

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

**EFEITOS DO BLOQUEIO DE RECEPTORES AT<sub>1</sub> NAS ALTERAÇÕES  
CARDIOVASCULARES RESULTANTES DO ACIDENTE VASCULAR  
HEMORRÁGICO EXPERIMENTAL NO CÓRTEX INSULAR DE RATOS**

LILIANE RAMOS DOS SANTOS MACHADO

BELO HORIZONTE – MG

2021

Liliane Ramos dos Santos Machado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto De Ciências Biológicas Da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção Do título de mestre em Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes

BELO HORIZONTE

2021

043 Machado, Liliane Ramos dos Santos.  
Efeitos do bloqueio de receptores AT1 nas alterações cardiovasculares resultantes do acidente vascular hemorrágico experimental no córtex insular de ratos [manuscrito] / Liliane Ramos dos Santos Machado. – 2021.  
63 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes.

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

1. Fisiologia. 2. Acidente Vascular Cerebral. 3. Doenças Cardiovasculares. 4. Losartan. I. Fontes, Marco Antônio Peliky. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 543 DE LILIANE RAMOS DOS SANTOS MACHADO**

Às 09:00 horas do dia **21 do mês de julho de 2021**, transmitida através de webconferência da plataforma Zoom, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Liliane Ramos dos Santos Machado**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. André Ricardo Massensini**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Dra. Fernanda Ribeiro Marins**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Efeitos do Bloqueio de Receptores AT1 nas Alterações Cardiovasculares Resultantes do Acidente Vascular Hemorrágico Experimental no Córtex Insular de Ratos**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 21 de julho de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Marco Antonio Peliky Fontes, Membro de comissão**, em 22/07/2021, às 14:29, 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 **Andre Ricardo Massensini, Pró-reitor(a) adjunto(a)**, em 22/07/2021, às 16:09, 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 **Fernanda Ribeiro Marins, Usuário Externo**, em 22/07/2021, às 17:08, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0820647** e o código CRC **50F9131D**.

Dedico este trabalho a minha família, em especial à Laura, de 10 anos, minha doce e inteligente menina. Laurinha, não desista dos seus sonhos e lembre-se, você vai precisar de:

Paciência, perseverança e amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, meu marido Wagner e minha filha Laura por acreditarem em mim e comigo. Sou grata pela compreensão nos dias em que eu não pude dar atenção e cuidados, quando o meu marido fez o papel de pai e mãe. Agradeço-os por me amarem e apoiarem sempre, e até quando não pude assistir aos filmes (em família) ou jogar com vocês, torciam por mim. Agradeço o amor tão palpável, o carinho, paciência e incentivo. Amo muito vocês.

Agradeço aos meus pais pelo amor incondicional e por me apoiarem desde cedo, pelos cuidados com a Laura e as orações por mim. À mamãe pelos almoços de todos os domingos e os dias em que eu estive tão ocupada. Sou tão grata a Deus por estarem aqui, neste tempo difícil, em que a vida sofreu um risco constante, mas vocês se mantiveram firmes. São meu exemplo de fé. Como amo vocês! Ao meu sogro e sogra pelo carinho e orações, aos meus irmãos e suas famílias pelo apoio e a minha irmã (e família) por acreditar nos meus sonhos comigo. Aos amigos que torcem por mim, em especial, a Mestre Priscila Faria e a Dra. Kelly Paixão por todo incentivo durante o mestrado.

Agradeço ao meu orientador Dr. Marco Antonio Peliky Fontes por receber-me em sua sala numa tarde de maio de 2018, sem saber quem era eu e, ainda assim, acreditar e aceitar-me como aluna. Obrigada pela orientação, as correções, por compartilhar seu conhecimento comigo e por despertar em mim o desejo e à busca pela pesquisa. Você é um exemplo como mestre e pesquisador, percebe-se a conduta ética como profissional, mas também como pessoa.

À professora Dra. Sílvia Guatimosin, ao Itamar Couto e Marcos Eliezeck pela preciosa colaboração e a professora Dra. Maria José Campagnole pela especial contribuição no nosso trabalho. Ao professor Dr. Robson Santos pelos recursos cedidos e o apoio para que o projeto se concretizasse.

Agradeço em especial, aos colegas Carina Cunha, Sílvia Zebral e Cristiane Amorin por ensinarem-me pacientemente as técnicas importantes para o meu projeto. Ainda, agradeço a Carina Cunha por todo apoio ao longo do trabalho e, juntamente com o Adelson Héric Monteiro, Filipe Silva e o técnico de laboratório André de Souza, pelo auxílio em alguns momentos nos meus experimentos. Aos demais colegas do laboratório pela companhia e amizade.

Agradeço aos professores do laboratório de hipertensão pelo apoio e aos professores de outros laboratórios, em especial professor Dr. Glauber Silva, por serem solícitos, amigáveis e dispostos a auxiliar-nos. Também aos demais professores do departamento de Biofísica e Fisiologia por compartilharem tão precioso conhecimento conosco.

Agradeço a: CAPES, Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG CB-APQ-01463-15), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e INCT NanoBioFar pelo apoio financeiro concedido.

Finalmente agradeço a Deus, o Primeiro e o Último (o Alfa e Ômega), então vai um agradecimento aqui, pois “é ele quem dá sabedoria aos sábios e conhecimento aos que sabem discernir” (Daniel 2:21), “Porque dele, por ele e para ele são todas as coisas” (Paulo de Tarso).

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá



## RESUMO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE), uma doença cerebrovascular, ocupa o segundo lugar entre as causas de morte no mundo, além disso, os pacientes que sobrevivem ao AVE frequentemente apresentam diferentes alterações fisiológicas. Nesse sentido, investigar estratégias que possam amenizar as consequências pós-AVE torna-se extremamente relevante. Dentre as diferentes regiões cerebrais acometidas está o córtex insular, cujo dano resulta em graves alterações cardiovasculares. O sistema renina-angiotensina possui dois eixos de ação; I) enzima conversora de angiotensina (ECA), angiotensina (Ang) II, receptor AT<sub>1</sub>, com ação vasopressora e II) ECA2, angiotensina (1-7) (Ang-(1-7)), receptor Mas, com ações contrárias ao eixo da Ang II. No presente estudo avaliamos o efeito do bloqueio de receptores AT<sub>1</sub> nas alterações cardiovasculares geradas a partir da hemorragia experimental no córtex insular de ratos Wistar (CEUA UFMG 112/2019). Os animais foram submetidos a estereotaxia para indução da hemorragia experimental no córtex insular (HCI) do lado direito e após três dias de tratamento com veículo, NaCl 0,9% (0,1ml/100g), ou losartan (10mg/kg), via intraperitoneal (ip) foram registrados os parâmetros cardiovasculares, frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM). O grupo submetido à HCI apresentou FC basal elevada comparados ao controle (antes no controle;  $364,71 \pm 5,57$  bpm vs  $422,0 \pm 10,29$  após hemorragia;  $P < 0,0001$ ) sem alterações significantes nos valores basais de PAM. O tratamento com losartan, bloqueador do receptor AT<sub>1</sub> no grupo HCI restaurou a FC aos valores basais e adicionalmente, diminuiu os valores de pressão arterial basal (antes  $111,33 \pm 1,66$  mmHg vs  $98,66 \pm 2,33$  após losartan;  $P < 0,0001$ ). Estes efeitos produzidos pelo losartan foram abolidos pelo tratamento associado ao A-779, antagonista do receptor Mas. Em conjunto com achados anteriores de nosso laboratório, o presente estudo sugere que o bloqueio dos receptores AT<sub>1</sub> pode reduzir o impacto da exacerbação da atividade simpática cardíaca observada após HCI, bem como promover redução dos valores basais da pressão arterial. Pelo menos parte dos efeitos produzidos pelo losartan parecem estar relacionados à Ang-(1-7) via receptor Mas. Os dados do presente estudo sugerem claramente que o losartan pode minimizar o risco cardiovascular após hemorragia no CI.

## PALAVRAS-CHAVE

Acidente Vascular Encefálico, doença cerebrovascular, controle autonômico, sistema renina-angiotensina, hemorragia experimental, córtex insular, alterações cardiovasculares, receptor AT<sub>1</sub>, losartan.

## ABSTRACT

Stroke, a cerebrovascular disease, is the second leading cause of death in the world, besides, patients who survive a stroke, often present different physiological changes. In this sense, investigating strategies that can mitigate the post-stroke consequences, becomes extremely relevant. Among the different brain regions affected is the insular cortex, the damage of which results in serious cardiovascular changes. The renin-angiotensin system has two axes of action; I) angiotensin-converting enzyme (ACE), angiotensin (Ang) II, AT<sub>1</sub> receptor, with vasopressor action and II) ECA2, angiotensin (1-7) (Ang- (1-7)), Mas receptor, with actions contrary to axis of Ang II. In the present study, we evaluated the effect of AT<sub>1</sub> receptor blockade on cardiovascular changes generated from experimental hemorrhage in the insular cortex of Wistar rats (CEUA UFMG 112/2019). The animals were submitted to stereotaxis to induce experimental hemorrhage in the insular cortex (ICH) on the right side and after three days of treatment with vehicle, NaCl 0.9% (0.1ml / 100g) or losartan (10mg / kg) were registered cardiovascular parameters, heart rate (HR) and mean arterial pressure (MAP). The group submitted to ICH showed a high baseline HR compared to the control (before in the control;  $364.71 \pm 5.57$  bpm vs  $422.0 \pm 10.29$  after hemorrhage;  $P < 0.0001$ ) without significant changes in the baseline values of PAM. Treatment with losartan, AT<sub>1</sub> receptor blocker in the HCI group restored HR to baseline values and additionally, decreased baseline blood pressure values (before  $111.33 \pm 1.66$  mmHg vs  $98.66 \pm 2.33$  after losartan;  $P < 0.0001$ ). These effects produced by losartan have been abolished by the treatment associated with A-779, the Mas receptor antagonist. Taken together with previous findings from our laboratory, the present study suggests that AT<sub>1</sub> receptors blockade may reduce the impact of cardiac sympathetic activity exacerbation observed after ICH, as well as promoting a reduction in baseline blood pressure values. At least part of the effects obtained by losartan seems to be related to Ang- (1-7) via the Mas receptor. The data from the present study clearly suggest that losartan can minimize cardiovascular risk after ICH.

## KEYWORDS

Stroke, cerebrovascular disease, autonomic control, renin-angiotensin system, experimental hemorrhage, insular cortex, cardiovascular changes, AT<sub>1</sub> receptor, losartan.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ang – Angiotensina

CI – Córtex insular

CSS – Cage switch stress / Estresse por mudança de ambiente

ECA – Enzima conversora de angiotensina

ECA2 – Enzima conversora de angiotensina 2

HCI – Hemorragia no córtex insular

HCI – sal – Hemorragia no córtex insular tratados com salina

HCI – los – Hemorragia no córtex insular tratados com losartan

HCI – los + A-779 – Hemorragia no córtex insular tratados com losartan e A-779

PA – Pressão arterial

PAM – Pressão arterial média

SalCI – sal – Salina no córtex insular tratados com salina

SNS – Sistema nervoso simpático

SRA – Sistema Renina Angiotensina

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Sistema Renina Angiotensina.....	24
<b>Figura 2</b> – Desenho representativo da estereotaxia e área do córtex insular direito.....	31
<b>Figura 3</b> – Desenho representativo do teste CSS – estresse por mudança de ambiente.....	33
<b>Figura 4</b> – Esquema do protocolo experimental grupo HCl – sal e SalCl – sal.....	35
<b>Figura 5</b> – Esquema do protocolo experimental grupo HCl – los .....	36
<b>Figura 6</b> – Esquema do protocolo experimental grupo HCl – los + A-779.....	37
<b>Figura 7</b> – Valores basais de PAM em ratos submetidos à hemorragia experimental no CI..	38
<b>Figura 8</b> – Valores basais de FC em ratos submetidos à hemorragia experimental no CI, comparação com respectivos grupos controle. ....	39
<b>Figura 9 A</b> – PAM em mmHg por tempo em minutos, grupos: HCl – sal e SalCl – sal .....	40
<b>Figura 9 B</b> – Valores de delta para PAM .....	40
<b>Figura 10 A</b> – FC em bpm (beats per minute) por tempo em minutos, grupos: HCl – sal e SalCl – sal.....	41
<b>Figura 10 B</b> Valores de delta para FC.....	41
<b>Figura 11 A</b> – PAM em mmHg por tempo em minutos, grupos: HCl – sal e HCl – los, comparados ao grupo SalCl – sal .....	43
<b>Figura 11 B</b> – PAM em mmHg por tempo em minutos, grupos: HCl – sal e HCl – los .....	43

<b>Figura 12 A</b> – FC bpm por tempo em minutos, grupos: HCl – sal e HCl – los, comparados ao grupo SalCl – sal.....	44
<b>Figura 12 B</b> – FC bpm por tempo em minutos, grupos: HCl – sal e HCl – los .....	44
<b>Figura 12 C</b> Valores de delta para FC.....	45
<b>Figura 13 A</b> – PAM em mmHg por tempo em minutos, grupos: HCl – los e HCl – los + A-779, comparados ao grupo SalCl – sal .....	46
<b>Figura 13 B</b> – PAM em mmHg por tempo em minutos, grupos: HCl – los e HCl – los + A-779.....	46
<b>Figura 14 A</b> – FC bpm por tempo em minutos, grupos: HCl – los e HCl – los + A-779, comparados ao grupo SalCl – sal .....	47
<b>Figura 14 B</b> – FC bpm por tempo em minutos, grupos: HCl – los e HCl – los + A-779.....	47
<b>Figura 15 A</b> – Foto histologia, mostrando um exemplo da área de nanoinjeção do sangue....	49
<b>Figura 15 B</b> – local aproximado do sítio de injeção, visto na figura do atlas.....	49
<b>Figura 15 C</b> – Desenho esquemático mostrando região da hemorragia no CI direito do rato.....	49
<b>Figura 15 D</b> – Mapa das injeções no CI.....	49
<b>Figura 16</b> – Esquema mostrando as principais conexões entre o CI e a rede de controle simpática cardíaca.....	55

## **LISTA DE TABELA**

**Tabela 1.** Valores basais de PAM em ratos submetidos à hemorragia experimental no CI...38

**Tabela 2.** Valores basais de FC em ratos submetidos à hemorragia experimental no CI.....39

**Tabela 3.** Resultados obtidos, de acordo com a abordagem e as variáveis observadas.....48

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	17
1.1- O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....	17
1.2 – O CÓRTEX INSULAR.....	19
1.3 – CONSEQUÊNCIAS DO ACIDENTE VASCULAR NO CÓRTEX INSULAR.....	20
1.4 – O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.....	22
1.5 – ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES AT <sub>1</sub> E MAS.....	25
1.5.1 – LOSARTAN – ANTAGONISTA DO RECEPTOR AT <sub>1</sub> DE ANG II.....	25
1.5.2 – A-779 – ANTAGONISTA DA ANG-(1-7).....	26
2 – JUSTIFICATIVA / OBJETIVO GERAL.....	27
2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 – METODOLOGIA.....	28
3.1 – ANIMAIS.....	28
3.2 – ANESTESIA E ANALGESIA.....	28
3.3 – DROGAS.....	29
3.4 – PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	29

3.4.1 – HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CÓRTEX INSULAR.....	29
3.4.2 – CANULAÇÃO DA ARTÉRIA FEMORAL.....	31
3.5 – REGISTRO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.....	32
3.6 – CAGE SWITCH STRESS (CSS) .....	32
3.7 – HISTOLOGIA.....	33
3.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4 – PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	34
4.1 – PROTOCOLO 1. OBJETIVO: CARACTERIZAR O PERFIL CARDIOVASCULAR APÓS HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CI DE RATOS.....	34
4.2 – PROTOCOLO 2. OBJETIVO: AVALIAR O PERFIL CARDIOVASCULAR APÓS A HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CI DE RATOS TRATADOS COM LOSARTAN (BLOQUEADOR AT <sub>1</sub> ).....	35
4.3 – PROTOCOLO 3. OBJETIVO: AVALIAR O PERFIL CARDIOVASCULAR APÓS A HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CI DE RATOS TRATADOS COM LOSARTAN (BLOQUEADOR AT <sub>1</sub> ) APÓS ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA DE A-779 (BLOQUEADOR MAS).....	36
5 – RESULTADOS.....	37
5.1 – RESULTADO PROTOCOLO 1 – OBJETIVO: CARACTERIZAR O PERFIL CARDIOVASCULAR APÓS HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CI DE RATOS. ....	37



5.2 – RESULTADO PROTOCOLO 2 – OBJETIVO: AVALIAR O PERFIL CARDIOVASCULAR APÓS A HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CI DE RATOS TRATADOS COM LOSARTAN (BLOQUEADOR AT <sub>1</sub> ).....	42
5.3 – RESULTADO PROTOCOLO 3. – OBJETIVO: AVALIAR O PERFIL CARDIOVASCULAR APÓS A HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CI DE RATOS TRATADOS COM LOSARTAN (BLOQUEADOR AT <sub>1</sub> ) APÓS ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA DE A-779 (BLOQUEADOR MAS).....	45
5.4 – RESULTADO – HISTOLOGIA.....	49
6 – DISCUSSÃO.....	50
7 – CONCLUSÕES.....	56
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é considerado uma doença cerebrovascular (Caplan et al., 1982; Virani Salim S. et al., 2020), de especial relevância. Em uma definição atualizada para o século XXI feita pela American Heart Association, o AVE foi classificado como um déficit neurológico atribuído a uma lesão focal aguda do Sistema Nervoso Central (SNC). O AVE hemorrágico é caracterizado como uma doença heterogênea resultante de hemorragia focal no parênquima cerebral, no sistema ventricular ou no espaço subaracnóideo (Sacco et al., 2013). A hemorragia ocorre a partir da ruptura dos vasos cerebrais, frequentemente como resultado da hipertensão, em que o sangue exerce pressão excessiva nas paredes arteriais já danificadas por aterosclerose, aneurisma ou malformação arteriovenosa. Na hemorragia o cérebro fica exposto aos efeitos dos produtos do sangue que causam irritação no tecido (Frizzell, 2005; Perna and Temple, 2015). Os AVEs isquêmicos são caracterizados por infartos cerebrais resultantes da oclusão de um vaso, geralmente artérias, resultados do desenvolvimento aterosclerótico de trombos e êmbolos que levam à deficiência de oxigênio (Adams et al., 1993; Frizzell, 2005). A isquemia tem como alvo a microvasculatura, onde as respostas inflamatórias são iniciadas e contribuem para a lesão do tecido (del Zoppo and Hallenbeck, 2000). Os AVEs causam morte das células cerebrais devido à ausência de oxigênio quando há interrupção do fluxo sanguíneo por bloqueio ou ruptura do vaso o que também pode desencadear outras doenças como demências e depressão (Johnson et al., 2016). Estudos da doença, mostram que cerca de 90% do risco de AVE pode ser atribuído a fatores de risco como (hipertensão, obesidade, hiperglicemia, hiperlipidemia e disfunção renal) e, 74% destes, podem ser atribuídos a fatores de risco comportamentais determinados pelo estilo de vida, como tabagismo, sedentarismo e uma dieta pouco saudável. Globalmente, 29% do risco foi atribuível à poluição do ar (Benjamin et al., 2019).

Cerca de 15 milhões de pessoas por ano, no mundo, são acometidas por um AVE. O tabagismo e a hipertensão são relevantes fatores de risco, sendo que, para cada 10 indivíduos que foram a óbito por AVE, 4 deles poderiam sobreviver caso a pressão sanguínea fosse devidamente regulada (Anon, n.d.). Estima-se que mais de dois terços dos sobreviventes de AVE requerem cuidados médicos diários e mais da metade ficam incapacitados, além do fato

de que o AVE aumenta as chances de deficiência física mais marcadamente do que qualquer outra condição (Adamson et al., 2004; Arroja et al., 2016). No Brasil, só em 2016, foram registrados mais de 107 mil óbitos por AVE e boa parte dos pacientes que sobreviveram apresentaram incapacidades. (de Santana et al., 2018). O envelhecimento da população global e o acúmulo de fatores de risco contribuem para um risco crescente de AVE ao longo da vida. O risco médio global de AVE aumentou de 22,8% em 1990 para 24,9% em 2016 (Anon, n.d.), ocupando o segundo lugar como causa morte e o terceiro entre as doenças que causam incapacidades (Strong et al., 2007; Feigin et al., 2015, Anon, n.d.). É pertinente ressaltar que, neste momento, devido à pandemia causada por infecções do SARS -CoV-2, a ciência volta sua atenção às doenças cerebrovasculares, especialmente eventos de AVE em observações clínicas que apontam um aumento de AVE agudo em pacientes graves com Covid-19, associado a, aumento da inflamação e tendência a uma maior mortalidade, o que necessita ser melhor estudado (Aggarwal et al., 2020; Dhamoon et al., 2021). Estudos relatam pacientes jovens com oclusão da artéria cerebral média do lado direito e aumento de AVE hemorrágicos em pacientes com SARS-CoV-2 (Oxley et al., 2020; Mishra et al., 2021), além de estados pró-trombóticos e DIC (coagulação intravascular disseminada) com lesão cerebrovascular direta e eventos hemorrágicos (devido a terapia anticoagulante), resultando em aumento de AVE hemorrágicos e risco maior de morte em pacientes internados com covid-19 (Fayed et al., 2020; Zhang et al., 2020; Melmed et al., 2021).

Durante as primeiras semanas, complicações cerebrais podem ser responsáveis pela mortalidade, entre elas, um quadro conhecido como herniação transtentorial (Oppenheimer and Hachinski, 1992), causado por aumento da pressão intracraniana, consequência do edema cerebral agudo (Parizel et al., 2002). Além disso, é reportado casos de pacientes com depressão pós-AVE agudo que pode estar relacionada a lesão anterior do hemisfério esquerdo (Starkstein et al., 1988). Vários estudos relatam o estresse pós-AVE em pacientes com estados de ansiedade não específico e estresse pós-traumático (Bruggimann et al., 2006; Edmondson and Cohen, 2013), parte destes, devido a situação de incapacidade e dependência em que o paciente se encontra. (Oppenheimer and Hachinski, 1992).

Consequências sistêmicas comuns são infecções pulmonares, urinária e outras (com importância devido a complicações que levam a morte); febre; embolia pulmonar; hiperglicemia transitória ou crônica em pacientes que não eram diabéticos antes do acidente vascular (Oppenheimer and Hachinski, 1992). Outras complicações podem ainda ocorrer, como insuficiência renal (Doshi et al., n.d.), que além de piorar a hipertensão em pacientes que já eram hipertensos, pode levar alguns pacientes a se tornarem hipertensos após o evento, e ainda,

gerar outras complicações, como disfunções, arritmias e insuficiência cardíaca (Oppenheimer and Hachinski, 1992; Chen et al., 2017).

## 1.2 – O CÓRTEX INSULAR

O córtex insular (CI) ou ínsula em humanos está localizado profundamente na fissura Sylviana, caracterizado pela primeira vez por Reil (1809), ocupa cerca de 2% do total da área cortical (Baier et al., 2014; Oppenheimer and Cechetto, 2016; Gogolla, 2017). É uma região do córtex filogeneticamente antiga, posicionada na porção telencefálica, transição entre o alocórtex (sistema olfatório, hipocampo) e neocórtex (frontal, parietal e lobos temporais), o seu suprimento arterial tem origem na artéria cerebral média (Tokgözüoğlu et al., 1999; Raghu et al., 2019).

O CI está presente no cérebro de todos os mamíferos (Oppenheimer and Cechetto, 2016) e recebe atenção especial por sua função devido a estudos que apontam seu papel no controle autonômico e visceral (Allen et al., 1991a). Através de estímulos elétricos no CI de ratos, gatos, cães, macacos e humanos verificou-se resposta autonômica com alterações cardiovasculares, respiratórias, na motilidade gástrica e outras áreas do corpo (Cechetto, 1990). Dentro da ínsula de várias espécies estão localizadas sub-regiões envolvidas na regulação cardíaca e na pressão sanguínea. Assim como nos humanos, em ratos a ínsula é dividida em três regiões: agranular, disgranular e granular, diferenciadas microscopicamente por sua estrutura celular (Oppenheimer and Cechetto, 2016). Estudos experimentais e clínicos revelam que dentre as áreas do hemisfério cerebral envolvidas no controle autonômico do coração, como a amígdala e o hipotálamo lateral, o CI é uma importante região cortical do território da irrigação da artéria cerebral média relacionada à regulação simpática e parassimpática cardiovascular (Tokgözüoğlu et al., 1999; Fink et al., 2005). A ínsula recebe aferências topograficamente organizadas, dos principais sítios viscerais e límbicos no cérebro de ratos, sugerindo a importância do CI na integração e controle nos sistemas autônomo e límbico (Allen et al., 1991b; Marins et al., 2016b). Estudos anteriores sugeriram uma lateralização nas regiões da ínsula envolvidas com o controle cardiovascular, sendo o lado direito posterior da ínsula relacionado ao controle simpático e o lado esquerdo posterior associado ao parassimpático (Oppenheimer, 2007).

Em humanos, durante estimulação em pacientes epiléticos, em procedimentos intraoperatórios na ínsula, diminuição na frequência cardíaca e resposta depressora foram

mostradas principalmente no lado esquerdo, enquanto aumento da frequência cardíaca e resposta pressora foram mais pronunciadas quando a estimulação foi realizada no lado direito (Oppenheimer et al., 1992). Envolvimento do CI direito em pacientes com AVE isquêmico resultou em arritmias, danos cardiovasculares, pior prognóstico e morte dentro de 1 ano após o acidente (Colivicchi et al., 2005). Em estudo recente, Chouchou e colaboradores avaliaram efeitos dos estímulos elétricos no CI de 47 pacientes epiléticos e forneceram um mapa funcional das regiões exploradas. De acordo com os autores, pode haver alguma assimetria esquerda/direita, ao observarem que a taquicardia pode ser evocada preferencialmente pela estimulação da parte posterior ventral da ínsula no lado direito (Chouchou et al., 2019).

Em ratos, microestimulação no CI resultou em resposta na pressão sanguínea e alterações na frequência cardíaca e respiratória (Ruggiero et al., 1987). O insulto promovido por ácido dl-homocisteico (DLH) em células do CI direito de ratos Wistar resultou em aumento na pressão arterial média que se tornou evidente 4 horas após o tratamento (Butcher Kenneth S. and Cechetto David F., 1995). Após estimulação elétrica, em ratos anestesiados, na região rostral posterior da ínsula foi observada aceleração da frequência cardíaca, enquanto na região mais caudal verificou-se desaceleração da frequência cardíaca (Oppenheimer and Cechetto, 1990). Em estudo prévio de nosso laboratório, foi observada uma organização topográfica da regulação cardiovascular autonômica ao longo do eixo rostrocaudal no CI de ratos, demonstrando que a região intermediária do CI posterior é predominantemente simpatoexcitatória, enquanto uma região simpatoinibitória está localizada mais rostralmente, não sendo neste estudo, no entanto, encontrada nenhuma evidência clara de assimetria funcional para controle cardiovascular autonômico entre os lados esquerdo e direito do CI posterior (Marins et al., 2016a).

### 1.3 – CONSEQUÊNCIAS DO ACIDENTE VASCULAR NO CORTÉX INSULAR

Ocorrências do acidente vascular no CI possibilitaram estudar as regiões envolvidas na regulação cardiovascular ao observar as alterações geradas. Os desarranjos da função cardiovascular devido ao acidente vascular no CI podem comprometer a sobrevivência do indivíduo a longo prazo ou causar a morte súbita cardíaca (Cheung and Hachinski, 2000; Oppenheimer and Cechetto, 2016). A ínsula é uma área onde ocorre AVEs frequentes devido à oclusão/infarto na artéria cerebral média (Tokgözüglu et al., 1999), ou por rompimento dos

vasos causando hemorragia intracerebral (HIC) (van Bree et al., 2010; Romano et al., 2019). Alguns relatos consideram a lateralização, com o lado direito do CI mais importante na estabilização da frequência cardíaca e ritmo cardíaco, portanto um AVE no lado direito causaria maiores efeitos, como arritmias cardíacas, mediados pelo simpático, mostrando alterações cardiovasculares mais facilmente detectadas no ECG (Oppenheimer, 1992). Um estudo realizado com humanos relacionou o AVE nos hemisférios esquerdo e direito do cérebro, incluindo o córtex insular. Nesse estudo, morte súbita ocorreu apenas em pacientes com lesão no córtex insular e a maioria dos pacientes com lesão no lado direito, sugerindo que a ínsula, principalmente o lado direito, exerce um importante papel no controle autônomo e ainda, o AVE nessa região aumenta o tônus simpático e a probabilidade de arritmias cardíacas e morte súbita ((Tokgözüglu et al., 1999). O ECG de pacientes com AVE agudo no CI geralmente resulta em anormalidades no intervalo ST e na onda T, mostrando arritmias e problemas na repolarização (Cheshire and Saper, 2006). Em um outro estudo, também com humanos, o acidente vascular no córtex insular direito provocou alterações nos parâmetros cardiovasculares e aumento no tônus simpático cardíaco (Meyer et al., 2004). Paciente com AVE isquêmico, seguido de hemorragia no CI, apresentou “torsades de pointes” (arritmia ventricular, associada a perturbação na repolarização) desencadeada por intervalo QT prolongado (Romano et al., 2019).

Diversas consequências do acidente vascular no CI são reportadas, como por exemplo, déficits motores e sensoriais, déficit de consciência e distúrbios neuropsiquiátricos, ruptura das respostas afetivas, déficit na percepção e reconhecimento ipsilaterais, ausência do tato, comprometimento da fala, alterações na percepção da audição, paladar, olfativas, dor e mudanças na temperatura (Baier et al., 2014; Jones et al., 2010; Di Stefano et al., 2021). Em um estudo com humanos pós AVE no córtex insular, foram observadas alterações na percepção da dor e variações de temperatura (frio e calor) (Starr et al., 2009), considera-se que cerca de 50% dos pacientes que sofrem AVE apresentam febre (Wrotek et al., 2011; Thomas et al., 2020) que pode ser devido a infecções, ou sem nenhum foco de infecção identificável (Georgilis et al., 1999).

Em ratos, alterações autonômicas como, aumento da atividade simpática do nervo renal e pressão arterial média também foram relatadas como efeitos do AVE (Butcher Kenneth S. and Cechetto David F., 1995). Estudo recente de nosso laboratório, comparou os efeitos cardiovasculares produzidos pela hemorragia focal no CI de ratos em ambos os hemisférios. Foram observados, taquicardia sustentada (mediada pelo aumento da atividade simpática cardíaca), redução na atividade simpática renal, arritmias cardíacas e alterações moleculares

cardíacas sugerindo progressão para insuficiência cardíaca. Interessantemente, as alterações observadas foram mais proeminentes quando hemorragia era no lado direito (Marins et al., 2020).

#### 1.4 – O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) desempenha um papel importante no controle das funções cardiovascular, renal e adrenal que mantém o balanço homeostático e a pressão arterial (Carey and Siragy, 2003). Descrito simplificado, o Angiotensinogênio (AGT), uma glicoproteína que é produzida pelo fígado, embora possa ser produzida também por outros órgãos como o cérebro, rins e coração, é liberada na circulação sanguínea (Passos-Silva et al., 2013), pela ação da enzima renina – outra glicoproteína que é produzida nas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais (Carey and Siragy, 2003) – é hidrolisado produzindo a Angiotensina I (Ang I) (Fontes et al., 2016). A Ang I por sua vez, é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), produzida principalmente nos vasos pulmonares, e é subsequentemente convertida em angiotensina II (Ang II) (Paz Ocaranza et al., 2020).

Os principais efeitos da Ang II são mediados pelo receptor  $AT_1$ . O chamado eixo clássico, que consiste nos produtos ECA /Ang II / $AT_1$ , possui ações vasoconstritora, hipertensiva, fibróticas e proliferativa associados às doenças cardiovasculares, como insuficiência cardíaca, AVE e outras (Sasaki and Dampney, 1990; Ferreira et al., 2011). Além da Ang II, outros produtos biologicamente ativos também são formados no SRA, a Ang III, Ang IV e Ang-(1-7) (Fontes et al., 2016).

Através da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) a Ang II por hidrólise forma a Ang-(1-7) (Passos-Silva et al., 2013). A Ang-(1-7) pode ser gerada por clivagem da Ang I por endopeptidases e oligopeptidases, como THOP, NEP, PEP ou por clivagem da Ang II por carboxipeptidases, como a ECA2 (Santos et al., 2018). As ações da Ang-(1-7) são mediadas por receptor Mas (Fontes et al., 2016), receptor acoplado a proteína G (GPCR) (Santos et al., 2003), podendo se ligar também ao receptor MRGD, no entanto ainda não há muita clareza sobre a relevância funcional desta associação (Tetzner et al., 2016; Paz Ocaranza et al., 2020). Considerado o segundo eixo, ECA2/Ang-(1-7)/Mas, com ação vasoprotetora, exerce um papel importante contrarregulador do eixo clássico e que pode trazer benefícios aos pacientes com doenças cardiovasculares (Ferreira et al., 2010). Evidências atuais sugerem a ECA2 humana

recombinante como terapia promissora em doenças cardiovasculares, a fim de diminuir quantidades de Ang II e aumentar Ang-(1-7) (Wysocki et al., 2010). A Ang-(1-7) apresenta efeitos antiarrítmicos e foi demonstrado que o receptor Mas no nodo sinoatrial exerce uma papel funcional na atenuação de arritmias (Ferreira et al., 2011). Dados mostram ainda que a ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas diminui taquicardias interferindo com a resposta cronotrópica positiva, mediada pela estimulação de receptores beta adrenérgicos cardíacos, induzida por isoproterenol em animais anestesiados e conscientes (Lima et al., 2013). Outros importantes efeitos ocorrem no sistema renal e proteção contra lesão renal, no modelo de hipertensão (Dilauro and Burns, 2009).

Recentemente uma nova classe do SRA foi descoberta, as alatensinas, entre elas a Alamandina, cujo receptor é o receptor D acoplado à proteína G relacionado ao Mas (MrgD), com efeitos vasodilatadores, diminuição da pressão sanguínea e do tônus simpático (Lautner et al., 2013; Paz Ocaranza et al., 2020).



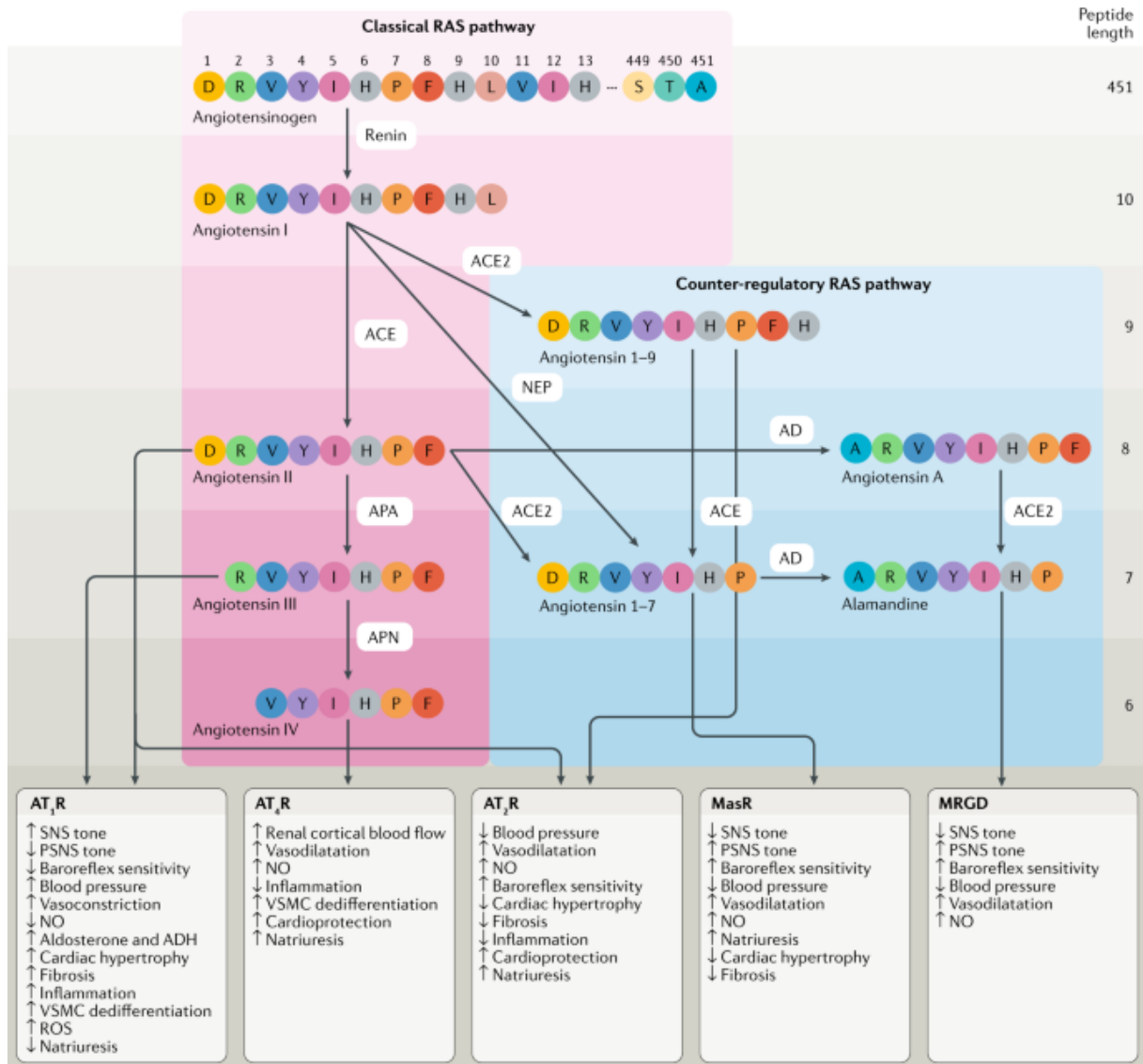


Figura 1 – Sistema Renina Angiotensina - (Paz Ocaranza et al., 2020).

Considerando o acidente vascular no córtex insular, os resultados que afetam o sistema autonômico cardiovascular e com base nas evidências dos efeitos da ativação dos receptores  $AT_1$  e Mas, o SRA apresenta-se como um importante alvo farmacológico para o tratamento de doenças (Victor, 2007), portanto explorá-lo como alvo terapêutico utilizando drogas que possam interferir, como inibidores dos receptores da Ang II ou ativadores da Ang-(1-7), via receptor Mas, poderia resultar em respostas importantes sobre a atuação integrada deste sistema no controle das funções cardiovasculares envolvidas, bem como, um possível tratamento para os pacientes. Estudo em animais modelo de AVE isquêmico, por oclusão da artéria cerebral média no hemisfério direito, sendo o CI também afetado, uma vez que uma porção grande do hemisfério direito foi afetado pela isquemia, mostrou que a Ang-(1-7) exerce ações

cardioprotetoras e ações cerebroprotetoras em casos de AVE isquêmico em ratos (Mecca et al., 2011).

## 1.5 – ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES AT<sub>1</sub> E MAS

### 1.5.1 – LOSARTAN – ANTAGONISTA DO RECEPTOR AT<sub>1</sub> DE ANG II

Losartan, o sal de potássio de 2-n-butil - 4- cloro - 5 - hidroximetil -1 - [(2 / - (1H - tetrazol - 5 - il) bifênil-4-il) metil] imidazol (Wexler et al., n.d.) é uma substância de baixo peso molecular, não peptídico, antagonista do receptor AT<sub>1</sub> de Ang II, de administração oral, utilizado para bloquear os efeitos fisiológicos induzidos pela Ang II, sendo assim, importante como anti-hipertensivo (Johnston, 1995). Antagonista do receptor AT<sub>1</sub> de Ang II (Habashi et al., 2006) é considerada uma droga eficaz, pois bloqueia os efeitos da Ang II (Dahlof et al., n.d.), e, por esta razão, utilizada no tratamento da hipertensão e prevenção das doenças cardiovasculares, como o infarto do miocárdio e o AVE reduzindo a morbidade e mortalidade cardiovascular (Dahlöf et al., 2002).

Especificamente com relação ao AVE, losartan mostrou-se eficiente em diminuir a pressão sanguínea noturna ambulatorial em pacientes com histórico de AVE (Okuguchi, 2002). Adicionalmente, estudos mostram que losartan é eficiente na redução da fibrilação atrial e também no tratamento pós-AVE em pacientes com hipertensão, oferecendo proteção cerebrovascular (Kjeldsen et al., 2005; Wachtell et al., 2005). Em estudos com animais (ratos) em um modelo de isquemia cerebral induzida por oclusão de vasos, losartan apresentou efeito neuroprotetor atenuando o dano neural e diminuindo morte neuronal após administração intraperitoneal (Zhang et al., 2012). Losartan foi mais eficiente em prevenir a morbidade cardiovascular e morte, num estudo comparado com atenolol em pacientes hipertensos que foram tratados durante 4 anos, tendo também reduzido a pressão arterial e sendo melhor tolerado (Dahlöf et al., 2002). Semelhantemente, losartan foi mais eficaz do que o atenolol na prevenção da morbidade cardiovascular e morte, especialmente em casos de AVE, independente da redução da pressão arterial, além de prevenir AVE em pacientes com hipertrofia ventricular esquerda com espectro de risco cardiovascular (Devereux, 2003; Kizer et al., 2005). O tratamento com bloqueador AT<sub>1</sub>, em pacientes idosos hipertensos, diminuiu em

42% o risco relativo de acidente vascular (Papademetriou et al., 2004). Dados de um estudo com bloqueador AT<sub>1</sub>, cujo tratamento foi realizado durante 7 dias após AVE isquêmico resultou em melhora no prognóstico, diminuição da morbidade e mortalidade dos pacientes, mostrando que quanto mais cedo a inibição do receptor AT<sub>1</sub> de Ang II, melhor os efeitos e benefícios (Schrader et al., 2003). Pré-tratamento com losartan mostrou efeitos benéficos contra danos em AVE isquêmico em ratos (Zhao et al., 2009). Além disso, estudos mostram efeitos de cardioproteção após tratamento com inibidores (Xu et al., 2000; Dahlöf et al., 2002). Adicionalmente, evidências clínicas e experimentais mostram outros diversos efeitos neuroprotetores dos tratamentos com bloqueadores da Ang II (Villapol and Saavedra, 2015). Estudo mostrou a eficácia do losartan em epilepsia após lesão cerebral a fim de evitar uma devastadora seqüela neurológica e dano na barreira hematoencefálica (causados pós-injúria cerebral), sendo então, proposto como uma nova estratégia para evitar modificações neurovasculares lentas e progressivas, ressaltando que ele mostra-se promissor por produzir vários efeitos benéficos na unidade neurovascular com diferentes mecanismos de ação (Friedman et al., 2014).

#### 1.5.2 – A-779 – ANTAGONISTA DA ANG-(1-7)

O A-779 [Asp 1-Arg 2-Val 3-Tyr 4-Ile 5-His 6-D-Ala 7, (A-779)] é um antagonista seletivo do receptor Mas do heptapeptídeo Ang-(1-7). Estudos pioneiros de Santos e colaboradores, mostraram que o A-779 seletivamente bloqueou as alterações de PAM produzidas pela microinjeção de Ang-(1-7) em regiões cardiovasculares do bulbo dorsal e ventral, bem como o efeito antidiurético de Ang-(1-7) (Santos et al., 1994). Experimentos *in vitro* revelaram que Ang-(1-7) diminuiu a autofagia de cardiomiócitos induzida por Ang II, e reduziu a remodelação cardíaca juntamente com a melhora da função cardíaca, sendo que quando administrado A-779, o antagonista do receptor Mas mitigou os efeitos benéficos da Ang-(1-7) (Lin et al., 2016).

Mecca e colaboradores mostraram que quando administrado um ativador da ECA2 (o que aumenta Ang-(1-7) disponível) por infusão intracerebroventricular antes, durante e após o AVE isquêmico, o tamanho do infarto em ratos foi reduzido, e o mesmo efeito foi revertido pela co-administração com o antagonista Mas A-779 (MECCA *et al.*, 2011). Num outro estudo o grupo observou que ao administrar o ativador de ECA2 junto com o A-779, o volume do

infarto foi pior comparado ao grupo que não recebeu A-779 (Bennion et al., 2015). Estudo com ratos SHR, com um modelo de AVE hemorrágico induzido por hipertensão, o tratamento com Ang-(1-7) resultou em um aumento significativo na sobrevivência dos animais e diminuiu o número de hemorragias. Este efeito foi parcialmente revertido pela infusão intracerebroventricular do bloqueador do receptor Mas, A-779 (Regenhardt et al., 2014).

## 2 – JUSTIFICATIVA / OBJETIVO GERAL

Compreender os diferentes mecanismos envolvidos nas alterações cardiovasculares oriundas do AVE pode revelar alternativas terapêuticas para o tratamento ou prevenção desta condição. Neste estudo, procuramos avaliar os efeitos produzidos pelo bloqueio de receptores AT<sub>1</sub> nas alterações cardiovasculares resultantes da hemorragia experimental no córtex insular de ratos. Adicionalmente, investigar a contribuição do receptor Mas nos efeitos resultantes do bloqueio AT<sub>1</sub>.

### 2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil cardiovascular após hemorragia experimental no CI de ratos.
- Avaliar o perfil cardiovascular após a hemorragia experimental no CI de ratos tratados com losartan (bloqueador AT<sub>1</sub>).
- Avaliar o perfil cardiovascular após a hemorragia experimental no CI de ratos tratados com losartan (bloqueador AT<sub>1</sub>) após administração subcutânea de A-779 (bloqueador Mas).

### 3 – METODOLOGIA

#### 3.1 – ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar pesando 280 a 350g. fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais. Os procedimentos foram realizados de acordo com as regras estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEUA UFMG, sob o protocolo aprovado, nº 112/2019. Os animais foram mantidos em ambiente adequado com temperatura e luminosidade controladas, com livre acesso a ração e água.

Os experimentos cirúrgicos e tratamentos foram realizados no Laboratório de Hipertensão da UFMG. A hemorragia experimental intracerebral no CI foi realizada conforme o método adaptado (Nakamura et al., 2008) e descrito anteriormente pelo nosso laboratório (Marins et al., 2020) .

#### 3.2 – ANESTESIA E ANALGESIA

Em todos os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com Cetamina (80mg/Kg) e Xilazina (7mg/Kg) por via intraperitoneal (ip) a fim de serem submetidos às cirurgias. Após os procedimentos receberam 0,2 ml de pentabiótico veterinário 1:200000 UI (Fort Dodge) por via intramuscular para prevenir infecções, dose única, logo após a cirurgia de estereotaxia e 0,1ml/100g, de peso animal, de banamine na concentração de 50mg/ml (MSD) por via subcutânea (sc) para promover analgesia logo após a estereotaxia e pós-cirurgia de canulação da artéria femoral.

### 3.3 – DROGAS

Foram utilizadas: losartan antagonista do receptor AT<sub>1</sub> (10mg/kg) por via ip e A-779 antagonista do receptor Mas (200µg/kg) por via subcutânea (sc).

Os grupos controle receberam injeção por via ip (0,1ml/100g de peso vivo) de salina estéril (NaCl 0,9%).

### 3.4 – PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

#### 3.4.1 – HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CÓRTEX INSULAR

Os animais foram anestesiados com Cetamina (80mg/Kg) e Xilazina (7mg/Kg) via ip, tiveram o pelo da cabeça raspado e foram posicionados no estereotáxico e fixados pelas barras auriculares e barras incisivas reguladas em 3,3 mm abaixo da linha intraural. O animal foi mantido posicionado sobre uma manta aquecida, mantendo 37° C, durante todo o procedimento cirúrgico e sua temperatura foi monitorada por um termômetro (medida de temperatura retal) ligado a um software. Foi realizada assepsia no couro cabeludo com álcool 70%, logo após administrado anestésico local sc com cloridrato de lidocaína 2%+epinefina 1:200000 (Xylestesin<sup>®</sup>) para promover a redução do sangramento na região do corte devido a sua ação vasoconstritora e a seguir, uma incisão mediada na pele para visualização do bregma (ponto de referência para a leitura dos parâmetros: ântero-posterior, latero-lateral e dorso-ventral). Com uma broca foi utilizada para trepanação craniana, cujo orifício obedecia às coordenadas para a localização do córtex insular direito, seguindo as coordenadas antero-posterior: 0.0, latero-lateral: 5,8 mm e dorsoventral:7,0 mm a partir do bregma, descritas no Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos et al., 2009). A Hemorragia Experimental no córtex insular direito foi induzida pela nanoinjeção (200 nl) de sangue autólogo sem anticoagulante, nesta região, em um período de 1 min. Esse sangue foi retirado da cauda do rato durante o procedimento, figura (Fig.2). Na fase de caracterização/padronização do modelo, o grupo controle recebeu 200 nanolitros (nl) de salina estéril na região do CI. Adicionalmente, para separar os possíveis efeitos dos procedimentos cirúrgicos da intervenção no CI um grupo sham foi adicionado. O grupo sham

consistiu de ratos que foram submetidos a todos os procedimentos de estereotaxia com a trepanação craniana utilizando uma broca para fazer o orifício, seguindo as mesmas coordenadas a partir do bregma, sem receberem, no entanto, qualquer injeção no CI. Vale aqui ressaltar que, como o grupo hemorragia experimental no córtex insular foi o mesmo utilizado para comparação com hemorragia experimental no córtex insular com tratamento ip de antagonistas angiotensinérgicos, todos receberam injeção ip de veículo salina. Assim três grupos experimentais foram avaliados e respectivamente denominados:

- 1) Sham controle sem injeção no córtex insular, **Sham – sal**; n=5
- 2) Hemorragia experimental no córtex insular; **HCI – sal**; n= 7.
- 3) Salina no córtex insular; **SalCI – sal**; n= 7.
- 4) Hemorragia experimental no córtex insular tratamento com losartan ip; **HCI – los**; n= 6.
- 5) Hemorragia experimental no córtex insular tratamento com losartan ip + A-779 sc; **HCI – los + A-779**; n=6.

Logo após, a região foi suturada e finalizado com limpeza da sutura com álcool iodado. O pós-operatório foi feito em ambiente aquecido até a recuperação anestésica e depois os ratos retornaram para o biotério do laboratório onde foram mantidos em caixas de polipropileno com livre acesso a água e comida por um período de 3 dias, durante o qual eles receberam os diferentes tratamentos, (losartan, losartan+A-779 ou veículo i.p). No segundo dia após a estereotaxia os ratos foram submetidos a canulação da artéria femoral.

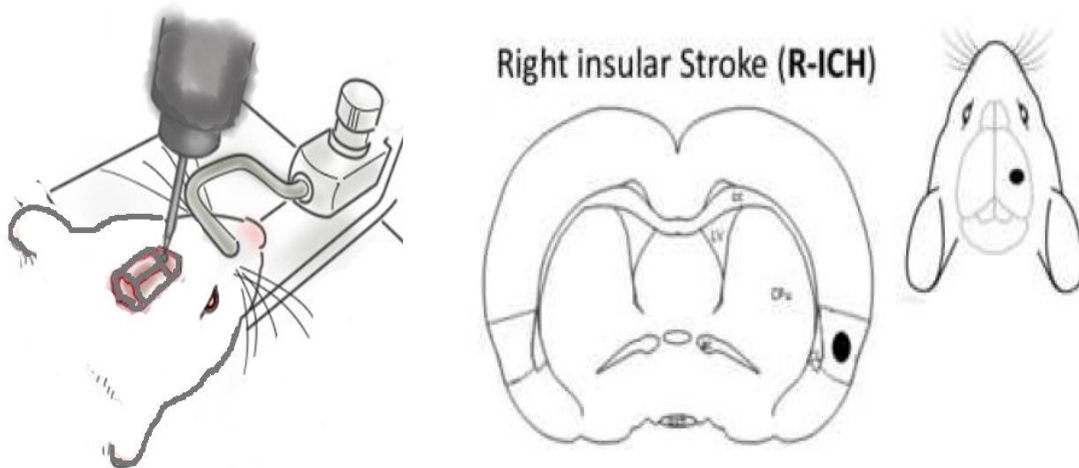


Figura. 2 – Desenho representativo da estereotaxia e área do córtex insular direito onde foi realizada a hemorragia experimental. Figura modificada, adaptada de MARINS *et al.*, 2020.

### 3.4.2 – CANULAÇÃO DA ARTÉRIA FEMORAL

Os animais foram novamente anestesiados com Cetamina (80mg/Kg) e Xilazina (7mg/Kg) por via ip e submetidos a canulação da artéria femoral, com cânula de polietileno 48h após a hemorragia experimental. As cânulas foram confeccionadas a partir do aquecimento e união de tubo de polietileno PE-10 (4,5 cm) e PE-50 (15cm). Posteriormente foram preenchidas com solução salina (0,9%) e obstruídas na extremidade livre do P-50 com alfinetes de metal. A canulação ocorreu a partir de uma incisão unilateral na região inguinal dos ratos anestesiados em decúbito dorsal para dissecação e isolamento da artéria femoral onde a cânula de polietileno foi implantada até chegar a aorta abdominal, sendo amarrada e fixada. A extremidade livre foi passada pela região lateral e dorsal do tronco pelo espaço subcutâneo até a região interescapular por onde foi exteriorizada através de uma pequena incisão previamente realizada e então fixada externamente também por amarrações. Os animais foram suturados na região inguinal e passaram por um período de recuperação de aproximadamente 24h. A seguir a cânula foi conectada a um transdutor para registro dos parâmetros cardiovasculares.



### 3.5 – REGISTRO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

Os parâmetros cardiovasculares foram analisados 72h após a hemorragia experimental, A cânula inserida na artéria foi conectada a um transdutor de pressão ligado a um amplificador e a um sistema de conversão analógico-digital (MP100A-CE) para aferição desses parâmetros. Foram coletados os valores através do equipamento e do software Biopac Systems Inc. Os registros de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram gravados e analisados posteriormente.

### 3.6 – CAGE SWITCH STRESS (CSS)

Com o intuito de avaliar o efeito da Hemorragia no CI e sua associação com os diferentes tratamentos frente à uma situação de reatividade cardiovascular, os animais foram submetidos ao estresse por mudança de ambiente ou cage switch stress (CSS) (Cunha Silva and Fontes, 2019). Este paradigma consiste em transferir o rato de sua caixa original para uma caixa contendo maravalha usada por outro animal Fig.3. O teste foi feito 24 horas após a canulação através da qual os parâmetros cardiovasculares foram monitorados. Após estabilização, os valores basais foram coletados por um período de 10 minutos (min), seguidos de 10 min de CSS e retorno à caixa original por mais 10 minutos.

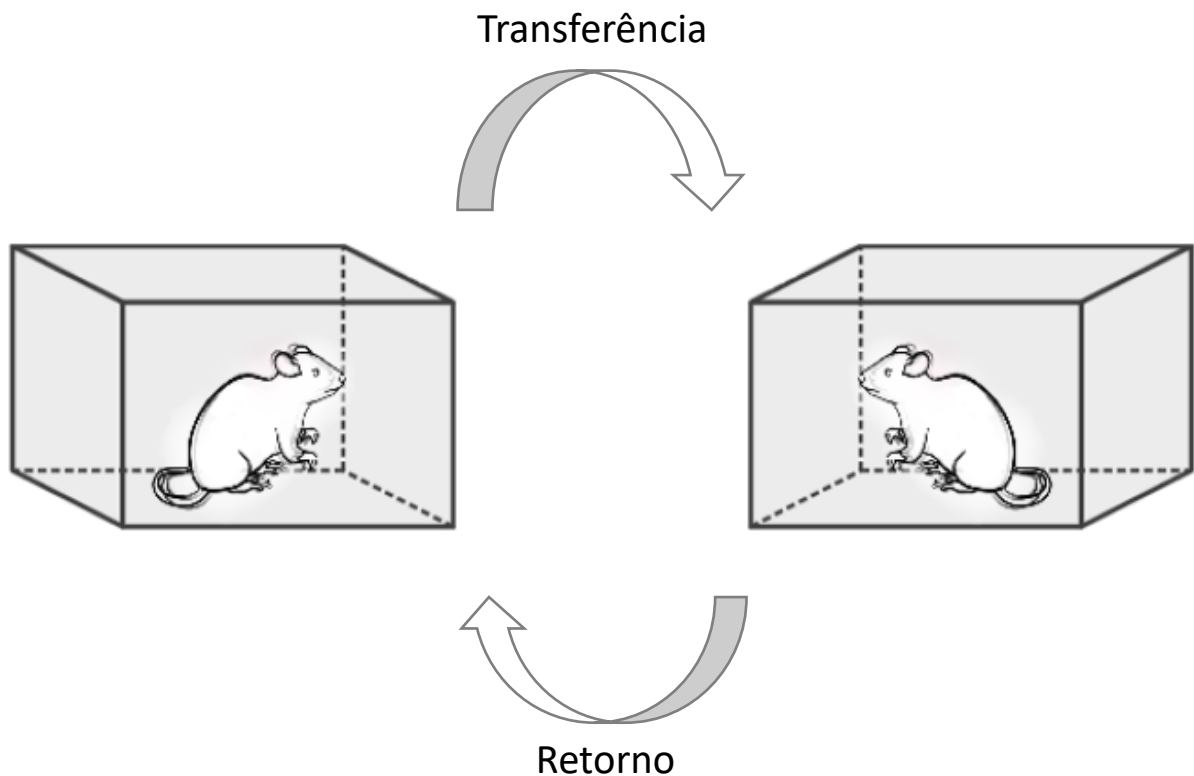


Figura. 3 – Desenho representativo do teste CSS – estresse por mudança de ambiente.

### 3.7 – HISTOLOGIA

Ao final do experimento, a fim de confirmar o sítio de injeção no cérebro, todos os animais foram anestesiados profundamente com tiopental (100mg/kg) por via ip e foi realizada a perfusão transcardíaca. Os animais foram submetidos à abertura da região torácica, o esterno foi rebatido a fim de expor o coração e uma agulha de grosso calibre foi introduzida no ventrículo esquerdo, a aorta abdominal foi bloqueada com pinça hemostática enquanto o átrio direito seccionado. Os animais foram perfundidos com solução salina 0,9%. Os cérebros foram removidos e armazenados em paraformaldeído 10% por 72 horas e posteriormente transferidos para uma solução de sacarose 30% por 24 - 48 horas.

No criostato (LEICA CM 1850) foram feitos cortes transversais do cérebro com espessura de 60  $\mu\text{m}$  para histologia, estes foram distribuídos em placas e posteriormente colocados em lâminas gelatinizadas e corados com vermelho neutro 1% pela técnica de Nissl. As lâminas foram então analisadas por microscopia óptica utilizando o atlas de Paxinos e

Watson (Paxinos et al., 2009) como referência para identificar a região do córtex insular que receberam a nanoinjeção de sangue autólogo.

### 3.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $x \pm \text{epm}$ ). Na análise estatística para comparação entre grupos serão utilizados os testes t de Student ou análise de variância (ANOVA two-way), seguido pelo teste de Bonferroni conforme apropriado. O nível de significância será fixado em  $p < 0,05$ .

Os valores de delta foram calculados, usando o primeiro valor registrado, coletado no intervalo de 30 segundos em cada minuto durante os 10 minutos de registro CSS menos o valor basal coletado no intervalo de 30 segundos imediatamente antes desta abordagem. Assim:

Delta = [Primeiro valor do intervalo de 30 s PAM CSS] – [Valor de PAM 30 s imediatamente antes do CSS]

Delta = [Primeiro valor do intervalo de 30 s FC CSS] – [Valor de FC 30 s imediatamente antes do CSS]

## 4 – PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### 4.1 – PROTOCOLO 1. OBJETIVO: CARACTERIZAR O PERFIL CARDIOVASCULAR APÓS HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CI DE RATOS.

Nesta primeira etapa procuramos caracterizar o perfil cardiovascular dos animais após hemorragia experimental no CI. Os animais foram submetidos a estereotaxia e receberam injeção de 200 nl de sangue autólogo no CI e tratamento com salina ip durante 3 dias, sendo a primeira dose logo após a cirurgia. O grupo controle recebeu injeção de 200 nl de salina estéril 0,9% no CI e tratamento com salina ip durante 3 dias, sendo a primeira dose também logo após a cirurgia. No terceiro dia os animais foram novamente anestesiados e a artéria femoral foi

canulada. Após 24h de recuperação a cânula foi conectada ao transdutor para registro dos parâmetros cardiovasculares. Durante o registro foram avaliados os parâmetros cardiovasculares basais e 10 minutos após foi avaliada a reatividade cardíaca ao estresse por mudança de ambiente (CSS). Cerca de uma hora após, os animais foram anestesiados, foi realizada perfusão transcardíaca, retirada do cérebro para fixação e posterior histologia. Esquema do protocolo apresentado na Fig. 4. Todos os procedimentos foram melhor detalhados na metodologia, ítem 3.4.

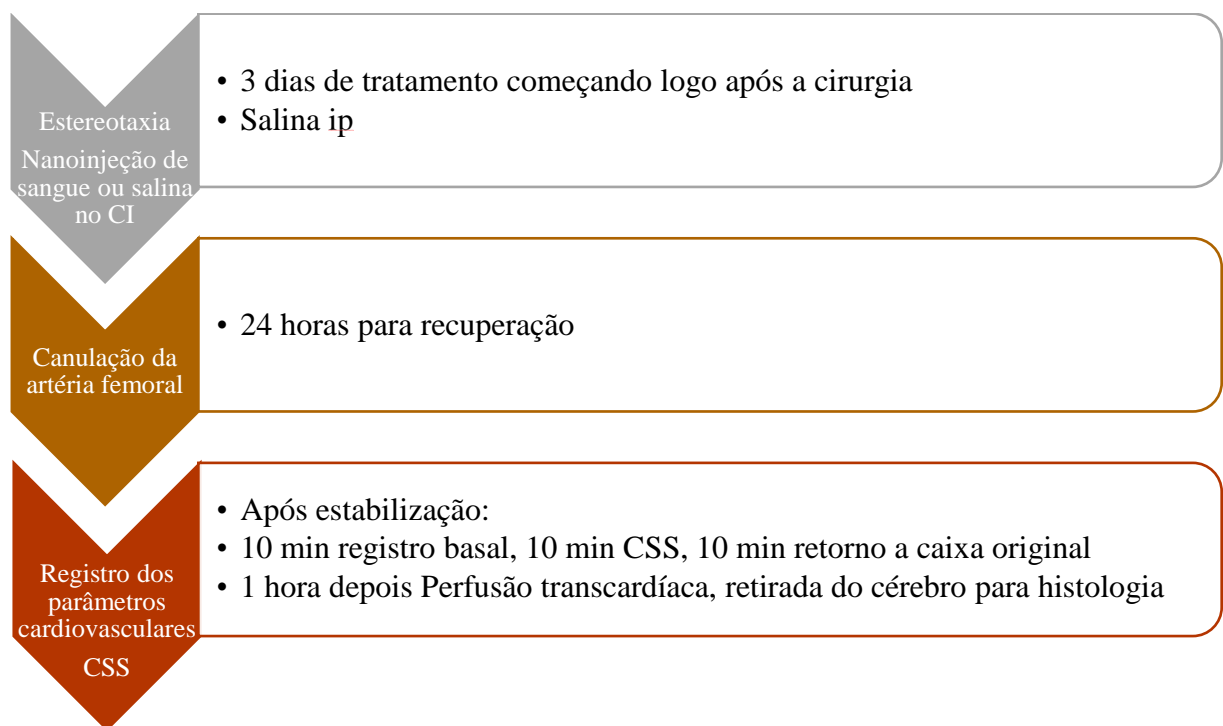


Figura. 4 - Esquema do protocolo experimental grupo HCI – sal e SalCI – sal.

#### 4.2 – PROTOCOLO 2. OBJETIVO: AVALIAR O PERFIL CARDIOVASCULAR APÓS A HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CI DE RATOS TRATADOS COM LOSARTAN (BLOQUEADOR AT<sub>1</sub>).

Os animais receberam injeção de 200 nl de sangue autólogo no CI e tratamento com losartan ip durante 3 dias, sendo a primeira dose após a cirurgia. Os demais procedimentos foram iguais aos grupos especificados anteriormente no ítem 4.1. Esquema do protocolo

apresentado na Fig. 5. Todos os procedimentos foram melhor detalhados na metodologia, ítem 3.4.

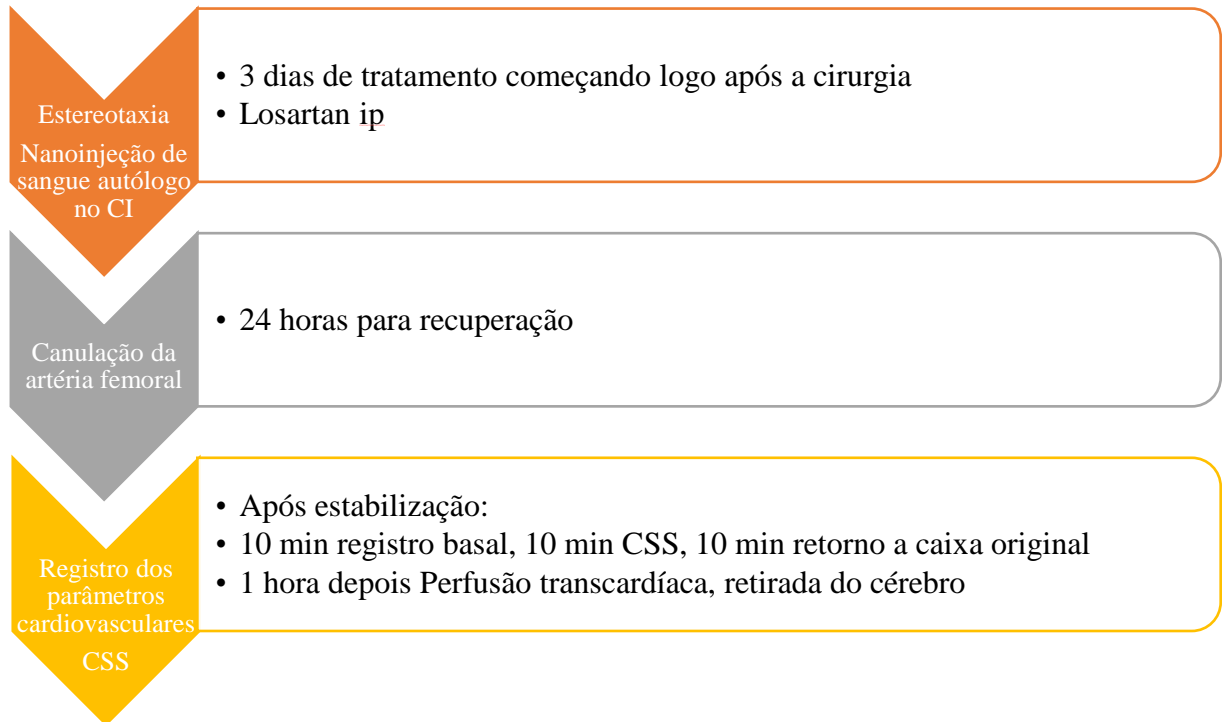


Figura. 5 - Esquema do protocolo experimental grupo HCI – los.

4.3 – PROTOCOLO 3. OBJETIVO: AVALIAR O PERFIL CARDIOVASCULAR APÓS A HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CI DE RATOS TRATADOS COM LOSARTAN (BLOQUEADOR AT1) APÓS ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA DE A-779 (BLOQUEADOR MAS).

Os animais receberam injeção de 200 nl de sangue autólogo no CI e tratamento com A-779 sc e losartan ip, 30 min após, durante 3 dias, sendo a primeira dose após a cirurgia. Os demais procedimentos foram iguais aos grupos anteriores especificados no 4. 1, 4. 2. Esquema do protocolo apresentado na Fig. 6. Todos os procedimentos foram melhor detalhados na metodologia, ítem 3.4.

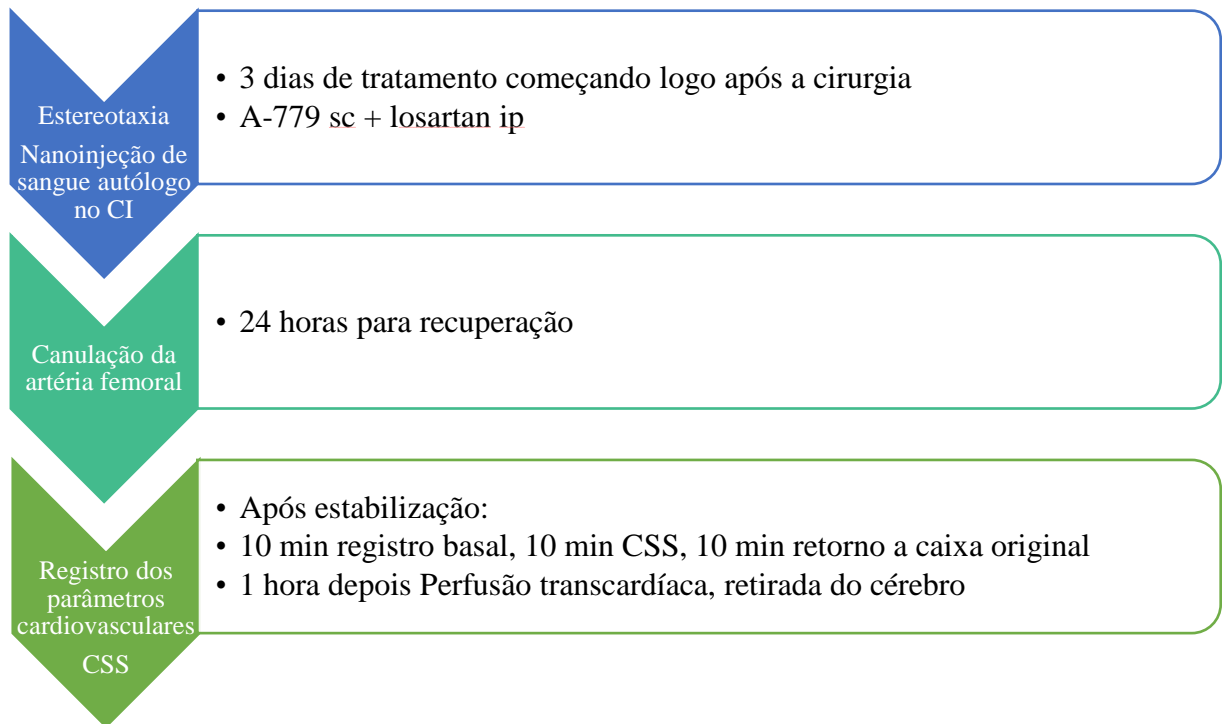


Figura 6 - Esquema do protocolo experimental grupo HCI – los + A-779.

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 – RESULTADO PROTOCOLO 1 – OBJETIVO: CARACTERIZAR O PERFIL CARDIOVASCULAR APÓS HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CI DE RATOS.

Inicialmente comparamos os valores basais das variáveis cardiovasculares entre três grupos experimentais; 1) Sham – sal e 2) SalCI – sal. 3) HCI – sal. Não foram observadas diferenças significativas nos valores basais de PAM entre os grupos (Fig. 7, Tabela 1). Ao contrário, o grupo HCI – sal apresentou valores elevados de FC basal. (Fig. 8, Tabela 2).

Após a coleta dos valores basais de PAM e FC os animais foram submetidos ao paradigma de CSS por um período de 10 minutos. Apesar de não haver diferenças nos valores basais de PAM, durante o CSS o grupo controle apresentou reatividade ao estresse com elevação da PAM, enquanto os resultados mostram que a resposta pressórica ao estresse agudo foi claramente suprimida nos animais pós hemorragia quando comparada ao grupo SalCI – sal (Fig. 9A e B).

A manobra de CSS produziu uma taquicardia sustentada durante todo o período de estresse, que, mesmo com valores basais de FC muito diferentes, foi de magnitude e perfil similar entre os grupos, (Fig. 10 A e B).

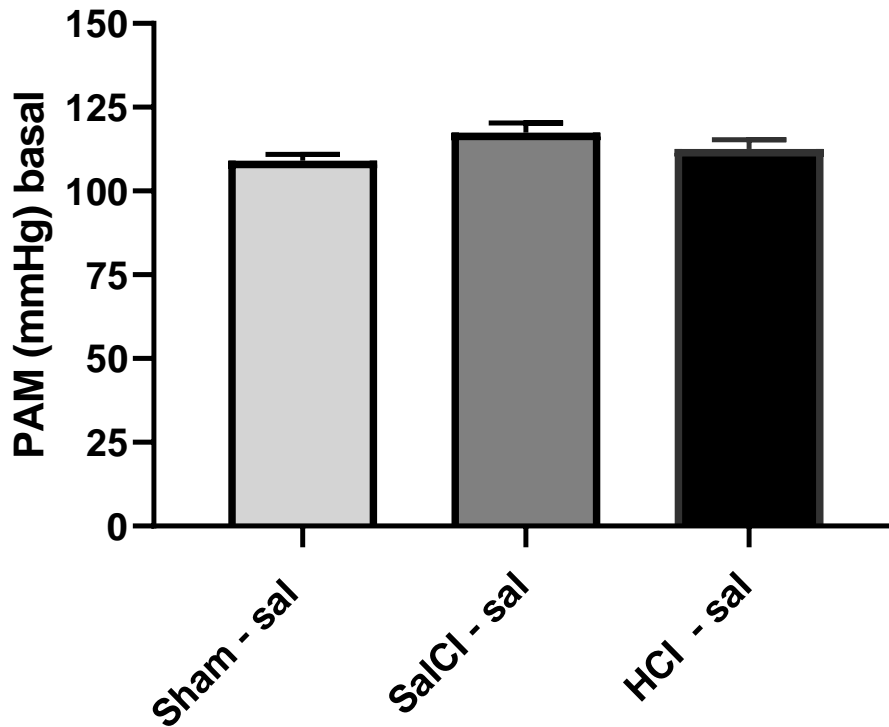


Figura. 7 – Valores basais de PAM em ratos submetidos à hemorragia experimental no CI.

GRUPOS	PAM (mmHg)
Sham – sal	108,7 ± 4,4
SalCI – sal	119,4 ± 10,9
HCl – sal	109,3 ± 10,2

Tabela 1 – Valores basais de PAM em ratos submetidos à hemorragia experimental no CI; comparação entre os grupos controle (vide métodos para detalhes).

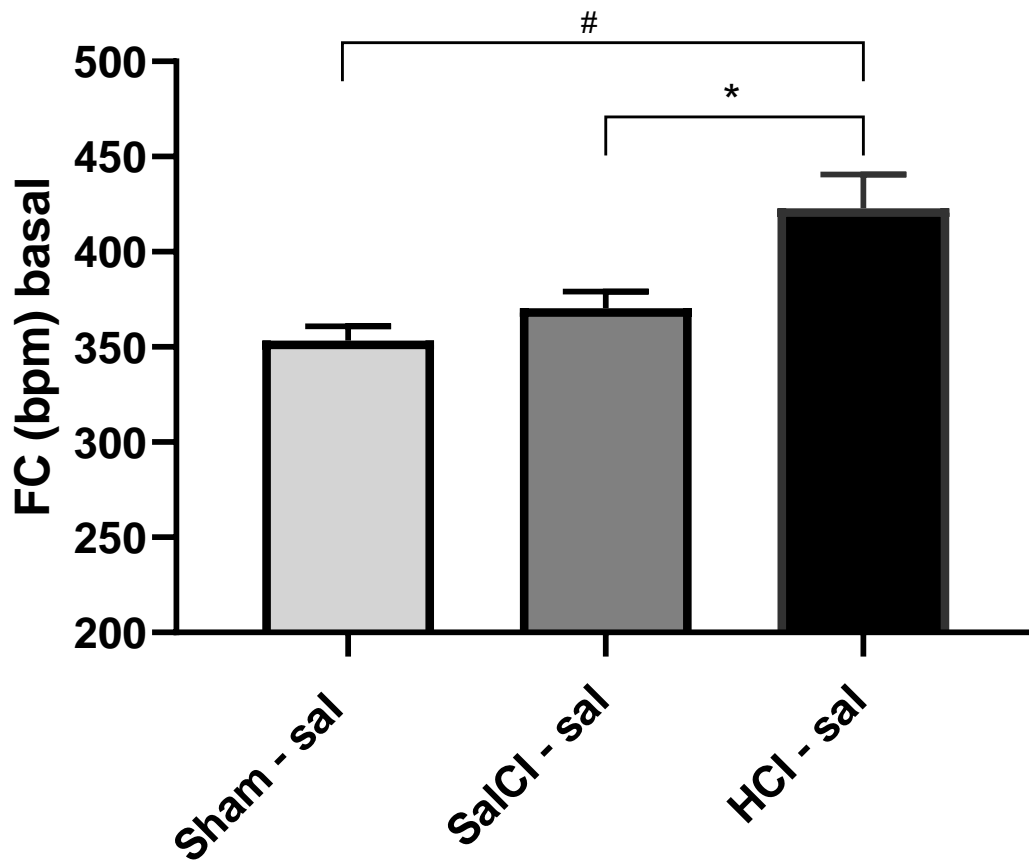


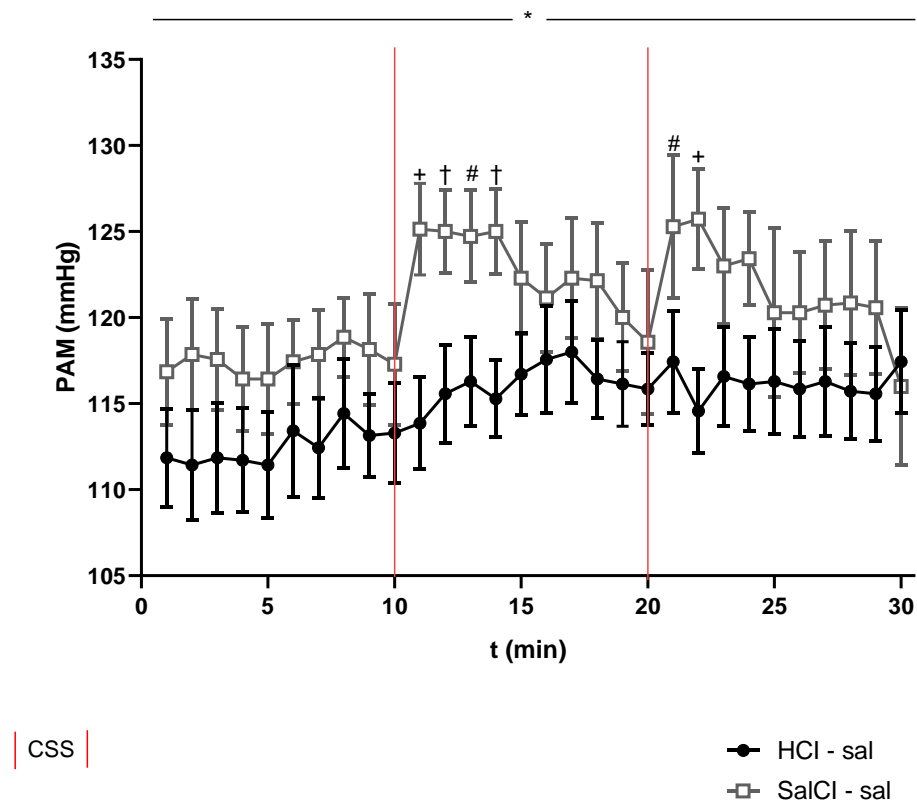
Figura. 8 – Valores basais de FC em ratos submetidos à hemorragia experimental no CI, comparação com respectivos grupos controle (vide métodos para detalhes). HCl – sal e Sham – sal  $#p < 0,05$ , HCl – sal e SalCI – sal  $*p < 0,05$  – ANOVA – one way.

GRUPOS	FC (bpm)
Sham – sal	351,2 ± 17,8
SalCI – sal	336,25 ± 31,85
HCl – sal	439,95 ± 68,65*

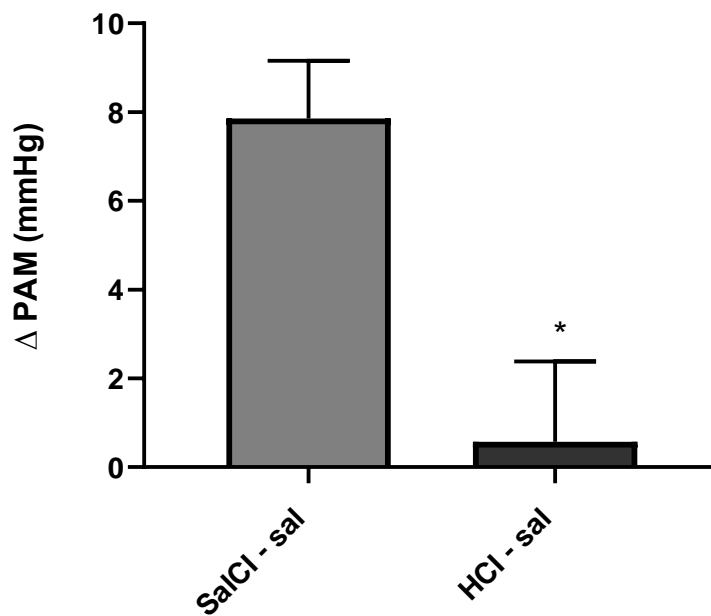
Tabela 2 – Valores basais de FC em ratos submetidos à hemorragia experimental no CI, comparação entre os grupos controle (vide métodos para detalhes).  $*P < 0.05$  vs Sham-Sal e SalCI.



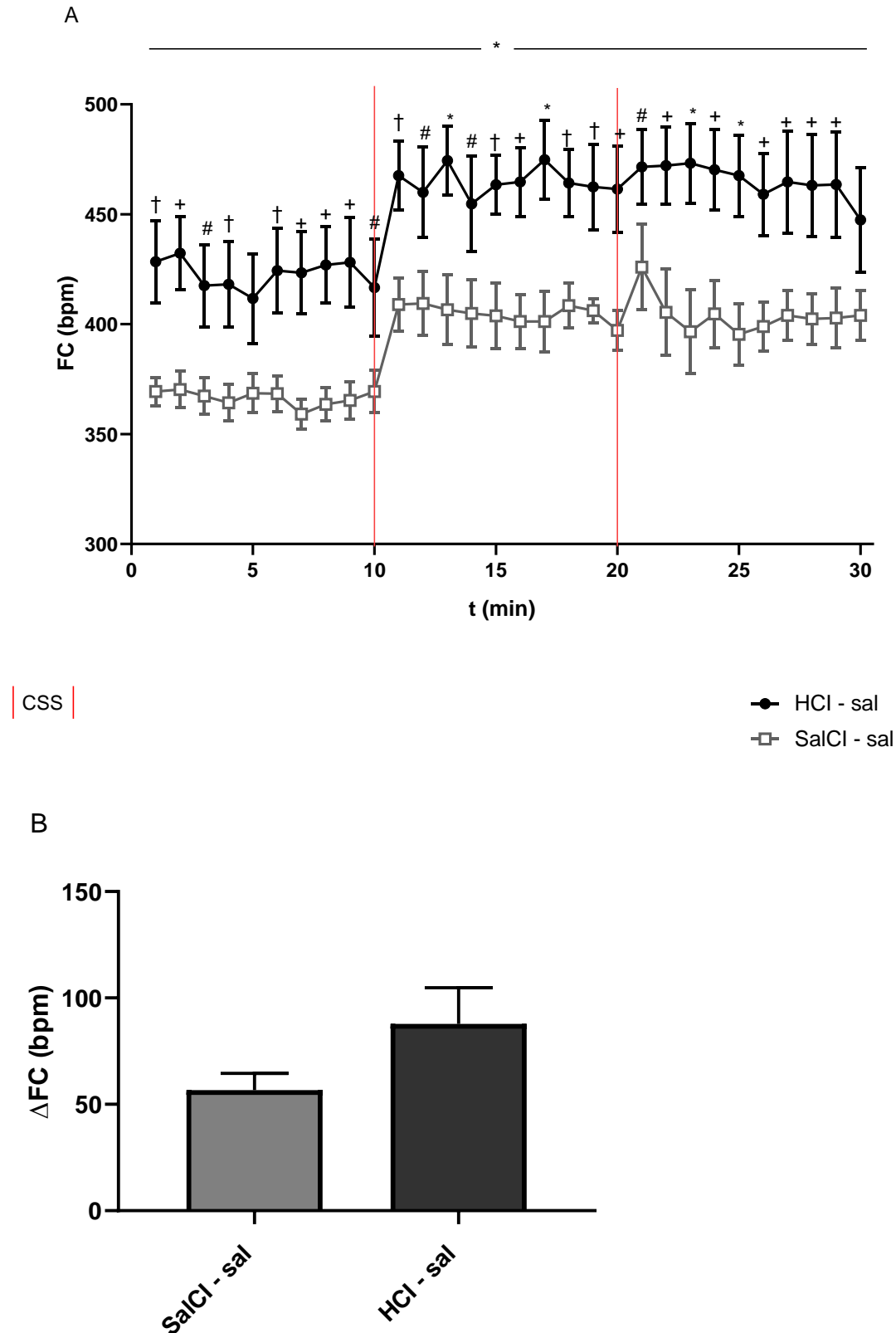
A



B



Figuras: 9A – PAM em mmHg por tempo em minutos: valores coletados no período de 30min, sendo de 0 – 10 min. valores basais, 10 – 20 min valores da reatividade cardíaca ao estresse agudo avaliada pelo Cage Switch Stress (CSS), 20 – 30 min valores de recuperação após o CSS, grupos: HCl – sal e SalCl – sal, ambos com n=7. ANOVA Two Way com pós teste Bonferroni com # $p < 0,05$ , + $p < 0,0009$ , \* $p < 0,0001$  e † $p < 0,005$ . e 9B – Delta PAM (mmHg) com \* $p < 0,05$ .

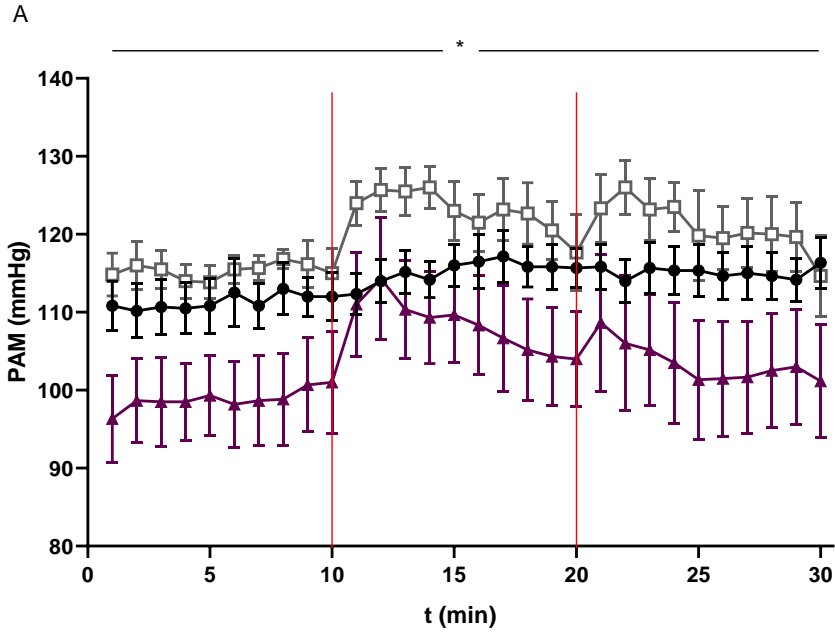


Figuras: 10A – FC em bpm (beats per minute) por tempo em minutos: valores coletados no período de 30min, sendo de 0 – 10 min valores basais, 10 – 20 min valores da reatividade cardíaca ao estresse agudo avaliada pelo Cage Switch Stress (CSS), 20 – 30 min valores de recuperação após o CSS, grupos: HCl – sal e SalCl – sal, ambos com n=7. ANOVA Two Way com pós teste Bonferroni com #p<0,05, †p<0,0009, \*p<0,0001 e †p<0,005 10B – Delta FC (bpm).

## 5.2 – RESULTADO PROTOCOLO 2 – OBJETIVO: AVALIAR O PERFIL CARDIOVASCULAR APÓS A HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CI DE RATOS TRATADOS COM LOSARTAN (BLOQUEADOR AT<sub>1</sub>).

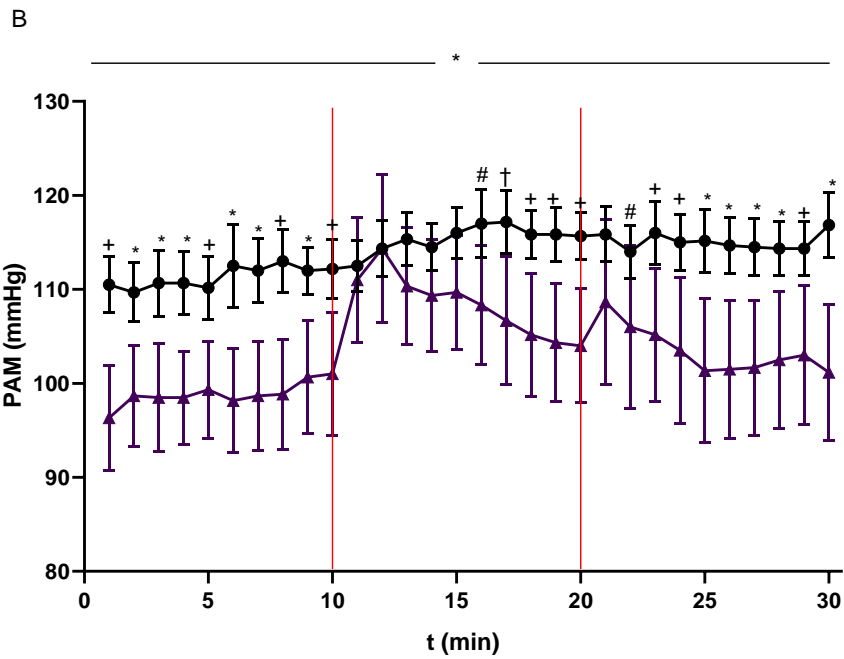
O tratamento com losartan ip reduziu os valores basais de PAM (alterações médias máximas antes  $111,33 \pm 1,66$  mmHg vs  $98,66 \pm 2,33$  após losartan;  $P < 0,0001$ ) (Fig. 11A e B). Adicionalmente, o tratamento com losartan restaurou a reatividade pressórica ao estresse.

Interessantemente, observamos que o tratamento com losartan ip recuperou completamente os valores basais de FC que se apresentavam elevados após a hemorragia no CI (alterações médias máximas antes  $428,25 \pm 10,08$  bpm vs  $357,75 \pm 7,42$  após losartan;  $P < 0,0001$ ). Não houve diferença significativa na reatividade cardíaca ao estresse (CSS), entre o grupo HCl – sal e HCl – los, Entretanto a recuperação cardíaca pós reatividade ao estresse agudo com losartan produziu um efeito similar ao observado em ratos que receberam salina no CI (Fig. 12A e B e C).



CSS

● HCl - sal  
 ▲ HCl - los  
 □ SalCl - sal

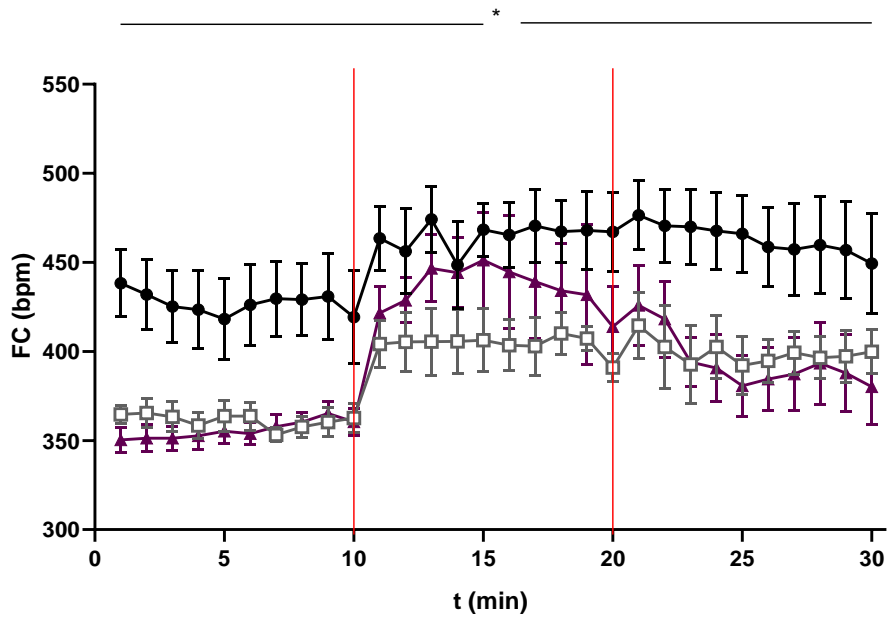


CSS

● HCl - sal  
 ▲ HCl - los

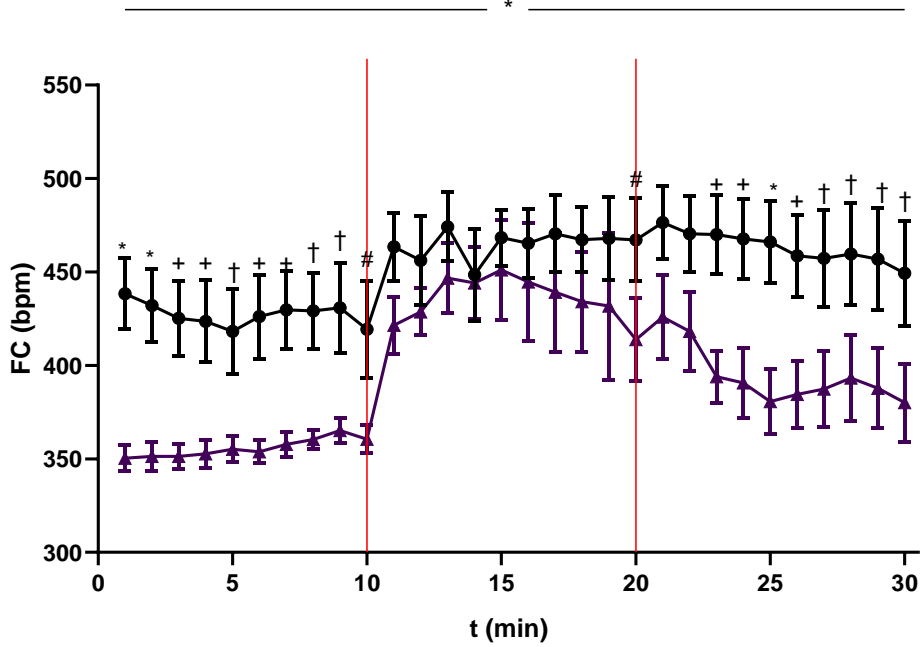
Figuras: 11A e B – PAM em mmHg por tempo em minutos. Valores coletados no período de 30min, sendo de 0 – 10 min valores basais, 10 – 20 min valores da reatividade cardíaca ao estresse agudo avaliada pelo Cage Switch Stress (CSS), 20 – 30 min valores de recuperação após o CSS, animais tratados com salina 0,9% ou losartan 10 mg/kg ip grupos: HCl – sal e HCl – los, 11A (valores comparados ao grupo controle SalCl – sal) todos com n=6. ANOVA Two Way com pós teste Bonferroni com #p<0,05, †p<0,0009, \*p<0,0001 e ‡p<0,005.

A

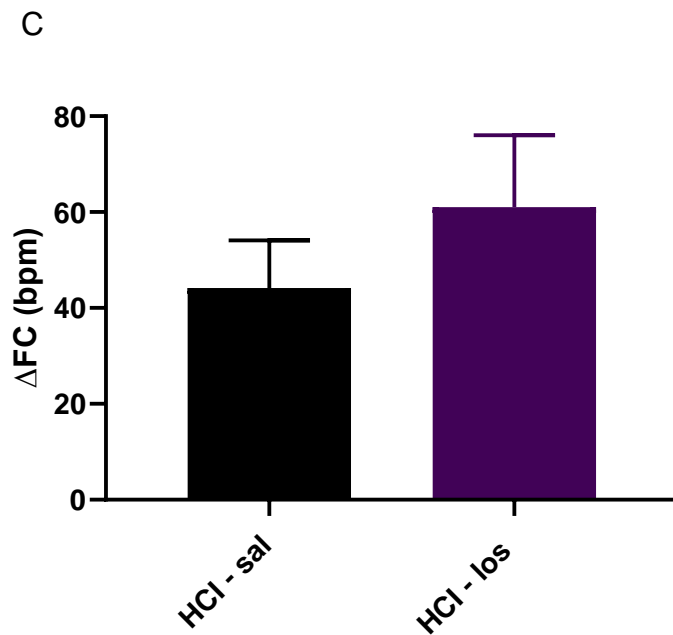


CSS

B



CSS

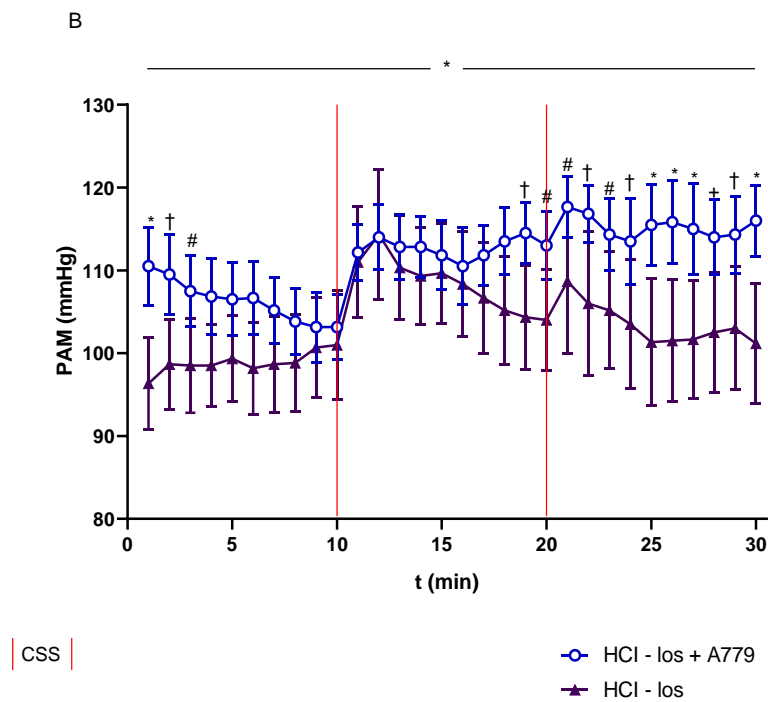
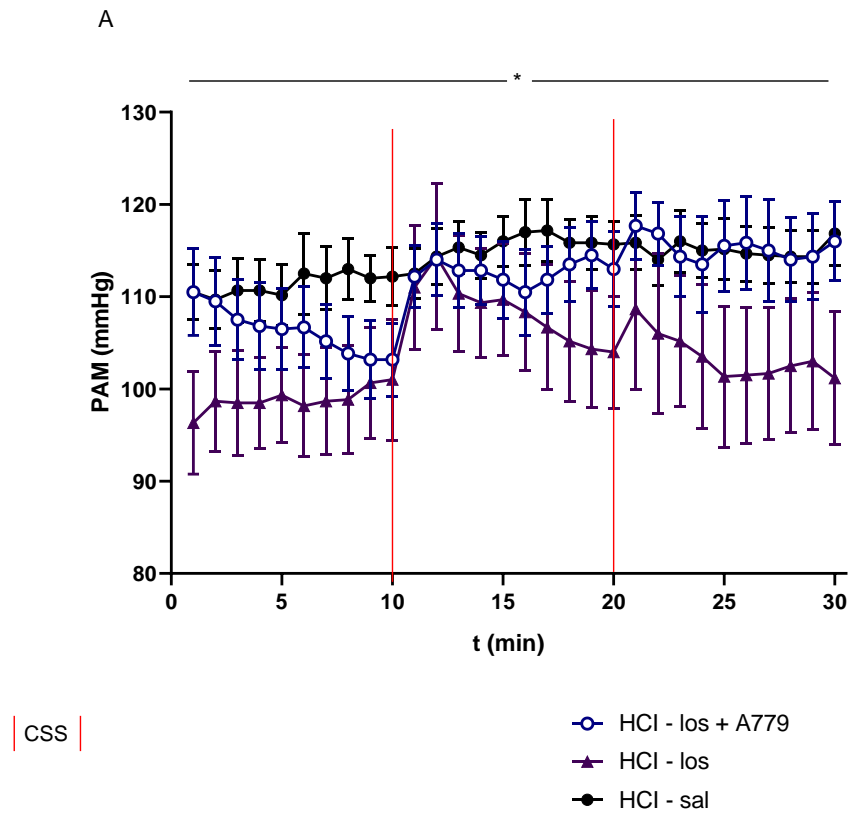


Figuras: 12A e B – FC bpm por tempo em minutos. Valores coletados no período de 30min, sendo de 0 – 10 min valores basais, 10 – 20 min valores da reatividade cardíaca ao estresse agudo avaliada pelo Cage Switch Stress (CSS), 20 – 30 min valores de recuperação após o CSS, animais tratados com salina 0,9% ou losartan 10 mg/kg ip grupos: HCl – sal e HCl – los, 12A (valores comparados ao grupo controle SalCl – sal) todos com n=6. ANOVA Two Way com pós teste Bonferroni com #p<0,05, +p<0,0009, \*p<0,0001 e †p<0,005. 12C – Delta FC (bpm).

5.3 – RESULTADO PROTOCOLO 3. – OBJETIVO: AVALIAR O PERFIL CARDIOVASCULAR APÓS A HEMORRAGIA EXPERIMENTAL NO CI DE RATOS TRATADOS COM LOSARTAN (BLOQUEADOR AT1) APÓS ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA DE A-779 (BLOQUEADOR MAS).

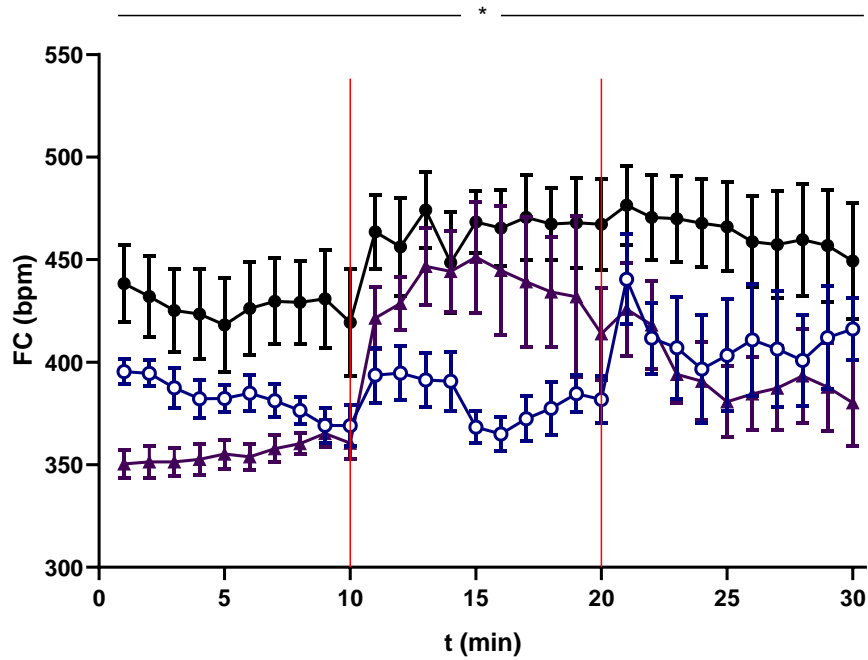
A fim de verificar a contribuição dos receptores Mas nos efeitos produzidos pelo losartan, um grupo separado de animais recebeu injeção subcutânea do antagonista A-779, 30 min antes da administração de losartan ip. A-779 reverteu todos os efeitos cardiovasculares produzidos pelo losartan nos ratos HCl. Elevou os níveis basais de PA e FC, e produziu um efeito pressor mais prolongado na reatividade cardiovascular ao estresse. A resposta de taquicardia ao estresse foi suprimida em presença do A-779 (alterações médias máximas antes  $432,5 \pm 18,66$  vs após  $379,83 \pm 14,83$ ) (Fig. 13 A e B e Fig. 14 A e B).

Principais resultados sumarizados, de acordo com os grupos e as variáveis observadas (Tabela 3).



Figuras: 13A e B – PAM em mmHg por tempo em minutos. Valores coletados no período de 30min, sendo de 0 – 10 min valores basais, 10 – 20 min valores da reatividade cardíaca ao estresse agudo avaliada pelo Cage Switch Stress (CSS), 20 – 30 min valores de recuperação após o CSS, animais tratados com salina 0,9% ou losartan 10 mg/kg ip grupos: HCl – los e HCl – los + A-779, 13A (valores comparados ao grupo HCl – sal) todos com n=6. ANOVA Two Way com pós teste Bonferroni com #p<0,05, +p<0,0009, \*p<0,0001 e †p<0,005.

A



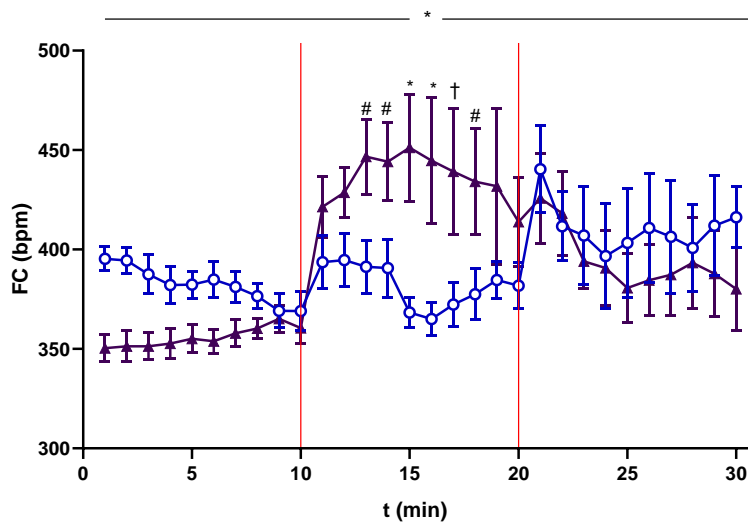
CSS

○ HCl - los + A779

▲ HCl - los

● HCl - sal

B



CSS

○ HCl - los + A779

▲ HCl - los

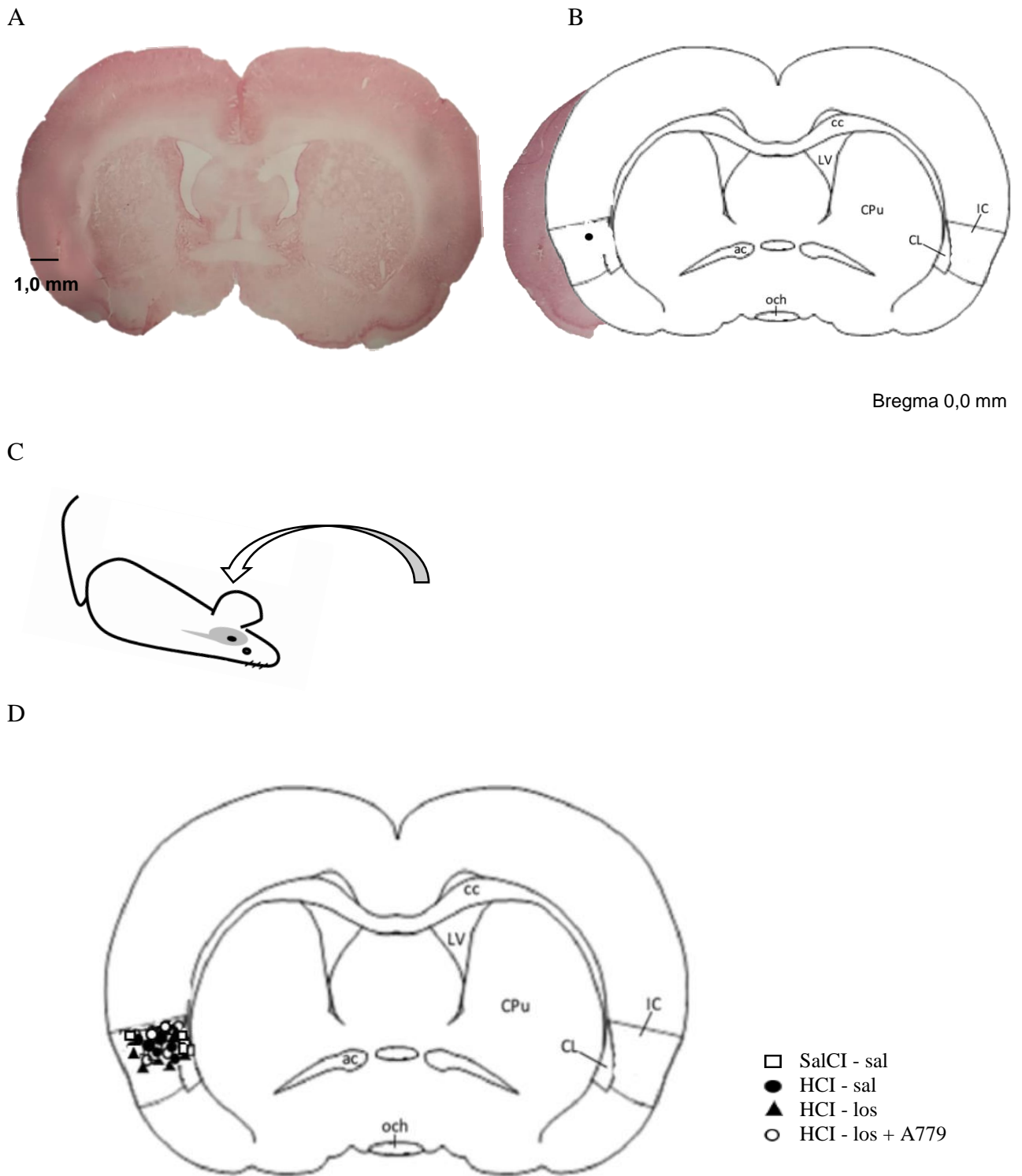
Figuras: 14A e B – FC bpm por tempo em minutos. Valores coletados no período de 30min, sendo de 0 – 10 min valores basais, 10 – 20 min valores da reatividade cardíaca ao estresse agudo avaliada pelo Cage Switch Stress (CSS), 20 – 30 min valores de recuperação após o CSS, animais tratados com salina 0,9% ou losartan 10 mg/kg ip grupos: HCl – los e HCl – los + A-779, 14A (valores comparados ao grupo HCl – sal) todos com n=6. ANOVA Two Way com pós teste Bonferroni com #p<0,05, +p<0,0009, \*p<0,0001 e †p<0,005.



<b>Abordagens</b> / <b>Variável</b>	<b>PAM basal</b>	<b>FC basal</b>	<b>Reatividade pressórica ao estresse</b>	<b>Reatividade cardíaca ao estresse</b>
Hemorragia experimental no CI	Não alterou	Aumentou	Abolida	Apresentou
Hemorragia experimental no CI Tratamento Losartan ip	Diminuiu	Restaurada para o basal	Restaurada	Mantida
Hemorragia experimental no CI Tratamento A-779 sc + Losartan ip	Aumentou	Aumentou	Mantida	Diminuída

Tabela 3 – Resumo dos resultados obtidos, de acordo com a abordagem e as variáveis observadas.

## 5.4 – RESULTADO – HISTOLOGIA



Figuras: 15A – Foto histologia, mostrando um exemplo da área de nanoinjeção do sangue para indução da hemorragia experimental no CI, 15B – local aproximado do sítio de injeção, visto na figura do atlas. 15C – Desenho esquemático mostrando região da hemorragia no CI direito do rato. 15D – Mapa das injeções no CI, os símbolos representam os pontos de injeção, alguns se sobrepõem, imagem conforme Atlas Paxinos e Watson, 2004.

## 6 – DISCUSSÃO

Os principais resultados deste trabalho mostram que a hemorragia experimental no CI direito de ratos, não alterou significativamente os valores basais da PAM, porém leva a um aumento na FC basal dos animais. O tratamento com losartan (bloqueador AT<sub>1</sub>) restaurou os valores de FC aos níveis basais e adicionalmente diminuiu os valores da pressão arterial basal. Os efeitos produzidos pelo losartan foram abolidos quando o tratamento foi associado ao A-779, antagonista do receptor Mas.

O presente estudo reitera a relevância do modelo de acidente vascular no CI de ratos implantado em nosso laboratório que reproduz os resultados de importantes alterações cardíacas no CI particularmente quando estas ocorrem no hemisfério direito (Marins et al., 2020). Em ratos, as ectopias cardíacas resultantes de lesão ou estimulação no CI direito estão relacionadas ao aumento da atividade simpática (Nagai et al., 2021). Em humanos foram observadas alterações cardíacas após lesões no CI, geradas por desequilíbrio autonômico (Sörös and Hachinski, 2012) ou estimulações no CI de pacientes epiléticos que também resultam taquicardia devido ao aumento da atividade simpática (Chouchou et al., 2019). O modelo de AVE hemorrágico, foi focal, utilizando sempre as mesmas coordenadas estereotáticas, atingindo o CI com o mesmo volume de sangue. Portanto, podemos supor que a região afetada é muito semelhante para todos os ratos. Além disso, esse modelo de hemorragia mostra-se interessante útil para explorar os mecanismos centrais e a fisiopatologia que envolvem um acidente vascular não só no CI (Marins et al., 2021; Nagai et al., 2021), mas para outras áreas do SNC onde efeitos de AVE mais localizados precisam ser estudados.

Inicialmente utilizamos um grupo controle adicional, grupo sham, conforme descrito no item 3.4.1, descrito na metodologia. O grupo sham não recebeu nenhum veículo ou sangue no CI, nem mesmo qualquer introdução da agulha da injetora na região, apenas o mesmo procedimento de estereotaxia com a abertura do crânio nas mesmas coordenadas do bregma. Apesar de não receber nenhum volume no CI como o grupo SalCI que recebeu salina na região determinada, não observamos diferenças significativas nos registros dos parâmetros cardiovasculares entre os dois grupos. Optamos por continuar com o grupo SalCI por receberem o mesmo volume de salina estéril na região onde o grupo hemorragia recebeu sangue, seguindo assim, procedimentos anteriores de nosso laboratório utilizados por Marins e colaboradores cujo grupo controle também recebeu 200 nl de salina estéril no CI (Marins et al., 2020). Marins e colaboradores adicionaram ainda um grupo controle que recebeu 200 nl de plasma na região,

cujos resultados não foram significativamente diferentes do grupo que recebeu salina. Isso sugere que a cirurgia em si, bem como o volume da injeção não alteram os resultados, mostrando que há uma provável ação dos elementos do sangue, como por exemplo, o ferro (Fe). Estudos mostram o aumento dos níveis de metais, como o Fe após AVE hemorrágico, associado a aumento do estresse oxidativo e consequente morte neuronal (Dayani et al., 2004; Karadas et al., 2014).

Os resultados mostram que a hemorragia experimental no CI, por si não apresentou alterações significantes nos valores basais de PAM. Vale ressaltar que, embora nossos registros tenham sido realizados 72h após a hemorragia experimental, Marins e colaboradores também não observaram significante alteração na PAM nos primeiros 10 min de registro, nem 24 ou 48h após HCI, sugerindo um mecanismo compensatório concomitante, de diminuição da atividade simpática renal, mediado possivelmente pela atividade barorreflexa, cuja função está intacta ainda em ratos normotensos adultos jovens (com a idade próxima a dos animais deste presente estudo) (Marins et al., 2020, 2021). Os dados do presente estudo, em conjunto com as observações de Marins e colaboradores, sugerem que, pelo menos até 72h, mecanismos compensatórios mantêm a PA em níveis estáveis mesmo com o aumento da atividade simpática cardíaca. Entretanto, como discutido mais adiante no nosso teste de reatividade ao CSS, veremos que pode haver retroalimentação positiva envolvendo outras áreas centrais, como hipotálamo dorso medial e NTS (Fontes et al., 2014).

O tratamento com losartan diminuiu significativamente a PAM basal dos ratos submetidos a HCI, não sendo porém esse efeito observado quando losartan foi administrado com A-779. Em estudo prévio, ratos normotensos tratados durante 10 dias com losartan mostraram diminuição de 30mmHg na PAM, e quando A-779 e losartan foram administrados juntos, a mesma resposta não aconteceu, sugerindo, mais uma vez, uma interação funcional entre a ação do losartan e Ang-(1-7) via receptor Mas (Collister and Hendel, 2003). De Castro e colaboradores observaram o efeito vasodilatador mediado por Ang-(1-7) via receptor Mas, em baixas concentrações, ao bloquear o receptor  $AT_1$  em camundongos. Enquanto Souza e colaboradores mostraram que o bloqueio do receptor  $AT_1$  restaurou completamente a vasodilatação coronária induzida por Ang-(1-7) em corações hipertróficos de ratos. (de Castro et al., 2005; Souza et al., 2013). Em conjunto, os dados do presente estudo e de estudos anteriores sugerem que o efeito sobre a PA produzido pelo losartan pode em parte envolver efeitos vasculares mediados pelo receptor Mas. Alternativamente, parte deste efeito poderia envolver a função cardíaca, visto que losartan também restaurou a FC aos valores basais,

sabendo-se que a PA depende da resistência periférica e do débito cardíaco, entendemos assim, que a pressão pode diminuir concomitantemente com a diminuição da FC (Ackermann, 2004).

Uma taquicardia sustentada com valores de FC acima dos valores basais foi observada após HCI no CI direito. Estes resultados confirmam estudos recentes de nosso laboratório, realizados por Marins e colaboradores que também observaram taquicardia sustentada em animais com hemorragia no córtex insular, e este efeito foi maior após HCI do lado direito. Neste mesmo estudo, Marins e colaboradores mostraram que a injeção intravenosa de  $\beta 1$  antagonista do receptor adrenérgico, atenolol, restaurou a FC para valores basais, confirmando a contribuição da atividade simpática no processo. Adicionalmente, nosso grupo já havia demonstrado que a taquicardia resultante da estimulação glutamatérgica (NMDA) nas mesmas coordenadas, também eram mediadas por aumento da atividade simpática cardíaca (Marins et al., 2016a, 2020). Estudos prévios em ratos, semelhantemente, registraram taquicardia, após estimulação ou lesão no CI direito, mediada por aumento na atividade simpática (Nagai et al., 2010; Oppenheimer and Cechetto, 2016). Estimulação, lesão ou acidente vascular no CI em humanos, resultaram em arritmias cardíacas, e respostas taquicárdicas sustentadas pelo aumento da atividade simpática (Oppenheimer and Cechetto, 2016; Chouchou et al., 2019).

O principal novo resultado encontrado neste estudo foi a demonstração de que o tratamento com losartan nos animais com HCI restaurou a FC aos valores basais. Losartan age bloqueando o receptor  $AT_1$  inibindo a ação da Ang II (Xu et al., 2009). Adicionalmente, observamos que quando losartan foi administrado juntamente com A-779, os efeitos sobre a FC foram abolidos. A taquicardia observada em ratos nos estudos recentes em nosso laboratório apresentou aumento progressivo e já significativo 10 min após a HCI, sendo o valor máximo registrado 24 horas após e sustentado até 48 horas após a hemorragia (Marins et al., 2020). No presente estudo, estendemos essas observações mostrando que a FC permanece elevada mesmo 72 horas após a HCI. Os valores de FC foram restaurados depois de três dias de tratamento com losartan e o efeito abolido com o tratamento losartan e A-779. É razoável supor que ao bloquear o receptor  $AT_1$ , a Ang II disponível, através da ECA2, converte-se em Ang-(1-7), beneficiando o sistema com seus efeitos, via receptor Mas. Importante ressaltar que estudo anterior de nosso laboratório, Lima e colaboradores mostraram que Ang-(1-7) pode atenuar a taquicardia resultante do estresse agudo, mediada essencialmente pelo aumento da atividade simpática cardíaca e, a taquicardia induzida pelo isoproterenol, sugerindo uma ação da Ang-(1-7) em receptores beta-adrenérgicos (Lima et al., 2013). Assim o tratamento com losartan estaria interferindo também com a ação também da Ang-(1-7) (Collister and Hendel, 2003). Estudos com preparações diferentes também mostraram que losartan reduziu a FC basal e esse efeito foi

abolido pelo tratamento com A-779, reforçando uma possível interferência do losartan em uma ação regulatória cronotrópica mediada por Ang-(1-7). Estudos clínicos mostraram que uma terapia de losartan de 12 semanas melhorou significativamente a VFC e a turbulência da frequência cardíaca em pacientes com insuficiência cardíaca (Özdemir et al., 2007). Adicionalmente, dados de um estudo com bloqueador AT<sub>1</sub>, cujo tratamento foi 7 dias após AVE isquêmico resultou em melhora no prognóstico, diminuição da morbidade e mortalidade dos pacientes, mostrando que quanto mais cedo o bloqueio do receptor de Ang II, melhor os efeitos e benefícios (Schrader et al., 2003).

Como resultado da reatividade cardíaca ao estresse agudo ocorrem aumento na FC e na PA (Huang et al., 2013) devido ao aumento acentuado na atividade do SNS, que ao aumentar a FC, aumenta o tônus vasomotor, resultando em alterações na função renal e aumento na PA (Dampney et al., 2002). Conforme esperado, no presente estudo, o paradigma do estresse por mudança de ambiente – CSS resultou em taquicardia sustentada. Em estudos recentes do nosso laboratório, Cunha e colaboradores mostraram que a taquicardia produzida em ratos durante CSS, foi completamente abolida em animais previamente tratados com antagonista beta-adrenérgico, atenolol, indicando contribuição das eferências simpáticas do coração na resposta ao estresse agudo (Cunha Silva and Fontes, 2019). Da mesma maneira, conforme já discutido, injeções de atenolol restaurou a taquicardia aos níveis basais no trabalho de Marins e colaboradores. (Marins et al., 2020).

Embora não tenhamos observado alteração nos valores basais de PAM entre os grupos HCI e SalCI (controle), a resposta pressórica ao estresse agudo foi claramente suprimida no grupo HCI quando comparada ao controle (deltas diferentes). Este tamponamento da resposta pressora sugere uma possível alteração do tônus autonômico vasomotor. Zhang e colaboradores já haviam demonstrado envolvimento da ínsula no controle da PA e sensibilidade do barorreflexo, observando que o hemisfério posterior direito do CI regula o tônus simpático cardíaco e vasomotor em animais anestesiados (Zhang et al., 1998), Saleh e colaboradores mostraram que o CI de ratos está envolvido na modulação da sensibilidade do barorreflexo (Saleh and Connell, 1998). Fontes e colaboradores mostraram a contribuição do hipotálamo dorso medial (HDM) como mediador da atividade simpática cardíaca no estresse emocional envolvendo o NTS e RVLM, para controlar a PA, em estudos com ratos (Fontes et al., 2014), portanto, o impacto de uma lesão no CI pode gerar alteração na rede de controle autonômico, gerando uma retroalimentação positiva, uma vez que o CI faz conexões com o HDM, amígdala, NTS, RVLM e outras áreas centrais envolvidas no controle simpático cardíaco (Napadow et al., 2008; Nagai et al., 2010). Em humanos, lesões insulares do lado direito mostraram

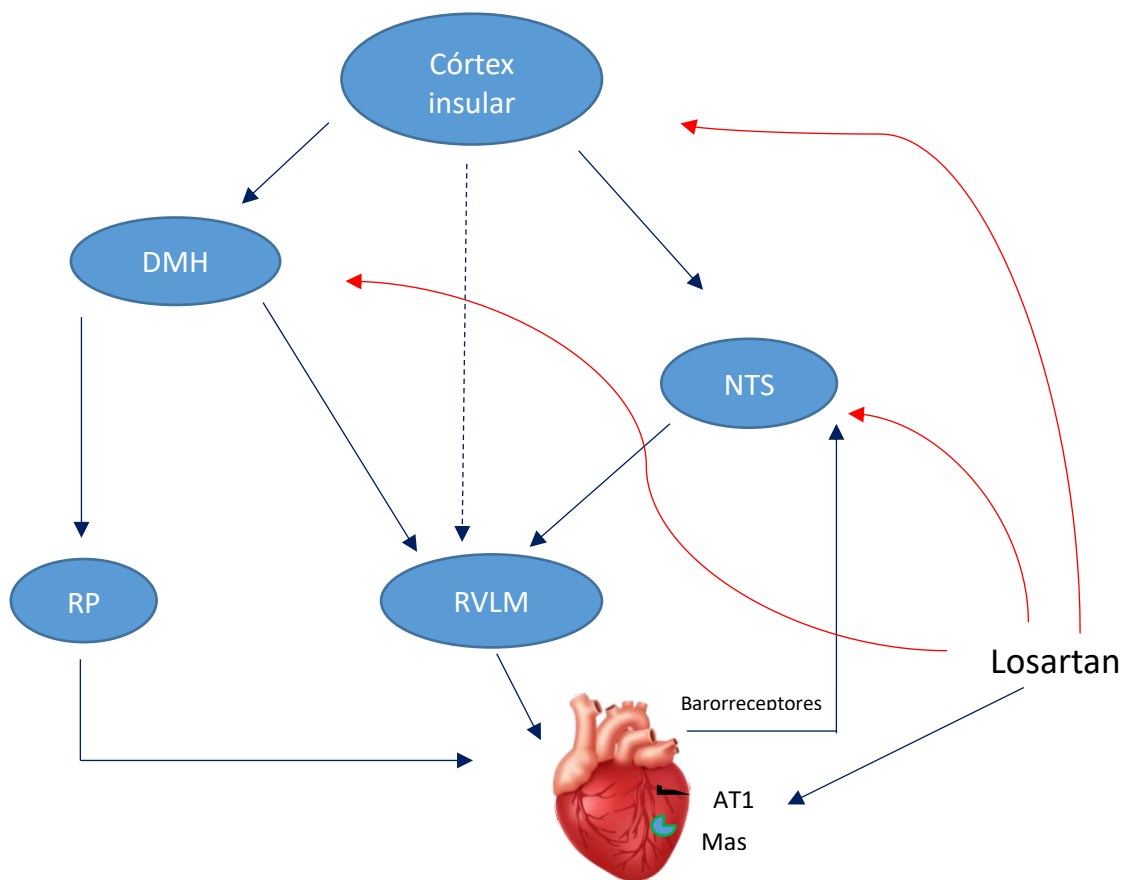
implicação na modulação autonômica cardíaca com desarranjo da função cardíaca pós AVE (Colivicchi et al., 2004). Além disso, um estudo de imagem (ressonância magnética com contraste) em humanos conscientes avaliando as regiões do cérebro associadas com pressão negativa do corpo inferior induzida pelo controle barorreflexo, mostrou envolvimento da ínsula, através do aumento e diminuição na atividade neural do CI lado direito durante descargas do barorreceptor (Kimmerly et al., 2005).

O tratamento com losartan não alterou significativamente a FC durante reatividade cardíaca ao CSS, confirmado nos valores de delta. Estudo recente com ratos Wistar mostrou que o aumento da FC induzido por estresse agudo de contenção não foi afetado por losartan (do Vale et al., 2020). Por outro lado, losartan restaurou a resposta pressórica à reatividade nos animais com HCI. Acreditamos que o tratamento com losartan promove uma reorganização autonômica cardiovascular, além de melhorar o controle do barorreflexo. Sabharwal e colaboradores mostraram que losartan, melhorou a regulação autonômica em camundongos com distrofia muscular (Sabharwal and Chapleau, 2014). Estudos com ratos hipertensos mostraram que o tratamento com losartan melhorou o controle do barorreflexo (Santos et al., n.d.) e em pacientes hipertensos, tratamento com losartan diminuiu a atividade simpática e melhorou a sensibilidade dos barorreceptores cardíacos (Bécher et al., 2005).

O tratamento com losartan e A-779, surpreendentemente atenuou a FC à reatividade cardíaca durante o CSS. Estudos mostram diminuição da taquicardia durante estresse agudo com aumento da Ang-(1-7). Em preparações diferentes com animais transgênicos, a superexpressão crônica da Ang-(1-7) endógena atenuou a resposta de taquicardia na reatividade ao estresse agudo, o que foi abolido com A-779 (Santos et al., 2017). Neste estudo, porém o bloqueio do receptor Mas por A-779 não resultou em aumento da taquicardia durante o CSS. Na PAM a reatividade foi mantida no tratamento com losartan e A-779, da mesma forma que com losartan sozinho.

Embora nossos resultados indiquem claramente uma interação entre os efeitos do losartan e o receptor Mas sobre os parâmetros cardiovasculares dos animais HCI, novos estudos serão necessários para melhor compreensão dos mecanismos de ação envolvidos. Estudos com marcadores moleculares são importantes para verificar a ação do losartan diretamente no coração ou uma possível ação central, Fig.16. Marins e colaboradores mostraram alterações moleculares pós-HCI nos miócitos, com diminuição do  $Ca^{+2}$  transiente e menor expressão de SERCA nos animais com hemorragia no CI direito (Marins et al., 2020). Entretanto ainda é necessário investigar, no período avaliado, a área afetada pela hemorragia, a região de penumbra e inflamação, o que pode ajudar a revelar uma possível ação central do losartan nesta

abordagem. Recentes estudos em ratos SHR mostraram que losartan pós-AVE hemorrágico interrompeu hematoma e expansão do edema, bem como o aumento do cérebro e herniação (Smeda et al., 2018), adicionalmente losartan demonstra ser uma droga neuroregenerativa e neuroprotetora em situações de hemorragia cerebral (Zhang et al., 2012; Friedman et al., 2014; Wanderer et al., 2020).



Figuras: 16 – Esquema mostrando as principais conexões entre o CI e a rede de controle simpática cardíaca. O tratamento com losartan (bloqueador  $AT_1$ ) e sua ação associada ao receptor Mas no coração. Uma possível ação central de losartan, nos núcleos de importância na regulação do tônus autonômico, representada pelas setas vermelhas, necessita ser investigada.



## 7 – CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo confirmam achados anteriores, incluindo pesquisas realizadas no nosso laboratório, conforme já descrito por (Marins et al., 2020), mostrando que a HCI intermediário produziu elevação nos valores basais de FC não havendo, entretanto, diferença significativa nos valores basais de PAM. Mesmo resultando em valores de FC elevados a hemorragia no CI não alterou a reatividade autonômica cardíaca ao estresse, por outro lado produziu um tamponamento na resposta pressora que sugere uma possível alteração do barorreflexo e concomitantemente do tônus autonômico vasomotor.

O tratamento com losartan restaurou a FC para os valores normais, produziu uma redução nos valores basais da PAM dos animais e restaurou a reatividade autonômica ao estresse, sugerindo uma reorganização do controle autonômico cardiovascular nos animais HCI. O bloqueio do receptor Mas, por A-779 associado ao tratamento com losartan aboliu os resultados obtidos apenas com losartan. Estes resultados apontam para uma interação entre losartan e o receptor Mas.

Nossos dados sugerem envolvimento importante dos receptores  $AT_1$  na mediação do controle autonômico após hemorragia experimental no CI do lado direito, além de mostrar uma evidente participação dos receptores Mas na ação do tratamento com losartan e seus efeitos, reduzindo o impacto da exacerbação da atividade simpática cardíaca observada pós hemorragia. O presente estudo sugere losartan como uma possível terapêutica futura para pacientes com acidente vascular no CI, a fim de minimizar o risco cardiovascular.

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackermann U (2004) Regulation of arterial blood pressure. *Surgery (Oxford)* 22:120a–120f.

Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE (1993) Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 24:35–41.

Adamson J, Beswick A, Ebrahim S (2004) Is stroke the most common cause of disability? *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 13:171–177.

Aggarwal G, Lippi G, Michael Henry B (2020) A doença cerebrovascular está associada a um aumento da gravidade da doença em pacientes com Doença por Coronavírus 2019 (COVID-19): Uma análise agrupada da literatura publicada. *International Journal of Stroke* 15:385–389.

Allen GV, Saper CB, Hurley KM, Cechetto DF (1991a) Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 311:1–16.

Allen GV, Saper CB, Hurley KM, Cechetto DF (1991b) Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 311:1–16.

Anon (n.d.) WHO EMRO | Stroke, Cerebrovascular accident | Health topics. Available at: <http://www.emro.who.int/health-topics/stroke-cerebrovascular-accident/index.html> [Accessed February 1, 2019a].

Anon (n.d.) Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association. Available at: <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/CIR.0000000000000757> [Accessed January 26, 2021b].

Anon (n.d.) Global\_burden\_of\_stroke\_27.11.2017.pdf. Available at: [https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/159894/1/Global\\_burden\\_of\\_stroke\\_27.11.2017.pdf](https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/159894/1/Global_burden_of_stroke_27.11.2017.pdf) [Accessed May 26, 2021c].

Arroja MMC, Reid E, McCabe C (2016) Therapeutic potential of the renin angiotensin system in ischaemic stroke. *Experimental & Translational Stroke Medicine* 8:8.

Baier B, zu Eulenburg P, Geber C, Rohde F, Rolke R, Maihöfner C, Birklein F, Dieterich M (2014) Insula and sensory insular cortex and somatosensory control in patients with insular stroke: Insula and sensory. *European Journal of Pain* 18:1385–1393.

Bécher M, Enseleit F, Chenevard R, Lüscher TF, Noll G (2005) Effect of losartan on muscle sympathetic activity and baroreceptor function in systemic hypertension. *The American Journal of Cardiology* 95:129–131.

Benjamin EJ et al. (2019) Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 139 Available at: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000659> [Accessed January 26, 2021].

Bennion DM, Haltigan EA, Irwin AJ, Donnangelo LL, Regenhardt RW, Pioquinto DJ, Purich DL, Summers C (2015) Activation of the Neuroprotective Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Rat Ischemic Stroke. *Hypertension* 66:141–148.

- Bruggimann L, Annoni JM, Staub F, von Steinbuchel N, Van der Linden M, Bogouslavsky J (2006) Chronic posttraumatic stress symptoms after nonsevere stroke. *Neurology* 66:513–516.
- Butcher Kenneth S., Cechetto David F. (1995) Insular Lesion Evokes Autonomic Effects of Stroke in Normotensive and Hypertensive Rats. *Stroke* 26:459–465.
- Caplan LR, Hier DB, Banks G (1982) Current concepts of cerebrovascular disease--stroke: stroke and drug abuse. *Stroke* 13:869–872.
- Carey RM, Siragy HM (2003) Newly Recognized Components of the Renin-Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation. *Endocrine Reviews* 24:261–271.
- Cechetto D (1990) Role of the cerebral cortex in autonomic function. Central regulation of autonomic functions:208–223.
- Chen Z, Venkat P, Seyfried D, Chopp M, Yan T, Chen J (2017) Brain–Heart Interaction: Cardiac Complications After Stroke. *Circulation Research* 121:451–468.
- Cheshire WP, Saper CB (2006) The insular cortex and cardiac response to stroke. *Neurology* 66:1296–1297.
- Cheung RTF, Hachinski V (2000) The Insula and Cerebrogenic Sudden Death. *Arch Neurol* 57:1685.
- Chouchou F, Mauguière F, Vallayer O, Catenox H, Isnard J, Montavont A, Jung J, Pichot V, Rheims S, Mazzola L (2019) How the insula speaks to the heart: Cardiac responses to insular stimulation in humans. *Human Brain Mapping* 40:2611–2622.
- 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.
- Colivicchi F, Bassi A, Santini M, Caltagirone C (2005) Prognostic Implications of Right-Sided Insular Damage, Cardiac Autonomic Derangement, and Arrhythmias After Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 36:1710–1715.
- Collister JP, Hendel MD (2003) The role of Ang (1-7) in mediating the chronic hypotensive effects of losartan in normal rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 4:176–179.
- Cunha Silva C, Fontes MAP (2019) Cardiovascular reactivity to emotional stress: The hidden challenge for pets in the urbanized environment. *Physiology & Behavior* 207:151–158.
- Dahlof B, Devereux R, de Faire U, Fyhrquist F, Hedner T, Ibsen H, Julius S, Kjeldsen S, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S (n.d.) The Losartan Intervention For Endpoint Reduction ( LIFE ) in Hypertension Study. :9.
- Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H (2002) Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *THE LANCET* 359:9.
- Dampney R a. L, Coleman MJ, Fontes M a. P, Hirooka Y, Horiuchi J, Li Y-W, Polson JW, Potts PD, Tagawa T (2002) Central Mechanisms Underlying Short- And Long-Term Regulation Of The Cardiovascular System. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29:261–268.

- Dayani PN, Bishop MC, Black K, Zeltzer PM (2004) Desferoxamine (DFO) – Mediated Iron Chelation: Rationale for a Novel Approach to Therapy for Brain Cancer. *J Neurooncol* 67:367–377.
- de Castro CH, Souza dos Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Pinto de Almeida A (2005) Evidence for a Functional Interaction of the Angiotensin-(1–7) Receptor Mas With AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> Receptors in the Mouse Heart. *Hypertension* 46:937–942.
- de Santana NM, dos Santos Figueiredo FW, de Melo Lucena DM, Soares FM, Adami F, de Carvalho Pádua Cardoso L, Correa JA (2018) The burden of stroke in Brazil in 2016: an analysis of the Global Burden of Disease study findings. *BMC Res Notes* 11 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6192154/> [Accessed February 1, 2019].
- del Zoppo GJ, Hallenbeck JM (2000) Advances in the Vascular Pathophysiology of Ischemic Stroke. *Thrombosis Research* 98:73–81.
- Devereux RB (2003) Effects of Losartan or Atenolol in Hypertensive Patients without Clinically Evident Vascular Disease: A Substudy of the LIFE Randomized Trial. *Ann Intern Med* 139:169.
- Dhamoon MS et al. (2021) Acute Cerebrovascular Events With COVID-19 Infection. *Stroke* 52:48–56.
- Di Stefano V, De Angelis MV, Montemitro C, Russo M, Carrarini C, di Giannantonio M, Brighina F, Onofri M, Werring DJ, Simister R (2021) Clinical presentation of strokes confined to the insula: a systematic review of literature. *Neurol Sci* 42:1697–1704.
- Dilauro M, Burns KD (2009) Angiotensin-(1-7) and Its Effects in the Kidney. *The Scientific World JOURNAL* 9:522–535.
- do Vale GT, Leoni D, Sousa AH, Gonzaga NA, Uliana DL, La Gata DC, Resstel LB, Padovan CM, Tirapelli CR (2020) Acute restraint stress increases blood pressure and oxidative stress in the cardiorenal system of rats: a role for AT<sub>1</sub> receptors. *Stress* 23:328–337.
- Doshi VS, Say JH, Young SH-Y, Doraisamy P (n.d.) Complications in Stroke Patients: A Study Carried out at The Rehabilitation Medicine Service, Changi General Hospital. :10.
- Edmondson D, Cohen BE (2013) Posttraumatic Stress Disorder and Cardiovascular Disease. *Prog Cardiovasc Dis* 55:548–556.
- Fayed I, Pivazyan G, Conte AG, Chang J, Mai JC (2020) Intracranial hemorrhage in critically ill patients hospitalized for COVID-19. *Journal of Clinical Neuroscience* 81:192–195.
- Feigin VL, Mensah GA, Norrving B, Murray CJL, Roth GA, GBD 2013 Stroke Panel Experts Group (2015) Atlas of the Global Burden of Stroke (1990-2013): The GBD 2013 Study. *Neuroepidemiology* 45:230–236.
- Ferreira AJ, Moraes PL, Foureaux G, Andrade AB, Santos RAS, Almeida AP (2011) The Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis Is Expressed in Sinoatrial Node Cells of Rats. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59:761–768.
- Ferreira AJ, Santos RAS, Bradford CN, Mecca AP, Sumners C, Katovich MJ, Raizada MK (2010) Therapeutic Implications of the Vasoprotective Axis of the Renin-Angiotensin System in Cardiovascular Diseases. *Hypertension* 55:207–213.

- 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.
- Fontes MAP, Martins Lima A, Santos RAS dos (2016) Brain angiotensin-(1–7)/Mas axis: A new target to reduce the cardiovascular risk to emotional stress. *Neuropeptides* 56:9–17.
- Fontes MAP, Xavier CH, Marins FR, Limborço-Filho M, Vaz GC, Müller-Ribeiro FC, Nalivaiko E (2014) Emotional stress and sympathetic activity: Contribution of dorsomedial hypothalamus to cardiac arrhythmias. *Brain Research* 1554:49–58.
- Friedman A, Bar-Klein G, Serlin Y, Parmet Y, Heinemann U, Kaufer D (2014) Should losartan be administered following brain injury? *Expert Review of Neurotherapeutics* 14:1365–1375.
- Frizzell JP (2005) Acute Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *AACN Advanced Critical Care* 16:421–440.
- Georgilis K, Plomaritoglou A, Dafni U, Bassiakos Y, Vemmos K (1999) Aetiology of fever in patients with acute stroke \*. *Journal of Internal Medicine* 246:203–209.
- Gogolla N (2017) The insular cortex. *Current Biology* 27:R580–R586.
- Habashi JP et al. (2006) Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* 312:117–121.
- Huang C-J, Webb HE, Zourdos MC, Acevedo EO (2013) Cardiovascular reactivity, stress, and physical activity. *Front Physiol* 4 Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2013.00314/full> [Accessed May 25, 2021].
- Johnson W, Onuma O, Owolabi M, Sachdev S (2016) Stroke: a global response is needed. *Bull World Health Organ* 94:634–634A.
- Johnston CI (1995) Angiotensin receptor antagonists: focus on losartan. *The Lancet* 346:1403–1407.
- Jones CL, Ward J, Critchley HD (2010) The neuropsychological impact of insular cortex lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 81:611–618.
- Karadas S, Sayın R, Aslan M, Gonullu H, Katı C, Dursun R, Duran L, Gonullu E, Demir H (2014) Serum Levels of Trace Elements and Heavy Metals in Patients with Acute Hemorrhagic Stroke. *J Membrane Biol* 247:175–180.
- Kimmerly DS, O’Leary DD, Menon RS, Gati JS, Shoemaker JK (2005) Cortical regions associated with autonomic cardiovascular regulation during lower body negative pressure in humans: Autonomic cardiovascular regulation. *The Journal of Physiology* 569:331–345.
- Kizer JR et al. (2005) Stroke Reduction in Hypertensive Adults With Cardiac Hypertrophy Randomized to Losartan Versus Atenolol: The Losartan Intervention For Endpoint Reduction in Hypertension Study. *Hypertension* 45:46–52.
- Kjeldsen SE, Lyle PA, Kizer JR, Dahlof B, Devereux RB, Julius S, Beevers G, Faire U de, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Snapinn SM, Harris KE, Wedel H (2005) The Effects of Losartan Compared to Atenolol on Stroke in Patients With Isolated Systolic Hypertension and Left Ventricular Hypertrophy. The LIFE Study. *The Journal of Clinical Hypertension* 7:152–158.

Lautner RQ et al. (2013) Discovery and Characterization of Alamandine: A Novel Component of the Renin–Angiotensin System. *Circ Res* 112:1104–1111.

Lima AM, Xavier CH, Ferreira AJ, Raizada MK, Wallukat G, Velloso EPP, Santos RAS dos, Fontes MAP (2013) Activation of angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1–7)/Mas axis attenuates the cardiac reactivity to acute emotional stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 305:H1057–H1067.

Lin L, Liu X, Xu J, Weng L, Ren J, Ge J, Zou Y (2016) Mas receptor mediates cardioprotection of angiotensin-(1-7) against Angiotensin II-induced cardiomyocyte autophagy and cardiac remodelling through inhibition of oxidative stress. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 20:48–57.

Marins F, Limborço-Filho M, Xavier C, Biancardi V, Vaz G, Stern J, Oppenheimer S, Fontes P (2016a) Functional topography of cardiovascular regulation along the rostrocaudal axis of the rat posterior insular cortex. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 43.

Marins FR, Limborço-Filho M, D’Abreu BF, Machado de Almeida PW, Gavioli M, Xavier CH, Oppenheimer SM, Guatimosim S, Fontes MAP (2020) Autonomic and cardiovascular consequences resulting from experimental hemorrhagic stroke in the left or right intermediate insular cortex in rats. *Autonomic Neuroscience* 227:102695.

Marins FR, Limborço-Filho M, Xavier CH, Biancardi VC, Vaz GC, Stern JE, Oppenheimer SM, Fontes MAP (2016b) Functional topography of cardiovascular regulation along the rostrocaudal axis of the rat posterior insular cortex. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 43:484–493.

Marins FR, Limborço-Filho M, Xavier CH, Guatimosim S, Fontes MAP (2021) Autonomic response after hemorrhagic stroke in the right insular cortex: What is the common pathophysiology in rat and human?; Reply. *Autonomic Neuroscience* 231:102772.

Mecca AP, Regenhardt RW, O’Connor TE, Joseph JP, Raizada MK, Katovich MJ, Sumners C (2011) Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke: Angiotensin-(1-7) cerebroprotection during stroke. *Experimental Physiology* 96:1084–1096.

Melmed KR, Cao M, Dogra S, Zhang R, Yaghi S, Lewis A, Jain R, Bilaloglu S, Chen J, Czeisler BM, Raz E, Lord A, Berger JS, Frontera JA (2021) Risk factors for intracerebral hemorrhage in patients with COVID-19. *J Thromb Thrombolysis* 51:953–960.

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.

Mishra S, Choueka M, Wang Q, Hu C, Visone S, Silver M, Stein EG, Levine SR, Wang QT (2021) Intracranial Hemorrhage in COVID-19 Patients. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 30:105603.

Nagai M, Dote K, Kato M (2021) Autonomic response after hemorrhagic stroke in the right insular cortex: What is the common pathophysiology in rat and human? *Autonomic Neuroscience* 230:102755.

Nagai M, Hoshida S, Kario K (2010) The insular cortex and cardiovascular system: a new insight into the brain-heart axis. *Journal of the American Society of Hypertension* 4:174–182.

Nakamura T, Kuroda Y, Yamashita S, Zhang X, Miyamoto O, Tamiya T, Nagao S, Xi G, Keep RF, Itano T (2008) Edaravone Attenuates Brain Edema and Neurologic Deficits in a Rat Model of Acute Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 39:463–469.

- Napadow V, Dhond R, Conti G, Makris N, Brown EN, Barbieri R (2008) Brain correlates of autonomic modulation: Combining heart rate variability with fMRI. *NeuroImage* 42:169–177.
- Okuguchi T (2002) Effect of losartan on nocturnal blood pressure in patients with stroke: comparison with angiotensin converting enzyme inhibitor. *American Journal of Hypertension* 15:998–1002.
- Oppenheimer S (1992) The Insular Cortex and the Pathophysiology of Stroke-Induced Cardiac Changes. *THE CANADIAN JOURNAL OF NEUROLOGICAL SCIENCES* 19:4.
- Oppenheimer S (2007) Cortical control of the heart. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 74:S27–S27.
- Oppenheimer S, Cechetto D (2016) The Insular Cortex and the Regulation of Cardiac Function. In: *Comprehensive Physiology* (Terjung R, ed), pp 1081–1133. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c140076> [Accessed March 13, 2019].
- Oppenheimer S, Hachinski V (1992) Complications of acute stroke. *The Lancet* 339:721–724.
- Oppenheimer SM, Cechetto DF (1990) Cardiac chronotropic organization of the rat insular cortex. *Brain Research* 533:66–72.
- Oppenheimer SM, Gelb A, Girvin JP, Hachinski VC (1992) Cardiovascular effects of human insular cortex stimulation. *Neurology* 42:1727–1727.
- Oxley TJ, Mocco J, Majidi S, Kellner CP, Shoirah H, Singh IP, De Leacy RA, Shigematsu T, Ladner TR, Yaeger KA, Skliut M, Weinberger J, Dangayach NS, Bederson JB, Tuhim S, Fifi JT (2020) Large-Vessel Stroke as a Presenting Feature of Covid-19 in the Young. *N Engl J Med* 382:e60.
- Özdemir M, Arslan U, Türkoğlu S, Balçioğlu S, Çengel A (2007) Losartan Improves Heart Rate Variability and Heart Rate Turbulence in Heart Failure Due to Ischemic Cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure* 13:812–817.
- Papademetriou V, Farsang C, Elmfeldt D, Hofman A, Lithell H, Olofsson B, Skoog I, Trenkwalder P, Zanchetti A (2004) Stroke prevention with the angiotensin II type 1-receptor blocker candesartan in elderly patients with isolated systolic hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 44:1175–1180.
- Parizel PM, Makkat S, Jorens PG, Özsarlak Ö, Cras P, Van Goethem JW, van den Hauwe L, Verlooy J, De Schepper AM (2002) Brainstem hemorrhage in descending transtentorial herniation (Duret hemorrhage). *Intensive Care Medicine* 28:85–88.
- Passos-Silva DG, Verano-Braga T, Santos RAS (2013) Angiotensin-(1–7): beyond the cardio-renal actions. *Clinical Science* 124:443–456.
- Paxinos G, Watson C, Carrive P, Kirkcaldie MTK, Ashwell K (2009) *Chemoarchitectonic Atlas of the Rat Brain*. Available at: <http://ecite.utas.edu.au/61312> [Accessed March 6, 2021].
- Paz Ocaranza M, Riquelme JA, García L, Jalil JE, Chiong M, Santos RAS, Lavandero S (2020) Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 17:116–129.
- Perna R, Temple J (2015) Rehabilitation Outcomes: Ischemic versus Hemorrhagic Strokes. *Behavioural Neurology* 2015:e891651.
- Raghu ALB, Parker T, van Wyk A, Green AL (2019) Insula stroke: the weird and the worrisome. *Postgrad Med J* 95:497–504.

- Regenhardt RW, Mecca AP, Desland F, Ritucci-Chinni PF, Ludin JA, Greenstein D, Banuelos C, Bizon JL, Reinhard MK, Summers C (2014) Centrally administered angiotensin-(1–7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Experimental Physiology* 99:442–453.
- Romano IJ, Lippolis A, D’Anna M, Gentile F (2019) Cardiac Arrhythmias and Acute Cerebrovascular Events: A Case of QT Prolongation and Torsades de Pointes Early After Right Insular Stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 28:104308.
- Ruggiero DA, Mraovitch S, Granata AR, Anwar M, Reis DJ (1987) A role of insular cortex in cardiovascular function. *J Comp Neurol* 257:189–207.
- Sabharwal R, Chapleau MW (2014) Autonomic, locomotor and cardiac abnormalities in a mouse model of muscular dystrophy: targeting the renin–angiotensin system. *Experimental Physiology* 99:627–631.
- Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, Elkind MS, George MG, Hamdan AD, Higashida RT (2013) An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 44:2064–2089.
- Saleh TM, Connell BJ (1998) Role of the insular cortex in the modulation of baroreflex sensitivity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 274:R1417–R1424.
- Santos CM, Pontieri V, Neto ML, Lisete, Michelin C, Pontieri SCMV (n.d.) Losartan improves baroreflex control of.
- Santos D, Marins F, Limborço-Filho M, Oliveira M, Hamamoto D, Xavier C, Moreira F, Santos R, Campagnole-Santos M, Fontes P (2017) Chronic overexpression of angiotensin-(1-7) in rats reduces cardiac reactivity to acute stress and dampens anxious behavior. *Stress* 20:1–8.
- Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Baracho NCV, Fontes MAP, Silva LCS, Neves LAA, R. Oliveira D, Caligorne SM, Rodrigues ARV, Gropen C, Carvalho WS, E Silva ACS, Khosla MC (1994) Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1–7): Evidence that the actions of angiotensin-(1–7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Research Bulletin* 35:293–298.
- Santos RAS, e Silva ACS, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss H-P, Speth R, Walther T (2003) Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *PNAS* 100:8258–8263.
- Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, Campagnole-Santos MJ (2018) The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). *Physiological Reviews* 98:505–553.
- Sasaki S, Dampney RA (1990) Tonic cardiovascular effects of angiotensin II in the ventrolateral medulla. *Hypertension* 15:274–283.
- Schrader J, Lüders S, Kulschewski A, Berger J, Zidek W, Treib J, Einhüpl K, Diener HC, Dominiak P (2003) The ACCESS Study: Evaluation of Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors. *Stroke* 34:1699–1703.
- Smeda JS, Watson D, Stuckless J, Negandhi A (2018) Post-stroke losartan and captopril treatments arrest hemorrhagic expansion in SHRsp without lowering blood pressure. *Vascular Pharmacology* 111:26–35.



Sörös P, Hachinski V (2012) Cardiovascular and neurological causes of sudden death after ischaemic stroke. *The Lancet Neurology* 11:179–188.

Souza ÁPS, Sobrinho DBS, Almeida JFQ, Alves GMM, Macedo LM, Porto JE, Vêncio EF, Colugnati DB, Santos RAS, Ferreira AJ, Mendes EP, Castro CH (2013) Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1–7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. *Clinical Science* 125:449–459.

Starkstein SE, Robinson RG, Price TR (1988) Comparison of spontaneously recovered versus nonrecovered patients with poststroke depression. *Stroke* 19:1491–1496.

Starr CJ, Sawaki L, Wittenberg GF, Burdette JH, Oshiro Y, Quevedo AS, Coghill RC (2009) Roles of the Insular Cortex in the Modulation of Pain: Insights from Brain Lesions. *Journal of Neuroscience* 29:2684–2694.

Strong K, Mathers C, Bonita R (2007) Preventing stroke: saving lives around the world. *The Lancet Neurology* 6:182–187.

Tetzner A, Gebolys K, Meinert C, Klein S, Uhlich A, Trebicka J, Villacañas Ó, Walther T (2016) G-Protein–Coupled Receptor MrgD Is a Receptor for Angiotensin-(1–7) Involving Adenylyl Cyclase, cAMP, and Phosphokinase A. *Hypertension* 68:185–194.

Thomas AJ, Ascanio-Cortez L, Gomez S, Salem M, Maragkos G, Hanafy KA (2020) Defining the Mechanism of Subarachnoid Hemorrhage–Induced Pyrexia. *Neurotherapeutics* Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13311-020-00866-x> [Accessed May 17, 2020].

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.

van Bree MDR, Roos YBWEM, van der Bilt IAC, Wilde AAM, Sprengers MES, de Gans K, Vergouwen MDI (2010) Prevalence and Characterization of ECG Abnormalities After Intracerebral Hemorrhage. *Neurocrit Care* 12:50–55.

Victor RG (2007) Pathophysiology of Target-Organ Disease: Does Angiotensin II Remain the Key? *The Journal of Clinical Hypertension* 9:4–10.

Villapol S, Saavedra JM (2015) Neuroprotective Effects of Angiotensin Receptor Blockers. *American Journal of Hypertension* 28:289–299.

Virani Salim S. et al. (2020) Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 141:e139–e596.

Wachtell K, Lehto M, Gerds E, Olsen MH, Hornestam B, Dahlöf B, Ibsen H, Julius S, Kjeldsen SE, Lindholm LH, Nieminen MS, Devereux RB (2005) Angiotensin II receptor blockade reduces new-onset atrial fibrillation and subsequent stroke compared to atenolol. *Journal of the American College of Cardiology* 45:712–719.

Wanderer S, Anderegg L, Mrosek J, Kashfiolasi S, Marbacher S, Konczalla J (2020) The Role of Losartan as a Potential Neuroregenerative Pharmacological Agent after Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage. *International Journal of Molecular Sciences* 21:6496.

Wexler RR, Carini DJ, Duncia JV, Johnson EL, Wells GJ, Chiu AT, Wong PG, Timmermans PBWM (n.d.) Rationale for the Chemical Development of Angiotensin II Receptor Antagonists.

- Wrotek SE, Kozak WE, Hess DC, Fagan SC (2011) Treatment of Fever After Stroke: Conflicting Evidence. *Pharmacotherapy* 31:1085–1091.
- Wysocki J, Ye M, Rodriguez E, González-Pacheco FR, Barrios C, Evora K, Schuster M, Loibner H, Brosnihan KB, Ferrario CM, Penninger JM, Batlle D (2010) Targeting the Degradation of Angiotensin II With Recombinant Angiotensin-Converting Enzyme 2: Prevention of Angiotensin II–Dependent Hypertension. *Hypertension* 55:90–98.
- Xu F, Mao C, Hu Y, Rui C, Xu Z, Zhang L (2009) Cardiovascular Effects of Losartan and Its Relevant Clinical Application. *CMC* 16:3841–3857.
- Xu Y, Menon V, Jugdutt BI (2000) Cardioprotection after angiotensin II type 1 blockade involves angiotensin II type 2 receptor expression and activation of protein kinase C- $\epsilon$  in acutely reperfused myocardial infarction in the dog: Effect of UP269-6 and losartan on AT1- and AT2-receptor expression and IP3 receptor and PKC $\epsilon$  proteins. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1:184–195.
- Zhang T-L, Fu J-L, Geng Z, Yang J-J, Sun X-J (2012) The Neuroprotective Effect of Losartan through Inhibiting AT1/ASK1/MKK4/JNK3 Pathway Following Cerebral I/R in Rat Hippocampal CA1 Region. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 18:981–987.
- Zhang Y et al. (2020) Coagulopathy and Antiphospholipid Antibodies in Patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine* Available at: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc2007575> [Accessed June 2, 2021].
- Zhang Z-H, Rashba S, Oppenheimer SM (1998) Insular cortex lesions alter baroreceptor sensitivity in the urethane-anesthetized rat. *Brain Research* 813:73–81.
- Zhao Z, Barber P, Tuor U (2009) Chronic treatment with Losartan and Cerebral Ischemic Tolerance. *Journal of Experimental Stroke and Translational Medicine* 2:32–40.