

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Ana Caroline Ventris de Godoy

**EFEITOS DO ANTI-HIPERTENSIVO DE AÇÃO CENTRAL RILMENIDINA NAS
ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E MOLECULARES RESULTANTES DO AVE
HEMORRÁGICO EXPERIMENTAL NO CÓRTEX INSULAR DE ROEDORES**

Belo Horizonte

2026

Ana Caroline Ventris de Godoy

**EFEITOS DO ANTI-HIPERTENSIVO DE AÇÃO CENTRAL RILMENIDINA NAS
ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E MOLECULARES RESULTANTES DO AVE
HEMORRÁGICO EXPERIMENTAL NO CÓRTEX INSULAR DE ROEDORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, com área de concentração em Fisiologia.

Orientador: Marco Antônio Peliky Fontes
Coorientadora: Cibele Rocha Resende

Belo Horizonte

2026

043

Godoy, Ana Caroline Ventris de.

Efeitos do anti-hipertensivo de ação central rilmenidina nas alterações funcionais e moleculares resultantes do AVE hemorrágico experimental no córtex insular de roedores [manuscrito] / Ana Caroline Ventris de Godoy. – 2026.

200 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Marco Antônio Peliky Fontes. Coorientadora: Cibeles Rocha Resende.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Sistema Nervoso Simpático. 3. Córtex Insular. 4. Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico. I. Fontes, Marco Antônio Peliky. II. Resende, Cibeles Rocha. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

"EFEITOS DO ANTI-HIPERTENSIVO DE AÇÃO CENTRAL RILMENIDINA NAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E MOLECULARES RESULTANTES DO AVE HEMORRÁGICO EXPERIMENTAL NO CÓRTEX INSULAR DE ROEDORES"

ANA CAROLINE VENTRIS DE GODOY

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **26 de janeiro de 2026**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

PROF. DR. FABRÍCIO DE ARAÚJO MOREIRA - ICB/UFMG

PROF. DR. CARLOS CESAR CRESTANI - FCFAR/UNESP

PROF. DR. RUY RIBEIRO CAMPOS JÚNIOR - EPM/UNIFESP

PROF. DR. CARLOS HENRIQUE XAVIER CUSTÓDIO - ICB/UFMG

PROFA. DRA CIBELE ROCHA RESENDE, COORIENTADORA - ICB/UFMG

PROF. DR. MARCO ANTÔNIO PELIKY FONTES, ORIENTADOR - ICB/UFMG

Belo Horizonte, 26 de janeiro de 2026



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique Xavier Custodio, Usuário Externo**, em 02/02/2026, às 10:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabricio de Araujo Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 02/02/2026, às 10:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ruy Ribeiro de Campos Junior, Usuário Externo**, em 02/02/2026, às 10:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Cesar Crestani, Usuário Externo**, em 02/02/2026, às 15:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marco Antonio Peliky Fontes, Professor do Magistério Superior**, em 03/02/2026, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cibele Rocha Resende, Professora do Magistério Superior**, em 04/02/2026, às 10:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4908829** e o código CRC **61B4B780**.

À Deus, ao Universo, aos meus Guias
Espirituais e aos meus pais – Sueli Ventris
e Gilmar Godoy

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Marco Antonio Peliky Fontes, por me receber, orientar e compartilhar comigo suas ideias, sou grata por ter realizado este projeto incrível e desafiador.

Agradeço à minha coorientadora Dr. Cibele Rocha Resende por tantos ensinamentos, a disponibilidade, dedicação e zelo na execução dos protocolos e análise de dados. Foram muitas manhãs de idas e vindas do departamento de farmacologia. Tivemos manhãs divertidas nas coletas e levo comigo o seu exemplo e sua forma de trabalhar.

Também agradeço aos alunos de iniciação científica Henrique Abramo Mendes, Matheus Henrique da Silva Cruz e Giovane Lucas do Carmo Pires pelo tempo, disponibilidade em nos ajudar, por todo o cuidado com as amostras durante os experimentos e o zelo com os animais.

Agradeço ao Dr. Lucas Rodrigues Aguiar Ribeiro pela preparação das amostras de proteômica e ao professor Dr. Thiago Verano Braga por quantificar as amostras no espectômetro de massa enquanto estava em seu período sabático na Dinamarca, prevenindo atrasos ou outras intercorrências.

Agradeço aos professores Dr. Paula Bargi de Souza e Dr. Rodrigo Antonio Peliciari-Garcia pela ideia e auxílio nas análises de ciclo circadiano, por todos os cuidados e critérios padronizados para a acurácia e reprodutibilidade dos dados.

Agradeço aos meus pais, Sueli e Gilmar, pelo amor e o apoio emocional, mesmo à distância. Vocês serão para mim sempre exemplo de dedicação, lealdade e honestidade, que são alguns dos pilares da ciência.

Agradeço aos meus irmãos, Yasmin, Gabriel e Júlio, por todo o amor, carinho e preocupação. Vocês me ajudaram a não esquecer quem eu sou.

Agradeço ao meu tio Paulo César por todo o carinho, preocupação e apoio que sempre me deu à distância, você fez parte da minha caminhada de estudos.

Agradeço ao meu marido, Lucas, pelo amor e companheirismo ao longo desse tempo. Sua amizade e seu amor foram luz no meu caminho.

Agradeço à minha amiga e comadre Dr. Melissa Goulart por sempre estar por perto desde o mestrado, dividindo angústias e vitórias. Obrigada minha amiga.

Agradeço ao meu querido amigo André Fernandes, futuro doutor, que me socorreu em tantos momentos! Sua companhia, carinho e amizade foram luz para mim durante meus anos de doutorado. Obrigada meu amigo.

Agradeço ao meu DJ favorito, Vintage Culture: seus sons foram uma explosão de dopamina diária durante meus anos de doutorado, eles eram tudo o que eu precisava nos dias que o desânimo batia.

Agradeço ao grupo de pesquisa do professor Marco Antonio, ao Laboratório de Hipertensão pelo espaço, insumos e equipamentos fornecidos, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da UFMG e às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

O acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEh) envolvendo o córtex insular (IC) está associado a disfunções cardiovasculares e aumento da morbidade e mortalidade. Contudo os mecanismos neurobiológicos centrais que conectam o AVEh no IC a essas complicações ainda não são completamente compreendidos. O presente estudo teve como objetivo investigar, de forma integrada, os efeitos funcionais e moleculares do AVEh no IC de roedores e avaliar o potencial terapêutico da rilmenidina, um agente anti-hipertensivo de ação central. Para isso, foram realizadas a avaliação dos parâmetros cardiovasculares, autonômicos, neuroquímicos e moleculares pós-AVEh insular. Adicionalmente, desenvolvemos um modelo de AVEh insular em camundongos C57BL/6J, por se tratar de uma linhagem amplamente utilizada na pesquisa e por ser base para a geração de diversos modelos knockout e transgênicos. Os resultados em ratos demonstraram que o AVEh no IC induziu taquicardia e aumento pressórico sustentados, sem alterações significativas nos parâmetros morfométricos, neurocomportamentais ou na sobrevivência. A ritmicidade circadiana da temperatura corporal foi identificada em todos os grupos, e o AVEh no IC promoveu alterações no mesor e na acrofase. Em nível molecular, o AVEh no IC induziu regulação positiva dos genes GAD1, GAD2 e Slc32a1. No RVLM, o AVEh insular promoveu regulação negativa da expressão de NMDA, AMPA, vGLUT, GABA-A e GABA-B. A dosagem de neurotransmissores demonstrou que o AVEh reduziu a concentração de glutamato, sem alterar significativamente a concentração de GABA no IC. No RVLM, o AVEh insular aumentou a concentração de GABA, sem alterações significativas nas concentrações de glutamato. No coração, a concentração de norepinefrina foi significativamente maior no grupo AVEh insular em comparação ao controle, caracterizando hiperatividade simpática cardíaca, enquanto a expressão dos receptores β_1 e β_2 não diferiu entre os grupos. O tratamento com rilmenidina restaurou a função cardiovascular e o mesor da ritmicidade circadiana da temperatura corporal, reverteu as alterações moleculares no IC e, no RVLM, modulou negativamente apenas a proteína GAD1 e positivamente a GABRA4. No IC, o grupo tratado apresentou aumento da concentração de glutamato, embora ainda diferente do controle, sem alterações na concentração de GABA. No RVLM, o tratamento normalizou as concentrações de GABA para níveis semelhantes ao controle, enquanto as concentrações de glutamato permaneceram inalteradas. Além disso, a rilmenidina normalizou as concentrações cardíacas de norepinefrina. Em camundongos C57BL/6J, o AVEh no IC induziu taquicardia, aumento da norepinefrina cardíaca, instaurou um processo inflamatório cardíaco de intensidade branda e causou possíveis danos ao rim esquerdo. O tratamento com rilmenidina preveniu a taquicardia e o aumento de norepinefrina, o processo inflamatório cardíaco, as alterações morfométricas do rim esquerdo e conferiu maior sobrevivência aos animais. Em conjunto, este estudo demonstra que o AVEh no IC de roedores desencadeia uma disfunção autonômica simpática de origem central, com repercussões funcionais e moleculares. Foi estabelecido de forma inédita e com sucesso a padronização e a caracterização do modelo experimental de AVEh no córtex insular de camundongos C57BL/6J, demonstrando que a lesão nessa região é capaz de desencadear uma intensa hiperativação simpática. Os achados reforçam a rilmenidina como um agente cardioprotetor capaz de reverter este desequilíbrio autonômico por meio da modulação de circuitos centrais. Esses resultados consolidam o papel crítico do IC no controle cardiovascular e indicam que o modelo experimental aqui utilizado constitui

uma ferramenta importante e promissora para a investigação fisiopatológica e farmacológica dos mecanismos das cardiomiopatias secundárias ao AVEh.

Palavras-chave: córtex insular; acidente vascular hemorrágico cerebral; atividade simpática.

ABSTRACT

Hemorrhagic stroke (AVEh) involving the insular cortex (IC) is associated with cardiovascular dysfunctions and increased morbidity and mortality. However, the central neurobiological mechanisms linking AVEh in the IC to these complications remain incompletely understood. The present study aimed to investigate, in an integrated manner, the functional and molecular effects of AVEh in the IC of rodents and to evaluate the therapeutic potential of rilmenidine, a centrally acting antihypertensive agent. To this end, cardiovascular, autonomic, neurochemical, and molecular parameters were evaluated following insular AVEh. Additionally, an insular AVEh model was developed in C57BL/6J mice, as this strain is widely used in research and serves as the basis for the generation of multiple knockout and transgenic models. Results in rats demonstrated that AVEh in the IC induced sustained tachycardia and increased arterial pressure, without significant changes in morphometric or neurological parameters or survival. Circadian rhythmicity of body temperature was identified in all groups, and AVEh in the IC altered both mesor and acrophase. At the molecular level, AVEh in the IC induced upregulation of the genes GAD1, GAD2, and Slc32a1. In the RVLM, insular AVEh promoted downregulation of NMDA, AMPA, vGLUT, GABA-A, and GABA-B expression. Neurotransmitter quantification showed that AVEh reduced glutamate concentration without significantly altering GABA concentration in the IC. In the RVLM, insular AVEh increased GABA concentration, without significant changes in glutamate levels. In the heart, norepinephrine concentration was significantly higher in the insular AVEh group compared with controls, characterizing cardiac sympathetic hyperactivity, while the expression of β_1 and β_2 receptors did not differ between groups. Treatment with rilmenidine restored cardiovascular function and the mesor of circadian body temperature rhythmicity, reversed molecular alterations in the IC, and, in the RVLM, negatively modulated only GAD1 protein and positively modulated GABRA4. In the IC, the treated group showed increased glutamate concentration, although it remained different from controls, while GABA concentration was unchanged. In the RVLM, treatment normalized GABA concentrations to levels similar to controls, whereas glutamate concentrations remained unchanged. In addition, rilmenidine normalized cardiac norepinephrine concentrations. In C57BL/6J mice, AVEh in the IC induced tachycardia, increased cardiac norepinephrine, triggered a mild cardiac inflammatory process, and caused possible damage to the left kidney. Rilmenidine treatment prevented tachycardia and norepinephrine elevation, cardiac inflammation, morphometric alterations in the left kidney, and increased animal survival. Taken together, this study demonstrates that AVEh in the IC of rodents triggers a centrally mediated sympathetic autonomic dysfunction, with functional and molecular consequences. The standardization and characterization of an experimental AVEh model in the insular cortex of C57BL/6J mice were successfully and originally established, demonstrating that injury to this region is capable of inducing intense sympathetic hyperactivation. These findings reinforce rilmenidine as a cardioprotective agent capable of reversing this autonomic imbalance through modulation of central circuits. Moreover, the results consolidate the critical role of the IC in cardiovascular control and indicate that the experimental model used herein represents an important and promising tool for pathophysiological and pharmacological investigation of the mechanisms underlying AVEh-related cardiomyopathies.

Keywords: insular cortex; hemorrhagic stroke; sympathetic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração dos principais tipos de acidente vascular encefálico, destacando o contexto de obstrução vascular no AVE isquêmico e a ruptura do vaso no AVE hemorrágico	26
Figura 2 – Ilustração esquemática dos principais tipos de acidente vascular encefálico, destacando quando ocorre a obstrução vascular no AVC isquêmico e a ruptura do vaso no AVC hemorrágico.....	33
Figura 3 – Modelo conceitual da justificativa do estudo	34
Figura 4 – Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliação do perfil cardiovascular após AVE hemorrágico no córtex insular de ratos <i>Wistar</i>	51
Figura 5 – Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliação do perfil neurocomportamental após AVE hemorrágico no córtex insular de ratos <i>Wistar</i>	52
Figura 6 – Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliação da temperatura corporal e ritmicidade circadiana após AVE hemorrágico no córtex insular de ratos <i>Wistar</i>	53
Figura 7 – Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliação do perfil neuroquímicos e molecular após AVE hemorrágico no córtex insular de ratos <i>Wistar</i>	54
Figura 8 – Fotomicrografia representativa do cérebro de rato pós-AVEh experimental	55
Figura 9 – Mapa de microinjeções de sangue autólogo ou solução fisiológica no córtex insular direito de ratos <i>Wistar</i> utilizando o atlas Paxinos e Watson (2004) como referência	56
Figura 10 – Efeitos nos parâmetros cardiovasculares de ratos <i>Wistar</i> pós-AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC	58
Figura 11 – Parâmetros cardiovasculares ao longo de 30 minutos de animais submetidos ao AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC	59
Figura 12 – Variação dos parâmetros cardiovasculares entre o período basal e de estresse de animais submetidos ao AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC	61

Figura 13 – Variação dos parâmetros cardiovasculares entre os períodos de estresse e recuperação de animais submetidos ao AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC	62
Figura 14 – Pico da reatividade cardiovascular ao estresse por mudança de ambiente (CSS) em animais submetidos ao AVEh experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC	64
Figura 15 – Efeitos do AVEh experimental no IC sobre parâmetros neurocomportamentais de ratos Wistar.....	65
Figura 16 – Temperatura média intraperitoneal de ratos Wistar pós-AVEh experimental ou procedimentos cirúrgicos	66
Figura 17B – Variação circadiana da temperatura intraperitoneal pós-AVEh experimental ou procedimentos cirúrgicos	69
Figura 18 – Variação do peso corporal e relação entre o peso do coração; rim direito e rim esquerdo em animais submetidos ao AVEh experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC	71
Figura 19 – Representação gráfica das curvas de sobrevivência de ratos Wistar com AVEh experimental que receberam veículo ou rilmenidina 10 µg/Kg e submetidos aos experimentos cardiovasculares	72
Figura 20 – Quantificação de proteínas a partir do proteoma do córtex insular e RVLM de ratos Wistar submetidos ao AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica.....	74
Figura 21 – Ontologia Gênica: córtex insular.....	75
Figura 22 – Ontologia Gênica: RVLM	76
Figura 23 – Gráfico de calor das principais proteínas envolvidas na neurotransmissão gabaérgica e glutamatérgica	78
Figura 24 – Proteínas reguladas que participam das vias de neurotransmissão glutamatérgica e/ou gabaérgica no IC.....	79
Figura 25 – Proteínas reguladas que participam das vias de neurotransmissão glutamatérgica e/ou gabaérgica no RVLM	80

Figura 26 – Concentração de neurotransmissores em amostras do IC e RVLM em animais submetidos ao AVEh experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC.....	82
Figura 27 – Concentração de catecolaminas no tecido cardíaco de ratos Wistar submetidos ao AVEh experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC ..	83
Figura 28 – Efeitos na expressão receptores β -adrenérgicos no tecido cardíaco	84
Figura 29 – Sugestão de mecanismo que ilustra o desequilíbrio autonômico em neurônios do IC e da RVLM, envolvendo as neurotransmissões gabaérgica e glutamatérgica após o AVE hemorrágico.....	93
Figura 30 – Esquema do protocolo experimental utilizado para padronização do modelo de AVEh experimental no córtex insular direito de camundongos C57BL/6J	109
Figura 31 – Esquema do protocolo experimental utilizado para caracterização do perfil cardiovascular e o perfil de células imunes do coração de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina.	110
Figura 32 – Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliação do perfil de catecolaminas do coração de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina.....	111
Figura 33 – Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliar os parâmetros morfométricos de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina	112
Figura 34 – Fotomicrografia representativa do cérebro de camundongo C57BL/6J com AVEh experimental	113
Figura 35 – Mapa de microinjeções de sangue autólogo ou solução fisiológica no córtex insular direito de camundongos C57BL/6J utilizando o atlas Paxinos e Franklin (2004) como referência	114
Figura 36 – Efeitos na frequência cardíaca de camundongos C57BL/6J anestesiados pós-AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC	115
Figura 37 – Imunofluorescência para a proteína CD68+ no coração de camundongos C57BL/6J após 1 dia de AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC.....	116

Figura 38 – Imunofluorescência para a proteína CD68+ no coração de camundongos C57BL/6J após 3 dias de AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC.....	117
Figura 39 – Aumento no número de leucócitos, monócitos e macrófagos no coração camundongos C57BL/6J por citometria de fluxo submetidos ao AVEh ou microinjeção de solução salina.....	118
Figura 40 – Imunofluorescência para a proteína CD68+ no coração de camundongos C57BL/6J após 3 dias de AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC e tratados durante os 3 dias	119
Figura 41 – Imunofluorescência para a proteína Ly6G+ no coração de camundongos C57BL/6J após 3 dias de AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC e tratados durante os 3 dias	120
Figura 42 – Concentração de catecolaminas no coração de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC	121
Figura 43 – Variação do peso corporal e relação entre o peso do coração em camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC.....	123
Figura 44 – Relação entre o peso dos rins (direito e esquerdo) e o peso corporal ou comprimento da tíbia em animais submetidos ao AVE hemorrágico experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC.....	124
Figura 45 – Representação gráfica da comparação das curvas de sobrevivência de camundongos C57BL/6J com AVEh experimental que receberam veículo ou rilmenidina 10 µg/Kg e submetidos aos experimentos cardiovasculares	125
Figura 46 – Esquema ilustrativo do coração antes e após o AVE hemorrágico insular e o recrutamento de monócitos CCR2 ⁺	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para este experimento e suas respectivas identificações.....	46
Tabela 2 – Análise do ajuste dos dados sobre a curva cosseno com periodicidade de 24h	70
Tabela 3 – Resumo da Quantificação de Proteínas Diferencialmente Expressas (PDEs) no IC e RVLM após AVEh e Tratamento com Rilmenidina.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ FC	Variação da frequência cardíaca
Δ PAM	Variação da pressão arterial média
Δ Temperatura	Variação da temperatura
°C	Graus Celsius
AMPA	Receptor do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análise de variância
AP	Ântero-posterior
AVE	Acidente Vascular Encefálico
AVEh	Acidente Vascular Encefálico hemorrágico
bpm	Batimentos por minuto
C57BL/6J	Linhagem de camundongos C57BL/6J
CAA	Angiopatia amiloide cerebral
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCR2 ⁻	Receptor de quimiocina CC tipo 2 negativo
CCR2 ⁺	Receptor de quimiocina CC tipo 2 positivo
CD64 ⁺ Ly6C ⁺	Marcadores de superfície CD64 positivo e Ly6C positivo
CD68 ⁺	Marcador de superfície CD68 positivo
CH ₃ COONa	Acetato de sódio
CHO	Células de ovário de hamster chinês
cm	Centímetros
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DIA	Aquisição Independente de Dados
DIA MS	Aquisição Independente de Dados acoplada à espectrometria de
massas	
DIA N/N	Aquisição Independente de Dados normalizada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DV	Dorso-ventral
E	Epinefrina
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
EUA	Estados Unidos da América
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FASTA	Formato de arquivo de sequência biológica
FC	Frequência cardíaca
g	Gramas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABAA	Receptor GABA do tipo A
GABAB	Receptor GABA do tipo B
GABBR1	Subunidade 1 do receptor GABA-B
GABRA4	Subunidade alfa-4 do receptor GABA-A
GAD1	Glutamato descarboxilase 1
GAD2	Glutamato descarboxilase 2
Glu	Glutamato

GRIA1	Subunidade 1 do receptor AMPA
GRIA2	Subunidade 2 do receptor AMPA
GRIA3	Subunidade 3 do receptor AMPA
GRIN1	Subunidade 1 do receptor NMDA
GRIN2A	Subunidade 2A do receptor NMDA
GRIN2B	Subunidade 2B do receptor NMDA
H ₂ O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HPLC-FD fluorescência	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência
HSP90 α/β	Proteína de choque térmico 90 alfa/ beta
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
I1	Receptor imidazolínico do tipo 1
IC	Córtex insular
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
ICH	Acidente vascular encefálico hemorrágico experimental
ICSaI	Injeção de salina no córtex insular
IgG	Imunoglobulina G
IL, EUA	Illinois, Estados Unidos da América
IRAS	Proteína selecionada por antissoro do receptor
IRAS-1	Proteína selecionada por antissoro do receptor tipo 1
kg	Quilograma
Ly6G ⁺	Marcador de superfície Ly6G positivo
M	Mol
Mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
μ L	Microlitros
min	Minutos
mL	Mililitros
ML	Médio-lateral
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
MPA	Ácido 3-mercaptopropiônico
Na ₄ P ₂ O ₇	Pirofosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NE	Norepinefrina
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
ng	Nanogramas
nL	Nanolitros
NMDA	Receptor do N-metil-D-aspartato
Nonidet P40	Detergente não iônico Nonidet P40
OPA	Orto-ftalaldeído
PAM	Pressão arterial média
PASEF	Parallel Accumulation–Serial Fragmentation
PASEF-MS/MS	Parallel Accumulation–Serial Fragmentation acoplado à espectrometria de massas em tandem
PC-12	Linhagem celular de feocromocitoma de rato

PC-PLC	Fosfolipase C específica para fosfatidilcolina
PDEs	Proteínas diferencialmente expressas
PFA	Paraformaldeído
PIB	Produto interno bruto
PVC	Policloreto de vinila
Ril	Rilmenidina
RNA	Ácido ribonucleico
RVLM	Bulbo ventrolateral rostral
s	Segundos
s.c.	Subcutânea
sal	Solução salina
Slc17a7	Transportador vesicular de glutamato 1
Slc32a1	Transportador vesicular de GABA
TCEP	Tris(2-carboxietil) fosfina
TEAB	Bicarbonato de trietilamônio
TH	Tirosina hidroxilase
THF	Tetraidrofurano
TIMS-MS/MS	Espectrometria de massas com mobilidade iônica aprisionada
acoplada a MS/MS	
u.a.	Unidades arbitrárias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
vGAT	Transportador vesicular de GABA
vGLUT1	Transportador vesicular de glutamato 1
vs.	<i>Versus</i>
α_1	Receptor alfa-adrenérgico do tipo 1
α_2	Receptor alfa-adrenérgico do tipo 2
β_1	Receptor beta-adrenérgico do tipo 1
β_2	Receptor beta-adrenérgico do tipo 2
β_1 -AR	Receptor beta-adrenérgico do tipo 1
β_2 -AR	Receptor beta-adrenérgico do tipo 2
μ g	Micrograma
μ m	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	23
2 CAPÍTULO I: EFEITOS DO ANTI-HIPERTENSIVO DE AÇÃO CENTRAL RILMENIDINA NAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E MOLECULARES RESULTANTES DO AVE HEMORRÁGICO EXPERIMENTAL NO CÓRTEX INSULAR DE RATOS	25
2.1 Introdução	25
2.1.1 Acidente vascular encefálico	25
2.1.2 Córtex Insular	26
2.1.3 Ação Central Anti-hipertensiva da Rilmenidina.....	29
2.1.4 Receptores Imidazólicos tipo 1 (I ₁).....	30
2.2 Justificativa.....	34
2.3 Objetivos	35
2.3.1 Objetivo Geral	35
2.3.2 Objetivos específicos	35
2.4 Material e Métodos.....	36
2.4.1 Animais.....	36
2.4.2 Drogas.....	36
2.4.3 Hemorragia experimental no córtex insular direito (AVEh).....	36
2.4.4 Experimentos cardiovasculares	37
2.4.4.1 Canulação da artéria femoral	38
2.4.4.2 Registro cardiovascular	38
2.4.4.3 Estresse por mudança de ambiente (Cage switch stress).....	39
2.4.5 Avaliações neurocomportamentais.....	39
2.4.5.1 Teste de enterramento de bolinhas (marble burying).....	39
2.4.5.2 Teste locomotor	40
2.4.5.3 Teste de função motora (wire hang)	40
2.4.6 Temperatura corporal	40
2.4.7 Análise de Ritmicidade Circadiana.....	41
2.4.8 Análises Proteômicas	41
2.4.8.1 Preparação de amostras	41
2.4.8.2 Cromatografia líquida (Evosep One®).....	42
2.4.8.3 Espectrometria de massa	43

2.4.8.4 Processamento dos dados (DIA MS).....	43
2.4.9 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	44
2.4.9.1 Quantificação de neurotransmissores	44
2.4.9.2 Quantificação de catecolaminas	45
2.4.10 Análise da expressão de receptores β -adrenérgicos no tecido cardíaco por meio de <i>Western Blot</i>	45
2.4.11 Variação do peso corporal e relação peso corporal/órgãos	46
2.4.12 Determinação anatômica dos sítios de injeção	47
2.4.13 Análises estatísticas	48
2.4.13.1 Análise estatística da Ritmicidade Circadiana	48
2.4.13.2 Análise estatística dos dados proteômicos.....	49
2.5 Protocolo Experimental	50
2.5.1 Experimentos cardiovasculares	50
2.5.2 Experimentos neurocomportamentais.....	51
2.5.3 Experimentos de temperatura corporal e ritmicidade circadiana.....	52
2.5.4 Experimentos neuroquímicos e moleculares.....	53
2.6 Resultados	55
2.6.1 Localizações das lesões no córtex insular	55
2.6.2 Efeitos da Rilmenidina na Disfunção Cardiovascular Basal e Reatividade ao Estresse	57
2.6.2.1 Perfil Cardiovascular Basal.....	57
2.6.2.2 Reatividade Cardiovascular ao Estresse	59
2.6.3 Efeitos no Perfil Neurocomportamental, Temperatura e Ritmicidade Circadiana	64
2.6.3.1 Perfil neurocomportamental.....	64
2.6.3.2 Efeitos na Temperatura.....	65
2.6.3.3 Ritmicidade Circadiana.....	66
2.6.4 Parâmetros Morfométricos e Sobrevivência.....	70
2.6.4.1 Parâmetros Morfométricos	70
2.6.4.2 Sobrevivência	71
2.6.5 Vias Moleculares e Neuroquímicas Envolvidas no AVEh	72
2.6.5.1 Análise Proteômica	72
2.6.5.2 Quantificação de Neurotransmissores Centrais.....	81
2.6.5.3 Catecolaminas Cardíacas.....	83

2.6.6 Análise da expressão de receptores β -adrenérgicos no tecido cardíaco por meio de <i>Western blot</i>	84
2.7 Discussão.....	86
2.8 Conclusão	97
3 CAPÍTULO II: EFEITOS DO ANTI-HIPERTENSIVO DE AÇÃO CENTRAL RILMENIDINA NAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES RESULTANTES DO AVE HEMORRÁGICO EXPERIMENTAL NO CÓRTEX INSULAR DE CAMUNDONGOS C57BL/6J.....	98
3.1 Introdução	98
3.1.1 Modelos animais experimentais	98
3.2 Justificativa.....	100
3.3 Objetivos	101
3.3.1 Objetivo Geral	101
3.3.2 Objetivos específicos	101
3.4 Material e Métodos	102
3.4.1 Animais.....	102
3.4.2 Drogas.....	102
3.4.3 Hemorragia experimental no córtex insular direito (AVEh).....	102
3.4.4 Avaliação do perfil cardiovascular	103
3.4.4.1 Eletrocardiograma	103
3.4.5 Experimentos imunológicos	104
3.4.5.1 Imunofluorescência.....	104
3.4.5.2 Caracterização das células imunes por citometria de fluxo	105
3.4.6 Dosagem de catecolaminas no coração	105
3.4.7 Variação do peso corporal e relação peso corporal/órgãos	106
3.4.8 Determinação anatômica dos sítios de injeção	107
3.4.9 Mortalidade	108
3.4.10 Análise estatística.....	108
3.5 Protocolo Experimental	109
3.5.1 Padronização do modelo de AVEh experimental no córtex insular de camundongos C57BL/6J	109
3.5.2 Caracterização do perfil cardiovascular e o perfil de células imunes do coração de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina	110

3.5.3 Avaliação do perfil de catecolaminas do coração de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina	111
3.5.4 Avaliar os parâmetros morfométricos de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina.....	112
3.6 Resultados	113
3.6.1 Localizações das lesões no córtex insular	113
3.6.2 Efeitos do AVEh no IC sobre a frequência cardíaca e a ação da rilmenidina	114
3.6.3 Efeitos do AVEh insular no sistema imune cardíaco	116
3.6.4 Catecolaminas cardíacas	121
3.6.5 Parâmetros Morfométricos e Sobrevivência.....	122
3.6.5.1 Parâmetros Morfométricos	122
3.6.5.2 Sobrevivência	125
3.7 Discussão.....	126
3.8 Conclusão	132
4 CONCLUSÃO GERAL.....	133
4.1 Limitações do Trabalho	133
5 PERSPECTIVAS FUTURAS	135
5.1 Avaliação Crônica e Remodelamento Cardíaco	135
5.2 Dimorfismo Sexual	135
5.3 Sinalização Adrenérgica Cardíaca	135
ANEXOS	152
Aprovação do comitê de ética no uso de animais – ratos <i>Wistar</i>	152
Aprovação do comitê de ética no uso de animais – camundongos C57BL/6J	153
Participação como coautora no artigo intitulado “ <i>Neurogenic background for emotional stress-associated hypertension</i> ” https://doi.org/10.1007/s11906-023-01235-7	154
Participação como coautora no artigo intitulado “ <i>The insular cortex, autonomic asymmetry and cardiovascular control: looking at the right side of stroke</i> ”. https://doi.org/10.1007/s10286-024-01066-9	164

Participação como coautora no artigo intitulado “ <i>Identification and Characterization of Alamandine-(1-5), a New Component of the Renin-Angiotensin System</i> ”.	
https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.125.32617	176
Participação como coautora no artigo intitulado “ <i>Losartan treatment attenuates the cardiorenal alterations in a rat model of hemorrhagic insular stroke</i> ”.	
https://doi.org/10.1007/s10286-026-01188-2	193
Participação como coautora no trabalho intitulado “Losartan treatment improves the cardiovascular profile in rats with right-sided insular experimental stroke” apresentado no “The Physiological Society – 150 anos (Harrogate, UK, 2023)”	197
Apresentação de pôster do trabalho intitulado “ <i>Microinjection of the novel angiotensin, alamandine-(1–5) into the insular cortex increases blood pressure</i> ” (Chicago, USA, 2024). https://doi.org/10.1161/hyp.81.suppl_1.P212	198
Apresentação de pôster do trabalho intitulado “Cardiovascular, neurological and proteomic characterization of rats submitted to experimental insular hemorrhagic stroke: effects of rilmenidine” no “ <i>54th Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) (Águas de Lindóia, BRA, 2025)</i> ”	199

1 INTRODUÇÃO GERAL

O acidente vascular encefálico hemorrágico figura entre as condições que mais levam a óbito e limitações funcionais no mundo (Feigin et al., 2022). Para além do dano direto ao tecido cerebral, é comum o quadro ser agravado por alterações no funcionamento cardiovascular. Nesse cenário, o córtex insular se destaca como uma das áreas encefálicas mais críticas (Oppenheimer; Cechetto, 2016).

O córtex insular tem um papel fundamental no controle autonômico, especialmente na modulação da atividade do sistema nervoso simpático cardiovascular (Oppenheimer; Cechetto, 2016; Laredo et al., 2018). Quando ocorre uma hemorragia nessa região, instala-se uma hiperatividade simpática sustentada, caracterizada por taquicardia, arritmias, elevação da pressão arterial, aumento de catecolaminas circulantes e risco de morte súbita (Hachinski et al., 1986; Smith et al., 1986; Oppenheimer; Cechetto, 2016; Laredo et al., 2018; Sanchez-Larsen et al., 2024). Além disso, após o primeiro evento, o paciente fica mais suscetível a um segundo acidente vascular encefálico nos próximos três meses (Prats-Sánchez et al., 2019).

Apesar da relevância clínica, os mecanismos que relacionam a hemorragia insular às disfunções cardiovasculares ainda permanecem pouco conhecidos. Compreender esses mecanismos é essencial para desenvolver terapias que possam auxiliar nesse processo (Kleinschnitz; Fluri; Schuhmann, 2015; Bai et al., 2020). Atualmente, ainda persistem lacunas importantes como a escassez de modelos experimentais que reproduzam de maneira eficaz a hemorragia focal no córtex insular e suas repercussões cardiovasculares, além da escassez de abordagens farmacológicas direcionadas ao controle da hiperatividade simpática pós-hemorragia insular (Sommer, 2017; Li; Zhang, 2021).

Foi pensando nessas lacunas que esta tese foi estruturada em dois capítulos. No Capítulo I, foi utilizado o modelo experimental previamente estabelecido pelo nosso grupo, baseado na injeção de sangue autólogo no córtex insular de ratos (Marins et al., 2020; Dos Santos Machado et al., 2026), para avaliar se a rilmenidina, um fármaco de ação central com efeito simpatolítico, seria capaz de atenuar as alterações funcionais e moleculares induzidas pela hemorragia experimental. No Capítulo II, adaptamos esse modelo para camundongos C57BL/6J, uma linhagem amplamente empregada em estudos mecanísticos (Sloin et al., 2022), para a qual

ainda não havia um modelo experimental de hemorragia no córtex insular descrito na literatura. Além disso, também investigamos os efeitos da rilmenidina sobre as repercussões sistêmicas desencadeadas pelo acidente vascular encefálico hemorrágico insular nestes animais. Em conjunto, os dois capítulos têm como objetivo compreender as consequências cardiovasculares da hemorragia insular em roedores, além de identificar ferramentas e mecanismos que possam contribuir para estratégias terapêuticas no contexto do acidente vascular encefálico hemorrágico insular.

2 CAPÍTULO I: EFEITOS DO ANTI-HIPERTENSIVO DE AÇÃO CENTRAL RILMENIDINA NAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E MOLECULARES RESULTANTES DO AVE HEMORRÁGICO EXPERIMENTAL NO CÓRTEX INSULAR DE RATOS

2.1 Introdução

2.1.1 Acidente vascular encefálico

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é um problema de saúde global que têm crescido de forma preocupante ao longo dos anos. Estima-se que uma em cada quatro pessoas com mais de 25 anos terá um AVE ao longo da vida. A cada ano, cerca de 12 milhões de indivíduos no mundo sofrem seu primeiro AVE, e infelizmente, 6,5 milhões morrem em decorrência das complicações desta condição. Este impacto não se limita à saúde: os custos globais do AVE já ultrapassam US\$ 720 bilhões, o que equivale a 0,66% do PIB mundial, e a previsão é que esse número chegue a 1 trilhão de dólares por ano até 2030. Hoje, mais de 100 milhões de pessoas convivem com as sequelas do AVE, incluindo desde dificuldades motoras até comprometimentos cognitivos graves. Para quem sobrevive, as consequências podem ser profundas, afetando não apenas a capacidade de se movimentar, mas também a saúde mental e o funcionamento de diversos sistemas do corpo, impactando drasticamente o dia a dia e a qualidade de vida (Feigin et al., 2022).

O AVE pode ser classificado em duas formas principais (figura 1): isquêmico, quando o fluxo de um vaso sanguíneo é interrompido, ou hemorrágico, quando acontece a ruptura de um vaso sanguíneo e extravasamento de sangue para o parênquima cerebral. O AVE hemorrágico (AVEh) tende a ser mais grave e potencialmente fatal, já que suas taxas de mortalidade são mais altas e apresenta mais complicações a curto prazo (Campbell et al., 2019; Feigin et al., 2022; Wang, 2010).

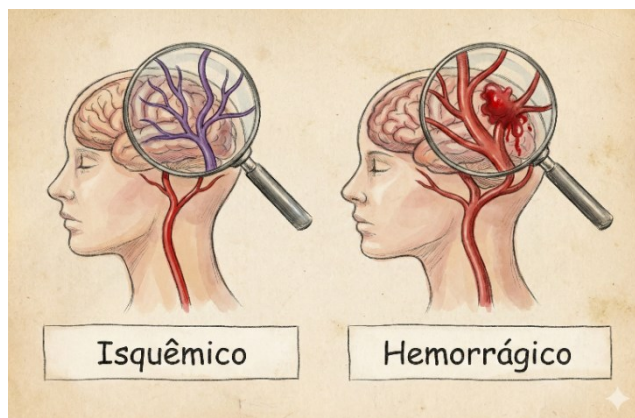


Figura 1 – Ilustração dos principais tipos de acidente vascular encefálico, destacando o contexto de obstrução vascular no AVE isquêmico e a ruptura do vaso no AVE hemorrágico. Fonte: Elaborado pela autora

A região encefálica afetada pelo AVEh é um fator determinante para o seu grau de letalidade (Campbell et al., 2019; Lai et al., 2018; Wang, 2010). Em particular, o IC desempenha um papel fundamental em diversos processos envolvidos na homeostase corporal e regulação autonômica. Lesões nessa área podem resultar em consequências graves, como distúrbios cardiovasculares e morte súbita (Christensen, 2005; Rincon et al., 2008; Oppenheimer; Cechetto, 2016; Laredo et al., 2018).

2.1.2 Córtex Insular

O Córtex Insular (IC) ou Córtex Pré-Frontal Lateral (Krettek; Price, 1977), foi descrito pela primeira vez em 1809 por Johann Christian Reil, é uma região encefálica que faz parte do córtex pré-frontal e também faz parte do sistema límbico (Reil, J. C., 1809; Saper, 1982; Nagai; Dote; Kato, 2021). Em humanos e outros primatas, essa região está oculta, a estrutura localiza-se imersa sob a fissura de Sylvius, sulco lateral dos hemisférios cerebrais, formando assim um lobo cerebral distinto. Por isso foi dado o nome “córtex insular” à região, uma vez que sua localização escondida se assemelhava às ilhas insulares. Em geral, outros mamíferos não apresentam esta estrutura anatômica específica, mas, normalmente, encontra-se localizada na lateral dos hemisférios cerebrais como no caso dos camundongos e ratos e por isso esta região também ficou conhecida como córtex pré-frontal lateral (Saper, 1982; Aleksandrov; Aleksandrova, 2015; Nagai; Kato, 2025).

Muitas características anatômicas da ínsula são conservadas entre roedores e humanos, sugerindo uma semelhança evolutiva e funcional. O IC é classicamente

dividido ao longo do eixo antero posterior em porções anterior, medial e posterior, e pode ser subdividido em três zonas principais: granular (caudodorsal), disgranular (zona intermediária) e agranular (rostroventral). Os termos agranular e granular referem-se à ausência ou presença da camada IV de células granulares (Mesulam; Mufson, 1985a; Bonthius; Solodkin; Van Hoesen, 2005).

Estas zonas do IC são caracterizadas por alta heterogeneidade funcional e intensa interconectividade. No entanto, as porções anterior e posterior do IC apresentam padrões de conectividade bastante distintos com outras áreas do cérebro, e por isso cada sub-região do IC pode assumir funções diferentes (Gogolla, 2017). Suas conexões abrangem diversas estruturas encefálicas, incluindo a amígdala, o núcleo leito da estria terminal, o tálamo, hipotálamo, regiões para-hipocampais, o núcleo do trato solitário e córtices frontais como o cíngulo, orbitofrontal e pré-frontal medial (Sato et al., 2013; Gehrlach et al., 2020; Wakabayashi et al., 2026). Essa extensa rede permite que o IC funcione como um centro cortical integrativo essencial para o processamento de funções vitais, como paladar (Schiff et al., 2023; Juen; Villavicencio; Zuker, 2024), dor (Coffeen et al., 2024; Zhang et al., 2022), temperatura (Goulart et al., 2022; Vestergaard et al., 2023), interocepção (Berntson; Khalsa, 2021; (Bud) Craig, 2009; Qian et al., 2021), imunocepção (Hadamitzky et al., 2020; Koren et al., 2021; Rolls, 2023), comportamento social (Rieger et al., 2022), emoções (Zhang et al., 2022), memória (Juen; Villavicencio; Zuker, 2024), modulação do comportamento em situações de medo (Alves et al., 2013), ansiedade (Vitorio et al., 2023), depressão (Biver et al., 1997; Takahashi et al., 2010; Yokoyama et al., 2024) e estresse (Alves et al., 2009a, 2009b; Rieger et al., 2022), e atua ativamente na modulação do controle autonômico cardiovascular (Alves et al., 2013, 2014; Gogolla, 2017; Kapp; Schwaber; Driscoll, 1985; Mesulam; Mufson, 1985b; Mutschler et al., 2012; Neafsey; Hurley-Gius; Arvanitis, 1986; Oppenheimer; Cechetto, 2016; Shipley, 1982; Sprengelmeyer et al., 2011; Xu; Li, 2015; Yasui et al., 1991). Por isso, a integridade e o adequado funcionamento do IC são fundamentais para a execução de suas funções.

Danos à ínsula podem gerar alterações autonômicas e cardiovasculares; entretanto, a predominância funcional de um dos hemisférios (assimetria) ainda é um assunto debatido. O hemisfério direito do IC é geralmente associado a atividades simpáticas, enquanto o hemisfério esquerdo tende a se relacionar mais a atividades parassimpáticas. Alterações neste equilíbrio, desencadeadas por lesões ou por

intensa ativação neuronal de áreas associadas, resultam no desequilíbrio autonômico central, caracterizado pela predominância funcional de um dos hemisférios. Diversas evidências experimentais e clínicas demonstram essa lateralidade funcional, sendo que AVE ao envolver a ínsula direita está associado a uma maior incidência de disfunção cardíaca e a desfechos mais graves, com aumento da chance de mortalidade, principalmente nos primeiros meses após a lesão (Marins et al., 2020; Meyer et al., 2004; Oppenheimer, 1992; Rincon et al., 2008; Sanchez-Larsen et al., 2021; Sanchez-Larsen et al., 2024; Seifert et al., 2015; Watkins, 2001; Wittling et al., 1998).

Um estudo de Marins e colaboradores (2016) demonstrou que o IC apresenta uma organização topográfica ao longo do eixo rostrocaudal para o controle cardiovascular autônomo, com áreas inibitórias e excitatórias relativamente distintas (Marins et al., 2016). Posteriormente, em 2020, os mesmos autores confirmaram a assimetria no controle cardíaco mediada pelo IC, observando um número significativamente maior de arritmias após AVEh no IC direito de ratos, em comparação com o IC esquerdo (Marins et al., 2020). Mais recentemente, Winder e colaboradores (2023) demonstraram uma probabilidade elevada de disfunção cardíaca, arritmias e danos ao tecido cardíaco em indivíduos com AVE nessa mesma região (Winder et al., 2023). Esses achados reforçam que a integridade funcional do IC é essencial para o controle autonômico, cuja modulação depende da regulação mediada por diferentes sistemas de neurotransmissão. Em conjunto, esses achados reforçam que a integridade funcional do IC é essencial para o controle autonômico, cuja modulação depende da integração de diferentes sistemas de neurotransmissão.

A neurotransmissão glutamatérgica no IC está envolvida na modulação de vias descendentes que modulam a atividade autonômica. Neurônios glutamatérgicos localizados no IC estabelecem projeções excitatórias diretas para núcleos bulbares simpatoexcitatórios, como o RVLM (Butcher; Cechetto, 1995; Marins et al., 2016; Sato et al., 2013; Shipley, 1982; Torrealba; Müller, 1996; Wakabayashi et al., 2016; Xu; Li, 2015)., o que resulta em aumento da pressão arterial, taquicardia e liberação periférica de catecolaminas durante situações de estresse (Hachinski et al., 1986; Marins et al., 2016; Oppenheimer, 1992; Smith et al., 1986).

Por outro lado, a neurotransmissão GABAérgica exerce papel central na modulação inibitória do IC. Evidências funcionais demonstram que o bloqueio farmacológico de receptores GABA_A e GABA_B no IC posterior reduz a temperatura

cutânea da cauda em ratos, indicando aumento da vasoconstrição simpática cutânea. Além disso, sub-regiões ao longo do eixo rostrocaudal do IC posterior desempenham funções distintas no controle autonômico. Na porção rostral (rplC), o bloqueio de receptores GABA potencializa a taquicardia induzida por estresse, sugerindo que, nessa região, o GABA exerce efeito inibitório sobre vias simpatoexcitatórias. Em contraste, na porção caudal (cplC), o mesmo bloqueio atenua a resposta taquicárdica, sugerindo um papel facilitador do GABA na modulação de vias autonômicas inibitórias descendentes (Santos et al., 2025).

Assim, perturbações no equilíbrio entre a neurotransmissão glutamatérgica (excitatória) e GABAérgica (inibitória), podem comprometer de forma significativa a regulação autonômica central. Nesse contexto, a rilmenidina surge como uma alternativa terapêutica importante. Ao ativar seletivamente receptores de imidazolinicos do tipo I_1 no RVLM, este fármaco reduz a saída simpática para a periferia, o que pode contribuir para a restauração do equilíbrio autonômico e redução dos efeitos decorrentes da hiperatividade simpática (Esler et al., 2004).

2.1.3 Ação Central Anti-hipertensiva da Rilmenidina

A rilmenidina é um anti-hipertensivo de ação central de segunda geração, identificado e caracterizado na década de 1980 (Ehrhardt, 1985; LAUBIE et al., 1985; Xu; Li, 2015). Com alta afinidade por receptores imidazolinicos, sua ação farmacológica depende da ativação seletiva dos receptores I_1 , localizados predominantemente no bulbo ventrolateral rostral (RVLM) – região essencial para o controle tônico da atividade simpática (Bousquet et al., 1989; Bricca et al., 1988). Mediante essa ativação, a rilmenidina exerce efeito simpatolítico (Esler et al., 2004), promovendo vasodilatação, redução da resistência periférica e diminuição sustentada da pressão arterial, acompanhada de bradicardia (Bousquet; Feldman; Schwartz, 1984; Bousquet; Guertzenstein, 1973; Bousquet et al., 1981; Feldman et al., 1990). Adicionalmente, reduz os níveis de catecolaminas circulantes (Valet et al., 1988) e melhora parâmetros metabólicos como a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, modulando vias inflamatórias (Mahmoudi et al., 2018). A especificidade por receptores I_1 foi confirmada por estudos em que antagonistas imidazolinicos, como idazoxano e ioimbina, bloquearam seu efeito anti-hipertensivo (Bousquet et al., 1989). Clinicamente, a rilmenidina demonstra eficácia comparável às demais classes de

primeira linha (diuréticos, betabloqueadores e inibidores da ECA) em monoterapia, apresenta bom perfil de tolerabilidade e pode ser utilizada em terapia combinada (Bauduceau; Mayaudon; Dupuy, 2000; Scemama et al., 1995; Xu; Li, 2015).

A alta seletividade da rilmenidina para receptores I_1 reduz os efeitos adversos clássicos dos anti-hipertensivos centrais tradicionais, como a clonidina, que possui grande afinidade por receptores α_2 -adrenérgicos e frequentemente provoca sedação e boca seca. Devido à sua estrutura oxazolina, a rilmenidina mantém uma seletividade superior pelos receptores I_1 , exibindo uma afinidade por esses sítios que é centenas de vezes maior do que pelos receptores α_2 -adrenérgicos (Gargalidis-Moudanos; Parini, 1995). Estudos de binding demonstraram que a rilmenidina apresenta um K_i de 7,1 nM para os receptores I_1 , enquanto sua afinidade pelos receptores α_2 -adrenérgicos é de 2440 nM, isso significa que a rilmenidina precisa de uma concentração 344 vezes maior para ocupar os receptores α_2 -adrenérgicos (Gargalidis-Moudanos; Parini, 1995).

Essa seletividade explica por que a rilmenidina preserva o efeito anti-hipertensivo central mediado por I_1 sem provocar os efeitos típicos da ativação de receptores α_2 -adrenérgicos. Ao atuar preferencialmente sobre os I_1 , a droga exerce sua ação hipotensora com mínima interferência em áreas noradrenérgicas como o locus coeruleus, evitando a indução de sedação e boca seca em doses terapêuticas (Bousquet, 2000; Mahmoudi et al., 2018). Estudos comparativos indicam que a rilmenidina é mais eficaz que a clonidina na redução da pressão arterial, reforçando sua vantagem como anti-hipertensivo de ação central (Bourreau; Tricoche, 1987; Xu; Li, 2015). A especificidade de sua ação é ainda corroborada pelo fato de que a injeção central no bulbo ventrolateral caudal (CVLM) não produz efeitos cardiovasculares, confirmando que o local primário para o efeito vasodepressor da rilmenidina é restrito à RVLM (Gomez et al., 1990).

2.1.4 Receptores Imidazólicos tipo 1 (I_1)

Os receptores imidazólicos do tipo I_1 foram inicialmente descritos por Bousquet em 1984 e encontram-se amplamente distribuídos na RVLM (Bousquet; Feldman; Schwartz, 1984; Bousquet; Guertzenstein, 1973; Bousquet et al., 1981; Ernsberger; Haxhiu, 1997; Feldman et al., 1990; Kino et al., 2005; Xu; Li, 2015). Em menor abundância, também estão expressos no córtex pré-frontal (King et al., 1992),

plaquetas (Srdic-Rajic et al., 2016), células cromafins adrenais (Piletz; Zhu; Chikkala, 1996), pâncreas (Schulz; Hasselblatt, 1989), rins (Allan; Penner; Smyth, 1993) e, mais especificamente, nos túbulos proximais onde estão envolvidos na excreção de sódio (Penner; Smyth, 1994, 1995). O agonismo de receptores I_1 promove a liberação de GABA e, portanto, possuem ação inibitória (Alves et al., 2016; Pittaluga; Torelli; Raiteri, 1991; Sun; Reis, 1995). Esta ação inibitória não acontece diretamente sobre os neurônios pressores da RVLM, mas por meio do recrutamento de interneurônios GABAérgicos cujo mecanismo é depende de proteínas Gq/o e ativação da fosfolipase C sensível à fosfatidilcolina (PC-PLC) (Separovic; Kester; Ernsberger, 1996; Separovic et al., 1997) resultando em uma resposta vasodepressora (Greney et al., 2000). Quando os receptores GABAérgicos são antagonizados na RVLM essa resposta não é desencadeada (Sun; Reis, 1995).

Do ponto de vista farmacológico, os receptores I_1 exibem ação rápida, específica, saturável e reversível. Quando microinjetados no RVLM, agonistas I_1 como a rilmenidina produzem vasodepressão. Em contraste, agonistas α_2 -adrenérgicos potentes, como guanidina ou feniletilamina, não eliciam esse efeito na mesma região, embora mantenham seus efeitos vasodepressores no NTS – uma área com alta densidade de receptores α_2 (Bousquet; Feldman; Schwartz, 1984; Bousquet et al., 1981; Feldman et al., 1990). Adicionalmente, antagonistas α_2 -adrenérgicos não bloqueiam as respostas mediadas por receptores I_1 , enquanto antagonistas específicos de I_1 conseguem fazê-lo, o que reforça a distinção funcional entre os dois sistemas (Ernsberger et al., 1990, 1995; Ernsberger; Haxhiu, 1997). Essa distinção é sustentada pela sua distribuição anatômica diferencial: a RVLM apresenta alta densidade de receptores I_1 , conforme demonstrado por Ernsberger et al. (1995), nos quais a marcação por iodoclonidina persistiu nessa região mesmo na presença de epinefrina. Por outro lado, no NTS essa marcação foi abolida, evidenciando que esta área é rica em receptores α_2 -adrenérgicos, mas não em receptores I_1 (Ernsberger et al., 1995).

A estrutura e os mecanismos de sinalização do receptor I_1 de membrana ainda permanecem pouco explorados. No entanto, Piletz et al. (2000) identificaram o primeiro gene associado às suas características funcionais: o IRAS (do inglês, Imidazoline Receptor Antisera-Selected), isolado a partir de cDNA do hipocampo humano (Piletz et al., 2000). Este gene codifica a proteína efetora IRAS-1, que fica ancorada à parte interna da membrana citoplasmática, essa proteína é ativada pela

ligação de agonistas, como a rilmenidina, ao receptor I_1 de imidazolina. Uma vez ativada, a IRAS-1 desencadeia vias de sinalização intracelular, incluindo a inibição da via ERK (do inglês, Extracellular signal-Regulated Kinase) – uma via relacionada ao efeito simpatoinibitório da rilmenidina no RVLM (Zhang; Abdel-Rahman, 2008) – e a modulação de fluxos iônicos (Piletz et al., 2000).

Para demonstrar que o gene IRAS era suficiente para conferir a funcionalidade dos receptores I_1 , ele foi transfectado em células CHO (do inglês, Chinese Hamster Ovary), que não possuem receptores I_1 endógenos. Como resultado, estas células passaram a expressar a proteína IRAS-1 e, passaram a apresentar sítios de ligação de alta afinidade para agonistas I_1 , como a rilmenidina, comprovando que a IRAS-1 é um efetor molecular importante para desencadear os efeitos dos receptores I_1 . Paralelamente, em células PC-12 — um modelo neuroendócrino derivado de um feocromocitoma da medula adrenal de rato (*Rattus norvegicus*) que expressa naturalmente receptores I_1 — a transfecção do gene IRAS e consequente superexpressão da proteína IRAS-1 modulou vias de sinalização intracelular, inibindo a atividade da via ERK. Esses achados complementares estabeleceram que o gene IRAS codifica a proteína efetora IRAS-1, a qual é necessária e suficiente para gerar uma resposta funcional à ativação por agonistas I_1 , seja criando novos sítios de ligação (em células CHO) seja modulando cascatas de sinalização a jusante (em células PC-12) (Piletz; Zhu; Chikkala, 1996; Piletz et al., 2000). O gene NISCH é o ortólogo do gene IRAS em camundongos, ele codifica a proteína Nischarin, que compartilha estrutura, localização e função com a proteína IRAS-1. É importante ressaltar que IRAS-1 e a Nischarin são proteínas moduladoras da sinalização downstream, atuando a jusante do receptor I_1 de imidazolina, ou seja, não são o receptor I_1 propriamente dito (Piletz; Wang; Zhu, 2003; Piletz et al., 2000).

Embora estudos *in vitro* tenham associado os genes IRAS/Nisch à inibição da via da ERK, evidências *in vivo* demonstram que a ativação do receptor I_1 pela rilmenidina no RVLM promove uma ativação da via da ERK dependente da Nischarin (Zhang; Abdel-Rahman, 2008). Este aparente paradoxo (quando a proteína IRAS-1 está sozinha pode modular a inibição da via ERK mas quando os receptores I_1 estão acoplados à IRAS-1 a via da ERK é ativada) sugere que a ativação dos receptores I_1 promove um redirecionamento da sinalização intracelular que, em vez de inibir, acaba por ativar a via da ERK. Essa ativação da ERK eleva a excitabilidade de interneurônios GABAérgicos, resultando em maior liberação de GABA e na subsequente inibição do

tônus simpático (Piletz; Wang; Zhu, 2003; Piletz et al., 2000; Zhang; Abdel-Rahman, 2008). A Figura 2 apresenta uma síntese das evidências aqui descritas pela literatura sobre as possíveis vias de sinalização associadas à ativação dos receptores imidazolínicos do tipo 1.

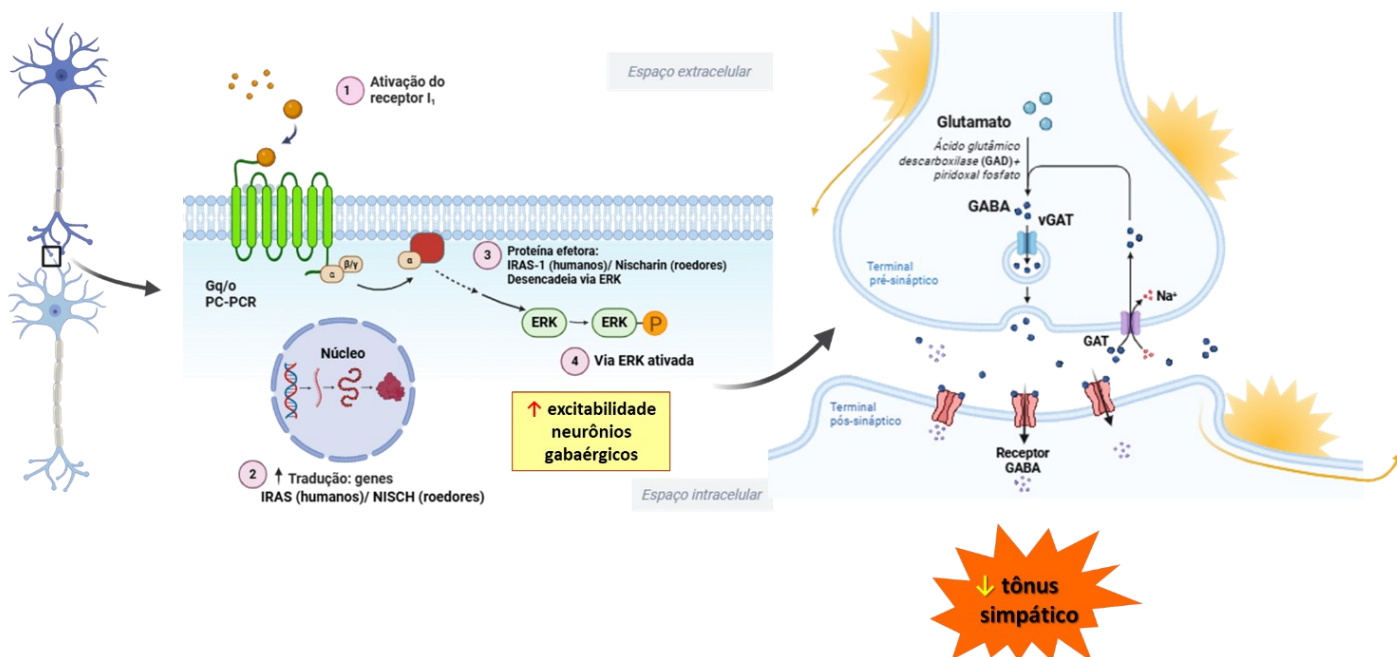


Figura 2 – Ilustração esquemática dos principais tipos de acidente vascular encefálico, destacando quando ocorre a obstrução vascular no AVC isquêmico e a ruptura do vaso no AVC hemorrágico. Fonte: Elaborado pela autora

Portanto, considerando a localização estratégica e o perfil farmacológico dos receptores I₁ na RVLM, a ativação seletiva desses receptores pela rilmenidina representa uma estratégia importante para modular a hiperatividade simpática central, preservando vias noradrenérgicas e o controle autonômico fisiológico. Assim, avaliar seus efeitos nas alterações cardiovasculares induzidas pelo AVEh no córtex insular pode contribuir significativamente para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas disfunções autonômicas pós-AVEh e auxiliar na identificação de novas abordagens terapêuticas.

2.2 Justificativa

O estudo do acidente vascular encefálico (AVE), seja em relação aos seus mecanismos fisiopatológicos ou às estratégias terapêuticas, depende do uso de modelos experimentais capazes de reproduzir com fidelidade seus efeitos. O modelo de AVE isquêmico insular em ratos tem sido tradicionalmente utilizado para estudar os efeitos do AVE (Sommer, 2017). Contudo, a isquemia induzida nesse modelo gera lesões extensas e pouco específicas, frequentemente alcançando regiões subcorticais essenciais para o controle cardiovascular, o que limita sua eficácia para investigações focadas na ínsula.

Em contraste, o modelo de AVE hemorrágico experimental restrito ao córtex insular de ratos produz lesão focal e reproduz alterações autonômicas cardiovasculares descritas em pacientes com lesão insular, incluindo arritmias, taquicardia e maior risco de morte súbita (Marins et al., 2020; Dos Santos Machado et al., 2026). Esses achados reforçam sua relevância translacional e sustentam sua utilização para o estudo dos mecanismos envolvidos na disfunção autonômica pós-AVE.

Considerando que a rilmenidina é um anti-hipertensivo de ação central, já utilizado clinicamente e com potencial modulador da atividade simpática, propomos investigar seus efeitos nesse modelo experimental. Assim, a hipótese deste estudo é que a administração de rilmenidina seja capaz de atenuar a hiperatividade simpática e reduzir as disfunções cardiovasculares induzidas pelo AVE hemorrágico no córtex insular de ratos (Figura 3).

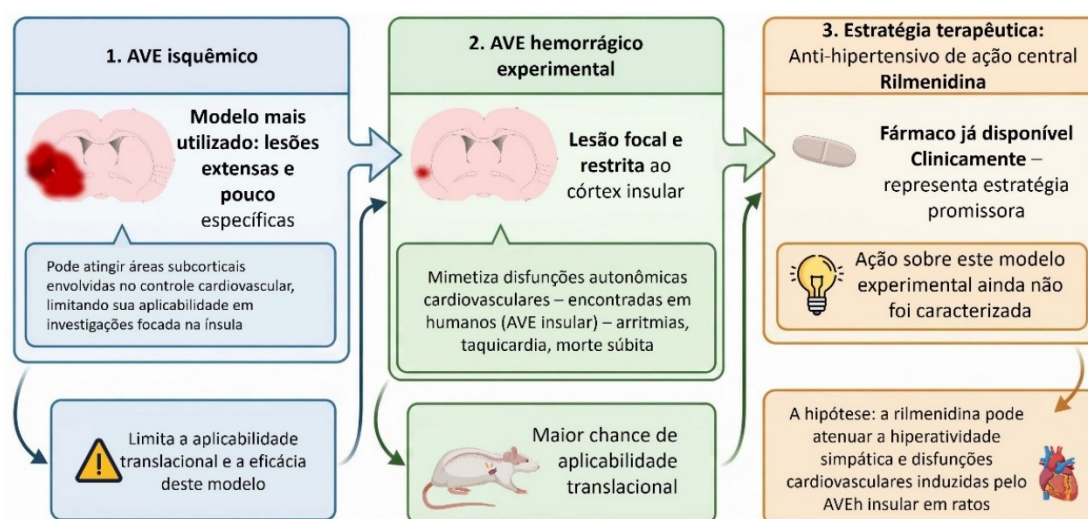


Figura 3 – Modelo conceitual da justificativa do estudo. Fonte: Elaborado pela autora

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo Geral

Avaliar se o tratamento com o anti-hipertensivo de ação central, rilmenidina, pode atenuar a hiperatividade simpática e disfunções decorrentes do AVEh experimental no córtex insular de ratos.

2.3.2 Objetivos específicos

- I. Caracterizar o perfil cardiovascular de ratos *Wistar* submetidos ao AVEh experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina;
- II. Caracterizar o perfil neurocomportamental: ansiedade e/ou compulsão, atividade locomotora e função motora de ratos *Wistar* submetidos ao AVEh experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina;
- III. Caracterizar o perfil de temperatura corporal e ritmicidade circadiana de ratos *Wistar* submetidos ao AVEh experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina;
- IV. Avaliar os parâmetros morfométricos e sobrevivência de ratos *Wistar* submetidos ao AVEh experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina;
- V. Caracterizar as vias neuroquímicas e moleculares envolvidas nas alterações decorrentes do AVEh insular experimental em ratos *Wistar*, bem como aquelas moduladas pelo tratamento com rilmenidina.

2.4 Material e Métodos

2.4.1 Animais

Os procedimentos experimentais foram realizados conforme o protocolo nº109/2022 aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO 18.1). Foram utilizados ratos *Wistar* com peso entre 300-350g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO – ICB/ UFMG). Os animais foram alojados em caixas de polipropileno forradas com maravalha, mantidos em temperatura ambiente de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12h:12h. Durante os experimentos, os animais receberam ração padrão granulada (Nuvilab-CR1, Quimtia. S. A., Brasil) e água à vontade.

2.4.2 Drogas

Os animais foram anestesiados com cetamina (80mg/Kg) e xilazina (7mg/Kg), via intraperitoneal (i.p.), e cloridrato de lidocaína 2% + epinefina 1:200000 (Hypocaina®), via subcutânea (s.c.), para serem submetidos às cirurgias. Receberam a dose única de 40.000 UI/kg de pentabiótico (Fort Dodge®), por via intramuscular (i.m.), após estereotaxia, e 2,5 mg/kg do analgésico não-esteroidal flunixinina meglumina (Banamine®) via subcutânea (s.c.), para analgesia após estereotaxia, canulação da artéria femoral ou implante de probes, uretana (*ethyl carbamate*, Sigma-Aldrich, EUA) na dose de 1,2 g/kg, via i.p., anestésico utilizado para a perfusão dos animais ao final dos experimentos. Para a assepsia foi utilizado clorexidina 2% (Riohex®) e álcool 70%. Foi utilizado para tratamento anti-hipertensivo de ação central a rilmenidina (Sigma-Aldrich, EUA), em doses de 1 $\mu\text{g/Kg}$ e 10 $\mu\text{g/Kg}$ baseado em estudos anteriores (Mendonça et al., 2021). Para os animais controle, foi administrado solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%; 0,1ml/100g) via i.p. e para microinjeção diretamente no córtex insular direito o volume de 200nL.

2.4.3 Hemorragia experimental no córtex insular direito (AVEh)

Para realizar o AVEh no córtex insular de ratos *Wistar*, os animais foram anestesiados e tricotomizados na região superior ao crânio. Em seguida, foram imobilizados em um estereotáxico para animais de pequeno porte (Stoelting, IL, EUA), feito assepsia local e a calota craniana foi exposta por uma incisão na pele, de aproximadamente 1,5 cm. O periósteo foi afastado e removido. O hemisfério direito foi escolhido para a realização das microinjeções com base em evidências anteriores que demonstraram uma lateralização do controle autonômico cardiovascular mediada pelo córtex insular, predominando efeitos simpáticos no hemisfério direito e efeitos parassimpáticos no hemisfério esquerdo (Oppenheimer et al., 1992; Marins et al., 2020; Dos Santos Machado et al., 2026). Todas as coordenadas para as microinjeções (ântero-posterior (AP): 0.0 mm; látero-lateral (LL), 5.8 mm; dorsoventral (DV), 7.1 mm, incisivo = -3.3 mm, em relação ao bregma) foram determinadas a partir do Atlas de Paxinos & Watson e de Marins et al., 2020 (Marins et al., 2020; Paxinos, G; Watson, C., 2004). Para realizar a hemorragia experimental, foi feito a trepanação do crânio com uma broca odontológica e o sangue autólogo foi coletado a partir de uma pequena incisão da cauda previamente aquecida em bolsa térmica gel (Termogel®), para dilatação local dos vasos sanguíneos. O sangue coletado foi transferido para uma agulha gengival, 30G, posicionada previamente no estereotáxico, que estava conectada a uma nanoinjetora de 1µL (Hamilton, EUA) por meio de um Silastic®. Após a transferência do sangue, o volume de 200nL foi injetado nas coordenadas pré-definidas. O grupo controle também recebeu este mesmo volume, no entanto, de solução fisiológica estéril. Em seguida, a região foi suturada (Shalon Seda 4-0®) e submetida à assepsia. Imediatamente após a cirurgia, todos os animais receberam analgésico, pentabiótico e seus respectivos tratamentos. O pós-operatório ocorreu em ambiente aquecido por lâmpada fisioterápica infravermelho (Philips®) e, após a recuperação, os animais foram transportados para o biotério. No segundo e terceiro dia após hemorragia experimental, os animais continuaram a receber seus respectivos tratamentos.

2.4.4 Experimentos cardiovasculares

Para caracterizar o perfil cardiovascular de ratos *Wistar* submetidos ao AVEh experimental no córtex insular foram realizados os seguintes procedimentos:

canulação da artéria femoral, registro cardiovascular e estresse por mudança de ambiente (*cage switch stress*).

2.4.4.1 Canulação da artéria femoral

Para avaliar o efeito do AVEh no córtex insular de ratos *Wistar* e o perfil cardiovascular diante de diferentes tratamentos foi realizada a canulação da artéria femoral. No terceiro dia, pelo menos uma hora após os tratamentos, os animais foram anestesiados com cetamina (80mg/Kg) e xilazina (7mg/Kg) por via i.p. para receberem a cânula na artéria femoral. As cânulas foram confeccionadas a partir do aquecimento e união de dois tubos de polietileno (PE-10, 4cm, e PE-50, 13cm) e preenchidas com solução fisiológica (NaCl; 0,9%) com heparina (15 U/mL). A extremidade livre do PE-50 foi obstruída com um alfinete de metal. Para posicionar a cânula na artéria femoral, foi feita uma pequena incisão na região inguinal, o divulcionamento dos tecidos adjacentes e o isolamento da artéria. Assim, foi possível a inserção da cânula na artéria femoral e seu direcionamento até a aorta abdominal. Imediatamente após a inserção, a cânula foi fixada por amarraduras e exteriorizada na região dorsal do animal, passando pelo espaço subcutâneo e chegando à região interescapular, onde foi fixada à pele por meio de sutura (Shalon Seda 4-0®). Em seguida o analgésico foi aplicado e o pós-operatório ocorreu em ambiente aquecido por lâmpada fisioterápica infravermelho (Philips®). Após este período, os animais foram direcionados a sala de registro cardiovascular, onde permaneceram por 24 horas (Belem-Filho et al., 2025).

2.4.4.2 Registro cardiovascular

Para mensuração dos parâmetros cardiovasculares – pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) – após o AVEh no córtex insular e a canulação da artéria femoral, os animais foram submetidos ao registro cardiovascular. Decorrido 24h após a implantação da cânula na artéria femoral, um volume de 0,5 mL de solução fisiológica (NaCl; 0,9%) com heparina (15 U/mL) foi inoculado na cânula para prevenir possíveis obstruções por coágulos. Em seguida, a cânula foi conectada a um transdutor de pressão arterial ligado a um amplificador e a um sistema de aquisição de dados computadorizado (MP-100, Biopac, EUA). Os valores de PAM e FC foram derivados da pressão arterial pulsátil e processados pelo software AcqKnowledge

4.1®. A PAM e FC do animal foi registrada por aproximadamente 30 minutos após estabilização: 10 minutos em sua *home-cage* (basal), 10 minutos em caixa usada por outro animal (período de estresse) e dez minutos de retorno à sua *home-cage* (período de recuperação) (Cunha Silva; Fontes, 2019).

2.4.4.3 Estresse por mudança de ambiente (Cage switch stress)

Para avaliar o efeito do AVEh no córtex insular e sua associação com os diferentes tratamentos frente a uma situação de reatividade cardiovascular, os animais foram submetidos ao estresse por mudança de ambiente ou *cage switch stress* (CSS). O teste consiste na transferência do animal de sua caixa original para uma caixa contendo maravalha usada por outro animal ao mesmo tempo em que os parâmetros cardiovasculares estão sendo registrados. Após estabilização, os valores basais foram coletados por um período de 10 minutos, seguidos de 10 minutos de CSS e retorno à caixa original por mais 10 minutos (Cunha Silva; Fontes, 2019).

2.4.5 Avaliações neurocomportamentais

Para caracterizar o perfil neurocomportamental de ratos *Wistar* submetidos ao AVEh experimental no córtex insular foram realizados os seguintes testes: enterramento de bolinhas (*marble burying*), teste locomotor e o teste função motora (*wire hang*).

2.4.5.1 Teste de enterramento de bolinhas (marble burying)

Para avaliar o comportamento compulsivo e/ou ansioso dos animais foi realizado o teste de enterramento de bolinhas de vidro. Para isso, cada animal foi colocado individualmente em uma caixa idêntica à sua original, com dimensões de 47 cm × 27 cm × 15 cm, contendo maravalha e nove bolinhas de vidro de 2 cm de diâmetro, dispostas em três fileiras de três bolas cada. O experimento teve duração de 10 minutos, ao término dos quais o animal foi removido e o número de bolas enterradas foi contabilizado. Considerou-se enterrada qualquer bolinha que estivesse com, no mínimo, metade de sua superfície coberta por maravalha. Cada animal foi testado em uma caixa distinta, e as bolinhas de vidro foram higienizadas com álcool

70% entre os testes (Broekkamp et al., 1989, 1986; Njung'e; Handley, 1991; Schneider; Popik, 2007).

2.4.5.2 Teste locomotor

O teste locomotor foi realizado para avaliar a atividade locomotora espontânea dos animais em um ambiente desconhecido. O experimento foi conduzido em uma caixa opaca, preta (50 cm × 30 cm × 20 cm) (Queiroz et al., 2011) cujo fundo foi subdividido por meio de demarcações, resultando em quatro áreas com dimensões finais de 22,5 cm × 13 cm cada, considerando a espessura das linhas traçadas. Em seguida, o animal foi colocado no centro da caixa e submetido a uma única sessão experimental de 10 minutos. Considerou-se movimento completo quando o corpo do animal cruzava integralmente uma das linhas demarcatórias. A atividade locomotora foi analisada por meio do *software X-Plo-Rat* (versão 1.1.0, 2005) e expressa pelo número total de cruzamentos realizados durante esse período. Após cada sessão, a caixa foi cuidadosamente higienizada com papel toalha e uma solução de álcool 10%, a fim de prevenir a interferência de odores nas sessões subsequentes (Dos Santos Machado et al., 2026).

2.4.5.3 Teste de função motora (wire hang)

O teste de função motora foi realizado para avaliar, em conjunto com o teste locomotor, o desempenho somatomotor dos animais após a hemorragia no córtex insular. Para isso, foi utilizada uma grade de malha de arame de 60 cm × 50 cm, posicionada a 70 cm acima de uma almofada de espuma. Os animais foram colocados na região central e inferior da grade, onde deveriam se agarrar. O tempo de suspensão foi medido a partir do momento em que o animal se segurava até a queda na almofada. O teste foi repetido cinco vezes, com um intervalo de 3 minutos entre as tentativas. O tempo máximo de suspensão foi fixado em 60 segundos, e a latência média para a queda ao longo das cinco tentativas foi determinada (Chang et al., 2019; Mao et al., 2021; Nishitani et al., 2020; Dos Santos Machado et al., 2026).

2.4.6 Temperatura corporal

Para avaliar a temperatura corporal de ratos *Wistar* submetidos à hemorragia no córtex insular foi realizado o implante de sensores de temperatura intraperitonealmente. Os sensores de temperatura foram previamente imersos em clorexidina a 2% (Riohex®) e, em seguida, solução fisiológica antes da cirurgia de implante. A inserção dos sensores na cavidade abdominal ocorreu imediatamente após a indução do AVE experimental. Para isso, realizou-se a tricotomia da região abdominal, seguida por uma incisão ventral mediana na pele e outra na linha alba do músculo reto abdominal, permitindo o acesso à cavidade abdominal. Após a implantação dos sensores de temperatura (*dataloggers*, DLs; SubCue®), o músculo e a pele foram suturados (Shalon Seda 4-0®). As primeiras horas pós-cirurgia, bem como os períodos correspondentes à administração das drogas de tratamento, foram desconsiderados, sendo válidas 40 horas de registro pós-AVE (Spencer et al., 2008).

2.4.7 Análise de Ritmicidade Circadiana

Considerando a natureza dos dados de temperatura intraperitoneal, que foram coletados em intervalos regulares ao longo de um período de 24 horas, e a potencial influência do AVEh e do tratamento com rilmenidina sobre o ciclo circadiano e a termorregulação, optou-se por realizar uma análise de ritmicidade circadiana. Esta abordagem estatística é fundamental para determinar a presença de oscilações rítmicas nos parâmetros fisiológicos e para quantificar as características do ritmo (mesor, amplitude e acrofase), permitindo a comparação entre os grupos experimentais.

2.4.8 Análises Proteômicas

Para investigar as possíveis alterações nas vias moleculares decorrentes do AVEh experimental no córtex insular ratos e os respectivos efeitos da rilmenidina sobre estas alterações, foram realizadas análises proteômicas do córtex insular direito e medula ventrolateral rostral (RVLM).

2.4.8.1 Preparação de amostras

Para realizar a proteômica do córtex insular direito e da RVLM de ratos *Wistar* amostras do córtex insular e RVLM foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C . Posteriormente, foi feita uma preparação prévia dessas amostras coletadas: os tecidos coletados provenientes dos grupos (controle, AVE + solução fisiológica, AVE + rilmenidina $10\mu\text{g/Kg}$) foram homogeneizados em $100\mu\text{L}$ do tampão de lise contendo 1% (m/v) de deoxicolato de sódio (SDC), 20 mM tris (2-carboxietil) fosfina hidrocloreto (TCEP), 40 mM cloroacetamida (CAA), 50 mM bicarbonato de trietilamônio (TEAB, $\text{pH} = 8$) e inibidor de protease. Em seguida, estas amostras foram sonicadas duas vezes, durante 15 segundos em banho de gelo, para otimização da lise celular e rompimento das fitas de DNA. Posteriormente, foram incubadas a 28°C em um ThermoMixer (Eppendorf®) sob agitação de 650 rpm por 2 horas, para a redução completa das ligações dissulfeto e alquilação dos grupos tióis dos resíduos de cisteína. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $5000\times g$ por 10 minutos para remoção de particulados celulares e o sobrenadante foi seco utilizando uma centrífuga a vácuo (speedvac, Thermo®). Estas amostras foram armazenadas em ultra freezer a -80°C para processamento posterior. Então, foram ressuspendidas em TEAB $\text{pH} = 8$ e quantificadas utilizando Nanodrop (Thermo Scientific®). Após a quantificação, $300\mu\text{g}$ de proteínas foram digeridas utilizando a proporção 1:50 (Enzima – Proteína) (m/m) tripsina a 37°C por 18 horas. Para quantificação dos peptídeos tripticos, foi utilizado fluorímetro Qubit 4 (Thermo Scientific®) de acordo com as especificações do fabricante. Estas amostras foram acidificadas com ácido fórmico 2% (v/v) e vortexado para remoção do SDC. Em seguida, foram centrifugadas a $14000\times g$ por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. Posteriormente, as amostras foram dessalinizadas usando micro colunas feitas a mão empacotadas com a resina R2 e R3 OLIGO™ e os peptídeos dessalinizados foram secos em uma centrífuga a vácuo e armazenadas a -20°C .

2.4.8.2 Cromatografia Líquida (Evosep One®)

Para a posterior análise de espectrometria de massa, as proteínas foram separadas molecularmente por cromatografia líquida alta eficiência (CLAE, do inglês HPLC) utilizando o equipamento Evosep One®, seguindo as instruções do fabricante. Os peptídeos tripticos foram carregados em um cromatógrafo Evosep One (protocolo 30 SPD), acoplado online a um espectrômetro de massa timsTOF Pro (Bruker®). A

eluição das amostras a partir dos Evotips ocorreu sob baixa pressão para o loop de armazenamento, com um deslocamento de gradiente que reduziu a porcentagem do tampão orgânico. O gradiente foi personalizado para um tempo de 40 minutos (método de 30 amostras/dia), com uma taxa de fluxo de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, em uma coluna de fase reversa de 4 cm $\times$ 150 μm de diâmetro interno, preenchida com partículas de sílica porosa revestidas com C18 de 3 μm (PepSep, Odense, Dinamarca).

2.4.8.3 Espectrometria de massa

Para identificar e quantificar as proteínas e peptídeos das amostras com altíssima sensibilidade, velocidade e precisão foi realizada a análise pelo espectrômetro de massa timsTOF Pro (Bruker®), operando no modo PASEF (Meier et al., 2018) com aquisição independente de dados (DIA). O túnel TIMS é composto por duas regiões: uma destinada ao armazenamento de íons e outra à análise de mobilidade iônica. A separação dos íons aprisionados foi realizada por meio da variação da voltagem de entrada na segunda região. Os espectros de massa (MS) foram registrados na faixa de 100 a 1700 m/z . A seleção dos íons precursores para PASEF-MS/MS ocorreu de forma dinâmica e em tempo real, utilizando um algoritmo avançado de agendamento PASEF baseado em varreduras de pesquisa TIMS-MS. Para identificar características prováveis de precursores de peptídeos, foi aplicado um filtro poligonal no espaço de m/z e mobilidade iônica, diferenciando-os de íons com carga única. A largura da janela de isolamento do quadrupolo foi ajustada para 2 Th para íons com valores abaixo de 700 m/z e 3 Th para valores acima desse limite. A energia de colisão foi ajustada incrementalmente conforme a mobilidade iônica aumentava, sendo configurada da seguinte forma: 52 eV para os primeiros 0-19% do tempo de rampa, 47 eV para 19-38%, 42 eV para 38-57%, 37 eV para 57-76% e 32 eV para a parte restante da análise.

2.4.8.4 Processamento dos dados (DIA MS)

Para analisar e interpretar os dados gerados pelo espectrômetro de massa, os dados brutos obtidos pelo timsTOF Pro PASEF foram processados no software DIA-NN (versão 1.8.1). A biblioteca espectral foi gerada a partir do arquivo FASTA da taxonomia *Rattus norvegicus* (UniprotKB). Para a deconvolução dos dados

proteômicos, foram utilizados os parâmetros padrão do programa, considerando a identificação de proteínas com, no mínimo, dois peptídeos distintos, sendo pelo menos um deles único, e uma taxa de falso positivo (FDR) inferior a 1%. A execução da deconvolução dos dados DIA-NN foi realizada por meio de um script baseado nas instruções disponibilizadas pelo próprio programa (Demichev, 2025).

2.4.9 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para quantificar e identificar os compostos biológicos de baixa concentração como os neurotransmissores e catecolaminas presentes nos tecidos coletados, foi empregada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2.4.9.1 Quantificação de neurotransmissores

Para a quantificação dos neurotransmissores glutamato (Glu) e ácido gama-aminobutírico (GABA) foi realizado o método conforme descrito por De Freitas Silva, Ferraz e Ribeiro (2009), com pequenas adaptações. As amostras do córtex insular e RVLm foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C . Posteriormente, estas amostras foram ressuspensas em uma solução de metanol a 85% (v/v) contendo 20 mM de HCl e incubadas com esferas sob agitação por 60 segundos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 6 minutos, e o sobrenadante resultante foi filtrado em filtros de seringa de $0,22\ \mu\text{m}$. Para a derivatização dos aminoácidos, 100 μL do sobrenadante filtrado foram misturados com 20 μL de orto-ftalaldeído (OPA) em metanol (5 mg/mL), 75 μL de tampão borato (pH 9,45) e 5 μL de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA). A mistura foi vortexada e imediatamente injetada no sistema cromatográfico. A separação foi realizada em uma coluna de fase reversa C18 (150 mm $\times$ 4,6 mm, 3 μm), utilizando como fase móvel uma solução composta por 0,05 M de acetato de sódio, tetraidrofurano (THF) 100% (v/v) e metanol 100% (v/v), na proporção de 50:1:49 (v/v), ajustada para pH 8,1. A análise foi conduzida em condições isocráticas, com tempo total de execução de 10 minutos e fluxo de 0,5 mL/min. A detecção dos aminoácidos derivados foi realizada por fluorescência, com comprimentos de onda de excitação e emissão de $\lambda_{\text{ex}} = 337\ \text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 454\ \text{nm}$, respectivamente.

com um coquetel de inibidores de protease e fosfatase. Um total de 30–40 Ig de proteína foi separado por SDS-PAGE seguido de *Western Blotting*. Os anticorpos e suas fontes estão listados na Tabela 1. A imunodeteção foi realizada usando quimioluminescência aprimorada detectada com equipamento LAS 4000 (GE HealthCareLife Science). Os níveis de proteína foram expressos como uma razão de densidades ópticas, e HSP90 foi usado como controle de carregamento (Eliezeck et al., 2024). A seguinte tabela apresenta os anticorpos primários e secundários utilizados para este experimento:

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para este experimento e suas respectivas identificações

Anticorpo primário	Marca	Número no catálogo	RRID	Diluição
TH	Santa Cruz Biotechnology	sc-374047	AB_10918377	1:1000
β_1 -AR	Thermo Fisher Scientific	PA1-049	AB_2289444	1:1000
β_2 -AR	Thermo Fisher Scientific	PA5-80323	AB_2787652	1:1000
HSP90a/b	Santa Cruz Biotechnology	sc-13119	AB_675659	1:3000
Anticorpo secundário	Marca	Número no catálogo	RRID	Diluição
Goat Anti-Rabbit IgG	Sigma-Aldrich	A3687	AB_258103	1:15000
Goat Anti-Mouse IgG	Sigma-Aldrich	A0545	AB_10689821	1:15000

Fonte: Elaborado pela autora

2.4.11 Variação do peso corporal e relação peso corporal/órgãos

Para avaliar a variação do peso corporal de ratos *Wistar* submetidos ao AVEh experimental no córtex insular, foram calculadas a variação absoluta e a variação relativa (percentual) do peso corporal. A variação absoluta foi obtida pela diferença entre o peso pré-eutanásia e o peso pré-cirúrgico, conforme a Equação 1:

Equação 1:

$$\text{Variação absoluta (g)} = \text{Peso pré-eutanásia} - \text{Peso pré-cirúrgico}$$

A variação relativa (percentual) foi determinada pela Equação 2:

Equação 2:

$$\text{Variação percentual (\%)} = \left[\frac{(\text{Peso pré-eutanásia} - \text{Peso pré-cirúrgico})}{\text{Peso pré-cirúrgico}} \right] \times 100$$

Para avaliar as diferenças entre os grupos quanto aos pesos do coração e dos rins (direito e esquerdo), foram calculadas as seguintes relações morfométricas, considerando o peso corporal pré-eutanásia como parâmetro de normalização:

$$\text{Relação 1} = \frac{\text{Peso do coração}}{\text{Peso corporal (pré - eutanásia)}}$$

$$\text{Relação 2} = \frac{\text{Peso do rim direito}}{\text{Peso corporal (pré - eutanásia)}}$$

$$\text{Relação 3} = \frac{\text{Peso do rim esquerdo}}{\text{Peso corporal (pré - eutanásia)}}$$

2.4.12 Determinação anatômica dos sítios de injeção

Para constatar os sítios de microinjeção no córtex insular direito, foi realizada a histologia da região. Para isso, após a conclusão dos experimentos, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, via i.p.) e submetidos à perfusão cerebral. A caixa torácica foi aberta, expondo o coração, e a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática. Em seguida, uma agulha de perfusão foi inserida no ventrículo esquerdo, e uma incisão no átrio direito foi realizada para permitir o escoamento do sangue e do perfusato. A perfusão foi realizada com 40 ml de solução fisiológica (NaCl 0,9%). Após este procedimento, os cérebros foram removidos da caixa craniana e

fixados em solução tamponada de formalina a 10%. Posteriormente, os tecidos foram transferidos para uma solução de sacarose a 20% por um período de 24 a 48 horas. Em seguida, no criostato (LEICA CM 1850®), foram obtidos cortes transversais do cérebro (50 µm), os quais foram imediatamente dispostos em lâminas previamente gelatinizadas e corados com vermelho neutro a 1%, de acordo com a técnica de Nissl. A análise das lâminas foi realizada por microscopia óptica, utilizando o atlas de Paxinos e Watson (2004) como referência para a identificação dos sítios de microinjeção (Paxinos, G; Watson, C., 2004). Para visualização do ponto de injeção foi utilizado o software SlideViewer versão 2.9.

2.4.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism* 8.0.1 (GraphPad, EUA), e os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de *Shapiro–Wilk*. Confirmado o atendimento aos pressupostos de normalidade, as comparações entre grupos foram realizadas por análise de variância (*one-way* ou *two-way* ANOVA), seguidas dos pós-testes de *Tukey* ou *Bonferroni*, conforme apropriado. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

2.4.13.1 Análise estatística da Ritmicidade Circadiana

Os resultados obtidos, a partir dos registros de temperatura, foram inicialmente submetidos à detecção de outliers utilizando o método ROUT. Em seguida, o teste de *Shapiro-Wilk* foi empregado para avaliar o padrão de distribuição dos dados. Para as análises temporais, os valores de cada grupo ao longo do período avaliado foram submetidos à análise de variância unifatorial (ANOVA *One-way*) ou ao teste de *Kruskal-Wallis*, conforme o padrão de distribuição dos dados, para avaliar a influência do fator tempo. Nos casos em que a ANOVA *One-way* ou o *Kruskal-Wallis* indicaram significância estatística, as séries temporais foram submetidas à regressão não linear utilizando a seguinte equação:

$$Y = \left[\frac{\text{Mesor} + \text{Amplitude} \times \cos (2 \times \pi (X - \text{Acrofase}))}{24} \right]$$

Para verificar se as oscilações observadas apresentavam ritmicidade circadiana num período de 24h (Cornelissen, 2014). Além disso, os resultados foram validados em através do ajuste co-senoidal com o pacote *Circacomp*. Quando a ritmicidade circadiana foi comprovada, os parâmetros ritmométricos (mesor, amplitude e acrofase) entre os grupos foram comparados por meio de uma análise de variância unifatorial (ANOVA) de uma via (*One-way*).

A comparação temporal entre os grupos também foi avaliada através da análise de variância bifatorial (*Two-way* ANOVA) considerando os fatores: tratamento e o tempo, bem como a interação entre estes fatores. Em seguida, foi utilizado o pós-teste *Fisher's LSD* para análise pareada a cada ponto de coleta dentre os grupos.

2.4.13.2 Análise estatística dos dados proteômicos

Os valores de quantificação das proteínas identificadas pelas análises proteômicas ($n = 6238$) foram transformados em $\log_2$ e normalizados pela mediana de cada coluna. Os valores ausentes foram imputados utilizando o algoritmo de aprendizado de máquina do pacote *missForest* e um algoritmo para análises estatísticas implementado no software *R*. As comparações entre os grupos foram realizadas por *one-way* ANOVA. As proteínas foram consideradas diferencialmente reguladas quando apresentaram $p < 0,05$ e variação mínima correspondente a $|\log_2 \text{fold change}| \geq 0,378$ ($\approx 1,3$ vezes de variação; $\log_2 \geq 0,378 \rightarrow$ proteínas mais abundantes ou $\leq -0,378 \rightarrow$ proteínas menos abundantes) nas comparações entre os grupos: ICSal + sal vs. ICH + sal, ICSal + sal vs. ICH + Ril 10 μg e ICH + sal vs. ICH + Ril 10 μg . A identificação proteica foi previamente controlada por taxa de falso positivo (FDR) inferior a 1%, conforme descrito no item 4.8.4.

2.5 Protocolo Experimental

2.5.1 Experimentos cardiovasculares

Para avaliação do perfil cardiovascular, ratos *Wistar* foram submetidos ao AVEh experimental no córtex insular direito. Os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico, com bolsa térmica aquecida sob a cauda para manutenção da temperatura corporal. Em seguida, realizou-se a injeção de sangue autólogo no córtex insular direito, sendo o sangue obtido por meio de pequeno corte na extremidade da cauda. Imediatamente após a cirurgia, os animais receberam a primeira dose de rilmenidina (1 ou 10 $\mu\text{g/kg}$, i.p.) ou solução salina (Dia 0). A segunda dose foi administrada no Dia 1 pós-AVEh e a terceira no Dia 2. Pelo menos, duas horas após a última administração (Dia 2), procedeu-se à canulação da artéria femoral. Os registros cardiovasculares foram realizados pelo menos 24 horas após esse procedimento. O protocolo de registro consistiu em 10 minutos na própria *home-cage* (parâmetros basais), 10 minutos em caixa previamente utilizada por outro animal (estresse) e 10 minutos finais na *home-cage*, totalizando 30 minutos de registro. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo pesquisador, a fim de reduzir variabilidade experimental. Ao término dos registros, os animais foram eutanasiados e os cérebros coletados para análise histológica, com o objetivo de confirmar os sítios de injeção. Este delineamento experimental está esquematizado na Figura 4.

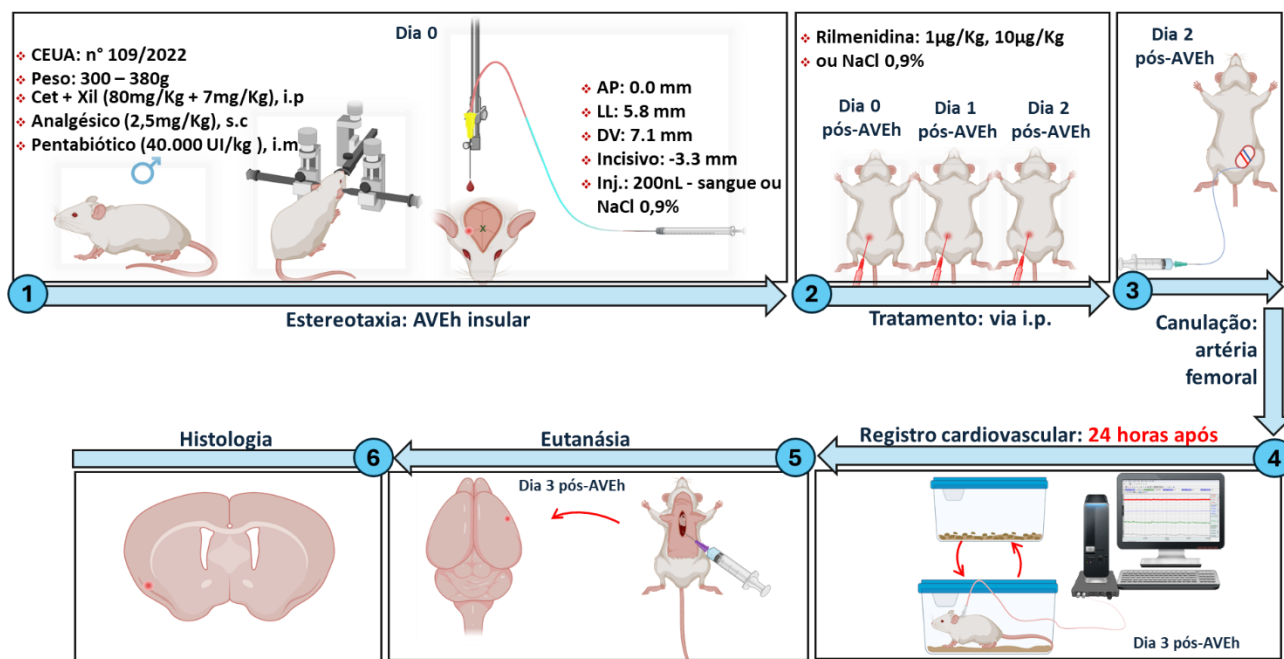


Figura 4 – Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliação do perfil cardiovascular após AVE hemorrágico no córtex insular de ratos *Wistar*. Fonte: Elaborado pela autora

2.5.2 Experimentos neurocomportamentais

Para avaliação neurocomportamental, ratos *Wistar* foram submetidos ao AVEh experimental no córtex insular direito. Os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico, com bolsa térmica aquecida sob a cauda para manutenção da temperatura corporal. Em seguida, realizou-se a injeção de sangue autólogo no córtex insular direito, sendo o sangue obtido por meio de pequeno corte na extremidade da cauda. Imediatamente após a cirurgia, os animais receberam rilmenidina, desta vez apenas a dose de 10 µg/kg, i.p., ou solução salina (Dia 0). A segunda dose foi administrada no Dia 1 pós-AVEh e a terceira no Dia 2. Pelo menos duas horas após a última administração (Dia 2), os animais foram submetidos aos testes neurocomportamentais, realizados na seguinte sequência: enterramento de bolas, teste locomotor e avaliação da função motora. Todos os testes foram conduzidos pelo mesmo pesquisador. Após a conclusão das avaliações neurocomportamentais, procedeu-se à canulação da artéria femoral. Os registros cardiovasculares foram realizados pelo menos 24 horas após esse procedimento, seguindo o mesmo protocolo descrito no item 5.1. Este delineamento experimental está esquematizado na Figura 5.

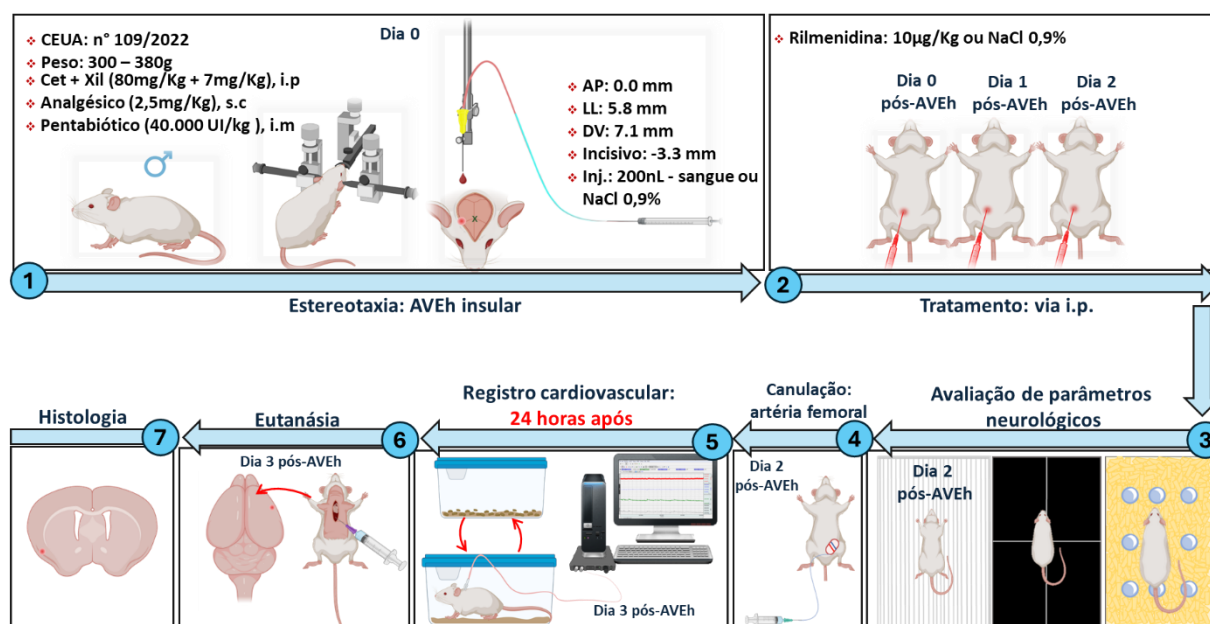


Figura 5 – Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliação do perfil neurocomportamental após AVE hemorrágico no córtex insular de ratos *Wistar*. Fonte: Elaborado pela autora

2.5.3 Experimentos de temperatura corporal e ritmicidade circadiana

Para avaliação da temperatura corporal e da ritmicidade circadiana, ratos *Wistar* foram submetidos ao AVEh experimental no córtex insular direito. Os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico, com bolsa térmica aquecida sob a cauda para manutenção da temperatura corporal. Em seguida, realizou-se a injeção de sangue autólogo no córtex insular direito, sendo o sangue obtido por meio de pequeno corte na extremidade da cauda. Imediatamente após o AVEh, foi implantado sensor de temperatura por via intraperitoneal, seguido da administração de rilmenidina (10 µg/kg, i.p.) ou solução salina (Dia 0). A segunda dose foi administrada no Dia 1 pós-AVEh e a terceira no Dia 2. Pelo menos duas horas após a última administração (Dia 2), procedeu-se à canulação da artéria femoral. Os registros cardiovasculares foram realizados 24 horas após esse procedimento, seguindo o protocolo descrito no item 5.1. O delineamento experimental encontra-se esquematizado na Figura 6.

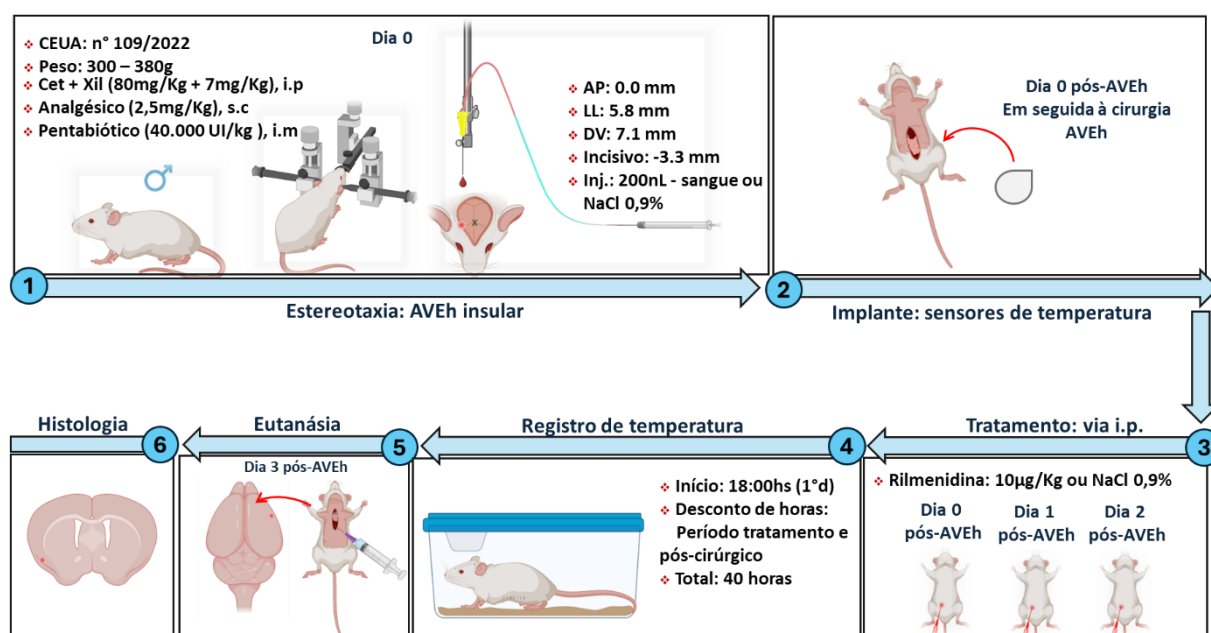


Figura 6 – Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliação da temperatura corporal e ritmicidade circadiana após AVE hemorrágico no córtex insular de ratos *Wistar*.
Fonte: Elaborado pela autora

2.5.4 Experimentos neuroquímicos e moleculares

Para avaliação do perfil neuroquímico e molecular, ratos *Wistar* foram submetidos ao AVEh experimental no córtex insular direito e ao respectivo tratamento, conforme protocolo descrito no item 5.1. No Dia 3 pós-AVEh, os animais foram eutanasiados no período da manhã, e amostras do córtex insular, da RVLM e demais órgãos foram coletadas para posterior análise. O delineamento experimental está esquematizado na Figura 7.

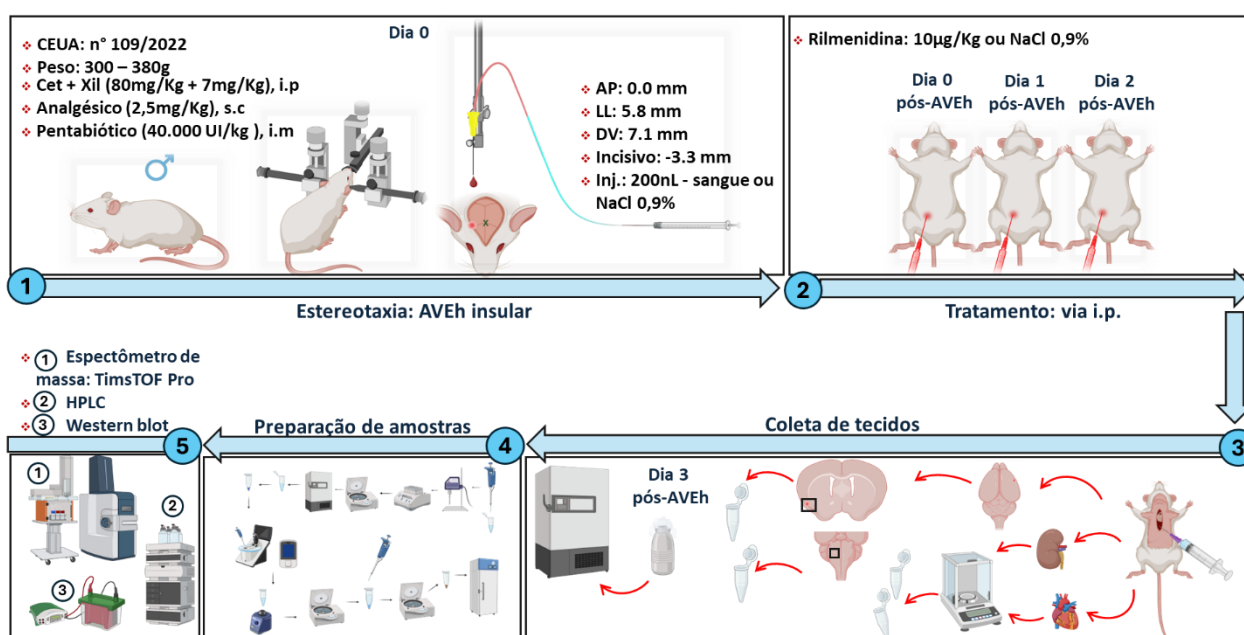


Figura 7 – Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliação do perfil neuroquímico e molecular após AVE hemorrágico no córtex insular de ratos *Wistar*. Fonte: Elaborado pela autora

2.6 Resultados

2.6.1 Localizações das lesões no córtex insular

Com base em estudos anteriores que demonstraram que o modelo de AVEh no IC direito intermediário causa aumento da atividade simpática e consequente disfunção cardíaca, as microinjeções foram direcionadas para a coordenada 0,00 mm em relação ao bregma, no eixo intermediário. A confirmação da localização das microinjeções foi obtida por meio de análise histológica de lâminas coradas, observadas em microscópio óptico, utilizando o atlas de Paxinos e Watson (2004) como referência. A Figura 8 apresenta uma fotomicrografia representativa da área de microinjeção.

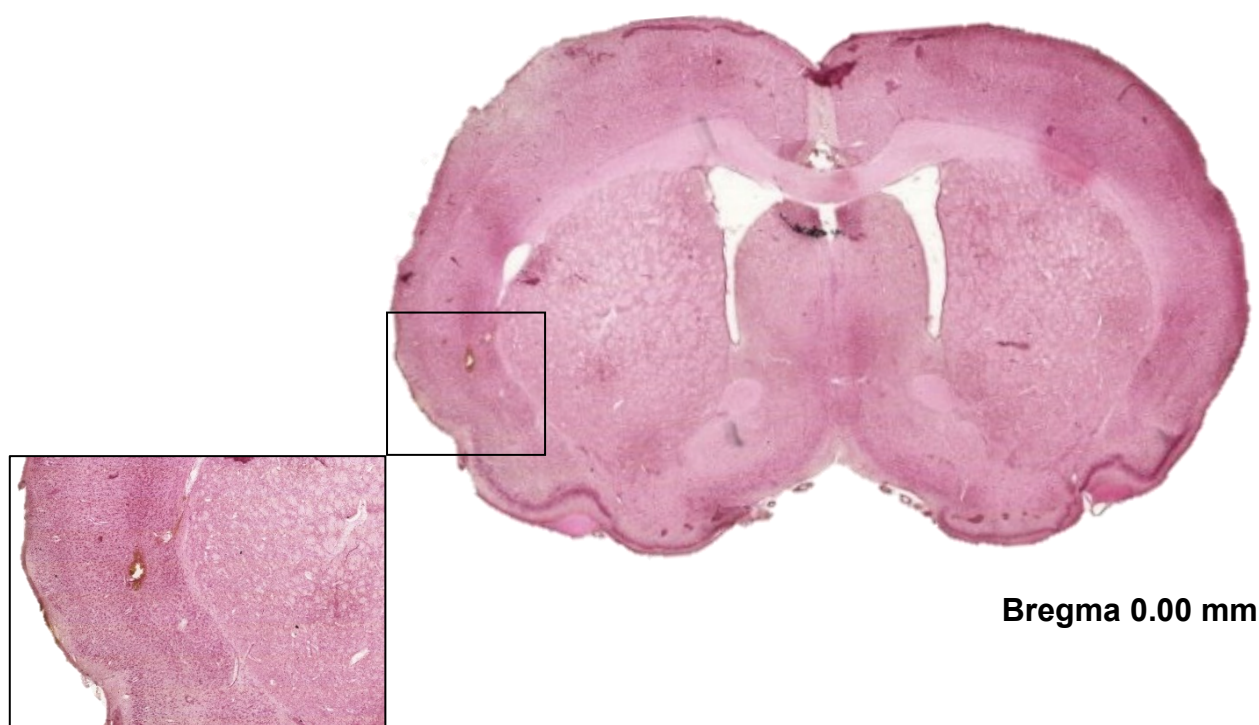


Figura 8 – Fotomicrografia representativa do cérebro de rato pós-AVEh experimental. Coordenada estereotática: bregma 0.00 mm. Aumento do ponto de injeção em 2.3x por meio do software SlideViewer versão 2.9. Fonte: Elaborado pela autora

O mapa de microinjeções representado pela Figura 9, ilustra a distribuição dos pontos de injeção ao longo do eixo intermediário do IC direito de ratos *Wistar*.

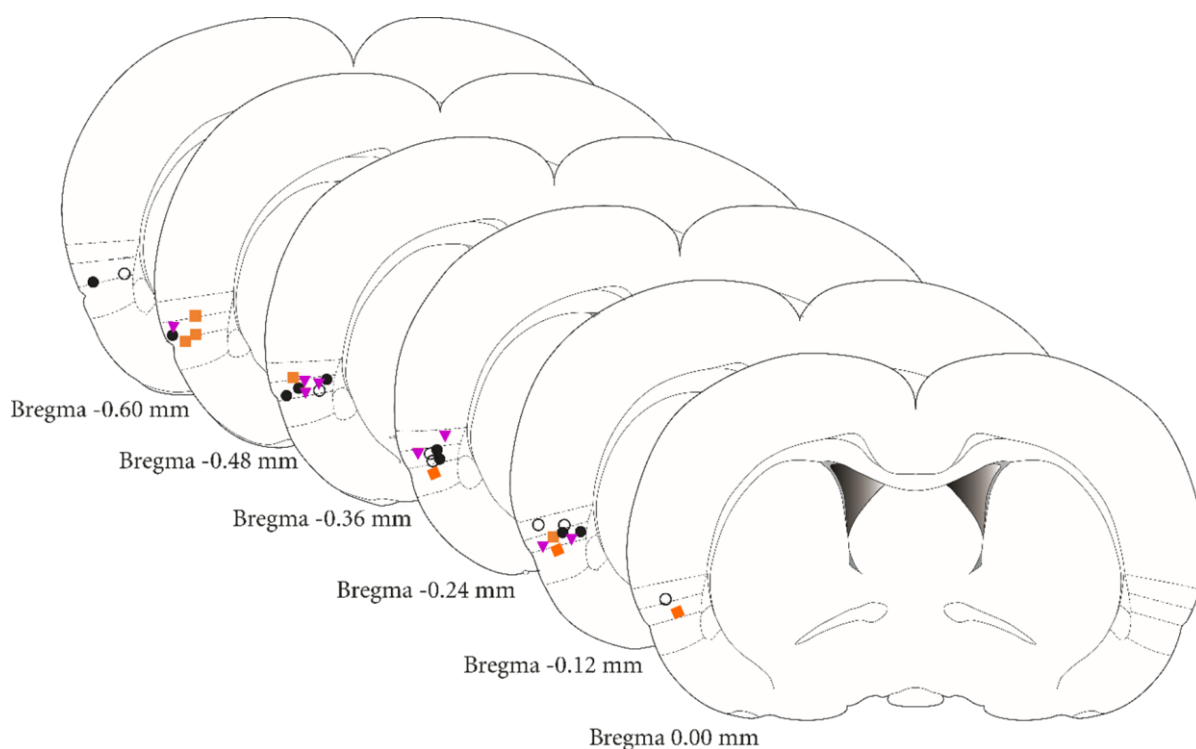
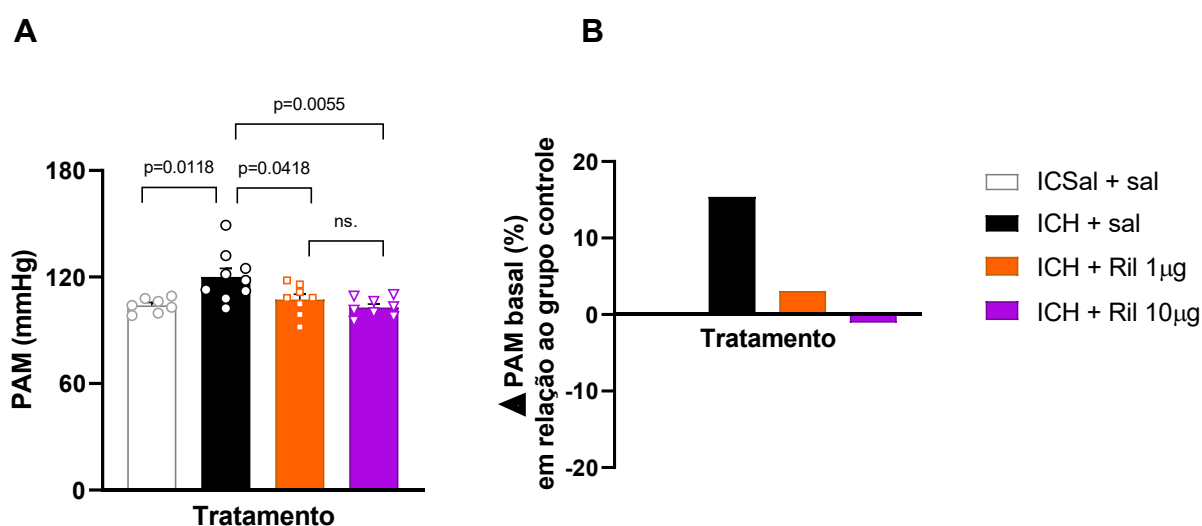


Figura 9 – Mapa de microinjeções de sangue autólogo ou solução fisiológica no córtex insular direito de ratos *Wistar* utilizando o atlas Paxinos e Watson (2004) como referência. Círculos brancos: Grupo controle – ICSal + sal (n=7): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica; Círculos pretos: Grupo não tratado – ICH + sal (n=9): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica; Quadrados laranja: Grupo tratado – ICH + Ril 1 μ g (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 1 μ g/Kg; Triângulos invertidos roxos: Grupo tratado – ICH + Ril 10 μ g (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 μ g/Kg. Secções coronais de 50 μ m de espessura. Fonte: Elaborado pela autora

2.6.2 Efeitos da Rilmenidina na Disfunção Cardiovascular Basal e Reatividade ao Estresse

2.6.2.1 Perfil Cardiovascular Basal

A microinjeção de sangue autólogo no IC induziu um aumento da PAM basal (ICSal + sal: 104 ± 4 mmHg vs. ICH + sal: 120 ± 14 mmHg; $P < 0.01$; Figura 10A-B) e provocou taquicardia sustentada em comparação ao grupo controle (ICSal + sal: 314 ± 21 bpm vs. ICH + sal: 460 ± 41 bpm; $P < 0.01$; Figura 10C-D), confirmando, assim, a disfunção cardíaca e a reprodutibilidade do modelo experimental descrito em estudos anteriores (Marins et al., 2020; Dos Santos Machado et al., 2026). O tratamento com rilmenidina, em ambas as doses testadas: $1 \mu\text{g/kg}$ (PAM: 107 ± 9 mmHg; FC: 341 ± 37 bpm; $P < 0.01$) e $10 \mu\text{g/kg}$ (PAM: 103 ± 5 mmHg; FC: 295 ± 22 bpm; $P < 0.01$), preveniu o aumento da PAM e da FC após a indução do AVEh, resultando em valores que não diferiram estatisticamente dos observados no grupo controle. Entretanto, a dose de $1 \mu\text{g/kg}$ (FC: 341 ± 37 bpm; $P < 0.01$) promoveu significativamente uma atenuação da FC menor em comparação à dose de $10 \mu\text{g/kg}$ (FC: 295 ± 22 bpm; $P < 0.01$), sugerindo uma relação dose-resposta.



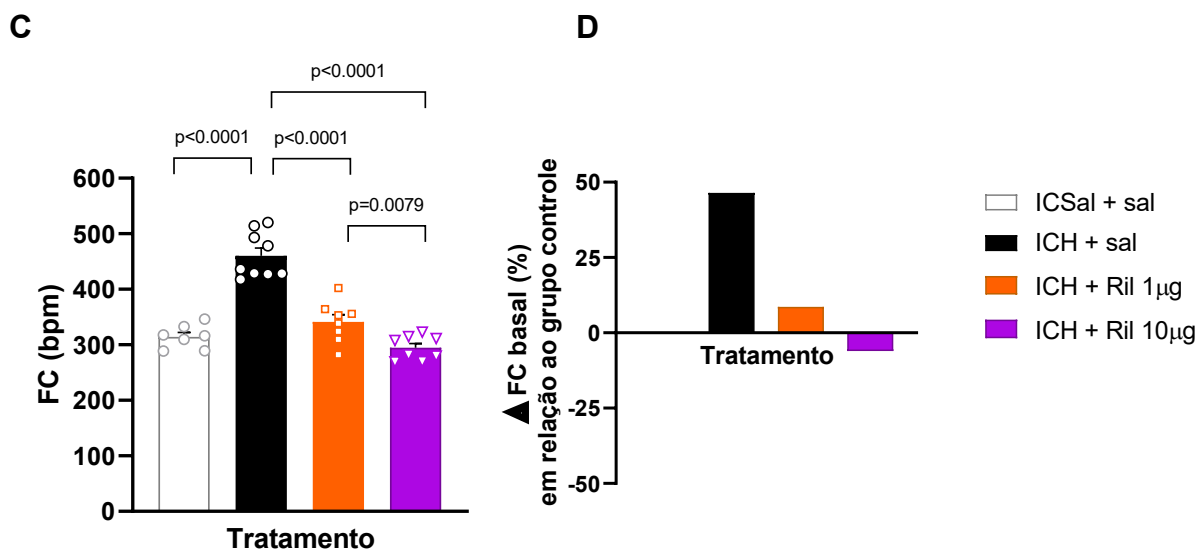
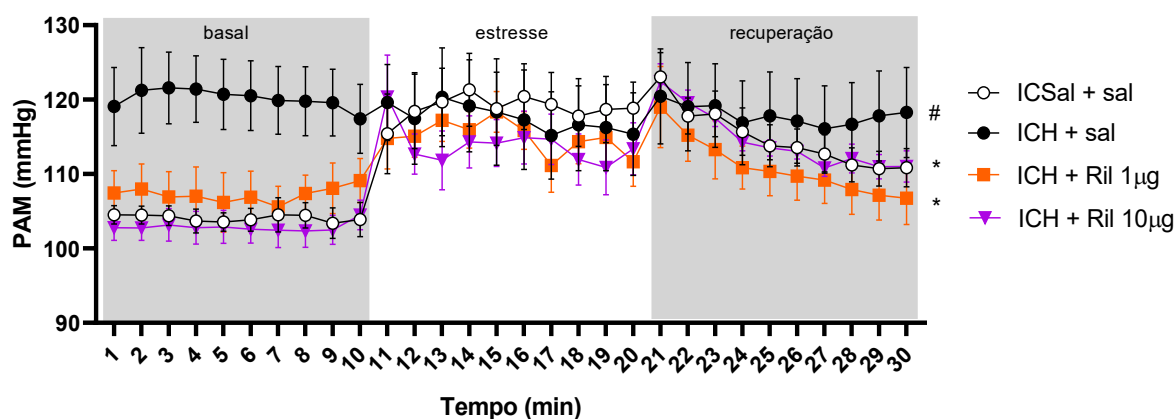


Figura 10 – Efeitos nos parâmetros cardiovasculares de ratos *Wistar* pós-AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC. (A-B) Efeitos na pressão arterial média basal e variação da pressão arterial média basal em relação ao grupo controle. **(C-D)** Efeitos na frequência cardíaca basal e variação da frequência cardíaca basal em relação ao grupo controle. ICSal + sal (n=7): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, barra branca); ICH + sal (n=9): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril 1 µg (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 1 µg/Kg (barra laranja); ICH + Ril 10 µg (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 µg/Kg (barra roxa). As barras representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média ± EPM. Análise estatística: *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora

2.6.2.2 Reatividade Cardiovascular ao Estresse

O período de avaliação de 30 minutos da PAM e FC compreendeu os períodos: basal, estresse (CSS) e recuperação (Figura 11A-B).

A



B

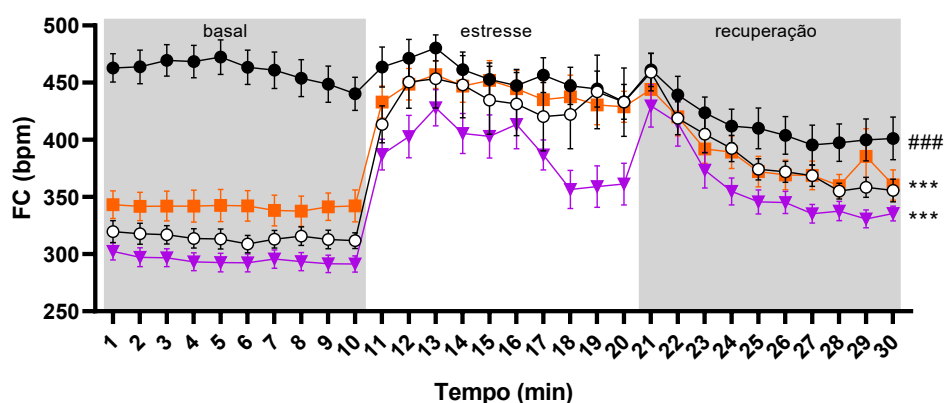
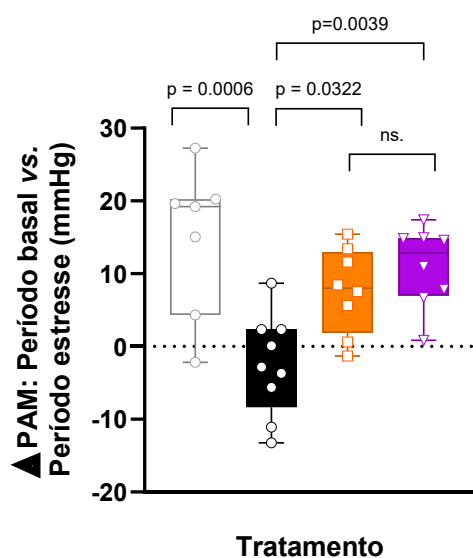


Figura 11 – Parâmetros cardiovasculares ao longo de 30 minutos de animais submetidos ao AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC. (A) Pressão arterial média. Análise estatística: # indica diferença no período basal em relação ao grupo ICSal + sal; $p < 0,05$; *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. * indica diferença no período basal em relação ao grupo ICH + sal; $p < 0,05$; *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. **(B)** Frequência cardíaca. Análise estatística: ### indica diferença no período basal em relação ao grupo ICSal + sal; $p < 0,0001$; *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. *** indica diferença no período basal em relação ao grupo ICH + sal; $p < 0,0001$; *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. ICSal + sal ($n=7$): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, círculos brancos); ICH + sal ($n=9$): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, círculos pretos); ICH + Ril 1 μg ($n=8$): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 1 $\mu\text{g/Kg}$ (quadrados laranja); ICH + Ril 10 μg ($n=8$): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 $\mu\text{g/Kg}$ (triângulos invertidos roxos). Os símbolos representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM; basal: período de 10 minutos de registro dos parâmetros cardiovasculares basais do animal em sua home-cage; estresse: período de 10 minutos de registro dos parâmetros

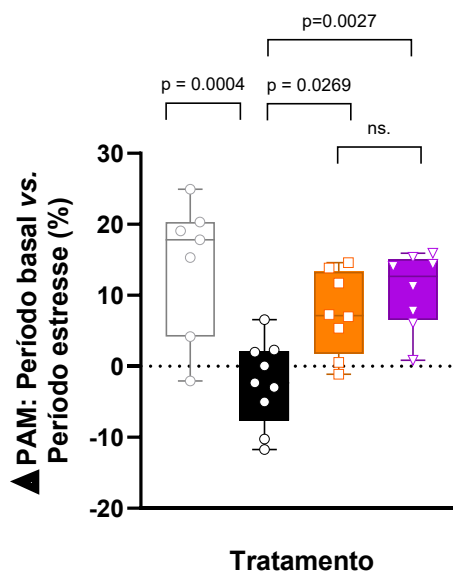
cardiovasculares durante o CSS; recuperação: período de 10 minutos de registro dos parâmetros cardiovasculares após a volta do animal para home-cage. Fonte: Elaborado pela autora

A análise da reatividade ao estresse revelou que os animais com AVEh sem tratamento apresentaram uma hiporreatividade cardiovascular evidenciado pela Δ PAM (ICSal + sal: Δ PAM aumentou $\approx 14\%$ vs. ICH + sal: Δ PAM diminuiu $\approx 2\%$; $P < 0.05$; Figuras 12A-B) e Δ FC (ICSal + sal: Δ FC aumentou $\approx 39\%$ vs. ICH + sal: Δ FC diminuiu $\approx 0.5\%$, $P < 0.05$; Figuras 12C-D) durante o período de estresse em comparação ao período basal. Em contraste, os grupos com AVEh tratados com rilmenidina, em ambas as doses, mantiveram a reatividade cardiovascular durante o período de estresse, apresentando aumentos da Δ PAM (ICH + Ril 1 μ g: Δ PAM aumentou $\approx 7\%$ vs. ICH + Ril 10 μ g: Δ PAM aumentou $\approx 11\%$; $P < 0.05$) e da Δ FC (ICH + Ril 1 μ g: Δ FC aumentou $\approx 30\%$ vs. ICH + Ril 10 μ g: Δ FC aumentou $\approx 32\%$; $P < 0.05$) e restaurando a valores próximos aos do grupo controle.

A



B



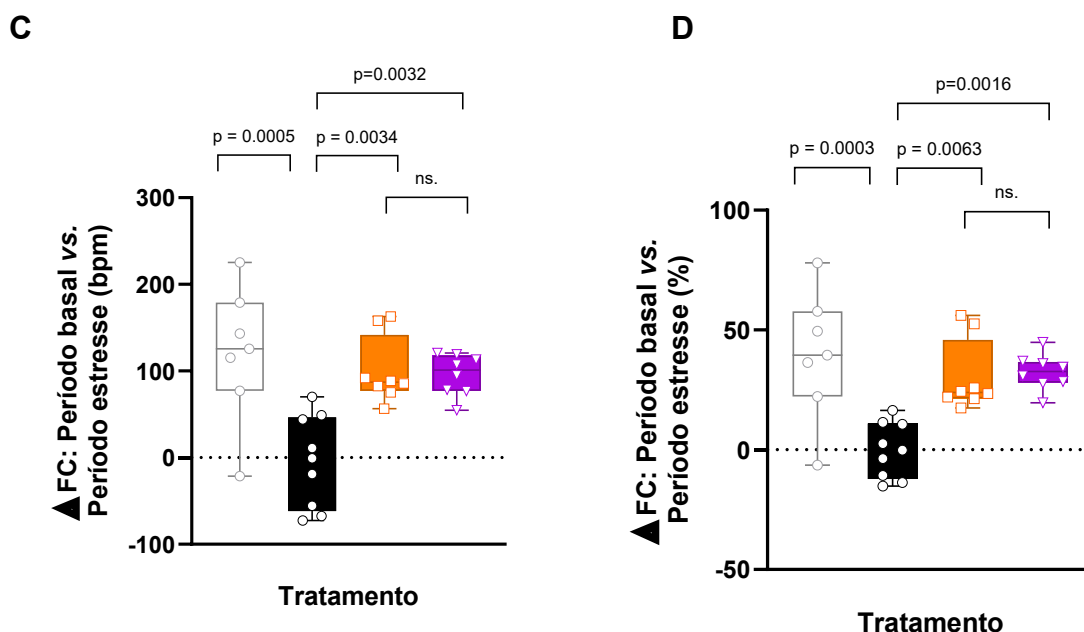


Figura 12 – Variação dos parâmetros cardiovasculares entre o período basal e de estresse de animais submetidos ao AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC. (A-B) Variação absoluta e percentual da PAM entre o período basal e o período de estresse. **(C-D)** Variação absoluta e percentual da FC entre o período basal e o período de estresse. ICSal + sal (n=7): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, barra branca); ICH + sal (n=9): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril 1 µg (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 1 µg/Kg (barra laranja); ICH + Ril 10 µg (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 µg/Kg (barra roxa). Os símbolos representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos após teste *one-way* ANOVA com $p < 0,05$ e pós-teste de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora

Ao comparar os períodos de estresse e de recuperação, não foram observadas diferenças significativas na Δ PAM entre os grupos (ICSal + sal: Δ PAM diminuiu $\approx 3\%$; ICH + sal: Δ PAM diminuiu 0% ; ICH + Ril 1 µg: Δ PAM diminuiu $\approx 4\%$; ICH + Ril 10 µg: Δ PAM diminuiu $\approx 0.5\%$; $P < 0.05$; Figuras 13A-B). Resultado semelhante foi encontrado para a Δ FC (ICSal + sal: Δ FC diminuiu $\approx 12\%$; ICH + sal: Δ FC diminuiu 11% ; Figuras 13C-D), indicando que não parece haver diferença no tempo de recuperação dos parâmetros cardiovasculares entre os grupos.

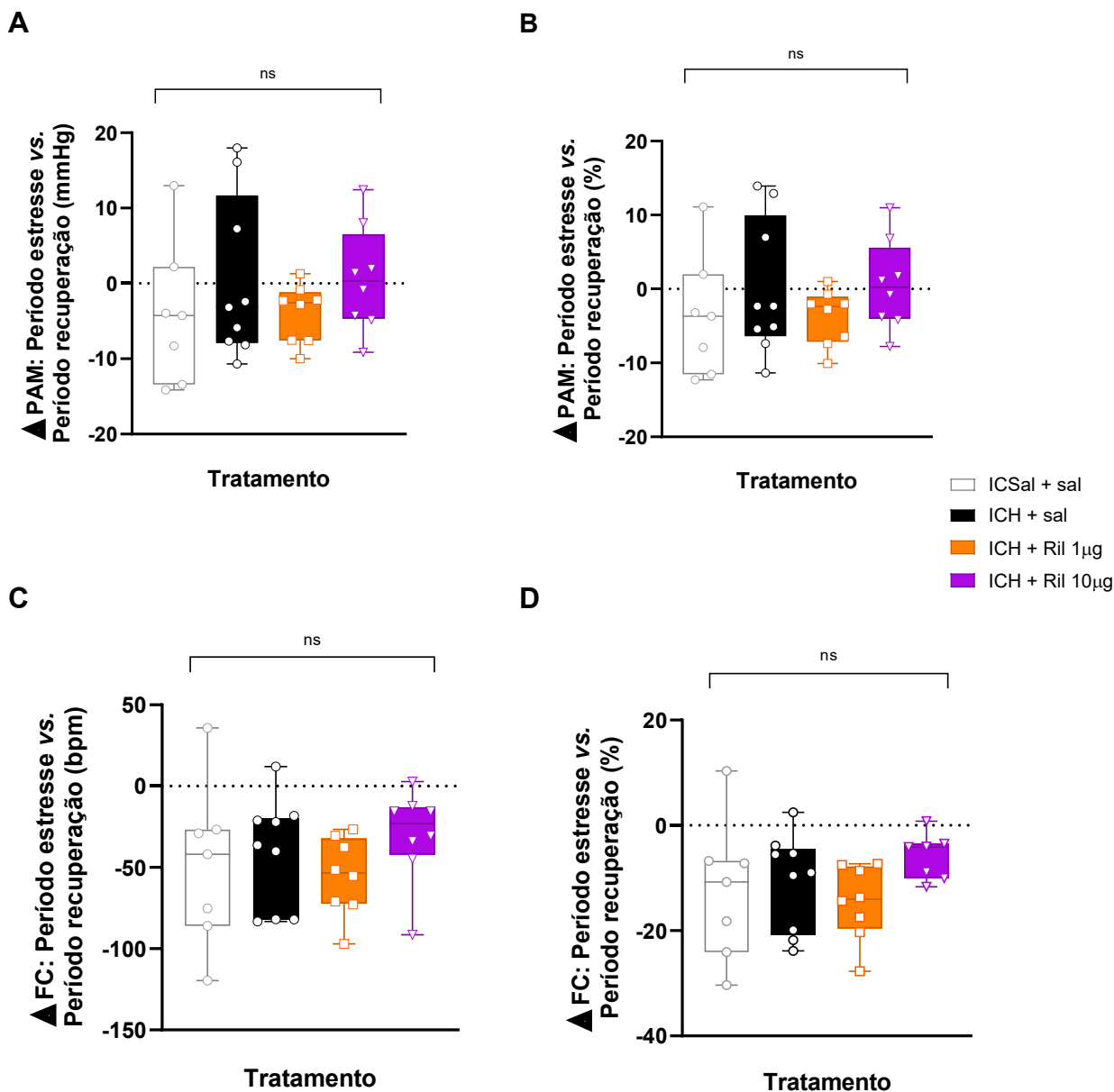
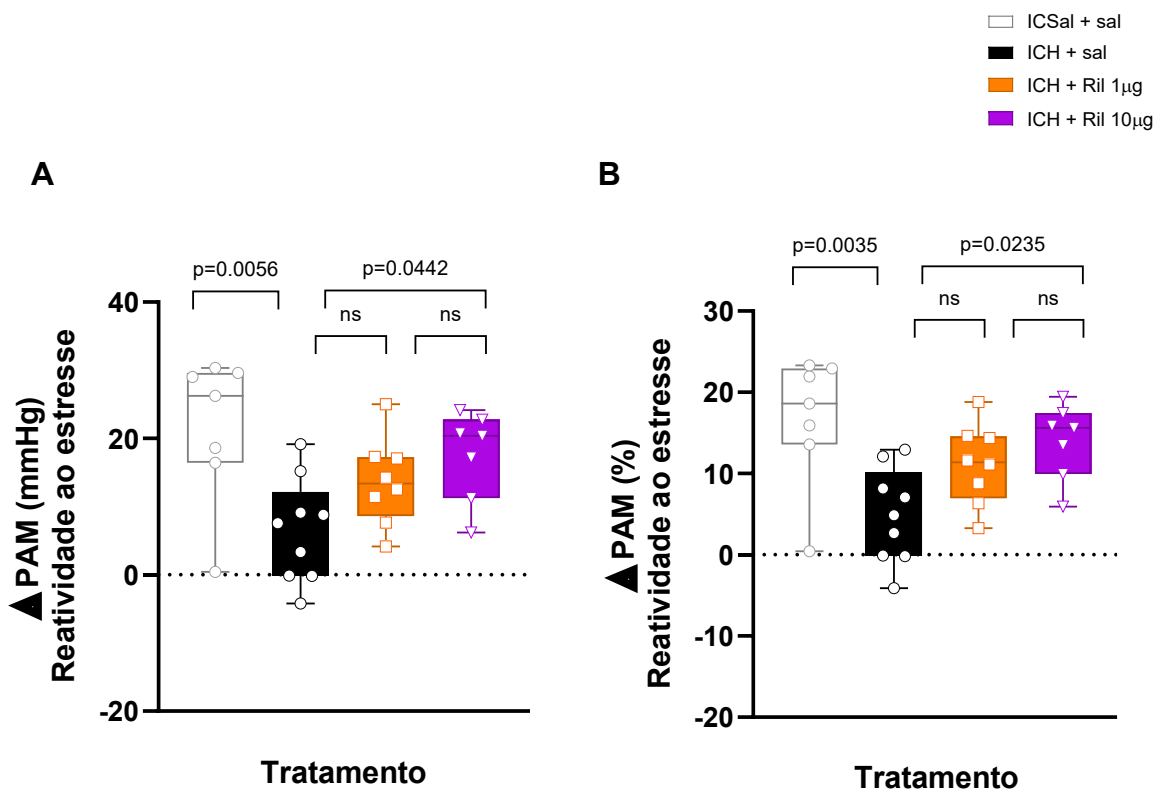


Figura 13 – Variação dos parâmetros cardiovasculares entre os períodos de estresse e recuperação de animais submetidos ao AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC. (A-B) Variação absoluta e percentual da PAM entre o período de estresse e o período de recuperação. **(C-D)** Variação absoluta e percentual da FC entre o período de estresse e o período de recuperação. ICSal + sal (n=7): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, barra branca); ICH + sal (n=9): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril 1 μ g (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 1 μ g/Kg (barra laranja); ICH + Ril 10 μ g (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 μ g/Kg (barra roxa). Os símbolos representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos após teste *one-way* ANOVA com $p < 0,05$ e pós-teste de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora

Ao avaliar a variação dos parâmetros cardiovasculares em relação ao maior pico do período de CSS, observou-se que o grupo controle apresentou o maior pico de aumento da PAM, enquanto o grupo com AVEh exibiu o menor pico de elevação (ICSal + sal: Δ PAM aumentou $\approx 17\%$; ICH + sal: Δ PAM aumentou $\approx 5\%$; ICH + Ril $1\mu\text{g}$: Δ PAM aumentou $\approx 11\%$; ICH + Ril $10\mu\text{g}$: Δ PAM aumentou $\approx 14\%$; $P < 0.05$). Em relação aos tratamentos, ambas as doses da rilmenidina restauraram o pico da PAM durante o CSS a valores próximos aos do grupo controle, sendo que a dose de $10\mu\text{g/kg}$ foi a que mais se aproximou desses valores (Figura 14A-B).

Da mesma forma, o grupo controle apresentou o maior pico de aumento na FC, enquanto o grupo com AVEh exibiu o menor pico (ICSal + sal: Δ FC aumentou $\approx 33\%$; ICH + sal: Δ FC aumentou $\approx 12\%$; ICH + Ril $1\mu\text{g}$: Δ FC aumentou $\approx 24\%$; ICH + Ril $10\mu\text{g}$: Δ FC aumentou $\approx 28\%$; $P < 0.05$). Ambas as doses de rilmenidina promoveram restauração dos picos de FC durante o CSS para valores semelhantes aos do grupo controle, com a dose de $10\mu\text{g/kg}$ apresentando a resposta mais próxima (Figura 14C-D).



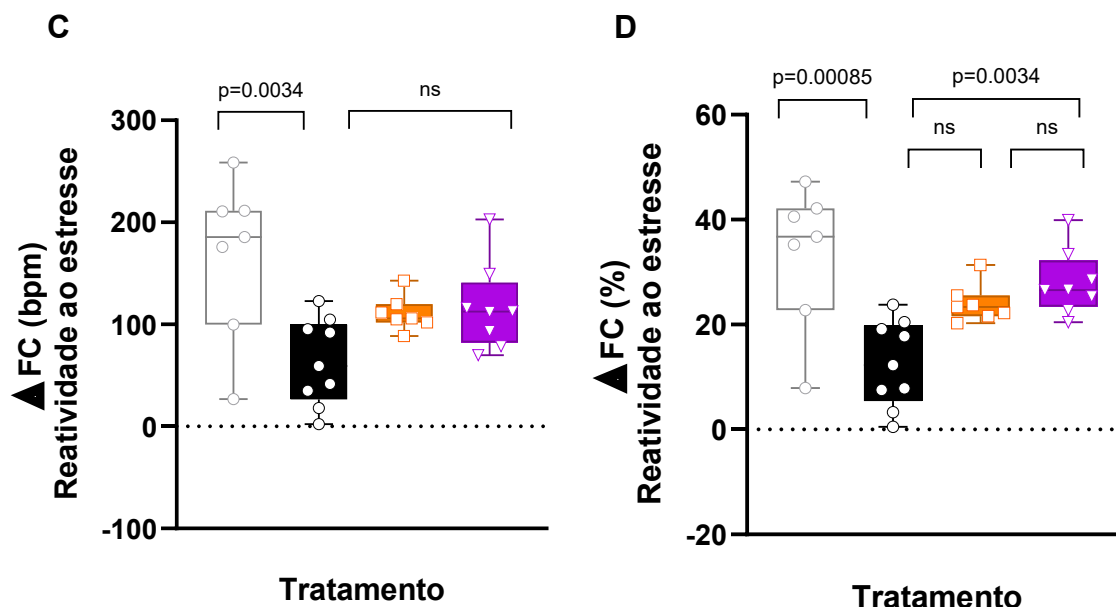


Figura 14 – Pico da reatividade cardiovascular ao estresse por mudança de ambiente (CSS) em animais submetidos ao AVEh experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC. (A-B) Variação absoluta e percentual da PAM em resposta ao CSS. **(C-D)** Variação absoluta e percentual da FC em resposta ao CSS. ICSal + sal (n=7): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, barra branca); ICH + sal (n=9): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril 1 μg (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 1 μg/Kg (barra laranja); ICH + Ril 10 μg (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 μg/Kg (barra roxa). Os símbolos representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média ± EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos após teste *one-way* ANOVA com $p < 0,05$ e pós-teste de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora

Diante dessa diferença dose-resposta, a dose de 10 μg/kg de Rilmenidina foi selecionada para os experimentos subsequentes, já que os experimentos cardiovasculares demonstraram que esta concentração promoveu a maior eficácia na atenuação do aumento pressórico e da taquicardia provocado pelo AVEh.

2.6.3 Efeitos no Perfil Neurocomportamental, Temperatura e Ritmicidade Circadiana

2.6.3.1 Perfil neurocomportamental

A avaliação dos parâmetros neurocomportamentais dos animais (Figura 15) demonstrou que o AVEh não alterou a atividade locomotora (cruzamentos: ICSal + sal: 35 ± 19 ; ICH + sal: 34 ± 11 ; ICH + Ril 10 μg: 26 ± 7 ; $P < 0.05$), a função motora (tempo de

suspensão à grade: ICSal + sal: 14 ± 7 s; ICH + sal: 17 ± 5 s; ICH + Ril $10 \mu\text{g}$: 15 ± 8 s; $P < 0.05$) ou o comportamento tipo ansioso/ compulsivo (nº bolas enterradas: controle: 8 ± 1 ; pós-AVE: 9 ± 0.5 ; tratamento [Ril $10 \mu\text{g/Kg}$]: 7 ± 2 ; $P < 0.05$), indicando que o AVEh no IC não parece prejudicar de forma evidente funções neurocomportamentais.

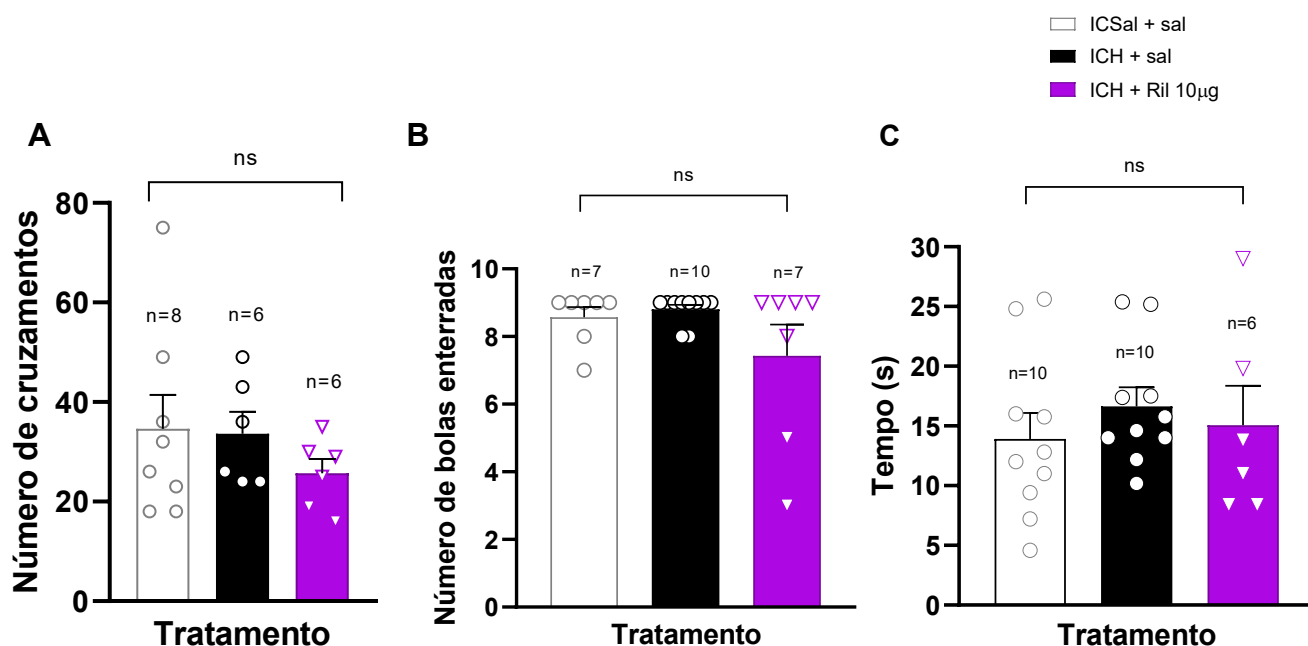


Figura 15 – Efeitos do AVEh experimental no IC sobre parâmetros neurocomportamentais de ratos *Wistar*. (A) Teste locomotor, avalia atividade locomotora pelo número de cruzamentos (B) Teste *Marble Burying*, avalia compulsividade e/ou ansiedade pelo número de bolas enterradas (C) Teste *Wire Hang*, avalia a função motora pelo tempo (segundos) de suspensão do animal. ICSal + sal: microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, barra branca); ICH + sal: microinjeção de sangue autólogo no IC e tratado com solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril $10 \mu\text{g}$: microinjeção de sangue autólogo no IC e tratado com rilmenidina na dose de $10 \mu\text{g/Kg}$ (barra roxa). As barras representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos após teste *one-way* ANOVA. $p < 0,05$. Fonte: Elaborado pela autora

2.6.3.2 Efeitos na Temperatura

A análise da manutenção da temperatura média intraperitoneal (Figura 16) não revelou alterações significativas quando comparado ao grupo controle (*Naïve*: $37,48 \pm 0,25$; ICSal + sal: $37,74 \text{ }^{\circ}\text{C}$; ICH + sal: $37,70 \pm 0,036^{\circ}\text{C}$; ICH + Ril $10 \mu\text{g}$: $37,63 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; $P < 0,05$) indicando que o AVEh não parece ter impactos evidentes na termorregulação entre os grupos experimentais. No entanto, estes resultados

sugeriram a presença de oscilações na temperatura ao longo do dia. Por essa razão, foi realizada a avaliação da ritmicidade circadiana dos animais.

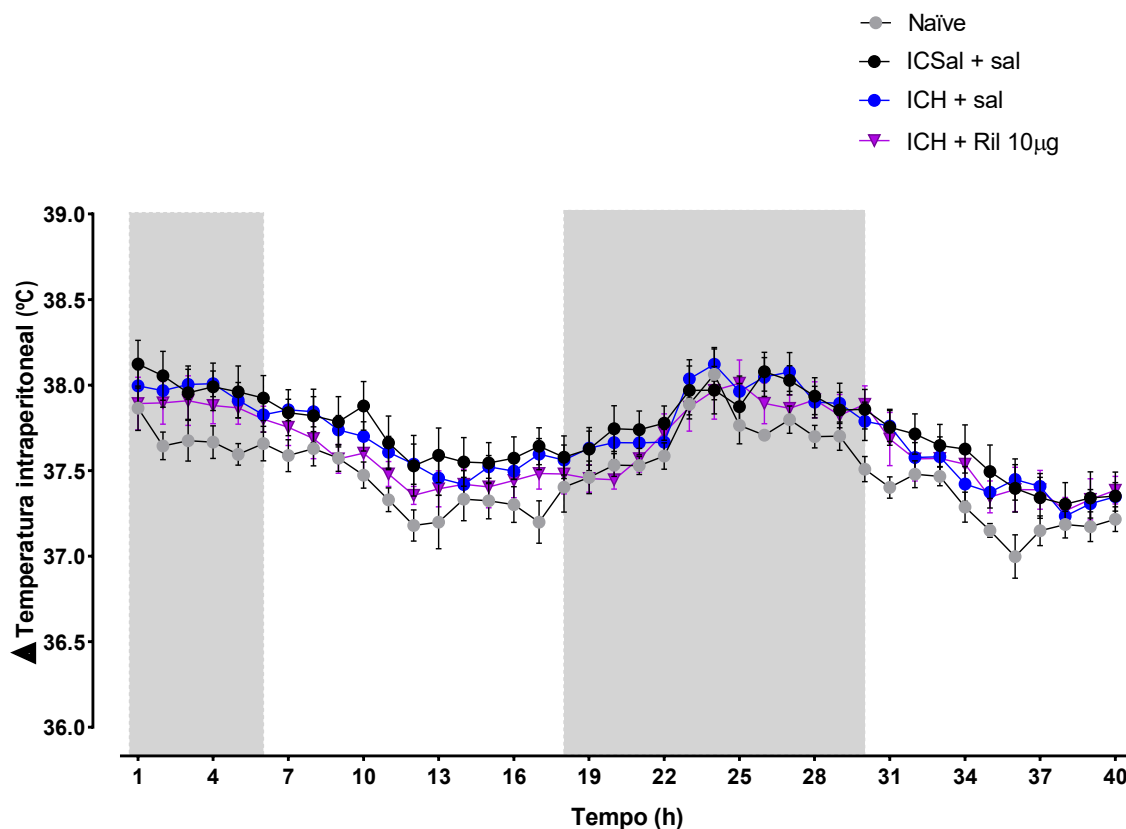


Figura 16 – Temperatura média intraperitoneal de ratos *Wistar* pós-AVEh experimental ou procedimentos cirúrgicos. Naïve (n=6): apenas injeção i.p. de solução fisiológica (círculos cinzas); ICSal + sal (n=7): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, círculos pretos); ICH + sal (n=9): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, círculos azuis); ICH + Ril 10 µg (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 µg/Kg (triângulos invertidos roxos). Os símbolos representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM; retângulo cinza: fase escura de registro da temperatura média intraperitoneal do animal em sua home-cage; retângulo branco: fase clara de registro da temperatura média intraperitoneal do animal em sua home-cage. Análise estatística: não houve diferença entre os grupos após teste *two-way* ANOVA $p < 0,05$. Fonte: Elaborado pela autora

2.6.3.3 Ritmicidade Circadiana

As análises de ritmicidade circadiana revelaram uma variação temporal significativa dentro de cada grupo experimental, indicando oscilações de 24 horas na temperatura corporal, com valores mais elevados no início da fase de atividade dos

animais (fase escura) para todos os grupos (Figura 16A). As análises também demonstraram diferença significativa para os fatores tempo e tratamento. Em relação às comparações pareadas, foram observadas diferenças pontuais entre os grupos: *Naïve* vs. ICSal + sal nos tempos 1, 3, 4, 8, 17 e 22 horas; *Naïve* vs. ICH + sal nos tempos 3, 8, 17 e 22 horas; e *Naïve* vs. ICH+Ril 10 μ g no tempo 21 horas (Tabela 2, Figura 17A).

As variações temporais confirmaram a ritmicidade circadiana da temperatura corporal em todos os grupos experimentais, validada pelo ajuste dos dados à curva cosseno com periodicidade de 24 horas ($P < 0,0001$ para todos os casos). Todos os grupos apresentaram acrofase na fase escura do período de 24 horas, variando entre 16,60 e 17,48 horas, e valores de mesor oscilando entre 37.52 e 37.75 °C.

Diferenças significativas foram observadas nas comparações do mesor entre os grupos *Naïve* vs. ICSal + sal/ ICH + sal/ ICH + Ril10 μ g, respectivamente, demonstrando um aumento significativo da temperatura corporal. E houve redução do mesor nas comparações entre os grupos ICSal + sal vs. ICH + Ril10 μ g e ICH + sal vs. ICH + Ril10 μ g, respectivamente, demonstrando uma diminuição significativa da temperatura corporal. Em relação às acrofases, observou-se um atraso em todas as comparações do grupo *Naïve* vs. ICSal + sal/ ICH + sal/ ICH + Ril10 μ g, respectivamente, demonstrando que horário do pico máximo do ritmo circadiano estava ocorrendo mais tarde. De modo semelhante a comparação ICH + sal vs. ICH + Ril10 μ g também apresentou atraso na acrofase. Estas informações detalhadas são apresentadas na Tabela 2 e Figura 17B.

A

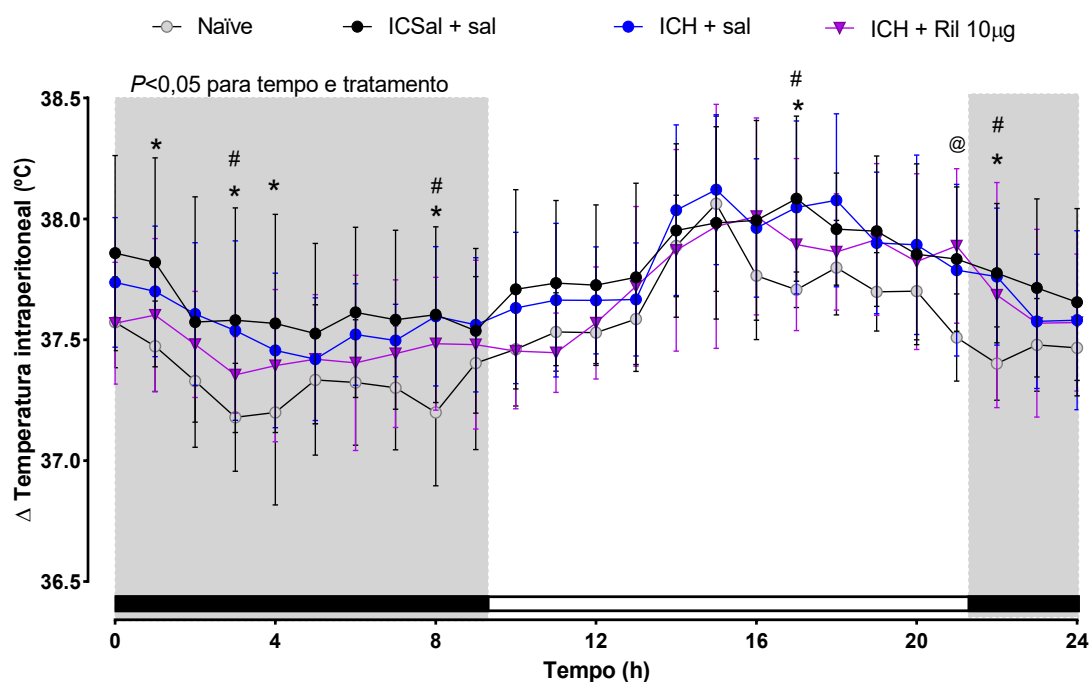


Figura 16A – Variação temporal da temperatura intraperitoneal pós-AVEh experimental ou procedimentos cirúrgicos. Naïve (n=6): apenas injeção i.p. de solução fisiológica (barra cinza); ICSal + sal (n=7): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, barra preta); ICH + sal (n=9): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra azul); ICH + Ril 10 µg (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 µg/Kg (barra roxa). Dados expressos como médias $\pm$ EPM. *Two-way* ANOVA $P < 0,05$ para tempo e tratamento com descrito no gráfico. *One-way* ANOVA $P < 0,05$ para todos os casos (ver Tabela x). Análise pareada Fisher's LSD test: * $P < 0,05$ para Naïve vs ICSal + sal nos tempos 1, 3, 4, 8, 17 e 22; # $P < 0,05$ para Naïve vs ICH + sal nos tempos 3, 8, 17 e 22 h; e @ $P < 0,05$ para Naïve vs ICH + Ril 10µg no tempo 21h. Barras horizontais branca e preta juntamente com retângulo branco e cinza correspondem à fase clara e escura, respectivamente. Fonte: Elaborado pela autora

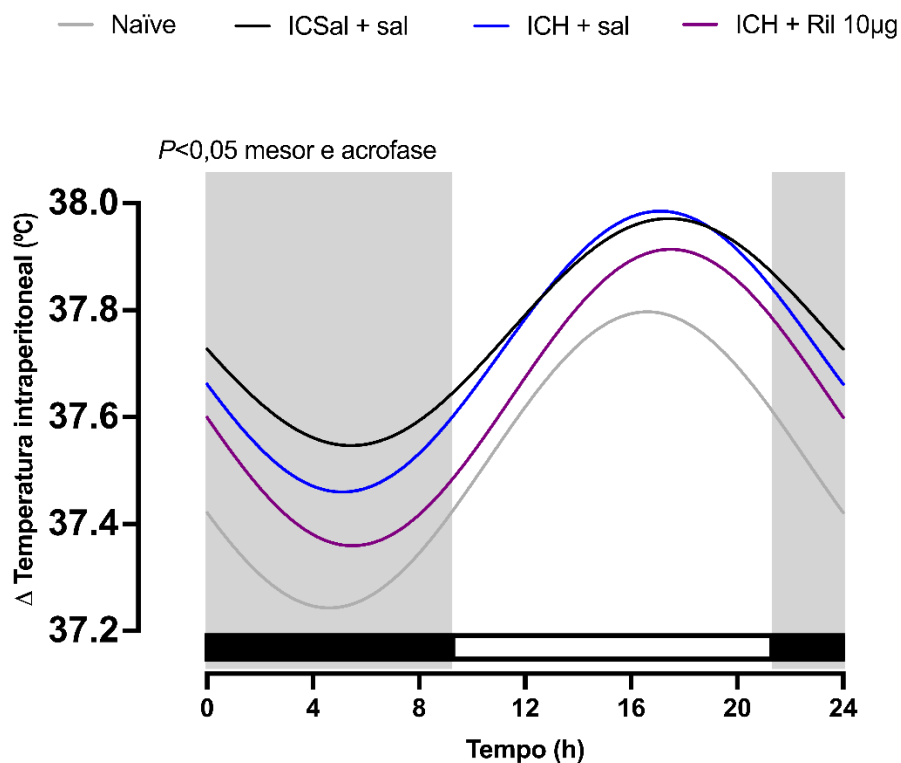
B

Figura 17B – Variação circadiana da temperatura intraperitoneal pós-AVEh experimental ou procedimentos cirúrgicos. Naïve (n=6): apenas injeção i.p. de solução fisiológica (barra cinza); ICSal + sal (n=7): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, barra preta); ICH + sal (n=9): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra azul); ICH + Ril 10 µg (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 µg/Kg (barra roxa). Os dados foram ajustados à curva cosseno com período de 24 h, obtendo-se os parâmetros ritmométricos: mesor, amplitude e acrofase ($P < 0,0001$ para todos os grupos). Todas as comparações entre os parâmetros ritmométricos estão detalhadas na Tabela 2. Barras horizontais branca e preta juntamente com retângulo branco e cinza correspondem à fase clara e escura, respectivamente. Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 2 – Análise do ajuste dos dados sobre a curva cosseno com periodicidade de 24h

Grupos	P-Valor One-way ANOVA	Mesor	Amplitude	Acrofase	P-Valor (ajuste curva cosseno)
Naïve	$P<0,0001$	$37,52\pm0,0218$	$0,276\pm0,03127$	$16,6\pm0,1097$	$P<0,0001$
ICSaI+Sal	$P<0,0340$	$37,75\pm0,0141^a$	$0,212\pm0,02043$	$17,42\pm0,0927^a$	$P<0,0001$
ICH+Sal	$P<0,0001$	$37,72\pm0,0183^a$	$0,262\pm0,02633$	$17,10\pm0,0968^a$	$P<0,0001$
ICH+Ril 10µg	$P<0,0001$	$37,63\pm0,0148^{a,b}$	$0,277\pm0,02143$	$17,48\pm0,074^{a,b}$	$P<0,0001$

Análise ritmométrica (mesor, amplitude e acrofase) está apresentadas como medias $\pm$ EPM, One-way ANOVA, ou teste-t de Student, múltiplo, bicaudado e não pareado ^a $P<0,05$ vs Naïve, ^b $P<0,05$ vs ICSaI+sal, ICH+sal. Fonte: Elaborado pela autora

2.6.4 Parâmetros Morfométricos e Sobrevivência

2.6.4.1 Parâmetros Morfométricos

A análise da variação do peso corporal entre os períodos pré-cirúrgico e pré-eutanásia não revelou diferenças significativas entre os grupos (ICSaI + sal: Δ Peso corporal diminuiu $\approx 7\%$; ICH +sal: Δ Peso corporal diminuiu $\approx 5\%$; ICH + Ril 10µg: Δ Peso corporal diminuiu $\approx 4\%$; $P<0.05$) como podemos observar na Figura 18A-B. O peso do coração, normalizado pelo peso corporal, também não apresentou diferença significativa (ICSaI + sal: $3\pm0.3\text{mg/g}$; ICH +sal: $3\pm0.4\text{mg/g}$; ICH + Ril 10µg: $3\pm0.2\text{mg/g}$; $P<0.05$), assim como os pesos dos rins direito (ICSaI + sal: $3\pm0.3\text{mg/g}$; ICH +sal: $3\pm0.3\text{mg/g}$; ICH + Ril 10µg: $3\pm0.2\text{mg/g}$; $P<0.05$) e esquerdo (ICSaI + sal: $3\pm0.3\text{mg/g}$; ICH +sal: $3\pm0.3\text{mg/g}$; ICH + Ril 10µg: $3\pm0.1\text{mg/g}$; $P<0.05$). Esses resultados indicam que o AVEh não promoveu alterações nos parâmetros morfométricos dos ratos (Figura 18C-E).

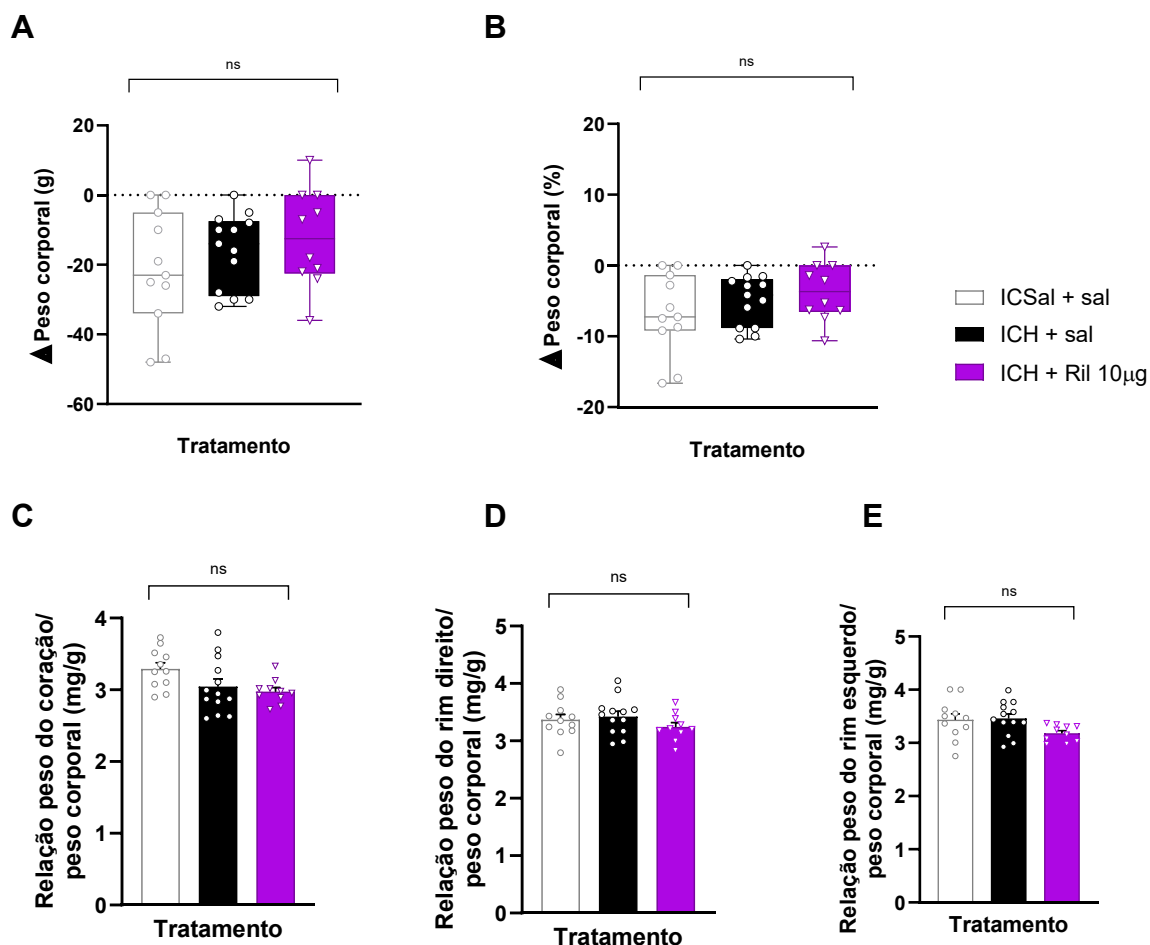


Figura 18 – Variação do peso corporal e relação entre o peso do coração; rim direito e rim esquerdo em animais submetidos ao AVEh experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC. (A-B) Variação absoluta e percentual do peso corporal entre os períodos pré-cirúrgico e pré-eutanásia. **(C)** Relação entre o peso do coração e o peso corporal. **(D)** Relação entre o peso do rim direito e o peso corporal. **(E)** Relação entre o peso do rim esquerdo e peso corporal. ICSal + sal (n=11): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, barra branca); ICH + sal (n=13): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril 10 µg (n=10): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 µg/Kg (barra roxa). Os símbolos representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos após teste *one-way* ANOVA com $p < 0,05$ e pós-teste de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora

2.6.4.2 Sobrevivência

A análise das curvas de sobrevivência entre os grupos experimentais não apresentou diferença significativa (ICSal + sal: $\approx 80\%$; ICH + sal: $\approx 75\%$; ICH + Ril $\approx 89\%$; $p = 0.733$) no tempo de sobrevivência após a indução do AVEh após avaliação pelo

teste estatístico de Mantel-Cox (Figura 19), indicando que o AVEh não parece causar prejuízos significativos a ponto de aumentar a mortalidade dos animais.

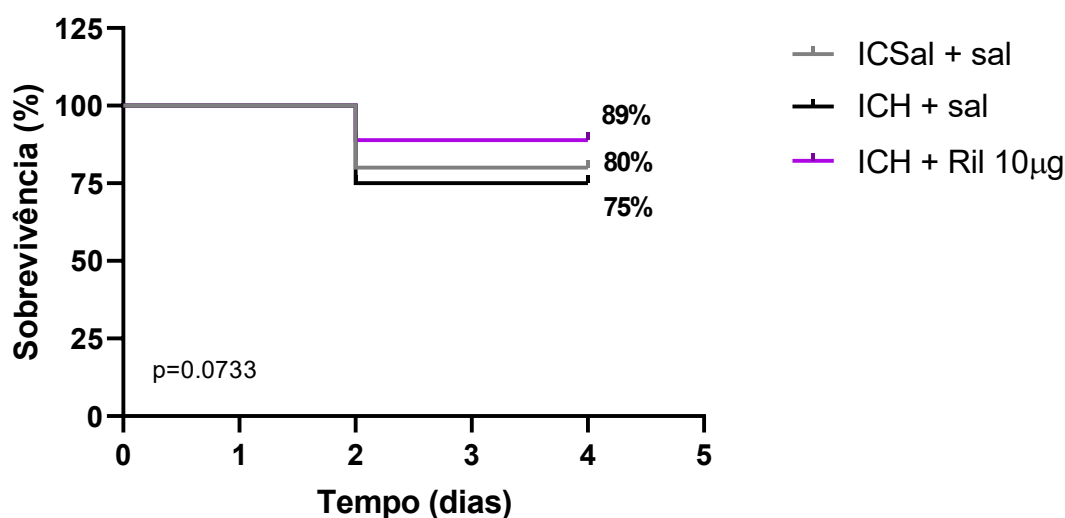


Figura 19 – Representação gráfica das curvas de sobrevivência de ratos *Wistar* com AVEh experimental que receberam veículo ou rilmenidina 10 µg/Kg e submetidos aos experimentos cardiovasculares. Grupo ICSal + Sal: n=7 e mortalidade n=2; Grupo ICH + Sal: n=9 e mortalidade n=3; grupo ICH + Ril 10 µg/Kg: n=8 e mortalidade n=1. Não houve diferença significativa ($p = 0.733$) entre os grupos após o teste Mantel-Cox. Fonte: Elaborado pela autora

2.6.5 Vias Moleculares e Neuroquímicas Envolvidas no AVEh

2.6.5.1 Análise Proteômica

A análise proteômica quantitativa das amostras do córtex insular e RVLM resultou na identificação e quantificação de 6.238 proteínas no total (Figura 20A).

Para a identificação de proteínas diferencialmente expressas (PDEs), foram estabelecidos critérios rigorosos de significância estatística: $p < 0,05$ (ANOVA *one-way*) e um valor de quantificação em $\text{Log}_2 > 0.378$ para proteínas reguladas positivamente e $p < 0.05$ e valor de quantificação em $\text{Log}_2 < -0.378$ para proteínas reguladas negativamente. Este critério corresponde a uma alteração de abundância de pelo menos 1,3 vezes entre os grupos, garantindo que apenas as alterações moleculares robustas fossem consideradas.

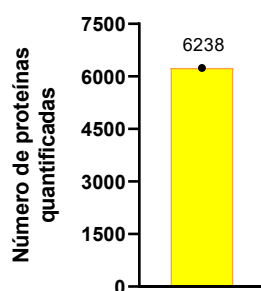
No Córtex Insular, o AVEh (ICH+sal vs. ICSal+sal) resultou na regulação de 100 proteínas (70 positivamente e 30 negativamente). O tratamento com Rilmenidina (ICH+Ril 10µg/Kg vs. ICH+sal) demonstrou um perfil de modulação mais intenso, alterando a expressão de 187 proteínas (63 positivamente e 124 negativamente). Por outro lado, no RVLM, o impacto do AVEh (ICH+sal vs. ICSal+sal) parece ter sido acentuado, com 277 proteínas diferencialmente expressas (67 positivamente e 210 negativamente), e o tratamento induziu a regulação de 280 proteínas, com uma forte predominância de proteínas negativamente reguladas (248 PDEs), conforme detalhado na Tabela 3 e ilustrado na Figura 20B.

Tabela 3 – Resumo da Quantificação de Proteínas Diferencialmente Expressas (PDEs) no IC e RVLM após AVEh e Tratamento com Rilmenidina

Comparações	Região	Proteínas	Proteínas	PDEs
		Reguladas Positivamente	Reguladas Negativamente	
ICH+sal vs. ICSal+sal	IC	70	30	100
ICH+Ril 10µg/Kg vs. ICH+sal	IC	63	124	187
ICH+Ril 10µg/Kg vs. ICSal+sal	IC	34	36	70
ICH+sal vs. ICSal+sal	RVLM	67	210	277
ICH+Ril 10µg/Kg vs. ICH+sal	RVLM	32	248	280
ICH+Ril 10µg/Kg vs. ICSal+sal	RVLM	119	183	302

A tabela apresenta o número total de PDEs identificadas nas amostras de IC e do RVLM em diferentes comparações experimentais. A análise proteômica quantitativa foi realizada por espectrometria de massa de alta performance (tims TOF-Pro). As proteínas foram consideradas diferencialmente expressas quando atendiam aos seguintes critérios rigorosos: significância estatística de $p < 0,05$ (ANOVA *one-way*) e magnitude de alteração de Log_2 Fold Change (Log_2FC) $\pm 0,378$. Proteínas reguladas positivamente (Up) são aquelas com $\text{Log}_2\text{FC} \geq 0,378$ (aumento de abundância de pelo menos 1,3 vezes), e proteínas reguladas negativamente (Down) são aquelas com $\text{Log}_2\text{FC} \leq -0,378$ (redução de abundância de pelo menos 1,3 vezes). Abreviações: ICSal+sal: Grupo controle (injeção salina no IC e tratamento com solução fisiológica); ICH+sal: Grupo AVEh não tratado (injeção de sangue autólogo no IC e tratamento com solução fisiológica); ICH+Ril 10µg/Kg: Grupo AVEh tratado com Rilmenidina na dose de 10 µg/kg. Fonte: Elaborado pela autora

A



B

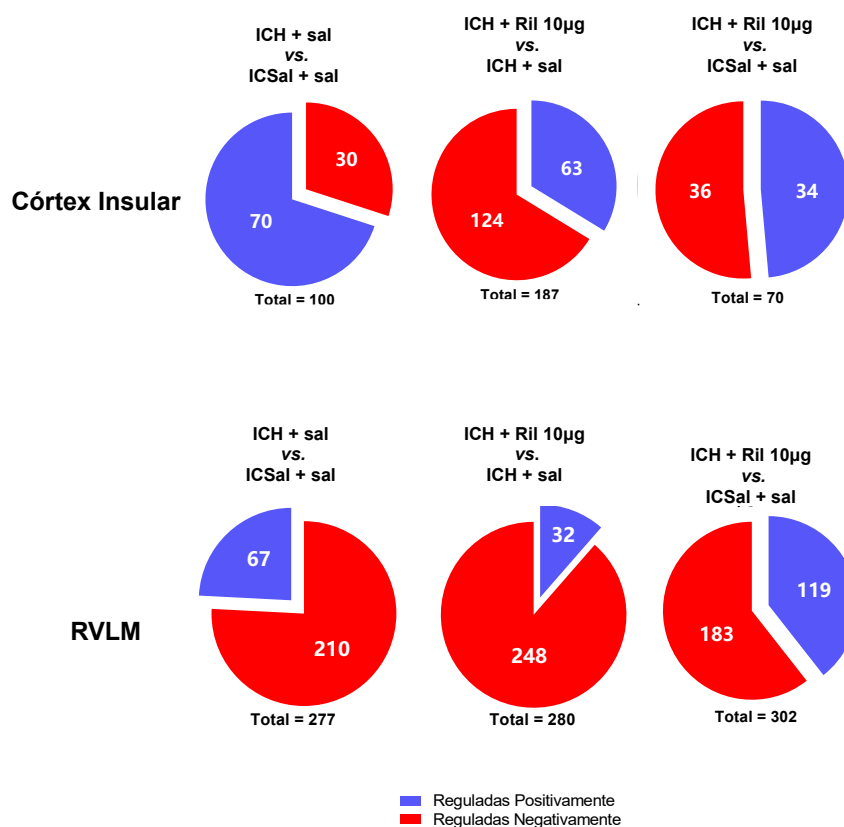


Figura 20 – Quantificação de proteínas a partir do proteoma do córtex insular e RVLM de ratos *Wistar* submetidos ao AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica. (A) Número total de proteínas quantificadas em ambos os proteomas. (B) Proporção de proteínas reguladas positivamente (porção azul) ou negativamente (porção vermelha) no córtex insular e RVLM, entre as diferentes condições experimentais. Fonte: Elaborado pela autora

Para investigar os processos biológicos associados às proteínas do córtex insular cujas alterações foram revertidas pelo tratamento com rilmenidina, realizou-se o enriquecimento de Ontologia Gênica dessas proteínas. Os resultados demonstraram que o AVEh experimental induziu mudanças em proteínas envolvidas em diversos

processos biológicos, como a biossíntese de GABA, proteínas relacionadas a vias de sinalização e sinapse, e que o tratamento com rilmenidina foi capaz de reverter esses efeitos como podemos visualizar na Figura 21A. A análise dos componentes celulares do proteoma do córtex insular revelou que o AVEh induziu principalmente mudanças em componentes relacionados à sinapse, como sinapse glutamatérgica, sinapses inibitórias, sinapse GABAérgica e proteínas relacionadas à estrutura do neurônio. Essas alterações também foram revertidas pelo tratamento com rilmenidina, como destaca a Figura 21B.

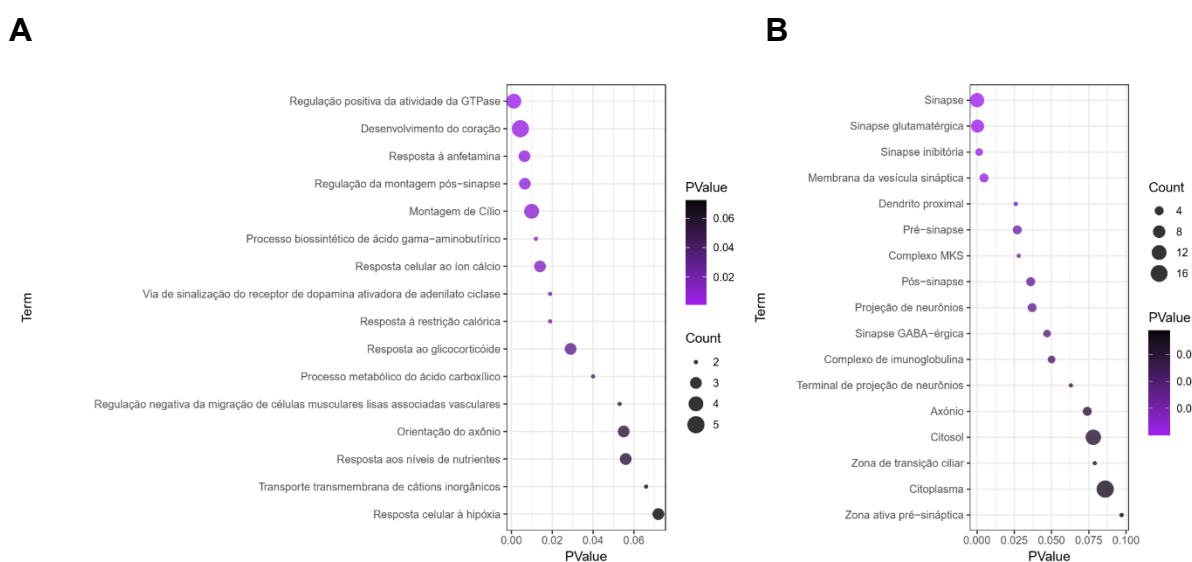


Figura 21 – Ontologia Gênica: córtex insular. (A) Processos biológicos do proteoma do córtex insular. **(B)** Componente celular do proteoma do córtex insular. Os gráficos foram criados utilizando os componentes celulares com menor p valor e o número de proteínas alteradas. Cada componente celular é representado por um ponto no gráfico que apresenta diferentes tamanhos. O tamanho dos pontos corresponde respectivamente à 2, 3, 4, 5 ou 6 proteínas. As cores indicam a relevância estatística, ou seja, quanto mais próximas estiverem do preto indicam $p \geq 0.06$ e quando as cores estiverem mais próximas do roxo indicam $p \leq 0.025$. Fonte: Elaborado pela autora

Para investigar os processos biológicos associados às proteínas do RVLM cujas alterações foram revertidas pelo tratamento com rilmenidina, do mesmo modo, realizou-se o enriquecimento de Ontologia Gênica dessas proteínas. A análise dos dados revelou que AVEh experimental induziu mudanças em proteínas envolvidas em processos biológicos associados principalmente à transcrição de RNAs e tradução de proteínas, e que o tratamento com rilmenidina reverteu esses efeitos como

apresentado na Figura 22A. A análise dos componentes celulares do proteoma do RVLM revelou que o AVEh induziu principalmente mudanças em componentes relacionados à sinapse e tradução de proteínas. Essas alterações também foram revertidas pelo tratamento com rilmenidina, como destaca a Figura 22B.

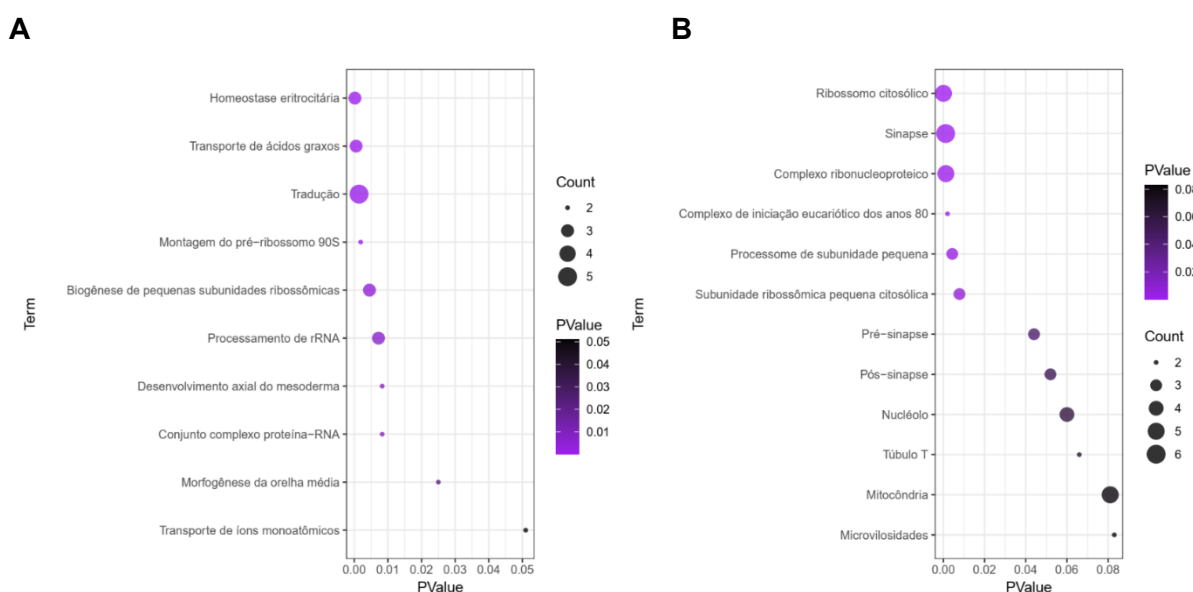
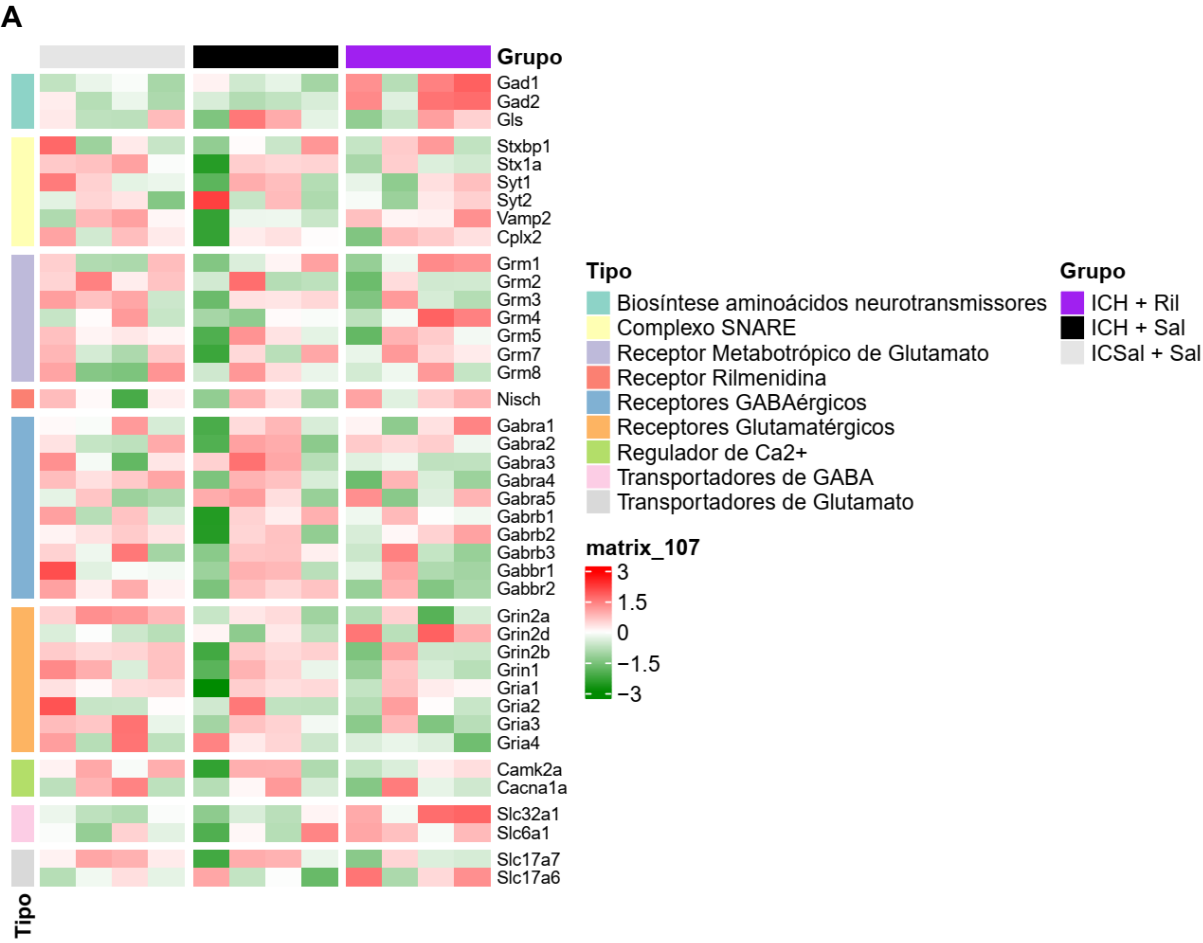


Figura 22 – Ontologia Gênica: RVLM. (A) Processos biológicos do proteoma do RVLM. **(B)** Componente celular do proteoma do RVLM. Os gráficos foram criados utilizando os componentes celulares com menor p valor e o número de proteínas alteradas. Cada componente celular é representado por um ponto no gráfico que apresenta diferentes tamanhos. O tamanho dos pontos corresponde respectivamente à 2, 3, 4, 5 ou 6 proteínas. As cores indicam a relevância estatística, ou seja, quanto mais próximas estiverem do preto indicam $p \geq 0.05$ e quando as cores estiverem mais próximas do roxo indicam $p \leq 0.01$. Fonte: Elaborado pela autora

Considerando as alterações funcionais e as análises anteriores do proteoma, e com o objetivo de elucidar os mecanismos neuroquímicos ainda pouco compreendidos da disfunção cardiovascular pós-AVEh, bem como o efeito terapêutico da rilmenidina, foi realizada uma investigação direcionada aos proteomas do IC e RVLM, para identificar e avaliar os principais genes correspondentes às proteínas envolvidas nas neurotransmissões glutamatérgica e GABAérgica detectadas na análise proteômica. Os gráficos de calor apresentados a seguir ilustram os genes identificados e a abundância relativa das proteínas associadas em cada grupo experimental, conforme detalhado na Figura 23A-B.



B

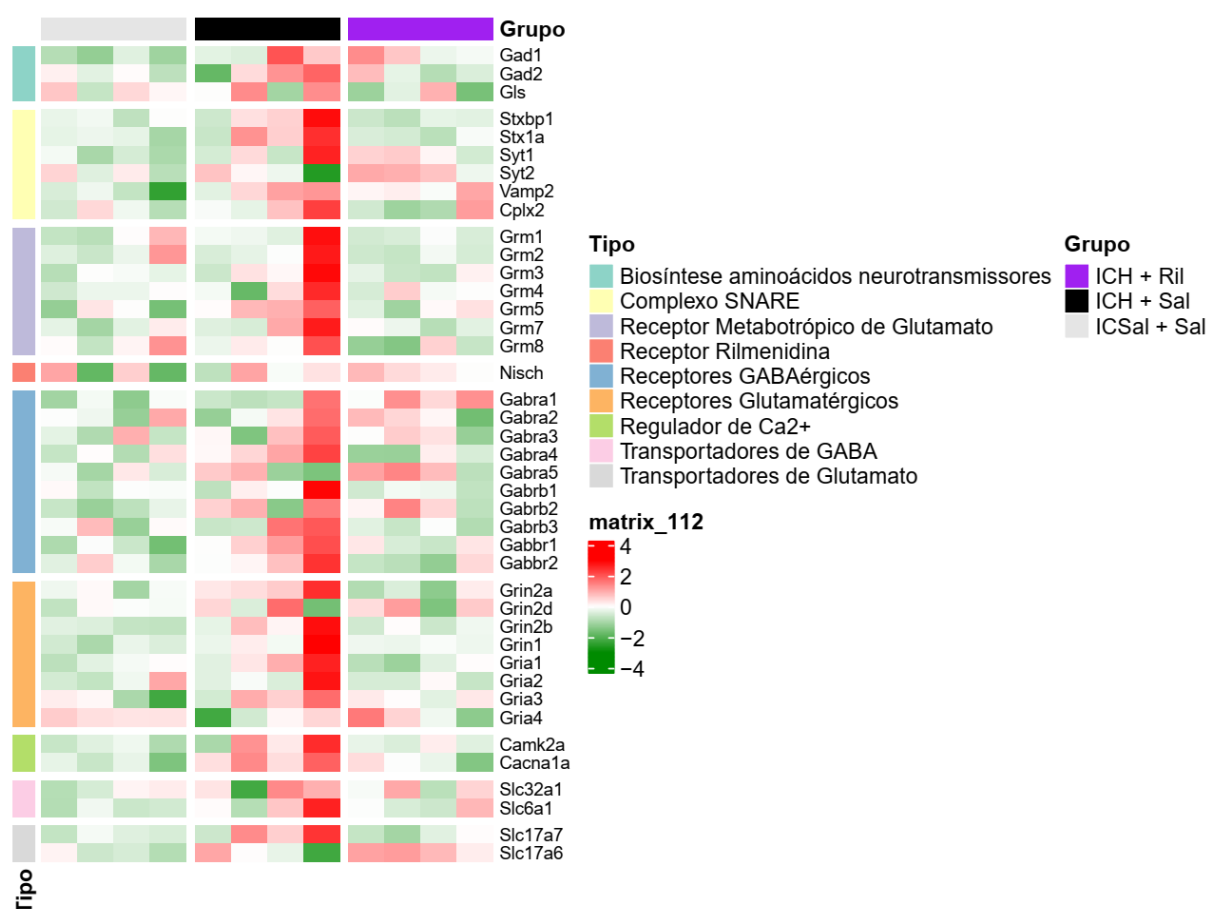


Figura 23 – Gráfico de calor das principais proteínas envolvidas na neurotransmissão gabaérgica e glutamatérgica. (A) Córtex insular. (B) Bulbo Ventrolateral Rostral (RVLM). As colunas maiores representam os grupos experimentais ICSal+sal (cinza), ICH+sal (preto) e ICH+Ril 10µg (roxo), respectivamente. Enquanto as colunas menores representam cada replicata do grupo. Os blocos ao lado esquerdo nomeados: Biossíntese de aminoácidos neurotransmissores (ciano), complexo SNARE (amarelo), Receptor metabotrópico de glutamato (lilás), Receptor de rilmenidina (vermelho), Receptores GABAérgicos (azul), Receptores glutamatérgicos (laranja), Regulador de cálcio (verde), Transportadores de GABA (rosa), Transportadores de Glutamato (cinza), respectivamente, representam o tipo de envolvimento no processo de neurotransmissão. As linhas representam os principais genes das proteínas encontradas no proteoma do IC que estão envolvidos na neurotransmissão gabaérgica e glutamatérgica. Adicionalmente, foi inserido uma linha para a identificar a presença do gene que codifica a proteína associada ao receptor de rilmenidina (I_1) no proteoma. Neste gráfico de calor, a cor vermelha representa maior abundância da proteína e a cor verde representa menor abundância da proteína. Fonte: Elaborado pela autora

A identificação das proteínas diferencialmente expressas (PDEs) dentro destas vias é fundamental para validar e compreender o mecanismo subjacente ao desequilíbrio excitatório/inibitório induzido pelo AVE e sua reversão pela rilmenidina. Diante disso, foi avaliado quais dessas proteínas estavam positivamente ou

negativamente reguladas em ambos os proteomas, uma vez que o perfil entre os grupos experimentais apresentou diferenças importantes após o AVEh e o tratamento com rilmenidina.

No CI, o AVEh induziu a regulação positiva das proteínas associadas aos genes GAD1 e GAD2, que codificam as duas principais isoformas da enzima glutamato descarboxilase, responsável pela biossíntese do neurotransmissor GABA. Adicionalmente, o gene *Slc32a1*, que codifica a proteína vGAT (transportador de GABA para as vesículas sinápticas), também apresentou regulação positiva no CI. O tratamento com rilmenidina (10 µg/kg) reverteu essas alterações induzidas pelo AVEh. Além disso, o tratamento regulou positivamente as proteínas associadas aos genes GRIN2A (subunidade 2A do receptor NMDA) e GRIA3 (subunidade 3 do receptor AMPA), ambos receptores de glutamato. Curiosamente, a modulação do perfil de proteínas promovida pelo tratamento resultou em um perfil molecular semelhante ao do controle, sem diferenças estatisticamente significativas entre estes grupos. O gene *NISCH* não apresentou regulação diferencial entre os grupos experimentais (Figura 24).

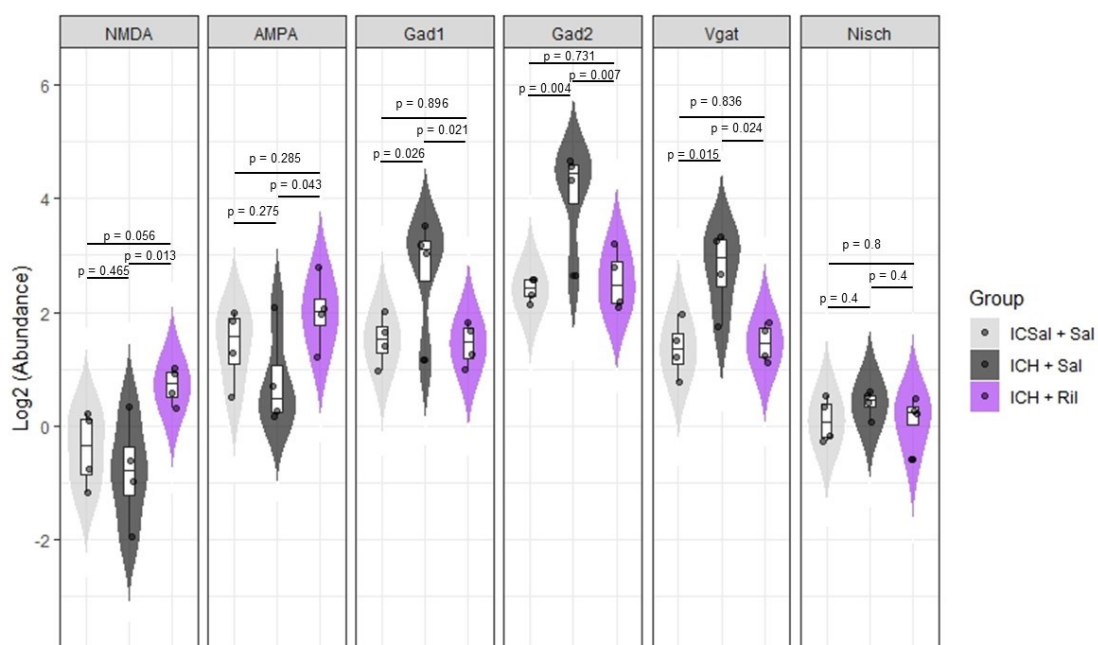


Figura 24 – Proteínas reguladas que participam das vias de neurotransmissão glutamatérgica e/ou gabaérgica no IC. ICSal+sal (cinza), ICH+sal (preto) e ICH+Ril 10µg. Fonte: Elaborado pela autora

No RVLM, o AVEh provocou a regulação negativa de proteínas associadas aos genes GRIN1, GRIN2A e GRIN2B, que codificam as subunidades 1, 2A e 2B do receptor NMDA, respectivamente. Foi também identificada a regulação negativa de proteínas associadas aos genes GRIA1, GRIA2 e GRIA3, que codificam as subunidades 1, 2 e 3 do receptor AMPA, respectivamente. Adicionalmente, observou-se a regulação negativa de proteínas associadas ao gene Slc17a7 (que codifica o transportador vesicular de glutamato 1, vGLUT1) e aos genes GABRA4 (subunidade $\alpha 4$ do receptor GABAA) e GABBR1 (subunidade 1 do receptor GABAB). No grupo AVEh, apenas o gene GAD1, que codifica a enzima glutamato descarboxilase 1, não apresentou regulação negativa das proteínas associadas, permanecendo semelhante ao do grupo controle. Curiosamente, o perfil de proteínas encontrado no grupo tratado foi semelhante ao grupo AVEh, com exceção do gene GAD1 que apresentou modulação negativa em grupos com tratamento. O gene GABRA4, apresentou pequena modulação positiva em grupos tratados tornando-os semelhante ao controle, apesar de não diferir estatisticamente do grupo AVEh. O gene NISCH não apresentou regulação diferencial entre os grupos experimentais (Figura 25).

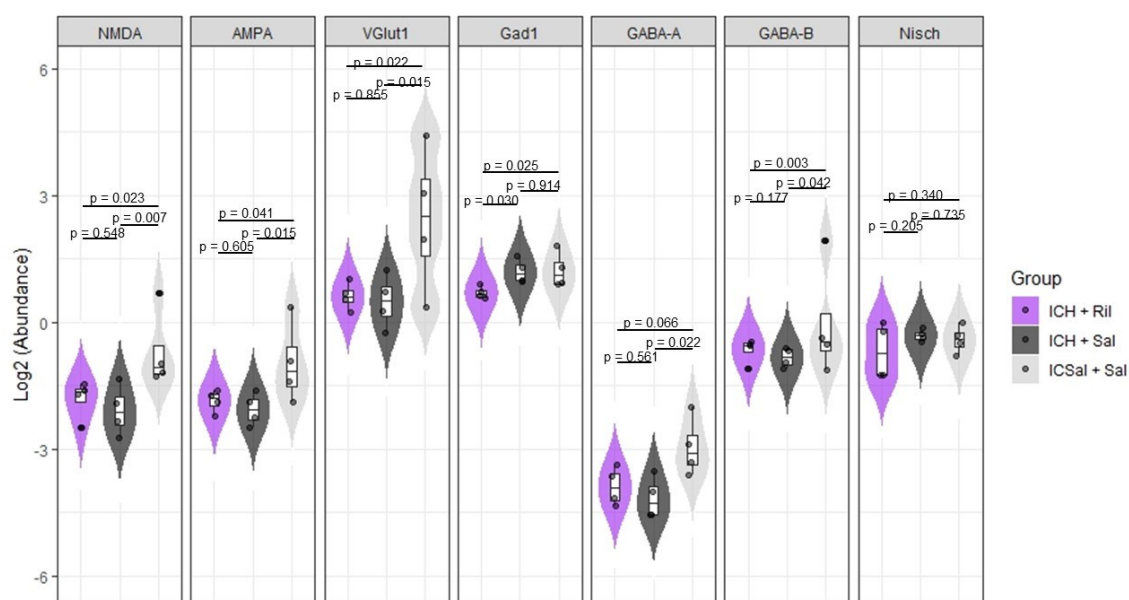


Figura 25 – Proteínas reguladas que participam das vias de neurotransmissão glutamatérgica e/ou gabaérgica no RVLM. ICSal+sal (cinza), ICH+sal (preto) e ICH+Ril 10 μ g. Fonte: Elaborado pela autora

2.6.5.2 Quantificação de Neurotransmissores Centrais

Após a identificação das proteínas diferencialmente expressas envolvidas nas vias de neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica no IC e no RVLM, a etapa subsequente consistiu na quantificação direta das concentrações dos neurotransmissores glutamato e GABA nessas mesmas áreas. Esta análise foi realizada com o objetivo de validar funcionalmente as alterações observadas no proteoma e estabelecer uma correlação entre a modulação da expressão proteica e a disponibilidade efetiva dos neurotransmissores no contexto do AVEh e do tratamento com rilmenidina.

A análise das concentrações de neurotransmissores no IC revelou uma redução significativa na concentração de glutamato no grupo com AVEh em comparação ao grupo controle (ICSal + sal: $396 \pm 272 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$; ICH + sal: $59 \pm 38 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$). Por outro lado, a concentração de GABA não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais (ICSal + sal: $3.5 \pm 3.5 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$; ICH + sal: $1.6 \pm 1.5 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$; ICH + Ril $10 \mu\text{g}$: $2.2 \pm 0.6 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$) (Figura 26A-B).

No RVLM, observou-se um padrão distinto: a concentração de GABA estava significativamente aumentada no grupo com AVEh em relação ao grupo controle (ICSal + sal: $0.004 \pm 0.009 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$; ICH + sal: $3 \pm 2.8 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$), enquanto a concentração de glutamato permaneceu inalterada entre os grupos (ICSal + sal: $167 \pm 125 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$; ICH + sal: $84 \pm 99 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$; ICH + Ril $10 \mu\text{g}$: $40 \pm 21 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$) (Figura 26C-D).

O tratamento com rilmenidina ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$) demonstrou um efeito modulador em ambas as regiões. No CI, a rilmenidina restaurou a concentração de glutamato para valores semelhantes aos do grupo controle (ICH + Ril $10 \mu\text{g}$: $153 \pm 68 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$) e no RVLM, também reverteu o aumento induzido pelo AVEh na concentração de GABA (ICH + Ril $10 \mu\text{g}$: $0.5 \pm 0.6 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$).

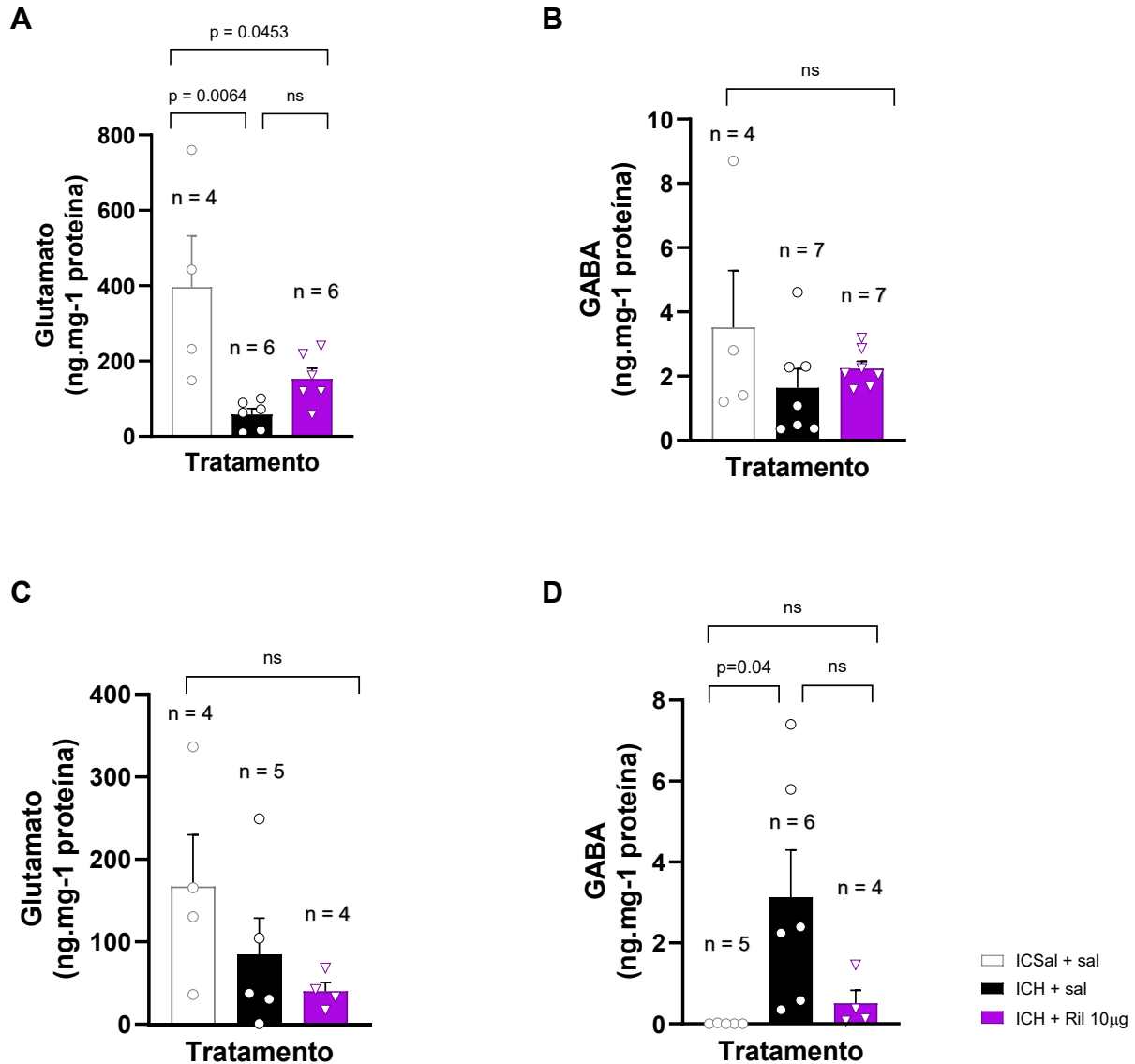


Figura 26 – Concentração de neurotransmissores em amostras do IC e RVLM em animais submetidos ao AVEh experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC. (A-B) Concentração de glutamato e GABA no IC. (C-D) Concentração de glutamato e GABA na RVLM. ICSal + sal: microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, barra branca); ICH + sal: microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril 10 µg: microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 µg/Kg (barra roxa). Os símbolos representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos após teste *one-way* ANOVA com $p < 0,05$ e pós-teste de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora

2.6.5.3 Catecolaminas Cardíacas

Prosseguindo com a investigação dos mecanismos neuroquímicos centrais, e para validar a hiperativação simpática periférica induzida pelo AVEh, foi realizada a quantificação da concentração de catecolaminas no tecido cardíaco dos animais. Esta análise foi fundamental para confirmar se o desequilíbrio autonômico central, evidenciado pelas alterações proteômicas e nas concentrações de neurotransmissores no IC e RVLM, resultou no aumento da atividade simpática e da liberação de catecolaminas na periferia, o que está diretamente associado à disfunção cardiovascular pós-AVE.

A concentração de norepinefrina aumentou significativamente no tecido cardíaco dos animais com AVEh (ICSal + sal: $17 \pm 9 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$; ICH + sal: $37 \pm 4 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$; ICH + Ril $10 \mu\text{g}$: $7 \pm 7 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$), refletindo a hiperatividade simpática. O tratamento com rilmenidina ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$) reverteu esse aumento, restabelecendo os níveis de norepinefrina a valores semelhantes aos do grupo controle (Figura 27A). As concentrações de epinefrina no tecido cardíaco não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais (ICSal + sal: $146 \pm 72 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$; ICH + sal: $115 \pm 70 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$; ICH + Ril $10 \mu\text{g}$: $43 \pm 68 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$) (Figura 27B).

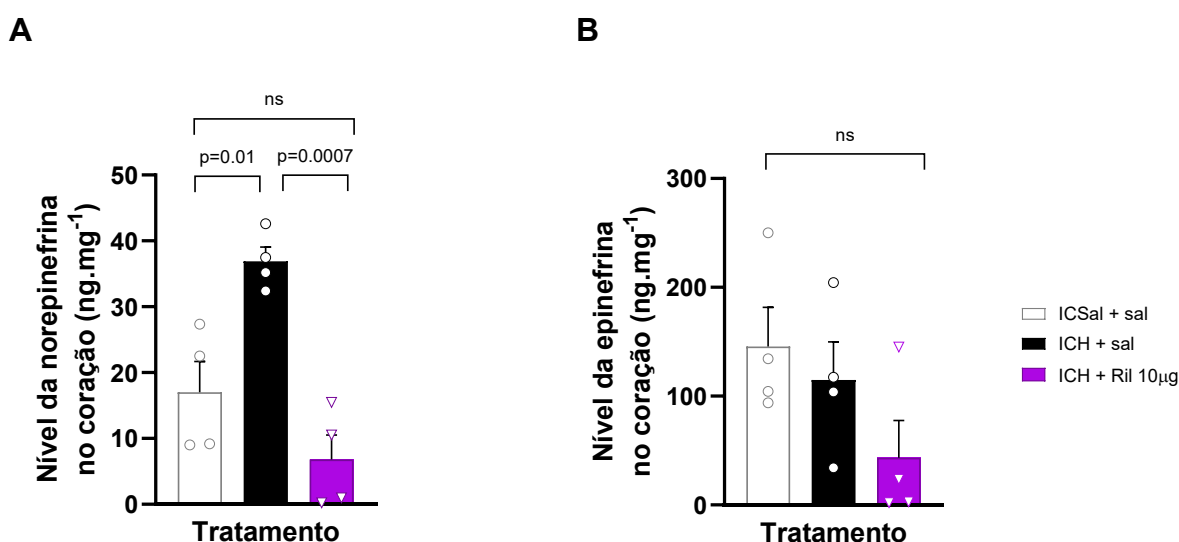


Figura 27 – Concentração de catecolaminas no tecido cardíaco de ratos *Wistar* submetidos ao AVEh experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC. (A) Concentração de norepinefrina no miocárdio. **(B)** Concentração de epinefrina no miocárdio. ICSal + sal (n=4): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, barra branca); ICH + sal (n=4): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril $10 \mu\text{g}$ (n=4):

microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 µg/Kg (barra roxa). Os símbolos representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos após teste *one-way* ANOVA com $p < 0,05$ e pós-teste de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora

2.6.6 Análise da expressão de receptores β -adrenérgicos no tecido cardíaco por meio de *Western blot*

Para investigar as consequências da hiperativação simpática periférica, evidenciada pelo aumento da norepinefrina no tecido cardíaco, e das alterações nas neurotransmissões centrais, procedeu-se à análise da expressão proteica dos receptores β -adrenérgicos no tecido cardíaco por western blot. Esta análise visou determinar se o aumento das catecolaminas induzido pelo AVEh resultaria em um processo de regulação negativa ou dessensibilização dos receptores β_1 e β_2 , que são importantes na mediação dos efeitos simpáticos no coração.

A análise demonstrou que a abundância dos receptores β_1 no tecido cardíaco não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais (ICSal + sal: 0.0718 ± 0.03 u.a; ICH + sal: 0.1044 ± 0.09 u.a; ICH + Ril 10µg: 0.1033 ± 0.009 u.a) (Figura 28A). De forma similar, a abundância de receptores β_2 no tecido cardíaco também não foi diferente nas condições avaliadas (ICSal + sal: 0.05 ± 0.004 u.a; ICH + sal: 0.02 ± 0.02 u.a; ICH + Ril 10µg: 0.02 ± 0.03 u.a) (Figura 28B). Esses dados apontam que, possivelmente, os receptores β não sofrem modulação importante após o AVEh ou após o tratamento com rilmenidina.

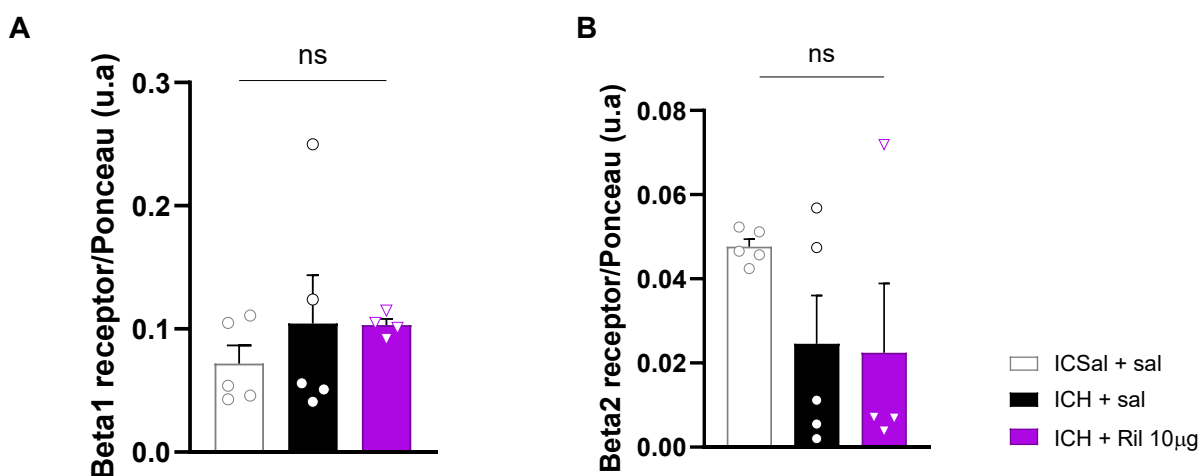


Figura 28 – Efeitos na expressão receptores β -adrenérgicos no tecido cardíaco. (A) Expressão de receptores β_1 -adrenérgicos; **(B)** Expressão de receptores β_2 -adrenérgicos.

ICSal + sal (n=5): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, barra branca); ICH + sal (n=5): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril 10 µg (n=4): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 µg/Kg (barra roxa). Os símbolos representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos após teste *one-way* ANOVA com $p < 0,05$ e pós-teste de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora

2.7 Discussão

O presente estudo investigou, pela primeira vez, os efeitos da rilmenidina em ratos submetidos ao AVEh no córtex insular (IC), avaliando de forma integrada suas repercussões funcionais, moleculares e terapêuticas nesse modelo. Funcionalmente, o AVEh no IC induziu taquicardia e aumento pressórico sustentados, as quais foram revertidas pela rilmenidina, que restaurou esses parâmetros a valores similares aos do grupo controle. Entretanto, não foram observadas alterações significativas nos parâmetros morfométricos, neurocomportamentais ou na sobrevivência dos animais. A ritmicidade circadiana da temperatura corporal dos animais foi identificada em todos os grupos. O AVEh no IC alterou o mesor e a acrofase em animais não tratados. No grupo tratado com rilmenidina a temperatura basal foi normalizada, mas a acrofase foi piorada. Em nível molecular, no IC, o AVEh promoveu a regulação positiva dos genes GAD1, GAD2 e Slc32a1, efeito revertido pelo tratamento com rilmenidina. Já no RVLM, o AVEh resultou na regulação negativa da expressão de NMDA, AMPA, vGLUT, GABA-A e GABA-B, com exceção do GAD1, que manteve expressão semelhante à do controle. O perfil de proteínas no RVLM do grupo tratado assemelhou-se ao do grupo AVEh, exceto pela proteína GAD1, que sofreu modulação negativa. O gene GABRA4, que codifica receptores GABA-A, apresentou pequena regulação positiva no grupo tratado, assemelhando-se ao controle. Quanto aos neurotransmissores, no IC, o AVEh provocou a redução da concentração de glutamato, e o grupo tratado apresentou aumento desta concentração, apesar de não alcançar os valores do grupo controle. As concentrações de GABA no IC não apresentaram diferenças significativas. No RVLM, o AVEh aumentou as concentrações de GABA, enquanto o grupo tratado apresentou concentrações sem diferenças às do grupo controle. As concentrações de glutamato no RVLM não diferiram entre os grupos. Perifericamente, no coração, a concentração de norepinefrina foi significativamente maior no grupo AVEh em comparação ao controle. Já no grupo tratado, essas concentrações não foram diferentes do controle. As concentrações de epinefrina, assim como a expressão dos receptores β_1 e β_2 no tecido cardíaco, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

O aumento da PAM basal e a taquicardia sustentada dos animais não tratados confirmaram a disfunção cardiovascular pós-AVEh. Pela primeira vez é relatado o aumento da PAM basal no modelo. Em estudos anteriores, apenas a taquicardia e

aumento da hiperatividade simpática haviam sido observadas (Marins et al., 2020; Nagai; Dote; Kato, 2021). Este achado é importante, pois, esclarece uma questão relevante: Porque este modelo reproduz a taquicardia, mas não reproduz o aumento pressórico observado em humanos acometidos por AVEh no IC? (Nagai; Dote; Kato, 2021). Marins e colaboradores sugeriram que alguns dos motivos poderiam ser a área de abrangência da área de penumbra que poderia estar muito limitada ou ainda devido a mecanismos centrais compensatórios (Marins et al., 2021). Entretanto, a área de abrangência não parece ter sido diferente (Marins et al., 2016), mas a atuação de mecanismos centrais compensatórios pode ser debatida. O ambiente experimental e isolamento acústico é um fator importante para o bem-estar dos animais e para conseguir uma aferição fidedigna dos parâmetros cardiovasculares, este também deve ser um ponto a se pensar. Todavia, estes achados estabeleceram a reprodutibilidade do modelo reforçando a importância da área no controle autonômico central e corroborando com os estudos anteriores (Marins et al., 2016, 2020).

Evidências na literatura revelam informações importantes para compreender o papel fisiológico do IC no controle autonômico simpático cardiovascular e interpretar nossos achados. O IC desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase autonômica, e parece exercer uma influência tônica inibitória sobre parâmetros cardiovasculares e a atividade simpática renal (Butcher & Cechetto, 1995; Marins et al., 2020). Essa tonicidade inibitória parece ser de natureza intrínseca/dependente da integridade global da área, pois, o bloqueio sináptico local com cloreto de cobalto (Alves et al., 2010; Tomeo et al., 2022), o antagonismo de receptores glutamatérgicos (Goulart et al., 2022; Santos et al., 2025), noradrenérgicos (Alves et al., 2011, 2014) ou endocanabinoides (Belem et al., 2025) não alteraram os parâmetros cardiovasculares basais (PAM e FC) de ratos *Wistar* não anestesiados. Apesar disso, o IC parece modular tonicamente a sensibilidade do barorreflexo via receptores NMDA (Alves et al., 2009a; 2009b).

Um outro ponto é que o IC parece agir como um “freio inibitório” intrínseco apenas em condições fisiológicas normais, pois em modelos de hipertensão essencial, como o rato espontaneamente hipertenso (SHR), o IC não exerceu tal influência inibitória tônica (Butcher & Cechetto, 1995). Portanto, a hiperatividade simpática renal e as alterações cardiovasculares observadas após o AVEh no IC direito no estudo de Marins et al. (2020), bem como os achados do presente estudo, podem ser atribuídas

a uma possível “perda inibitória tônica pós-AVEh insular”, contribuindo para o desequilíbrio autonômico central.

O tratamento com anti-hipertensivo de ação central rilmenidina em ambas as doses utilizadas preveniram a taquicardia e resposta pressórica evocadas após o AVEh no IC, sendo que a maior dose produziu maior redução da FC, revelando que a modulação pela rilmenidina dos parâmetros cardiovasculares pós-AVEh foi dependente da concentração do fármaco, evidenciando uma importante relação dose-resposta. Logo, a rilmenidina pode ser considerada um fármaco de relevância em contextos de prevenção de AVEs secundários que ocorrem frequentemente após um episódio primário de AVE (Seiffge et al., 2024; Spence, 2010), além disso, a dose de 10 µg/kg equivale à dose clinicamente já utilizada.

Entretanto, este é um ponto importante e vale destrinchá-lo um pouco mais. A rilmenidina é um fármaco aprovado e comercializado em diversos países, disponível exclusivamente na apresentação de comprimidos de 1 mg, com posologia fixa de 1 mg/dia por indivíduo, podendo ser aumentada para 2 mg/dia em casos de resposta terapêutica insuficiente, essa posologia é confirmada em bulas oficiais de fármacos aprovados para comercialização por agências regulatórias em países como França (ANSM, 2026), Portugal (INFARMED, 2026), Reino Unido (BNF, 2026), República Tcheca (Tenaxum, 2026), Áustria (Iterium, 2026), entre outros. Em nenhuma dessas fontes há qualquer recomendação de ajuste posológico baseado no peso corporal (Servier, 2017; ANSM, 2026; BNF, 2026; INFARMED, 2026; Tenaxum, 2026; Iterium, 2026). Essa prática resulta em uma ampla variação interindividual da dose administrada por quilograma, que pode oscilar entre 8 µg/kg em pacientes com 120 kg e 20 µg/kg em pacientes com 50 kg. Assim, a dose de 10 µg/kg administrada em ratos no presente estudo corresponde exatamente à dose recebida por um paciente de 100 kg tratado com rilmenidina 1 mg/dia, o que confere validade translacional direta à escolha posológica adotada. Soma-se a isso o fato de que a aplicação de fatores alométricos convencionais torna-se problemática diante da ausência de uma dose de referência padronizada por peso na prática clínica. Uma vez que a própria dose em humanos não é individualizada por peso, a exigência de correção alométrica para o modelo animal perde parte de seu fundamento, sobretudo quando se busca reproduzir condições clinicamente relevantes para subpopulações específicas, como os pacientes com sobrepeso.

No Brasil, a rilmenidina foi aprovada para comercialização sob o nome Hyperium® em 2017, com a mesma posologia fixa de 1 mg/dia, sem qualquer ajuste por peso (Servier, 2017). O fármaco, no entanto, foi descontinuado em outubro de 2022 por motivos comerciais (Servier, 2022; Servier, 2023). A ausência de uma individualização posológica da rilmenidina com base no peso corporal constitui uma questão que merece ser reavaliada e pode representar uma oportunidade para seu aprimoramento terapêutico.

Ao avaliar a redução da reatividade cardiovascular ao estímulo estressor em animais com AVEh sem tratamento foi revelado que a capacidade da elevação da PAM e FC diante de contextos estressantes não se manteve preservada, enquanto os animais tratados com rilmenidina responderam ao mesmo estímulo de forma semelhante ao grupo controle, o que significa que a reatividade cardiovascular diante de contextos de estresse estava preservada nestes grupos.

Essa ausência da resposta esperada no grupo AVEh sem tratamento reflete um possível mecanismo de teto fisiológico: como esses animais já se encontravam em estado basal hipertenso e taquicárdico, sua capacidade de responder adequadamente a novos estímulos estava comprometida, caracterizando uma disautonomia do sistema cardiovascular frente aos desafios externos (Xu; Li, 2015). É importante lembrar que o IC é uma área muito importante para as respostas cardiovasculares em contextos de estresse (Alves et al., 2010, 2014) e a lesão pelo AVEh impede que esse mecanismo seja ativado adequadamente. Além disso, é possível que o AVEh também comprometa a modulação da sensibilidade barorreflexa (Alves et al., 2009a; 2009b), o que poderia reduzir a eficiência do retorno aos níveis basais após o término do estresse.

Portanto, não é surpreendente que: a diferença entre o último minuto de registro basal e o maior pico do período de estresse seja maior no grupo controle e o grupo com AVEh apresente a menor diferença. Apenas a maior dose de rilmenidina foi eficaz em restaurar o pico da reatividade cardiovascular, revelando que essa dose além de normalizar os parâmetros cardiovasculares basais, restaurou a flexibilidade e a capacidade de adaptação do sistema nervoso autônomo (SNA) frente ao estímulo estressante. A manutenção da reatividade ao estresse é um marcador de um SNA funcional e equilibrado (Cunha Silva; Fontes, 2019; Xu; Li, 2015), isso indica que o tratamento pode estar modulando os circuitos centrais responsáveis pelo tônus simpático e normalizando o desequilíbrio central.

O fato de que o AVEh no IC não produzir déficits neurocomportamentais evidentes, reforça a especificidade do modelo e a seletividade da lesão para indução de disfunção autonômica cardíaca, sem comprometer de maneira significativa funções motoras ou o comportamento de maneira importante ou de forma que mascarasse os efeitos cardíacos. Esses achados são coerentes com a literatura, que aponta o IC como uma região primariamente associada à interocepção, sensação visceral e controle autonômico (Nagai; Kato, 2025), diferentemente de outras regiões cerebrais críticas para o funcionamento e controle motor, como córtex pré-motor e gânglios da base (Falaschi; Stagg; Sel, 2025; Xu; Li, 2015).

A estabilidade dos parâmetros morfométricos é relevante, pois embora a disfunção cardíaca estivesse presente, evidenciada pela taquicardia e aumento pressórico, não parece ter progredido para uma hipertrofia ou caquexia intensa que comprometesse estes parâmetros de forma significativa durante o período de avaliação do estudo. A hipertrofia cardíaca patológica é tipicamente um processo crônico que se desenvolve ao longo de vários dias ou semanas em resposta à hipertensão sustentada (Oldfield; Duhamel; Dhalla, 2020). O período de observação do estudo não parece ter sido suficiente para desencadear um remodelamento cardíaco estrutural importante. Assim, este é mais um achado que reforça que o modelo parece reproduzir mecanismos predominantemente agudos de disfunção autonômica.

A avaliação da variação circadiana da temperatura corporal demonstrou que este era um fenômeno consistente, apresentando uma ritmicidade, e que foi preservado mesmo após intervenções experimentais (Cornelissen, 2014; Halberg, 1960). Todos os grupos apresentaram um ritmo significativo de 24 horas, com a acrofase ocorrendo durante a fase escura, período correspondente à maior atividade dos roedores (Cornelissen, 2014). Esse padrão encontrado é importante, pois, corrobora com princípios já estabelecidos pela literatura de que as funções fisiológicas se organizam no tempo de forma adaptativa e em sincronia com o ciclo ambiental claro–escuro (Halberg, 1960).

Entretanto, diferenças nos parâmetros rítmicos foram observadas entre os grupos controle (ICSal+sal e Naive). O grupo ICSal+sal apresentou aumento do mesor (temperatura média ajustada) e atraso da acrofase em relação ao grupo Naive, indicando que o próprio procedimento cirúrgico no córtex insular, mesmo sem indução do AVEh, é suficiente para alterar o perfil térmico circadiano. Considerando que a

ínsula atua como uma importante região integradora de informações autonômicas e interoceptivas, é possível alterações locais, como estresse tecidual ou inflamação decorrentes da cirurgia, possam influenciar as vias envolvidas na termorregulação e no ajuste temporal dos ritmos fisiológicos (Halberg, 1960).

A indução do AVEh no IC (grupo ICH + sal) ao levar a um aumento adicional do mesor e maior atraso da acrofase quando comparado ao *Naïve* sugere que esta lesão exerceu um efeito mais intenso sobre a regulação da temperatura corporal e seu ritmo circadiano. Sabe-se que o IC apresenta conexões com núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle térmico, como o núcleo pré-óptico medial e o hipotálamo paraventricular, além de integrar sinais provenientes do relógio central (núcleo supraquiasmático) (Gogolla, 2017). Portanto, o AVEh insular pode comprometer essas vias, resultando tanto no aumento da temperatura basal quanto alterações no momento do pico do ritmo térmico (Cornelissen, 2014; Halberg, 1960).

O tratamento com rilmenidina atenuou parcialmente essas alterações observadas no grupo AVEh, reduzindo significativamente o mesor em relação ao grupo ICH + sal, aproximando-o dos valores encontrados nos grupos controle (*Naïve*). Em contrapartida, houve um atraso adicional da acrofase. Esses achados sugerem que a rilmenidina exerce efeitos distintos sobre o nível basal da temperatura corporal e sobre o momento em que ocorre seu pico diário. A normalização do mesor é consistente com a ação da rilmenidina que atua na restauração do equilíbrio autonômico central após o AVEh, é possível que o tratamento esteja reduzindo a vasoconstrição periférica e a produção de calor metabólico, levando à diminuição da temperatura média corporal, esses efeitos são coerentes com seu mecanismo de ação no tratamento da hipertensão. O atraso adicional da acrofase indica que, além de atuar sobre a temperatura basal, a rilmenidina também interfere nos mecanismos que determinam o momento do pico do ritmo circadiano, levando a uma dessincronização circadiana da temperatura.

Receptores I_1 também estão presentes em áreas hipotalâmicas relacionadas à termorregulação, como o núcleo pré-óptico (Xu et al., 2025). É possível que a modulação dessas regiões pela rilmenidina possa estar resultando em um novo ajuste da fase rítmica. Ou ainda, esse efeito pode estar ocorrendo de forma indireta, pela prevenção da hiperatividade simpática cardiovascular e/ou processos inflamatórios que poderiam estar atuando sob o núcleo supraquiasmático (por exemplo) e, consequentemente, sob o ritmo de temperatura corporal. Em resumo, as alterações

observadas no mesor e na acrofase indicam uma reorganização do ritmo circadiano após o tratamento.

A semelhança da sobrevida observada entre os grupos experimentais é um achado importante, isso significa que o modelo não é agudamente letal e que o tratamento com rilmenidina não induziu efeitos deletérios que aumentassem a mortalidade. É possível sugerir que a lesão provocada tanto pelo AVEh quanto pela injeção salina no IC são subletais para a maioria dos animais, permitindo a observação dos efeitos funcionais e moleculares ao longo dos dias.

Os achados moleculares sustentam a hipótese de uma disfunção importante na neurotransmissão GABAérgica. A regulação positiva da enzima glutamato descarboxilase (GAD1 e GAD2) e do transportador vesicular de GABA (vGAT) no IC sugere uma desregulação ou uma tentativa de compensação desse sistema de neurotransmissão em resposta ao AVEh. O tratamento com rilmenidina reverteu este fenótipo molecular: a expressão de vGAT e GAD, elevada no grupo AVEh não tratado, foi reduzida a níveis semelhantes aos do grupo controle. A Rilmenidina reverteu estas alterações: o vGAT e o GAD, que estavam aumentados no grupo AVEh não tratado, diminuíram no grupo tratado, tornando-se semelhantes ao grupo controle.

Na RVLM, as alterações da GAD1 e GABA-A entre grupos tratados e não tratados pós-AVEh também são uma evidência de que a neurotransmissão gabaérgica parece ser um fator importante no desequilíbrio autonômico simpático causado pelo AVEh insular.

Considerando que inúmeros estudos já demonstraram que a maioria dos receptores imidazolínicos I_1 estão localizados na RVLM e que sua ativação provoca a liberação de GABA e a consequente inibição do tônus simpático (Zhang; Abdel-Rahman, 2008), nossos achados sugerem que a ativação dos receptores I_1 pela rilmenidina na RVLM vai além da simples modulação da via GABAérgica. O fármaco também parece modular os componentes da maquinaria dessa via (como GAD e vGAT), promovendo um feedback que atua na restauração do equilíbrio excitatório/inibitório e corrige o desequilíbrio no eixo IC-RVLM, em casos de injúrias como o AVEh. A seguir, é sugerido na Figura 29 o mecanismo que ilustra o desequilíbrio autonômico em neurônios do IC e da RVLM, envolvendo as neurotransmissões gabaérgica e glutamatérgica após o AVE hemorrágico, bem como o efeito do tratamento com rilmenidina, que resultou na normalização dos parâmetros cardiovasculares.

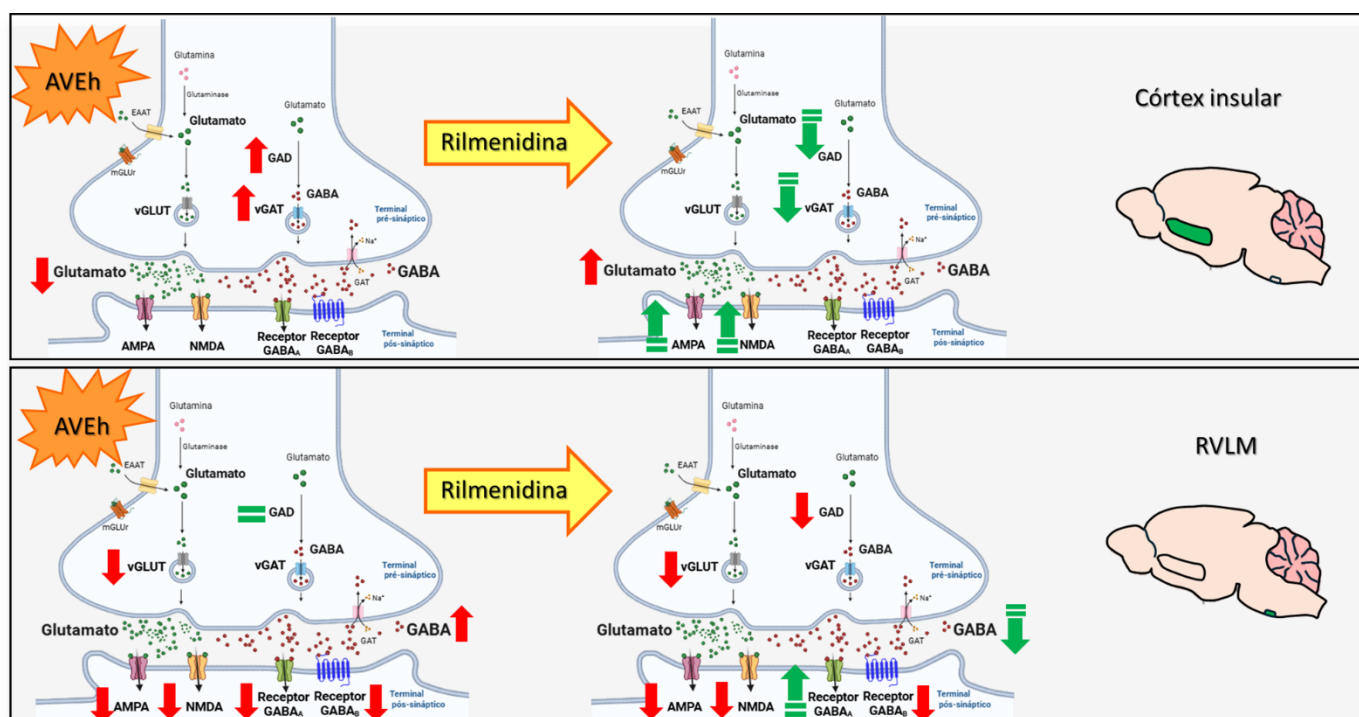


Figura 29 – Sugestão de mecanismo que ilustra o desequilíbrio autonômico em neurônios do IC e da RVLM, envolvendo as neurotransmissões gabaérgica e glutamatérgica após o AVEh hemorrágico, bem como o efeito do tratamento com rilmenidina na dose 10 µg/ Kg. Setas em vermelho indicam parâmetros diferentes do grupo controle; setas em verde com sinal de igualdade indicam parâmetros normalizados; sinais de igualdade em verde indicam ausência de diferença em relação ao grupo controle. Fonte: Elaborado pela autora

O aumento da norepinefrina no tecido cardíaco dos animais com AVEh reflete diretamente a hiperatividade simpática cardíaca induzida pelo desequilíbrio da via simpática do sistema nervoso autônomo. A norepinefrina é a principal catecolamina liberada e armazenada nas terminações nervosas simpáticas que inervam o miocárdio, sendo a sua concentração tecidual um indicador importante da atividade simpática local (Goldstein, 2025; Wong, 2006; Xu; Li, 2015). Esse aumento pode ser atribuído a uma maior frequência de disparos dos neurônios simpáticos pós-ganglionares, resultando em uma liberação aumentada do neurotransmissor nas terminações nervosas cardíacas (Schwartz et al., 2005; Wong, 2006; Xu; Li, 2015). A elevação crônica da norepinefrina cardíaca é um achado comum em condições de estresse cardiovascular de origem central, como o AVE, e está diretamente associada à cardiotoxicidade, lesão do miocárdio, inflamação e arritmias (Hachinski et al., 1986; Oppenheimer, 1992; Smith et al., 1986).

O fato de a concentração de epinefrina permanecer inalterada no tecido cardíaco é consistente com a resposta esperada para este modelo de AVEh, cujo o

efeito primário é evocar a hiperatividade simpática de origem central, direcionada ao coração, em detrimento de respostas secundárias como a resposta sistêmica ao estresse que estimula a liberação de epinefrina pelas glândulas adrenais (Goldstein, 2025; Wong, 2006; Xu; Li, 2015). A epinefrina é primariamente sintetizada e liberada pela medula adrenal, e sua presença no tecido cardíaco é principalmente resultado da captação a partir da circulação (Goldstein, 2025; Wong, 2006; Xu; Li, 2015). Portanto, o AVEh no IC não foi suficiente para desencadear o aumento significativo de epinefrina circulante e, conseqüentemente, a sua captação e concentração no tecido cardíaco. Um dos estudos pioneiros envolvendo AVE e IC realizados por Oppenheimer et al. (1992) também reproduziu respostas semelhantes via microestimulação elétrica insular, que elevou a concentração de norepinefrina plasmática sem alterar significativamente a de epinefrina.

A concentração de NE no miocárdio de animais tratados com rilmenidina semelhante ao controle demonstra que o tratamento foi eficaz em prevenir o aumento desta catecolamina. Este efeito está acontecendo provavelmente devido a ativação dos receptores I_1 -imidazolinicos que estão localizados abundantemente no RVLM, a ativação desses receptores leva à inibição da saída simpática para a periferia reduzindo a frequência de disparos dos neurônios pré-ganglionares e, conseqüentemente, diminuindo a liberação de NE nas terminações nervosas cardíacas (Bousquet; Feldman; Schwartz, 1984; Bousquet; Guertzenstein, 1973; Bousquet et al., 1981; Bricca et al., 1989, 1989; Chan; Burke; Head, 2007; Esler et al., 2004; Valet et al., 1988). A reversão completa dos níveis de NE no coração para valores de controle é mais uma evidência funcional importante de que a rilmenidina corrigiu o desequilíbrio autonômico na sua origem central.

Distinguir se a ação da rilmenidina foi de reversão ou prevenção dos efeitos desencadeados pós-AVEh é essencial para uma interpretação adequada dos resultados. Embora a administração da rilmenidina tenha prevenido o estabelecimento da hiperativação simpática periférica (evitando o aumento de NE), as análises moleculares do IC e RVLM demonstraram que o fármaco parece agir de maneira a reverter os efeitos do AVEh que se inicia imediatamente após o AVEh. Os efeitos do tratamento com rilmenidina não parece se pautar na prevenção do desequilíbrio autonômico simpático, pois, o tratamento além de prevenir a disfunção cardiovascular, modulou de maneira específica as expressões de GAD, vGAT e GABA-A à nível central. A Rilmenidina não apenas inibiu a saída simpática, mas também remodelou o

ambiente sináptico no eixo IC-RVLM, corrigindo o desequilíbrio molecular e neuroquímico induzido pelo AVEh.

O achado de que a expressão dos receptores β_1 e β_2 no tecido cardíaco não foi diferente entre os grupos experimentais deve ser observado com cautela. Algumas hipóteses sobre esse achado podem ser discutidas. No grupo AVEh não tratado, a NE está elevada, o que esperaria-se que, classicamente, deveria induzir a regulação negativa dos receptores β_1 e β_2 como um mecanismo de proteção contra a sobrecarga adrenérgica (Chen et al., 2021; Xu et al., 2024; Zhao; Hagler; Muntz, 1996). Entretanto, essa ausência dessa regulação negativa na expressão total de receptores β_1 é um mais processo lento, ocorrendo em fases mais crônicas (dias/ semanas), e o período da análise: um período agudo ou subagudo, seria insuficiente para detectar essa alteração. Porém, a dessensibilização funcional e a internalização de receptores β_2 são processos rápidos que retiram este receptor da membrana celular (Chan; Burke; Head, 2007; Xu et al., 2024; Zhao; Hagler; Muntz, 1996). Então, é possível que a cardiotoxicidade pelo aumento de NE no grupo AVEh estivesse levando à falha no sistema de internalização de receptores (dessensibilização).

No caso do grupo tratado, a rilmenidina ao impedir o aumento da NE estaria prevenindo a cardiotoxicidade ou sobrecarga adrenérgica, impedindo essa possível dessensibilização funcional. Portanto, o coração no grupo tratado estaria em um estado preservado, dentro da normalidade, com quantidade de NE normal e receptores não dessensibilizados, e por isso com expressão de receptores semelhante ao grupo controle. Resumindo, a semelhança de expressão de receptores entre o grupo rilmenidina e controle seria uma evidência da prevenção da toxicidade por NE, enquanto a semelhança entre o grupo AVEh e controle seria devido a uma falha do sistema de proteção/ internalização de receptores β_1 e β_2 frente a toxicidade por NE.

Apesar dos grupos experimentais não apresentarem diferença na expressão de receptores β_2 , é importante salientar que a variabilidade do grupo tratado é muito alta. Essa variabilidade sugere uma tendência de modulação da expressão do receptor β_2 pela rilmenidina. Neste contexto, a rilmenidina não apenas estaria impedindo a cardiotoxicidade por NE, mas também exerceria um efeito farmacológico (direto ou indireto) sobre a regulação do receptor β_2 . Essa ação poderia ser interpretada como uma tentativa de ajustar a atividade cardíaca diante da hiperatividade simpática, na qual, o tratamento estaria estabelecendo um novo ponto

de equilíbrio homeostático no estado pós-AVEh. Contudo, para confirmar todas estas hipóteses são necessários estudos aumentando o n amostral, avaliando a localização celular dos receptores, fosforilação e/ou internalização dos receptores no miocárdio, avaliando se estão expressos em quantidades semelhantes e se estão funcionais.

Em resumo, este estudo permitiu compreender melhor as alterações após o AVEh no IC, bem como explorar o mecanismo central pelo qual a rilmenidina exerce seu efeito cardioprotetor. Com base na consistência dos resultados obtidos, propomos um possível mecanismo fisiopatológico para o desequilíbrio autonômico induzido pelo AVEh no IC e para o mecanismo de ação central da rilmenidina.

2.8 Conclusão

O presente estudo demonstrou, de forma inédita, que o AVEh no Córtex Insular (IC) de ratos desencadeia uma disfunção autonômica simpática central, caracterizada por taquicardia sustentada, elevação da pressão arterial média e hiperatividade simpática cardíaca, sem induzir déficits neurocomportamentais ou alterações morfométricas significativas. Esses achados consolidam o papel do IC como uma área crítica no controle autonômico cardiovascular e validam o modelo experimental em ratos como uma ferramenta importante para investigar terapias farmacológicas.

O tratamento com rilmenidina exerceu um efeito cardioprotetor importante, que foi dose-dependente, restaurou a reatividade ao estresse e preveniu o aumento da concentração de norepinefrina cardíaca. Este efeito ocorreu por meio da modulação simpática central do eixo IC–RVLM, promovendo a reorganização da neurotransmissão GABAérgica e corrigindo o desequilíbrio excitatório/inibitório induzido pelo AVEh. A modulação seletiva da maquinaria GABAérgica no IC e RVLM pela rilmenidina sustenta que este fármaco atua remodelando circuitos autonômicos centrais, e não apenas prevenindo os efeitos finais causados pelo AVEh. Além disso, o tratamento também parece promover a reorganização temporal dos ritmos fisiológicos, revelando um papel importante sobre a ritmicidade circadiana. Em conjunto, estes achados destacam a importância da rilmenidina no contexto de cardiomiopatias associadas ao AVEh, reforçam o papel do IC na disfunção cardiovascular pós-AVEh e destaca a relevância da utilização deste modelo experimental para a compreensão dos mecanismos neurobiológicos que envolvem o AVEh.

3 CAPÍTULO II: EFEITOS DO ANTI-HIPERTENSIVO DE AÇÃO CENTRAL RILMENIDINA NAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES RESULTANTES DO AVE HEMORRÁGICO EXPERIMENTAL NO CÓRTEX INSULAR DE CAMUNDONGOS C57BL/6J

3.1 Introdução

3.1.1 Modelos animais experimentais

Os modelos experimentais animais são ferramentas importantes para a investigação dos mecanismos fisiopatológicos do Acidente Vascular Encefálico (AVE) e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. A pesquisa pré-clínica em modelos animais permite explorar de forma controlada as relações causais entre a lesão cerebral, disfunções sistêmicas e respostas farmacológicas, o que seria eticamente inviável em humanos (Li; Zhang, 2021). A utilidade desses modelos depende, principalmente, da capacidade de reproduzir os aspectos chave da condição clínica, aliando a validação, reprodutibilidade e relevância translacional (Bai et al., 2020; Li; Zhang, 2021).

No contexto do AVE, observa-se uma maior utilização de modelos experimentais de isquemia cerebral, como a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) e os modelos tromboembólicos, amplamente utilizados para estudar cenários como neuroinflamação e estratégias de reperfusão. Em contraste, modelos de AVE hemorrágico (AVEh) são menos explorados, e o conhecimento sobre seus mecanismos e desfechos ainda permanecem limitados (Bai et al., 2020). Frequentemente são utilizados a injeção de colagenase ou grandes volumes de sangue autólogo, para estudar, por exemplo, a área de penumbra. No entanto, essas abordagens tendem a formar hematomas extensos e pouco delimitados, comprometendo múltiplas áreas encefálicas e dificultando a associação entre a topografia da lesão e os respectivos desfechos funcionais (Liddle et al., 2020).

A padronização de modelos experimentais de AVEh representa, portanto, uma necessidade e um ponto crítico para a pesquisa translacional. A heterogeneidade metodológica, aliada à escassez de modelos capazes de atingir com precisão regiões encefálicas específicas e de utilizar volumes adequados para reproduzir os efeitos do AVEh observados em humanos, dificulta a interpretação dos resultados e sua

aplicação ao contexto clínico (Bai et al., 2020; Kleinschnitz; Fluri; Schuhmann, 2015). Nesse contexto, a padronização de modelos que permitam uma correlação mais precisa entre a área lesionada e as consequências funcionais é essencial para a identificar alvos terapêuticos de forma mais assertiva e para fortalecer a relevância clínica dos achados (Kleinschnitz; Fluri; Schuhmann, 2015).

O córtex insular (IC) é uma região fundamental para o controle autonômico cardiovascular em humanos e roedores. O AVEh envolvendo o IC está associado a arritmias, taquicardia, disfunção cardíaca aguda e aumento da mortalidade precoce (Christensen, 2005; Gogolla, 2017; Nagai; Kato, 2025). Portanto, a caracterização de modelos experimentais capazes de reproduzir uma hemorragia restrita ao IC é essencial para investigar os mecanismos centrais que envolvem o AVEh à disfunção autonômica cardiovascular.

O presente estudo propõe implementar e caracterizar um modelo de AVEh experimental restrito ao IC de camundongos, utilizando um volume focal e controlado de sangue autólogo, com o objetivo de avaliar suas consequências cardiovasculares e o potencial terapêutico da rilmenidina.

3.2 Justificativa

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) hemorrágico representa uma das formas mais devastadoras de AVE, associada a elevadas taxas de mortalidade e morbidade. A hemorragia intracerebral, particularmente quando afeta regiões críticas como o córtex insular, está ligada a disfunções autonômicas graves, como o aumento da atividade simpática, hipertensão e arritmias cardíacas. Estas disfunções são preditores de mau prognóstico em humanos, reforçando a necessidade de modelos experimentais que mimetizam esta condição em busca do desenvolvimento de estratégias terapêuticas e melhoria do prognóstico clínico. Embora o modelo de AVE hemorrágico experimental no córtex insular de ratos tenha fornecido insights valiosos, a sua utilização é limitada quando se pretende investigar a função de genes específicos.

Neste contexto, a linhagem de camundongos C57BL/6J é muito utilizada em pesquisas e base para a criação de diversos modelos knockout e transgênicos. A padronização do modelo de AVE hemorrágico no córtex insular nesta linhagem permitirá a utilização de animais knockout permitindo avaliar, por exemplo, o papel de genes e proteínas pós-AVE. Além disso, a escolha do camundongo C57BL/6J como modelo experimental oferece vantagens como maior facilidade de manipulação, alta reprodutibilidade, custos operacionais reduzidos, além da otimização do tempo e da comparação entre dados da literatura já existente.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo Geral

Padronizar e caracterizar o modelo de acidente vascular hemorrágico experimental no córtex insular de camundongos da linhagem C57BL/6J, estabelecendo uma ferramenta metodológica para a investigação de mecanismos e disfunções pós-AVE.

3.3.2 Objetivos específicos

- I. Padronizar o modelo de acidente vascular hemorrágico experimental no córtex insular de camundongos C57BL/6J;
- II. Caracterizar o perfil cardiovascular e o perfil de células imunes do coração de camundongos C57BL/6J submetidos ao acidente vascular hemorrágico experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina;
- III. Avaliar o perfil de catecolaminas do coração de camundongos C57BL/6J submetidos ao acidente vascular hemorrágico experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina;
- IV. Avaliar os parâmetros morfométricos e sobrevivência de camundongos C57BL/6J submetidos ao acidente vascular hemorrágico experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina.

3.4 Material e Métodos

3.4.1 Animais

Os procedimentos experimentais foram realizados conforme o protocolo n°233/2023 aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO 18.2). Foram utilizados camundongos C57BL/6J com peso entre 20-25g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram alojados em caixas de polipropileno forradas com maravalha, mantidos em temperatura ambiente de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12h:12h. Durante os experimentos, os animais receberam ração padrão granulada e água à vontade.

3.4.2 Drogas

Os animais foram anestesiados com cetamina (80mg/Kg) e xilazina (7mg/Kg), via intraperitoneal (i.p.), e cloridrato de lidocaína 2% + epinefrina 1:200000 (Hypocaina®), via subcutânea (s.c.), para serem submetidos às cirurgias. Receberam a dose única de 40.000 UI/kg de pentabiótico (Fort Dodge®), por via intramuscular (i.m.), após estereotaxia, e 2,5 mg/kg do analgésico não-esteroidal flunixinina meglumina (Banamine®) via subcutânea (s.c.), para analgesia após estereotaxia. Para a assepsia foi utilizado clorexidina 2% (Riohex®) e álcool 70%. Foi utilizado para tratamento anti-hipertensivo de ação central a rilmenidina (Sigma-Aldrich, EUA), na dose de 10 μg /Kg. Para os animais controle, foi administrado solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%; 0,1ml/100g) via i.p. e para a microinjeção diretamente no córtex insular direito o volume de 100nL ().

3.4.3 Hemorragia experimental no córtex insular direito (AVEh)

Para realizar o AVEh no córtex insular de camundongos C57BL/6J, os animais foram anestesiados e os pelos da região superior ao crânio foram removidos com creme depilatório. Em seguida, foram imobilizados em um estereotático para animais de pequeno porte (Stoelting, IL, EUA), feito assepsia local e a calota craniana foi exposta por uma incisão na pele, de aproximadamente 0,5 cm, e o periósteo foi

removido. O hemisfério direito foi escolhido para a realização das microinjeções com base em evidências anteriores que demonstraram uma lateralização do controle autonômico cardiovascular mediada pelo córtex insular, predominando efeitos simpáticos no hemisfério direito e efeitos parassimpáticos no hemisfério esquerdo (Marins et al., 2020; Oppenheimer et al., 1992; Dos Santos Machado et al., 2026). Todas as coordenadas para as microinjeções (ântero-posterior (AP): -0.10 mm; médio-lateral (ML): +3.7 mm, dorsoventral (DV): 4.5 mm) foram determinadas a partir do Atlas de Paxinos & Franklin (Paxinos, G; Franklin, K. B.J., 2004). Para realizar a hemorragia experimental, foi feita a trepanação do crânio com uma broca odontológica e o sangue autólogo foi coletado a partir de uma pequena incisão da cauda previamente aquecida em bolsa térmica gel (Termogel®), para dilatação local dos vasos sanguíneos. O sangue coletado foi transferido para uma agulha gengival, 30G, posicionada previamente no estereotáxico, que estava conectada a uma nanoinjetora de 1µL (Hamilton, EUA) por meio de um Silastic®. Após a transferência do sangue, o volume de 100nL foi injetado nas coordenadas pré-definidas. O grupo controle também recebeu o mesmo volume, porém de solução fisiológica estéril. Em seguida, a região foi suturada e submetida a procedimento de assepsia. Imediatamente após a cirurgia, todos os animais receberam analgésico, pentabiótico e o respectivo tratamento experimental. O pós-operatório foi realizado em ambiente aquecido por lâmpada fisioterápica de infravermelho (Philips®) e, após a recuperação, os animais foram transportados para o biotério. No segundo e terceiro dias após a indução da hemorragia experimental, os animais continuaram a receber seus respectivos tratamentos.

3.4.4 Avaliação do perfil cardiovascular

Para a caracterização do perfil cardiovascular de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental no córtex insular, foram realizados os seguintes procedimentos e análises: registro eletrocardiográfico, análise de arritmias cardíacas e avaliação da variabilidade da frequência cardíaca.

3.4.4.1 Eletrocardiograma

Para o registro do eletrocardiograma (ECG), os animais foram previamente anestesiados com cetamina e xilazina. Em seguida, fios de cobre foram introduzidos subcutaneamente nas patas, sendo conectados à eletrodos acoplados a um amplificador e a um sistema de conversão analógico-digital para aquisição dos sinais (PowerLab 4/20, ADInstruments), integrado ao software LabChart 7.3.3 para captação e análise dos dados. Os eletrodos foram posicionados da seguinte forma: pata anterior direita (eletrodo preto), pata anterior esquerda (eletrodo vermelho) e pata posterior esquerda (eletrodo verde). O sinal obtido correspondeu aos potenciais elétricos cardíacos, permitindo o registro da atividade elétrica do coração, o cálculo da frequência cardíaca, a análise dos traçados eletrocardiográficos e a verificação de possíveis arritmias. Os registros foram realizados com os animais posicionados em decúbito ventral, sob temperatura corporal controlada ($\pm 38^{\circ}\text{C}$) e tempo médio de registro de 5 minutos por animal.

3.4.5 Experimentos imunológicos

Para a caracterização do perfil imunológico do coração de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental no córtex insular, foram realizados os seguintes procedimentos: imunofluorescência e caracterização das células imunes por citometria de fluxo.

3.4.5.1 Imunofluorescência

O protocolo de imunofluorescência foi realizado como previamente descrito por Rocha-Resende et al., 2019. O coração foi fixado em PFA 4%, congelado em OCT e cortado em secções transversais de 10 μm no criostato. Os cortes foram incubados com tampão de bloqueio (20% FBS, 60% tampão maleato, 20% Reagente de Bloqueio da Roche) por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram incubadas overnight a 4°C com os anticorpos primários específicos. Para a marcação de macrófagos utilizamos o Rat anti-mouse CD68 FA-11 (MCA1957, BioRad, 1:300) e para a marcação de neutrófilos Purified Rat Anti-Mouse Ly-6G 1A8 (551459, BD, 1:200). Logo após, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 Goat anti-Rat (A-11006, Invitrogen, 1:200) ou Alexa Fluor 555 Goat anti-Rat (A-21434, Invitrogen, 1:200) [durante 2 horas] em temperatura

ambiente. DAPI foi utilizado para marcação do núcleo celular. As fotos foram obtidas utilizando o microscópio APOTOME.2 (Zeiss), com aumento de 20x. Para cada amostra, foram tiradas 10 fotos, provenientes de 2 cortes distintos. As análises foram realizadas utilizando o software ZEN pro 2012 (Zeiss). A quantificação do número de células foi realizada considerando o número de macrófagos CD68⁺DAPI⁺ ou neutrófilos Ly-6G⁺DAPI⁺ por foto (Rocha-Resende et al., 2019).

3.4.5.2 Caracterização das células imunes por citometria de fluxo

Para caracterização do perfil de células imunes no tecido cardíaco, foi realizada citometria de fluxo. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os corações foram coletados, perfundidos com solução Digestion Buffer (DB) e pesados. O tecido cardíaco foi fragmentado e digerido com collagenase tipo I (Sigma; 300 U/mL) e Hialuronidase (Sigma; 60 U/mL) em um volume final de 3 mL de HBSS, por 30 minutos a 37 °C, sob agitação constante. O material digerido foi filtrado em peneira de 40 µm e centrifugado a 400 × g por 5 minutos. Os eritrócitos foram lisados com tampão ACK (ACK Lysis Buffer, Thermo Fisher Scientific) por 12 minutos no gelo. As células remanescentes foram ressuspensas em 200 µL de tampão FACS (2% FBS e 2 mM EDTA em PBS estéril) e incubadas com os anticorpos específicos por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e ressuspensas novamente em tampão FACS para aquisição dos dados. As amostras foram analisadas no citômetro BD LSRFortessa, pertencente ao Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores da Faculdade de Farmácia. Os resultados foram expressos como número de células por coração. A análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo v10. (Lavine et al., 2014; Rocha-Resende et al., 2019, 2020).

3.4.6 Dosagem de catecolaminas no coração

Para quantificação das catecolaminas no tecido cardíaco, foram utilizados corações inteiros, os corações dos animais foram extraídos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80 °C. Posteriormente, foram ressuspensos em uma solução de desproteinização contendo 0,2 M de ácido perclórico e 3 mM de cisteína. As amostras foram sonicadas em banho de gelo e, em seguida, centrifugadas a 15.000 × g por 15 minutos a 4 °C. O

sobrenadante obtido foi coletado e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência equipada com detector de fluorescência (HPLC-FD, Shimadzu). Utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex) como fase estacionária. A fase móvel foi composta por 12 mM de acetato de sódio (CH₃COONa) e 0,26 mM de EDTA dissódico (EDTA·Na₂), ajustada para pH 3,5. O sistema operou em condições isocráticas, com fluxo de 0,5 mL/min por 30 minutos. A detecção das catecolaminas foi realizada com comprimentos de onda de excitação e emissão de λ_{ex} = 279 nm e λ_{em} = 320 nm, respectivamente, com alta sensibilidade e ganho do detector de 4×.

3.4.7 Variação do peso corporal e relação peso corporal/órgãos

Para avaliar a variação do peso corporal dos camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental no córtex insular, foram calculadas a variação absoluta e a variação relativa (percentual) do peso corporal. A variação absoluta foi obtida pela diferença entre o peso pré-eutanásia e o peso pré-cirúrgico, conforme a Equação 1:

Equação 1:

$$\text{Variação absoluta (g)} = \text{Peso pré-eutanásia} - \text{Peso pré-cirúrgico}$$

A variação relativa (percentual) foi determinada pela Equação 2:

Equação 2:

$$\text{Variação percentual (\%)} = \left[\frac{(\text{Peso pré-eutanásia} - \text{Peso pré-cirúrgico})}{\text{Peso pré-cirúrgico}} \right] \times 100$$

Para avaliar as diferenças entre os grupos quanto aos pesos do coração e dos rins (direito e esquerdo), foram calculadas as seguintes relações morfométricas, considerando o peso corporal pré-eutanásia e o comprimento da tíbia direita como parâmetros de normalização:

$$\text{Relação 1} = \frac{\text{Peso do coração}}{\text{Peso corporal (pré – eutanásia)}}$$

$$\text{Relação 2} = \frac{\text{Peso do coração}}{\text{Peso comprimento da tíbia}}$$

$$\text{Relação 3} = \frac{\text{Peso do rim direito}}{\text{Peso corporal (pré – eutanásia)}}$$

$$\text{Relação 4} = \frac{\text{Peso do rim direito}}{\text{Comprimento da tíbia}}$$

$$\text{Relação 5} = \frac{\text{Peso do rim esquerdo}}{\text{Peso corporal (pré – eutanásia)}}$$

$$\text{Relação 6} = \frac{\text{Peso do rim esquerdo}}{\text{Comprimento da tíbia}}$$

3.4.8 Determinação anatômica dos sítios de injeção

Para a confirmação dos sítios de microinjeção no córtex insular direito, foi realizada a análise histológica da região. Para isso, após a conclusão dos experimentos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os encéfalos foram removidos da caixa craniana e fixados em solução tamponada de formalina a 10%. Posteriormente, os tecidos foram transferidos para uma solução de sacarose a 20% por um período de 24 a 48 horas. Em seguida, no criostato (LEICA CM 1850®), foram obtidos cortes transversais do cérebro (50 µm), os quais foram imediatamente dispostos em lâminas previamente gelatinizadas e corados com vermelho neutro a 1%, de acordo com a técnica de Nissl. A análise das lâminas foi realizada por microscopia óptica, utilizando o atlas de Paxinos e Watson (2004) como referência para a identificação dos sítios de microinjeção (Paxinos, G; Franklin, K. B.J., 2004).

3.4.9 Mortalidade

Para a avaliação da taxa de mortalidade dos camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental no córtex insular, foram considerados todos os animais que vieram a óbito após a realização do procedimento. O número de óbitos em cada grupo experimental foi utilizado para a análise de sobrevivência no software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad, EUA), empregando-se o teste de Mantel-Cox, considerando-se significância estatística quando $p < 0,05$.

3.4.10 Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad, EUA), e os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para comparação entre grupos, foram realizadas a análise de variância *one-way* ANOVA ou *two-way* ANOVA, seguidos pelo pós-teste de *Tukey* ou *Bonferroni* conforme apropriado. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

3.5 Protocolo Experimental

3.5.1 Padronização do modelo de AVEh experimental no córtex insular de camundongos C57BL/6J

Para padronização do modelo de AVEh no córtex insular direito de camundongos C57BL/6J, as coordenadas estereotáticas foram previamente estimadas com base no atlas de Paxinos & Franklin (2004). Posteriormente, os animais foram posicionados no aparelho estereotático, com bolsa térmica aquecida sob a cauda para manutenção da temperatura corporal. A partir do bregma, as coordenadas foram posicionadas e realizou-se a injeção de sangue autólogo no córtex insular direito, sendo o sangue obtido por meio de pequeno corte na extremidade da cauda. No Dia 3 pós-AVEh, os animais foram eutanasiados e os cérebros removidos para avaliação histológica. As coordenadas padronizadas para animais com peso entre 20 e 25 g foram as seguintes: AP: -0,10 mm; LL: +3,7 mm; DV: 4,5 mm. Este delineamento experimental está esquematizado na Figura 30.

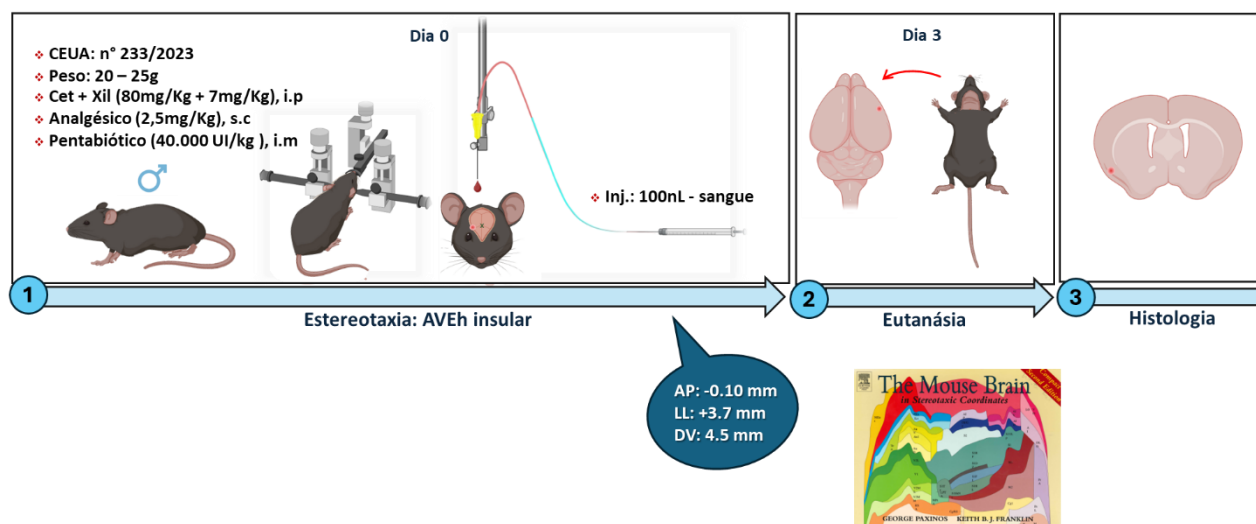


Figura 30 – Esquema do protocolo experimental utilizado para padronização do modelo de AVEh experimental no córtex insular direito de camundongos C57BL/6J. Fonte: Elaborado pela autora

3.5.2 Caracterização do perfil cardiovascular e o perfil de células imunes do coração de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina

Para avaliar o perfil cardiovascular e o perfil de células imunes do coração, camundongos C57BL/6J foram submetidos ao AVEh experimental no córtex insular direito. Os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico, com bolsa térmica aquecida sob a cauda para manutenção da temperatura corporal. Em seguida, realizou-se a injeção de sangue autólogo no córtex insular direito, sendo o sangue obtido por meio de pequeno corte na extremidade da cauda. Imediatamente após a cirurgia, os animais receberam a primeira dose de rilmenidina (10 µg/kg, i.p.) ou solução salina (Dia 0). A segunda dose foi administrada no Dia 1 pós-AVEh e a terceira no Dia 2. No Dia 3 pós-AVEh, os animais foram novamente anestesiados e, em seguida, eletrodos foram implantados por via subcutânea para registro do ECG. Após esse procedimento, os animais foram eutanasiados; o coração foi removido para avaliação do perfil de células imunes, e o cérebro coletado, armazenado em formol 10% para posterior análise dos sítios de injeção. Este delineamento experimental está esquematizado na Figura 31.

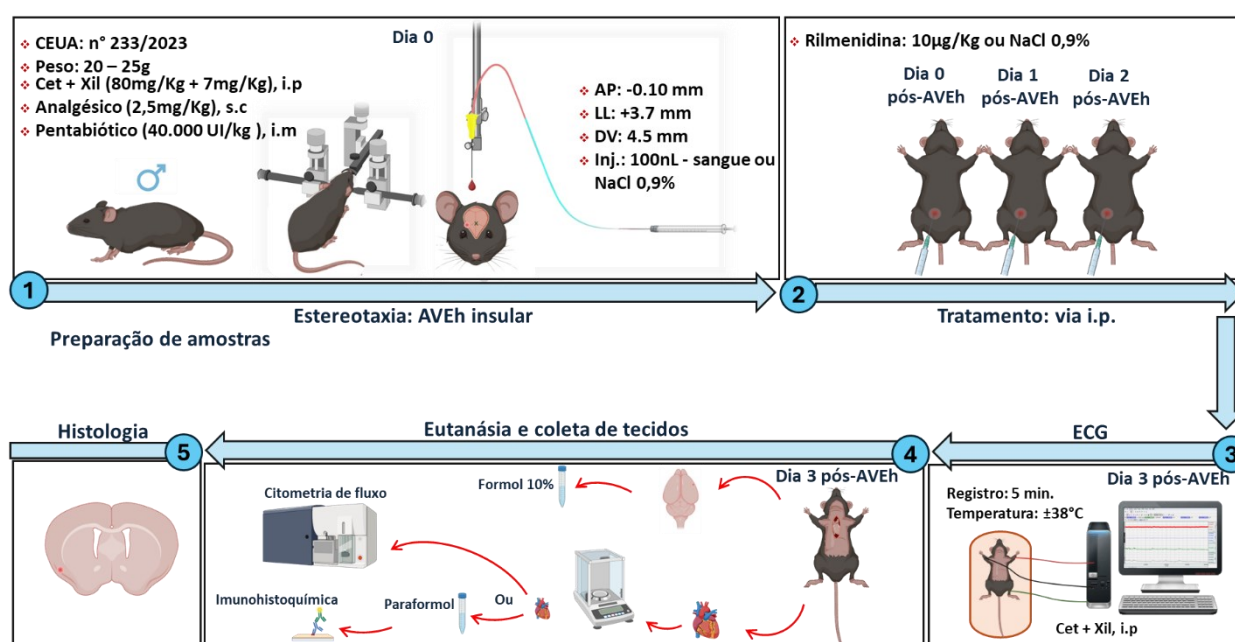


Figura 31 – Esquema do protocolo experimental utilizado para caracterização do perfil cardiovascular e o perfil de células imunes do coração de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina. Fonte: Elaborado pela autora

3.5.3 Avaliação do perfil de catecolaminas do coração de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina

Para avaliar o perfil de catecolaminas do coração, camundongos C57BL/6J foram submetidos ao AVEh experimental no córtex insular direito. Os animais foram posicionados no aparelho estereotático, com bolsa térmica aquecida sob a cauda para manutenção da temperatura corporal. Em seguida, realizou-se a injeção de sangue autólogo no córtex insular direito, sendo o sangue obtido por meio de pequeno corte na extremidade da cauda. Imediatamente após a cirurgia, os animais receberam a primeira dose de rilmenidina (10 µg/kg, i.p.) ou solução salina (Dia 0). A segunda dose foi administrada no Dia 1 pós-AVEh e a terceira no Dia 2. No dia 3 pós-AVEh, os animais foram eutanasiados, e o coração foi imediatamente removido e congelado em nitrogênio líquido para posterior dosagem de catecolaminas cardíacas. O cérebro foi coletado e armazenado em formol a 10% para posterior avaliação dos sítios de injeção. Este delineamento experimental está esquematizado na Figura 32.

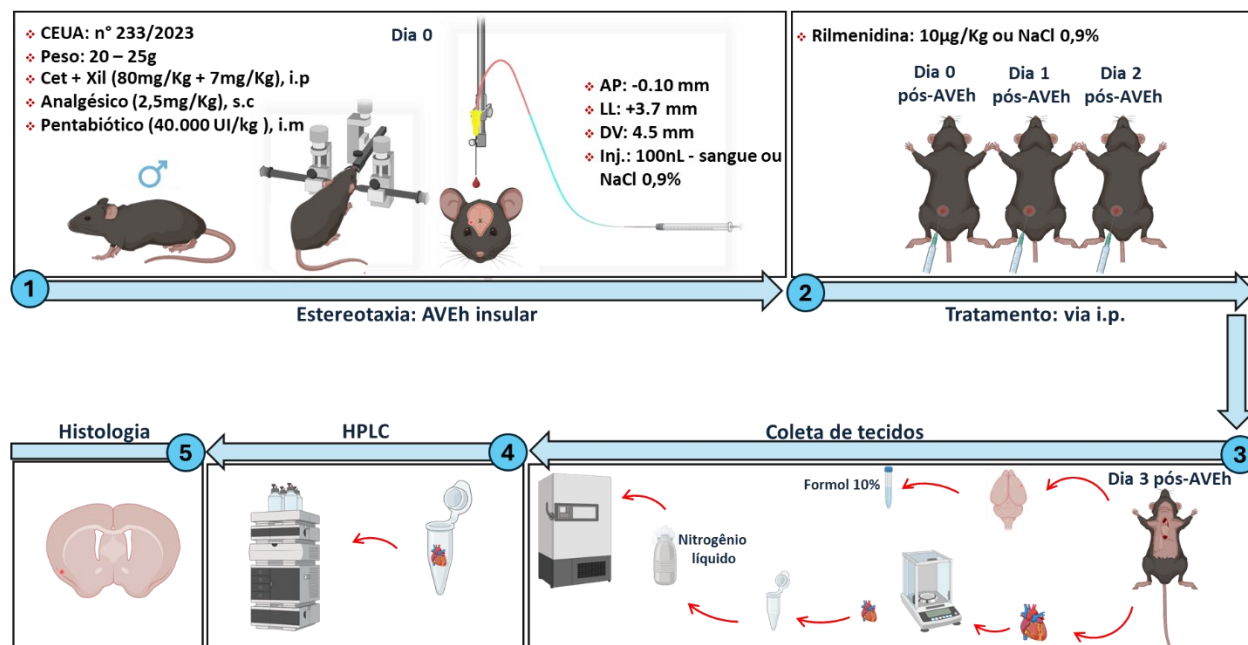


Figura 32 – Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliação do perfil de catecolaminas do coração de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina. Fonte: Elaborado pela autora

3.5.4 Avaliar os parâmetros morfométricos de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina.

Para avaliar os parâmetros morfométricos, camundongos C57BL/6J foram submetidos ao AVEh experimental no córtex insular direito. Os animais foram posicionados no aparelho estereotático, com bolsa térmica aquecida sob a cauda para manutenção da temperatura corporal. Em seguida, realizou-se a injeção de sangue autólogo no córtex insular direito, sendo o sangue obtido por meio de pequeno corte na extremidade da cauda. Imediatamente após a cirurgia, os animais receberam a primeira dose de rilmenidina (10 µg/kg, i.p.) ou solução salina (Dia 0). A segunda dose foi administrada no Dia 1 pós-AVEh e a terceira no Dia 2. No dia 3 pós-AVEh, os animais foram eutanasiados, e os corações foram imediatamente removidos e congelados em nitrogênio líquido para análises posteriores. Cérebro e rins foram coletados e fixados em formol a 10% para análises subsequentes. Corações e rins foram pesados em balança de precisão e os valores normalizados pelo comprimento da tibia direita de cada animal. Este delineamento experimental está esquematizado na Figura 33.

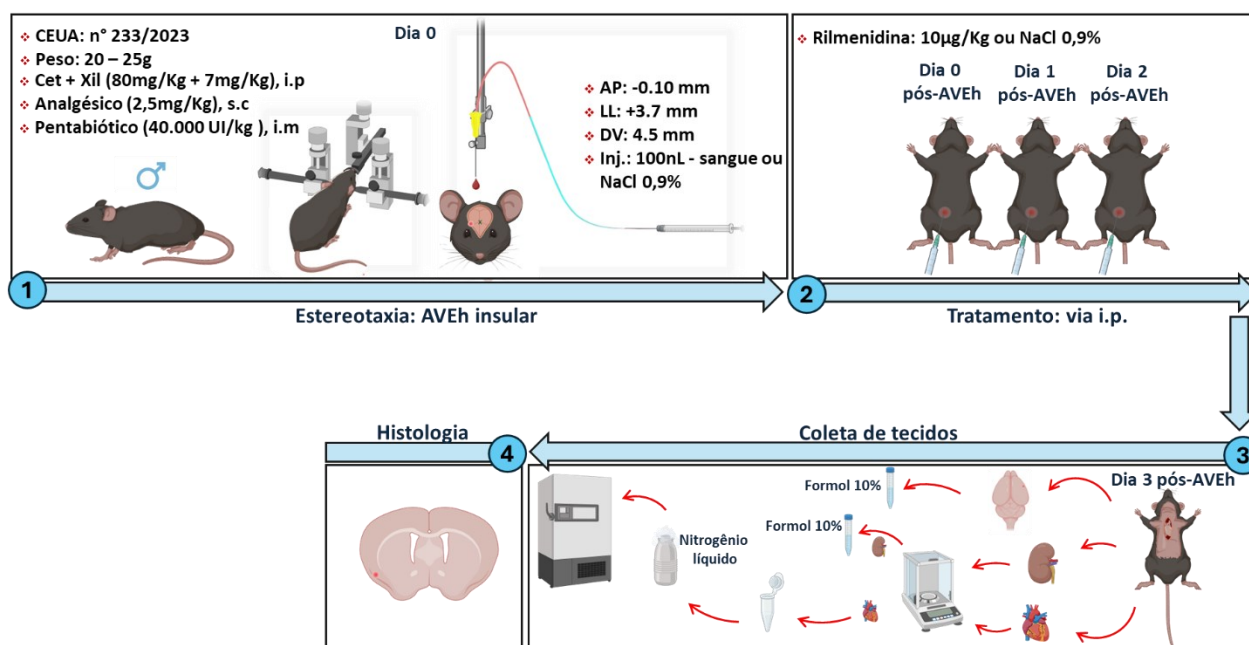


Figura 33 – Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliar os parâmetros morfométricos de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental no córtex insular e após o tratamento com rilmenidina. Fonte: Elaborado pela autora

3.6 Resultados

3.6.1 Localizações das lesões no córtex insular

Com base em estudos anteriores que demonstraram que o modelo de AVEh no IC direito intermediário causa aumento da atividade simpática e consequente disfunção cardíaca, as microinjeções foram direcionadas para a coordenada -0.10 mm em relação ao bregma, no eixo intermediário. A confirmação da localização das microinjeções foi obtida por meio de análise histológica de lâminas coradas, observadas em microscópio óptico, utilizando o atlas de Paxinos & Franklin (2004) como referência. As coordenadas foram fixadas em: ântero-posterior (AP): -0.10 mm; médio-lateral (ML): +3.7 mm; dorsoventral (DV): 4.5 mm. A Figura 34 apresenta uma fotomicrografia representativa da área de microinjeção.

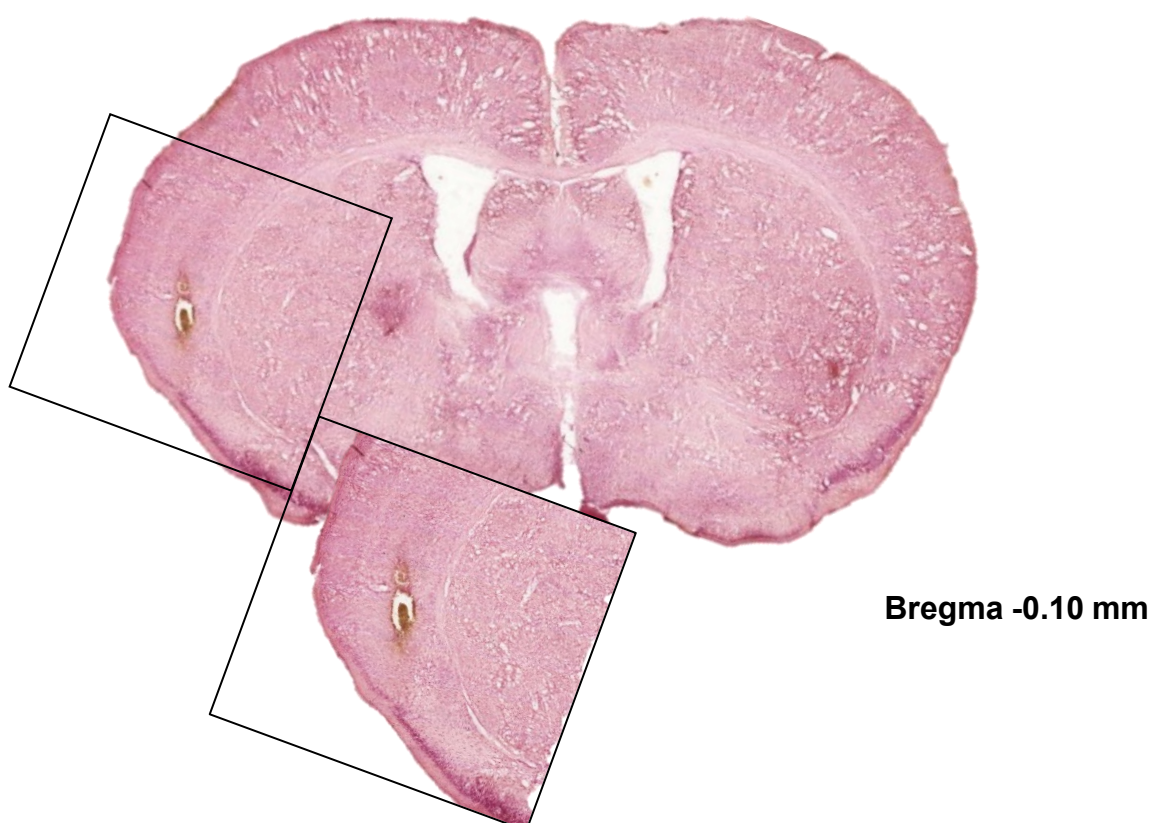


Figura 34 – Fotomicrografia representativa do cérebro de camundongo C57BL/6J com AVEh experimental. Coordenada estereotática: bregma -0.10 mm (Paxinos e Franklin, 2004). Aumento do ponto de injeção em 2.4x por meio do software SlideViewer versão 2.9. Fonte: Elaborado pela autora

O mapa de microinjeções representado pela Figura 35, ilustra a distribuição dos pontos de injeção ao longo do eixo intermediário do IC direito de camundongos C57BL/6J.

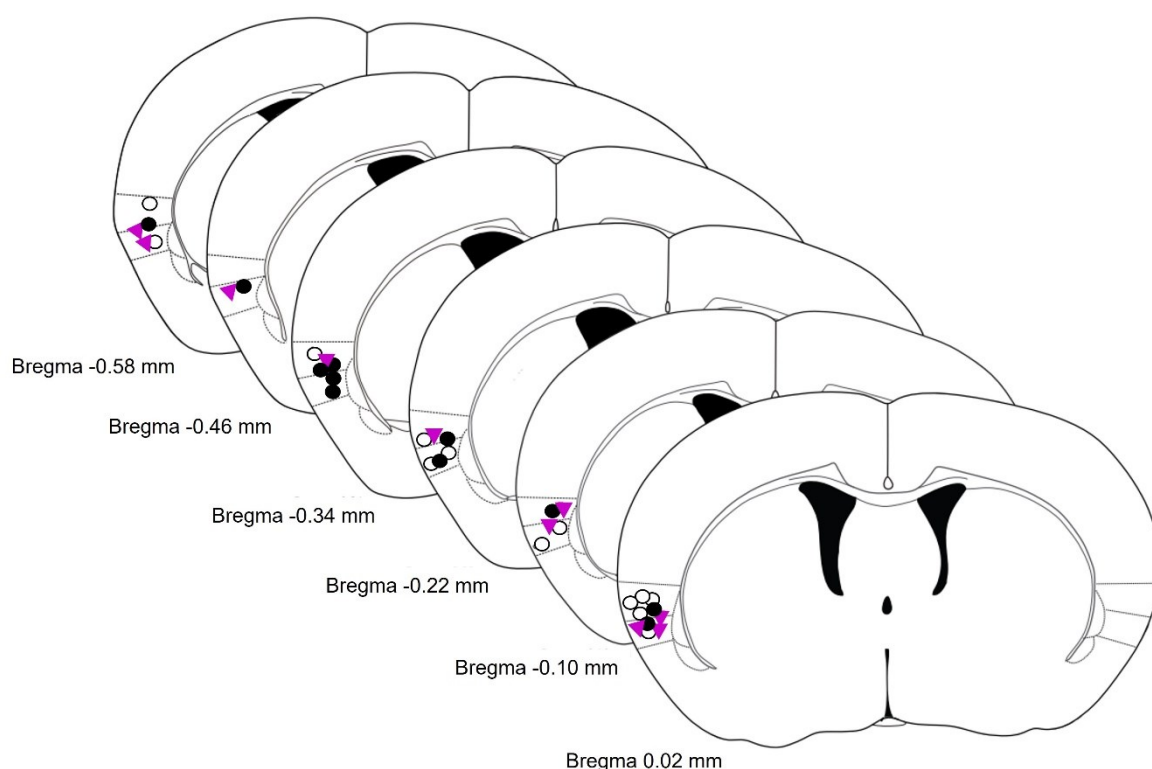


Figura 35 – Mapa de microinjeções de sangue autólogo ou solução fisiológica no córtex insular direito de camundongos C57BL/6J utilizando o atlas Paxinos e Franklin (2004) como referência. Círculos brancos: Grupo controle – ICSal + sal (n=14): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica; Círculos pretos: Grupo não tratado – ICH + sal (n=12): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica; Triângulos invertidos roxos: Grupo tratado – ICH + Ril 10 μ g (n=11): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 μ g/Kg. Secções coronais de 50 μ m de espessura. Fonte: Elaborado pela autora

3.6.2 Efeitos do AVEh no IC sobre a frequência cardíaca e a ação da rilmenidina

A microinjeção de sangue autólogo no IC provocou taquicardia sustentada apenas nos grupos com AVEh - dia 3 (ICSal + sal: 257 ± 21 bpm vs. ICH +sal: 302 ± 38 bpm; $P < 0.01$) (Figura 36B), em animais com AVEh - dia 1 não foi observado diferença (Figura 36A). Nos experimentos posteriores, utilizando tratamentos via i.p., a

taquicardia também foi desencadeada após o AVEh (ICSal + sal: 291 ± 33 bpm vs. ICH + sal: 349 ± 38 bpm; $P < 0.01$). O tratamento com rilmenidina $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (311 ± 27 bpm; $P < 0.01$), preveniu o aumento da FC, resultando em valores que não diferiram estatisticamente dos observados no grupo controle (Figuras 36C).

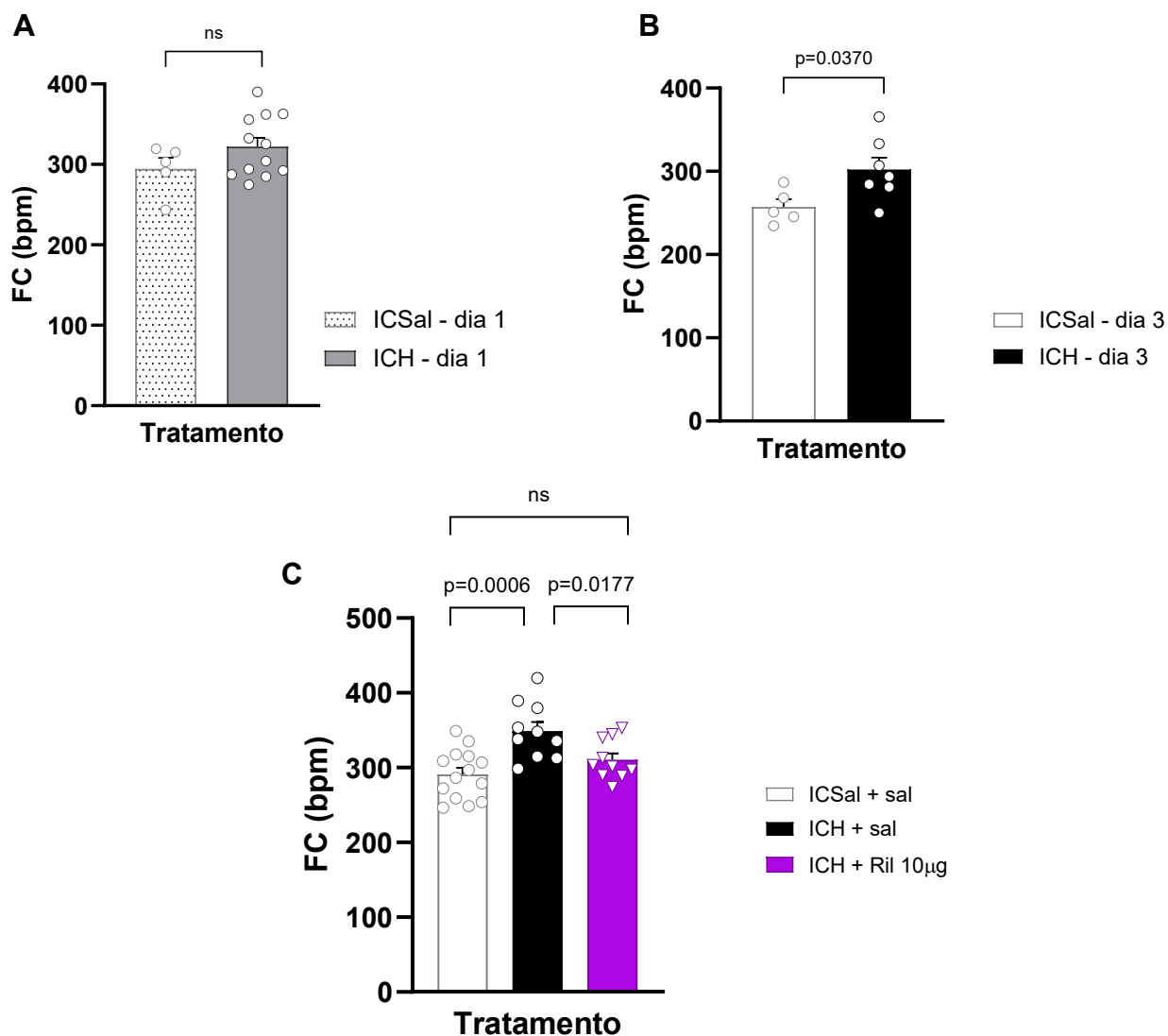
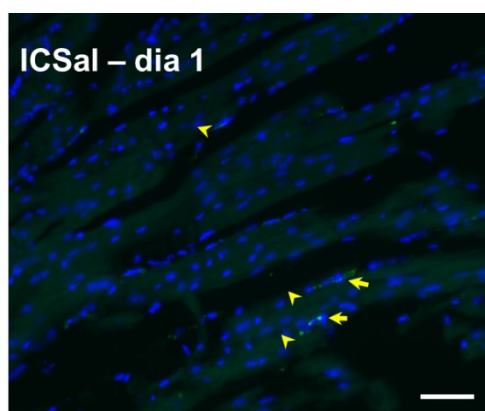


Figura 36 – Efeitos na frequência cardíaca de camundongos C57BL/6J anestesiados pós-AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC. (A) ICSal – dia 1 (n=5): microinjeção de solução fisiológica no IC (grupo controle, barra pontilhada); ICH – dia 1 (n=12): microinjeção de sangue autólogo no IC (barra cinza); **(B)** ICSal – dia 3 (n=5): microinjeção de solução fisiológica no IC (grupo controle, barra branca); ICH – dia 3 (n=7): microinjeção de sangue autólogo no IC (barra preta); **(C)** ICSal + sal (n=14): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica durante 3 dias (grupo controle, barra branca); ICH + sal (n=12): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril $10 \mu\text{g}$ (n=11): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de $10 \mu\text{g}/\text{Kg}$ (grupo tratado, barra roxa). As barras representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos **(A-B)** teste t de Student não pareado; **(C)** one-way ANOVA e pós-teste de Tukey; $p < 0,05$. Fonte: Elaborado pela autora

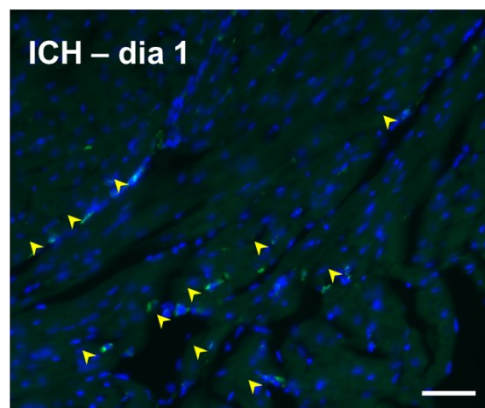
3.6.3 Efeitos do AVEh insular no sistema imune cardíaco

Considerando a taquicardia induzida pelo AVEh e a prevenção desse evento pelo tratamento com rilmenidina, e dado que a hiperativação simpática periférica pode induzir danos no miocárdio (Chen; Gu; Zhang, 2024; Hu et al., 2023), investigamos a presença de infiltrado de macrófagos CD68⁺ no tecido cardíaco. Os resultados revelaram um aumento significativo do número de células CD68⁺ nos animais submetidos ao AVEh, em comparação com o grupo controle. Este aumento foi evidente tanto no ponto temporal do dia 1 pós-AVEh (Figura 37A-C) quanto no dia 3 pós-AVEh (Figura 38A-C). Nas imagens representativas do grupo AVEh, é notável que o sinal fluorescente se manifesta de forma heterogênea, apresentando-se difuso pelo parênquima tecidual e, em certas regiões, aglomerado em *clusters* ou grumos, sugerindo focos de resposta inflamatória.

A



B



C

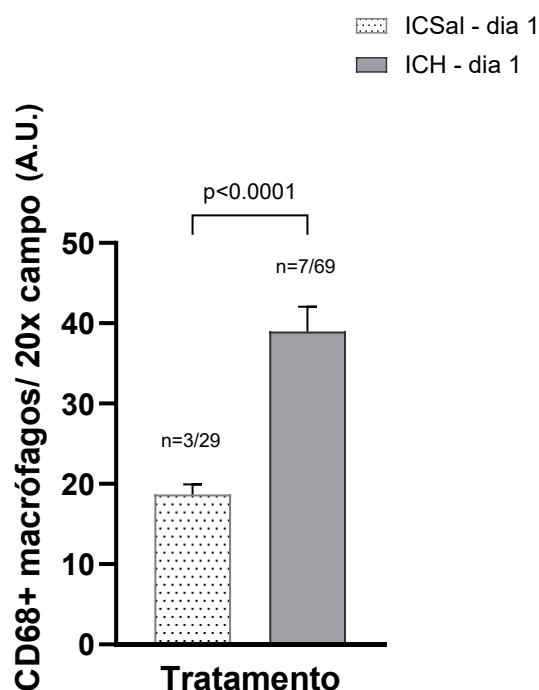


Figura 37 – Imunofluorescência para a proteína CD68⁺ no coração de camundongos C57BL/6J após 1 dia de AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no

IC. (A) setas amarelas indicam macrófagos CD68⁺ no coração de animais ICSal – dia 1 e (B) animais ICH – dia 1; (C) ICSal – dia 1 (n=3): microinjeção de solução fisiológica no IC (grupo controle, barra pontilhada); ICH – dia 1 (n=7): microinjeção de sangue autólogo no IC (barra cinza). As barras representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: teste t de Student não pareado; $p < 0.05$. Fonte: Elaborado pela autora

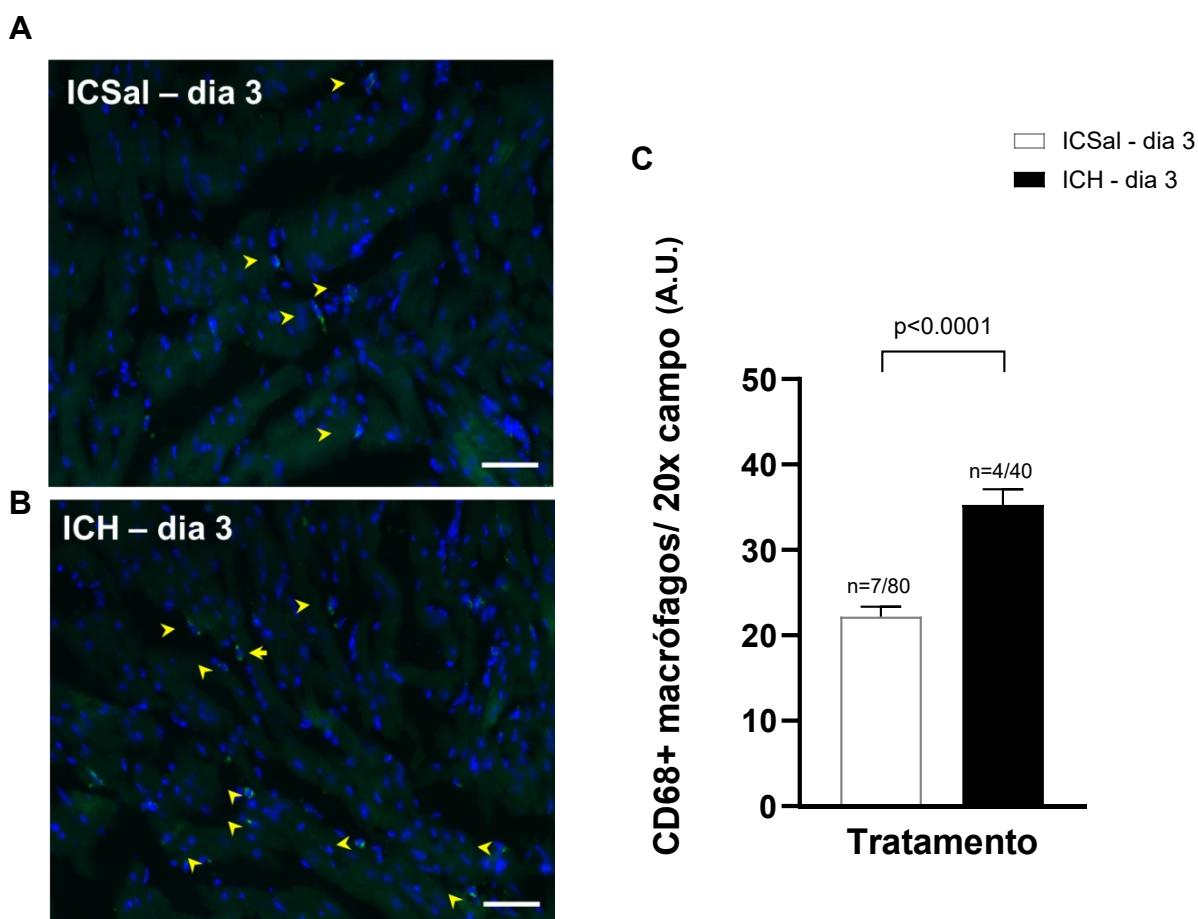


Figura 38 – Imunofluorescência para a proteína CD68⁺ no coração de camundongos C57BL/6J após 3 dias de AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC. (A) setas amarelas macrófagos CD68⁺ no coração de animais ICSal – dia 3 e (B) animais ICH – dia 3; (C) ICSal – dia 3 (n=7): microinjeção de solução fisiológica no IC (grupo controle, barra branca); ICH – dia 3 (n=4): microinjeção de sangue autólogo no IC (barra preta). As barras representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: teste t de Student não pareado; $p < 0.05$. Fonte: Elaborado pela autora

Para entender melhor que tipo de macrófagos/ monócitos eram estes prosseguimos com os experimentos com apenas com animais pós-AVEh 3 dias. O coração pode abrigar duas populações de macrófagos: 1) células residentes, majoritariamente embrionárias, que tem um papel protetor e 2) os macrófagos derivados da medula óssea, geralmente associados a um quadro patológico e que são identificados por CCR⁺ (Hulsmans et al., 2017). A avaliação por citometria de fluxo confirmou esse aumento significativo apontando um maior número de leucócitos CD45⁺, número de macrófagos/monócitos CD64⁺Ly6C⁺ e macrófagos/monócitos CCR2⁺ no tecido cardíaco de animais ICH – dia 3 em relação ao grupo controle (ICSaI – dia 3). Em conjunto, nossos dados demonstram um aumento significativo no número de células imunes (leucócitos) no coração dos animais submetidos ao AVEh, consistente com a presença de um quadro inflamatório. É importante ressaltar o aumento no número de monócitos/macrófagos CCR2⁺ derivados da medula óssea, sugerindo a instalação de um processo inflamatório e patológico de intensidade branda, porém consistente, nos corações desses animais. Esses dados estão demonstrados na Figura 39A-C.

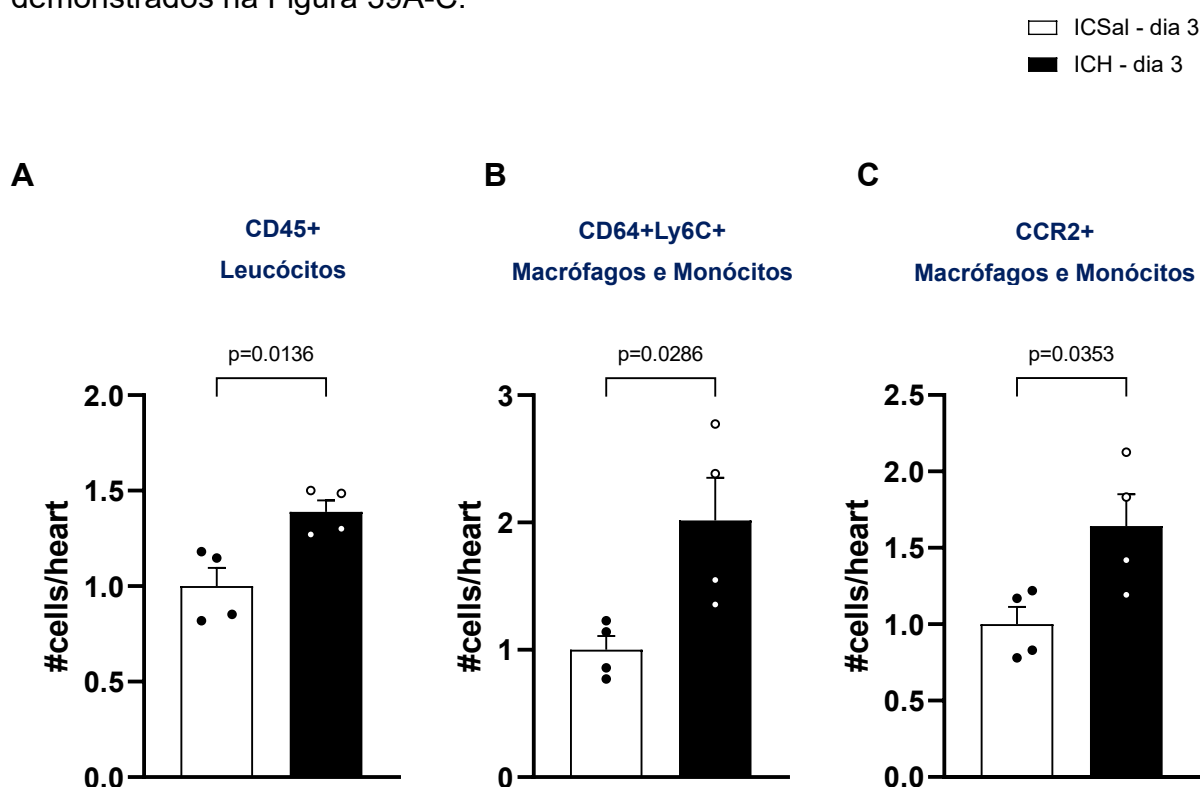


Figura 39 – Aumento no número de leucócitos, monócitos e macrófagos no coração camundongos C57BL/6J por citometria de fluxo submetidos ao AVEh ou microinjeção de solução salina. (A) número total de leucócitos (CD45⁺) no tecido cardíaco de animais ICSaI – dia 3 e ICH – dia 3; (B) número total de macrófagos e monócitos (CD64⁺Ly6C⁺) no

tecido cardíaco de animais ICSal – dia 3 e ICH – dia 3; **(C)** número total de macrófagos e monócitos derivados da medula óssea (CCR2⁺) no tecido cardíaco de animais ICSal – dia 3 e ICH – dia 3. As barras representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: teste t de Student não pareado; $p < 0.05$. Dados obtidos de 2 experimentos independentes e normalizados pelo grupo controle de cada dia de experimento. Fonte: Elaborado pelos autores

Diante destes resultados da citometria, foi iniciado o tratamento com rilmenidina para avaliar possíveis efeitos do tratamento. O mesmo padrão foi observado: o grupo AVEh apresentou maior fluorescência tecidual, indicando um aumento no número de macrófagos CD68⁺ infiltrados. O tratamento com rilmenidina preveniu essa infiltração, conforme demonstrado na Figura 40A-D.

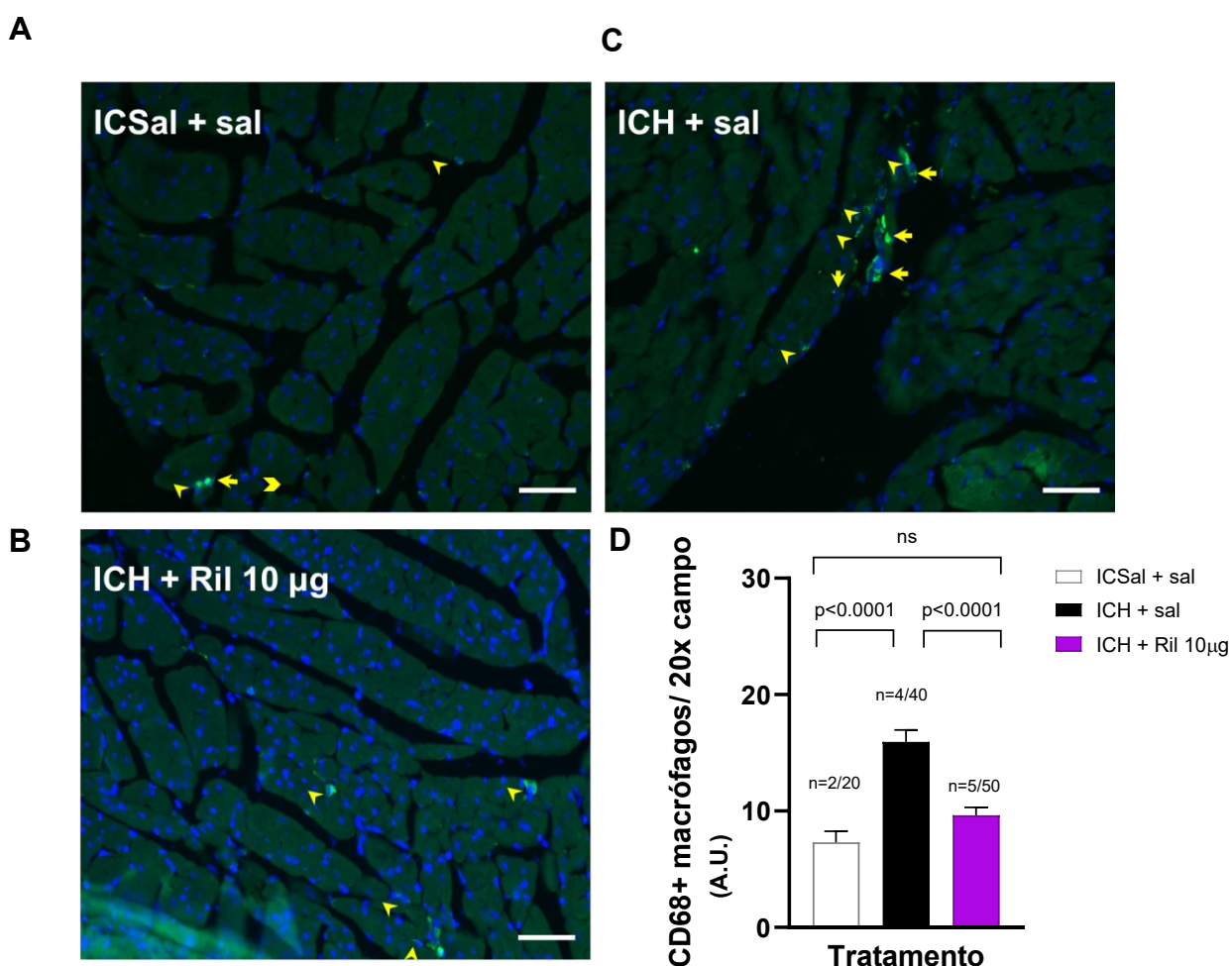


Figura 40 – Imunofluorescência para a proteína CD68+ no coração de camundongos C57BL/6J após 3 dias de AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no IC e tratados durante os 3 dias. (A) setas amarelas indicam fluorescência de CD68+ no coração de animais ICSal + sal; **(B)** animais ICH + sal e **(C)** animais ICH + Ril 10 µg; **(D)** ICSal + sal (n=2): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica durante 3 dias (grupo controle, barra branca); ICH + sal (n=4): microinjeção de sangue

autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril 10 μ g (n=5): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 μ g/Kg (grupo tratado, barra roxa). As barras representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos; teste *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey; $p < 0,05$. Fonte: Elaborado pela autora

Diante do aumento significativo de macrófagos CD68⁺ no miocárdio de animais com AVEh e da prevenção dessa infiltração pelo tratamento com rilmenidina, foi investigado a presença de neutrófilos, cuja elevação também está associada à resposta inflamatória miocárdica. Para isso, foi realizada a marcação específica para Ly6G. Os resultados demonstraram um aumento expressivo do sinal fluorescente para Ly6G nos animais submetidos ao AVEh, em comparação com o grupo controle. Semelhante ao observado para CD68⁺, o tratamento com rilmenidina preveniu a infiltração de neutrófilos, conforme evidenciado na Figura 41A-D.

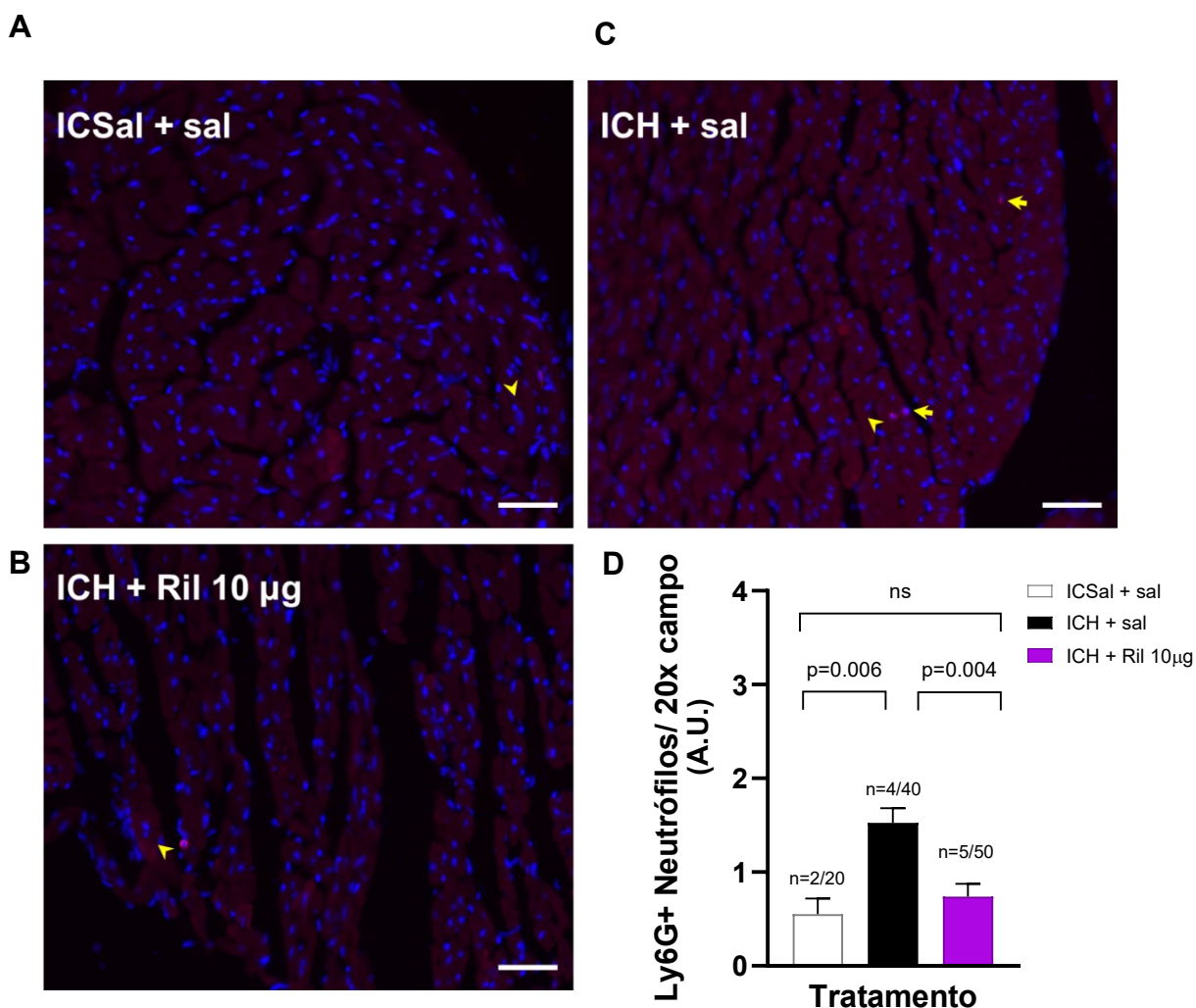


Figura 41 – Imunofluorescência para a proteína Ly6G+ no coração de camundongos C57BL/6J após 3 dias de AVEh experimental ou microinjeção de solução fisiológica no

IC e tratados durante os 3 dias. (A) setas amarelas indicam fluorescência de Ly6G⁺ no coração de animais ICSal + sal; **(B)** ICH + sal e **(C)** ICH + Ril 10 µg; **(D)** ICSal + sal (n=2): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica durante 3 dias (grupo controle, barra branca); ICH + sal (n=4): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril 10 µg (n=5): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 µg/Kg (grupo tratado, barra roxa). As barras representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos; teste *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey; $p < 0,05$. Fonte: Elaborado pela autora

3.6.4 Catecolaminas cardíacas

Para confirmar a presença da hiperativação simpática periférica induzida pelo AVEh, foi realizada a quantificação da concentração de catecolaminas no coração dos animais. A concentração de norepinefrina aumentou significativamente no coração dos animais com AVEh (ICSal + sal: $9 \pm 4 \text{ ng.mg}^{-1}$; ICH + sal: $25 \pm 14 \text{ ng.mg}^{-1}$; ICH + Ril 10 µg: $8 \pm 6 \text{ ng.mg}^{-1}$), refletindo a hiperatividade simpática. O tratamento com rilmenidina (10 µg/kg) reverteu esse aumento, restabelecendo os níveis de norepinefrina a valores semelhantes aos do grupo controle (Figura 42A). As concentrações de epinefrina no coração não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais (ICSal + sal: $145 \pm 68 \text{ ng.mg}^{-1}$; ICH + sal: $118 \pm 58 \text{ ng.mg}^{-1}$; ICH + Ril 10 µg: $152 \pm 63 \text{ ng.mg}^{-1}$) (Figura 42B).

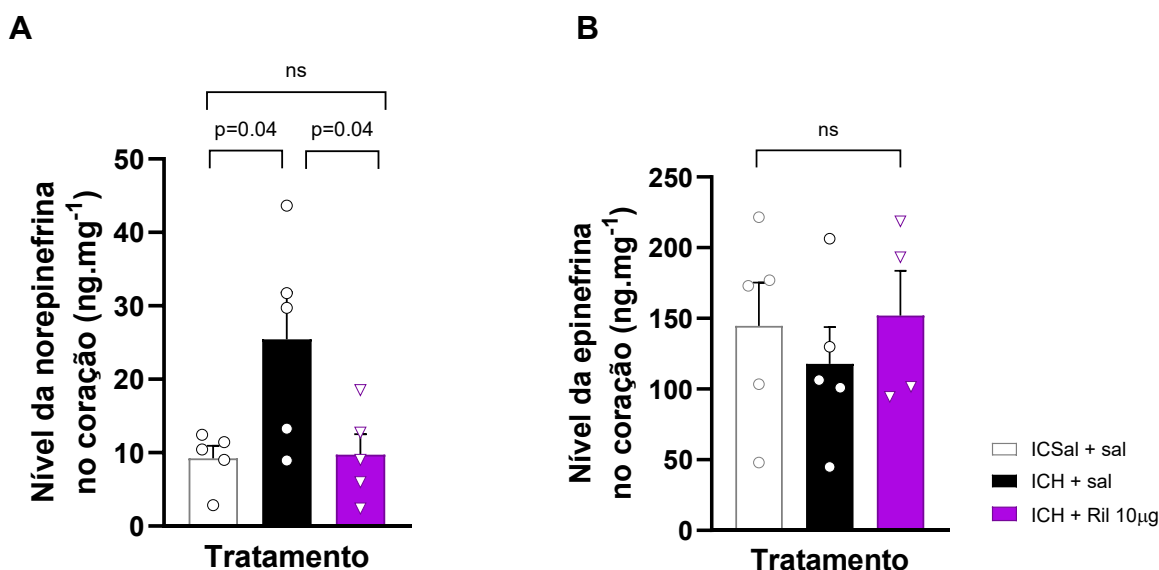


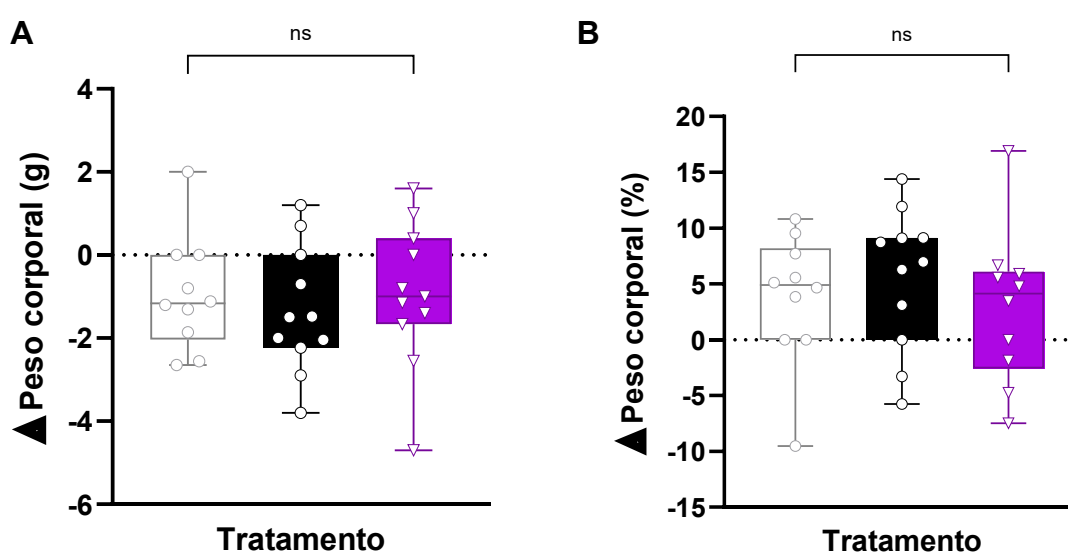
Figura 42 – Concentração de catecolaminas no coração de camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC. (A) Concentração de norepinefrina no coração. **(B)** Concentração de epinefrina no coração. ICSal + sal (n=5): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo

controle, barra branca); ICH + sal (n=5): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril 10 µg (n=5: dosagem NE; n=4: dosagem E): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 µg/Kg (grupo tratado, barra roxa). Os símbolos representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos; teste *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey; $p < 0,05$. Fonte: Elaborado pela autora

3.6.5 Parâmetros Morfométricos e Sobrevivência

3.6.5.1 Parâmetros Morfométricos

A análise da variação do peso corporal entre os períodos pré-cirúrgico e pré-eutanásia não revelou diferença significativa no peso absoluto (ICSal + sal: 0.95 ± 1.4 g; ICH +sal: 1.3 ± 1.5 g; ICH + Ril 10µg: 0.93 ± 1.7 g; $P < 0.05$), ou peso relativo entre os grupos (ICSal + sal: Δ Peso corporal diminuiu $\approx 1.8 \pm 7\%$; ICH +sal: Δ Peso corporal diminuiu $\approx 6 \pm 7\%$; ICH + Ril 10µg: Δ Peso corporal diminuiu $\approx 1.2 \pm 9\%$; $P < 0.05$) como podemos observar na Figura 43A-B. O peso do coração, normalizado pelo peso corporal (ICSal + sal: 5 ± 0.5 mg/g; ICH +sal: 4.6 ± 0.5 mg/g; ICH + Ril 10µg: 5 ± 0.5 mg/g; $P < 0.05$) ou pela tíbia (ICSal + sal: 6 ± 0.6 mg/g; ICH +sal: 6 ± 0.4 mg/g; ICH + Ril 10µg: 6 ± 0.3 mg/g; $P < 0.05$), também não apresentou diferença significativa (Figura 43C-D).



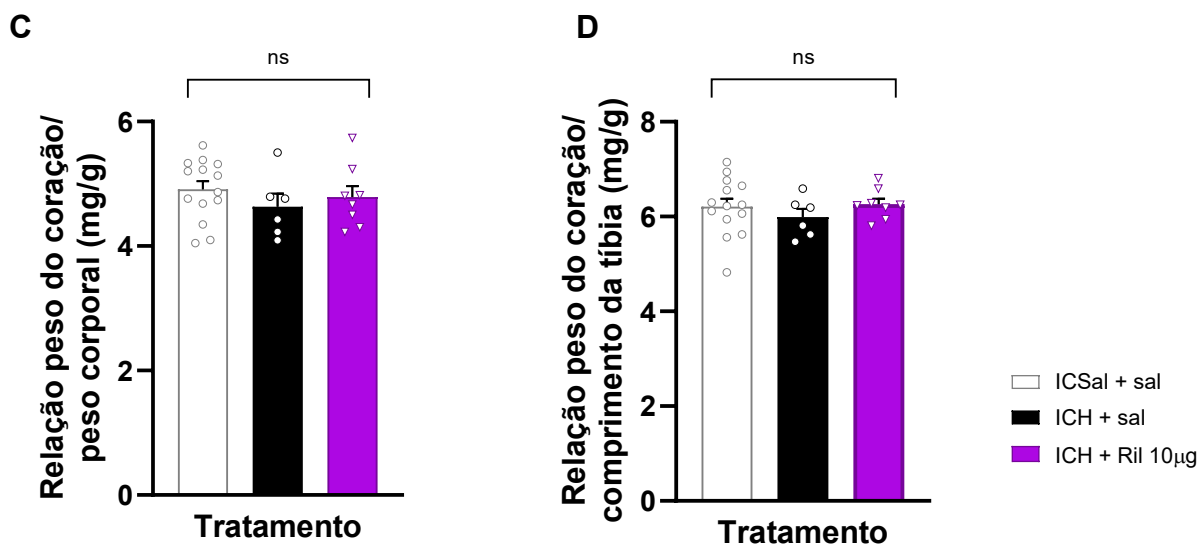


Figura 43 – Variação do peso corporal e relação entre o peso do coração e o peso corporal em camundongos C57BL/6J submetidos ao AVEh experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC. (A-B) Variação absoluta e percentual do peso corporal entre os períodos pré-cirúrgico e pré-eutanásia. **(C-D)** Relação entre o peso do coração e o peso corporal. ICSal + sal (n=14): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, barra branca); ICH + sal (n=6): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril 10 µg (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 µg/Kg (grupo tratado, barra roxa). Os símbolos representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos; teste *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey; $p < 0,05$. Fonte: Elaborado pela autora

O peso do rim direito normalizado pelo peso corporal (ICSal + sal: $6 \pm 0.3 \text{ mg/g}$; ICH + sal: $6 \pm 0.7 \text{ mg/g}$; ICH + Ril 10µg: $6 \pm 0.6 \text{ mg/g}$; $P < 0.05$) ou pela tíbia (ICSal + sal: $8 \pm 0.4 \text{ mg/g}$; ICH + sal: $8 \pm 1.2 \text{ mg/g}$; ICH + Ril 10µg: $8.5 \pm 1.1 \text{ mg/g}$; $P < 0.05$) não apresentaram diferença (Figura 44A-B). O peso do rim esquerdo normalizado pelo peso corporal também não apresentou diferença (ICSal + sal: $6 \pm 0.3 \text{ mg/g}$; ICH + sal: $5.6 \pm 0.5 \text{ mg/g}$; ICH + Ril 10µg: $6 \pm 0.4 \text{ mg/g}$; $P < 0.05$; Figura 44C), entretanto, quando normalizado pela tíbia o grupo AVEh apresentou diferença do grupo controle e grupo tratado (ICSal + sal: $8 \pm 0.4 \text{ mg/g}$; ICH + sal: $7 \pm 0.1 \text{ mg/g}$; ICH + Ril 10µg: $8 \pm 0.6 \text{ mg/g}$; $P < 0.05$) como podemos observar na Figura 44D.

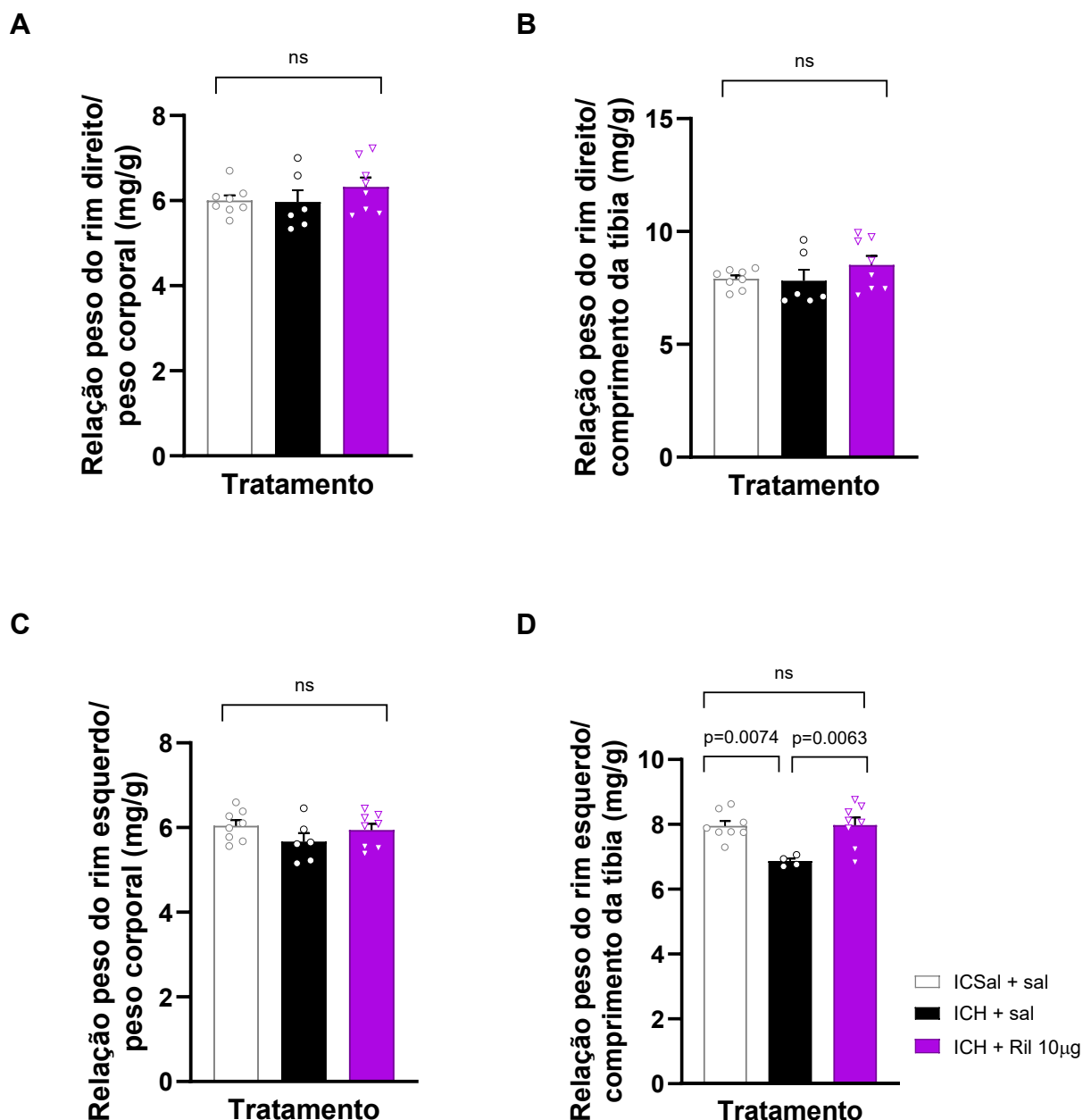


Figura 44 – Relação entre o peso dos rins (direito e esquerdo) e o peso corporal ou comprimento da tibia em animais submetidos ao AVE hemorrágico experimental ou à microinjeção de solução fisiológica no IC. (A) Relação entre o peso do rim direito e peso corporal; (B) Relação entre o peso do rim direito e comprimento da tibia (C) Relação entre o peso do rim esquerdo e peso corporal; (D) Relação entre o peso do rim esquerdo e comprimento da tibia. ICSal + sal (n=8): microinjeção de solução fisiológica no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo controle, barra branca); ICH + sal (n=6): microinjeção de sangue autólogo no IC e injeção i.p. de solução fisiológica (grupo não tratado, barra preta); ICH + Ril 10 µg (n=8): microinjeção de sangue autólogo no IC e tratamento com rilmenidina na dose de 10 µg/Kg (grupo tratado, barra roxa). Os símbolos representam a média; a variação de erro indica o erro padrão da média $\pm$ EPM. Análise estatística: n.s. indica que não houve diferença entre os grupos; teste *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey; $p < 0,05$. Fonte: Elaborado pela autora

3.6.5.2 Sobrevivência

As curvas de sobrevivência mostradas na Figura 45 evidenciaram que houve diferença significativa no tempo de sobrevivência entre os grupos, demonstrando que o tratamento com rilmenidina oferece proteção pós-AVEh e pós-cirurgia em animais ICSal.

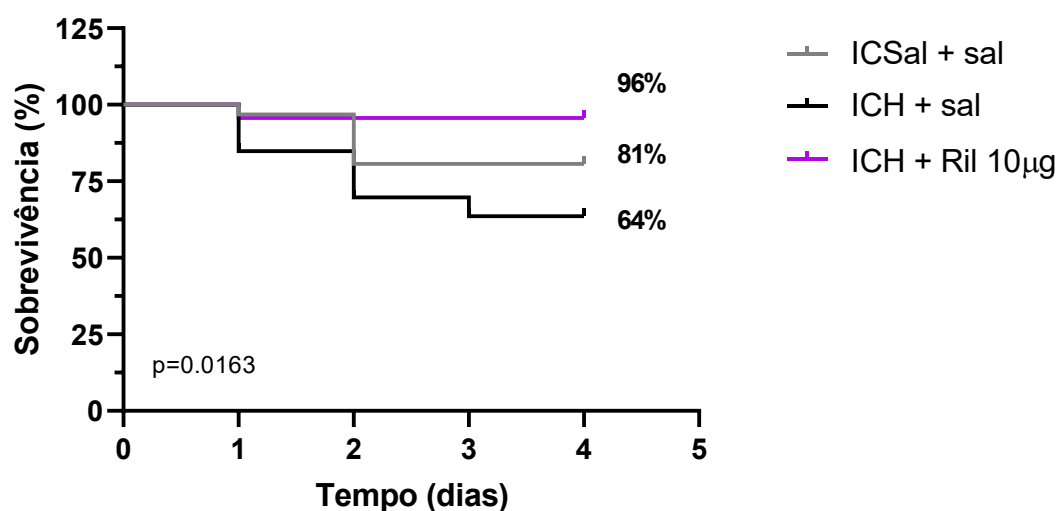


Figura 45 – Representação gráfica da comparação das curvas de sobrevivência de camundongos C57BL/6J com AVEh experimental que receberam veículo ou rilmenidina 10 µg/Kg e submetidos aos experimentos cardiovasculares. Grupo ICSal + Sal: n=25 e mortalidade n=6; Grupo ICH + Sal: n=21 e mortalidade n=12; grupo ICH + Ril 10 µg/Kg: n=22 e mortalidade n=1. Comparação realizada pelo teste de Mantel-Cox com significância quando $p < 0.05$. Fonte: Elaborado pela autora

3.7 Discussão

O presente estudo estabeleceu a padronização e caracterização do modelo de AVEh no IC de camundongos da linhagem C57BL/6J. A etapa inicial dos experimentos consistiu na padronização das coordenadas estereotáticas. As coordenadas foram ajustadas para atingir o IC direito intermediário, visando investigar se as alterações simpáticas cardíacas, previamente observadas no modelo em ratos, seriam reproduzidas nos camundongos. Adicionalmente à padronização estereotática, foi conduzido o experimento de determinação do *time point* ideal para identificar o período mais adequado e viável para a investigação dos possíveis efeitos do AVEh.

O AVEh no IC demonstrou ser um potente desencadeador de disfunção autonômica e injúria cardíaca em camundongos. O primeiro achado relevante foi a taquicardia sustentada, observada apenas no Dia 3 pós-AVEh e ausente no Dia 1. Esse intervalo entre o AVEh e o surgimento da taquicardia sugere que a alteração cardíaca não foi ocasionada por um efeito imediato da lesão, mas por um possível esgotamento progressivo de mecanismos compensatórios (como por exemplo: barorreflexo) (Colivicchi et al., 2004; Sykora et al., 2009). Assim, no Dia 1 esses mecanismos estariam ativos, mascarando a hiperativação simpática central. E no Dia 3, estariam esgotados ou a hiperativação simpática estaria mais acentuada, sobrepondo-se à proteção reflexa e manifestando a taquicardia. Entretanto, foi possível observar um infiltrado de macrófagos CD68⁺ no tecido cardíaco já no Dia 1 pós-AVEh. Este achado sugere que, apesar de a taquicardia ainda não estar presente, o tecido cardíaco já estava sofrendo algum tipo de injúria ou estresse inflamatório precoce, associado provavelmente à lesão no IC pelo AVEh.

Desse modo, foi estabelecido 3 Dias como o *time point* ideal para a realização dos experimentos subsequentes. O perfil do infiltrado celular no tecido cardíaco indicou um aumento de leucócitos CD45⁺, macrófagos e monócitos CD64⁺Ly6G⁺, e macrófagos e monócitos CCR2⁺ em animais com AVEh insular, confirmando a presença de inflamação tecidual. Esse achado representa uma semelhança importante com o que é observado na Síndrome de Takotsubo (Síndrome do Coração Partido). A Síndrome de Takotsubo é caracterizada por uma disfunção ventricular aguda desencadeada por estresse emocional ou físico muito intenso, mediada por uma descarga maciça de catecolaminas, e que cursa com infiltração inflamatória no tecido cardíaco (Lyon et al., 2008). O perfil dos tipos de células imunes no tecido

cardíaco pode variar conforme o seu estado de condições fisiológicas ou patológicas, a composição de macrófagos, por exemplo, em seu estado normal possui uma presença maior de macrófagos CCR2⁻ que são células predominantemente de origem embrionária e que se proliferam localmente no tecido, atuam na homeostase local, em processos vitais como a condução dos estímulos elétricos no miocárdio (Hulsmans et al., 2017). Em condições patológicas ocorre mudança do perfil destes macrófagos, e monócitos CCR2⁺ são recrutados a partir da medula óssea migram para o tecido cardíaco, local da injúria, e diferenciam-se em macrófagos CCR2⁺ que possuem um papel predominantemente pró-inflamatório, atuam na reparação tecidual e na amplificação da resposta imune local (Epelman et al., 2014; Lavine et al., 2014). Portanto, a presença desse perfil inflamatório, caracterizado pelo aumento de células CCR2⁺, indica que o modelo de AVEh no IC mimetiza o componente inflamatório observado na Síndrome de Takotsubo. Esses achados sugerem que a hiperatividade simpática induzida pelo AVEh no IC pode contribuir tanto para o desenvolvimento da taquicardia quanto para o desencadeamento da resposta inflamatória cardíaca. A Figura 46 apresenta um esquema ilustrativo do coração antes e após o AVE hemorrágico insular e o recrutamento de monócitos CCR2⁺.

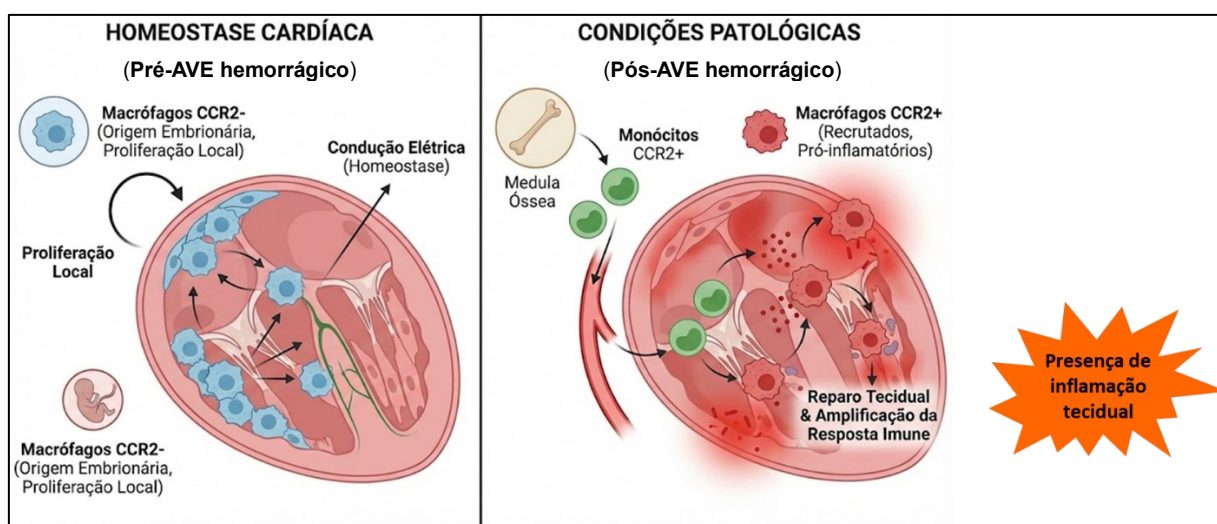


Figura 46 – Esquema ilustrativo do coração antes e após o AVE hemorrágico insular e o recrutamento de monócitos CCR2⁺. Fonte: Elaborado pela autora

A taquicardia e o aumento de células imunes no coração observados nos animais com AVEh no IC foram prevenidos pelo tratamento com rilmenidina. Esse efeito é consistente com achados prévios em ratos e com o mecanismo de ação da rilmenidina, cujo principal sítio de ação são os receptores I₁ na RVLM. A ativação

desses receptores inibe a saída simpática central e, conseqüentemente, impede a hiperatividade simpática induzida pelo AVEh no IC no grupo tratado.

O aumento significativo e seletivo da NE no tecido cardíaco, sem alterações nos níveis de E, constitui um importante marcador da hiperatividade simpática cardíaca. Este achado corrobora que o AVEh no IC desregulou o controle autonômico central, resultando em uma maior liberação periférica de NE. A NE é a principal catecolamina liberada pelas terminações nervosas simpáticas pós-ganglionares diretamente no miocárdio, e seu aumento no tecido cardíaco reflete o aumento da atividade nervosa simpática direcionada ao coração (Goldstein, 2025; Wong, 2006; XU; LI, 2015). Por outro lado, a E é liberada principalmente pela medula adrenal e reflete a ativação do eixo HPA em resposta sistêmica ao estresse. A ausência de alteração na E tecidual sugere que o AVEh no IC não desencadeou um aumento significativo de epinefrina circulante (Goldstein, 2025; Wong, 2006; XU; LI, 2015). Tais resultados são consistentes com os achados apresentados anteriormente no Capítulo I.

A hiperativação simpática, evidenciada pelo aumento de NE no miocárdio, funciona como um potente sinal pró-inflamatório que contribui para a transmigração de células do sistema imune e a expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM-1, por meio da ativação de vias como a do NF- κ B (Kopp, 2015). Os corações dos animais AVEh sem tratamento apresentaram infiltração de macrófagos CD68⁺ e neutrófilos Ly6G⁺. A presença de ambas as populações celulares, em um contexto como este de hiperatividade simpática e AVEh, pode estar associada ao início do desenvolvimento de uma miocardite neurogênica. A liberação excessiva de NE é cardiotóxica, pode causar necrose de cardiomiócitos e liberação de DAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Dano) que, por sua vez, podem recrutar macrófagos e neutrófilos (Hu et al., 2023; Roth; Wernsdorf; Liesz, 2023). A infiltração de neutrófilos Ly6G⁺ é característica da fase aguda da inflamação, enquanto a presença de macrófagos CD68⁺ sugere o início da fase de reparo ou a persistência do estímulo inflamatório, portanto, a presença destas podem indicar resposta inflamatória cardíaca (Hu et al., 2023).

É importante notar que: nos experimentos de *time point* – Dia 1 os corações dos animais com AVEh apresentaram infiltração de macrófagos CD68⁺, isto é, antes da taquicardia estar instalada a infiltração de macrófagos já estava presente. Ou seja, o aumento de macrófagos CD68⁺ não ocorreu devido à presença de taquicardia.

A rilmenidina ao atuar nos receptores I_1 e reduzir a hiperatividade simpática induzida pelo AVEh previne a liberação excessiva de NE no coração, impedindo este que é o principal gatilho para a expressão de substâncias como quimiocinas, moléculas de adesão e a ativação de vias inflamatórias no miocárdio. Além disso, ao normalizar o tônus simpático, a rilmenidina também acaba por preservar a integridade do endotélio vascular cardíaco, tornando-o menos permeável e menos propenso a infiltração por células do sistema imune (Hua et al., 2025; Yalçın et al., 2023).

A manutenção do peso corporal, no período de observação (agudo/subagudo), sugere que o AVEh e o tratamento com rilmenidina não parece ter induzido um estado de catabolismo importante o suficiente para causar perda de peso corporal significativa. Em relação ao coração, o peso cardíaco normalizado é um importante indicador morfológico de hipertrofia cardíaca e a ausência de diferença indica que o AVEh, mesmo com hiperativação simpática e infiltrado inflamatório, não parece ter causado hipertrofia durante o período experimental.

A alteração no peso do rim esquerdo, observada após a normalização pelo comprimento da tíbia, sugere uma disfunção renal induzida pelo AVEh. Classicamente, a inervação simpática renal é descrita como sendo estritamente ipsilateral, com as fibras pré-ganglionares originando-se na coluna intermediolateral da medula espinal (T9-T13) e fazendo sinapse em gânglios pré-vertebrais (celíaco e aorticorrenal) do mesmo lado, antes de atingirem o órgão alvo (DiBona, 2000a). Esta organização anatômica (canônica) implicaria que o AVEh no hemisfério direito deveria afetar preferencialmente o rim direito. Entretanto, algumas evidências neuroanatômicas e eletrofisiológicas sugerem que esta lateralidade não é absoluta. Estudos de rastreamento neuronal e registros de potenciais evocados identificaram a existência de vias descendentes contralaterais que decussam em níveis espinais torácicos, o que permitiria que o fluxo simpático de um lado do sistema nervoso central influencie o nervo renal contralateral (McAllen; May, 1990). Ou seja, partindo dessa organização estrutural, a hiperativação simpática originada no IC direito poderia afetar o rim esquerdo. Também não podemos esquecer o IC apresenta lateralização: o hemisfério direito está associado a uma maior influência simpática e, possui controle tônico inibitório sobre a atividade cardiovascular e renal (Hachinski et al., 1992; Butcher & Cechetto, 1995; Zhang; Oppenheimer, 1997; Marins et al., 2020; Cai et al., 2022; Dos Santos Machado, 2026).

Assim, o AVEh no IC direito pode ter resultado na perda dessa inibição tônica, resultando em uma resposta simpática exacerbada e assimétrica sob o rim esquerdo. Supondo que haja essa hiperativação simpática no rim esquerdo, ela estaria provocando liberação persistente de NE local, o que poderia estar resultando em a vasoconstrição das arteríolas, redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular, desencadeando uma intensa ativação do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona local. Como desfecho, pode estar havendo por exemplo retenção de sódio e água, alterações morfológicas estruturais, como hipertrofia tecidual, fibrose intersticial e apoptose celular o que resultaria no aumento de peso do rim esquerdo que observamos (DiBona, 2000a, 2000b). Portanto, o aumento do peso do órgão observado neste experimento pode não ser apenas um achado isolado, mas o reflexo de um remodelamento tecidual patológico após o AVEh insular. O fato de o tratamento com rilmenidina prevenir o aumento do peso do rim esquerdo nos animais tratados sugere que este fármaco pode estar exercendo algum efeito protetor renal ao restaurar o desequilíbrio da atividade simpática central causado pelo AVEh no IC.

O tratamento com rilmenidina também conferiu uma proteção significativa contra a mortalidade, uma vez que a sobrevivência do grupo tratado foi superior à dos grupos AVEh sem tratamento e Controle. Este resultado é importante, pois indica que a rilmenidina oferece uma proteção adicional contra a mortalidade basal que afetou o grupo Controle. Isso significa que os procedimentos cirúrgicos ou o estresse pós-operatório também impõem um risco adicional de morte.

O modelo de hemorragia insular em camundongos C57BL/6J aqui estabelecido apresenta três tipos fundamentais de validade que sustentam sua relevância translacional. A validade de face refere-se à semelhança fenomenológica entre o modelo e a condição humana (Pankevich et al., 2013). No presente estudo, a injeção de sangue autólogo no IC mimetiza o extravasamento sanguíneo característico da hemorragia intracerebral espontânea, reproduzindo as principais características clínicas e histopatológicas observadas em pacientes. A validade de constructo diz respeito à fidelidade com que o modelo reproduz os mecanismos moleculares e estruturais associados à doença (Pankevich et al., 2013). Demonstramos que a hemorragia experimental insular desencadeia os principais processos fisiopatológicos observados em humanos, como a hiperatividade simpática e as repercussões cardiovasculares sistêmicas. A validade preditiva, por sua vez, refere-se à capacidade do modelo de responder a intervenções terapêuticas de forma análoga ao que seria

esperado na clínica (Pankevich et al., 2013). O tratamento com rilmenidina foi capaz de atenuar as alterações cardiovasculares pós-hemorragia, indicando que o modelo responde ao tratamento farmacológico e, portanto, pode ser utilizado para investigação de novas estratégias terapêuticas voltadas à modulação simpática central.

Em resumo, os resultados obtidos demonstram que o modelo de AVEh no IC direito de camundongos induz uma hiperativação simpática importante, caracterizada por taquicardia, aumento da NE e infiltração de células imunes no miocárdio, além de um potencial prejuízo no rim esquerdo. O tratamento com rilmenidina normalizou estes parâmetros, prevenindo a injúria cardíaca e conferindo uma sobrevida superior aos animais tratados. Estes achados validam o modelo de AVEh no IC de camundongos como uma estratégia importante para a investigação dos mecanismos associados ao AVEh insular. Adicionalmente, o estudo demonstra a eficácia da rilmenidina em reduzir essas injúrias induzidas pelo AVEh.

3.8 Conclusão

O presente estudo estabeleceu de forma inédita a padronização e a caracterização do modelo experimental de AVEh no córtex insular de camundongos C57BL/6J, demonstrando que a lesão nessa região é capaz de desencadear uma intensa hiperativação simpática manifestada por taquicardia persistente e aumento de norepinefrina, processo inflamatório de intensidade branda no coração, além de indícios de comprometimento do rim esquerdo, evidenciando um impacto sistêmico do AVEh insular. O tratamento com rilmenidina mostrou-se eficaz ao prevenir a taquicardia e de norepinefrina, o quadro inflamatório cardíaco e promover maior sobrevida dos animais tratados, reforçando a hipótese de que sua ação se dá principalmente pela restauração do equilíbrio da atividade simpática central.

Embora todo modelo experimental apresente limitações, o protocolo aqui padronizado configura uma ferramenta importante, relevante e necessária para a pesquisa translacional. Este modelo possibilita a investigação de mecanismos fisiopatológicos envolvidos na injúria hemorrágica cerebral localizada, a avaliação de intervenções terapêuticas e contribui de maneira significativa para o avanço do entendimento dos mecanismos autonômicos e cardiovasculares associados ao AVEh.

4 CONCLUSÃO GERAL

. Este estudo demonstrou que o AVEh no córtex insular de roedores desencadeia uma disfunção autonômica simpática de origem central, com repercussões moleculares e sistêmicas significativas, consolidando o córtex insular como uma região crítica no controle autonômico cardiovascular. Além disso, este estudo estabeleceu com sucesso o modelo experimental de AVEh no córtex insular de camundongos C57BL/6J. Em conjunto, os achados destacam a rilmenidina como uma estratégia farmacológica importante no tratamento das disfunções cardiovasculares associadas ao AVEh insular e reforçam a relevância do modelo de AVEh insular em roedores para a investigação e compreensão dos mecanismos fisiopatológicos relacionados ao AVEh insular.

4.1 Limitações do Trabalho

Embora os resultados deste estudo sejam consistentes, algumas limitações metodológicas devem ser consideradas. Os experimentos foram conduzidos exclusivamente em animais machos, tanto ratos quanto camundongos. Sabe-se que o sexo pode influenciar de maneira significativa parâmetros fisiológicos ou a resposta a fármacos. Assim, a ausência de um estudo em fêmeas pode limitar a extrapolação dos presentes resultados ou dificultar a avaliação de possíveis diferenças dependentes do sexo.

Outra limitação refere-se à procedência dos animais. Nos experimentos finais, foi necessário utilizar animais oriundos de um biotério distinto daquele utilizado inicialmente. Diferenças sutis nas condições de criação, microbiota, manejo ou estresse basal podem influenciar parâmetros fisiológicos e autonômicos, introduzindo variabilidade adicional aos resultados.

No modelo em camundongos, o volume da injeção no córtex insular poderia ser menor para reduzir ainda mais a dispersão tecidual. Entretanto, em função do tempo disponível para a execução do estudo e da necessidade de priorizar um método reprodutível e operacionalmente mais simples, optou-se por um volume maior, que permitiu o uso de seringas convencionais (Hamilton, EUA) em vez de micropipetas de vidro que permitem um volume ainda menor de injeção.

Adicionalmente, o número amostral destinado às análises de Western-blot para avaliação dos receptores β -adrenérgicos foi reduzido em decorrência de um episódio de descongelamento acidental do freezer a -80°C , comprometendo parte do material biológico armazenado. Esse fato impactou o poder estatístico dessas análises específicas e exige cautela na interpretação dos resultados relacionados à expressão dos receptores β_1 e β_2 .

Além disso, o tecido cardíaco utilizado para os experimentos de Western-blot não correspondeu ao coração íntegro, mas a fragmentos selecionados, sem distinção entre átrios e ventrículos. Considerando que diferentes regiões cardíacas apresentam perfis distintos de inervação simpática, densidade de receptores e resposta à sobrecarga adrenérgica, essa abordagem pode ter mascarado possíveis alterações regionais.

Em conjunto, essas limitações não são para invalidar os achados da tese, mas apenas para delimitar nossa interpretação a respeito dos dados aqui apresentados.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1 Avaliação Crônica e Remodelamento Cardíaco

Estudos futuros devem avaliar contextos de experimentação crônica, a fim de determinar se a disfunção autonômica induzida pelo AVEh no córtex insular pode progredir para remodelamento cardíaco estrutural e funcional. Essa abordagem permitirá avaliar se a rilmenidina é capaz além de modular respostas agudas, prevenir ou reverter cardiomiopatias provocadas pelo AVEh insular.

5.2 Dimorfismo Sexual

A validação do modelo em roedores fêmeas é um passo muito importante para ampliar a relevância translacional do estudo e a elucidação de mecanismos associados ao AVEh.

5.3 Sinalização Adrenérgica Cardíaca

A investigação da sinalização β -adrenérgica deve avaliar além da expressão total dos receptores, incorporar análises de dessensibilização, fosforilação e internalização dos receptores β_1 e β_2 no miocárdio. Isso é essencial para verificar se a rilmenidina preserva a resposta adrenérgica cardíaca e para compreender os mecanismos de sua ação cardioprotetora.

REFERÊNCIAS

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ DU MÉDICAMENT ET DES PRODUITS DE SANTÉ (ANSM). **HYPERIUM 1 mg, comprimé**: résumé des caractéristiques du produit. Paris: ANSM, 2026. Disponível em: <https://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/extrait.php?specid=62174246>. Acesso em: 12 fev. 2026.

ALEKSANDROV, V. G.; ALEKSANDROVA, N. P. The role of the insular cortex in the control of visceral functions. **Human Physiology**, v. 41, n. 5, p. 553–561, set. 2015.

ALLAN, D. R.; PENNER, S. B.; SMYTH, D. D. Renal imidazoline preferring sites and solute excretion in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 108, n. 4, p. 870–875, abr. 1993.

ALVES, Fernando H. F. et al. N-methyl-d-aspartate receptors in the insular cortex modulate baroreflex in unanesthetized rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 147, n. 1–2, p. 56–63, maio 2009a.

ALVES, Fernando H. F. et al. Insular cortex $\alpha 1$ -adrenoceptors modulate the parasympathetic component of the baroreflex in unanesthetized rats. **Brain Research**, v. 1295, p. 119–126, out. 2009b.

ALVES, Fernando H. F. et al. Involvement of the insular cortex in the consolidation and expression of contextual fear conditioning. **European Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 2, p. 2300–2307, jul. 2013.

ALVES, Fernando H. F. et al. Both $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -adrenoceptors in the Insular Cortex Are Involved in the Cardiovascular Responses to Acute Restraint Stress in Rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e83900, jan. 2014.

ALVES, Thales B. et al. GABA mechanisms of the nucleus of the solitary tract regulates the cardiovascular and sympathetic effects of moxonidine. **Autonomic Neuroscience**, v. 194, p. 1–7, jan. 2016.

BAI, Qian et al. Intracerebral haemorrhage: from clinical settings to animal models. **Stroke and Vascular Neurology**, v. 5, n. 4, p. 388–395, dez. 2020.

BAUDUCEAU, Bernard; MAYAUDON, Hervé; DUPUY, Olivier. Rilmenidine in the Hypertensive Type-2 Diabetic: A Controlled Pilot Study versus Captopril. **Journal of Cardiovascular Risk**, v. 7, n. 1, p. 57–61, 1 fev. 2000.

BELEM-FILHO, Ivaldo J. A. et al. Role of endocannabinoid neurotransmission in the insular cortex on cardiovascular, autonomic and behavioral responses evoked by acute restraint stress in rats. **Neuropharmacology**, v. 271, p. 110404, jun. 2025.

BERNTSON, Gary G.; KHALSA, Sahib S. Neural Circuits of Interoception. **Trends in Neurosciences**, v. 44, n. 1, p. 17–28, jan. 2021.

BIVER, Françoise et al. Serotonin 5-HT₂ receptor imaging in major depression: focal changes in orbito-insular cortex. **British Journal of Psychiatry**, v. 171, n. 5, p. 444–448, nov. 1997.

BONTHIUS, Daniel J.; SOLODKIN, Ana; VAN HOESEN, Gary W. Pathology of the Insular Cortex in Alzheimer Disease Depends on Cortical Architecture: **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 64, n. 10, p. 910–922, out. 2005.

BOURREAU, J. P.; TRICOCHÉ, R. Prejunctional alpha 2-adrenergic properties of S-3341 (dicyclopropylmethyl)amino-2-delta-2-oxazoline: a comparison with clonidine. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 65, n. 12, p. 2496–2499, dez. 1987.

BOUSQUET, P.; FELDMAN, J.; SCHWARTZ, J. Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 230, n. 1, p. 232–236, jul. 1984.

BOUSQUET, P.; GUERTZENSTEIN, P. G. Localization of the central cardiovascular action of clonidine. **British Journal of Pharmacology**, v. 49, n. 4, p. 573–579, dez. 1973.

BOUSQUET, Pascal et al. The nucleus reticularis lateralis: A region highly sensitive to clonidine. **European Journal of Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 389–392, jan. 1981.

BOUSQUET, Pascal et al. New concepts on the central regulation of blood pressure. **The American Journal of Medicine**, v. 87, n. 3, p. S10–S13, set. 1989.

BOUSQUET, Pascal et al. Imidazoline receptors: a challenge. **Pharmacochimistry Library**, v. 31, p. 205-209, 2000.

BRICCA, Giampiero et al. Evidence for the existence of a homogenous population of imidazoline receptors in the human brainstem. **European Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 3, p. 401–402, jun. 1988.

BRICCA, Giampiero et al. Rilmenidine selectivity for imidazoline receptors in human brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 2–3, p. 373–377, abr. 1989.

BRITISH NATIONAL FORMULARY (BNF). **Rilmenidine**. London: BMJ Group and Pharmaceutical Press, 2026. Disponível em: <https://bnf.nice.org.uk/drugs/rilmenidine/>. Acesso em: 12 fev. 2026.

BROEKKAMP et al. Animal Models for Anxiety and Response to Serotonergic Drugs. **Psychopathology**, n. 22, p. 2–12, 1989.

BROEKKAMP, Chris L. et al. Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 3, p. 223–229, jul. 1986.

(BUD) CRAIG, A. D. How do you feel — now? The anterior insula and human awareness. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 59–70, jan. 2009.

BUTCHER, K. S.; CECETTO, D. F. Autonomic responses of the insular cortex in hypertensive and normotensive rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 268, n. 1, p. R214–R222, jan. 1995.

CAI, Yingyuan et al. Increased renal dysfunction, apoptosis, and fibrogenesis through sympathetic hyperactivity after focal cerebral infarction. **Translational Stroke Research**, v. 13, n. 4, p. 641–651, 2022.

CAMPBELL, Bruce C. V. et al. Ischaemic stroke. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 70, 10 out. 2019.

CHAN, Candy K. S.; BURKE, Sandra L.; HEAD, Geoffrey A. Contribution of imidazoline receptors and alpha2-adrenoceptors in the rostral ventrolateral medulla to sympathetic baroreflex inhibition by systemic rilmenidine. **Journal of Hypertension**, v. 25, n. 1, p. 147–155, jan. 2007.

CHANG, MinCheol et al. Early treadmill exercise increases macrophage migration inhibitory factor expression after cerebral ischemia/reperfusion. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 7, p. 1230, 2019.

CHEN, Hao et al. Biased activation of β 2-AR/Gi/GRK2 signal pathway attenuated β 1-AR sustained activation induced by β 1-adrenergic receptor autoantibody. **Cell Death Discovery**, v. 7, n. 1, p. 340, nov. 2021.

CHEN, Xiaosheng; GU, Jiajie; ZHANG, Xiaojia. Brain-Heart Axis and the Inflammatory Response: Connecting Stroke and Cardiac Dysfunction. **Cardiology**, v. 149, n. 4, p. 369–382, 2024.

CHRISTENSEN, H. Insular lesions, ECG abnormalities, and outcome in acute stroke. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 76, n. 2, p. 269–271, fev. 2005.

COFFEEN, Ulises et al. The Role of the Insular Cortex and Serotonergic System in the Modulation of Long-Lasting Nociception. **Cells**, v. 13, n. 20, p. 1718, 17 out. 2024.

COLIVICCHI, Furio et al. Cardiac Autonomic Derangement and Arrhythmias in Right-Sided Stroke With Insular Involvement. **Stroke**, v. 35, n. 9, p. 2094–2098, set. 2004.

CORNELISSEN, Germaine. Cosinor-based rhythmometry. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 11, n. 1, p. 16, dez. 2014.

CUNHA SILVA, Carina; FONTES, Marco Antônio Peliky. Cardiovascular reactivity to emotional stress: The hidden challenge for pets in the urbanized environment. **Physiology & Behavior**, v. 207, p. 151–158, ago. 2019.

DEMICHEV. **DiaNN**. Disponível em: <<https://github.com/vdemichev/DiaNN>>. jan. 2026.

DIBONA, Gerald F. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 5, p. R1517–R1524, nov. 2000a.

DIBONA, Gerald F. Nervous Kidney: Interaction Between Renal Sympathetic Nerves and the Renin-Angiotensin System in the Control of Renal Function. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 1083–1088, dez. 2000b.

DOS SANTOS MACHADO, Liliane Ramos et al. Losartan treatment attenuates the cardiorenal alterations in a rat model of hemorrhagic insular stroke. **Clinical Autonomic Research**, p. 1-4, 2026.

EHRHARDT, J. D. Gas chromatographic negative ion mass spectrometric assay of 2-dicyclopropylmethylamino-2-oxazoline (S-3341), a new antihypertensive drug. **Biological Mass Spectrometry**, v. 12, n. 10, p. 593–595, out. 1985.

ELIEZECK, Marcos et al. β -Adrenergic signaling drives structural and functional maturation of mouse cardiomyocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 326, n. 5, p. C1334–C1344, maio 2024.

EPELMAN, Slava et al. Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 91–104, jan. 2014.

ERNSBERGER, P. et al. Role of imidazole receptors in the vasodepressor response to clonidine analogs in the rostral ventrolateral medulla. **The Journal of**

Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 253, n. 1, p. 408–418, abr. 1990.

ERNSBERGER, P. et al. I1-imidazoline receptors. Definition, characterization, distribution, and transmembrane signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 763, p. 22–42, 12 jul. 1995.

ERNSBERGER, Paul; HAXHIU, Musa A. The I₁ -imidazoline-binding site is a functional receptor mediating vasodepression via the ventral medulla. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 273, n. 5, p. R1572–R1579, nov. 1997.

ESLER, Murray et al. Rilmenidine sympatholytic activity preserves mental stress, orthostatic sympathetic responses and adrenaline secretion. **Journal of Hypertension**, v. 22, n. 8, p. 1529–1534, ago. 2004.

FALASCHI, Domiziana; STAGG, Charlotte; SEL, Alejandra. Promoting motor recovery after stroke using cortico-cortical paired associative stimulation. **eClinicalMedicine**, v. 88, p. 103473, out. 2025.

FEIGIN, Valery L. et al. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. **International Journal of Stroke**, v. 17, n. 1, p. 18–29, jan. 2022.

FELDMAN, J. et al. Evidence for the involvement of imidazoline receptors in the central hypotensive effect of rilmenidine in the rabbit. **British Journal of Pharmacology**, v. 100, n. 3, p. 600–604, jul. 1990.

GARGALIDIS-MOUDANOS, C.; PARMI, Angelo. Selectivity of rilmenidine for I1-imidazoline-binding sites in rabbit proximal tubule cells. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 26, p. S59-62, 1995.

GEHRLACH, Daniel A. et al. A whole-brain connectivity map of mouse insular cortex. **eLife**, v. 9, p. e55585, 17 set. 2020.

GOGOLLA, Nadine. The insular cortex. **Current Biology**, v. 27, n. 12, p. R580–R586, jun. 2017.

GOLDSTEIN, David S. Peripheral catecholamine systems: an evolutionary perspective. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 329, n. 6, p. R1032–R1052, dez. 2025.

GOMEZ, Roberto E. et al. Rilmenidine lowers arterial pressure via imidazole receptors in brainstem C1 area. **European journal of pharmacology**, v. 195, n. 2, p. 181-191, 1991.

GOULART, Melissa T. et al. NMDA receptors in the insular cortex modulate cardiovascular and autonomic but not neuroendocrine responses to restraint stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 119, p. 110598, dez. 2022.

GRENEY, Hugues et al. Coupling of I1 Imidazoline Receptors to the cAMP Pathway: Studies with a Highly Selective Ligand, Benazoline. **Molecular Pharmacology**, v. 57, n. 6, p. 1142–1151, jun. 2000.

HACHINSKI, V. C. et al. The Insula and Altered Sympathetic Activity after Experimental Stroke. In: STOBER, T. et al. (Orgs.). **Central Nervous System Control of the Heart: Proceedings of the IIIrd International Brain Heart Conference Trier, Federal Republic of Germany**. Boston, MA: Springer US, p. 181–186, 2012.

HADAMITZKY, Martin et al. Pavlovian Conditioning of Immunological and Neuroendocrine Functions. **Physiological Reviews**, v. 100, n. 1, p. 357–405, jan. 2020.

HALBERG, F. Temporal Coordination of Physiologic Function. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 25, n. 0, p. 289–310, jan. 1960.

HU, Jiun-Ruey et al. The Brain–Heart Axis: Neuroinflammatory Interactions in Cardiovascular Disease. **Current Cardiology Reports**, v. 25, n. 12, p. 1745–1758, dez. 2023.

HUA, Qiuwei et al. Rilmenidine attenuates intracerebral hemorrhage by regulating autophagy flux and apoptosis via the HO-1/Fe2+/ERK pathway. **Neuroscience**, v. 573, p. 382–398, maio 2025.

HULSMANS, Maarten et al. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 510–522.e20, abr. 2017.

INFARMED – AUTORIDADE NACIONAL DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE. **Hyperium: rilmenidina**. Resumo das Características do Medicamento. Lisboa: INFARMED, 2026. Disponível em: https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml?med_guid=fc6503b06d6111e293f2ba60b1601f19. Acesso em: 12 fev. 2026.

ITERIUM. **Iterium 1 mg: rilmenidina**. Fachinformation des Arzneimittels. Viena: Iterium Pharma GmbH; s.d. Disponível em: <https://medikamente.basg.gv.at/en/medicinal-products/9d994cdad7d4659cc1a24edd1f402046862f93c7>. Acesso em: 12 fev. 2026.

JUEN, Zhang; VILLAVICENCIO, Miguel; ZUKER, Charles S. A neural substrate for short-term taste memories. **Neuron**, v. 112, n. 2, p. 277- 287.e4, jan. 2024.

KAPP, Bruce S.; SCHWABER, James S.; DRISCOLL, Patricia A. The organization of insular cortex projections to the amygdaloid central nucleus and autonomic regulatory nuclei of the dorsal medulla. **Brain Research**, v. 360, n. 1, p. 355–360, 23 dez. 1985.

KING, Paul R. et al. α 2-adrenoceptor and catecholamine-insensitive binding sites for [3H]rilmenidine in membranes from rat cerebral cortex. **European Journal of Pharmacology**, v. 218, n. 1, p. 101–108, 21 jul. 1992.

KINO, Yurika et al. Involvement of Supraspinal Imidazoline Receptors and Descending Monoaminergic Pathways in Tizanidine-Induced Inhibition of Rat Spinal Reflexes. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, n. 1, p. 52–60, 2005.

KLEINSCHNITZ, Christoph; FLURI, Felix; SCHUHMANN, Michael. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. **Drug design, development and therapy**, p. 3445, jul. 2015.

KOPP, Ulla C. Role of renal sensory nerves in physiological and pathophysiological conditions. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 308, n. 2, p. R79–R95, 15 jan. 2015.

KOREN, Tamar et al. Insular cortex neurons encode and retrieve specific immune responses. **Cell**, v. 184, n. 24, p. 5902- 5915.e17, nov. 2021.

KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 171, n. 2, p. 157–191, 15 jan. 1977.

LABORATÓRIOS SERVIER DO BRASIL LTDA (SERVIER). **Comunicado de descontinuação de Hyperium comprimidos**. São Paulo: Servier Brasil, [2022?]. Disponível em: <https://servier.com.br/comunicados-sobre-nossos-produtos/comunicado-de-descontinuacao-de-hyperium-comprimidos/>. Acesso em: 12 fev. 2026.

LABORATÓRIOS SERVIER DO BRASIL LTDA (SERVIER). **Cancelamento de registro de todas as apresentações dos medicamentos: Hyperium, Muphoran e Stablon**. São Paulo: Servier Brasil, 10 mar. 2023. Disponível em: <https://servier.com.br/comunicados-sobre-nossos-produtos/comunicado-sobre-desabastecimento-temporario-de-oncaspar-2/>. Acesso em: 12 fev. 2026.

LAI, Yun-Ru et al. Effect of Baroreceptor Sensitivity on Outcomes in Patients with Acute Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. **World Neurosurgery**, v. 109, p. e754–e760, jan. 2018.

LAREDO, Carlos et al. Prognostic Significance of Infarct Size and Location: The Case of Insular Stroke. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9498, 22 jun. 2018.

LAUBIE, M. et al. Pharmacological properties of (n-dicyclopropylmethyl) amino-2-oxazoline (s3341), an alpha-2 adrenoceptor agonist. **Journal de Pharmacologie**, v. 16, n. 3, p. 259–278, 1985.

LAVINE, Kory J. et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 45, p. 16029–16034, nov. 2014.

LI, Yanyu; ZHANG, Jingjing. Animal models of stroke. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 4, n. 3, p. 204–219, set. 2021.

LIDDLE, Lane J. et al. Translational Intracerebral Hemorrhage Research: Has Current Neuroprotection Research ARRIVED at a Standard for Experimental Design and Reporting? **Translational Stroke Research**, v. 11, n. 6, p. 1203–1213, dez. 2020.

LYON, Alexander R. et al. Stress (Takotsubo) cardiomyopathy—a novel pathophysiological hypothesis to explain catecholamine-induced acute myocardial stunning. **Nature Reviews Cardiology**, v. 5, n. 1, p. 22–29, jan. 2008.

MAHMOUDI, J. et al. Imidazoline Receptors Agonists for Managing Hypertension May Hold Promise for Treatment of Intracerebral Hemorrhage. **Current Molecular Medicine**, v. 18, set. 2018.

MAO, Leilei et al. Ethyl pyruvate improves white matter remodeling in rats after traumatic brain injury. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 113–122, jan. 2021.

MARINS, Fernanda Ribeiro et al. Functional topography of cardiovascular regulation along the rostrocaudal axis of the rat posterior insular cortex. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 4, p. 484–493, abr. 2016.

MARINS, Fernanda Ribeiro et al. Autonomic and cardiovascular consequences resulting from experimental hemorrhagic stroke in the left or right intermediate insular cortex in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 227, p. 102695, set. 2020.

MARINS, Fernanda Ribeiro et al. Autonomic response after hemorrhagic stroke in the right insular cortex: What is the common pathophysiology in rat and human?; Reply. **Autonomic Neuroscience**, v. 231, p. 102772, mar. 2021.

MCALLEN, R. M.; MAY, C. N. The conduction velocity of the descending spinal pathway to the renal sympathetic nerve in the cat. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 30, n. 2, p. 139-142, 1990.

MEIER, Florian et al. Online Parallel Accumulation–Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 17, n. 12, p. 2534–2545, dez. 2018.

MENDONÇA, Michelle M. et al. Centrally acting antihypertensives change the psychogenic cardiovascular reactivity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 35, n. 5, p. 892-905, 2021.

MESULAM, M.-Marsel; MUFSON, Elliott J. The Insula of Reil in Man and Monkey. In: PETERS, Alan; JONES, Edward G. (Orgs.). **Association and Auditory Cortices**. Cerebral Cortex. Boston, MA: Springer US, 1985a. v. 4 p. 179–226.

MESULAM, M.-Marsel; MUFSON, Elliott J. The Insula of Reil in Man and Monkey. In: JONES, Edward G. et al. (Orgs.). **Association and Auditory Cortices**. Boston, MA: Springer US, 1985b. v. 4 p. 179–226.

MEYER, S. et al. Lateralization in autonomic dysfunction in ischemic stroke involving the insular cortex: **NeuroReport**, v. 15, n. 2, p. 357–361, fev. 2004.

MUTSCHLER, Isabella et al. Pain and emotion in the insular cortex: evidence for functional reorganization in major depression. **Neuroscience Letters**, Neuroimaging of Pain: Insights into normal and pathological pain mechanisms. v. 520, n. 2, p. 204–209, 29 jun. 2012.

NAGAI, Michiaki; DOTE, Keigo; KATO, Masaya. Autonomic response after hemorrhagic stroke in the right insular cortex: What is the common pathophysiology in rat and human? **Autonomic Neuroscience**, v. 230, p. 102755, jan. 2021.

NAGAI, Michiaki; KATO, Satoshi. How did Johann Christian Reil feel the insular cortex? Gemeingefühl as a seat of mind. **Journal of the History of the Neurosciences**, p. 1–17, maio 2025.

NEAFSEY, Edward J.; HURLEY-GIUS, Karen M.; ARVANITIS, Dimitrios. The topographical organization of neurons in the rat medial frontal, insular and olfactory cortex projecting to the solitary nucleus, olfactory bulb, periaqueductal gray and superior colliculus. **Brain Research**, v. 377, n. 2, p. 261–270, 9 jul. 1986.

NISHITANI, Ai et al. Muscle weakness and impaired motor coordination in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1-deficient rats. **Experimental Animals**, v. 69, n. 1, p. 11–17, 2020.

NJUNG'E, Kung'u; HANDLEY, Sheila L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 38, n. 1, p. 63–67, jan. 1991.

OLDFIELD, Christopher J.; DUHAMEL, Todd A.; DHALLA, Naranjan S. Mechanisms for the transition from physiological to pathological cardiac hypertrophy. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 98, n. 2, p. 74–84, fev. 2020.

OPPENHEIMER, Stephen. The Insular Cortex and the Pathophysiology of Stroke-Induced Cardiac Changes. **Can. j. neurol. sci.**, v. 19, n. 2, p. 208–211, maio 1992.

OPPENHEIMER, Stephen; CECETTO, David. The Insular Cortex and the Regulation of Cardiac Function. In: PRAKASH, Y. S. (Org.). **Comprehensive Physiology**. 1. ed. [S.l.]: Wiley, 2016. p. 1081–1133.

OPPENHEIMER, Stephen M. et al. Cardiovascular effects of human insular cortex stimulation. **Neurology**, v. 42, n. 9, p. 1727–1727, set. 1992.

PANKEVICH, Diana E. et al. **Improving the utility and translation of animal models for nervous system disorders: workshop summary**. National Academies Press, 2013.

PAXINOS, G; FRANKLIN, K. B. J. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2 ed. ed. San Diego: Academic Press, 2004.

PAXINOS, G; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 5 ed. ed. San Diego: Academic Press, 2004.

PENNER, S. Brian; SMYTH, Donald D. Sodium excretion following central administration of an I₁ imidazoline receptor agonist, moxonidine. **British Journal of Pharmacology**, v. 112, n. 4, p. 1089–1094, ago. 1994.

PENNER, S. Brian; SMYTH, Donald D. The role of the peripheral sympathetic nervous system in the natriuresis following central administration of an I₁ imidazoline agonist, moxonidine. **British Journal of Pharmacology**, v. 116, n. 6, p. 2631–2636, nov. 1995.

PILETZ, J. E.; ZHU, H.; CHIKKALA, D. N. Comparison of ligand binding affinities at human I1-imidazoline binding sites and the high affinity state of alpha-2 adrenoceptor subtypes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 279, n. 2, p. 694–702, nov. 1996.

PILETZ, Je; WANG, G.; ZHU, H. Cell Signaling by Imidazoline-1 Receptor Candidate, IRAS, and the Nischarin Homologue. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1009, n. 1, p. 392–399, dez. 2003.

PILETZ, John E. et al. Imidazoline Receptor Antisera-Selected (IRAS) cDNA: Cloning and Characterization. **DNA and Cell Biology**, v. 19, n. 6, p. 319–329, jun. 2000.

PITTALUGA, A.; TORELLI, R.; RAITERI, M. Clonidine differentially modulates the release of endogenous gaba in various rat brain areas. **Pharmacological Research**, v. 24, n. 2, p. 189–196, ago. 1991.

PRATS-SÁNCHEZ, L. et al. Insular damage is an independent predictor of new-onset atrial fibrillation and death at 3 months in patients with acute intracerebral hemorrhage. **European Journal of Neurology**, v. 26, n. 3, p. 542-549, 2019.

QIAN, Kai et al. Intraperitoneal injection of lithium chloride induces lateralized activation of the insular cortex in adult mice. **Molecular Brain**, v. 14, n. 1, p. 71, abr. 2021.

QUEIROZ, Edson Alexandre et al. Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamus are involved in the cardiovascular and behavioural chemoreflex responses: Dorsomedial hypothalamus and chemoreflex in conscious rats. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 2, p. 73–84, 1 fev. 2011.

REIL, J. Die Sylvische Grube oder das gestreifte grobe Hirnganglion, dessen Kapsel und die Seitentheile des großen Gehirns: d. **Archiv für die Physiologie**, 1809.

RIEGER, Nathaniel S. et al. Insular cortex corticotropin-releasing factor integrates stress signaling with social affective behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 47, n. 6, p. 1156–1168, maio 2022.

RINCON, Fred et al. Stroke Location and Association With Fatal Cardiac Outcomes: Northern Manhattan Study (NOMAS). **Stroke**, v. 39, n. 9, p. 2425–2431, set. 2008.

ROCHA-RESENDE, Cibele et al. Immunomodulatory role of nonneuronal cholinergic signaling in myocardial injury. **JCI Insight**, v. 4, n. 14, p. e128961, 2019.

ROCHA-RESENDE, Cibele et al. Developmental changes in myocardial B cells mirror changes in B cells associated with different organs. **JCI Insight**, v. 5, n. 16, p. e139377, 2020.

ROLLS, Asya. Immunoception: the insular cortex perspective. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 20, n. 11, p. 1270–1276, jun. 2023.

ROTH, Stefan; WERNSDORF, Saskia R.; LIESZ, Arthur. The role of circulating cell-free DNA as an inflammatory mediator after stroke. **Seminars in Immunopathology**, v. 45, n. 3, p. 411–425, maio 2023.

SANCHEZ-LARSEN, Alvaro et al. Characterization of the Insular Role in Cardiac Function through Intracranial Electrical Stimulation of the Human Insula. **Annals of Neurology**, v. 89, n. 6, p. 1172–1180, jun. 2021.

SANCHEZ-LARSEN, Alvaro et al. Insular Role in Blood Pressure and Systemic Vascular Resistance Regulation. **Neuromodulation: Technology at the Neural Interface**, v. 27, n. 7, p. 1218–1226, out. 2024.

SANTOS, Adrielly et al. Functional topography of glutamatergic and GABAergic neurotransmissions along the rostrocaudal axis of the posterior insular cortex regulating cardiovascular/autonomic responses to stress in rats. **Cerebral Cortex**, v. 35, n. 11, p. bhaf304, nov. 2025.

SAPER, Clifford B. Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 210, n. 2, p. 163–173, 10 set. 1982.

SATO, F. et al. Projections from the insular cortex to pain-receptive trigeminal caudal subnucleus (medullary dorsal horn) and other lower brainstem areas in rats. **Neuroscience**, v. 233, p. 9–27, mar. 2013.

SCEMAMA, Michel et al. Lipid Profile and Antihypertensive Efficacy in Hyperlipidemic Hypertensive Patients: Comparison of Rilmenidine and Captopril. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 26, p. S34, 1995.

SCHIFF, Hillary C. et al. Experience-dependent plasticity of gustatory insular cortex circuits and taste preferences. **Science advances**, 2023.

SCHNEIDER, Tomasz; POPIK, Piotr. Attenuation of estrous cycle-dependent marble burying in female rats by acute treatment with progesterone and antidepressants. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 6, p. 651–659, jul. 2007.

SCHULZ, A.; HASSELBLATT, A. An insulin-releasing property of imidazoline derivatives is not limited to compounds that block α -adrenoceptors. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 340, n. 3, p. 321–327, 1989.

SCHWARTZ, Joel W. et al. Substrate Binding Stoichiometry and Kinetics of the Norepinephrine Transporter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 19, p. 19177–19184, 13 maio 2005.

SEIFERT, Frank et al. Neuroanatomical correlates of severe cardiac arrhythmias in acute ischemic stroke. **Journal of Neurology**, v. 262, n. 5, p. 1182–1190, maio 2015.

SEIFFGE, David J. et al. Secondary stroke prevention in people with atrial fibrillation: treatments and trials. **The Lancet Neurology**, v. 23, n. 4, p. 404–417, abr. 2024.

SEPAROVIC, D.; KESTER, M.; ERNSBERGER, P. Coupling of I1-imidazoline receptors to diacylglyceride accumulation in PC12 rat pheochromocytoma cells. **Molecular Pharmacology**, v. 49, n. 4, p. 668–675, abr. 1996.

SEPAROVIC, Duska et al. Activation of phosphatidylcholine-selective phospholipase C by I1-imidazoline receptors in PC12 cells and rostral ventrolateral medulla. **Brain Research**, v. 749, n. 2, p. 335–339, fev. 1997.

SERVIER. **Hyperium®: rilmenidina**. Bula de medicamento. Rio de Janeiro: Laboratórios Servier do Brasil Ltda., 2017. Registro MS 1.1278.0054. Aprovada pela Anvisa em 04/05/2017.

SHIPLEY, M. T. Insular cortex projection to the nucleus of the solitary tract and brainstem visceromotor regions in the mouse. **Brain Research Bulletin**, v. 8, n. 2, p. 139–148, 1 fev. 1982.

SLOIN, Hadas E. et al. Hybrid offspring of C57BL/6J mice exhibit improved properties for neurobehavioral research. **eNeuro**, v. 9, n. 4, 2022.

SMITH, Karen E. et al. Changes in plasma catecholamine levels after insula damage in experimental stroke. **Brain Research**, v. 375, n. 1, p. 182–185, jun. 1986.

SOMMER, Clemens J. Ischemic stroke: experimental models and reality. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 2, p. 245–261, fev. 2017.

SPENCE, J. David. Secondary stroke prevention. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 9, p. 477–486, set. 2010.

SPENCER, Sarah J. et al. Effects of Global Cerebral Ischemia in the Pregnant Rat. **Stroke**, v. 39, n. 3, p. 975–982, mar. 2008.

SPRENGELMEYER, Reiner et al. The insular cortex and the neuroanatomy of major depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 133, n. 1, p. 120–127, 1 set. 2011.

SRDIC-RAJIC, Tatjana et al. Rilmenidine suppresses proliferation and promotes apoptosis via the mitochondrial pathway in human leukemic K562 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, p. 172–180, jan. 2016.

SUN, Miao-Kun; REIS, Donald J. GABA-mediated inhibition of pacemaker neurons of rostral ventrolateral medulla by clonidine in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 276, n. 3, p. 291–296, abr. 1995.

SYKORA, Marek et al. Impaired Baroreceptor Reflex Sensitivity in Acute Stroke Is Associated With Insular Involvement, But Not With Carotid Atherosclerosis. **Stroke**, v. 40, n. 3, p. 737–742, mar. 2009.

TAKAHASHI, Tsutomu et al. Volumetric MRI study of the insular cortex in individuals with current and past major depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 121, n. 3, p. 231–238, mar. 2010.

TENAXUM. **Tenaxum 1 mg: rilmenidina**. Resumo das Características do Medicamento. Praga: Tenaxum, s.r.o.; s.d. Disponível em: https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/leciva/0261035. Acesso em: 12 fev. 2026.

TOMEIO, Rodrigo A. et al. Site-specific regulation of stress responses along the rostrocaudal axis of the insular cortex in rats. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, p. 878927, 2022.

TORREALBA, F.; MÜLLER, C. Glutamate immunoreactivity of insular cortex afferents to the nucleus tractus solitarius in the rat: A quantitative electron microscopic study. **Neuroscience**, v. 71, n. 1, p. 77–87, mar. 1996.

VALET, P. et al. Rilmenidine (S 3341) and the sympathoadrenal system: adrenoreceptors, plasma and adrenal catecholamines in dogs. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 319–326, dez. 1988.

VESTERGAARD, M. et al. The cellular coding of temperature in the mammalian cortex. **Nature**, v. 614, n. 7949, p. 725–731, 23 fev. 2023.

VITORIO, Alex S. et al. Evaluation of the posterior insular cortex involvement in anxiogenic response to emotional stress in male rats: Functional topography along the rostrocaudal axis. **Physiology & Behavior**, v. 258, p. 114006, jan. 2023.

WAKABAYASHI, Ami et al. Synaptic function of descending projections from the insular cortex to the nucleus solitary tract in the rat. **Brain Research**, v. 1870, p. 150061, jan. 2026.

WANG, Jian. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 4, p. 463–477, dez. 2010.

WATKINS, K. E. Structural Asymmetries in the Human Brain: a Voxel-based Statistical Analysis of 142 MRI Scans. **Cerebral Cortex**, v. 11, n. 9, p. 868–877, set. 2001.

WINDER, Klemens et al. Acute right insular ischaemic lesions and poststroke left ventricular dysfunction. **Stroke and Vascular Neurology**, v. 8, n. 4, p. 301–306, ago. 2023.

WITTLING, Werner et al. Hemisphere asymmetry in parasympathetic control of the heart. **Neuropsychologia**, v. 36, n. 5, p. 461–468, maio 1998.

WONG, Dona Lee. Epinephrine Biosynthesis: Hormonal and Neural Control During Stress. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 4, p. 889–898, 1 jul. 2006.

XU, BIN; LI, HONGLI. Brain mechanisms of sympathetic activation in heart failure: Roles of the renin-angiotensin system, nitric oxide and pro-inflammatory cytokines (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 6, p. 7823–7829, dez. 2015.

XU, Bing et al. Differential Downregulation of β_1 -Adrenergic Receptor Signaling in the Heart. **JAHA**, v. 13, n. 12, p. e033733, jun. 2024.

XU, Jianhui et al. Imidazoline 1 receptors mediate the hyperthermia induced by preoptic agmatine application in male rats. **Journal of Thermal Biology**, v. 131, p. 104206, jul. 2025.

YALÇIN, Mehmet Burak et al. Autophagy and anti-inflammation ameliorate diabetic neuropathy with Rilmenidine. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 38, p. e387823, 2023.

YASUI, Yukihiro et al. Autonomic responses and efferent pathways from the insular cortex in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 303, n. 3, p. 355–374, 1991.

YOKOYAMA, Rei et al. (R)-ketamine restores anterior insular cortex activity and cognitive deficits in social isolation-reared mice. **Molecular Psychiatry**, v. 29, n. 5, p. 1406–1416, maio 2024.

ZHANG, Jian; ABDEL-RAHMAN, Abdel A. Inhibition of Nischarin Expression Attenuates Rilmenidine-Evoked Hypotension and Phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Production in the Rostral Ventrolateral Medulla of Rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 1, p. 72–78, jan. 2008.

ZHANG, Ming-Ming et al. Glutamatergic synapses from the insular cortex to the basolateral amygdala encode observational pain. **Neuron**, v. 110, n. 12, p. 1993–2008.e6, jun. 2022.

ZHANG, Zhihua; OPPENHEIMER, Stephen M. Characterization, distribution and lateralization of baroreceptor-related neurons in the rat insular cortex. **Brain research**, v. 760, n. 1-2, p. 243-250, 1997.

ZHAO, M.; HAGLER, H. K.; MUNTZ, K. H. Regulation of alpha 1-, beta 1-, and beta 2-adrenergic receptors in rat heart by norepinephrine. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 271, n. 5, p. H1762–H1768, nov. 1996.

ANEXOS

Aprovação do comitê de ética no uso de animais – ratos *Wistar*



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos dos anti-hipertensivos de ação central nas alterações cardiovasculares resultantes do acidente vascular hemorrágico experimental no córtex insular de ratos: contribuição dos receptores AT1 e Mas", protocolo do CEUA: 109/2022 sob a responsabilidade de Marco Antonio Peliky Fontes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 27/06/2022.

Aprovação do comitê de ética no uso de animais – camundongos C57BL/6J

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos cardiovasculares e neurológicos resultantes da hemorragia experimental no córtex insular de camundongos: desenvolvimento de um novo modelo murino de AVE focal para compreensão de mecanismos e estudo de alternativas terapêuticas", protocolo do CEUA: 233/2023 sob a responsabilidade de Marco Antonio Peliky Fontes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 07/11/2023.

Participação como coautora no artigo intitulado “*Neurogenic background for emotional stress-associated hypertension*” <https://doi.org/10.1007/s11906-023-01235-7>

Current Hypertension Reports (2023) 25:107–116
<https://doi.org/10.1007/s11906-023-01235-7>

SECONDARY HYPERTENSION: NERVOUS SYSTEM MECHANISMS (M WYSS, SECTION EDITOR)



Neurogenic Background for Emotional Stress-Associated Hypertension

Marco Antônio Peliky Fontes¹ · Fernanda Ribeiro Marins¹ · Tapan A. Patel³ · Cristiane Amorim de Paula¹ · Liliane Ramos dos Santos Machado¹ · Erick Bryan de Sousa Lima¹ · Ana Caroline Ventris-Godoy¹ · Ana Clara Rocha Viana¹ · Isadora Cristina Souza Linhares¹ · Carlos Henrique Xavier² · Jessica A. Filosa⁴ · Kaushik P. Patel³

Accepted: 31 January 2023 / Published online: 14 April 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

Abstract

Purpose of Review The response to natural stressors involves both cardiac stimulation and vascular changes, primarily triggered by increases in sympathetic activity. These effects lead to immediate flow redistribution that provides metabolic support to priority target organs combined with other key physiological responses and cognitive strategies, against stressor challenges. This extremely well-orchestrated response that was developed over millions of years of evolution is presently being challenged, over a short period of time. In this short review, we discuss the neurogenic background for the origin of emotional stress-induced hypertension, focusing on sympathetic pathways from related findings in humans and animals.

Recent Findings The urban environment offers a variety of psychological stressors. Real or anticipatory, emotional stressors may increase baseline sympathetic activity. From routine day-to-day traffic stress to job-related anxiety, chronic or abnormal increases in sympathetic activity caused by emotional stressors can lead to cardiovascular events, including cardiac arrhythmias, increases in blood pressure and even sudden death. Among the various alterations proposed, chronic stress could modify neuroglial circuits or compromise antioxidant systems that may alter the responsiveness of neurons to stressful stimuli. These phenomena lead to increases in sympathetic activity, hypertension and consequent cardiovascular diseases.

Summary The link between anxiety, emotional stress, and hypertension may result from an altered neuronal firing rate in central pathways controlling sympathetic activity. The participation of neuroglial and oxidative mechanisms in altered neuronal function is primarily involved in enhanced sympathetic outflow. The significance of the insular cortex-dorsomedial hypothalamic pathway in the evolution of enhanced overall sympathetic outflow is discussed.

Keywords Emotional stress · Anxiety · Autonomic nervous system · Sympathetic · Hypertension

Introduction

Hypertension is now recognized as the most important risk factor in cardiovascular diseases, ranking first among global causes of death. Strikingly, this silent disease is considered the leading cause of years of life lost due to premature death [1].

According to a recent United Nations report, in the past few decades, the world has been urbanizing rapidly. In 1950, only 30% of the world's population lived in urban areas, a proportion that grew to 55% by 2018 [2]. Urbanization offers new opportunities, but it has also some adverse impacts, such as health risks, including sedentarism, unhealthy diet, substance abuse (mainly alcohol and tobacco), anxiety, and emotional stress [3]. Poor mental health contributes to loss of quality of

This article is part of the Topical Collection on *Secondary Hypertension: Nervous System Mechanisms*

✉ Marco Antônio Peliky Fontes
peliky@icb.ufmg.br

¹ Department of Physiology & Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270 901, Brazil

² Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiania, Brazil

³ Department of Cellular and Integrative Physiology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA

⁴ Department of Physiology, Augusta University, Augusta, GA, USA

life and generally leads to numerous other unhealthy habits leading to disease. In this regard, it is interesting to observe that the percentage of the population with hypertension is positively correlated with the increase in growth of the urban population in previous decades (Fig. 1) [2, 4].

Emotional stress is merely considered a risk factor in most cases, however it is a global health problem, and indeed is the hidden force behind innumerable diseases, including hypertension and cardiac arrhythmias [5, 6•, 7]. Genetic and other risk factors do not fully explain the development of hypertension, and there is increasing evidence suggesting that psychosocial stress may also play an important role [8]. This picture became clear with the uncertainty and isolation caused by the COVID-19 pandemic that led to different mood disorders [9]. Indeed, the incidence of cardiovascular complications has increased during the COVID-19 pandemic. The proposed mechanisms include generalized increases in psychological distress and sympathetic hyperactivity [9].

Psychological or emotional stress can be defined as the subjective perception of a potential or real environmental threat or challenge. This perception triggers an organized set of physiological responses that aim to improve fight or flight efficiency and chances of survival. The word stress can assume different forms. Sometimes it is used to describe the stimulus or situation (the stressor), whereas sometimes it

is used to describe the physiological responses and the cognitive-behavioral strategies that are used to face that stimulus or condition (the stress or body reaction). More simply, stress involves the stressor and the stress reaction. However, it is necessary to consider that the stressor does not always need to be physically present, but it can be mentally present, assuming the form of anxiety, in anticipation of a real stress situation. In this regard, the urbanized and competitive modern life has created powerful, often invisible, new enemies or emotional stressors. The variety of psychological stressors are almost always present and usually are found in combination. Indeed, evidence points to a higher prevalence of anxiety disorders in urban environments [10, 11]. Anxiety disorders often co-occur with major depression and are associated with the development of other physical illnesses [12]. Real or anticipatory (anxiety) emotional stressors trigger physiological responses that, when abnormal (chronic or exaggerated), can be deleterious for health. In this regard, current evidence indicates that there is a positive association between comorbid anxiety and hypertension [6•].

Sympathetic activation is a hallmark in anxiety and emotional stress, leading to increased cardiac output and peripheral resistance [13, 14]. Importantly, stress biomarkers are present in patients with essential hypertension [5]. Therefore, at least part of the mechanism contributing to this enormous and growing number of hypertensive patients certainly result from sustained and abnormal increases in sympathetic activity due to anxiety and emotional stress. As a quotidian and simple example, it is known that sustained and abnormal increase in sympathetic activity triggered by workplace mental stressors or urban noise can lead to cardiac arrhythmias and hypertension [15–17]. For all reasons described above, the understanding of the mechanisms underlying emotional stress-associated responses and disease, needs to advance. This review discusses neural mechanisms contributing to emotional stress-associated hypertension.

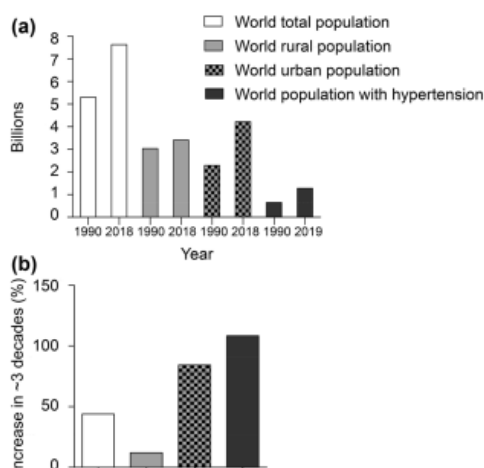


Fig. 1 Total world population, world urban population, world rural population and world population with hypertension; rates of change over approximately three decades (a). Approximate percentage of growth for each population in ~30 years interval (b). Note that the percentage of the population with hypertension in the past 3 decades grows accordingly to the growth of the urban population. Data extracted from World Urbanization Prospects: The 2018 Revision [2] and Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019 [4]

Neurogenic Background for Emotional Stress-Associated Hypertension

The response to stress, whether real or anticipatory, leads to activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and a sympathoadrenal response that involves rapid activation of sympathoneural and adrenomedullary components. In humans and animals, baseline sympathetic activity or sympathetic reactivity can be evaluated by direct nerve recording (sympathoneural component) or catecholamine spillover (humoral component) [18]. The first evaluates bursts of neural activity in sympathetic nerves [19], the second evaluates endogenous release of catecholamines, usually noradrenaline [18]. Increase in sympathetic activity is associated with increased heart rate, cardiac output, peripheral resistance,

plasma and urinary noradrenaline levels and regional noradrenaline changes, for example in the cardiac tissue [20].

Importantly, strong evidence indicates that the pattern of sympathetic response during mental stress preferentially involves the heart [5], specifically through increasing heart rate and stroke volume. Long term, these are contributing factors for raising systolic blood pressure. In addition, in abnormal conditions, the altered pattern of sympathetic activity to the heart can lead to cardiac arrhythmias and, under severe emotional stress, takotsubo syndrome, characterized by acute transient left ventricular dysfunction. Indeed, a recent study indicated that a substantial number of patients with takotsubo cardiomyopathy were also afflicted with hypertension (64.2%) [7]. The latter finding suggests that the progressive increase in ventricular afterload (peripheral resistance) together with sudden stress-associated cardiac sympathetic overactivity may contribute to the ventricular dysfunction observed in takotsubo episodes.

From a pharmacological standpoint, after blockade of beta 1 adrenergic receptors it is expected that heart rate and blood pressure do not increase during stressful situations. Following this rationale, it is presumed that by preventing the stress-associated cardiac changes, one could avoid a chain reaction of other physical anxiety symptoms, attenuating anxiety [21•] and thus offer cardiovascular protection. However, a previous study by Lee and colleagues using mice showed that atenolol 10 mg in the drinking water for 7 days before cage-switch stress (CSS), a form of acute psychosocial stress, only moderately attenuated the tachycardic effect to acute stress and had no effect to blunt the initial

increase in MAP [22•]. Indeed, the peak pressor response in the acute phase of CSS was enormous, approximately 40 mmHg, likely an α 1-receptor mediated vasoconstrictor response. The authors questioned why heart rate increased at all during stress if there was significant β -receptor blockade and raised the possibility of parasympathetic tone withdrawal. Recent experiments from our laboratory using a different route of administration showed that a single and lower dose of atenolol in rats (2 mg/Kg; intraperitoneal) resulted in almost complete blockade of the tachycardic response in the acute phase of CSS (Fig. 2). Based on these findings, the route of administration and absorption appears to explain the different responses. However, as Lee and colleagues have previously observed [22•], we also found a large pressor response (approximately 55 mmHg) that was completely preserved even with an almost complete blockade of the tachycardic response. Therefore, these findings in rodents reveal new insights regarding beta-blockers and stress cardiovascular response. First, in the acute phase of stress, it seems that the vascular and cardiac responses are completely dissociated since a large pressor response is present, even in the presence of atenolol. Second, as demonstrated previously by Esler and colleagues [5], these experiments show that the heart is the main target during acute stress responses and the powerful contribution of cardiac sympathetic output to the tachycardic response during the acute phase of stress. Finally, this observation may have a clinical implication, as well. Blockade of inotropic and chronotropic cardiac changes with atenolol may help to relieve anxiety symptoms because this specific visceral response is not perceived by

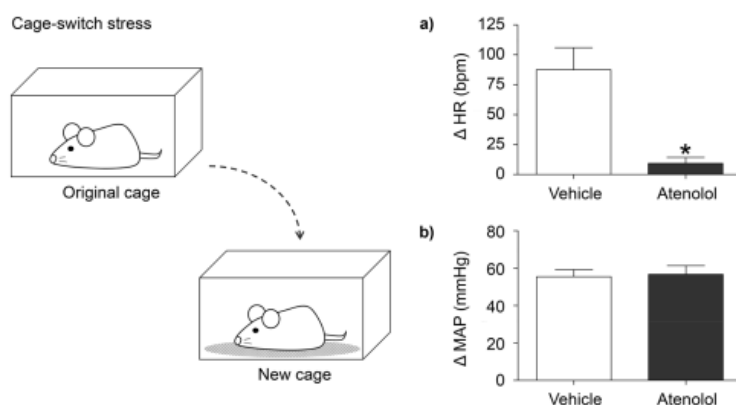


Fig. 2 Mean maximum changes in heart rate (HR) (a) and mean arterial pressure (MAP) (b) caused by environment change stress in male Wistar rats ($n=6$) treated with vehicle (white bars) or atenolol (black bars) during cage-switch stress (left drawing). In the experiment illustrated, the new cage was previously occupied by another male rat. Tachycardia is com-

pletely abolished in the group of rats that received previous treatment with beta-adrenergic antagonist, atenolol (intraperitoneal; 2 mg/kg). Note that the pressor response is completely preserved. See main text for discussion. (Ethics approval protocol number: 278/76/2017); t test, $*P<0.05$

the patient; however, cardiovascular protection is not guaranteed given that a large pressor response may still be present when facing stressful situations.

It is important to clarify that the neurogenic background for stress-associated hypertension may not result from isolated stress episodes but from chronic sympathetic overactivity triggered by long-term stressful situations and abnormal anxiety. Direct recording of sympathetic nerve fiber activity in humans (clinical microneurography) has supported this correlation. Lambert and colleagues demonstrated a correlation between anxiety and greater firing rate of individual sympathetic fibers during bursts of muscle sympathetic nerve activity (MSNA) [23]. Holwerda and colleagues showed that individuals with chronic anxiety demonstrate selective augmentation in relative MSNA burst amplitude, indicating enhanced sympathetic drive in a population with higher risk of cardiovascular disease [24]. An interesting study by El Sayed and colleagues indicated that the reactivity of blood pressure at the onset of mental stress dictates the direction of change in MSNA, a phenomenon related to baroreflex sensitivity. In some individuals a gradual rise in pressure enables baroreflex resetting without substantial baroreceptor loading, allowing MSNA to become elevated during mental stress [25]. White coat hypertension is a clear example that some people are simply more autonomic-reactive in anxiety situations and this phenotype is already present in children [26]. Central sympathetic hyperactivity exists in white coat hypertension, even though to a lesser degree than essential hypertension [27]. These findings indicate that stress and anxiety modulate the pattern of sympathetic activity, which, in turn, may confer greater cardiovascular risk. Stress, anxiety and sympathetic overactivity is a problem that needs to be more completely addressed. To understand the neurogenic background for stress-associated hypertension, there are two necessary steps: (i) to identify the central nuclei involved in organizing or modulating the autonomic responses to stress and (ii) to understand the influence each has on the other. These steps are crucial and may permit the discovery of specific dysregulations associated with chronic stress and anxiety.

Sympathetic Pathways Mediating the Cardiovascular Response During Stressful Events

Determining the type and intensity of environmental stimuli is the key to trigger defense reactions. Firstly, pathways conducting exteroceptive inputs would constitute a setpoint. These potentially stressful sensory stimuli may be luminous, auditive, motor, vibrotactile, olfactive, thermal, and others. Despite having a generalized and unspecified component, the intensity and harmful potential of these environmental stimuli

manifests uniquely within the brain of each individual, which is mainly based on genetic background and previous learned experiences. Exteroceptive stimuli generated from sensory organs are conducted to the central nervous system by sensory nerves reaching specific thalamic and cortical areas. Simultaneous activation of amygdala subregions determines whether a stimulus is considered a threat, or not, and adjusts the perception of intensity [28, 29]. If a risk situation is detected, baseline efferent sympathetic activity will increase accordingly (Fig. 3). The central command driven from the cortex and the amygdala will then organize the adequate response. Part of this response depends on projections reaching the dorsomedial hypothalamus (DMH). The DMH is currently considered a key region that controls the autonomic, respiratory, and neuroendocrine responses to psychological stress, as demonstrated in animals [30] and humans [31]. The DMH, through sympathetic premotor neuron projections, distributes the sympathetic discharge to target organs in response to the stimuli [30]. Premotor neurons are involved in the maintenance of sympathetic tone to target organs. Three groups of sympathetic premotor neurons have mostly been studied in the context of cardiovascular responses to stress, which include: the rostral ventrolateral medulla (RVLM), the paraventricular hypothalamus (PVN), and medullary raphe.

Neurons located within the RVLM region are well known for their pivotal role in the generation of sympathetic tone controlling vasomotion and renal function [32, 33]. The PVN is a diencephalic region that contains neurons projecting to the RVLM and to sympathetic preganglionic neurons in the intermediolateral cell column (IML) [34]. Therefore, PVN tonic activity would increase noradrenergic-mediated vasoconstriction either directly via IML neurons or through its excitatory projections innervating the RVLM, respectively [35]. GABA is reported to be a dominant inhibitory neurotransmitter in the PVN. Studies indicated that hyperactivation resulting from reductions in gabaergic activity that controls PVN excitability are part of the puzzling combination resulting in essential hypertension [36]. Finally, evidence indicates that medullary raphe neurons are responsible for adjusting the cardiac and thermoregulatory responses to emotional stress [37•]. Whether or not raphe neurons may present dysregulated activity in hypertensive states remains to be determined.

In abnormal conditions, as a strengthened learning circuit, it is likely that some regions of the brain may become dysregulated with chronic stress and anxiety. Consequently, in such a condition, the sympathetic output to a stressor of a hypothetical stress of the same magnitude may result in an enhanced response to target organs when compared to a normal response (Fig. 3). This increased activation is probably modulated by a top-down processes, which are initiated in emotion related regions. It is important to observe that several brain regions may be involved in such phenomena; however, for clarity of discussion, we indicate some potential

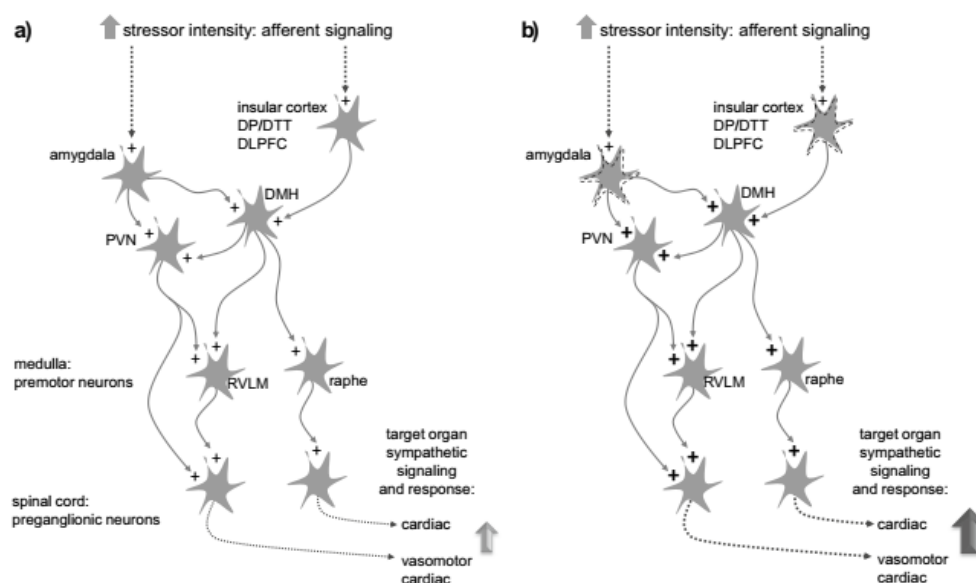


Fig. 3 Top-down control of sympathetic responses in the presence of an emotional stressor. In this hypothetical scheme, the presence of a stressor stimuli evokes a prompt sympathetic response evoking cardiac, vasomotor, and renal changes that are necessary for an optimal functional defensive reaction (a). In the abnormal circuit (b), note that the hypothetical stressor of same magnitude now evokes an enhanced sympathetic response given that the stimulus is boosted by hyperactive circuits in emotion related regions (here represented by amygdala

and/or cortical regions), enhancing excitatory activity in downstream pathways. “Plus” symbols (+) indicate excitatory activity; Dashed arrows represent indirect projections. DMH, dorsomedial hypothalamus; PVN, paraventricular hypothalamus; RVLM, rostral ventrolateral medulla; Raphe: medullary raphe neurons; DP/DTT dorsal peduncular cortex and dorsal tenia tecta; DLPFC, dorsolateral prefrontal cortex. See main text for details

candidates, which include; amygdala, cortical regions, the PVN and the DMH.

Several studies suggest that abnormal amygdala responses could lead to abnormal sympathetic responses to different physiological systems, including the cardiovascular system [24, 38]. Amygdala is activated in response to the intensity of negative stimuli [39, 40], working as an “intensity detector” [28]. Studies using neuroimaging and physiological measurements showed that individuals with post-traumatic stress disorder (PTSD) present significantly more amygdala activation in response to negative emotional stimuli and greater sympathetic responses when compared to control individuals [41•]. Corroborating these findings, people with PTSD present greater risk for developing hypertension [42]. Interestingly, resting amygdalar metabolic activity is associated with abnormal cardiac function and perfusion in women, suggesting a closer link between emotional stress and cardiovascular disease in women [43]. This is quite relevant, considering that previous evidence indicates that women are more susceptible than men to emotional stress [44]. Therefore, anxiety or intense stress can establish a new

baseline abnormal firing rate in amygdala neuronal circuits, thus leading to altered (enhanced) sympathetic responses. It is quite important to remember that the amygdala sends projections to different hypothalamic nuclei, including the PVN and the DMH. Evidence indicates that these are pathways in which the amygdala activates sympathetic outflow to the cardiovascular system during stressful events [45].

In addition to amygdala, fear and anxiety circuits within cortical regions are also involved in mediating sympathetic responses [46] and evidence indicates that specific regions may regulate chronic stress-induced cardiovascular susceptibility [47]. Kataoka and colleagues showed that psychosocial stress signals from emotion-related forebrain regions activate an excitatory (glutamatergic) pathway from the dorsal peduncular cortex and dorsal tenia tecta (DP/DTT), a medial prefrontal cortical area, to the DMH [37•]. The DP/DTT—DMH pathway is referred to as a central master neural pathway that drives autonomic and behavioral stress responses [37•]. Another potential cortical region involved is the dorsolateral prefrontal cortex (dLPFC). This region is primarily responsible for social and executive functioning

[48, 49] and appears to be critical for on-going mood regulation with negative emotional judgment and major depressive disorders [50–52]. A recent study by Sesa-Ashton and colleagues showed that stimulation of dlPFC, either left or right, in awake humans resulted in cyclic modulation of MSNA, BP and heart rate, and a significant increase in BP [53]. It is suggested that the effects of dlPFC on MSNA could be potentially mediated through the DMH via connections through the insula [53], however functionally, this projection needs to be further studied.

The insular cortex (IC) plays an important role in integrating emotional, memory and autonomic activity [54]. Human and animal studies have implicated the insula in processing positive and negative emotions, risk evaluation and probability of expected outcomes of an action [55, 56]. Neuroimaging studies have demonstrated that abnormal gray matter activity levels in the insula have been associated with anxiety and mood disorders [57]. Therefore, disorganized neuronal activity in the insula could enhance sympathetic activity. In this regard, we have recently shown that, in spontaneously hypertensive rats (SHR), the increased activity of the sympathetic nervous system may be related to alterations in the neurovascular unit of the IC, leading to neurogenic hypertension [58]. An increased density of astrocytes and de-ramified microglia is present in the IC of SHR. In addition, the densest number of neurons projecting to the DMH is also observed (Fig. 4). Interestingly, SHR are well known for their aggressive and anxious behavior and for the highest levels of physiological arousal to environmental stimuli [59], suggesting a direct correlation between anxious behavior and hypertension. Whether these IC neuroglial alterations are linked to SHR behavior and higher blood

pressure levels, remains to be further confirmed. However, it is important to highlight that such alterations involve two regions that are directly involved in emotional behavior and autonomic cardiovascular control, the IC and the DMH (see below). It is also interesting to note that Wistar-Kyoto strain, from which SHR rats are derived and are considered the appropriate control group for SHR [59], are naturally more responsive to stress when compared to other strains, even though they present normal blood pressure levels [60]. These observations strongly indicate that a stressful behavioral profile composes the genetic basis for the development of hypertension in SHR rats. Whether or not chronic stress can also modify such neuroglial circuits in normal individuals, leading to altered or hyperactive responses to environment stressors remains to be determined.

Emotions processed in the IC can affect sympathetic activity through different pathways. The first includes direct projections to the RVLM [61]. The RVLM provides sympathoexcitatory drive to the heart, kidney, and is involved in vascular resistance. The second alternative could be via the amygdala. The IC and the amygdala are closely integrated with dense reciprocal connections [56]. An additional pathway could be via direct projections to the hypothalamus. In this regard, we have recently demonstrated that the IC sends dense excitatory glutamatergic projections to the DMH (Fig. 3). The IC-DMH signaling may be enhanced in specific conditions, leading to abnormal increases in cardiac sympathetic output [62]. Several previous studies demonstrated functional and anatomical connections between the DMH and RVLM [63]. Using a sophisticated neuroimaging approach in rats, Kono and colleagues found that the connection between the DMH and the RVLM serves as a

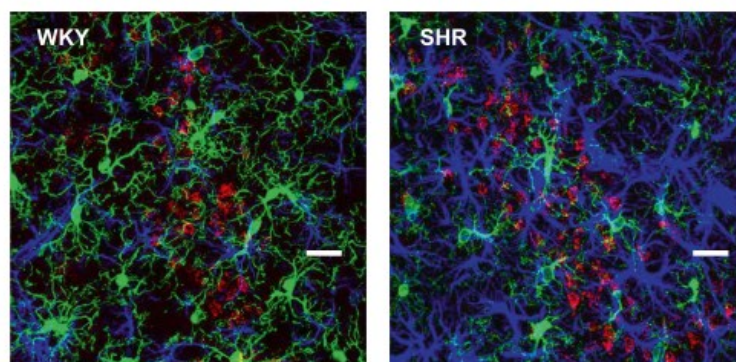


Fig. 4 SHR rats present marked alterations to the neurovascular unit within the IC (blue: astrocytes; green: microglia) and enhanced NMDA-mediated anatomical projections to the DMH (red: neurons retrogradely labeled from the DMH). These alterations may contribute to the maintenance of hyper-

tension and altered behavior in SHR. See text for details. Scale bar: 30 μ m. Experiments were conducted in accordance with NIH guidelines and carried out in agreement with Augusta University Institutional Animal Care and Use Committee Guidelines

chronological amplifier of stress-induced sympathetic excitation [64]. The study proposes a basic mechanism to understand the sustained augmentation of sympathetic activity following stressful life events [64].

Triggered by external stressors or internal stressful states, the increase in sympathetic activity is modulated by a top-down processes initiated in emotion related regions. Specifically, the amygdala and cortical regions detect stimuli intensity and type, resulting in the modulation of the autonomic response via the PVN and DMH. These hypothalamic regions then adjust the sympathetic output to the cardiovascular system via descending excitatory projections to downstream regions, including the RVLM and raphe (Fig. 3a). In the abnormal brain, the stimuli magnitude, type and intensity are magnified in some circuits, leading to an enhanced and sustained sympathetic response (Fig. 3b).

Role of ROS-Mediated Activation of Sympathetic Pathways During Stress

Emotional stress is a condition caused by various factors such as anxiety, anger, and sadness. Emotional stressors trigger many physiological alterations in the body (anatomically and physiologically) which can be deleterious for physical and mental health. Current cross-sectional studies indicate

that there is a strong connection between anxiety and hypertension. When an individual is suffering from emotional stress, such as anxiety, the autonomic nervous system (ANS) is enhanced via the hypothalamic-pituitary axis, as well as emotional stressors that affect the physiology of the hypothalamus [64, 65]. Malfunctioning of the hypothalamus affects the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. Stressful conditions also activate the sympathetic-adrenomedullary (SAM) axis. [66–68]. Emotional stress affects motor coordination, as well as other cognitive functions. It also alters the communication process in various regions of the brain [69]. The electron transport chain or respiratory chain located in the mitochondria pumps protons (H^+) to generate membrane potential. During this process, a small quantity of reactive oxygen species (ROS) are generated, which are detoxified by specific antioxidant enzymes. During stressful conditions, neural mitochondria are negatively impacted, which in turn generates excessive free radicals or ROS. ROS generated during stressful conditions may cause neuronal degeneration and/or neuronal dysfunction in the brain [70–73]. The specific pathways that are vulnerable and affected by stress are illustrated in Fig. 3 and discussed in the previous section above. The majority of neuronal cell membrane is composed of polyunsaturated fatty acids, which are key substrates for ROS. Hence, during stressful conditions, neurons are highly vulnerable to lipid peroxidation

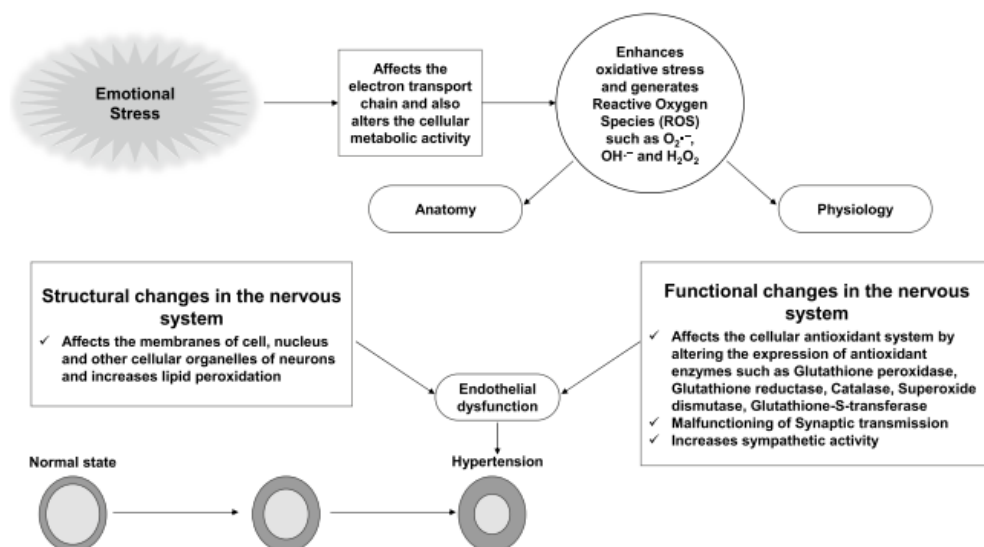


Fig. 5 Schematic diagram for the effects of stress on ROS-mediated changes in neural pathways related to enhanced sympathetic outflow. Emotional stress increases ROS levels in neural pathways while reducing the activities of antioxidant enzymes resulting in enhanced activa-

tion of neurons in the amygdala, paraventricular nucleus, and rostral ventrolateral medulla (see Fig. 3), overall resulting in increased sympathetic outflow and concomitant hypertension

via free radicals. Chronic stress enhances lipid peroxidation, while reducing the activities of antioxidant enzymes, such as glutathione peroxidase and catalase in rat brain [74]. A compromised antioxidant system negatively affects normal neuronal metabolic activity. The presence of free radicals or ROS during stressful conditions leads to vascular damage and endothelial dysfunction [75]. Stress-mediated enhanced sympathetic activity also contributes to the development of hypertension and other cardiovascular diseases [76, 77] (Fig. 5). Vascular damage, endothelial dysfunction, and elevated sympathetic activity are the major factors for the development of hypertension mediated by ROS that is generated during heightened stressful events.

Conclusions

Acute psychological stress induces elevation of blood pressure, which persists after the stress is relieved. There is increasing evidence of a positive association between comorbid anxiety and hypertension [6•]. The impact of modern urban stress on health is clear and research that addresses stress and anxiety needs strong support. There are numerous aspects that require further understanding, including stressors to emotional reactivity and cognitive coupling. Particularly in regard to hypertension, understanding how anxiety and stress determines the autonomic response in abnormal conditions is a critical part of the process. Among different aspects that may be involved, the participation of neuroglial and oxidative mechanisms in altered neuronal function is likely to be involved in enhanced sympathetic outflow. The significance of insular cortex-dorsomedial hypothalamic pathway in the evolution of enhanced overall sympathetic outflow seems relevant and deserves additional investigation. By identifying the nuclei, pathways, and the neurochemical peculiarities that are involved, new discoveries into the mechanisms of action, new molecular targets and drug development may be reached. These discoveries could provide alternatives that may help many patients that cannot tolerate side effects of the current drugs available.

Funding The authors received funding from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ-01128–21), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil, CNPq, INCT NanoBiofar (PQ MAPF 308923/2021–9; CHXC 404079/2021–0) and PRPq UFMG. This work was also supported by grants NIH 5R01NS097818-04 (J. A. Filosa), NIH R01DK114663 and R01DK129311 and endowed McIntyre Professorship to Dr. Kaushik P. Patel.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare no competing interests.

Human and Animal Rights and Informed Consent This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

References

Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as:

• Of importance

1. Tsao CW, Aday AW, Almarazooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, et al. Heart disease and stroke statistics—2022 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2022;145(8):e153–639.
2. Nations U. revision of world urbanization prospects. United Nations Department of Economic and Social Affairs. 2018;
3. Szabo CP. Urbanization and mental health: a developing world perspective. *Curr Opin Psychiatry*. 2018;31(3):256–7.
4. Zhou B, Carrillo-Larco RM, Danaei G, Riley LM, Paciorek CJ, Stevens GA, et al. Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *The Lancet*. 2021;398(10304):957–80.
5. Esler M. Mental stress and human cardiovascular disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017;74:269–76.
- 6• Johnson HM. Anxiety and hypertension: is there a link? A literature review of the comorbidity relationship between anxiety and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2019;21(9):1–7. **Shows that there is a positive association between comorbid anxiety and hypertension.**
7. Khara R, Light-McGroary K, Zahr F, Horwitz PA, Girotra S. Trends in hospitalization for takotsubo cardiomyopathy in the United States. *Am Heart J*. 2016;172:53–63.
8. Spruill TM. Chronic psychosocial stress and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2010;12(1):10–6.
9. Shah SMA, Mohammad D, Qureshi MFH, Abbas MZ, Aleem S. Prevalence, Psychological Responses and associated correlates of depression, anxiety and stress in a global population, during the coronavirus disease (COVID-19) pandemic. *Commun Ment Health J*. 2021;57(1):101–10.
10. Borg BA, Rabinak CA, Marusak HA. Violence exposure and mental health consequences among urban youth. *Curr Psychol*. 2021;1–10.
11. Ventimiglia I, Seedat S. Current evidence on urbanicity and the impact of neighbourhoods on anxiety and stress-related disorders. *Curr Opin Psychiat*. 2019;32(3):248–53.
12. Bandelow B, Michaelis S, Wedekind D. Treatment of anxiety disorders. *Dialog Clin Neurosci*. 2017;19(2):93.
13. de Silva T, Cosentino G, Ganji S, Riera-Gonzalez A, Hsia DS. Endocrine causes of hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2020;22(11):1–13.
14. Saxena T, Ali AO, Saxena M. Pathophysiology of essential hypertension: an update. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2018;16(12):879–87.
15. Hahad O, Beutel M, Gori T, Schulz A, Blettner M, Pfeiffer N, et al. Annoyance to different noise sources is associated with atrial fibrillation in the Gutenberg Health Study. *Int J Cardiol*. 2018;264:79–84.
16. Trudel X, Brisson C, Gilbert-Ouimet M, Milot A. Psychosocial stressors at work and ambulatory blood pressure. *Curr Cardiol Rep*. 2018;20(12):1–9.
17. Zeeb H, Hegewald J, Schubert M, Wagner M, Dröge P, Swart E, et al. Traffic noise and hypertension—results from a large case-control study. *Environ Res*. 2017;157:110–7.

18. Carter JR, Goldstein DS. Sympathoneural and adrenomedullary responses to mental stress. *Compr Physiol*. 2015;5(1):119.
19. da Silva AQQ, Xavier CH, Campagnole-Santos MJ, Caligiorne SM, Baltatu OC, Bader M, et al. Cardiovascular responses evoked by activation or blockade of GABAA receptors in the hypothalamic PVN are attenuated in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *Brain Res*. 2012;1448:101–10.
20. Saavedra JM, Benicky J. Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. *Stress*. 2007;10(2):185–93.
21. • Armstrong C, Kaplowicz MR. A preliminary investigation on the effects of atenolol for treating symptoms of anxiety. *Mil Med*. 2020;185(11–12):e1954–60. **This study suggests that the beta-blocker atenolol may be well-tolerated and effective among persons with anxiety disorders.**
22. • Lee DL, Webb RC, Brands MW. Sympathetic and angiotensin-independent hypertension during cage-switch stress in mice. *Am J Physiol-Regul Integrat Compar Physiol*. 2004;287(6):R1394–8. **(This study shows that atenolol only moderately attenuates the tachycardic effect to acute stress and had no effect to blunt the initial increase in MAP.)**
23. Lambert E, Dawood T, Straznicki N, Sari C, Schlaich M, Esler M, et al. Association between the sympathetic firing pattern and anxiety level in patients with the metabolic syndrome and elevated blood pressure. *J Hypertens*. 2010;28(3):543–50.
24. Holwerda SW, Luehrs RE, Gremaud AL, Wooldridge NA, Stroud AK, Fiedorowicz JG, et al. Relative burst amplitude of muscle sympathetic nerve activity is an indicator of altered sympathetic outflow in chronic anxiety. *J Neurophysiol*. 2018;120(1):11–22.
25. El Sayed K, Macefield VG, Hissen SL, Joyner MJ, Taylor CE. Blood pressure reactivity at onset of mental stress determines sympathetic vascular response in young adults. *Physiol Rep*. 2018;6(24): e13944.
26. Krmar RT. White-coat hypertension from a paediatric perspective. *Acta Paediatr*. 2019;108(1):44–9.
27. Smith PA, Graham LN, Mackintosh AF, Stoker JB, Mary DA. Sympathetic neural mechanisms in white-coat hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(1):126–32.
28. Bonnet L, Comte A, Tatu L, Millot JL, Moulin T, Medeiros de Bustos E. The role of the amygdala in the perception of positive emotions: an “intensity detector”. *Front Behav Neurosci*. 2015;9:178.
29. Namburi P, Al-Hasani R, Calhoun GG, Bruchas MR, Tye KM. Architectural representation of valence in the limbic system. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41(7):1697–715.
30. Fontes MAP, Filho ML, Machado NLS, Paula CA de, Cordeiro LMS, Xavier CH, et al. Asymmetric sympathetic output: The dorsomedial hypothalamus as a potential link between emotional stress and cardiac arrhythmias. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 1º de novembro de 2017;207:22–7.
31. Henderson LA, Macefield VG. The role of the dorsomedial and ventromedial hypothalamus in regulating behaviorally coupled and resting autonomic drive. *Em: Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier. 2021;187–200.
32. Dampney RAL, Coleman MJ, Fontes MAP, Hirooka Y, Horiuchi J, Li YW, et al. Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(4):261–8.
33. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(5):335–46.
34. Shafont AD, Ryan A, Badoer E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Brain Res*. 1998;801(1–2):239–43.
35. Zheng H, Katsurada K, Nandi S, Li Y, Patel KP. A critical role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the regulation of the volume reflex in normal and various cardiovascular disease states. *Curr Hypertens Rep*. 2022;1–12.
36. Zhang K, Li YF, Patel KP. Reduced endogenous GABA-mediated inhibition in the PVN on renal nerve discharge in rats with heart failure. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2002;282(4):R1006–15.
37. • Kataoka N, Shima Y, Nakajima K, Nakamura K. A central master driver of psychosocial stress responses in the rat. *Science*. 2020;367(6482):1105–12. **Points out the DMH as a key relay of a central master neural pathway that drives autonomic and behavioral stress responses.**
38. Calhoun GG, Tye KM. Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat Neurosci*. 2015;18(10):1394–404.
39. Canli T, Zhao Z, Brewer J, Gabrieli JD, Cahill L. Event-related activation in the human amygdala associates with later memory for individual emotional experience. *J Neurosci*. 2000;20(19):RC99–RC99.
40. Taylor SF, Liberzon I, Koeppe RA. The effect of graded aversive stimuli on limbic and visual activation. *Neuropsychologia*. 2000;38(10):1415–25.
41. • Ressler K, Berretta S, Bolshakov VY, Rosso IM, Meloni EG, Rauch SL, et al. Post-traumatic stress disorder: clinical and translational neuroscience from cells to circuits. *Nat Rev Neurol*. 2022;18(5):273–88. **Shows that individuals with PTSD present significantly more amygdala activation in response to negative emotional stimuli and greater sympathetic responses when compared to control individuals.**
42. Brudey C, Park J, Wiaderkiewicz J, Kobayashi I, Mellman TA, Marvar PJ. Autonomic and inflammatory consequences of post-traumatic stress disorder and the link to cardiovascular disease. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2015;309(4):R315–21.
43. Fiechter M, Roggo A, Burger IA, Bengs S, Treyer V, Becker A, et al. Association between resting amygdalar activity and abnormal cardiac function in women and men: a retrospective cohort study. *European Heart Journal-Cardiovascular Imaging*. 2019;20(6):625–32.
44. Vaccarino V, Bremner JD. Behavioral, emotional and neurobiological determinants of coronary heart disease risk in women. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017;74:297–309.
45. Chen Z, Liu N, Xiao J, Wang Y, Dong R. The amygdala via the paraventricular nucleus regulates asthma attack in rats. *CNS Neurosci Ther*. 2020;26(7):730–40.
46. Tovote P, Fadok JP, Lüthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(6):317–31.
47. Schaeuble D, Myers B. Cortical-hypothalamic integration of autonomic and endocrine stress responses. *Front Physiol*. 2022;151.
48. Holper L, Burke CJ, Fausch C, Seifritz E, Tobler PN. Inequality signals in dorsolateral prefrontal cortex inform social preference models. *Social Cognitive and Affective Neuroscience*. 2018;13(5):513–24.
49. Yuan P, Raz N. Prefrontal cortex and executive functions in healthy adults: a meta-analysis of structural neuroimaging studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;42:180–92.
50. Bench C, Frackowiak R, Dolan RJ. Changes in regional cerebral blood flow on recovery from depression. *Psychol Med*. 1995;25(2):247–61.
51. Grimm S, Beck J, Schuepbach D, Hell D, Boesiger P, Bermpohl F, et al. Imbalance between left and right dorsolateral prefrontal cortex in major depression is linked to negative emotional judgment: an fMRI study in severe major depressive disorder. *Biol Psychiat*. 2008;63(4):369–76.
52. Zhong M, Wang X, Xiao J, Yi J, Zhu X, Liao J, et al. Amygdala hyperactivation and prefrontal hypoactivation in subjects with cognitive vulnerability to depression. *Biol Psychol*. 2011;88(2–3):233–42.
53. Sesa-Ashton G, Wong R, McCarthy B, Datta S, Henderson LA, Dawood T, et al. Stimulation of the dorsolateral prefrontal cortex modulates muscle sympathetic nerve activity and blood pressure in humans. *Cereb Cortex Commun*. 2022;3(2):tgac017.

54. Oppenheimer S, Cechetto D. The insular cortex and the regulation of cardiac function. *Compr Physiol*. 2016;6:1081–133.
55. Gogolla N. The insular cortex. *Curr Biol*. 2017;27(12):R580–6.
56. Moraga-Amaro R, Stehberg J. The insular cortex and the amygdala: shared functions and interactions. The amygdala: a discrete multitasking manager. 2012;231–56.
57. Gasquoine PG. Contributions of the insula to cognition and emotion. *Neuropsychol Rev*. 2014;24(2):77–87.
58. Marins FR, Iddings JA, Fontes MA, Filosa JA. Evidence that remodeling of insular cortex neurovascular unit contributes to hypertension-related sympathoexcitation. *Physiol Rep*. 2017;5(5): e13156.
59. Tucker DC, Johnson AK. Behavioral correlates of spontaneous hypertension. *Neurosci Biobehav Rev*. 1981;5(4):463–71.
60. Paré WP. The performance of WKY rats on three tests of emotional behavior. *Physiol Behav*. 1992;51(5):1051–6.
61. Marins FR, Limbório-Filho M, Xavier CH, Biancardi VC, Vaz GC, Stern JE, et al. Functional topography of cardiovascular regulation along the rostrocaudal axis of the rat posterior insular cortex. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016;43(4):484–93.
62. Marins FR, Limbório-Filho M, Iddings JA, Xavier CH, Biancardi VC, Stern JE, et al. Tachycardia evoked from insular stroke in rats is dependent on glutamatergic neurotransmission in the dorsomedial hypothalamus. *Eur J Neurol*. 2021;28(11):3640–49.
63. Fontes MAP, Xavier CH, Marins FR, Limbório-Filho M, Vaz GC, Müller-Ribeiro FC, et al. Emotional stress and sympathetic activity: contribution of dorsomedial hypothalamus to cardiac arrhythmias. *Brain Res*. 2014;1554:49–58.
64. Kono Y, Yokota S, Fukushi I, Arima Y, Onimaru H, Okazaki S, et al. Structural and functional connectivity from the dorsomedial hypothalamus to the ventral medulla as a chronological amplifier of sympathetic outflow. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–11.
65. Grimsrud A, Stein DJ, Seedat S, Williams D, Myer L. The association between hypertension and depression and anxiety disorders: results from a nationally-representative sample of South African adults. *PLoS ONE*. 2009;4(5): e5552.
66. DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;71(3):469–80.
67. Mifsud KR, Reul JM. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated control of genomic responses to stress in the brain. *Stress*. 2018;21(5):389–402.
68. Pruessner JC, Dedovic K, Pruessner M, Lord C, Buss C, Collins L, et al. Stress regulation in the central nervous system: evidence from structural and functional neuroimaging studies in human populations-2008 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology*. 2010;35(1):179–91.
69. Savtchouk I, Liu SJ. Remodeling of synaptic AMPA receptor subtype alters the probability and pattern of action potential firing. *J Neurosci*. 2011;31(2):501–11.
70. Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosci Res*. 2010;68(4):261–75.
71. Lambert AJ, Brand MD. Reactive oxygen species production by mitochondria. *Mitochondrial DNA*. 2009;165–81.
72. Picard M, McEwen BS. Psychological stress and mitochondria: a systematic review. *Psychosom Med*. 2018;80(2):141.
73. Kumar A, Rinwa P, Kaur G, Machawal L. Stress: Neurobiology, consequences and management. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2013;5(2):91.
74. Che Y, Zhou Z, Shu Y, Zhai C, Zhu Y, Gong S, et al. Chronic unpredictable stress impairs endogenous antioxidant defense in rat brain. *Neurosci Lett*. 2015;584:208–13.
75. Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol*. 2015;31(5):631–41.
76. Hering D, Lachowska K, Schlaich M. Role of the sympathetic nervous system in stress-mediated cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep*. 2015;17(10):1–9.
77. Lambert EA, Lambert GW. Stress and its role in sympathetic nervous system activation in hypertension and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2011;13(3):244–8.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Participação como coautora no artigo intitulado “*The insular cortex, autonomic asymmetry and cardiovascular control: looking at the right side of stroke*”.
<https://doi.org/10.1007/s10286-024-01066-9>

Clinical Autonomic Research (2024) 34:549–560
<https://doi.org/10.1007/s10286-024-01066-9>

REVIEW ARTICLE



The insular cortex, autonomic asymmetry and cardiovascular control: looking at the right side of stroke

Marco Antônio Peliky Fontes¹ · Lilliane Ramos dos Santos Machado¹ · Ana Clara Rocha Viana¹ ·
 Matheus Henrique Cruz¹ · Ícaro Santos Nogueira¹ · Marcela Gondim Lima Oliveira¹ · Christiane Braga Neves¹ ·
 Ana Caroline Ventris Godoy¹ · Luke A. Henderson² · Vaughan G. Macefield^{3,4}

Received: 21 March 2024 / Accepted: 9 September 2024 / Published online: 24 September 2024
 © Springer-Verlag GmbH Germany 2024

Abstract

Purpose Evidence from animal and human studies demonstrates that cortical regions play a key role in autonomic modulation with a differential role for some brain regions located in the left and right brain hemispheres. Known as autonomic asymmetry, this phenomenon has been demonstrated by clinical observations, by experimental models, and currently by combined neuroimaging and direct recordings of sympathetic nerve activity. Previous studies report peculiar autonomic-mediated cardiovascular alterations following unilateral damage to the left or right insula, a multifunctional key cortical region involved in emotional processing linked to autonomic cardiovascular control and featuring asymmetric characteristics.

Methods Based on clinical studies reporting specific damage to the insular cortex, this review aims to provide an overview of the prognostic significance of unilateral (left or right hemisphere) post-insular stroke cardiac alterations. In addition, we review experimental data aiming to unravel the central mechanisms involved in post-insular stroke cardiovascular complications.

Results and Conclusion Current clinical and experimental data suggest that stroke of the right insula can present a worse cardiovascular prognosis.

Keywords Insular cortex · Stroke · Asymmetry · Cardiovascular · Dorsomedial hypothalamus

Introduction

Autonomic cardiovascular control was for a long time focused on subcortical regions, mainly medullary and hypothalamic regions. This concept likely resulted from a general conceptualized localizationist, modular idea, where the cognitive-executive function was detached from primitive

emotional-visceral homeostatic reflexes. However, in agreement with a previous premise [1], emotion and cognition are only minimally decomposable in the brain; these are often integrated so that they jointly contribute to behavior. In fact, output signals of the cerebral cortex are extremely diverse and integrated in different subcortical regions to adjust autonomic-cardiovascular homeostasis that sustains specific behavioral states [2].

Under certain conditions, it is known that emotional challenges may produce cardiac arrhythmias in normal persons [3–5], for example, when speaking before an audience [6]. This phenomenon has also been confirmed experimentally. Liu and colleagues showed that acute intense emotional stress results in arrhythmogenesis with higher incidence of sudden cardiac death in normal rats [7]. These are mainly cardiac sympathetic-mediated effects [8], almost completely blocked by β 1-adrenergic antagonists [8–10]. If emotional stress can lead to cardiac arrhythmias in individuals without apparent cardiac disorders then this implies that a central mechanism is vulnerable, and a central region has

✉ Marco Antônio Peliky Fontes
peliky@icb.ufmg.br

¹ Hypertension Laboratory, Department of Physiology and Biophysics - Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG 31270 901, Brazil

² Brain and Mind Centre, University of Sydney, Sydney, Australia

³ Department of Neuroscience, Monash University, Melbourne, Australia

⁴ Baker Department of Cardiometabolic Health, University of Melbourne, Melbourne, Australia

abnormally overresponded to that specific stimulus. Previous evidence supports this assumption [11].

The cardiac alterations resulting from this abnormal central response are quite often associated with a general excessive sympatho-adrenergic response [12]. Indeed, we know that stress evokes increases in sympathetic nerve activity to muscle and skin in humans, as measured by intraneural microelectrodes [13–15], and increases the release of catecholamines [16]. While the increase in sympathetic outflow is certainly part of the mechanism, abundant evidence indicates that a central autonomic imbalance to the heart can also contribute to the stress response, and lead to cardiac arrhythmias [11, 17–20]. Central autonomic imbalance, in which there is a presumed predominance of the left or right sides of the brain, may result from altered neuronal activity originating from different brain regions during emotional stress situations [12]. Autonomically mediated cardiovascular consequences are expected when permanent damage is present in one of these regions. Following this rationale, autonomic imbalance may result from altered central processing of interoceptive (or exteroceptive) signals, such as those caused by intense emotional stress or psychiatric disorders, seizures, or after stroke [5, 21]. In this regard, consistent evidence indicates that strokes affecting the insula may lead to cardiac electrophysiological, molecular, structural, and contractile dysfunction, and even sudden cardiac death [5, 22]. In humans, however, whether the side affected influences cardiovascular risk remains to be determined. Of course, several limiting factors may limit data interpretation from clinical findings.

This narrative review gathers the main findings from clinical studies reporting damage to the insular cortex (IC). We aimed to provide a clinical overview of the cardiac complications following unilateral, left or right, insular stroke. In addition, we establish a parallel with the data obtained from our recently developed model of experimental hemorrhagic insular stroke in the rat [22]. This review addresses the central autonomic mechanisms, the descending pathways involved in post-insular stroke, and the associated cardiovascular complications according to the brain hemisphere affected.

Insular cortex, emotions, and autonomic cardiovascular control

The human IC is hidden from the brain's outer surface, lying in the center of the cerebral hemisphere and forms a distinct, but entirely hidden island of cortex (hence the term “insular”), situated in the depth of the Sylvian fissure [23] (Fig. 1a). The IC is well preserved among species during evolution; it is present in all mammals and occupies a substantial cortical area [5, 24, 25]. Rats, monkeys, and

humans share similarities in insular cytoarchitectonics. Detailed reviews of comparative insular anatomy have been published previously [5, 25]. More important within the context of the present review, these anatomical similarities allow us to extrapolate some findings obtained in rodents to humans. Indeed, as discussed below, the effects of experimental stroke of the insula in rats are quite comparable to those found in humans [26, 27].

The IC is supplied by the middle cerebral artery, the most common artery involving a stroke, and is therefore exposed to a higher risk of cerebrovascular disease [28]. Historically, the insula was known for its role as the primary gustatory cortex, but recent human and animal studies have revealed a role for the insula in processing positive and negative emotions, risk evaluation, and probability of expected outcomes of an action [29, 30]. While its role in taste is well established, it is also strongly engaged in perceptions of disgust, brought about by watching videos of surgical procedures or watching someone vomit, for instance [31]. Abnormal gray matter activity levels in the insula have been associated with cognitive challenges, anxiety, and mood disorders [32]. The insula also plays an important role in processing interoceptive information and autonomic nervous system-mediated changes [32] and is critical for cardiovascular control [9, 33–35].

Within the viscerotopic organization of the IC, there is clear evidence for a cardiovascular controlling region [28, 33, 34, 36]. In this regard, we have recently revealed a clear functional topography for autonomic cardiovascular control along the rostrocaudal axis of the rat IC and showed that the intermediate region of the posterior IC is predominantly sympathoexcitatory [35] (Fig. 1b). Furthermore, Hsueh and colleagues have recently identified the posterior IC as a potential mediator of bottom-up cardiac interoceptive processing. These authors found that optogenetic inhibition of posterior IC attenuated the anxiety-like behavior that was induced by optical cardiac pacing [37].

Because the insula has no direct projections to preganglionic sympathetic neurons, autonomic responses resulting from insular engagement must be integrated in subcortical nuclei to be executed. Consistent with this, we have recently demonstrated that the IC-induced tachycardia is largely dependent upon a glutamatergic relay in the dorsomedial hypothalamus (DMH) [26]. The DMH is known for its critical role in integrating the cardiovascular responses to emotional stress [2, 12]. The DMH is also involved in the sympathetically mediated vasoconstrictor responses to muscle pain—which certainly has an unpleasant domain—in humans [38]. Therefore, the IC-DMH pathway (Fig. 1c) is likely critical for cardiovascular responses to emotional stress. The descending projections from the DMH are dependent on synaptic relays in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) and midline raphe [39, 40]. Functional

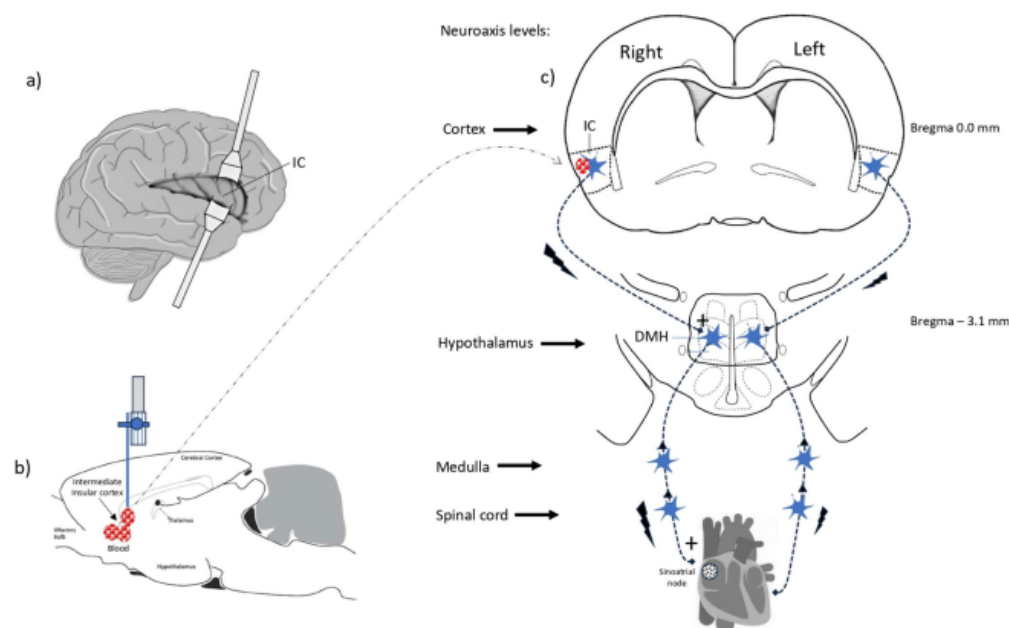


Fig. 1 **a** Schematic representation of the human insular cortex (IC), which is bilaterally located deep within the lateral sulcus separating the temporal lobe from the parietal and frontal lobes. **b** To understand the cardiovascular alterations resulting from insular stroke a rat model of focal experimental insular hemorrhagic stroke was developed; through stereotaxic surgery, autologous blood is injected into the intermediate region of posterior IC. **c** Schematic drawing hypothesizing that the experimental stroke located at the IC, right hemisphere, results in unbalanced sympathetic output; this alteration

leads to a greater number of cardiac arrhythmias and cardiac molecular changes, likely because the downstream ipsilateral right-side descending pathway is anatomically and functionally predominant to the sinoatrial node. The increases in cardiac sympathetic activity resulting from insular stroke involve a synaptic glutamatergic relay in the dorsomedial hypothalamic region (DMH); this projection, named the IC-DMH pathway, is featured in this review (c), see main text for details. “Plus” symbols (+) indicate excitatory activity; dashed arrows represent indirect projections

connectivity analysis in humans has also revealed strong coupling between the insula, DMH, and RVLM at rest, with the RVLM in turn being strongly coupled to the generation of sympathetic outflow to the muscle vascular bed [33, 41]. Curiously, it was only the right DMH that showed this strong functional connectivity [41]. Accordingly, and as discussed below, abnormalities in the IC-DMH pathway may play a significant contribution for the cardiovascular complications observed after unilateral insular stroke.

Functional asymmetries, cardiac autonomic asymmetry, and post-stroke implications

Functional asymmetries are differences between physiological responses or baseline parameters observed when comparing activation, inhibition, or damage between the left and right sides of the nervous system, thus meaning that a body

function is lateralized at a certain level of the neuroaxis, right or left sided. There are different forms of functional lateralization such as central language processing that is localized primarily to areas in the left brain hemisphere [42, 43]. Lateralization is also observed in manual motor control; right-handed motor control is highly lateralized, in this case performed by the left-hemisphere motor cortex [44]. Indeed, lateralization appears to be the rule rather than the exception in the central nervous system (CNS). Several factors can influence the development of neural asymmetries including environmental, genetics, and hormones; for a review, see [45].

Lateralization is also observed for autonomic control of the heart. In this regard, previous evidence indicates that the left side of the brain is associated with parasympathetic cardioregulatory responses [46–50]. On the other hand, the right hemisphere seems to be involved with emotional stress-associated sympathetic and

hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) responses [51, 52], with clear and consistent influence on cardiac performance [53].

The functional significance of autonomic lateralization for cardiovascular homeostasis remains to be unraveled. One possibility is that autonomic-cardiovascular asymmetry follows aspects of the heart's evolution. This strategy was likely developed to provide the most efficient target-organ drive in response to environmental emotional demands, i.e., efficient fight or flight responses, and consistent evidence corroborates this view. For example, a left eye dominance in eliciting escape responses to a stressful situation has been demonstrated in several vertebrates including fishes, toads, birds, and lizards [54, 55]. This finding suggests that, during evolution, structures located on the right side of the brain (mainly served by the left eye, especially in animals without binocular vision) predominantly specialized to respond to predatory threats. Considering that the fight or flight situation requires an immediate autonomic response with mandatory changes in cardiac functional activity, one can speculate that the right hemispheric specialization for emotional processing evolved together with a predominant right-sided descending sympathetic pathway to primarily control heart rate. This premise is based on the fact that all vertebrates stem from a common chordate ancestor, from an open circulatory system featuring poor contractility but with sophisticated control of heart rate [56]. Therefore, it is reasonable to presume that extrinsic neural adrenergic control of heart rate evolved first. Further, functional aspects of the heart itself also support this view. First, heart automatism indicates an autonomic-independent organ during early stages of evolution, i.e., complete extrinsic autonomic innervation appears later [57]. Second, the heart is a unique unpaired visceral organ, with asymmetric functional properties itself. The primary pacemaker, located in the sinoatrial node of the right atrium, determines resting heart rate in normal conditions while the left heart (left ventricle) must work against the afterload. Based on that, it is reasonable to consider a hemispheric lateralization for autonomic cardiac control that accompanies such intrinsic properties to maintain efficient cardiac responses to specific demands. How environmental demands are integrated with these asymmetric autonomic axes remains to be unraveled. However, as an example, the physiological consequences observed after unilateral hemispheric insular stroke clearly indicate the relevance of an unbalanced autonomic output and the need for further comprehension of mechanisms involved, which certainly involves downstream synaptic relays.

Previous findings from our laboratory showed differential autonomic and hemodynamic responses after systematic comparison between the two sides of the dorsomedial hypothalamus [19, 20]. The right DMH seems to be predominant for cardiac control as well as for stress-associated

tachycardia. Stimulation of the right DMH results in a greater number of ectopic beats when compared to the left DMH. As described above, the IC descending pathways are integrated in the DMH [9, 26]. These findings led us to believe in the importance of investigating the contribution of the IC-DMH pathway (Fig. 1c) to the cardiovascular consequences observed after insular stroke.

Clinical findings: insular stroke, autonomic asymmetry, and cardiac sympathetic overactivity

The involvement of IC in autonomic control has been known for a long time. Zamrini and colleagues, in 1990, found that unilateral hemispheric inactivation by intracarotid amobarbital in patients undergoing preoperative evaluation for epilepsy surgery showed differential left/right cerebral hemispheric effects on autonomic function. The authors observed tachycardia after inactivation of the left hemisphere and bradycardia following inactivation of the right [50]. However, the exact brain site involved in such phenomena was not specifically determined in that study. Later, Lane and colleagues (1992) concluded that the two cerebral hemispheres have a differential influence on the nature and severity of arrhythmias following an acute stroke. Supraventricular-mediated tachycardia was observed in patients with right hemispheric strokes. The authors suggested, without having formally assessed heart rate variability (HRV), that “parasympathetic tone” was diminished ipsilaterally to the affected hemisphere, associated with a reciprocal rise in “sympathetic tone”. Lane and colleagues recommend that a “prospective study should be undertaken to test this hypothesis more definitively...”. In the discussion, those authors stated that the prospective study could also include greater control of variables including the type of lesion (e.g., ischemic versus hemorrhagic infarct) and the exact location of it [58]. In the same year, Oppenheimer and colleagues were the first to demonstrate that cardiovascular changes were elicitable during electrical stimulation in humans. The authors also observed lateralization of such responses with right-sided dominance for sympathetic effects—increases in heart rate and blood pressure—and left-sided dominance for bradycardia and hypotension [36].

Reviewing the literature (Table 1) it is possible to conclude that both right (R) and left (L) side insular damage results in autonomic and cardiovascular alterations [59–61]. Whether these alterations are more pronounced when the damage affects a specific IC side is still a matter of debate. It is possible to identify a consensus indicating that patients with strokes involving the right insula, either ischemic or hemorrhagic, have an increased incidence of heart dysfunction (Table 1). In some cases, the effects are so severe that

Table 1 Outcomes resulting from different conditions (predominantly stroke) affecting the insular cortex [5, 22, 28, 36, 46, 50, 58–66, 96–113]

First author and journal	Animal	Insular cortex hemisphere side reported	Procedure or event	Outcome
Zamrini, Neurology, 1990	Human	Left/right	Inactivation by intracarotid amobarbital	Tachycardia after left inactivation and bradycardia following right inactivation
Oppenheimer et al., Neurology, 1992	Human	Right	Electrical stimulation	Tachycardia and pressor responses
Lane et al., Stroke, 1992	Human	Right	Hemorrhagic and ischemic stroke	Tachycardia and arrhythmias
Tokgözüglu et al., Stroke, 1999	Human	Right	Ischemic stroke	Cardiac complication and sudden death
Hilz et al., Ann Neurol, 2001	Human	Left/right	Intracarotid amobarbital procedure	Sympathetic and parasympathetic inactivation
Hirashima et al., AHA, 2001 Link	Human	Left/right	Hemorrhagic stroke	Cardiac consequences in patients with hemorrhage, especially in right Sylvian fissure
Cereda et al., Neurology, 2002	Human	Left/right	Ischemic stroke	Blood pressure with hypertensive episodes in right lesions
Robinson et al., Stroke, 2003	Human	?	Ischemic stroke	Impaired cardiac baroreceptor sensitivity
Colivicchi et al., Stroke, 2004	Human	Right	Ischemic stroke	Arrhythmias
Meyer et al., Neuroreport, 2004	Human	Left/right	Hemorrhagic and ischemic stroke	Heart rate was significantly higher in RH-I stroke and the highest BPsys and BPdia were seen in patients with RH-I stroke
Apak et al., Tohoku J Exp Med, 2005	Human	?	Hemorrhagic and ischemic stroke	Myocardial injury
Christensen et al., J Neurol, 2005	Human	Right	Hemorrhagic stroke	Sudden death
Fink, Arch Neurol, 2005	Human	Left/right	Ischemic stroke	Nonspecific ST/T-wave abnormalities (were more common with left hemisphere infarction) Arrhythmias (atrial fibrillation)—obs: (there is no specific side on the paper)
Ay et al., Neurology, 2006	Human	Right	Ischemic stroke	Myocardial injury
Abboud, Ann Neurol, 2006	Human	Left/right	Ischemic stroke	Cardiac arrhythmias and sudden death
Laowattana, Neurology, 2006	Human	Left	Hemorrhagic and ischemic stroke	Cardiac complications, heart damage, and arrhythmias
Sykora et al., J Neurol Neurosci Psychiatry, 2007	Human	Right	Hemorrhagic	Repetitive asystoles
Nagai et al., J Am Soc Hypertens, 2010	Human	Right	Hemorrhagic and ischemic stroke	Cardiac complications, atrial fibrillation and “right insular cortex involvement was associated with all-cause death and with vascular death at 2 years”
Sörös, Hachinski, Lancet Neurol, 2012	Human	Left/right	Ischemic stroke	Myocardial injury, sudden death
Walter et al., J Neurol, 2013	Human	Left/right	Ischemic stroke	Sympathetic hyperactivation and immunodepression
Lederman et al., J Stroke, 2014	Human	Right	Hemorrhagic and ischemic stroke	ECG alterations
Takeuchi et al., J Clin Neurosci, 2015	Human	Left/right	Hemorrhagic stroke	ECG alterations
Seifert et al., J Neurol, 2015	Human	Left/right	Ischemic stroke	Right-hemispheric lesions are associated with an elevated risk for severe cardiac arrhythmias

Table 1 (continued)

First author and journal	Animal	Insular cortex hemisphere side reported	Procedure or event	Outcome
Oppenheimer and Cecchetto, Compr Physiol, 2016	Human	Right	Hemorrhagic stroke	ECG alterations, myocardial injury
Krause et al., Ann Neurol, 2017	Human	Right	Right insular stroke	Myocardial injury
Constantinescu et al., Arch Clin Cases 2017	Human	Left/right	Ischemic stroke	Cardiac dysautonomia, autonomic imbalance, and arrhythmias
Prats-Sánchez, Eur J Neurol, 2018	Human	Left/right	Hemorrhagic stroke	Atrial fibrillation mortality at 3 months
Chouchou et al., Hum Brain Mapp, 2019	Human	Left/right	Electrical stimulation	Tachycardia
Marins et al., Auton Neurosci, 2020	Rat	Left/right	Hemorrhagic stroke (experimental)	Sustained sympathetic-mediated tachycardia after both left and right IC. However, damage to the right IC produces a greater number of arrhythmias and cardiac molecular changes
Wittstock et al., Acta Neurol Scand, 2021	Human	Left/right	Hemorrhagic stroke	Worse short-term outcome (insular localization of ICH lesions predicts worse short-term outcome independent from laterality of bleeding or cardiac dysfunction)
Min et al., J Stroke Cerebrovasc Dis, 2022	Human	Left	Ischemic stroke	Transient cardiac dysfunction
Sanchez-Larsen et al., Neuromodulation, 2022	Human	Left/right	Electrical stimulation	A vasopressor effect after right insula stimulation and a vasodilator effect after left insula stimulation
Winder et al., Stroke Vasc Neurol, 2023	Human	Left /right	Ischemic	Imaging analysis unveils a prominent role of the right hemispheric central autonomic network, especially of the insular cortex, in the brain–heart axis

Hemisphere affected is indicated. References are presented in chronological order. Main keywords used in the bibliographic search were hemorrhagic stroke; insular cortex; insular stroke; myocardial injury; tachycardia; arrhythmias; sudden death; insula; heart rate; stroke assessment; cerebrovascular disorder; ischemic stroke; humans; cardiovascular

acute right insular stroke increases the odds of death in the first 3 months post-injury [62]. The incidence of severe cardiac dysrhythmias was higher with right-sided strokes involving the insula [63].

Recent literature substantiates the view for a greater incidence of cardiovascular dysfunction after strokes involving the right insula. Prats-Sánchez et al. observed that right insular damage and insular cortex damage (left or right) were significantly more frequent in patients with new-onset atrial fibrillation [64]. Sanchez-Larsen et al. evaluated the insular influence on vascular regulation through direct high-frequency electrical stimulation of different insular regions during stereo-electroencephalography. Those authors found that electrical stimulation of the right insula in humans induced an increase in BP and systemic vascular resistance, while stimulation of the left insula produced a decrease in BP without changes in vascular resistance. Interestingly the authors observed that “most of the responses induced

by the right insula were hypertensive, whereas most of the left insular responses were hypotensive” [65]. Moreover, Winder and colleagues recently showed a strong relationship between infarct volume following ischemic lesions of the right insula and left ventricular dysfunction—the greater the lesion size, the greater the reduction in ejection fraction and the greater the incidence of wall motion abnormalities. The authors found that patients with ischemic lesions on the right side of the stroke had a significantly higher likelihood of cardiac dysfunction, cardiac arrhythmia, and myocardial damage [66].

However, we must come to grips with several limiting factors when aiming to compare findings from clinical studies such as the type of lesion and size of stroke, patient age, individual inflammatory response, size of penumbra zone, handedness, preexisting cardiac or other medical conditions, pharmacological treatment, and other circumstances. For example, strokes affecting the insula produce sympathetic

hyper-activation that depresses the immune system thereby increasing the chances of post-stroke infections [61]. Autonomic dysfunction, on the other hand, is quite frequent in some infectious conditions [67, 68]. Altogether, these concurrent and confounding factors make it difficult to compare the exclusive cardiac-autonomic consequences resulting from left or right insular stroke if one analyzes only clinical data. The crucial question is, after removing the most confounding factors, could the prognostic estimation for adverse cardiovascular events be based on the hemispheric location of an insular stroke? Certainly, a well-controlled laboratory animal model could help to clarify whether cardiovascular alterations are more pronounced when the damage affects a specific IC side.

Experimental models: understanding the mechanisms behind insular stroke-induced autonomic alterations

As described above, the IC is well preserved among species during evolution and its role in autonomic control in the rat has been reported previously. The cardiovascular regulation along the rostrocaudal axis of the rat posterior IC is topographically organized. Using chemical stimulation, Marins et al. identified a site of sympathoexcitatory cardiac control in the intermediate IC (Fig. 1b) [35]. Whilst this finding is important, within a translational perspective, chemical stimulation of a group of neurons largely differs from any kind of damage. In other words, the effect produced by local bleeding, in case of hemorrhagic stroke, cannot be compared with chemical stimulation of a group of neurons or with ischemic stroke models. The murine model of ischemic stroke is widely used to understand stroke effects but results in large and nonspecific intra-hemisphere brain damage. Indeed, many rodent focal occlusion stroke models produce large infarcts that more closely resemble malignant and fatal human infarction than the average sized human stroke [69]. Furthermore, occlusion methods produce primary ischemic cell death in several subcortical brain regions including the hypothalamus [70] which is critical autonomic-cardiovascular control with asymmetric functional properties [71]. To overcome these obstacles, and with focus on a translational approach, we have recently developed a rat model of focal experimental insular hemorrhagic stroke [22]. Briefly, rats are deeply anesthetized with tribromoethanol and, via stereotaxic surgery, a hemicraniectomy is made to allow the nanoinjection of autologous blood into the intermediate insular cortex (Fig. 1b). We found that focal stroke of the IC alters cardiac and renal autonomic control. Importantly, hemorrhagic damage to the right IC produces a greater number of arrhythmias and changes in calcium dynamics in cardiac cells indicating that the cardiovascular consequences

are indeed hemisphere dependent [22]. The study supports some clinical findings indicating asymmetry for cardiac autonomic control from the IC and helps to understand the cardiac and renal implications observed after specific side cortical hemorrhage. In conclusion, right-sided experimental insular stroke results in greater sympathetic-mediated cardiac alterations (Fig. 1c).

Some considerations must be raised regarding the stroke model above described and stroke models in general. First, our previous studies indicated that the cardiovascular alterations resulting from insular experimental stroke are mediated by activation of downstream autonomic nuclei [9], likely triggered by a blood component (see discussion below). This assumption is based on the fact that previous control experiments showed that injections of vehicle or even plasma into the rat insular cortex do not cause significant alterations in cardiovascular variables, i.e., discarding a volume effect [22]. However, changes in intracranial pressure (ICP) must be considered. ICP is maintained by complex mechanisms that determine cerebral perfusion pressure. In this regard, it is known that sudden rises in the ICP can lead to cardiovascular effects such as changes in the heart rate, myocardial damage, ventricular arrhythmias, and hypertension [72, 73]. Therefore, measurement of ICP in our experimental insular stroke model must be evaluated in future experiments. Second, although animal models are extremely necessary to understand mechanisms and test therapeutical strategies, it is important to point out that the human stroke is very heterogeneous. Thus, it is very difficult to produce a single perfect stroke model that mimics human stroke completely [74]. The key contributors to prior translational failures may be preclinical assessments in young male animals that ignore relevant biological variables, such as age, sex, genetic factors, and relevant comorbid diseases, such as atrial fibrillation, heart failure, hypertension, and diabetes [66, 75, 76]. Therefore, data obtained from animal models needs careful interpretation, and improvement of the models available is always necessary to enhance translational success [75]. The inclusion of diverse populations might affect research outcomes and applicability.

Theoretical mechanisms part 1: insular cortex and dorsomedial hypothalamus share common functional aspects and may play a role in insular stroke-associated arrhythmias

As a result of the close correlation between anxiety, stress, and cardiovascular disease [4, 77], several studies were carried out in the past decades aimed at deepening the understanding of the central mechanisms involved; part of this investigation highlighted the DMH [9, 78]. More

importantly, within the context of this review, there is a very interesting coincidence of factors supporting a functional link between the IC and the DMH that could be mediating the cardiovascular alterations observed under intense emotional stress conditions [79, 80] or after insular stroke [5]. First, like the IC, the DMH is currently identified as a critical nucleus for autonomic cardiovascular control in situations of emotional stress as shown in animals [12, 81] and humans [82, 83]. Second, as described for the IC, studies from our laboratory showed the presence of a functional asymmetry at the level of the DMH for cardiac autonomic control, with the right DMH having a predominance over chronotropism [19, 20]. This functional asymmetry arising from the DMH may be related to the generation of cardiac arrhythmias [19, 84]. Just as we observed in rodents, studies in humans have confirmed the involvement of the DMH in the control of sympathetic activity and indicate asymmetric activity of this region in situations of stress [82, 85]. Interestingly, a recent study using functional magnetic resonance imaging showed that an intense emotional situation can result in asymmetric activity at the IC resulting in sympathetic hyperactivity and cardiac dysfunction [86]. Third, as we have anatomically and functionally demonstrated [26], Kataoka and collaborators

showed that psychosocial stress results in the activation of a glutamatergic pathway involving the IC and the DMH [81]. Therefore, abnormalities in the IC-DMH pathway (Fig. 1c) may make a significant contribution to the cardiovascular complications observed after intense emotional stress situations [9] and likely after insular stroke.

Theoretical mechanisms part 2: how do (insular) strokes activate downstream pathways leading to sympathetic overactivity to the heart?

Hemorrhagic stroke, defined as bleeding within the brain parenchyma, accounts for 13–15% of all stroke cases. The central mechanism that results in the sustained tachycardia after hemorrhage at the IC remains to be further determined. However, it certainly involves release of blood/coagulation cascade factors that affect local neurons or astrocytes involved in a circuit controlling the autonomic output to the heart (Figs. 1c and 2). Some possibilities exist, for example, iron dysregulation. Intraparenchymal bleeding ultimately leads to lysis and the release of hemoglobin and

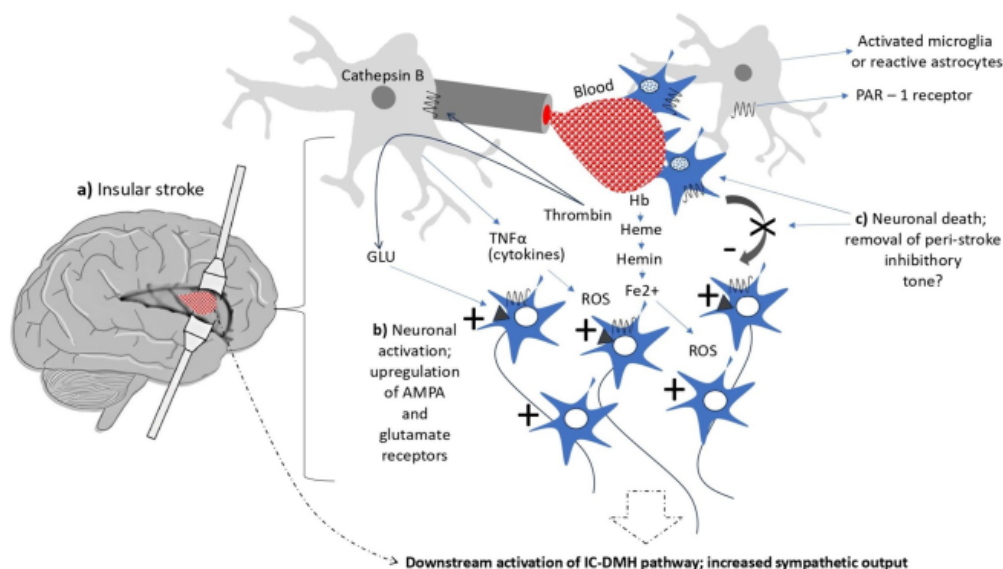


Fig. 2 Schematic representation of possible mechanisms resulting in sustained tachycardia after insular stroke (a). Blood/coagulation cascade factors affect intra-insular neurons or astrocytes involved in a circuit controlling the autonomic output to the heart. Intraparenchymal bleeding ultimately leads to lysis and the release of hemoglobin and its degradation product heme, iron overload resulting in microglia

activation and release of inflammatory mediators; these ultimately lead to activation of IC peri-stroke intact neurons (b) or, removal of an inhibitory intra-insular regional circuit (c). Both alternatives would then activate (indicated by plus signals) the downstream autonomic-cardiac controlling pathway via dorsomedial hypothalamus (IC-DMH pathway) as depicted in Fig. 1. See text for details

its degradation product heme. Heme is then taken up into neurons where it leads to iron overload and cell death. Iron is a cofactor for many enzymes in neurons and its dysregulation leads to iron-mediated toxicity [87, 88]. For example, hemine, the oxidized form of heme, is taken up into brain cells via a low-density lipoprotein receptor, inducing the endocytosis of both the complex and receptor. Situations such as hemorrhagic stroke that involve excessive amounts of hemoglobin or heme may be deleterious, particularly to neurons. The Fe^{2+} produced from heme metabolism (Fig. 2) can generate reactive oxygen species (ROS) [89]. Indeed, between the local bleeding and abnormal local neuronal function there are several factors released including tumor necrosis factor alpha (TNF α), cathepsin B (a powerful lysosomal protease), oxidants, and glutamate [90]. All of these can modify neuronal and astrocyte functions. Recent evidence indicates that high concentrations of thrombin, the serine protease activated during the coagulation cascade, enhances excitotoxicity via direct cellular interactions and are mediated by protease-activated receptors (PARs) [91]. Interestingly, thrombin has been shown to stimulate glutamate release from astrocytes [92].

Consistent evidence suggests that an altered local glutamatergic activity in the IC triggered by blood/hemorrhage factors could then lead to abnormal sympathetic activity. Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the mammalian nervous system. Interestingly, we found that stimulation of glutamatergic (NMDA) receptors at this same IC coordinate evokes a marked sympathetic-mediated tachycardia [35]. Moreover, approximately 50% of IC neurons that express NMDA receptor NR1 subunit in the IC send projections to the DMH [26], constituting the IC-DMH pathway (Fig. 1c). Evidence indicates that the increased activity of the sympathetic nervous system observed in spontaneous hypertensive rats (SHR) may be related to alterations in the neurovascular unit of the IC, leading to neurogenic hypertension. An increased density of astrocytes and de-ramified microglia is present in the IC of SHR. In addition, the IC sends dense excitatory projections to the DMH with approximately 50% of IC neurons projecting to the DMH expressing the NMDA receptor NR1 subunit [26, 93]. Finally, the IC-DMH pathway seems crucial for cardiac abnormalities observed after insular stroke. Blockade of NMDA receptors in the DMH completely abolishes the tachycardia resulting from insular stroke [26].

Altogether, the evidence described above leads to two possibilities: bleeding degradation components following stroke are activating IC surrounding intact neurons (Fig. 2b) or removing an inhibitory insular local mechanism that controls descending autonomic-cardiac controlling pathways (Fig. 2c). In the latter case it is important to point out that there is evidence indicating that the vicinity rostral portion of the IC is sympatho-inhibitory [35]. A previous study

showed that the histologic damage from intraparenchymal injection of blood occurs mainly in the immediate perihemorrhage region but not in distal regions. Indeed, blood results in a continued destruction of neurons that occurs over at least 3 days as the neurons come into proximity with the hematoma [94]. In conclusion, both possibilities could, via DMH, result in sustained increases in cardiac sympathetic activity, tachycardia, arrhythmias, and renal sympathetic nerve activity alterations as we have previously reported [22, 26] leading to cardiovascular disease (Fig. 2).

Conclusions

Because human stroke is very heterogeneous, animal models are extremely necessary to understand mechanisms and test therapeutical strategies. Current experimental and clinical data allow us to suggest that patients who survive stroke at the right IC present severe functional alterations, including a greater number of ectopic beats, renal complications, a reduced ejection fraction, and increased wall motion abnormalities of the heart and hence a more rapid progression to heart failure. Experimental findings indicate that the mechanism involves abnormal activation of the IC-DMH pathway that plays an important role in controlling the cardiac sympathetic output. However, it is important to point out that, although accumulated data indicates a dominance of right over left IC hemisphere in terms of cardiac consequences following hemorrhagic stroke, in either case the risk is elevated. Review of the literature identified the need for a better description, in the best possible way, of the laterality predominance and the antero-posterior location of the (insular) stroke. Recent discussion recognizes that there have been few reports assessing the IC damage and new onset of arrhythmias after stroke according to hemispheric laterality and the antero-posterior location of the IC in relation to sympatho-vagal imbalance [64, 95]. More detailed descriptions could help to determine a more precise prognostic and improve alternatives for patient treatment. Finally, this review suggests a relevant role for the IC-DMH pathway in altered cardiovascular conditions observed after insular stroke and highlights the need for additional research to identify the mechanisms involved.

Acknowledgements Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ-01128-21), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil, CNPq (308923/2021-9) and INCT Nanobiofar. VGM is supported by grants from the National Institutes of Health (U54AT012307) and the National Health and Medical Research Council of Australia (2019404).

Funding FAPEMIG, APQ-01128-21, Marco Antônio Peliky Fontes, CNPQ PQ, 308923/2021-9, Marco Antônio Peliky Fontes, Medical Research Council Aus, 2019404, Vaughan G Macefield, NIH, U54AT012307, Vaughan G Macefield.

Data availability Not applicable.

Declarations

Conflict of interest We declare no conflict of interest.

Ethical approval This is a review article and, therefore, the respective authors are solely responsible for ethical approvals for studies/articles mentioned here. We hereby declare that all experiments and articles developed in the Laboratory of Hypertension, UFMG, previously reported and discussed in this article, particularly those describing the experimental insular stroke model, were approved by CEUA/UFMG and conducted in accordance with the US NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; protocol numbers are indicated in the respective manuscripts previously published [22, 26, 35, 93].

References

- Pessoa L (2008) On the relationship between emotion and cognition. *Nat Rev Neurosci* 9:148–158
- Fontes MAP, Xavier CH, Marins FR, Limborço-Filho M, Vaz GC, Müller-Ribeiro FC et al (2014) Emotional stress and sympathetic activity: contribution of dorsomedial hypothalamus to cardiac arrhythmias. *Brain Res* 1554:49–58
- Cohen BE, Edmondson D, Kronish IM (2015) State of the art review: depression, stress, anxiety, and cardiovascular disease. *Am J Hypertens* 28:1295–1302
- Kivimäki M, Steptoe A (2018) Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 15:215
- Oppenheimer S, Cechetto D (2016) The insular cortex and the regulation of cardiac function. *Compr Physiol* 6:1081–1133
- Taggart P, Carruthers M, Somerville W (1973) Electrocardiogram, plasma catecholamines and lipids, and their modification by oxprenolol when speaking before an audience. *Lancet* 302:341–346
- Liu J, Hakucho A, Liu X, Fujimiya T (2016) Acute restraint stress provokes sudden cardiac death in normotensive rats and enhances susceptibility to arrhythmogenic effects of adrenaline in spontaneously hypertensive rats. *Leg Med* 21:19–28
- Esler M (2017) Mental stress and human cardiovascular disease. *Neurosci Biobehav Rev* 74:269–276
- Fontes MAP, Marins FR, Patel TA, de Paula CA, dos Santos Machado LR, de Sousa Lima EB et al (2023) Neurogenic background for emotional stress-associated hypertension. *Curr Hypertens Rep*. <https://doi.org/10.1007/s11906-023-01235-7>
- Silva CC, Fontes MAP (2019) Cardiovascular reactivity to emotional stress: the hidden challenge for pets in the urbanized environment. *Physiol Behav* 207:151–158
- Critchley HD, Taggart P, Sutton PM, Holdright DR, Batchvarov V, Hnatkova K et al (2005) Mental stress and sudden cardiac death: asymmetric midbrain activity as a linking mechanism. *Brain* 128:75–85
- Fontes MAP, Filho ML, Machado NLS, de Paula CA, Cordeiro LMS, Xavier CH et al (2017) Asymmetric sympathetic output: the dorsomedial hypothalamus as a potential link between emotional stress and cardiac arrhythmias. *Autonomic Neurosci* 207:22–27
- Brown R, James C, Henderson LA, Macefield VG (2012) Autonomic markers of emotional processing: skin sympathetic nerve activity in humans during exposure to emotionally charged images. *Front Physiol* 3:394
- Carter JR, Durocher JJ, Kern RP (2008) Neural and cardiovascular responses to emotional stress in humans. *Am J Physiol Regulatory Integr Comp Physiol* 295:R1898–R1903
- Wong R, Sesa-Ashton G, Datta S, McCarthy B, Henderson LA, Dawood T et al (2023) The role of the dorsolateral prefrontal cortex in control of skin sympathetic nerve activity in humans. *Cerebral Cortex* 33:bhad112
- Carter JR, Goldstein DS (2015) Sympathoneural and adrenomedullary responses to mental stress. *Compr Physiol* 5:119
- Lane RD, Jennings JR (1996) Hemispheric asymmetry, autonomic asymmetry, and the problem of sudden cardiac death. In: Davidson RD, Hugdahl K (eds) *Brain asymmetry*. MIT Press, Cambridge, p 271
- Quadt L, Critchley H, Nagai Y (2022) Cognition, emotion, and the central autonomic network. *Auton Neurosci* 238:102948
- Xavier CH, Beig MI, Ianzer D, Fontes MAP, Nalivaiko E (2013) Asymmetry in the control of cardiac performance by dorsomedial hypothalamus. *Am J Physiol Regulatory Integr Comp Physiol* 304:R664–R674
- Xavier CH, Nalivaiko E, Beig MI, Menezes GB, Cara DC, Campagnole-Santos MJ et al (2009) Functional asymmetry in the descending cardiovascular pathways from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience* 164:1360–1368
- Myers B (2017) Corticolimbic regulation of cardiovascular responses to stress. *Physiol Behav* 172:49–59
- Marins FR, Limborço-Filho M, D'Abreu BF, de Almeida PWM, Gavioli M, Xavier CH et al (2020) Autonomic and cardiovascular consequences resulting from experimental hemorrhagic stroke in the left or right intermediate insular cortex in rats. *Auton Neurosci* 227:102695
- Nieuwenhuys R (2012) The insular cortex: a review. *Prog Brain Res* 195:123–163
- Butti C, Hof PR (2010) The insular cortex: a comparative perspective. *Brain Struct Funct* 214:477–493
- Evrard HC (2019) The organization of the primate insular cortex. *Front Neuroanat* 13:43
- Marins FR, Limborço-Filho M, Iddings JA, Xavier CH, Biancardi VC, Stern JE et al (2021) Tachycardia evoked from insular stroke in rats is dependent on glutamatergic neurotransmission in the dorsomedial hypothalamus. *Eur J Neurol* 28:3640–3649
- Nagai M, Dote K, Kato M (2020) Autonomic response after hemorrhagic stroke in the right insular cortex: what is the common pathophysiology in rat and human? *Autonomic Neurosci* 230:102755–102755
- Nagai M, Hoshida S, Kario K (2010) The insular cortex and cardiovascular system: a new insight into the brain-heart axis. *J Am Soc Hypertens* 4:174–182
- Gogolla N (2017) The insular cortex. *Curr Biol* 27:R580–R586
- Moraga-Amaro R, Stehberg J (2012) The insular cortex and the amygdala: shared functions and interactions. In: Ferry B (ed) *The amygdala: a discrete multitasking manager*. InTech, pp 231–56.
- Harrison NA, Gray MA, Gianaros PJ, Critchley HD (2010) The embodiment of emotional feelings in the brain. *J Neurosci* 30:12878–12884
- Gasquoine PG (2014) Contributions of the insula to cognition and emotion. *Neuropsychol Rev* 24:77–87
- Macefield VG, Henderson LA (2019) Identification of the human sympathetic connectome involved in blood pressure regulation. *Neuroimage* 202:116119
- Macey PM, Wu P, Kumar R, Ogren JA, Richardson HL, Woo MA et al (2012) Differential responses of the insular cortex gyri to autonomic challenges. *Auton Neurosci* 168:72–81
- Marins FR, Limborço-Filho M, Xavier CH, Biancardi VC, Vaz GC, Stern JE et al (2016) Functional topography of cardiovascular regulation along the rostrocaudal axis of the rat posterior insular cortex. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 43:484–493

36. Oppenheimer SM, Gelb A, Girvin JP, Hachinski VC (1992) Cardiovascular effects of human insular cortex stimulation. *Neurology* 42:1727–1727
37. Hsueh B, Chen R, Jo Y, Tang D, Raffiee M, Kim YS et al (2023) Cardiogenic control of affective behavioural state. *Nature* 615:292–299
38. Kobuch S, Fazalbhoy A, Brown R, Henderson LA, Macefield VG (2017) Central circuitry responsible for the divergent sympathetic responses to tonic muscle pain in humans. *Hum Brain Mapp* 38:869–881
39. Fontes MAP, Tagawa T, Polson JW, Cavanagh S-J, Dampney RAL (2001) Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2891–901
40. Horiuchi J, McAllen RM, Allen AM, Killinger S, Fontes MA, Dampney RA (2004) Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R824–R832
41. James C, Macefield VG, Henderson LA (2013) Real-time imaging of cortical and subcortical control of muscle sympathetic nerve activity in awake human subjects. *Neuroimage* 70:59–65
42. Lindell AK, Hudry K (2013) Atypicalities in cortical structure, handedness, and functional lateralization for language in autism spectrum disorders. *Neuropsychol Rev* 23:257–270
43. Toga AW, Thompson PM (2003) Mapping brain asymmetry. *Nat Rev Neurosci* 4:37–48
44. Guidali G, Picardi M, Gramegna C, Bolognini N (2023) Modulating motor resonance with paired associative stimulation: neurophysiological and behavioral outcomes. *Cortex* 163:139–153
45. Concha ML, Bianco IH, Wilson SW (2012) Encoding asymmetry within neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 13:832–843
46. Chouchou F, Mauguière F, Vallayer O, Catenoix H, Isnard J, Montavont A et al (2019) How the insula speaks to the heart: cardiac responses to insular stimulation in humans. *Hum Brain Mapp* 40:2611–2622
47. Kikumoto M, Nagai M, Ohshita T, Toko M, Kato M, Dote K et al (2018) Insular cortex lesion and autonomic instability in a herpes simplex virus encephalitis patient. *J Neurovirol* 24:649–651
48. Naver HK, Blomstrand C, Wallin BG (1996) Reduced heart rate variability after right-sided stroke. *Stroke* 27:247–251
49. Wittling W, Block A, Genzel S, Schweiger E (1998) Hemisphere asymmetry in parasympathetic control of the heart. *Neuropsychologia* 36:461–468
50. Zamrini E, Meador K, Loring D, Nichols FT, Lee GP, Figueroa R et al (1990) Unilateral cerebral inactivation produces differential left/right heart rate responses. *Neurology* 40:1408–1408
51. Lueken U, Lisse M, Mattes K, Naumann D, Wittling W, Schweiger E (2009) Altered tonic and phasic cortisol secretion following unilateral stroke. *Psychoneuroendocrinology* 34:402–412
52. Wittling W (1997) The right hemisphere and the human stress response. *Acta Physiol Scand Suppl* 640:55–59
53. Wittling W, Block A, Schweiger E, Genzel S (1998) Hemisphere asymmetry in sympathetic control of the human myocardium. *Brain Cogn* 38:17–35
54. Bonati B, Csermely D, Sovrano VA (2013) Looking at a predator with the left or right eye: asymmetry of response in lizards. *Laterality* 18:329–39
55. Vallortigara G, Rogers L (2005) Survival with an asymmetrical brain: advantages and disadvantages of cerebral lateralization. *Behav Brain Sci* 28:575–89
56. Bettex DA, Prêtre R, Chassot P-G (2014) Is our heart a well-designed pump? The heart along animal evolution. *Eur Heart J* 35:2322–2332
57. Gibbins I (2021) Comparative anatomy and evolution of the autonomic nervous system. *Comparative physiology and evolution of the autonomic nervous system*. Routledge, pp 1–67
58. Lane RD, Wallace JD, Petrosky PP, Schwartz GE, Gradman AH (1992) Supraventricular tachycardia in patients with right hemisphere strokes. *Stroke* 23:362–366
59. Colivicchi F, Bassi A, Santini M, Caltagirone C (2004) Cardiac autonomic derangement and arrhythmias in right-sided stroke with insular involvement. *Stroke* 35:2094–2098
60. Laowattana S, Zeger SL, Lima JAC, Goodman SN, Wittstein IS, Oppenheimer SM (2006) Left insular stroke is associated with adverse cardiac outcome. *Neurology* 66:477–483
61. Walter U, Kolbaske S, Patejdl R, Steinhagen V, Abu-Mugheisib M, Grossmann A et al (2013) Insular stroke is associated with acute sympathetic hyperactivation and immunodepression. *Eur J Neurol* 20:153–159
62. Christensen H, Boysen G, Christensen A, Johannesen H (2005) Insular lesions, ECG abnormalities, and outcome in acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:269–271
63. Seifert F, Kallmünzer B, Gutjahr I, Breuer L, Winder K, Kaschka I et al (2015) Neuroanatomical correlates of severe cardiac arrhythmias in acute ischemic stroke. *J Neurol* 262:1182–1190
64. Prats-Sánchez L, Alcalde O, Martí-Fàbregas J (2018) Atrial fibrillation after acute intracerebral hemorrhage: how would the insular cortex damage interact? Reply *Euro J Neurol* 25:e77–e77
65. Sanchez-Larsen A, Principe A, Ley M, Vaquerizo B, Langohr K, Rocamora R (2023) Insular role in blood pressure and systemic vascular resistance regulation. *Neuromodulation*. <https://doi.org/10.1016/j.neurom.2022.12.012>
66. Winder K, Millar CV, Siedler G et al (2023) Acute right insular ischaemic lesions and poststroke left ventricular dysfunction. *Stroke Vascular Neurol* 8(4):301–6
67. Carod-Artal FJ (2018) Infectious diseases causing autonomic dysfunction. *Clin Auton Res* 28:67–81
68. Carrara M, Ferrario M, Bollen Pinto B, Herpain A (2021) The autonomic nervous system in septic shock and its role as a future therapeutic target: a narrative review. *Ann Intensive Care* 11:80
69. Carmichael ST (2005) Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2:396–409
70. Kumar A, Gupta V (2016) A review on animal models of stroke: an update. *Brain Res Bull* 122:35–44
71. Fontes MAP, Xavier CH, Marins FR, Limbório-Filho M, Vaz GC, Müller-Ribeiro FC et al (2014) Emotional stress and sympathetic activity: contribution of dorsomedial hypothalamus to cardiac arrhythmias. *Brain Res* 1554:49–58
72. Neulen A, Molitor M, Kosterhon M, Pantel T, Holzbach E, Rudi W-S et al (2021) Correlation of cardiac function and cerebral perfusion in a murine model of subarachnoid hemorrhage. *Sci Rep* 11:3317
73. Schmidt EA, Despas F, Pavy-Le Traon A, Czosnyka Z, Pickard JD, Rahmouni K et al (2018) Intracranial pressure is a determinant of sympathetic activity. *Front Physiol* 9:11
74. Narayan SK, Grace Cherian S, Babu Phaniti P, Babu Chidambaram S, Rachel Vasanthi AH, Arumugam M (2021) Preclinical animal studies in ischemic stroke: challenges and some solutions. *Animal Models Exp Med* 4:104–115
75. Lyden PD, Bosetti F, Diniz MA, Rogatko A, Koenig JJ, Lamb J et al (2022) The stroke preclinical assessment network: rationale, design, feasibility, and stage 1 results. *Stroke* 53:1802–1812
76. Zhang H, Lin S, Chen X, Gu L, Zhu X, Zhang Y et al (2019) The effect of age, sex and strains on the performance and outcome in animal models of stroke. *Neurochem Int* 127:2–11
77. Bigalke JA, Durocher JJ, Greenlund IM, Keller-Ross M, Carter JR (2023) Blood pressure and muscle sympathetic nerve activity are associated with trait anxiety in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 324:H494–503

78. Dampney RAL, Coleman MJ, Fontes MAP, Hirooka Y, Horiuchi J, Li Y-W et al (2002) Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:261–268
79. Leor J, Poole WK, Kloner RA (1996) Sudden cardiac death triggered by an earthquake. *N Engl J Med* 334:413–419
80. Meisel SR, Dayan KI, Pazuener H, Chetboun I, Arbel Y, David D et al (1991) Effect of Iraqi missile war on incidence of acute myocardial infarction and sudden death in Israeli civilians. *Lancet* 338:660–661
81. Kataoka N, Shima Y, Nakajima K, Nakamura K (2020) A central master driver of psychosocial stress responses in the rat. *Science* 367:1105–1112
82. Henderson LA, Macefield VG (2021) The role of the dorsomedial and ventromedial hypothalamus in regulating behaviorally coupled and resting autonomic drive. *Handbook of clinical neurology*, vol 180. Elsevier, pp 187–200
83. Jensen D, Ebmeier K, Suri S, Rushworth M, Klein-Flügge M (2024) Nuclei-specific hypothalamus networks predict a dimensional marker of stress in humans. *Nat Commun* 15:2426
84. Xavier CH, Ianzer D, Lima AM, Marins FR, Pedrino GR, Vaz G et al (2014) Excitatory amino acid receptors mediate asymmetry and lateralization in the descending cardiovascular pathways from the dorsomedial hypothalamus. *PLoS ONE* 9:e112412
85. Pruessner JC, Dedovic K, Khalili-Mahani N, Engert V, Pruessner M, Buss C et al (2008) Deactivation of the limbic system during acute psychosocial stress: evidence from positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging studies. *Biol Psychiatry* 63:234–240
86. Nagai M, Dote K, Kato M, Sasaki S, Oda N, Kagawa E et al (2017) The insular cortex and Takotsubo cardiomyopathy. *Curr Pharm Des* 23:879–888
87. David S, Jhelum P, Ryan F, Jeong SY, Kroner A (2022) Dysregulation of iron homeostasis in the central nervous system and the role of ferroptosis in neurodegenerative disorders. *Antioxid Redox Signal* 37:150–170
88. Zille M, Osés-Prieto JA, Savage SR, Karuppagounder SS, Chen Y, Kumar A et al (2022) Hemin-induced death models hemorrhagic stroke and is a variant of classical neuronal ferroptosis. *J Neurosci* 42:2065–2079
89. Robinson SR, Dang TN, Dringen R, Bishop GM (2009) Hemin toxicity: a preventable source of brain damage following hemorrhagic stroke. *Redox Rep* 14:228–235
90. Brown GC, Vilalta A (2015) How microglia kill neurons. *Brain Res* 1628:288–297
91. Ye F, Garton HJ, Hua Y, Keep RF, Xi G (2021) The role of thrombin in brain injury after hemorrhagic and ischemic stroke. *Transl Stroke Res* 12:496–511
92. López E, Lee-Rivera I, Alvarez-Arce A, López-Colomé AM (2019) Thrombin induces Ca²⁺-dependent glutamate release from RPE cells mediated by PLC/PKC and reverse Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Mol Vis* 25:546
93. Marins FR, Iddings JA, Fontes MA, Filosa JA (2017) Evidence that remodeling of insular cortex neurovascular unit contributes to hypertension-related sympathoexcitation. *Physiol Rep* 5:e13156
94. Felberg RA, Grotta JC, Shirzadi AL, Strong R, Narayana P, Hill-Felberg SJ et al (2002) Cell death in experimental intracerebral hemorrhage: the “black hole” model of hemorrhagic damage. *Ann Neurol* 51:517–524
95. Nagai M, Dote K, Kato M, Oda N (2018) Atrial fibrillation after acute intracerebral hemorrhage: how would the insular cortex damage interact? *Eur J Neurol* 25:e58–e58
96. Abboud H, Berroir S, Labreuche J, Orjuela K, Amarenco P (2006) Insular involvement in brain infarction increases risk for cardiac arrhythmia and death. *Ann Neurol* 59:691–699
97. Apak I, Iltumur K, Tamam Y, Kaya N (2005) Serum cardiac troponin T levels as an indicator of myocardial injury in ischemic and hemorrhagic stroke patients. *Tohoku J Exp Med* 205:93–101
98. Ay H, Koroshetz W, Benner T, Vangel M, Melnosky C, Arsava E et al (2006) Neuroanatomic correlates of stroke-related myocardial injury. *Neurology* 66:1325–1329
99. Cereda C, Ghika J, Maeder P, Bogousslavsky J (2002) Strokes restricted to the insular cortex. *Neurology* 59:1950–1955
100. Constantinescu V, Detante O, Matei D, Constantinescu I, Arsenescu-Georgescu C, Defaye P et al (2017) Cortical lateralization and cardiac autonomic control. Insights from insular stroke and epilepsy. *Arch Clin Cases* 4:154–68.
101. Fink JN, Selim MH, Kumar S, Voetsch B, Fong WC, Caplan LR (2005) Insular cortex infarction in acute middle cerebral artery territory stroke: predictor of stroke severity and vascular lesion. *Arch Neurol* 62:1081–1085
102. Hilz MJ, Dütsch M, Perrine K, Nelson PK, Rauhut U, Devinsky O (2001) Hemispheric influence on autonomic modulation and baroreflex sensitivity. *Ann Neurol* 49:575–584
103. Hirashima Y, Takashima S, Matsumura N, Kurimoto M, Origasa H, Endo S (2001) Right Sylvian fissure subarachnoid hemorrhage has electrocardiographic consequences. *Stroke* 32:2278–2281
104. Krause T, Werner K, Fiebach JB, Villringer K, Piper SK, Haueisler KG et al (2017) Stroke in right dorsal anterior insular cortex is related to myocardial injury. *Ann Neurol* 81:502–511
105. Lederman YS, Balucani C, Lazar J, Steinberg L, Gugger J, Levine SR (2014) Relationship between QT interval dispersion in acute stroke and stroke prognosis: a systematic review. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 23:2467–2478
106. Meyer S, Strittmatter M, Fischer C, Georg T, Schmitz B (2004) Lateralization in autonomic dysfunction in ischemic stroke involving the insular cortex. *NeuroReport* 15:357–361
107. Min J, Young G, Umar A, Kampfschulte A, Ahrar A, Miller M et al (2022) Neurogenic cardiac outcome in patients after acute ischemic stroke: the brain and heart connection. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 31:106859
108. Robinson TG, Dawson SL, Eames PJ, Panerai RB, Potter JF (2003) Cardiac baroreceptor sensitivity predicts long-term outcome after acute ischemic stroke. *Stroke* 34:705–712
109. Sörös P, Hachinski V (2012) Cardiovascular and neurological causes of sudden death after ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 11:179–188
110. Sykora M, Diedler J, Steiner T (2007) Repetitive asystole in right insular haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:1282–1283
111. Takeuchi S, Nagatani K, Otani N, Wada K, Mori K (2015) Electrocardiograph abnormalities in intracerebral hemorrhage. *J Clin Neurosci* 22:1959–1962
112. Tokgözoğlu SL, Batur MK, Topçuoğlu MA, Saribas O, Kes S, Oto A (1999) Effects of stroke localization on cardiac autonomic balance and sudden death. *Stroke* 30:1307–1311
113. Wittstock M, Meyer K, Klinke J, Grossmann A, Walter U, Storch A (2021) Effects of insular involvement on functional outcome after intracerebral hemorrhage. *Acta Neurol Scand* 144:559–565

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Participação como coautora no artigo intitulado “*Identification and Characterization of Alamandine-(1-5), a New Component of the Renin-Angiotensin System*”.

<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.125.32617>



Circulation Research

ORIGINAL RESEARCH

Identification and Characterization of Alamandine-(1-5), a New Component of the Renin-Angiotensin System

Robson A.S. Santos¹, Melissa Tainan Silva Dias, Amanda de Sá Martins Bessa², Carolina Fonseca Barros³, Matheus F. Itaborahy, Filipe Alex da Silva⁴, Sthefanie Chaves de Almeida Gonçalves⁵, Lucas Rodrigues-Ribeiro⁶, Kamyille Silva Ferraz⁷, Ana Paula Davel⁸, Natália Nóbrega, Bruno Durante da Silva, Sérgio Scalzo⁹, Pedro Alves Soares¹⁰, João Batista Rodrigues Dutra¹¹, Ivana Lula¹², Isadora Zhong Liang Ferreira Feng, Uri Flegler Vieira-Machado, Ana Caroline Ventris de Godoy¹³, Adelson Héric Alves Monteiro¹⁴, Marcos Eliezeck¹⁵, Bruno Sanches¹⁶, André Monteiro¹⁷, Gabriela Magalhães¹⁸, Nícia Pedreira Soares, Danilo Augusto Alves Pereira¹⁹, Júlia Rezende Ribeiro²⁰, Maria Luiza Dias-Pinto²¹, Leandro Eziquiel de Souza²², Amanda de A. Silva²³, Daisy Motta-Santos²⁴, Michael Bader²⁵, Natália Alenina²⁶, Luciano dos Santos Aggum Capettini²⁷, Marco Antônio Peliky Fontes²⁸, Andrea Siqueira Haibara²⁹, Daniel Campos Vilella³⁰, Thiago Verano-Braga³¹, Maria Claudia Irigoyen³², Fernanda Ribeiro Marins³³, Carlos Henrique Castro³⁴, Ana Cristina Simões-e-Silva³⁵, Sílvia Guatimosim³⁶, M. Fatima Leite³⁷, Maria José Campagnole-Santos³⁸

BACKGROUND: The renin-angiotensin system comprises a biochemical cascade that hydrolyzes angiotensinogen into several different bioactive peptides, which can activate different receptors, promoting plenty of specific effects. This study aimed to evaluate the presence of the putative product of alamandine, the pentapeptide Ala-(1-5) (alamandine-[1-5]), in the circulation and its biological activity.

METHODS: To accomplish this, we have used mass spectrometry (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight/Time-of-Flight mass spectrometry [MALDI/TOF/TOF], Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [LC-MS/MS]) and several methodologies, including isolated blood vessels, isolated perfused hearts, isolated cardiomyocytes, blood pressure recording in freely moving normotensive and spontaneously hypertensive rats, high-resolution echocardiography, central administration (intracerebroventricular infusion and microinjection in the insular cortex), cell culture (endothelial cells and G-protein-coupled receptors-transfected Chinese Hamster Ovary cells), and wild-type and Mas (Mas receptor proto-oncogene), MrgD (Mas-related G-protein-coupled receptor subtype D), or AT₂ (angiotensin II type 2) receptor-deficient mice.

RESULTS: We show that Ala-(1-5) is present in the circulation of healthy humans and rodents and promotes many biological central and peripheral actions. A major role for ACE (angiotensin-converting enzyme) activity in the formation of Ala-(1-5) from alamandine in the circulation was observed using plasma samples from angiotensinogen-knockout mice. Ala-(1-5) increases baroreflex sensitivity and produces a long-lasting (≈6 hours) antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats, associated with a significant reduction in cardiac output. Additionally, Ala-(1-5) decreases inotropism in isolated perfused hearts and reduces contractility in cardiomyocytes. In Chinese Hamster Ovary cells-transfected cells, Ala-(1-5) can bind and stimulate NO production through all receptors from the renin-angiotensin system protective arm (Mas, MrgD, and AT₂ receptors). On the other hand, the Ala-(1-5) effects on cardiomyocytes and mouse aortic rings were abolished only by MrgD genetic deletion, but not by Mas or AT₂ receptor knockout.

CONCLUSIONS: Our data demonstrate that Ala-(1-5) is a newly identified peptide within the renin-angiotensin system, with strong blood pressure-lowering effects that vary in mechanisms of action among different tissues. Ala-(1-5) has distinct characteristics that differentiate it from the conventional renin-angiotensin system pathways responsible for reducing blood pressure.

GRAPHIC ABSTRACT: A graphic abstract is available for this article.

Key Words: angiotensin A ■ angiotensins ■ hypertension ■ insular cortex ■ Mas1

Editorial, see Article by Chappell

Correspondence to: Robson A.S. Santos, MD, PhD, Laboratory of Hypertension, INCT-Nanobiofar, Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Av Presidente Antônio Carlos 6627 – ICB, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. Email: robsonsantos@gmail.com
Supplemental Material is available at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/CIRCRESAHA.125.326174>.
For Sources of Funding and Disclosures, see page 134.

© 2025 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at www.ahajournals.org/journal/res

120 January 2, 2026

Circulation Research. 2026;138:e326174. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.125.326174

Novelty and Significance

What Is Known?

- The renin-angiotensin system (RAS) is considered a major control mechanism of blood pressure and hydro-electrolyte balance.
- The system comprises 2 axes: 1 canonic, vasopressor, represented by Ang II (angiotensin II) acting on the AT1 (angiotensin type 1) receptor and another, alternative, represented by Ang-(1-7) (angiotensin-[1-7])/Alamandine acting on the receptors, Mas (Mas receptor proto-oncogene) and MrgD (Mas-related G-protein-coupled receptor subtype D), and angiotensin acting on AT2 (angiotensin II type 2) receptors.

What New Information Does This Article Contribute?

- This study is the first to identify and characterize a novel end-product of the RAS, the pentapeptide Ala-Arg-Val-Tyr-Ile, Ala-(1-5) (alamandine-[1-5]).
- Ala-(1-5) formed from alamandine (Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro) by removal of the C-terminal His-Pro by ACE (angiotensin-converting enzyme), is present in the circulation of rodents and humans.
- This novel component of the alternative RAS axis binds and stimulates Chinese Hamster Ovary cells transfected with Mas, MrgD, or AT2R.

Ala-(1-5) possesses several biological effects acting in blood vessels, heart, brain, and isolated cells, and exerts a potent anti-hypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. The effects of Ala-(1-5) in isolated blood vessels and cardiomyocytes are varyingly dependent on the different receptors of the alternative axis, and therefore our results suggest that Ala-(1-5) is a triple agonist of the receptors of the alternative RAS axis: Mas, MrgD, and AT2R. This fascinating possibility provides a new understanding of the RAS and may open a novel therapeutic alternative for the treatment of diseases that could benefit from stimulation of the alternative RAS axis.

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

ACE	angiotensin-converting enzyme
ACE2	angiotensin-converting enzyme 2
Ala-(1-5)	alamandine-(1-5)
Ang II	angiotensin II
Ang-(1-5)	angiotensin-(1-5)
Ang-(1-7)	angiotensin-(1-7)
Ang-A	Angiotensin A
AT₁R	angiotensin II type 1 receptor
AT₂R	angiotensin II type 2 receptor
CHO	Chinese Hamster Ovary cells
GPCRs	G-protein-coupled receptors
HR	heart rate
IC	insular cortex
KO	knockout
MAP	mean arterial pressure
Mas	Mas receptor proto-oncogene
MrgD	Mas-related G-protein-coupled receptor subtype D
RAS	renin-angiotensin system
SHR	spontaneously hypertensive rats
TLM	angiotensinogen knockout mice

It is well known that the renin-angiotensin system (RAS) plays a critical role in cardiovascular control and hydro-electrolyte homeostasis. The biologically active end products of this system are formed by a limited proteolysis process starting with the hydrolysis of the glycoprotein angiotensinogen by renin. Ang II (angiotensin II) and Ang-(1-7) (angiotensin-[1-7]) are key players of the RAS, acting as mediators of the classical and the noncanonical axes, respectively.¹ In 2007, Jankowski and collaborators reported that Ang II undergoes decarboxylation of the N-terminal aspartate to alanine, forming Ang-A (angiotensin A).² Years later, our group published the discovery and characterization of alamandine, a heptapeptide that can be formed from angiotensin A, through hydrolysis by ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2), or from Ang-(1-7) through decarboxylation of its aspartate residue to alanine.³ While Ang A displays actions that resemble those of Ang II, acting on AT₁ (angiotensin type 1) and AT₂ (angiotensin type 2) receptors, alamandine differs from Ang-(1-7) by acting on the MrgD (Mas-related G-protein-coupled receptor subtype D) instead of Ang-(1-7) receptor Mas (Mas receptor proto-oncogene).³ In addition, at least in some circumstances, alamandine can have selective actions such as those reported in the insular cortex (IC),⁴ where it increases blood pressure, heart rate (HR), and renal sympathetic activity, whereas

Ang-(1-7) was essentially without effect. The hydrolysis of Ang-(1-7) by ACE (angiotensin-converting enzyme) can form the pentapeptide Ang-(1-5), which has been reported as an AT₂ or Mas receptor agonist, depending on the cell type and organ.⁵⁻⁷ There is no data in the literature addressing the possible formation and actions of Ala-(1-5) (alamandine-[1-5]) [Ala-(1-5)], a putative product of alamandine through ACE hydrolysis. Here, we report the formation and actions of this novel pentapeptide. Our results suggest that Ala-(1-5) can be formed from alamandine by ACE, and it is present in human and rodent blood. This novel angiotensin has unique activities, including a noticeable negative inotropic effect and marked effect on cardiac inotropism. These novel findings might contribute importantly to extending our understanding of the RAS.

METHODS

Data Availability

The authors declare that all supporting data are available within the article and its [Supplemental Material](#). Detailed descriptions of experimental methods of the current study are provided in the [Supplemental Material](#). The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

RESULTS

Formation of Ala-(1-5)

Evidence that ACE Plays a Major Role in the Formation of Ala-(1-5) From Alamandine in Plasma

It is well known that the pentapeptide Ang-(1-5) is one of the ACE-derived major metabolites of Ang-(1-7).⁸ This study was initially planned to evaluate whether, similarly to Ang-(1-7), alamandine (Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro) could be hydrolyzed by ACE to the pentapeptide Ala-(1-5).

To explore the potential involvement of ACE in the conversion of alamandine to Ala-(1-5), plasma samples were collected from angiotensinogen knockout mice (TLM), which lack angiotensin production. We conducted incubation experiments with alamandine using TLM plasma in the presence and absence of the ACE inhibitor captopril. Mass spectrometry analysis (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight/Time-of-Flight mass spectrometry [MALDI-TOF/TOF]) was then used to detect any potential formation of a fragment matching the mass of Ala-(1-5) at 621 Da. As expected, plasma from TLM (TLM_CT) did not present a peak corresponding to Angiotensin mass. However, after 1 minute (TLM-T1') and 3 minutes (TLM-T3') of TLM plasma incubated with alamandine, formation of a peak of 621 Da was observed, corresponding to Ala-(1-5) mass. In contrast, in the presence of captopril (TLM-T1'-CAP and TLM-T3'-CAP), no formation of a 621 Da

peak was detected, highlighting the critical role of ACE activity in the formation of this pentapeptide (Figure 1A). The same mass spectrum was zoomed to the range of 610 to 650 m/z to better visualize the Da peak formation in the groups (Figure 1B). To confirm the identity of spiked alamandine, the pure synthetic peptide and the synthetic peptide in the plasma were submitted to MS/MS fragmentation and sequenced using the de novo sequencing method (Figure 1C). To confirm the identity of Ala-(1-5), the pure synthetic peptide and the Da peak in the plasma were submitted to MS/MS fragmentation and sequencing (Figure 1D). Altogether, these results suggest that ACE is responsible for rapidly forming Ala-(1-5) from alamandine. Indeed, alamandine inhibits ACE activity in the plasma of TLM mice in vitro with EC₅₀ ≈ 1.2 μmol·L⁻¹. In contrast, Ala-(1-5) demonstrated a weak ACE inhibitory activity, with EC₅₀ higher than 10⁻⁵ mol·L⁻¹ under the same conditions (Figure S1). These results are consistent with the MALDI-TOF/TOF findings and suggest that alamandine acts as a competitive inhibitor of ACE.

Ala-(1-5) Circulates in Mouse and Human Blood

We next used Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) to evaluate whether Ala-(1-5) is present in human and mouse plasma samples. Ala-(1-5) was detected in blood samples from young human volunteers and C57BL6/J mice (Figure 2A and 2B). Ala-(1-5) was detected in extracted mouse plasma samples (Figure 2A). The pentapeptide was also present in low concentrations in humans, ranging from 0.2 to 8.7 pg/mL (average 2.4±1.3 pg/mL). In those samples, the concentration of Ala-(1-5) precursor, alamandine, ranged from 0.1 to 18.6 pg/mL (average 3.7±2.5 pg/mL).

Biological Effects of Ala-(1-5)

Vascular Effects of Ala-(1-5)

Because we successfully used mouse aortic rings to demonstrate the alamandine vasorelaxation,³ we initially chose this preparation to test the Ala-(1-5). Surprisingly, in contrast to alamandine, Ala-(1-5) produced contraction of mice aortic rings (Figure 3A). This striking observation engendered the present study. To get an overall picture of the Ala-(1-5) effects, we selected to perform additional experiments not only in other vessel preparations (rat aortic rings, mesenteric microvessels), but also in heart, brain, and endothelial cells. In addition, to get insights on the mechanism of action of this novel peptide, we took advantage of knockout mice for Mas, MrgD, and AT₂ receptor, as well as Chinese Hamster Ovary cells (CHO)-transfected cells. These receptors were chosen based on previous studies showing that the other ACE-derived pentapeptide angiotensin [Ang-(1-5)], a Mas/AT₂R agonist^{6,7}, also contracted a mouse aortic ring (data not shown), and because the precursor of Ala-(1-5), alamandine, is a MrgD receptor agonist.

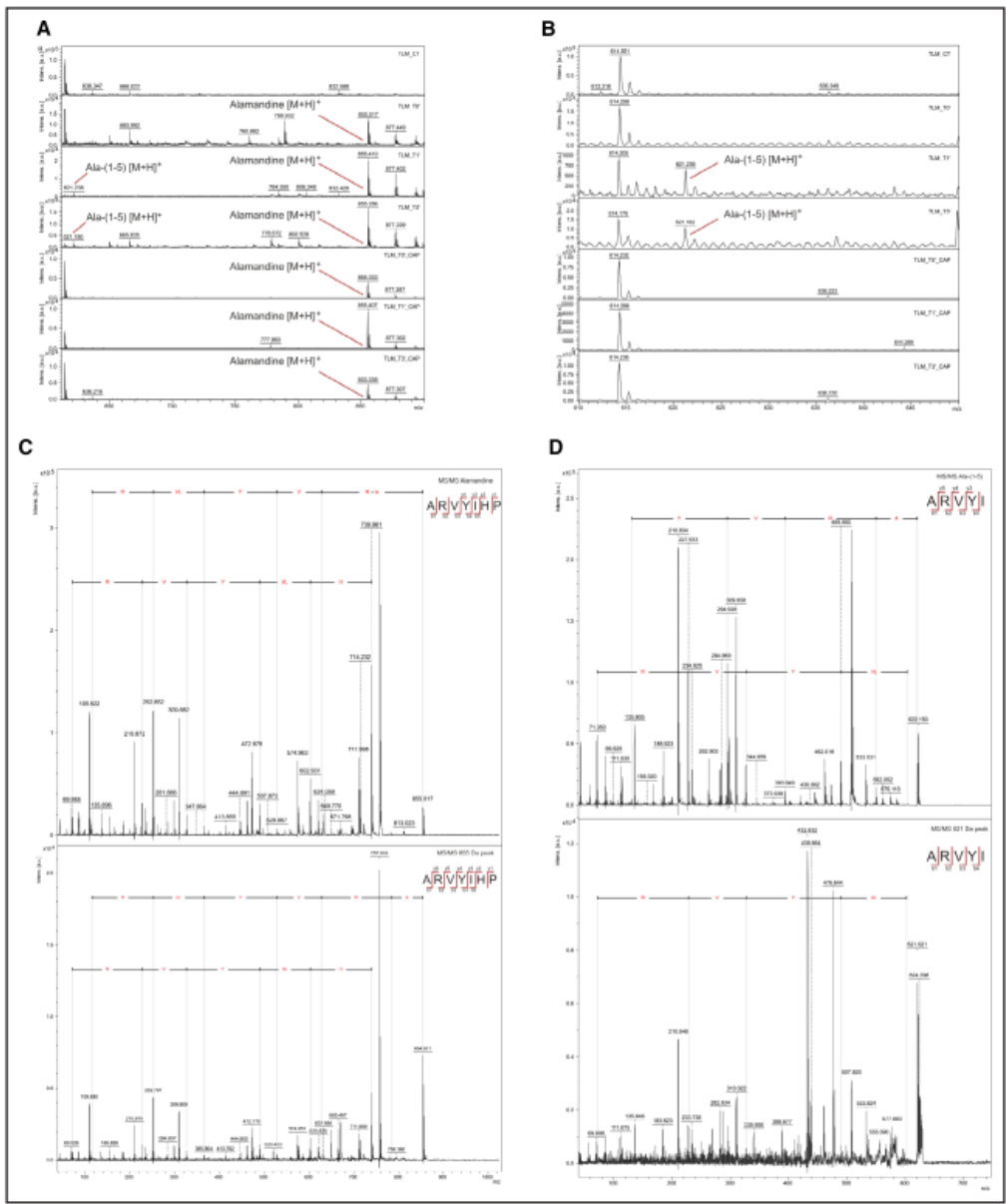


Figure 1. ACE (angiotensin-converting enzyme) can metabolize alamandine, forming Ala-(1-5) (alamandine-[1-5]). **A**, Plasma mass spectrometry spectra range 610 to 900 m/z. **B**, Plasma MS spectra range 610 to 650 m/z. **C**, De novo sequencing of synthesized alamandine (**upper**) in aqueous solution and spiked alamandine in plasma (**bottom**). **D**, De novo sequencing synthesized Ala-(1-5; **upper**) in aqueous solution and formed Ala-(1-5) in plasma (**bottom**). Ala-(1-5) formation by plasma from angiotensinogen knockout mice (TLM mice) from alamandine was suppressed in the presence of the ACE-inhibitor captopril (**A** and **B**).

Downloaded from <http://ahajournals.org> by on February 11, 2026

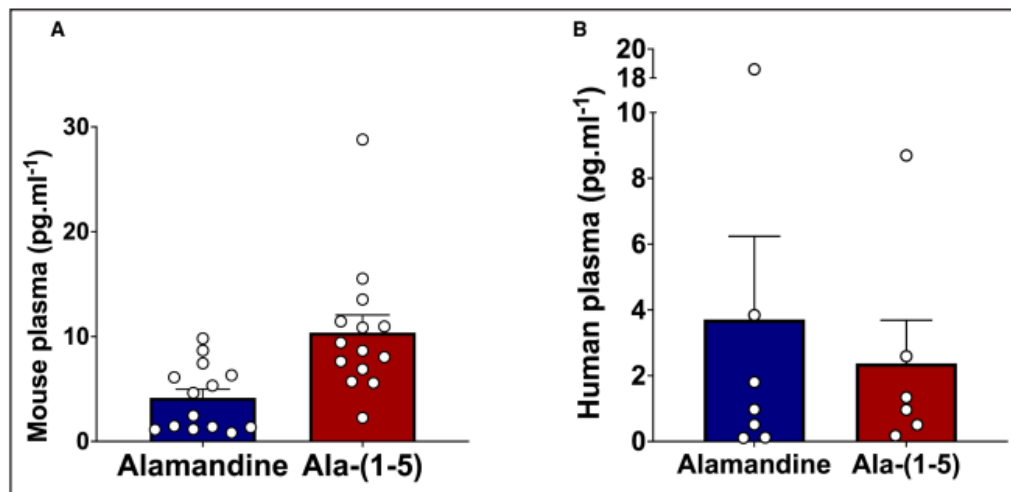


Figure 2. Ala-(1-5) (alamandine-[1-5]) is present in the circulation of mice and humans.

A. Alamandine and Ala-(1-5) quantification (pg/mL) in plasma from mice. **B.** Healthy young volunteers. Data obtained by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) peptide analyses as previously described. Values are mean $\pm$ SEM (see Table S1 for details).

As stated above, Ala-(1-5) produces a significant increase in the aortic ring's tension (Figure 3A). This was in sharp contrast with the vasorelaxation induced by the heptapeptide alamandine. Contraction induced by Ala-(1-5) was already evident at a concentration of 10^{-11} mol/L. The contractile effect was increased in endothelium-denuded rings (Figure 3B). In agreement with the results in endothelium-denuded vessel rings, pretreatment with NG-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) also increased the contractile effect (Figure 3C). Additional experiments aimed to evaluate a

possible vasoconstrictor activity of Ala-(1-5) in mouse aortic rings without preconstriction. In this condition, no contraction was observed in response to Ala-(1-5), indicating that, in this preparation, Ala-(1-5) does not seem to be a direct vasoconstrictor, but it is capable of modulating the phenylephrine-induced contractile response (Figure S2A). One may argue that Ala-(1-5) contracted mouse aortic rings because they were only partially contracted by the 10^{-7} mol/L⁻¹ phenylephrine concentration. Therefore, we performed additional experiments using 2 other conditions, KCl (60 mmol/L) and phenylephrine

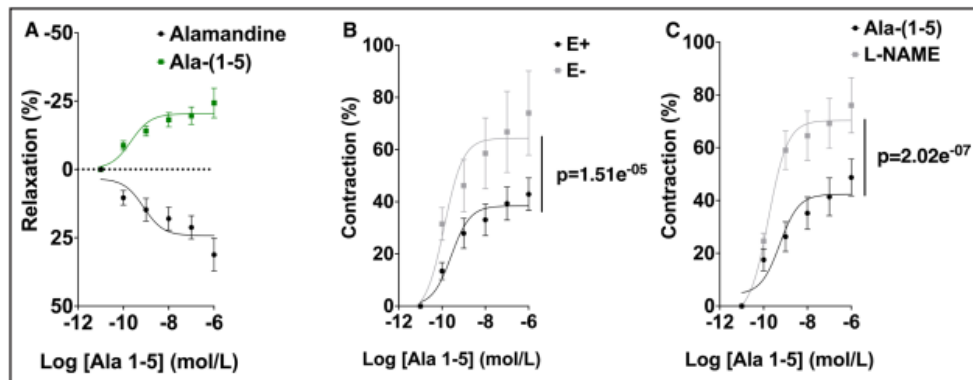


Figure 3. Vascular effects of Ala-(1-5) (alamandine-[1-5]) in isolated vessels.

A. Cumulative concentration of Ala (pD₂, 9.10; maximum effect [E_{max}], 31.21; N=10 rings) or Ala-(1-5; pD₂ [Log of IC₅₀], 9.66; E_{max}, 24.30; N=14 rings) in aortic rings preconstricted with phenylephrine. **B.** Ala-(1-5) in aortic rings preconstricted with phenylephrine with (E+ pD₂, 9.57; E_{max}, 42.87; N=18 rings) or without (E- pD₂, 9.89; E_{max}, 74; N=7 rings) endothelium. **C.** Ala-(1-5; pD₂, 9.26; E_{max}, 48.74; N=17 rings) in aortic rings preincubated with NG-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME; pD₂, 9.77; E_{max}, 76.06; N=10 rings). Data were expressed as mean $\pm$ SEM and analyzed by 2-way ANOVA.

(10 μmolL^{-1} ; Figure S2B). In these conditions, further contraction was observed with the peptide. The contractile effect was also not modified in the presence of the AT_1R antagonist, Losartan (Figure S2C). On the other hand, the contraction induced by Ala-(1-5) was abolished by pretreatment with indomethacin. Indeed, in vessels pretreated with indomethacin, a vasorelaxation was observed. This observation suggests that prostanoids are involved in the Ala-(1-5) effect in mouse aorta rings (Figure S2D). Contrasting with aortic rings, Ala-(1-5) produced a concentration-dependent relaxation in mouse small mesenteric arteries and aortic rings of spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar rats (Figure S3A through S3C).

Cardiac Effects of Ala-(1-5)

Ala-(1-5) Induced a Dramatic Decrease in Ventricular Myocyte Contractility

Our group has previously described a stimulating effect of alamandine on isolated cardiomyocyte inotropism.^{9,10} Given the instigating results obtained with Ala-(1-5) in mouse aorta rings, contrasting with the vasorelaxation caused by alamandine, we next assessed whether the effect of Ala-(1-5) in isolated ventricular myocytes would also be opposed to the stimulating effect of alamandine in this preparation. Cells were incubated with a range of Ala-(1-5) starting from 10 nmolL^{-1} until 1 μmolL^{-1} for 10 minutes. These initial results were analyzed by measuring individual cells to obtain the proper statistical power to determine the most suitable concentration for subsequent experiments. As shown in Figure 4A, Ala-(1-5) induced a concentration-dependent decrease in the shortening area of ventricular myocytes, with more pronounced effects observed in cells exposed to 100 nmolL^{-1} (Figure 4A). A significant decrease in the average speed of the cardiomyocytes' shortening was also observed (Figure 4B). Therefore, this Ala-(1-5) concentration was used for the next series of experiments. From this point forward, all data were analyzed as the mean value of cardiomyocytes from each independent heart. Illustrative images of motion vectors acquired from control or cardiomyocytes exposed to Ala-(1-5) 100 nmolL^{-1} are presented in Figure 4C. As shown in Figure 4D, Ala-(1-5) induced a statistically significant decrease in shortening area. To assess whether the reduction in contractility is due to alterations in Ca^{2+} release, we next recorded Ca^{2+} transient amplitude by confocal microscopy in cells loaded with Fluo-4/AM. Consistent with the contractility data, cardiomyocytes exposed to Ala-(1-5) presented reduced Ca^{2+} transients (Figure 4G). Although both contractile speed parameters and Ca^{2+} time to 50% decay show alteration tendencies, they were not statistically significant (Figure 4E, 4F, and 4H). It should be pointed out that the effect of Ala-(1-5) in isolated cardiomyocytes lasted as long as 30 minutes (Figure S4) and that

the effect in isolated cardiomyocytes from female hearts did not differ from that observed in male-derived cardiomyocytes (Figure S5). Taken together, these *in vitro* data obtained with Ala-(1-5) indicated that this peptide exerts actions that are importantly distinct from alamandine.

As observed in aortic rings, in MrgD-knockout (KO) cardiomyocytes, the effect of Ala-(1-5) on the contractile parameters was blunted (Figure S6A through S6C). Conversely, Ala-(1-5) decreased cell shortening as well as speed parameters in cardiomyocytes from both AT_2 -KO and Mas-KO (Figure S6D through S6I).

Ala-(1-5) Reduced Heart Contractility in Isolated Rat Hearts

Corroborating the data obtained in isolated myocytes, Ala-(1-5) reduced isolated heart contractility in Langendorff preparations. As shown in Figure S7A, alamandine gradually reduced LVESP at a concentration of 20 pmolL^{-1} . This effect was transient at the concentration of 200 pmolL^{-1} (Figure S7A). LVEDP was increased by Ala-(1-5) 200 pmolL^{-1} . No significant effects in the LVEDP were observed at the concentration of 20 pmolL^{-1} (Figure S7B). Interestingly, at the concentration of 200 pmolL^{-1} the pentapeptide evoked a biphasic effect on $\text{dP/dt}_{\text{max}}$ (Figure S7C) and $\text{dP/dt}_{\text{min}}$ (Figure S7D), that is, a rapid and transient increase followed by a significant decrease in these parameters. At the concentration of 20 pmolL^{-1} , Ala-(1-5) only produced a gradual reduction in these parameters. Ala-(1-5), at 200 pmolL^{-1} concentration, induced a reduction in perfusion pressure at the beginning of the perfusion period, indicating coronary vasodilation, which was returned to baseline values at the end of the analyzed period (Figure S7E). In contrast, with the concentration of 20 pmolL^{-1} , Ala-(1-5) promoted an initial slight, but not significant, reduction in the perfusion pressure, followed by a progressive increase in this parameter. No effects were observed in HR (Figure S7F).

Central Effects of Ala-(1-5)

Cardiovascular and Reflex Effects of Acute Intracerebroventricular Infusion of Ala-(1-5)

Considering that modulation of baroreflex is a well-characterized effect of angiotensin and alamandine,¹¹ we next tested the effect of Ala-(1-5) on this reflex. In conscious freely moving rats, 90 minutes of Ala-(1-5) Intracerebroventricular infusion did not significantly alter baseline values of mean arterial pressure (MAP) or HR in normotensive (MAP, 103 ± 8 mmHg before and 105 ± 11 mmHg; 90 minutes infusion; HR, 312 ± 13 bpm, before and 331 ± 10 bpm, 90 minutes infusion; $n=4$) or in hypertensive rats (MAP, 159 ± 8 mmHg, before and 161 ± 10 mmHg, 90 minutes infusion; HR, 296 ± 7 bpm, before and 310 ± 2 bpm, 90 minutes infusion; $n=5$). As expected, SHR animals presented a marked attenuation of the baroreflex control

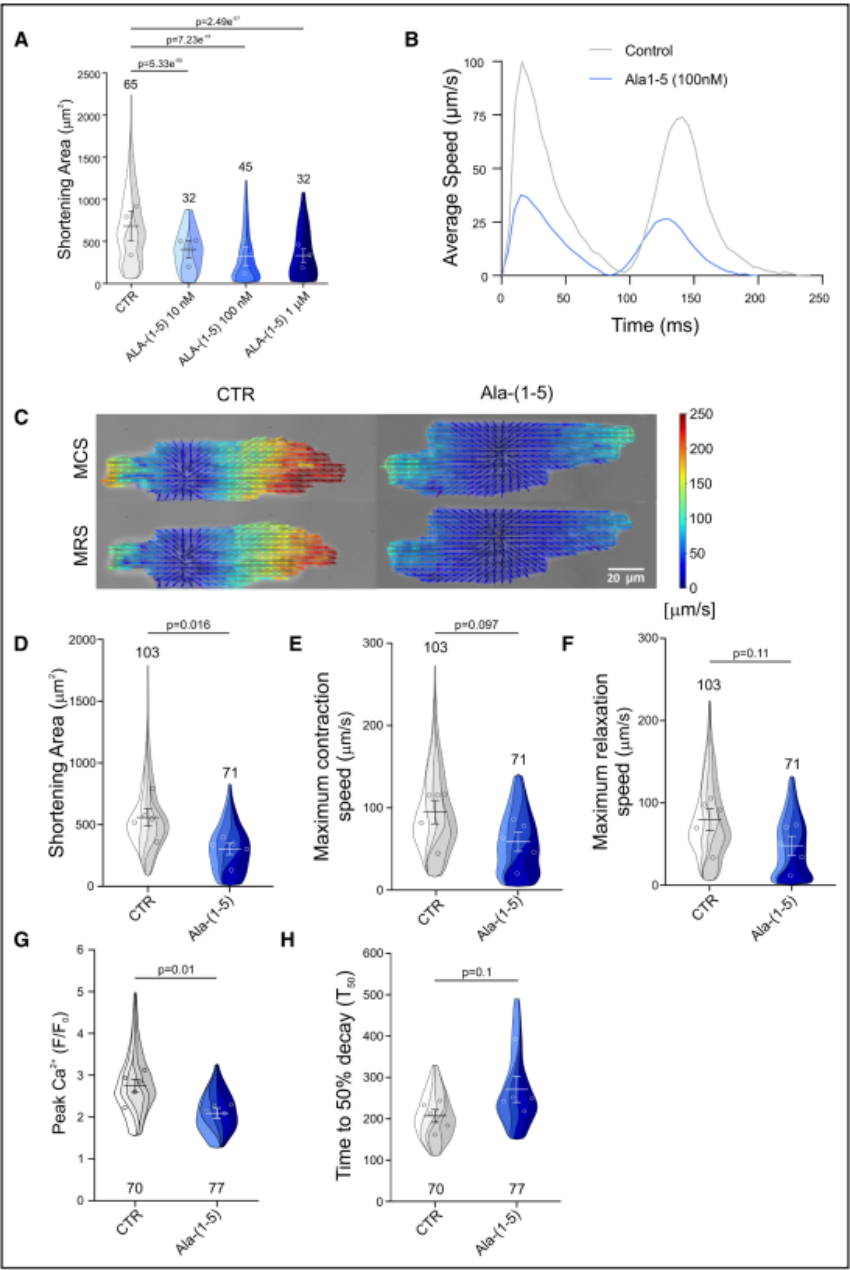


Figure 4. Ala-(1-5) (alamandine-[1-5]) reduces the ventricular myocyte shortening area. **A**, Concentration-dependent effect of Ala-(1-5) in isolated ventricular shortening. **B**, Sample average-speed trace obtained from a single contraction-relaxation cycle from control and under the effect of Ala-(1-5). **C**, Cardiomyocyte displacement speed displayed in magnitude and vector fields with visual and numerical intensity scale detection obtained during maximum contraction speed (MCS) and maximum relaxation speed (MRS) in response to Ala-(1-5). Scale bar: 20 μm . **D** through **F**, A marked decrease in cardiomyocyte shortening was observed in response to Ala-(1-5) treatment. **G** and **H**, Ala-(1-5) induced a decrease in Ca^{2+} transient amplitude, while the kinetics of decay of the (Continued)

of HR (0.27 ± 0.042 ms/mmHg; $n=9$) compared with Wistar rats (1.47 ± 0.137 ms/mmHg; $n=10$; Student *t* test; $P=0.0311$). Ala-(1-5)-infused SHR animals presented a significant improvement in the sensitivity of the baroreflex bradycardia (0.454 ± 0.058 ms/mmHg) compared with the same animals before Ala-(1-5) infusion (0.236 ± 0.060 ms/mmHg, $n=5$; paired 2-tailed Student *t* test; $P=0.0311$; Figure S8B). In contrast, Ala-(1-5) intracerebroventricular infusion did not significantly change baroreflex control of HR in Wistar rats (1436 ± 0.155 ms/mmHg versus 1466 ± 0.205 ms/mmHg, before, $n=4$; paired 2-tailed Student *t* test; $P=0.844$; Figure S8A). Saline intracerebroventricular infusion did not alter baroreflex index in Wistar rats ($n=5$; $P=0.4596$; Figure S8A) or in SHR ($n=5$; $P=0.1202$; Figure S8B). Cardiac autonomic balance was evaluated using the pharmacological blockade of cardiac muscarinic and α -adrenergic receptors. Interestingly, Ala-(1-5) did not produce significant changes in cardiac autonomic balance, both in normotensive and hypertensive strains (data not shown).

Effects of Ala-(1-5) in the Insular Cortex

We have recently shown that the IC is a brain site where alamandine has unique effects (increase in blood pressure, HR, and renal nerve activity), contrasting with the essentially absent effects of Ang-(1-7).⁴ Therefore, we next aimed to determine the effect of Ala-(1-5) in this region. At the baseline, there was no difference in cardiovascular parameters between the groups (vehicle, 85 ± 2 mmHg and 388 ± 5 bpm; alamandine, 83 ± 9 mmHg and 389 ± 10 bpm; or Ala-(1-5), 91 ± 6 mmHg and 386 ± 7 bpm). Vehicle (saline, $n=4$) microinjection was performed as a control for nonspecific autonomic and cardiovascular effects produced by volume microinjection and tissue damage. As shown in Figure S9, saline microinjection did not evoke changes in the evaluated parameters (Δ MAP, 2 ± 1 mmHg; Δ HR, 4 ± 2 bpm; Δ RSNA [renal sympathetic nerve activity], $3 \pm 1\%$; Figure S9). Alamandine ($n=7$) microinjection into the rostral IC produced a long-lasting (18 ± 3 minutes) increase in MAP ($\Delta=14 \pm 2$ mmHg), and this effect was associated with a significant increase in HR ($\Delta=32 \pm 4$ bpm) and in RSNA ($\Delta=36 \pm 6\%$). These responses were elicited immediately after alamandine microinjection. When compared with vehicle and, very different from what was observed with alamandine, microinjection of Ala-(1-5; $n=7$) evoked a significant increase in blood pressure without altering renal nerve

activity or HR (Δ MAP, 22 ± 2 mmHg; Δ HR $= -1 \pm 3$ bpm; Δ RSNA $= 1 \pm 3\%$; Figure S9). Different from the response evoked by alamandine, the effect of Ala-(1-5) had a shorter duration (5.88 ± 1.9 minutes) without delay on the onset of the effect.

In Vivo Cardiovascular Effects

Ala-(1-5) Administration Reduces Blood Pressure in Male SHR

Based on previous observations showing an antihypertensive effect of alamandine in SHR,³ we next tested the effect of intravenous (i.v.) injection of Ala-(1-5) in SHR and Wistar control rats. Administration of Ala-(1-5; $30 \mu\text{g/kg}$, i.v.) produced a progressive decrease in MAP in freely moving SHR, reaching -27.8 ± 3.63 mmHg (2-way ANOVA; $n=8$; Figure 5A; see below the *P* values) 6 hours after the administration (baseline MAP, 169 ± 4.9 mmHg; Figure 5A and 5E). This marked effect in blood pressure was not accompanied by significant changes in HR (baseline, 348 ± 24.2 bpm; 2-way ANOVA; $P=0.7093$; Figure 5B and 5F). To evaluate whether changes in plasma levels of Ala-(1-5) after its administration could be associated with the antihypertensive effect, we measured plasma levels of Ala-(1-5) following its i.v. administration in male SHR. As shown in Figure S11, a significant increase in plasma Ala-(1-5) was observed at 3 minutes after administration (27.44 ± 8.88 versus 78.13 ± 19.42 ; $P=0.014$), followed by a return to baseline values within 30 minutes. A secondary increase of Ala-(1-5) plasma concentration was observed 1 to 4 hours after the administration; however, this change did not reach statistical significance.

Ala-(1-5) injection $30 \mu\text{g/kg}$ in Wistar rats did not significantly alter MAP (98 ± 5.42 mmHg; 6 hours after versus 104 ± 3.56 mmHg, before; 2-way ANOVA followed by Tukey test, $F(6,98)=0.4646$; $P=0.8330$; Figure 5C and 5E) or HR (321 ± 8.06 bpm, 6 hours after versus 326 ± 8.73 bpm, before; 2-way ANOVA followed by Tukey test, $F(6,98)=0.9323$; $P=0.4755$; Figure 5D and 5F). Saline or Ang-(1-5; $30 \mu\text{g/kg}$, i.v.) did not significantly alter MAP (Figure 5A and 5E) or HR (Figure 5B and 5F) in SHR or the MAP (Figure 5C and 5E) or HR (Figure 5D and 5F) in Wistar rats. In contrast to the antihypertensive effect observed in male SHR, iv administration of same dose of Ala-(1-5) in female SHR was essentially without MAP effect (157 ± 5.33 mmHg, before; 149 ± 6.01 mmHg, 4 hours and 154 ± 5.80 mmHg, 6 hours after injection; 2-way ANOVA followed

Figure 4 Continued. Ca^{2+} transient (T50) were not statistically different from the control group. Super violin plot visualization was used to depict cell-level data from each experiment as color-coded stripes in a compound violin plot. Circles represent the means of individual experiments, and the lines represent the means $\pm$ SE of the replicate means, $n=10$ to 20 cells/heart. Data were collected from 3 to 5 hearts per group. Tests for normal distribution were performed using the Shapiro-Wilk test. Statistical analysis was performed using 1-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison post hoc test for panels (A and B) and unpaired *t* test for panels (D through H). *vs. CTR for panel (A). *P*-value is described in each panel (D through H).

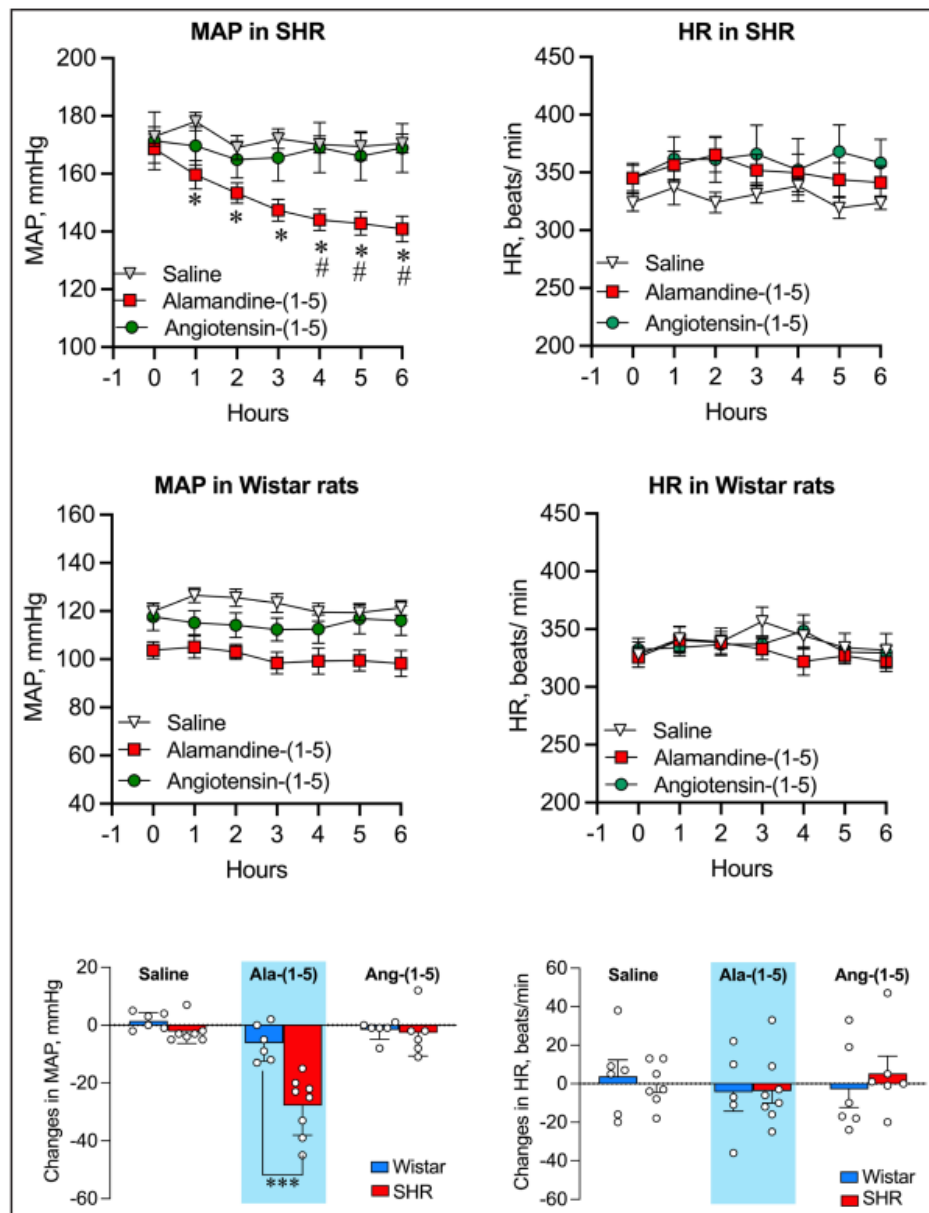


Figure 5. Ala-(1-5) (alamandine-[1-5]) antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats (SHR).

Mean arterial pressure (MAP; mmHg) and heart rate (HR; beats/min), showing the effect of bolus intravenous injection of 30 μ g/kg of angiotensin-(1-5) or Ala-(1-5) in normotensive (Wistar) or hypertensive (SHR) rats. Time zero represents baseline values before injection. **A**, MAP in SHR rats over time; **B** depicts HR in SHR rats over the same period; **C** and **D** present MAP and HR, respectively, in Wistar rats over time; **E** illustrates changes in MAP (mmHg) 6 hours after injection in Wistar and SHR rats; **F** shows changes in HR (beats/min) 6 hours after injection in Wistar and SHR rats. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed using 2-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for panels (**A** through **D**) and 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for panels (**E** and **F**). *vs. saline, #vs. Angiotensin-(1-5; n=6–8). *P* values are shown in the results section.

by Tukey test, $F(6,91)=0.4865$; $P=0.8169$; Figure S10). No significant changes in HR were observed at any time point following Ala-(1-5) injection in female SHR (2-way ANOVA followed by Tukey test; $F(6,91)=1.076$; $P=0.3829$; Figure S10).

High Resolution Echocardiography in SHR Treated With Ala-(1-5)

To evaluate whether the antihypertensive effect of Ala-(1-5) in male SHR could be associated with the change in heart function, we next evaluated changes in cardiac parameters induced by Ala-(1-5; 30 $\mu\text{g/kg}$, iv.) in these animals, by echocardiography. Two hours after administration, Ala-(1-5) reduced cardiac output by 32% (from $110\pm 10\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ to $75\pm 6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $P=0.02$), probably due to the similar reduction in stroke volume (30%; from $280\pm 21\text{ }\mu\text{L}$ to $195\pm 14\text{ }\mu\text{L}$; $P=0.01$; Figure S12R and S12S). These changes were associated with a reduction in diastolic posterior wall thickness of the left ventricle (from $1.89\pm 0.04\text{ mm}$ to $1.69\pm 0.06\text{ mm}$; $P=0.01$; Figure S12N) and in the E' wave (from $46.5\pm 4.82\text{ mm/s}$ to $36.6\pm 2.91\text{ mm/s}$; $P=0.04$; Figure S12O). Saline injection did not change any of the evaluated parameters. In keeping with the blood pressure data, no significant changes in these parameters were observed in female SHR (Figure S13).

Evaluation of the Mechanism of Action of Ala-(1-5)

We used pharmacological and genetic tools to get insights into the mechanism of action of Ala-(1-5). Mouse aortic rings, mesenteric microvessels, cardiomyocytes, and CHO-transfected cells were used to investigate which of the receptors of the alternative RAS Ala-(1-5) might bind to. The AT_1 receptor was not included in these experiments based on the fact that the contractile effect of Ala-(1-5) was not altered by losartan (Figure S2C).

Mouse Aortic Rings

As shown in Figure 6A, the contractile effect of Ala-(1-5) was essentially absent in aortic rings taken from MrgD-deficient mice. A significant attenuation of the contractile effect was also observed in aortic rings from AT_2 receptor KO mice (Figure 6C). In contrast, the effect of Ala-(1-5) in this preparation was not altered in rings from Mas KO animals (Figure 6B).

Mesenteric Microvessels

In contrast to the aortic rings, mesenteric microvessels from MrgD-deficient mice responded normally to Ala-(1-5; Figure 6D). A slight attenuation of the response was observed in mesenteric microvessels of Mas KO (maximum effect [Emax], 59.13 versus 71.41 in control mice; $P>0.05$; Figure 6E). As observed in the aortic rings, absence of AT_2 receptor produced a significant attenuation of the response to Ala-(1-5; Figure 6F).

Isolated Cardiomyocytes

As observed in aortic rings, in MrgD-KO cardiomyocytes, the effect of Ala-(1-5) on the contractile parameters was blunted (Figure S6A through S6C). Conversely, Ala-(1-5) decreased the contractility, shortening, and speed parameters in cardiomyocytes from AT_2 receptor-KO and Mas-KO mice (Figure S6D through S6I).

Binding Experiments in CHO-Transfected Cells: Evidence That Ala-(1-5) Is a Triple Angiotensin Receptor Agonist

The binding of Ala-(1-5) to Mas, MrgD, and AT_2 was confirmed using the fluorescent FAM (carboxyfluorescein)-Ala-(1-5) in EA.hy926 and CHO cells transfected with each of the receptors (Figure 7A). The FAM-Ala-(1-5) binding was displaced by nonfluorescent Ala-(1-5; $10^{-6}\text{ mol/L}^{-1}$) in CHO-Mas, CHO-MrgD and CHO- AT_2 cells. Immunofluorescence with anti-Mas, anti-MrgD, and anti- AT_2 antibodies was used to validate the presence of each receptor in all the indicated cells (Figure S14). As observed in CHO-transfected cells and EA.hy926 cells, Ala-(1-5) also binds to isolated adult cardiomyocytes (Figure 7B). The binding of FAM-Ala-(1-5) to cardiomyocyte was completed by the antagonists A-779 (Mas), D-Pro⁷-Ang-(1-7; Mas/MrgD) and PD123319 (AT_2 R; Figure 7B). In addition, we performed competition and association binding assays. Figure S15A through S15C showed a fast kinetics of Ala-(1-5) binding to all receptors. The results of the competition assay using FAM-Ala-(1-5) are shown in Figure S15D through S15F. Ala-(1-5) competed for the binding of FAM-Ala-(1-5) to Mas-transfected cells with an IC_{50} in the high nanomolar range ($6.72\times 10^{-7}\text{ mol/L}^{-1}$). A similar IC_{50} was obtained in MrgD-transfected cells ($3.13\times 10^{-7}\text{ mol/L}^{-1}$) and for the competition in AT_2 R-transfected cells (4.48×10^{-7}). In additional experiments, we observed that Ala-(1-5) competed for the binding of FAM-Ang-(1-7) to Mas-transfected cells with an IC_{50} in the nanomolar range ($1.10\times 10^{-9}\text{ mol/L}^{-1}$). A similar IC_{50} was obtained in MrgD-transfected cells for the competition with FAM-Alamandine ($9.94\times 10^{-8}\text{ mol/L}^{-1}$) and for the competition with FAM-Ang-II in AT_2 R-transfected cells ($2.52\times 10^{-9}\text{ mol/L}^{-1}$). The competition binding of Ang-(1-7), alamandine, and Ang-II with the corresponding FAM-labeled peptides is shown in Figure S16. Together, these data revealed that Ala-(1-5) can bind Mas, MrgD, and AT_2 receptors, indicating that this peptide can act as a triple angiotensin receptor ligand within the alternative axis of the RAS.

NO Production in CHO-Transfected Cells

We next conducted experiments using wild-type CHO cells (CHO-K1), as well as CHO cells transfected with either Mas, MrgD, or AT_2 receptors. We first assessed NO production upon stimulation with the pentapeptide in comparison with the control unstimulated cells

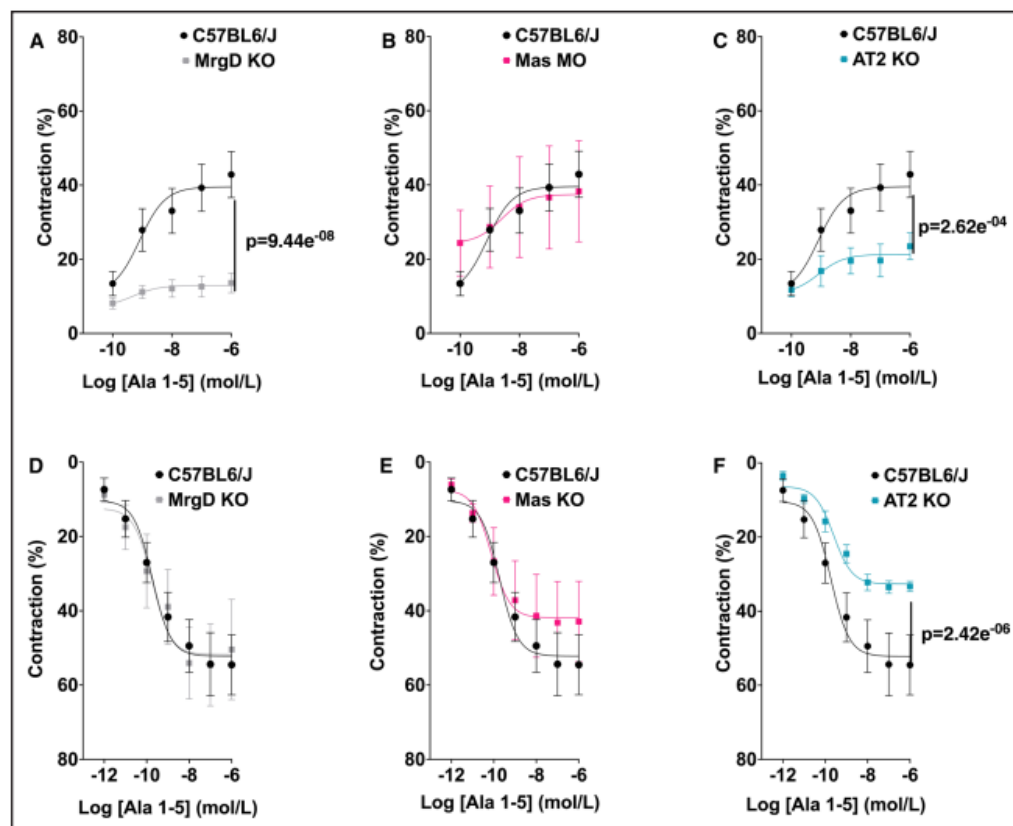


Figure 6. Ala-(1-5) (alamandine-[1-5]) effects in aortic and mesenteric rings of MrgD (Mas-related G-protein-coupled receptor subtype D) knockout (KO), Mas (Mas receptor proto-oncogene) KO, and AT2 (angiotensin II type 2) KO mice. **A**, Effects of Ala-(1-5); C57BL/6/J pD2, 9.02; maximum effect [Emax], 42.87; N=18 rings) in aortic rings of MrgD KO (pD2 [Log of IC50], 9.31; Emax, 13.63; N=10 rings); **(B)** Mas KO (pD2, 8.60; Emax, 38.30; N=5 rings) and **(C)** AT2 KO (pD2, 9.08; Emax, 24.48; N=11 rings). Effects of Ala-(1-5) in mesenteric rings of (C57BL/6/J pD2, 10.28; Emax, 61.3; N=5 rings); **(D)** MrgD KO (pD2, 10.31; Emax, 50.40; N=4 rings); **(E)** Mas KO (pD2, 10.82; Emax, 48.9; N=7 rings) and **(F)** AT2 KO (pD2, 10.01; Emax, 33.3; N=4 rings) mice. Values are mean±SEM (2-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test).

(Figure 8A and 8B). Ala-(1-5) activated CHO cells transfected with Mas, MrgD, and AT₂ receptors, increasing NO production by 77%, 85% and 67%, respectively (see Figure 8B for detailed *P* values). For comparison, we used EA.hy926 cells, which express Mas, MrgD, and AT₂ receptors (Figure S14). Ala-(1-5) activated NO production by 37% above unstimulated control (see Figure S17B for detailed *P* values). In this cell type, Ala-(1-5) induced NO formation in a concentration-dependent manner (Figure S17A and S17B). These data suggested that Ala-(1-5) acts through NO production to modulate vascular resistance. On the other hand, in wild-type CHO-K1 cells, no production of NO was observed. Collectively, the obtained of the binding and NO release indicated that Ala-(1-5) can act as a triple angiotensin receptor agonist within the alternative axis of the RAS.

DISCUSSION

In this study, using multiple approaches, we have obtained evidence that the pentapeptide (Ala-Arg-Val-Tyr-Ile), Ala-(1-5), a product of the hydrolysis of alamandine by ACE, is a biologically active end-product of the RAS. Evidence was also obtained for the presence of this pentapeptide in the circulation (human, rodents). In addition, we were able to demonstrate that Ala-(1-5) can bind and activate the known 3 receptors of the alternative arm of the RAS. Furthermore, a pronounced effect of Ala-(1-5) on the heart contractility was unmasked, suggesting a potential role of this peptide in the heart function.

To investigate the formation of this pentapeptide, we assessed its generation from alamandine using plasma samples from angiotensinogen-KO mice to eliminate

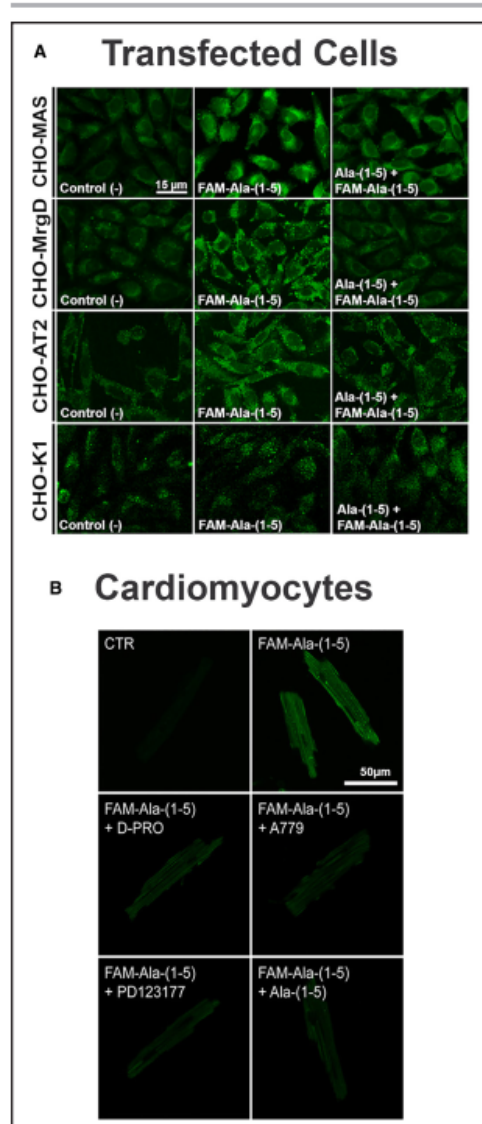


Figure 7. Ala-(1-5) (alamandine-[1-5]) binds to Mas (Mas receptor proto-oncogene), MrgD (Mas-related G-protein-coupled receptor subtype D), and AT2 (angiotensin II type 2) receptors.

A. Representative images of FAM (carboxyfluorescein)-Ala-(1-5) binding to Chinese Hamster Ovary cells (CHO)-Mas, CHO-MrgD, and CHO-AT2. Cells were either incubated with the control solution, 10 nmol/L FAM-Ala-(1-5) or 10 nmol/L FAM-Ala-(1-5) in combination with 1 μ mol/L nonfluorescent Ala-(1-5). In stable transfected CHO cells, Ala-(1-5) can bind to Mas, MrgD, and AT2 receptors. No binding of Ala-(1-5) was observed in nontransfected CHO-K1 cells. **B.** Binding of FAM-Ala-(1-5) to isolated cardiomyocytes (100 nmol/L). Nonspecific binding was obtained by preincubation with 1 μ mol/L nonfluorescent Ala-(1-5).

potential confounding factors. There was a rapid formation of Ala-(1-5) in the plasma incubated with alamandine. However, in plasma incubated with alamandine in the presence of captopril, the formation of Ala-(1-5) was suppressed, suggesting a significant involvement of ACE in its formation from alamandine. Our study did not explore the potential formation of Ala-(1-5) from Ang-(1-5) through decarboxylation of the aspartate residue to alanine. However, considering that the formation of Ang-(1-5) is also dependent on the action of ACE on Ang-(1-7), the formation of Ala-(1-5) by this putative route would also be ACE dependent. Importantly, we detected circulating Ala-(1-5) in plasma samples obtained from C57BL/6J mice (Figure 2A), healthy human volunteers (Figure 2B), and SHR (Figure S6).

In contrast to the vasorelaxant effect of alamandine in aortic rings, a contractile effect was produced by Ala-(1-5) in this preparation. Although there was an increase in the contractile effect in endothelium-denuded vessels or by pretreatment with L-NAME, we cannot exclude a direct effect on vascular smooth muscle. Indeed, the presence of Mas, MrgD and AT₂R receptors was reported in VSM cells.^{12–16} It should be pointed out that, in view of the absence of losartan effect on the Ala-(1-5) effect in aortic rings, AT₁ appears not to play a role in the Ala-(1-5) actions in mice aortic rings.

A similar contractile response in mouse aortic rings was obtained with the putative AT₂R/Mas agonist,⁴⁷ Ang-(1-5) and the selective AT₂R agonist compound 21 (data not shown). Therefore, it seems that this is a characteristic of the thoracic aortic rings rather than Ala-(1-5). This also appears to be a variable behavior, considering that Ang-(1-7) and alamandine produce relaxation in this preparation.

In sharp contrast to aortic rings, in mesenteric microvessels, Ala-(1-5) produced vasorelaxation. Actually, a differential effect of agonists in aortic rings as opposed to other vessels is not an unusual finding.¹⁷ NO release appears to be a major player in small vessels, while prostanoids are reported to be involved in mouse aortic ring preparation.¹⁷ Our data obtained with pretreatment of mouse aortic rings with indomethacin and L-NAME also suggest that the net response to Ala-(1-5) in this preparation may depend on the balance of vasoconstricting prostanoids and NO resulting from the vessel stimulation by Ala-(1-5).

Another key finding of this study was the pronounced effect of Ala-(1-5) on the isolated heart contractility. This finding was confirmed at the cellular level by using the isolated adult ventricular myocyte preparation. The pentapeptide induced a marked decrease in cardiomyocyte contractility and speed parameters. The reduction in the Ca²⁺ transient observed in cells exposed to Ala-(1-5) further confirms the contractility findings and provides evidence for a role of Ca²⁺ in the mechanism of the reduced contraction. In keeping with the dramatic

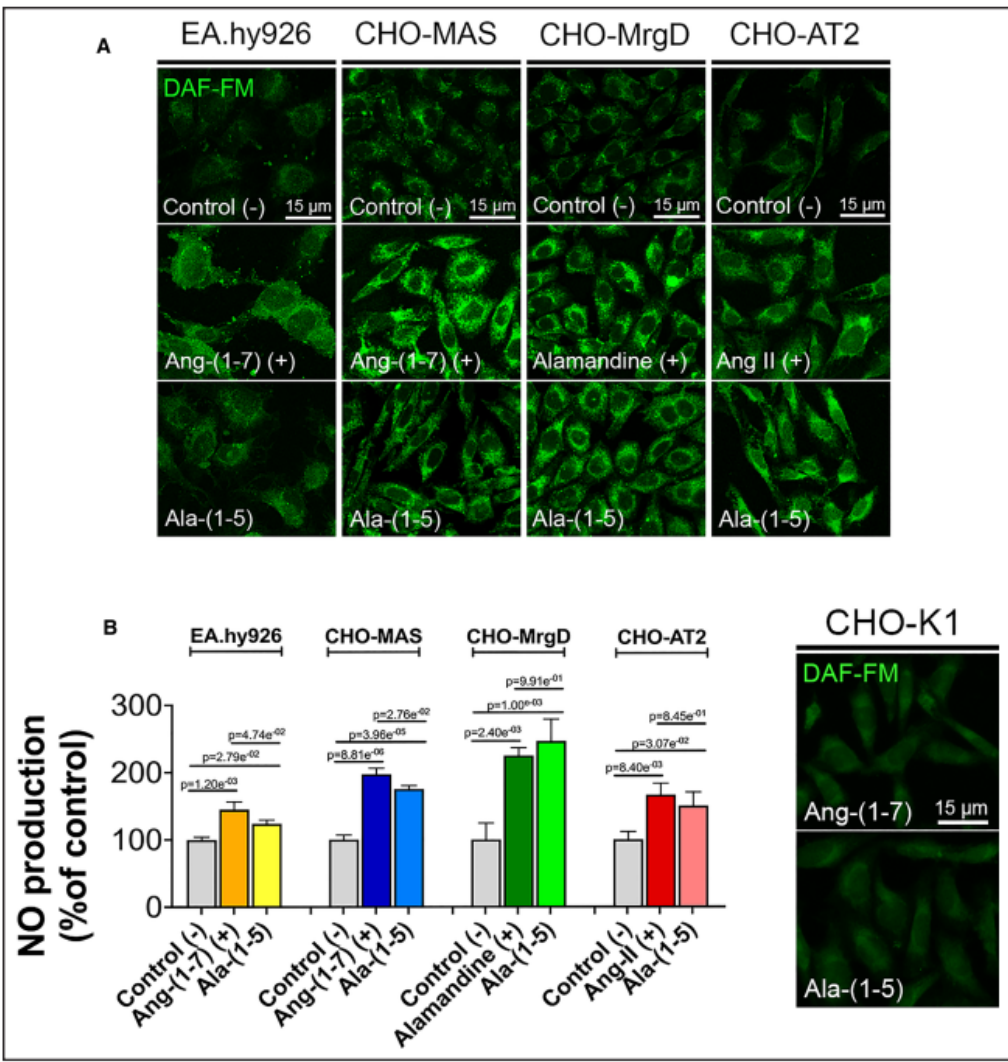


Figure 8. Ala-(1-5) (alamandine-[1-5]) activates Mas (Mas receptor proto-oncogene), MrgD (Mas-related G-protein-coupled receptor subtype D), and AT2 (angiotensin II type 2) receptors. **A**, Representative confocal images of NO production in EA.hy926, Chinese Hamster Ovary cells (CHO)-Mas, CHO-MrgD, and CHO-AT2 cells loaded with 10 μ mol/L 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM) and stimulated with 100 nmol/L Ala-(1-5) in comparison to the unstimulated control and respective positive controls. **B**, Ala-(1-5) produced a statistically significant increase NO production in all cell types, indicating that it binds and activates Mas, MrgD and AT2 receptors (N=3 wells. The number of cells analyzed in each well was at least 90 cells per each condition. The average of the fluorescence value of the 90 cells of each well was used for the statistical analyze). **C**, Wild-type CHO cells (CHO-K1) did not produce NO upon 100 nmol/L stimulation of either angiotensin-(1-7) or Ala-(1-5).

effects observed in isolated ventricular myocytes, Ala-(1-5) produced marked changes in the heart function in isolated rat heart preparations. In concentrations as low as 20 μ mol/L⁻¹ the peptide decreased the inotropism as evidenced by a decrease in left ventricular end-systolic

pressure (LVESP), dP/dtmax, and dP/dtmin. In addition, at the lower concentration (20 μ mol/L⁻¹), the peptide produced a mild progressive and sustained increase in the perfusion pressure, suggesting a slight coronary vasoconstriction. At a 10-fold higher concentration, the

effects of Ala-(1-5) were similar to those observed with the smaller concentration but mostly transient, suggesting desensitization or involvement of other mechanisms. Despite the obvious need for future studies, the findings in isolated hearts reinforce the observations made in isolated cardiomyocytes, suggesting that this peptide could be a potent modulator of heart function. One may argue that a limitation of this study lies in the fact that coronary flow in isolated heart preparations using the Langendorff method was estimated indirectly by the variation in perfusion pressure, which may be affected by ventricular inotropism. However, the indirect measurement of coronary flow by perfusion pressure is widely used by us and other groups.¹⁸⁻²¹ Furthermore, the sensitivity of this methodology has already been previously measured by the application of classic vasodilators, such as Bradykinin^{19,20} and sodium nitroprusside. Based on previous work from our laboratory, using isolated heart preparation, the reduction in contractility is not always accompanied by an increase in coronary flow. That is, in several protocols, we have observed a reduction in contractility without significant changes in perfusion pressure or even an increase in it.²⁰ This dissociation of effects is even more evident when we apply certain blockers/inhibitors in which the vascular and inotropic responses are dissociated.

A particularly intriguing finding of our study is the unique feature of Ala-(1-5) as a triple angiotensin receptor ligand/agonist within the alternative arm of the RAS (Mas, MrgD, and AT₂ receptors). This distinct characteristic was clearly demonstrated in CHO cells engineered to express each of these receptors. Furthermore, the complexity of this finding was emphasized by our observations in mouse aortic rings, in which rings taken from MrgD or AT₂-deficient mice had a marked reduction in the response to the peptide, while in rings from Mas-deficient mice, the response to Ala-(1-5) was not altered. On the other hand, in mesenteric microvessels, the response to Ala-(1-5) was fully preserved in microvessels of MrgD-deficient mice. In this preparation, the response to the peptide was slightly decreased in vessels from Mas KO mice, while a significant attenuation was observed in microvessels from AT₂R KO mice. These observations raise many possibilities, including oligomerization, signaling pathways dependent on a critical common downstream component, or allosteric modulation, among others. One may suggest that the involvement of multiple GPCRs (G-protein-coupled receptors) in the effects of Ala-(1-5) indicates nonspecificity; however, its contractile action in aortic rings was not influenced by the AT₁ antagonist Losartan alone or in rings from Mas-KO mice.

Several studies have provided evidence that Ang-(1-7) in the central nervous system enhances the baroreceptor reflex control of HR, especially its bradycardic component, while Ang II attenuates it.^{22,23} Besides,

acute intracerebroventricular infusion of Ang-(1-7) also improves baroreflex in hypertensive animals,²⁴⁻²⁷ while central infusion of a selective Ang-(1-7) antagonist blocks the improvement in baroreflex function produced by ACE-inhibitors in SHR.²⁶ Arterial baroreceptor dysfunction is a well-known factor involved in increased blood pressure variability, which has been closely correlated to end-organ damage.²⁸ Central infusion of Ala-(1-5) in SHR improves baroreflex control, even with the maintenance of high-pressure levels. Improvement in baroreflex control has a direct impact on the autonomic control of HR; thus, we also evaluated the autonomic drive to the heart through pharmacological blockade. Interestingly, central infusion of Ala-(1-5) did not produce significant changes in cardiac autonomic balance, both in normotensive or hypertensive strains (data not shown). These findings suggest, at least for acute treatment, that the improvement in baroreflex could be related to a direct effect of Ala-(1-5) in the neuronal circuitry sensitivity within the brain baroreceptor pathway. Further studies are obviously needed to clarify the mechanisms of this effect, including the angiotensin receptor(s) involved.

The IC can be broadly divided into 2 regions: the anterior insula and the posterior insula. Each region contributes to a distinct set of processes. The rostral IC is heavily involved in interoception, the processing of internal bodily signals like hunger, thirst, pain, and cardiovascular control, as previously described by our group. It also plays a crucial role in emotion processing, particularly in integrating emotional experiences with bodily sensations, decision-making, and self-awareness. Recent discoveries highlight a surprising level of specialization within the insula, suggesting it is responsible for specific peptides, such as alamandine.⁴ The fact that the alamandine product, Ala-(1-5), displayed a selective effect, increasing blood pressure without influencing HR or renal nerve activity, is intriguing and deserves further studies. It should be pointed out that no effect was observed after microinjection of equimolar amounts of Ang-(1-5) in the same site.²⁹ While the exact mechanisms are not understood, this newfound insula selective stimulator opens exciting avenues for further research on the role of alamandins³⁰ in this region.

We have observed a potent and long-lasting (up to 6 hours) anti-hypertensive effect following administration of a single intravenous dose (30 µg/kg) of Ala-(1-5) in male SHR. A pharmacokinetic experiment using these rats showed a significant rise of Ala-(1-5) 3 minutes after administration, followed by a return to the baseline values within 30 minutes. A secondary increase of Ala-(1-5) plasma concentration was observed 1 to 4 hours after administration. This observation would suggest that a bimodal increase in the plasma levels of Ala-(1-5) after administration in SHR could contribute to its antihypertensive effects. However, the secondary

increase in the plasma concentration of Ala-(1-5) did not reach statistical significance. A similar long-lasting antihypertensive effect was previously observed for alamandine, Ang-(1-7), and bradykinin-potentiating peptides in our laboratory.^{3,30,31} At least, the long-lasting effect of Bradykinin-potentiating peptides could not be ascribed to ACE-inhibition.³¹ This suggests that these peptides, upon binding to their receptors/targets, could trigger a long-lasting signaling mechanism that could influence vascular tone and heart function. The absence of effect of Ang-(1-5; Figure 5), in similar conditions, indicates that this long-lasting anti-hypertensive effect of Ala-(1-5) is not unspecific.^{32,33}

The major finding in the echocardiography in SHR was a 33% decrease in cardiac output due to a significant decrease in stroke volume. This change probably contributed to the anti-hypertensive effect of Ala-(1-5) in these animals. On the other hand, a large variation in ejection fraction and fractional shortening was observed, precluding a conclusion about the contribution of a direct effect of the peptide on these variables. It is very difficult to compare the changes in isolated cardiomyocytes and isolated perfused hearts of mice with the effects of the peptide in vivo in SHR; however, it is clear from our results that a direct or indirect alteration in heart function is also present in SHR following administration of Ala-(1-5).

An important attenuation of the peptide antihypertensive effect was observed in female rats. This observation is in keeping with previous reports indicating a sex dependency in SHR.^{34,35} Whether the absence of major changes in the echocardiography measurements in female SHR, as opposed to those observed in the male rats, could explain the gender difference in the response to the Ala-(1-5) in SHR remains to be fully clarified. It should be pointed out that no sex differences were observed in mouse isolated cardiomyocytes (Figure S5) or mouse mesenteric arteries (Figure S3A). Therefore, the sex differences in the responses to Ala-(1-5) appear not to be a general phenomenon.

It should be pointed out that an important limitation of this study is the fact that, although we have identified many biological actions of Ala-(1-5), further studies are necessary to demonstrate its physiological relevance within the RAS.

In summary, taken together, the compelling data obtained to date with Ala-(1-5) indicated that this ACE-derived peptide exerts unique actions, most of which are distinct from alamandine and Ang-(1-5), suggesting that Ala-(1-5) is a new biologically active component of the RAS that circulates in the human's and rodent's blood. Ala-(1-5) produces vasocontraction of aortic mouse rings, probably by a prostanoid-related mechanism, a potent vasorelaxation in mesenteric microvessels and aortic rings of SHR and Wistar rats, a marked decrease of isolated cardiomyocyte inotropism, reduction

of isolated heart inotropism, decreased cardiac output in SHR, a significant antihypertensive effect in SHR, and a selective increase in blood pressure when microinjected at the IC. In addition, this novel pentapeptide was capable of binding and releasing NO in endothelial cells and Mas, MrgD, or AT₂ receptor CHO-transfected cells.

This later observation suggests the fascinating possibility that Ala-(1-5) is a triple ligand/agonist of the protective arm of the RAS. Our observations to date suggest an intriguing possibility: Ala-(1-5) may function as a mediator of the alternative RAS axis in tissues that express 1 or more protective receptors, such as Mas, MrgD, and AT₂. In conclusion, in this study, we identified a new component of the RAS, Ala-(1-5).

ARTICLE INFORMATION

Received January 21, 2025; revision received October 21, 2025; accepted October 28, 2025.

Affiliations

INCT-Nanobiofar, Department of Physiology and Biophysics (R.A.S.S., A.S.M.B., C.F.B., M.F.I., F.A.S., S.C.A.G., L.R.-R., K.S.F., S.S., I.Z.L.F.F., U.F.V.-M., A.C.V.G., A.H.A.M., M.E., B.S., A.M., G.M., N.P.S., D.A.A.P., J.R.R., M.L.D.-P., D.M.-S., M.A.P.F., A.S.H., T.V.-B., S.G., M.F.L., M.J.C.-S.), Department of Pharmacology (M.T.S.D., L.S.A.C.), Department of Pediatrics (P.A.S., A.C.S.-E.-S.), and Department of Chemistry (I.L.), Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil. Department of Physiological Sciences, Federal University of Goiás (UFG), Brazil (J.B.R.D., C.H.C.). Institute of Biology, University of Campinas (Unicamp), Brazil (A.P.D., N.N.). Heart Institute, University of São Paulo (INCOR-USP), Brazil (B.D.S., L.E.S., A.A.S., M.C.I.). Max Delbrück Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association, Germany (M.B., N.A.). German Center for Cardiovascular Research (DZHK) Partner Site Berlin, Germany (M.B.). Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany (M.B.). Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Germany (M.B.). University of Lübeck, Institute of Biology, Germany (M.B.). Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys, Brazil (D.C.V.). Unis São Lourenço College, Brazil (F.R.M.).

Acknowledgments

The technical support from Ana Paula Assunção J. Araujo from the Animal Facility of INCT Nanobiofar and Samuel Rocha from "Centro de Aquisição e Processamento de Imagens" (CAPI-UFMG) is gratefully acknowledged.

Sources of Funding

The financial support for this study was from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) to INCT Nanobiofar (Proc# 406792/2022-4), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-DAAD; Proc# PROBRAL 2023), and from CNPq, CAPES, and Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEMIG) for fellowships to Brazilian authors. FAPEMIG RED-00081-23 and FAPEMIG APO-04900-22 091/2022-PDPG III-Parcerias Estratégicas-Edital CAPES 38/2022.

Disclosures

None.

Supplemental Material

Supplemental Material and Methods
Tables S1–S2
Figures S1–S17
Major Resources Tables S1–S2
References 36–50

REFERENCES

1. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, Campagnole-Santos MJ. The ACE2/angiotensin-(1-7)/MAS axis of the renin-angiotensin system: focus on angiotensin-(1-7). *Physiol Rev*. 2018;98:505–553. doi: 10.1152/physrev.00023.2016

2. Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Tölle M, Karadogan S, Gobom J, Furkert J, Oksche A, Krause E, Tran TNA, et al. Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:297–302. doi: 10.1161/01.ATV.0000253889.09765.5f
3. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, Jankowski J, Jankowski V, Sousa F, Alzamora A, et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res*. 2013;112:1104–1111. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301077
4. Marins FR, Oliveira AC, Qadri F, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, Fontes MAP, Santos RAS. Alamandine but not angiotensin-(1-7) produces cardiovascular effects at the rostral insular cortex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2021;321:R513–R521. doi: 10.1152/ajpregu.00308.2020
5. Park BM, Li W, Kim SH. Cardio-protective effects of angiotensin-(1-5) via Mas receptor in rats against ischemic-perfusion injury. *Peptides*. 2021;139:170516. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170516
6. Yu L, Yuan K, Phuong HTA, Park BM, Kim SH. Angiotensin-(1-5), an active mediator of renin-angiotensin system, stimulates ANP secretion via Mas receptor. *Peptides*. 2016;86:33–41. doi: 10.1016/j.peptides.2016.09.009
7. Souza-Silva IM, Peluso AA, Elsaafien K, Nazarova AL, Assersen KB, Rodrigues-Ribeiro M, Mohammed M, Rodrigues AF, Nawrocki A, Jakobsen LA, et al. Alamandine enhances cardiomyocyte contractility in hypertensive rats through a nitric oxide-dependent activation of CaMKII. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020;318:C740–C750. doi: 10.1152/ajpcell.00153.2019
8. Monteiro ALL, Eliezeck M, Scalzo SRA, Silva MM, Sanches B, Ferreira KKS, Poletini MO, Pelicari-Garcia RA, Cau SBA, Souza Santos RA, et al. Time of day affects MrgD-dependent modulation of cardiomyocyte contractility. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2024;327:C1143–C1149. doi: 10.1152/ajpcell.00049.2024
9. Villela DC, Passos-Silva DG, Santos RAS. Alamandine: a new member of the angiotensin family. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014;23:130–134. doi: 10.1097/01.mnh.0000441052.44406.92
10. Zhang F, Hu Y, Xu Q, Ye S. Different Effects of Angiotensin II and Angiotensin-(1-7) on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration. *PLoS One*. 2010;5:e12323. doi: 10.1371/journal.pone.0012323
11. Ng H-Y, Yisireyili M, Saito S, Lee C-T, Adelbieke Y, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate downregulates expression of Mas receptor via OAT3/Ahr/Stat3 pathway in proximal tubular cells. *PLoS One*. 2014;9:e91517. doi: 10.1371/journal.pone.0091517
12. Yang C, Wu X, Shen Y, Liu C, Kong X, Li P. Alamandine attenuates angiotensin II-induced vascular fibrosis via inhibiting p38 MAPK pathway. *Eur J Pharmacol*. 2020;883:173384. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173384
13. Carrillo-Sepúlveda MA, Ceravolo GS, Furstenau RC, Monteiro PS, Bruno-Fortes Z, Carvalho MH, Laurindo FR, Tostes RC, Webb RC, Barreto-Chaves MLM. Emerging role of angiotensin type 2 receptor (AT2R)/Akt/NO pathway in vascular smooth muscle cell in the hyperthyroidism. *PLoS One*. 2013;8:e61982. doi: 10.1371/journal.pone.0061982
14. Ghatage T, Singh S, Mandal K, Dhar A. MasR and pGCA receptor activation protects primary vascular smooth muscle cells and endothelial cells against oxidative stress via inhibition of intracellular calcium. *J Cell Biochem*. 2023;124:943–960. doi: 10.1002/jcb.30422
15. Xue F, Yang J, Cheng J, Sui W, Cheng C, Li H, Zhang M, Zhang J, Xu X, Ma J, et al. Angiotensin-(1-7) mitigated angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms in apolipoprotein E-knockout mice. *Br J Pharmacol*. 2020;177:1719–1734. doi: 10.1111/bph.14906
16. Bessa A, Jesus EF, Nunes A. Stimulation of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis in hypertensive pregnant rats attenuates cardiovascular dysfunction in adult male offspring. *Hypertens Res*. 2019;42:1883–1893. doi: 10.1038/s41440-019-0321-8
17. Felipe SA, Rodrigues ES, Martin RP, Paiva ACM, Pesquero JB, Shimuta SI. Functional expression of kinin B1 and B2 receptors in mouse abdominal aorta. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40:649–655. doi: 10.1590/s0100-879x2007000500007
18. da Cunha TR, Giesen JAS, Rouver WN, Costa ED, Grando MD, Lemos VS, Bendhack LM, Santos RLD. Effects of progesterone treatment on endothelium-dependent coronary relaxation in ovariectomized rats. *Life Sci*. 2020;247:117391. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117391
19. Vitorino PR, Gomes KP, Ghazale PP, da Silva M, Mendes EP, Dos Santos FCA, Pansani AP, de Castro CH, Sozsa FA, Colugnati DB. Coronary vasodilation impairment in pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2019;90:7–10. doi: 10.1016/j.yebeh.2018.10.037
20. Campagnole-Santos MJ, Herlinger SB, Batista EN, Khosla MC, Santos RA. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol*. 1992;263:R89–R94. doi: 10.1152/ajpregu.1992.263.1.R89
21. Diz DI, Jessup JA, Westwood BM, Bosch SM, Vinsant S, Gallagher PE, Averill DB. Angiotensin peptides as neurotransmitters/neuromodulators in the dorsomedial medulla. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29:473–482. doi: 10.1046/j.1440-1681.2002.03659.x
22. Sakima A, Averill DB, Kasper SO, Jackson L, Ganten D, Ferrario CM, Gallagher PE, Diz DI. Baroreceptor reflex regulation in anesthetized transgenic rats with low glia-derived angiotensinogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H1412–H1419. doi: 10.1152/ajpheart.00984.2006
23. Britto RR, Santos RA, Fagundes-Moura CR, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ. Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:549–556. doi: 10.1161/01.hyp.30.3.549
24. Herlinger-Walther S, Batista EN, Walther T, Khosla MC, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Baroreflex improvement in SHR after ACE inhibition involves angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 2001;37:1309–1314. doi: 10.1161/01.hyp.37.5.1309
25. Oliveira DR, Santos RA, Santos GF, Khosla M, Campagnole-Santos MJ. Changes in the baroreflex control of heart rate produced by central infusion of selective angiotensin antagonists in hypertensive rats. *Hypertension*. 1996;27:1284–1290. doi: 10.1161/01.hyp.27.6.1284
26. Miao C-Y, Xie H-H, Zhan L-S, Su D-F. Blood pressure variability is more important than blood pressure level in determination of end-organ damage in rats. *J Hypertens*. 2006;24:1125–1135. doi: 10.1097/01.jh.0000226203.57818.88
27. Godoy A, Monteiro A, Fontes P, Santos MA. Abstract P212: Micro-injection of the novel angiotensin, alamandine-(1-5) into insular cortex, increase blood pressure. *Hypertension*. 2024;81:P212–P212. doi: 10.1161/HYP81.SUPPL_1.P212
28. Santos R, Oudit GY, Verano-Braga T, Catta G, Steckelings UM, Bader M. The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;316:H958–H970. doi: 10.1152/AJPHEART.00723.2018
29. Ianzer D, Santos RAS, Etelvino GM, Xavier CH, de Almeida Santos J, Mendes EP, Machado LT, Prezoto BC, Dive V, de Camargo ACM. Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involve ACE-independent mechanisms? New insights from proline-rich peptides of Bothrops jararaca. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322:795–805. doi: 10.1124/jpet.107.120873
30. Ianzer D, Xavier CH, Fraga FC, Lautner RQ, Guerreiro JR, Machado LT, Mendes EP, de Camargo ACM, Santos RAS. BPP-5a produces a potent and long-lasting NO-dependent antihypertensive effect. *Thromb Haemostasis*. 2011;5:281–295. doi: 10.1177/1753944711427318
31. Ferraz K, Monteiro A, Chaves S, Barros C, Soares N, Campagnole-Santos MJ, Santos R. Abstract P210: Identification of alamandine-(1-5) as a new antihypertensive peptide of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2024;81:AP210–AP210. doi: 10.1161/hyp.81.suppl_1.p210
32. Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K. Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000;35:480–483. doi: 10.1161/01.hyp.35.1.480
33. Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*. 2001;37:1199–1208. doi: 10.1161/01.hyp.37.5.1199
34. Paquette K, Fernandes RO, Xie LF, Cloutier A, Fallaha C, Girard-Bock C, Mian MOR, Lukaszewski M-A, Mässe B, El-Jalbout R, et al. Kidney size, renal function, Ang (angiotensin) peptides, and blood pressure in young adults born preterm the HAPI study. *Hypertension*. 2018;72:918–928. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11397
35. Martins ALV, da Silva FA, Bolais-Ramos L, de Oliveira GC, Ribeiro RC, Pereira DAA, Annoni F, Diniz MML, Silva TGF, Ziviani B, et al. Increased circulating levels of angiotensin-(1-7) in severely ill COVID-19 patients. *ERJ Open Res*. 2021;7:00114–2021. doi: 10.1183/23120541.00114-2021
36. Martins ALV, Annoni F, Da Silva FA, Bolais-Ramos L, de Oliveira GC, Ribeiro RC, Diniz MML, Silva TGF, Pinheiro BD, Rodrigues NA, et al. Angiotensin-(1-7) infusion in COVID-19 patients admitted to the ICU: a seamless phase 1-2 randomized clinical trial. *Ann Intensive Care*. 2024;14:139. doi: 10.1186/s13613-024-01369-0
37. Bader M. Role of the local renin - angiotensin system in cardiac damage: a minireview focussing on transgenic animal models. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:1455–1462. doi: 10.1006/jmcc.2002.2077

40. Patil AA, Chiang C-K, Wen C-H, Peng W-F. Forced dried droplet method for MALDI sample preparation. *Anal Chim Acta*. 2018;1031:128–133. doi: 10.1016/j.jaca.2018.05.056
41. Santos RA, Krieger EM, Greene LJ. An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension*. 1985;7:244–252. Available from: <http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.7.2.244>
42. Lauton-Santos S, Guatimosim S, Castro CH, Oliveira FA, Almeida AP, Dias-Peixoto MF, Gomes MA, Pessoa P, Pesquero JL, Pesquero JB, et al. Kinin B1 receptor participates in the control of cardiac function in mice. *Life Sci*. 2007;81:814–822. doi: 10.1016/j.lfs.2007.06.033
43. Gómez AM, Guatimosim S, Dilly KW, Vassort G, Lederer WJ. Heart failure after myocardial infarction: altered excitation-contraction coupling. *Circulation*. 2001;104:688–693. doi: 10.1161/hc3201.092285
44. Scalzo S, Mendonça CATF, Kushmerick C, Agero U, Guatimosim S. Microscopy-based cellular contractility assay for adult, neonatal, and hiPSC cardiomyocytes. *STAR Protoc*. 2022;3:101144. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101144
45. Scalzo S, Afonso MQL, da Fonseca NJ Jr, Jesus ICG, Alves AP, Mendonça CATF, Teixeira VP, Biagi D, Crivinel E, Santos AK, et al. Dense optical flow software to quantify cellular contractility. *Cell Rep. Methods*. 2021;1:100044. doi: 10.1016/j.crmeth.2021.100044
46. Büttner-Ennever J. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd edn. By George Paxinos and Charles Watson. (Pp. xxiii+80; illustrated; £\$69.95 paperback; ISBN 0 12 547623; comes with CD-ROM.) San Diego: Academic Press. 1996. *J Anat*. 1997;191:315–317. doi: 10.1017/s0021878297232310
47. Tan PSP, Killinger S, Horluchi J, Dampney RAL. Baroreceptor reflex modulation by circulating angiotensin II is mediated by AT1 receptors in the nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293:R2267–R2278. doi: 10.1152/ajpregu.00267.2007
48. Sgoifo A, De Boer SF, Westenbroek C, Maes FW, Beldhuis H, Suzuki T, Koolhaas JM. Incidence of arrhythmias and heart rate variability in wild-type rats exposed to social stress. *Am J Physiol*. 1997;273:H1754–H1760. doi: 10.1152/ajpheart.1997.273.4.H1754
49. Leonhardt J, Villela DC, Teichmann A, Münster L-M, Mayer MC, Mardahl M, Kirsch S, Namsolleck P, Lucht K, Benz V, et al. Evidence for heterodimerization and functional interaction of the angiotensin type 2 receptor and the receptor MAS. *Hypertension*. 2017;69:1128–1135. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08814
50. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089

Participação como coautora no artigo intitulado “*Losartan treatment attenuates the cardiorenal alterations in a rat model of hemorrhagic insular stroke*”.
<https://doi.org/10.1007/s10286-026-01188-2>

Clinical Autonomic Research
<https://doi.org/10.1007/s10286-026-01188-2>

LETTER TO THE EDITOR



Losartan treatment attenuates the cardiorenal alterations in a rat model of hemorrhagic insular stroke

Liliane Ramos dos Santos Machado¹ · Itamar Couto Guedes Jesus¹ · Marcos Eliezeck¹ · Ana Caroline Ventris de Godoy¹ · Matheus Henrique da Silva Cruz¹ · Vanessa Pinho² · Aline Silva de Miranda² · Diogo Barros Peruchetti¹ · Maria José Campagnole-Santos¹ · Robson Augusto Souza dos Santos¹ · Sílvia Guatimosim¹ · Marco Antônio Peliky Fontes¹

Received: 25 June 2025 / Accepted: 17 January 2026
 © Springer-Verlag GmbH Germany 2026

Keywords Insula · Cortex · Stroke · Autonomic · Losartan · Cardiovascular · Rats

Abbreviations

IC Insular cortex
 ICH Experimental insular hemorrhagic stroke
 Los Losartan; AT₁ receptor blocker
 AT₁R Angiotensin II type 1 receptor

aims to investigate the effects produced by systemic administration of the Ang II AT₁R antagonist, losartan, on the cardiorenal effects observed in rats subjected to experimental hemorrhagic stroke.

Introduction

Intracerebral hemorrhagic stroke leads to serious functional alterations [1]. Therefore, the search for optimal pharmacological post-stroke therapy is extremely necessary. We have recently described a murine model of focal insular (IC) hemorrhagic stroke [2] that reproduces some physiological alterations observed in humans [3], including marked increases in cardiac sympathetic output, cardiac molecular changes and arrhythmias.

The renin–angiotensin system (RAS) is critical for cardiovascular homeostasis. Angiotensin II (Ang II) plays a key role in the regulation of cardiac, vascular and renal physiology. AT₁R is the main receptor mediating the effects of Ang II and there is compelling evidence linking AT₁R with sympathetic activation [4].

Losartan is an AT₁ antagonist, clinically safe and highly effective in offering cardiovascular protection [5]. This study

Methods

Experiments performed on male Wistar rats (300–350 g; CEBIO-UFMG) conducted in accordance with the U.S. NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by CEUA UFMG (protocol 112/2019). Rats were prepared for experimental insular hemorrhagic stroke (ICH) as described previously [2]. Losartan (Los; AT₁R antagonist; i.p.; 10 mg/kg; Sigma Chemical); vehicle used was NaCl 0.9%.

All protocols were evaluated in three groups of rats ($n = 6$ each) that were renewed for each approach (i.e., each rat was used in only one experiment). The first group of rats was included to demonstrate the effects of stroke itself on baseline parameters evaluated in each protocol. In this group, rats were injected with saline into the insular cortex (IC) and were subjected to 3 days treatment with intraperitoneal (i.p.) injection of saline (Sal IC 200 nL; control for central volume of injection; NaCl 0.9% i.p.; 0.1 ml/100 g; $n = 6$). The second group of rats was subjected to ICH and treated with saline i.p. (ICH-sal; NaCl 0.9% i.p.; 0.1 ml/100 g; $n = 6$). The third group of rats was subjected to ICH and treated with losartan i.p. (ICH-los; 10 mg/kg i.p.; $n = 6$). Immediately after the central injection of saline (Sal IC group) or blood (ICH groups), rats were randomly subjected to 3 days of the respective i.p. treatment (single daily i.p. injection within a 24 h intervals).

✉ Marco Antônio Peliky Fontes
 peliky@icb.ufmg.br

¹ Department of Physiology and Biophysics, National Institute of Science and Technology in Nanobiopharmaceutics (INCT Nanobiofar), ICB, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270 901, Brazil

² Department of Morphology, ICB, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Blood pressure (BP) and heart rate (HR) were recorded through a catheter inserted into the femoral artery (ketamine 80 mg/kg—xylazine 7 mg/kg, i.p.). Cardiovascular parameters were measured in conscious conditions. Electrocardiogram (ECG) recording (DII) was performed under urethane anesthesia (1.4 g/kg i.p.). Heart rate variability (HRV) analysis, an indirect measure of autonomic activity, was performed as described previously [6, 7].

Neurobehavioural evaluation was performed 96 h post-injection of saline or blood in the IC; Firstly, spontaneous locomotor activity was evaluated. After a recovery period of 30 min, the rat was subjected to muscle performance evaluation using the wire hang test. Anxious behavior was evaluated by elevated plus-maze (EPM).

For AT₁R and SERCA cardiac expression, on the fourth day, animals were deeply anesthetized with thiopental (100 mg/kg i.p.), the heart was removed and tissue was prepared for western blotting. Primary antibodies; anti-AT₁R (1:1000), anti-SERCA2 (1:1000) and GAPDH (control; 1:3000).

For renal function evaluation, rats were allocated to metabolic cages for measurement of 24 h water intake and 24 h urine. Urine samples were used to measure the levels of proteinuria. The measurement of estimated glomerular flow rate (eGFR) was performed by determining the creatinine clearance (CCr) [8].

Sites of microinjection were confirmed by histological analysis. Data recorded and analyzed using Powerlab 4/20—Chart 5.0 and expressed as mean $\pm$ SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test was performed. Mortality was calculated by chi-square test. $P < 0.05$ was considered as significant (Graph Pad Prism 8).

Results

Within 72 h after acute insular stroke, mortality in control rats amounted to 21% with most deaths occurring within 24 h after ICH. Strikingly, three consecutive days of intraperitoneal injection of losartan starting immediately after acute stroke prevented fatalities, that were reduced to 4% ($P = 0.023$).

Rats with ICH showed elevated baseline HR (427 ± 2 bpm) when compared with control rats where saline was injected into the insular cortex (Sal IC group, 361 ± 1 ; $P < 0.01$). Strikingly, losartan completely blunted the elevation in HR induced by ICH and caused a marked and additional decrease in baseline BP values when compared with ICH rats treated with vehicle i.p. (Fig. 1A and B).

Rats with ICH presented increased numbers of ectopic beats when compared with Sal IC, control. A significant reduction in the number of ectopic beats was observed in ICH rats treated with losartan (Fig. 1C). A higher LF/HF

ratio was observed in rats with insular stroke, and treatment with losartan completely prevented this effect (Fig. 1D). Systemic administration of losartan did not significantly change the cardiac expression of AT₁R. However, a reduction in SERCA2 levels was observed in the ICH-los group.

Rats with ICH showed no significant changes in locomotor activity or muscle force. Losartan did not alter the locomotor or force parameters. Strikingly, ICH induced a great increase in anxiogenic behaviour as observed in EPM (Sal IC 9 ± 1 versus ICH-sal 2 ± 1 entries in the open arms; $P < 0.01$) and this effect was completely blunted by losartan treatment (ICH-los 8 ± 1 entries in the open arms; $P < 0.01$).

We found a significant increase in 24 h water intake in ICH-sal rats treated with peripheral injections of vehicle when compared with Sal IC control group (Sal IC 22 ± 3 versus ICH-sal 34.8 ± 2 mL/min; $P < 0.01$), an effect abolished by losartan (ICH-los 27 ± 2 mL/min, $P < 0.05$). ICH presented higher levels of proteinuria when compared with the volume control group (Sal IC 38.6 ± 1 versus ICH-sal 57 ± 4 mg/dL; $P < 0.05$), an effect abolished by losartan (ICH-los 39.6 ± 5 mg/dL; $P < 0.01$). The ICH group presented a significant reduction of CCr when compared with Sal IC group (Sal IC 2.8 ± 0.4 versus ICH-sal 1.5 ± 0.2 , mL/min; $P < 0.05$). This deleterious effect was blunted by losartan (ICH-los 2.7 ± 0.2 mL/min; $P < 0.05$ versus ICH-sal).

Diffusion of blood was restricted to the IC. The cardiovascular parameters were not significantly altered when ICH was accidentally performed outside of the insular cortex limits (negative controls).

Discussion

Present experiments confirm and extend our previous findings showing that the ICH model used in the present study results in marked and sustained sympathetic-mediated tachycardia accompanied by arrhythmogenesis [2]. The cardiovascular changes are accompanied by renal and water balance alterations and anxious behaviour. Strikingly, treatment with losartan blunted all these deleterious effects and promoted protective reduction in baseline blood pressure in ICH rats. Altogether, these effects may have accounted for the reduction in insular stroke-induced mortality reported here.

A higher LF/HF ratio was observed in ICH rats, indicating a clear predominance of sympathetic activity [6, 7]. Losartan restored LF/HF ratio and thus reduced the cardiac sympathetic output to the heart, preventing tachycardia and attenuating the ectopic beats provoked by ICH. In this regard, it is well known that Ang II, via AT₁R, facilitates sympathetic neurotransmission [4].

The dose of losartan used here (10 mg/kg) induces tissue-specific changes in RAS components, including in the heart [9]. Normalization of heart rate is fundamental since

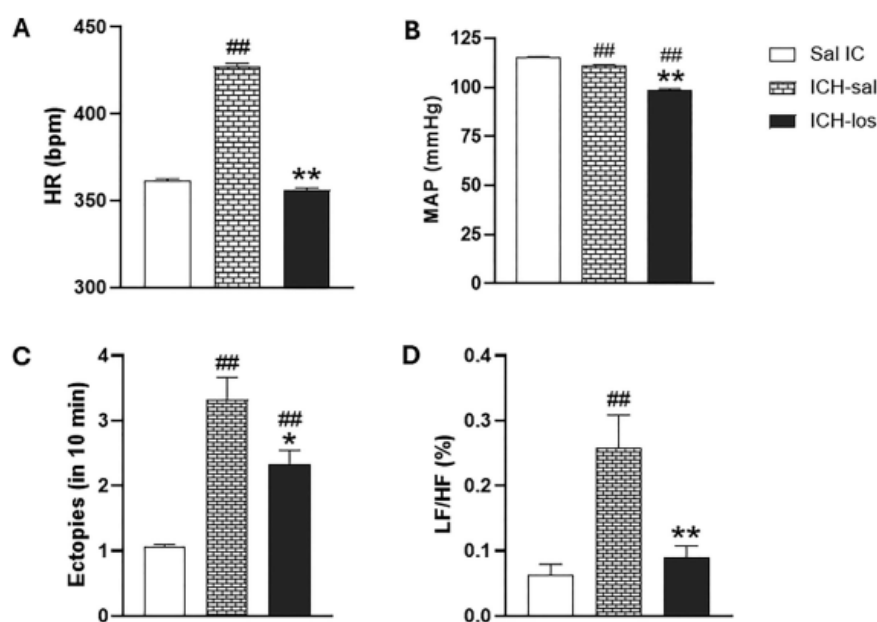


Fig. 1 **A** Heart rate (HR), **B** mean arterial pressure (MAP), **C** average number of ectopic beats and **D** heart rate variability expressed as low frequency/high frequency ratio (LF/HF) of rats with unilateral (right hemisphere) experimental stroke (ICH) treated with systemic injection of vehicle (ICH-sal) or systemic injection of losartan (ICH-los), or rats subjected to injection of saline into the insular cortex (Sal IC, cerebral injection volume control) and treated with systemic injection of vehicle. Ectopic beats were mainly characterized by biphasic P waves, ST segment alterations and extra-systoles with anomalous QRS complexes. Results are presented as mean $\pm$ SEM; $n=6$. * $P<0.05$ versus ICH-sal; ** $P<0.01$ versus ICH-sal; ## $P<0.01$ versus Sal IC. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test

tion of vehicle. Ectopic beats were mainly characterized by biphasic P waves, ST segment alterations and extra-systoles with anomalous QRS complexes. Results are presented as mean $\pm$ SEM; $n=6$. * $P<0.05$ versus ICH-sal; ** $P<0.01$ versus ICH-sal; ## $P<0.01$ versus Sal IC. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test

previous studies in humans show that hemorrhagic stroke results in marked cardiac sympathetic activation that leads to cardiac disease [3]. Reduction of ectopic beats can decrease the risk of death. Finally, lowering baseline blood pressure may offer additional protection considering that recurrent vascular events are common in patients with previous stroke [10].

Treatment with losartan did not alter the expression of AT_1 cardiac receptors, suggesting that AT_1 R expression was not downregulated by losartan treatment. On the other hand, we found that losartan treatment reduces cardiac SERCA expression. In general, altered SERCA activity has been implicated in a range of pathological conditions including heart failure [11].

ICH led to proteinuria and reduction of CCr, indicating renal dysfunction [8]. Losartan completely blunted these effects, suggesting activation of AT_1 R in this deleterious process. ICH evoked hyperhydration secondary to polydipsia, an effect blunted by losartan, suggesting a centrally mediated effect. Interestingly, a recent study in humans

showed that the posterior insular cortex is a key player in human thirst [12]. Whether AT_1 R plays a role at the IC in mediating thirst remains to be determined.

The model of insular stroke used here does not alter grip force or locomotor activity. Moreover, the fact that treatment with losartan did not cause significant changes in these parameters suggests that losartan may improve the cardiovascular profile with little or no interference in motor activity.

Losartan reduced the anxiogenic effect observed in ICH rats. This is in agreement with previous studies showing that blockade of AT_1 R results in an anxiolytic effect [13]. Thus, at least part of the effects observed for losartan may be mediated centrally as previously described [14].

Our study suggests that immediate treatment with losartan may offer significant cardiorenal protection and anxiolytic effect in the acute phase of post-hemorrhagic stroke. Current data supports previous findings indicating that losartan may provide substantial benefits to patients with hemorrhagic stroke that are beyond blood pressure reduction [15].

Acknowledgements Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ-01128-21) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq MAPF PQ 308923/2021-9; CNPq INCT 406792/2022-4). Abstract with preliminary results was presented at the Physiological Society Meeting 2024, Harrogate, UK.

Author contributions LRSM, ACVG, MHSC: stroke model, conducting procedures, data collection, data analysis, manuscript writing. ICGJ, ME, VP, SG: receptor expression experiments, data analysis, review and editing. ASM: neurobehavioral experiments, data analysis. DBP: renal function experiments, data analysis, review and editing. MJCS, RAS: review and editing. MAPF: conceptualization, data analysis, review and editing, manuscript writing.

Funding Fapemig, APQ-01128-21, Marco Antônio Peliky Fontes, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq INCT 406792/2022-4, Robson Augusto Souza Santos, CNPq PQ 308923/2021-9, Marco Antônio Peliky Fontes

Data availability The data that support the findings of the study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Conflicts of interest We declare no conflicts of interest.

Ethical approval Experiments have been approved by the CEUA-UFMG (protocol 112/2019) ethics committee and performed in accordance with the U.S. NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

References

1. Broderick JP et al (2021) The story of intracerebral hemorrhage: from recalcitrant to treatable disease. *Stroke* 52(5):1905–1914
2. Marins FR et al (2020) Autonomic and cardiovascular consequences resulting from experimental hemorrhagic stroke in the left or right intermediate insular cortex in rats. *Auton Neurosci* 227:102695
3. Nagai M, Dote K, Kato M, Oda eN (2018) Atrial fibrillation after acute intracerebral hemorrhage: how would the insular cortex damage interact? *Eur J Neurol* 25(5):58–58
4. Tsuda K (2012) Renin-angiotensin system and sympathetic neurotransmitter release in the central nervous system of hypertension. *Int J Hypertens* 2012(1):474870
5. Lévy e BI, Mourad JJ (2022) Renin angiotensin blockers and cardiac protection: from basics to clinical trials. *American J Hypertension* 35(4):293–302
6. Campos JO et al (2022) Cardiac autonomic dysfunction in school age children with overweight and obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 32(10):2410–2417
7. Švorc Pe, Grešová S (2023) Heart rate variability in male rats. *Physiol Rep* 11(18):15827
8. Silva LS et al (2018) The angiotensin II/AT1 receptor pathway mediates malaria-induced acute kidney injury. *PLoS ONE* 13(9):e0203836
9. Campbell DJ, Kladis A, Duncan eAM (1994) Effects of converting enzyme inhibitors on angiotensin and bradykinin peptides. *Hypertension* 23(4):439–449
10. Rashid P, Leonardi-Bee J, Bath e P (2003) Blood pressure reduction and secondary prevention of stroke and other vascular events: a systematic review. *Stroke* 34(11):2741–2748
11. Chemaly ER, Troncone L, Lebeche eD (2018) SERCA control of cell death and survival. *Cell Calcium* 69:46–61
12. Meier L, Federspiel A, Jann K, Wiest R, Strik W, Dierks eT (2018) Thirst-dependent activity of the insular cortex reflects its emotion-related subdivision: a cerebral blood flow study. *Neuroscience* 383:170–177
13. Marvar PJ, Andero R, Hurlmann R, Lago TR, Zelikowsky M, Dabrowska eJ (2021) Limbic neuropeptidergic modulators of emotion and their therapeutic potential for anxiety and post-traumatic stress disorder. *Journal of neuroscience* 41(5):901–910
14. Culman J, Blume A, Gohlke P, Unger eT (2002) The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT1-receptor blockers. *J Human Hypertension* 16(3):64–70
15. J. R. Kizer *et al.*, “Stroke Reduction in Hypertensive Adults With Cardiac Hypertrophy Randomized to Losartan Versus Atenolol”, 2004.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Participação como coautora no trabalho intitulado “Losartan treatment improves the cardiovascular profile in rats with right-sided insular experimental stroke” apresentado no “The Physiological Society – 150 anos (Harrogate, UK, 2023)”



• [Cardiovascular, Respiratory and Autonomic Control](#)

Physiology 2023 (Harrogate, UK) (2023) *Proc Physiol Soc* 54, PC8020

Poster Communications: Losartan treatment improves the cardiovascular profile in rats with right-sided insular experimental stroke

Liliane Santos Machado¹, Itamar Jesus¹, Marcos Eliezeck¹, Ana Caroline Ventris-Godoy¹, Maria Josã Campagnole-Santos¹, Sílvia Guatimosim¹, Marco A Peliky Fontes¹,

¹Federal University of Minas Gerais Belo Horizonte, MG Brazil,

View other abstracts by:

• [Ventris-Godoy_AC](#)
 • [Jesus_I](#)
 • [Santos Machado_L](#)
 • [Eliezeck_M](#)
 • [Fontes_MAP](#)
 • [Campagnole-Santos_MJ](#)
 • [Guatimosim_S](#)

Intro: Stroke, a cerebrovascular disease, is the second leading cause of death in the world. Patients who survive stroke present physiological alterations and prognostic depends on the affected area. In this regard, stroke in the insular cortex (IC) results in marked sympathetic-mediated increase in baseline heart rate, cardiac molecular changes and arrhythmias. Therefore, investigating strategies that can alleviate post-insular stroke consequences becomes extremely relevant. We have recently described an experimental model of right side insular hemorrhagic stroke in rats that reproduces some physiological alterations observed in humans, including marked increases in cardiac sympathetic output (Marins FR et al. 2020, 2021). Evidence indicates that the renin-angiotensin system (RAS) peptides interact with the sympathetic nervous system (Fontes MAP et al., 2016). **Aims:** Here, we evaluated the effect of angiotensin II (Ang II) AT₁ receptor blocker, losartan, on cardiovascular changes generated from experimental hemorrhagic stroke at the IC of rats. **Methods:** Experiments were conducted in accordance with the U.S. NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by CEUA UFMG; protocol 112/2019). Wistar rats were: 1) anesthetized (ketamine 80mg/kg – xylazine 7 mg/kg); 2) submitted to unilateral nanoinjection of blood into the IC (Stroke IC; 200 nL; n=6) or saline into the IC (Sal IC; NaCl 0.9%, 200 nL; n=6; control), and 3) prepared for recording of mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR). Just after experimental stroke, separated groups of rats were submitted to three days of treatment (single daily intraperitoneal dose) of losartan (Los i.p.; 10 mg/kg) or saline (Sal i.p.; NaCl 0.9%, 0.1ml /100g). **Results:** Stroke IC rats showed elevated baseline HR when compared with the Sal IC group (422 ± 10 bpm vs 365 ± 6 P<0.01). Baseline MAP was similar between groups. In Stroke IC rats, treatment with Los i.p. restored HR to baseline levels and decreased baseline blood pressure values when compared with Stroke IC rats treated with Sal i.p. (HR: Los i.p. 358 ± 7 vs Sal i.p. 428 ± 10 bpm P<0.01; MAP: Los i.p. 99 ± 2 vs Sal i.p. 111 ± 2 mmHg P<0.01). The effects produced by Los in Stroke IC rats were prevented by concomitant treatment with Ang-(1-7) antagonist, A-779 (200 µg/kg SC). In agreement with this observation losartan treatment also increased the cardiac expression of Ang-(1-7)/Mas receptor (0.93 a.u. Sal i.p. vs 1.6 a.u. Los i.p. P=0.03). **Conclusions:** The present data suggests that AT₁ receptors blockade may reduce the impact of cardiac sympathetic activity exacerbation observed after insular stroke as well as promote a protective reduction in baseline blood pressure values. At least part of these effects may involve activation of Ang-(1-7)/Mas receptors. The present study indicates that immediate treatment with losartan may help to minimize cardiovascular risk in the acute phase after insular stroke. Support: FAPEMIG APQ-01128-21; CNPq.

Where applicable, experiments conform with [Society ethical requirements](#).

Apresentação de pôster do trabalho intitulado “*Cardiovascular, neurological and proteomic characterization of rats submitted to experimental insular hemorrhagic stroke: effects of rilmenidine*” no “*54th Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) (Águas de Lindóia, BRA, 2025)*”

L - Molecular Mechanisms of Diseases

L33 - Cardiovascular, neurological and proteomic characterization of rats submitted to experimental insular hemorrhagic stroke: effects of rilmenidine

Ana Caroline Ventris-Godoy¹, Lucas Rodrigues-Ribeiro², Thiago Verano-Braga¹, Marco Antonio Peliky Fontes¹

¹Physiology and Biophysics, University of Minas Gerais (Minas Gerais, Brazil), ²Biochemistry and Immunology, University of Minas Gerais (Minas Gerais, Brazil)

INTRODUCTION: Vascular damage to the insular cortex in humans leads to sympathoexcitation, sustained tachycardia, cardiac dysfunction, and premature death. The model of experimental hemorrhagic stroke in the insular cortex in rats reproduces the post-insular vascular injury changes observed in humans. Rilmenidine is a centrally acting antihypertensive drug that acts on the rostral ventrolateral medulla and has an important action in inhibiting sympathetic tone. **OBJECTIVES:** To evaluate the cardiovascular effects, neurological parameters and molecular mechanisms after insular hemorrhagic stroke in rats treated with rilmenidine. **MATERIALS AND METHODS:** Male Wistar rats (n=30) underwent stereotaxic injections (vehicle or blood) into the right insular cortex. After three days of treatment with vehicle or rilmenidine (1 or 10 µg/kg, i.p.), neurological parameters were assessed. On day 4, cardiovascular registration was carried out. After euthanasia, insula samples were collected (n=4), the proteins were extracted and the tryptic peptides were analyzed using timsTOF Pro. Data were processed using DIA-NN against Rattus Norvegicus FASTA file. For functional tests, statistical comparisons were performed using an unpaired t-test or two-way ANOVA. For proteomics analysis, one-way ANOVA was performed. **DISCUSSION AND RESULTS:** Hemorrhagic stroke increased mean arterial pressure (MAP) (control: 109±11 mmHg vs. post-stroke: 126±23 mmHg; P< 0.01) and heart rate (HR) (control: 317±29 bpm vs. post-stroke: 469±51 bpm; P< 0.01). Rilmenidine (10 µg/kg) attenuated these increases (MAP: 103±7 mmHg; HR: 296±26 bpm; P< 0.01). Proteomic analysis quantified 6,238 proteins, with 187 differentially expressed in rilmenidine-treated vs. untreated post-stroke groups. Rilmenidine treatment upregulated proteins associated with GABAergic neurotransmission and downregulated those involved in glutamatergic. No significant neurological deficits were observed. **CONCLUSION:** Rilmenidine abolished the hypertension and tachycardia resulting from experimental insular hemorrhagic stroke. These findings suggest that glutamatergic and GABAergic neurotransmission in the right insula is modulated by rilmenidine. Thus, rilmenidine may reduce cardiovascular complications in the acute phase after insular hemorrhagic stroke and the risk of secondary strokes, without significant effects neurological.

Keywords: stroke, insular proteomics, tachycardia

Supported by: Cnpq