al.*, 2006).

O CPFMV possui conexões diretas com estruturas relacionadas com o controle cardiovascular durante situações aversivas (TERREBERRY e NEAFSEY, 1987; NEAFSEY, 1990). Além disso, a administração do agonista gabaérgico muscimol no CPFMV aumenta a atividade em estruturas subcorticais tais como o hipotálamo dorsomedial, núcleo medial da amígdala e o núcleo medial do trato solitário durante exposição ao ER (MCDOUGALL *et al.*, 2004). Estudos neurofuncionais são necessários para entender a via pelo qual o sistema opioidérgico e nociceptina/orfanina FQ presentes no PL e IL desempenham seu papel durante o ER.

O CPFM também está envolvido com a atividade do eixo HPA durante situações de estresse psicológico. Lesões nessa região estão associadas com o aumento dos níveis circulantes de ACTH e corticosterona durante o ER (DIORIO *et al.*, 1993; FIGUEIREDO *et al.*, 2003). Dioro e colaboradores (1993) demonstraram que corticosterona administrada no CPFM diminuiu a concentração plasmática de ACTH e corticosterona em resposta ao ER, sugerindo que essa estrutura module de forma inibitória a atividade do eixo HPA induzida por estresse e que, na ausência do CPFM, ocorre uma potencialização do eixo HPA durante essas situações.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados indicam que o sistema opioidérgico presente no córtex PL e IL desempenha papel facilitatório, enquanto o sistema nociceptina/orfanina FQ presente no PL desempenharia papel inibitório sobre as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER. Além disso, a facilitação da resposta cardiovascular desempenhada pelo sistema opioidérgico de ambas estruturas é modulada de forma distinta: por receptores μ e κ na porção PL e apenas por receptores κ na porção IL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. H. et al. The insular cortex modulates cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Brain Res**, v. 1333, p. 57-63, May 28 2010.

ARDATI, A. et al. Interaction of [3H]orphanin FQ and 125I-Tyr14-orphanin FQ with the orphanin FQ receptor: kinetics and modulation by cations and guanine nucleotides. **Mol Pharmacol**, v. 51, n. 5, p. 816-24, May 1997.

AYDIN, C. et al. Effect of physical restraint on the limits of thermoregulation in telemetered rats. **Exp Physiol**, v. 96, n. 11, p. 1218-27, Nov 2011.

BACHELARD, H.; PITRE, M. Regional haemodynamic effects of mu-, delta-, and kappa-opioid agonists microinjected into the hypothalamic paraventricular nuclei of conscious, unrestrained rats. **Br J Pharmacol**, v. 115, n. 4, p. 613-21, Jun 1995.

BARRON, B. A.; VAN LOON, G. R. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. **J Auton Nerv Syst**, v. 28, n. 2, p. 179-87, Nov 1989.

BHATNAGAR, S. et al. The effects of prior chronic stress on cardiovascular responses to acute restraint and formalin injection. **Brain Res**, v. 797, n. 2, p. 313-20, Jun 29 1998.

BOLME, P. et al. Cardiovascular effects of morphine and opioid peptides following intracisternal administration in chloralose-anesthetized rats. **Eur J Pharmacol**, v. 48, n. 3, p. 319-24, Apr 1 1978.

BUNZOW, J. R. et al. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. **FEBS Lett**, v. 347, n. 2-3, p. 284-8, Jun 27 1994.

BUSNARDO, C. et al. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **Auton Neurosci**, v. 158, n. 1-2, p. 51-7, Dec 8 2010.

CHALMERS, J.; PILOWSKY, P. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. **J Hypertens**, v. 9, n. 8, p. 675-94, Aug 1991.

CHEN, X. et al. Possible mechanism of hypothermia induced by intracerebroventricular injection of orphanin FQ/nociceptin. **Brain Res**, v. 904, n. 2, p. 252-8, Jun 22 2001.

CONE, R. I. et al. Regional distribution of dynorphin and neo-endorphin peptides in rat brain, spinal cord, and pituitary. **J Neurosci**, v. 3, n. 11, p. 2146-52, Nov 1983.

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. 268-78, May 2009.

CRESTANI, C. C. et al. Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. **Stress**, v. 13, n. 1, p. 61-72, Jan 2010.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**, v. 74, n. 2, p. 323-64, Apr 1994.

DAMPNEY, R. A. et al. Afferent connections and spinal projections of the pressor region in the rostral ventrolateral medulla of the cat. **J Auton Nerv Syst**, v. 20, n. 1, p. 73-86, Jul 1987.

DEPAOLI, A. M. et al. Distribution of kappa opioid receptor mRNA in adult mouse brain: an in situ hybridization histochemistry study. **Mol Cell Neurosci**, v. 5, n. 4, p. 327-35, Aug 1994.

DIORIO, D. et al. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **J Neurosci**, v. 13, n. 9, p. 3839-47, Sep 1993.

FERNANDES, K. B. et al. Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline injection into the cingulate cortex of unanesthetized rats. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 6, p. 757-63, May 2003.

FERREIRA-JUNIOR, N. C. et al. Medial prefrontal cortex endocannabinoid system modulates baroreflex activity through CB(1) receptors. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 302, n. 7, p. R876-85, Apr 2012.

FIGUEIREDO, H. F. et al. The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 8, p. 2357-64, Oct 2003.

FISK, G. D.; WYSS, J. M. Pressor and depressor sites are intermingled in the cingulate cortex of the rat. **Brain Res**, v. 754, n. 1-2, p. 204-12, Apr 18 1997.

FISK, G. D.; WYSS, J. M. Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. **Brain Res**, v. 859, n. 1, p. 83-95, Mar 17 2000.

FLORENTINO, A. et al. Hypotensive effect of naloxone on high blood pressure induced by stress in the rat. **Life Sci**, v. 41, n. 22, p. 2445-53, Nov 30 1987.

FORTALEZA, E. A. et al. The medial amygdaloid nucleus modulates cardiovascular responses to acute restraint in rats. **Neuroscience**, v. 159, n. 2, p. 717-26, Mar 17 2009.

FRYSZTAK, R. J.; NEAFSEY, E. J. The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. **Brain Res**, v. 643, n. 1-2, p. 181-93, Apr 18 1994.

GEORGE, S. R. et al. Distinct distributions of mu, delta and kappa opioid receptor mRNA in rat brain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 205, n. 2, p. 1438-44, Dec 15 1994.

GIULIANI, S. et al. Effect of nociceptin on heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. **Eur J Pharmacol**, v. 333, n. 2-3, p. 177-9, Aug 27 1997.

GOLDSTEIN, A.; GHAZAROSSIAN, V. E. Immunoreactive dynorphin in pituitary and brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 77, n. 10, p. 6207-10, Oct 1980.

GOLDSTEIN, S. Central catecholamines and the control of sympathetic tone. In: KUNOS, G. E. C., J. (Ed.). **Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation**. Boston, v.2, 1991.

GREVEL, J.; SADEE, W. An opiate binding site in the rat brain is highly selective for 4,5-epoxymorphinans. **Science**, v. 221, n. 4616, p. 1198-201, Sep 16 1983.

GROENEWEGEN, H. J. Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. **Neuroscience**, v. 24, n. 2, p. 379-431, Feb 1988.

GUIMARAES, F. S. et al. Anxiolytic effect of cannabidiol derivatives in the elevated plus-maze. **Gen Pharmacol**, v. 25, n. 1, p. 161-4, Jan 1994.

GUYENET, P. G. et al. Rostral ventrolateral medulla and sympathorespiratory integration in rats. **Am J Physiol**, v. 259, n. 5 Pt 2, p. R1063-74, Nov 1990.

HILL, C. et al. The effects of beta-endorphin (beta-END) on cardiovascular and behavioral dynamics in conscious rats. **Brain Res Bull**, v. 59, n. 1, p. 29-34, Oct 15 2002.

HILTON, S. M. Hypothalamic regulation of the cardiovascular system. **Br Med Bull**, v. 22, n. 3, p. 243-8, Sep 1966.

HOUDI, A. A. et al. Effects of beta-FNA on sympathoadrenal, cardiovascular, and analgesic responses to DAMPGO at rest and during stress. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 53, n. 4, p. 927-33, Apr 1996.

HSU, H. R. et al. Acute effects of nicotine on restraint stress-induced anxiety-like behavior, c-Fos expression, and corticosterone release in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 566, n. 1-3, p. 124-31, Jul 2 2007.

HUGHES, J. et al. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. **Nature**, v. 258, n. 5536, p. 577-80, Dec 18 1975.

HURLEY, K. M. et al. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. **J Comp Neurol**, v. 308, n. 2, p. 249-76, Jun 8 1991.

IMAKI, T. et al. Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. **Brain Res**, v. 616, n. 1-2, p. 114-25, Jul 9 1993.

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

ISHIKAWA, A.; NAKAMURA, S. Convergence and interaction of hippocampal and amygdalar projections within the prefrontal cortex in the rat. **J Neurosci**, v. 23, n. 31, p. 9987-95, Nov 5 2003.

JASKIW, G. E.; WEINBERGER, D. R. Ibotenic acid lesions of the medial prefrontal cortex potentiate FG-7142-induced attenuation of exploratory activity in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 36, n. 3, p. 695-7, Jul 1990.

JIMENEZ, I. et al. Stereoselectivity and subtype of the opiate receptor involved in stress-induced hypertension. **Eur J Pharmacol**, v. 182, n. 1, p. 155-60, Jun 21 1990.

JINKS, A. L.; MCGREGOR, I. S. Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. **Brain Res**, v. 772, n. 1-2, p. 181-90, Oct 24 1997.

JOMARY, C. et al. Autoradiographic localization of supraspinal kappa-opioid receptors with [125I-Tyr1, D-Pro10]dynorphin A-(1-11). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 2, p. 627-31, Jan 1988.

KAPUSTA, D. R. et al. Central administration of [Phe¹psi(CH₂-NH)Gly²]nociceptin(1-13)-NH₂ and orphanin FQ/nociceptin (OFQ/N) produce similar cardiovascular and renal responses in conscious rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 289, n. 1, p. 173-80, Apr 1999.

KEAY, K. A. et al. Cardiovascular effects of microinjections of opioid agonists into the 'Depressor Region' of the ventrolateral periaqueductal gray region. **Brain Res**, v. 762, n. 1-2, p. 61-71, Jul 11 1997.

KIM, K. W. et al. Pharmacological effects of naltriben as a ligand for opioid mu and kappa receptors in rat cerebral cortex. **Life Sci**, v. 68, n. 11, p. 1305-15, Feb 2 2001.

KIM, K. W. et al. Receptor selectivity of Met-enkephalin-Arg6-Phe7, an endogenous opioid peptide, in cerebral cortex of human and rat. **Life Sci**, v. 67, n. 1, p. 61-71, May 26 2000.

KIRITSY-ROY, J. A. et al. Effects of mu-opioid receptor stimulation in the hypothalamic paraventricular nucleus on basal and stress-induced catecholamine secretion and cardiovascular responses. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 239, n. 3, p. 814-22, Dec 1986.

KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. **J Comp Neurol**, v. 171, n. 2, p. 157-91, Jan 15 1977.

KRIEMAN, M. J. et al. Effects of adinazolam on plasma catecholamine, heart rate and blood pressure responses in stressed and non-stressed rats. **Neuropharmacology**, v. 31, n. 1, p. 33-8, Jan 1992.

LE MERRER, J. et al. Reward processing by the opioid system in the brain. **Physiol Rev**, v. 89, n. 4, p. 1379-412, Oct 2009.

LEONARD, C. M. The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. **Brain Res**, v. 12, n. 2, p. 321-43, Feb 1969.

LERICHE, M. et al. Presence of pro-opiomelanocortin mRNA in the rat medial prefrontal cortex, nucleus accumbens and ventral tegmental area: studies by RT-PCR and in situ hybridization techniques. **Neuropeptides**, v. 41, n. 6, p. 421-31, Dec 2007.

LEWANOWITSCH, T.; IRVINE, R. J. Naloxone and its quaternary derivative, naloxone methiodide, have differing affinities for mu, delta, and kappa opioid receptors in mouse brain homogenates. **Brain Res**, v. 964, n. 2, p. 302-5, Feb 28 2003.

LIOTTA, A. S. et al. Demonstration of in vivo synthesis of pro-opiomelanocortin-, beta-endorphin-, and alpha-melanotropin-like species in the adult rat brain. **J Neurosci**, v. 4, n. 4, p. 956-65, Apr 1984.

LOEWY, A. D. Raphe pallidus and raphe obscurus projections to the intermediolateral cell column in the rat. **Brain Res**, v. 222, n. 1, p. 129-33, Oct 5 1981.

LOEWY, A. D. Forebrain nuclei involved in autonomic control. **Prog Brain Res**, v. 87, p. 253-68, 1991.

LOEWY, A. D.; MCKELLAR, S. The neuroanatomical basis of central cardiovascular control. **Fed Proc**, v. 39, n. 8, p. 2495-503, Jun 1980.

LONG, N. C. et al. Stress-induced rise of body temperature in rats is the same in warm and cool environments. **Physiol Behav**, v. 47, n. 4, p. 773-5, Apr 1990.

MAGNAN, J. et al. The binding spectrum of narcotic analgesic drugs with different agonist and antagonist properties. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 319, n. 3, p. 197-205, Jun 1982.

MANSOUR, A. et al. Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. **J Neurosci**, v. 7, n. 8, p. 2445-64, Aug 1987.

MARSON, L. et al. mu-Opioid peptide modulation of cardiovascular and sympathoadrenal responses to stress. **Am J Physiol**, v. 257, n. 4 Pt 2, p. R901-8, Oct 1989.

MARTIN, W. R. et al. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 197, n. 3, p. 517-32, Jun 1976.

MCALLEN, R. M.; SPYER, K. M. The location of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the medulla of the cat. **J Physiol**, v. 258, n. 1, p. 187-204, Jun 1976.

MCDONALD, A. J. et al. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. **Neuroscience**, v. 71, n. 1, p. 55-75, Mar 1996.

MCDONALD, J.; LAMBERT, D. G. Binding of GTPgamma[35S] is regulated by GDP and receptor activation. Studies with the nociceptin/orphanin FQ receptor. **Br J Pharmacol**, v. 159, n. 6, p. 1286-93, Mar 2010.

MCDOUGALL, S. J. et al. Restraint stress : differential cardiovascular responses in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 35, n. 1 Pt 1, p. 126-9, Jan 2000.

MCDUGALL, S. J. et al. Medial prefrontal cortical integration of psychological stress in rats. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 9, p. 2430-40, Nov 2004.

MEUNIER, J. C. et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. **Nature**, v. 377, n. 6549, p. 532-5, Oct 12 1995.

MOGIL, J. S. et al. Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. **Neuroscience**, v. 75, n. 2, p. 333-7, Nov 1996.

MOLLEREAU, C. et al. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. **FEBS Lett**, v. 341, n. 1, p. 33-8, Mar 14 1994.

MOREIRA, F. A. et al. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 3, p. 958-65, Mar 2007.

MULLER-RIBEIRO, F. C. et al. Contribution of infralimbic cortex in the cardiovascular response to acute stress. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 303, n. 6, p. R639-50, Sep 15 2012.

NAKAMURA, K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 301, n. 5, p. R1207-28, Nov 2011.

NEAFSEY, E. J. Prefrontal cortical control of the autonomic nervous system: anatomical and physiological observations. **Prog Brain Res**, v. 85, p. 147-65; discussion 165-6, 1990.

NEAL, C. R., JR. et al. Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: comparison of ORL1 receptor mRNA expression with (125)I-[(14)Tyr]-orphanin FQ binding. **J Comp Neurol**, v. 412, n. 4, p. 563-605, Oct 4 1999.

NICOL, B. et al. Nociceptin induced inhibition of K⁺ evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. **Br J Pharmacol**, v. 119, n. 6, p. 1081-3, Nov 1996a.

NICOL, B. et al. mu- and kappa-opioids inhibit K⁺ evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. **Neurosci Lett**, v. 218, n. 2, p. 79-82, Nov 1 1996b.

OKA, T. Enkephalin receptor in the rabbit ileum. **Br J Pharmacol**, v. 68, n. 2, p. 193-5, Feb 1980.

OWENS, N. C. et al. Medial prefrontal cortex depressor response: role of the solitary tract nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 89, n. 4, p. 1331-46, 1999.

OWENS, N. C.; VERBERNE, A. J. Medial prefrontal depressor response: involvement of the rostral and caudal ventrolateral medulla in the rat. **J Auton Nerv Syst**, v. 78, n. 2-3, p. 86-93, Jan 14 2000.

PAAKKARI, P. et al. Evidence for differential opioid mu 1- and mu 2-receptor-mediated regulation of heart rate in the conscious rat. **Neuropharmacology**, v. 31, n. 8, p. 777-82, Aug 1992.

PAXINOS, G., WATSON, C. **The Rat Brain in stereotaxic coordinates**. 2007.

PFEIFFER, A. et al. Cardiovascular and respiratory effects of mu-, delta- and kappa-opiate agonists microinjected into the anterior hypothalamic brain area of awake rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 225, n. 3, p. 735-41, Jun 1983a.

PFEIFFER, A. et al. Mu-receptors mediate opioid cardiovascular effects at anterior hypothalamic sites through sympatho-adrenomedullary and parasympathetic pathways. **Endocrinology**, v. 113, n. 3, p. 929-38, Sep 1983b.

PRADHAN, A. A.; CLARKE, P. B. Comparison between delta-opioid receptor functional response and autoradiographic labeling in rat brain and spinal cord. **J Comp Neurol**, v. 481, n. 4, p. 416-26, Jan 24 2005.

RAO, S. P. et al. Cardiovascular responses to central administration of mu and kappa opioid receptor agonist and antagonist in normal rats. **Peptides**, v. 24, n. 5, p. 745-54, May 2003.

REINSCHEID, R. K. et al. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. **Science**, v. 270, n. 5237, p. 792-4, Nov 3 1995.

REIS, D. G. et al. Behavioral and autonomic responses to acute restraint stress are segregated within the lateral septal area of rats. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23171, 2011.

RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Injection of l-glutamate into medial prefrontal cortex induces cardiovascular responses through NMDA receptor - nitric oxide in rat. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 1, p. 160-7, Jul 2006a.

RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Involvement of the medial prefrontal cortex in central cardiovascular modulation in the rat. **Auton Neurosci**, v. 126-127, p. 130-8, Jun 30 2006b.

RESSTEL, L. B. et al. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. **Cereb Cortex**, v. 18, n. 9, p. 2027-35, Sep 2008.

RESSTEL, L. B. et al. Medial prefrontal cortex modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. **Brain Res**, v. 1015, n. 1-2, p. 136-44, Jul 23 2004.

RESSTEL, L. B. et al. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. **Neuroscience**, v. 143, n. 2, p. 377-85, Dec 1 2006.

SARTER, M.; MARKOWITSCH, H. J. Convergence of basolateral amygdaloid and mediodorsal thalamic projections in different areas of the frontal cortex in the rat. **Brain Res Bull**, v. 10, n. 5, p. 607-22, May 1983.

SARTER, M.; MARKOWITSCH, H. J. Collateral innervation of the medial and lateral prefrontal cortex by amygdaloid, thalamic, and brain-stem neurons. **J Comp Neurol**, v. 224, n. 3, p. 445-60, Apr 10 1984.

SBRENNNA, S. et al. L-glutamate and gamma-aminobutyric acid efflux from rat cerebrocortical synaptosomes: modulation by kappa- and mu- but not delta- and opioid receptor like-1 receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 291, n. 3, p. 1365-71, Dec 1999.

SCHULZ, R. et al. Selective receptors for beta-endorphin on the rat vas deferens. **Life Sci**, v. 24, n. 9, p. 843-9, Feb 26 1979.

SESACK, S. R. et al. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **J Comp Neurol**, v. 290, n. 2, p. 213-42, Dec 8 1989.

SHEN, S.; INGENITO, A. J. Comparison of cardiovascular responses to intra-hippocampal mu, delta and kappa opioid agonists in spontaneously hypertensive rats and isolation-induced hypertensive rats. **J Hypertens**, v. 17, n. 4, p. 497-505, Apr 1999.

SIMANTOV, R. et al. Opioid peptide enkephalin: immunohistochemical mapping in rat central nervous system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 5, p. 2167-71, May 1977.

SPYER, K. M. The central nervous organization of reflex circulatory control. In: LOEWY, A. D. A. S., K.M. (Ed.). **Central regulation of autonomic functions**. New York: Oxford University Press, 1990.

TAVARES, R. F. et al. Pressor effects of electrical stimulation of medial prefrontal cortex in unanesthetized rats. **J Neurosci Res**, v. 77, n. 4, p. 613-20, Aug 15 2004.

TAVARES, R. F.; CORREA, F. M. Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. **Neuroscience**, v. 143, n. 1, p. 231-40, Nov 17 2006.

TAVARES, R. F. et al. Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 11, p. 2601-7, Aug 15 2009a.

TAVARES, R. F. et al. The paraventricular nucleus of the hypothalamus is involved in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress**, v. 12, n. 2, p. 178-85, Mar 2009b.

TAYLOR, E. W. et al. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiol Rev**, v. 79, n. 3, p. 855-916, Jul 1999.

TERREBERRY, R. R.; NEAFSEY, E. J. The rat medial frontal cortex projects directly to autonomic regions of the brainstem. **Brain Res Bull**, v. 19, n. 6, p. 639-49, Dec 1987.

VERBERNE, A. J. Cuneiform nucleus stimulation produces activation of medullary sympathoexcitatory neurons in rats. **Am J Physiol**, v. 268, n. 3 Pt 2, p. R752-8, Mar 1995.

VERBERNE, A. J. Medullary sympathoexcitatory neurons are inhibited by activation of the medial prefrontal cortex in the rat. **Am J Physiol**, v. 270, n. 4 Pt 2, p. R713-9, Apr 1996.

VERBERNE, A. J.; OWENS, N. C. Cortical modulation of the cardiovascular system. **Prog Neurobiol**, v. 54, n. 2, p. 149-68, Feb 1998.

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

WEBER, E. et al. Immunohistochemical distribution of alpha-neo-endorphin/dynorphin neuronal systems in rat brain: evidence for colocalization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 79, n. 9, p. 3062-6, May 1982.

WEIHE, E. et al. Co-localization of proenkephalin- and prodynorphin-derived opioid peptides in laminae IV/V spinal neurons revealed in arthritic rats. **Neurosci Lett**, v. 85, n. 2, p. 187-92, Feb 29 1988.

YANG, T. T. et al. Morphine inhibits glutamate exocytosis from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes) by reducing Ca²⁺ influx. **Synapse**, v. 51, n. 2, p. 83-90, Feb 2004.

YOKOYAMA, C.; SASAKI, K. Regional expressions of Fos-like immunoreactivity in rat cerebral cortex after stress; restraint and intraperitoneal lipopolysaccharide. **Brain Res**, v. 816, n. 2, p. 267-75, Jan 23 1999.

ZAGON, I. S. et al. Characterization of zeta (zeta): a new opioid receptor involved in growth. **Brain Res**, v. 482, n. 2, p. 297-305, Mar 20 1989.

ZAMIR, N. et al. Differential processing of prodynorphin and proenkephalin in specific regions of the rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 21, p. 6886-9, Nov 1984.