

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**Contribuição do Hipotálamo Dorsomedial nas respostas cardiovasculares ao  
estresse emocional agudo**

Mestranda: Cristiane Amorim da Paula

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes

Belo Horizonte – MG

2015

CRISTIANE AMORIM DE PAULA

**Contribuição do Hipotálamo Dorsomedial nas respostas cardiovasculares ao  
estresse emocional agudo**

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

2015

"Escrevo sobre aquilo que não sei, para ficar sabendo"

Fernando Sabino

## AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar e guiar sempre o meu caminho na busca dos meus sonhos. Por me dar forças nos momentos de dificuldades e por colocar pessoas boas em minha vida.

À minha maravilhosa família que amo tanto e que me dá tanto suporte e força. Aos meus pais que nunca deixaram de apoiar as minhas decisões sempre torcendo e rezando pelas minhas conquistas. Vocês que são o meu alicerce sempre preocupados e dando muito carinho, amor e atenção.

Às minhas irmãs que me proporcionaram momentos de risadas para poder relaxar. Por torcerem e estarem ao meu lado.

À minha nova família o meu sogro e a minha sogra que torcem sempre pelas minhas conquistas e por entender os momentos de ausência.

Ao Davidson que desde o primeiro momento esteve ao meu lado torcendo, apoiando e estudando comigo. Não tenho palavras para agradecer por tanto apoio nos momentos bons e ruins. Obrigada por tanto amor, atenção, dedicação, paciência...

Ao Marco Antônio pela confiança depositada em mim. Pela paciências desde o início com o projeto até o resultado final, a dissertação. E por dividir sempre o seu conhecimento contribuindo para o meu crescimento científico e profissional.

Ao Celso Tarso quem me apresentou ao Prof. Marco Antônio.

Aos Profs.do Laboratório de Hipertensão, Andrea, Maria José e Robson pelos ensinamentos.

Ao Zezé pela amizade e auxílio durante os experimentos.

À Fernanda, Priscila, Letícia e a Carol que me ajudaram muito na elaboração e para o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos alunos da equipe do Prof. Marco Antônio por dividirem os seus conhecimentos. Natália Machado, Flávia, Thaís, Nathália Bitterncourt, Thiago, Gisele.

À todos do laboratório de Hipertensão que me apoiaram e divertiram durante esses anos. Em especial a Silvia, Mariana, Gisele, Nádia, Lucas Araújo, Jonathas, Érick.

Às agências de fomento CNPQ, FAPEMG, CAPES, PRONEX e INCT-Nanobiofar que financiaram a minha pesquisa e a bolsa de estudo.

## RESUMO

Evidências indicam que a região hipotalâmica dorsomedial (HDM) desempenha um papel chave na organização das respostas cardiovasculares (CV) ao estresse emocional agudo. A inibição do HDM e/ou o bloqueio dos receptores de aminoácido excitatório desta região atenuam as respostas fisiológicas evocadas pelo estresse. No entanto, todos estes efeitos tem sido explorados em um único modelo de estresse (estresse por jato de ar). Neste sentido, este trabalho objetivou avaliar a contribuição dos receptores NMDA do HDM nas respostas CV evocadas pelo *Cage Switch Stress* (CSS). Foram utilizados ratos Wistar submetidos às cirurgias de estereotaxia e canulação da artéria femoral previamente anestesiados com tribromoetanol. Os ratos foram submetidos à cirurgia de estereotaxia para implantação de cânulas guias bilaterais no HDM. Sete dias depois, uma canula foi inserida na artéria femoral para registro da frequência cardíaca e pressão arterial. Após 24 horas de recuperação os animais foram expostos ao CSS. Foram realizadas no HDM microinjeções bilaterais (100 nl) de veículo (salina 0,9%, n=7), do agonista GABA<sub>A</sub> muscimol (100 pmol, n=8) ou do antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA o AP-5 (100 pmol, n=6). Dez minutos depois, os ratos foram submetidos ao CSS. Um grupo adicional também foi testado (grupo intacto, n=9, sem microinjeção no HDM). Para análise das arritmias cardíacas os grupos experimentais (grupo veículo e AP-5) foram submetidos a cirurgia de eletrocardiograma e as alterações foram analisadas no momento de entrada ao CSS. Nos grupos controles (intacto e veículo HDM), o CSS evocou uma resposta taquicárdica ( $\Delta$  119 $\pm$ 12 bpm and 121 $\pm$ 11 bpm) acompanhada por um marcante aumento na PA ( $\Delta$  60 $\pm$ 2 mmHg and  $\Delta$  60 $\pm$ 3 mmHg, respectivamente). A taquicardia e a resposta pressora foram marcadamente reduzidas pelo muscimol e o AP-5 (musc:  $\Delta$ FC: 62 $\pm$ 7 bpm and  $\Delta$  PAM: 37 $\pm$ 4 mmHg; AP-5:  $\Delta$  FC: 31 $\pm$ 7 bpm e  $\Delta$  PAM:

39±3 mmHg, P<0.05 vs. veículo). O número de arritmias cardíacas foi reduzido pelo AP-5 no momento de entrada do rato no CSS (1,5 vs 3,33 veículo). Estes dados sugerem que o HDM é importante também para o controle das respostas CV em outras formas de estresse emocional agudo. Parte destas respostas envolvem ativação dos receptores excitatórios NMDA do HDM.

## ABSTRACT

Evidence indicates that the dorsomedial hypothalamic region (DMH) plays a key role in the organization of the cardiovascular (CV) responses to acute emotional stress. Inhibition of DMH and/or blockade of excitatory amino acid (EAA) receptors in this region attenuate the pressory and tachycardia responses evoked by stress. However, all these effects have been explored in a single stress model (air jet-stress). We evaluated the contribution of NMDA receptors in the DMH on the CV responses evoked by cage switch stress (CS stress). Under anesthesia (tribromoethanol, 250 mg/kg), Wistar male rats received guide cannulas into DMH. Seven days after, a cannula was inserted into femoral artery for heart rate (HR) and blood pressure (BP) recording. After 24 h, bilateral nanoinjections (100 nL) of vehicle (saline 0.9%, n=7), the GABAA agonist muscimol (100 pmol, n=8) or the NMDA antagonist AP-5 (100 pmol, n=6) were performed into DMH; ten min later, rats were submitted to CS stress. An additional control group was also tested (no injection, intact group, n=9). In the intact group and in the vehicle group CS stress evoked a tachycardic response ( $\Delta$  119 $\pm$ 12 bpm and 121 $\pm$ 11 bpm) accompanied by large increases in BP ( $\Delta$  60 $\pm$ 2 mmHg and  $\Delta$  60 $\pm$ 3 mmHg, respectively). Tachycardic and pressor responses were markedly reduced by muscimol and AP-5 (musc:  $\Delta$ HR: 62 $\pm$ 7 bpm and  $\Delta$  MAP: 37 $\pm$ 4 mmHg; AP-5:  $\Delta$  HR: 31 $\pm$ 7 bpm and  $\Delta$  MAP: 39 $\pm$ 3 mmHg, P<0.05 vs. vehicle). The number of cardiac arrhythmias was reduced by AP-5 (vehicle: 3,33 vs AP-5 1,5). Corticosterone and glucose plasma levels were unaffected by CS or any treatment. Data suggest that the DMH is also important for controlling CV responses in other forms of acute emotional stress. Part of this response involves activation of NMDA EAA receptors.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AP-5- Ácido DL-2-amino-5-fosfonopentanóico

BMI- Bicuculina Metiodide

CSS- *Cage Switch stress*

CV- Cardiovasculares

FC- Frequência cardíaca

HDM- Hipotálamo dorsomedial

NMDA- N-metil-D-aspartato

PA- Pressão arterial

PAM- Pressão arterial média

RP- Rafe Pallidus

RVLM- Bulbo ventrolateral rostral

SNC- Sistema nervoso central

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho representativo do paradigma de estresse por cage switch..	32
Figura 2. Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação da ativação do tônus autonômico simpático.	33
Figura 3. Desenho representativo do posicionamento dos eletrodos para o ECG.	34
Figura 4. Esquema representativo do procedimento experimental para análise das respostas metabólicas ao estresse por mudança de ambiente.	35
Figura 5. Traçados representativos das respostas de pressão arterial (PA) e de frequência cardíaca (FC) de ratos submetidos à exposição aguda ao estresse por mudança de ambiente (CSS).	37
Figura 6. A: Alterações da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) induzidas pelo estresse por mudança de ambiente	38
Figura 7. Alterações médias máximas de PA (mmHg) e FC (bpm) induzidas pelo CSS no momento de entrada ao paradigma.	40
Figura 8. Efeito da microinjeção de muscimol no HDM sobre parâmetros cardiovasculares de ratos submetidos ao CSS.	42
Figura 9. Efeito da microinjeção de AP-5 no HDM.	44
Figura 10. Alterações médias máximas de pressão arterial (PA) ou de frequência cardíaca (FC) observadas nos momentos de entrada (A) ou retirada (B) do animal no paradigma de CSS.	46
Figura 11. Traçado representativo do ECG dos ratos no momento de entrada do CSS.	49
Figura 12. Batimentos ectópicos presentes no momento de entrada do CSS	50
Figura 13. Análise temporal dos valores plasmáticos de glicose e corticosterona de ratos submetidos ao CSS.	52

Figura 14. Diagrama esquemático das secções coronais de cérebro de rato ilustrando os sítios de microinjeção no HDM. ....	53
Figura 15: Esquema respresentando as vias centrais ao estresse agudo. ....	63
Figura 16. Parâmetros cardiovasculares em condições basais. ....	64
Figura 17. Análise temporal dos valores plasmáticos de glicose de ratos submetidos ao estresse por contenção. ....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valores da variação/delta de PAM e FC produzidas durante os momentos de entrada e retirada do animal no Cage Switch Stress.....	47
--	----

## Sumário

1	Introdução .....	15
1.1-	Estresse.....	15
1.2-	Estresse emocional agudo .....	17
1.3-	Hipotálamo Dorsomedial e estresse emocional agudo.....	19
2	Justificativa.....	22
3	Objetivo .....	23
3.1-	Objetivo geral.....	23
3.2-	Objetivos específicos.....	23
4	Material e método.....	25
4.1-	Animais .....	25
4.2-	Anestesia .....	25
4.3-	Procedimentos gerais.....	25
4.3.1-	Confecção e implante de cânulas-guia:.....	25
4.3.2-	Canulação da artéria e veia femoral.....	27
4.3.3-	Procedimento de microinjeção no HDM .....	28
4.3.4-	Confirmação histológica .....	29
4.3.5-	Análise glicêmica e da corticosterona .....	29
4.3.6-	Drogas.....	30
4.4.	Protocolos experimentais .....	30
4.4.1-	Protocolo 1 .....	30
4.4.2-	Protocolo 2 .....	33
4.4.3-	Protocolo 3 .....	33
4.4.4-	Protocolo 4 .....	34
4.5.	Análise estatística.....	35
5	Resultados.....	36
5.1-	Efeito da exposição ao CSS sobre os parâmetros cardiovasculares .....	36
5.2-	Avaliação do componente simpático sobre as alterações cardiovasculares induzidos pelo CSS .....	39
5.3-	Efeito da inibição do Hipotálamo Dorsomedial sobre a resposta cardiovascular induzida pelo CSS .....	41
5.4-	Efeito do bloqueio dos receptores NMDA no HDM sobre as respostas cardiovasculares provocadas pelo CSS .....	43

5.5-	Efeito da exposição ao CSS na geração de arritmias cardíacas; contribuição dos receptores EAA no HDM.....	48
5.6-	Efeito do CSS sobre a concentração sanguínea de glicose e corticosterona....	51
5.7-	Análise histológica.....	53
6	Discussão.....	54
7	Conclusão.....	62
8	Apêndice.....	63
9	Referências.....	66

# **1 Introdução**

## **1.1- Estresse**

Cannon (1929) foi o primeiro cientista a introduzir o termo homeostasia para descrever os processos fisiológicos coordenados necessários para manter o organismo em um estado de equilíbrio. Cannon voltou sua atenção para o sistema nervoso simpático (SNS), como componente fundamental para restabelecer a homeostase perturbada e para promover a sobrevivência do organismo (Cannon, 1929).

Hans Selye em 1936 relatou que a exposição a qualquer agente estressor produziria o que ele descreveu como a “síndrome patológica”. Esta síndrome se caracterizava pela hipertrofia adrenal, ulceração gastrointestinal, e involução timo-linfática. A partir da observação destes efeitos, ele desenvolveu uma teoria de estresse que alcançou grande popularidade na área médica e científica e despertou interesse da pesquisa, mas, por outro lado também incitou controvérsia sobre o tema que persiste até hoje. Selye considerava que todos os animais respondem a estímulos como manipulação física e traumas, com diferentes componentes de ordem neural, humoral ou metabólica que tinham como consequência visar a manutenção ou o restabelecimento da homeostase. Experimentos em ratos mostraram que um organismo severamente agredido por um agente inespecífico como exposição ao frio, trauma cirúrgico, produção de choque medular, exercício muscular excessivo ou intoxicações com doses não letais de diversos fármacos, desenvolve uma síndrome típica, cujos sintomas independem da natureza do agente agressor (Selye, 1936). As respostas impostas por estes estímulos foram genericamente denominadas como resposta ao estresse. Sendo assim, Selye definiu

estresse como sendo uma resposta não específica do corpo a qualquer demanda que resultaria da exposição a qualquer agente estressor (Selye,1936).

Atualmente, sabe-se que a formação específica de novas conexões e o desligamentos de circuitos subordinados, as experiências anteriores de um organismo a um estressor individual, a genética neuronal e as funções celulares ajustam as respostas ao estresse. Considera-se que cada agente estressor resulte em respostas específicas e que o estresse pode ser visto como uma resposta que reflete a existência de centros anatômicos específicos e circuitos funcionais. É provável que estes circuitos, o circuito primário e os circuitos subordinados, estão combinados para garantir a plasticidade máxima de respostas ao estresse seja diante de um estresse agudo ou crônico (Pacak e Palkovits, 2001).

Em geral, os fatores que induzem o estresse podem ser divididos em quatro categorias principais: 1) estressores físicos que têm um componente psicológico negativo ou, em algumas situações, um componente psicológico positivo, exemplo: calor, frio, vibração, ruído; 2) estressores psicológicos que refletem uma resposta aprendida anteriormente a condições adversas e afetam profundamente os processos emocionais que podem resultar em mudanças comportamentais tais como ansiedade, medo ou frustração, 3) estressores sociais que refletem as interações perturbadas entre indivíduos, e 4) estressores que desafiam a homeostase cardiovascular e metabólica, como por exemplo exercício físico, hipotensão ortostática, inclinação vertical, exposição ao calor, hipoglicemia e hemorragia.

De acordo com a duração, o estresse pode ser dividido em duas categorias principais 1) agudo, sendo caracterizado por uma exposição única, intermitente, e por tempo limitado e, 2) crônico, refere-se à exposição prolongada e contínua.

As respostas adaptativas que são desencadeadas em resposta a um estressor agudo incluem alterações nos processos fisiológicos e comportamentais que são essenciais para restabelecer o equilíbrio homeostático. Durante uma resposta ao estresse agudo, alterações fisiológicas são importantes para redirecionar a utilização da energia entre os vários órgãos e inibir ou estimular seletivamente vários sistemas para mobilizar reservas de energia e de estar preparado para a exposição a desafios imprevisíveis adicionais. Assim, após exposição a fatores de estresse metabólico, determinados tecidos tendem a reduzir seu consumo de energia, enquanto outros, especialmente aqueles que são importantes para atividade locomotora, recebem nutrientes suficientes para funcionar com eficiência (Pacak and Palkovits, 2001). Estas alterações autonômicas durante o estresse emocional agudo são importantes para a resposta de luta e fuga que aumentam a taxa de sobrevivência do animal. Sendo assim, uma resposta ao estresse emocional agudo considerada como ideal compreende uma reação suficiente para lidar com ameaças externas durante o estresse e uma capacidade homeostática eficiente para recuperar após o término evento estressor.

## **1.2- Estresse emocional agudo**

Diante de um estresse emocional agudo observa-se uma série de alterações comportamentais, autonômicas e endócrinas para que a homeostase corporal seja mantida. Estas alterações são mediadas pelo Sistema Nervoso Central (SNC) e ocorrem em três grandes níveis; 1) inclui a formação de uma reação emocional frente ao estímulo pelas estruturas córtico-límbicas, determinando a estratégia cognitiva a ser tomada frente à situação estressante; 2) consiste na ativação de vias autonômicas, principalmente do

eixo simpático e 3) de respostas endócrinas para a periferia pelo eixo hipotálamo hipófise adrenal, principalmente com a liberação do cortisol.

Particularmente, o componente hemodinâmico deste padrão de resposta inclui o aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca, vasodilatação no músculo esquelético, vasoconstrição visceral e aumento de tônus venoso. Associado às alterações hemodinâmicas, existe uma mudança na função barorreflexa arterial, que permite o aumento simultâneo da pressão arterial e frequência cardíaca (Lovallo 2003, Davern 2009, Schadt JC. and Hasser EM, 1998)

Frente à situação de estresse emocional agudo o animal apresenta respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais. Estudos anteriores (Adell *et al.*, 1997; Pacak e Palkovits, 2001) mostraram que os circuitos cerebrais ativados durante a exposição à um estresse agudo podem ser diferentes dependendo do tipo de agente estressor. Adell e colaboradores estudaram os circuitos cerebrais ativados durante a exposição à diferentes modelos de estresse agudo, manipulação durante 30 s, 5 minutos de nado forçado ou injeção de salina subcutânea (1 ml/kg). Os autores observaram que as estruturas prosencefálicas foram ativadas em todas as situações de estresse. Entretanto, a região dorsal da raphe foi estimulada apenas pela injeção subcutânea de salina (Adell *et al.*, 1997). Em um outro estudo, Pacak e Palkovits observaram os efeitos do estresse de imobilização, hemorragia, dor, exposição ao frio ou hipoglicemia sobre as concentrações plasmáticas de norepinefrina, epinefrina e ACTH. Estes parâmetros apresentaram-se elevados apenas no estresse por imobilização, apresentando um padrão diferenciado para os outros paradigmas de estresse agudo. A exposição ao frio (4°C ou -3°C) aumentou a concentração plasmática de norepinefrina não alterando a epinefrina nem o ACTH. Um padrão antagônico foi visto no estresse por hemorragia, que não resultou em alterações nas concentrações plasmáticas de norepinefrina e epinefrina mas em aumento no ACTH

plasmático. Estas observações sugerem a existência de vias e circuitos centrais específicos ativados de acordo com o estressor. Desta forma, podemos concluir que, durante o estresse, uma resposta compensatória adaptativa do organismo é ativada para manter a homeostase, sendo esta resposta específica de acordo com o estressor (Pacak e Palkovits, 2001).

### **1.3- Hipotálamo Dorsomedial e estresse emocional agudo**

Anatomicamente, o hipotálamo é apontado como um dos núcleos centrais que regulam as respostas ao estresse emocional agudo.

O hipotálamo é a região cerebral determinante na produção das respostas de luta e fuga sendo, também, considerado o núcleo chave envolvido na integração das respostas fisiológicas, dentre elas cardiovasculares, ao estresse emocional agudo. Particularmente, estudos indicam que o hipotálamo dorsomedial (HDM) é considerado um componente fundamental que intercede as vias centrais das resposta cardiovascular ao estresse emocional (Fontes *et al.*, 2011; DiMicco *et al.*, 2002).

O HDM indica a região do hipotálamo que inclui não só o núcleo hipotalâmico dorsomedial, mas também as áreas adjacentes, particularmente dorsal e posterior ao próprio núcleo, assim como lateralmente, incluindo a parte medial da área perifornical. No animal, mais especificamente no rato, o HDM localiza-se adjacientemente ao terceiro ventrículo, caudal e ventral ao núcleo paraventricular do hipotálamo, dorsal ao núcleo ventromedial do hipotálamo e ventral ao trato mamilotalâmico. Lateralmente, o HDM é delimitado pelo fórnix e pela a área hipotalâmica lateral. Sua borda caudal é muito menos distinta e é indefinidamente delimitado com a área hipotalâmica posterior. O núcleo

hipotalâmico dorsomedial em si é dividido em duas porções distintas, uma porção difusa mal definida e uma porção compacta (Paxinos e Watson, 1986), sendo esta última claramente delimitada na parte posterior do HDM (Fontes *et al.*, 2011)

A desinibição dos neurônios do HDM por meio da microinjeção do antagonista GABA<sub>A</sub>, bicuculina metiodide (BMI), resulta em aumento da atividade simpática para o coração e rins com consequentes aumentos da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial (PA) (Fontes *et al.*, 2001, Cao and Morrison, 2004). Além disso, observa-se aumentos na taxa hemodinâmica, alterações neuroendócrinas, de motilidade gastrointestinal (Greenwood e DiMicco, 1995) e alterações comportamentais similares àquelas provocadas pelo estresse emocional agudo (Shekhar, 1993). Em conjunto, estes estudos mostraram que a ativação dos neurônios do HDM gera uma resposta integrada, semelhante às alterações fisiológicas classicamente descritas como reação de luta e fuga. Além disso, ao aplicar-se microinjeções de BMI em doses crescentes no HDM observa-se aumentos dose-resposta na PAM, FC e atividade simpática do nervo renal (Horiuchi *et al.*, 2004), indicando que os neurônios do HDM estão sob forte influência tônica inibitória. A remoção do tônus gabaérgico sobre os neurônios do HDM resulta em predomínio do balanço de projeções excitatórias permitindo que os neurônios desta região sejam estimulados com consequente aumento da atividade simpática (Cao e Morrison, 2004). Nesse sentido as alterações cardiovasculares produzidas pela desinibição do HDM são mediadas por ativação de receptores de aminoácidos excitatórios (EAA) via projeções oriundas da amígdala (Soltis and DiMicco, 1991a, b, Soltis *et al.*, 1998).

Em contrapartida, a microinjeção de muscimol, um agonista potente e específico do receptor GABA<sub>A</sub>, nos neurônios do HDM é capaz de reduzir significativamente a taquicardia em ratos quando expostos a modelos de estresse emocional agudo, abolindo

quase completamente as respostas cardiovasculares diante do estímulo aversivo (DiMicco, 1987)

Curiosamente, a microinjeção de muscimol no HDM tem pouco ou nenhum efeito sobre a pressão arterial ou frequência cardíaca basal em ratos anestesiados ou acordados (DiMicco, 1987). Isso indica que a inibição do HDM suprime mecanismos que, uma vez ativados, produzem alterações cardiovasculares que se assemelham àquelas encontradas diante de um estresse emocional. Além disso, estes mecanismos de controle hipotalâmicos que são responsáveis pelas alterações cardiovasculares perante um estresse emocional agudo devem ser latentes, ou seja, estão presentes mas não estão ativos, ou relativamente inativos, sob condições basais (Lisa *et. al.*, 1989). Portanto, o HDM é um núcleo crítico na resposta cardiovascular frente ao estresse emocional e suas vias descendentes envolvidas na resposta cardiovascular ao estresse têm sido mapeadas (Fontes *et al.*, 2011).

Surpreendentemente, o entendimento da contribuição do HDM nas respostas fisiológicas frente ao estresse emocional agudo tem sido exploradas basicamente em um único modelo, o “air jet stress” (Lisa *et. al.*, 1989, Stotz-Potter *et al.*, 1996a, Stotz-Potter *et al.*, 1996b, Xavier *et al.*, 2009). Como descrito acima, os circuitos cerebrais envolvidos podem ser distintos frente à estímulos estressores diferentes (Pacak e Palkovits, 2001). Dessa forma, torna-se importante reavaliar o papel do HDM no controle das respostas fisiológicas ao estresse emocional agudo diante de paradigmas diferentes.

## **2 Justificativa**

Em situações de estresse emocional agudo, o Sistema Nervoso Central é recrutado com consequentes alterações fisiológicas, dentre elas cardiovasculares, o que aumenta a probabilidade de sobrevivência da espécie. Por outro lado, em situações de estresse exacerbado, alterações autonômicas induzem a respostas cardiovasculares adversas que podem levar ao surgimento de doenças cardiovasculares como, por exemplo, a hipertensão, arritmia cardíaca, angina e em situações extremas à morte súbita.

Estudos demonstram que os circuitos cerebrais envolvidos nas respostas fisiológicas podem ser diferentes frente a estímulos estressores distintos. Desta forma, apesar da existência de estudos mostrando o papel claro do hipotálamo dorsomedial sobre o controle das respostas cardiovasculares ao estresse emocional agudo, a participação deste núcleo em diferentes paradigmas de estresse ainda não foi explorada.

### **3 Objetivo**

#### **3.1- Objetivo geral**

Reavaliar a contribuição do hipotálamo dorsomedial nas respostas cardiovasculares ao estresse emocional agudo utilizando o paradigma de estresse induzido por mudança de ambiente.

#### **3.2- Objetivos específicos**

3.2.1- Caracterizar a resposta cardiovascular induzida pelo estresse agudo induzido por mudança de ambiente avaliando o papel do componente simpático.

3.3.2- Avaliar o efeito da inibição dos neurônios do hipotálamo dorsomedial na resposta cardiovascular ao estresse agudo induzido por mudança de ambiente.

3.2.3- Avaliar a participação dos receptores NMDA no hipotálamo dorsomedial nas respostas cardiovasculares à exposição ao estresse agudo induzido por mudança de ambiente.

3.2.4- Avaliar o efeito da exposição ao estresse agudo induzido por mudança de ambiente na possível geração de arritmias cardíacas.

3.3.5- Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores NMDA no HDM na arritmogênese oriunda do estresse agudo induzido por mudança de ambiente

3.2.6- Avaliar o efeito do estresse agudo por “Cage Switch” nas respostas metabólicas.

3.2.7- Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores NMDA no HDM sobre os parâmetros metabólicos basais

## **4 Material e método**

### **4.1- Animais**

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar com peso entre 265-350 g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os procedimentos foram realizados de acordo com as regras estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA). Os animais foram mantidos em ambiente adequado com temperatura e luminosidade controladas, com livre acesso à ração e água. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG.

### **4.2- Anestesia**

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg) que foi administrado por via intraperitoneal e suplementado, em doses menores, quando necessário durante a cirurgia.

### **4.3- Procedimentos gerais**

#### **4.3.1- Confecção e implante de cânulas-guia:**

As cânulas-guia foram encaixadas no suporte da torre do aparelho estereotáxico e implantadas bilateralmente em direção ao HDM. A extremidade inferior de cada cânula foi fixada a 1,7 mm acima do HDM.

Os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico. A barra incisiva do estereotáxico foi posicionada em 3,3 mm abaixo da linha interaural e, por meio de duas barras auriculares, a cabeça foi mantida em uma posição fixa.

Após a assepsia da pele, foi realizada uma injeção subcutânea de anestésico local contendo vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% + epinefrina 1:200000) para provocar analgesia e vasoconstrição local, seguida de uma incisão mediana para exposição do crânio e localização do bregma, que foi o ponto de referência para a leitura dos parâmetros ântero-posterior, látero-lateral e dorso-ventral. Após a trepanação que consiste na abertura de um ou mais buracos no crânio, através de uma broca esférica odontológica, foram fixados dois parafusos ao crânio e implantadas as cânulas-guia bilaterais na direção do HDM.

O implante das cânulas guia foi realizado de acordo com as coordenadas estabelecidas pelo Atlas de Paxinos e Watson (1986) para o hipotálamo dorsomedial. [As coordenadas de localização do HDM são: -3.0 mm ântero-posterior, -7.0 mm dorso-ventral e + 0.6 mm ou - 0.6 mm látero-lateral a partir do bregma.

Posteriormente, as cânulas-guia foram fixadas através de um acrílico dental autopolimerizável e de pequenos parafusos de aço inoxidável inseridos na calota craniana. Um oclisor metálico de 15 mm foi introduzido na cânula-guia para evitar uma possível obstrução.

Ao término dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam uma dose intramuscular de 0,2 mL de pentabiótico veterinário (1:200000 UI) a título de profilaxia

para possíveis infecções decorrentes da cirurgia e receberam analgésico e anti-inflamatório Banamine (1,1 - 2,2 mg/kg). Posteriormente os animais foram mantidos em local aquecido até a recuperação da anestesia e retornaram para o biotério do laboratório, onde foram mantidos em caixas de polipropileno com livre acesso à água e comida por um período mínimo de 5 dias para recuperação.

#### **4.3.2- Canulação da artéria e veia femoral**

Um dia antes dos experimentos, foi realizada a canulação da artéria e da veia femoral, sendo que, a veia femoral foi canulada somente dos animais do grupo experimental com administração do atenolol . As cânulas foram confeccionadas a partir de um tubo de polietileno PE-10 (4 cm para a artéria e 2 cm para a veia) soldado por aquecimento a um tubo de polietileno PE-50 de 15 cm. Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução de salina (0,9%) e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com alfinetes de metal. Os animais foram novamente anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg i.p., suplementado se necessário). Os ratos foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma prancha cirúrgica e receberam uma incisão na região inguinal unilateral para visualização e dissecação do feixe vasculo-nervoso femoral. As cânulas foram introduzidas na aorta abdominal, através da artéria femoral, e na veia femoral e fixadas por amarraduras. Com o auxílio de um trocáter, as cânulas foram passadas pelo tecido subcutâneo até sua exteriorização na região interescapular. As incisões foram fechadas com pequenas suturas e, logo após, os animais foram levados para a sala de recuperação. Uma vez implantadas, a cânula arterial foi utilizada para

mensuração dos parâmetros cardiovasculares e a cânula venosa para administração sistêmica de drogas.

#### **4.3.3- Registro dos parâmetros cardiovasculares**

Para a realização dos registros dos parâmetros cardiovasculares durante o CSS foi utilizado o Biopac Systems e por meio do software Acknowledge 3.8 as oscilações de pressão arterial pulsátil (PAP) captadas permitiram calcular a PAM e a FC. A cânula inserida na artéria femoral foi acoplada a um transdutor de pressão (strain-Gauge-DT-XX Viggo-spectramed) ligado a um amplificador e a um sistema de conversão analógico-digital para aquisição de dados.

Para o registro do ECG, a cânula inserida na artéria femoral foi acoplada a um transdutor de pressão (MLT0699 ADInstruments) ligado a um amplificador e a um sistema de conversão analógico-digital para aquisição de dados. Foi utilizado o Power Lab 4/20 (ADInstruments) e, através do software LabChart 7.3.3, as oscilações de pressão captadas (PAP) permitiram calcular a PAM. Os eletrodos do ECG também foram acoplados a um amplificador e ao mesmo sistema. O sinal originou o registro da atividade elétrica cardíaca, sendo possível calcular a FC, analisar o eletrocardiograma e verificar a presença de arritmias.

#### **4.3.4- Procedimento de microinjeção no HDM**

As drogas foram injetadas no HDM utilizando-se uma seringa Hamilton de 5 µl, conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 à uma agulha injetora confeccionada

a partir de agulhas gengivais 30G. O comprimento das agulhas injetoras foi 1,7 mm maior que o comprimento das cânulas-guia para que as microinjeções atingissem o HDM. O volume total microinjetado no HDM foi sempre de 100 nl e a duração da microinjeção de aproximadamente 5 segundos com intervalo de aproximadamente 40 segundos entre um lado e outro.

#### **4.3.5- Confirmação histológica**

Logo após a eutanásia dos animais, foi microinjetado 100 nl do corante Alcian Blue no HDM, para confirmação subsequente dos sítios das microinjeções. Em seguida, os cérebros foram retirados e mantidos em solução de formolaldeído 10%, por pelo menos 7 dias. Após isto, os cérebros foram transferidos para uma solução de sacarose 20%, onde permaneceram por até 48 horas. Após esse período, os cérebros foram seccionados no sentido transversal, em fatias de 80µm, por meio de um criostato (Micron, International GmbH, Waldorf, Alemanha). As fatias foram fixadas em lâminas gelatinizadas e coradas com vermelho neutro 1% através da técnica de Nissl. Os mesmos foram analisados por microscopia óptica para a confirmação histológica. Os sítios de microinjeção foram confirmados utilizando como referência o Atlas de Paxinos e Watson (2002).

#### **4.3.6- Análise glicêmica e da corticosterona**

Em cada amostra foram coletados aproximadamente 200 ul de sangue em tubos de polietileno previamente heparinizados. Após a colheita sanguínea, o sangue arterial foi centrifugado e o plasma separado, transferido para eppendorff e armazenados a -80°C. As

concentrações séricas de glicose foram determinadas por kit enzimático (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). A quantificação da concentração de corticosterona sérica foi realizada através da técnica de ELISA, utilizando-se um kit específico (Corticosterone EIA Kit, Cayman Chemical, Michigan, USA)

#### **4.3.7- Drogas**

O grupo controle recebeu microinjeção de veículo, salina estéril 0,9%.

Para a inibição bilateral do HDM foi utilizado o agonista GABA<sub>A</sub>, muscimol (Sigma Chemical, St. Louis, MO), na concentração de 100 pmol/100 nl, diluído em salina estéril.

Para o bloqueio bilateral dos receptores NMDA do HDM foi utilizado AP-5 (Ácido DL-2-amino-5-fosfonopentanóico - antagonista glutamatérgico NMDA - Sigma Chemical, St. Louis, MO) na concentração de 100 pmol diluída em 100 nL de solução salina fisiológica estéril.

Para o bloqueio dos receptores  $\beta$ 1 adrenérgicos foi utilizado atenolol (Sigma Chemical, St. Louis, MO) na dose de 2 mg/kg, diluída em 1 mL de salina estéril.

#### **4.4. Protocolos experimentais**

##### **4.4.1- Protocolo 1**

Para avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo CSS e a contribuição do HDM na resposta cardiovascular ao CSS foram realizados quatro grupos experimentais. No primeiro grupo, não foi realizado nenhum tipo de microinjeção central (grupo intacto). Posteriormente, avaliou-se o efeito da microinjeção bilateral de veículo (salina 0,9%, 100 nl, grupo veículo), muscimol um agonista gabaérgico (100pmol/100nl, grupo muscimol) e AP-5 um antagonista dos receptores NMDA (100pmol/100nl, grupo AP-5) no HDM sobre a resposta cardiovascular ao CSS. As microinjeções foram efetuadas bilateralmente no HDM para maximizar o efeito da inibição do núcleo, uma vez que o controle do HDM sobre a frequência cardíaca ocorre de maneira assimétrica (Xavier et al. 2009).

O modelo de estresse utilizado foi o estresse por mudança de ambiente o CSS que consiste em um modelo agudo e leve de estresse emocional, parcialmente modificado da versão campo aberto (open field stress) (Long et al., 1990, Johnson Rowsey et al., 2002). Após 20 minutos de estabilização dos parâmetros cardiovasculares, é realizada a microinjeção na metade deste tempo ( $t=0$ ). Posteriormente, o animal é simplesmente transferido manualmente pela cauda de sua caixa para uma caixa ocupada previamente por um outro animal, representando um novo ambiente ( $t=10$ ) (figura 1). O CSS teve a duração de 20 minutos. Após este período o rato era retornado para a sua caixa de origem ( $t=30$ ) e os parâmetros cardiovasculares continuaram a ser monitorados durante mais 20 minutos (figura 1).

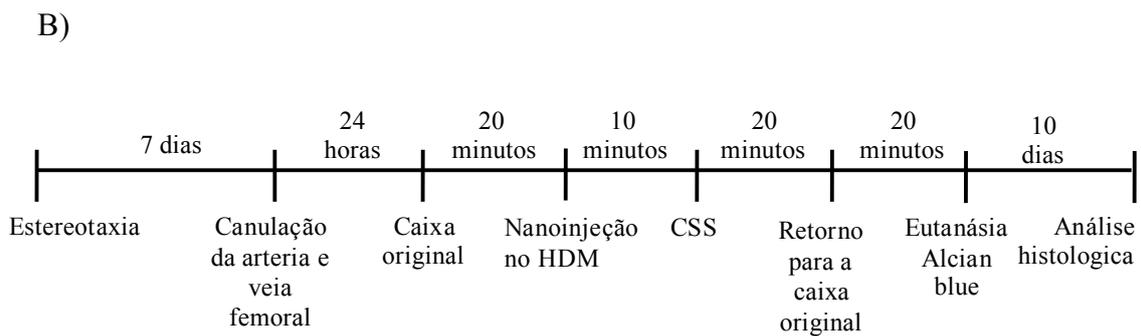
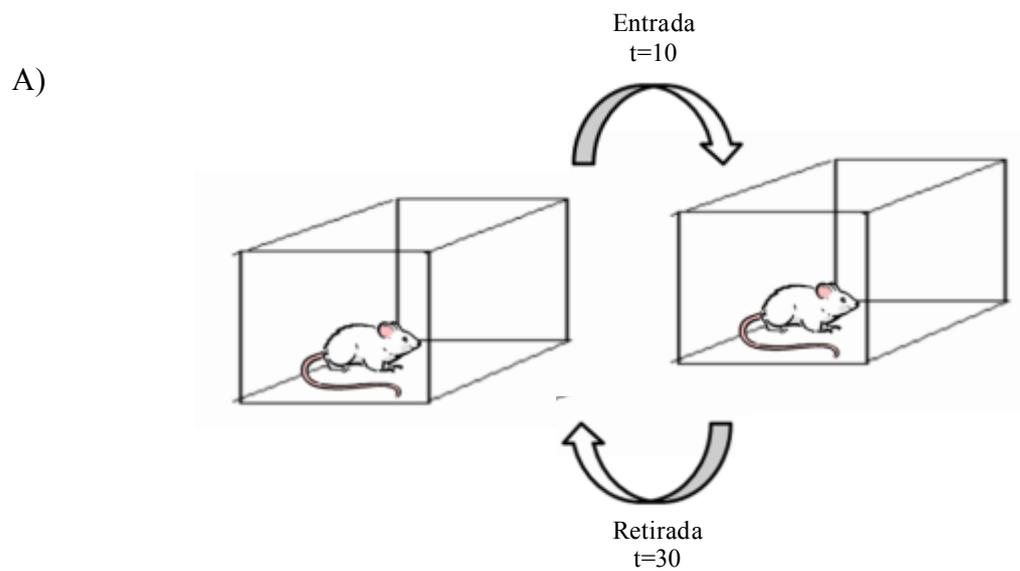


Figura 1. Desenho representativo do paradigma de estresse por cage switch. Os parâmetros cardiovasculares foram avaliados durante o basal, no momento de troca de caixa, ao longo do estresse e após o estresse. B: Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação da participação do HDM nas respostas cardiovasculares ao estresse por mudança de ambiente e da participação do HDM na mediação destas respostas.

#### 4.4.2- Protocolo 2

Para avaliar se a reatividade cardíaca observada no momento de transferência dos ratos no CSS era mediada pela ativação dos receptores  $\beta_1$  adrenérgicos, ou seja, pela ação do sistema nervoso autônomo simpático, um grupo separado de animais foi tratado com atenolol (antagonista seletivo de receptores  $\beta_1$  adrenérgicos) por via intravenosa (i.v.) na dose de 2 mg/kg, diluída em 1 mL de salina estéril. Após o registro das alterações cardiovasculares basais promovidas pelo atenolol os animais foram exposto ao estresse por mudança de ambiente (figura 2).

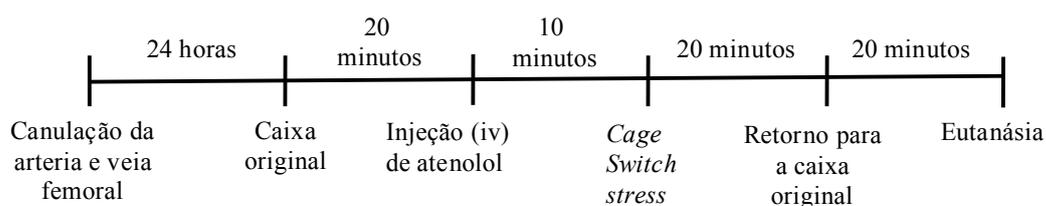


Figura 2. Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação da ativação do tônus autonômico simpático.

#### 4.4.3- Protocolo 3

Para avaliar a possível presença de arritmias cardíacas induzidas pelo CSS, no momento de entrada, foi realizada a análise do eletrocardiograma (ECG). Os ratos foram previamente submetidos a cirurgia de estereotaxia para implantação de canulas guia na direção do HDM. Após sete dias de recuperação os ratos foram posicionados em decúbito dorsal para canulação da artéria femoral e para a inserção dos três eletrodos. O eletrodo positivo foi posicionamento na extremidade inferior do manúbrio esternal através de

incisão na superfície ventral do pescoço. O eletrodo negativo foi posicionado embaixo do processo xifóide e fixado a ele. O eletrodo neutro foi fixado na região interescapular (Sgoifo et al., 1996) (figura 3). O dado da atividade elétrica cardíaca permitiu calcular a FC e verificar possíveis eventos arrítmicos.

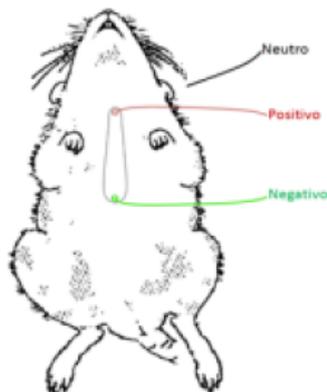


Figura 3. Desenho representativo do posicionamento dos eletrodos para o ECG.

#### 4.4.4- Protocolo 4

Para avaliar se o estresse por mudança de ambiente foi capaz de alterar as respostas metabólicas, dosagens de glicose e corticosterona foram realizadas em vários momentos de exposição ao CSS. A colheita sanguínea foi realizada pela artéria femoral e deu-se no tempo 0 (B) referente ao basal, no décimo e vigésimo minutos durante o CSS ( $t=10$  e  $t=20$ ) e nos tempos 30 e 40 ( $t=30$  e  $t=40$ ) que correspondiam a 10 e 20 minutos após o retorno do rato a sua caixa de origem (figura 4).

Os parâmetros cardiovasculares foram registrados ao longo de todo o experimento.

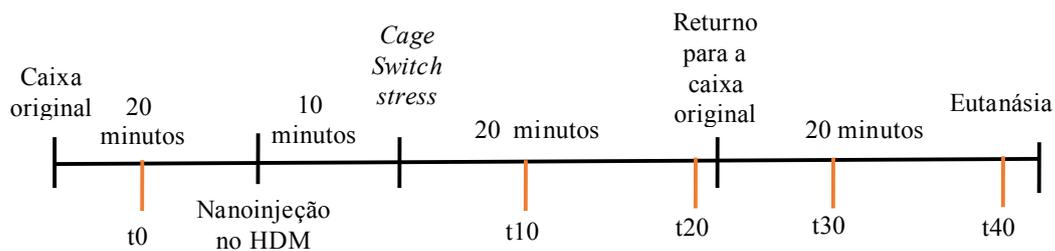


Figura 4. Esquema representativo do procedimento experimental para análise das respostas metabólicas ao estresse por mudança de ambiente. As linhas laranjas representam o momento de retirada do sangue arterial para análise da concentração sanguínea de glicose e de corticosterona.

#### 4.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $x \pm \text{epm}$ ). Na análise estatística dos resultados entre grupos foi utilizado o teste *t* de Student ou a análise de variância (ANOVA one way), seguida pelo teste Newman Keuls. Para comparação entre grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA two-way), seguido pelo teste de Bonferroni. O nível de significância foi fixado em  $P < 0,05$ . Diferenças com  $p < 0,05$  foram representadas graficamente com um asterisco (\*); diferenças com  $p < 0,01$  foram representadas com dois asteriscos (\*\*).

## **5 Resultados**

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: intacto, veículo HDM, muscimol HDM e AP-5 HDM. Os valores basais dos parâmetros cardiovasculares PA e FC não foram diferentes entre os grupos experimentais e estão apresentados na figura 16 no apêndice 1.

### **5.1- Efeito da exposição ao CSS sobre os parâmetros cardiovasculares**

Os traçados típicos representativos dos grupos controles, intacto (n=9) e veículo HDM (n=7), submetidos ao estresse por mudança de ambiente estão representados na figura 5. É possível observar que, em ambos os grupos, o estresse por mudança de ambiente resulta imediatamente em um pico de resposta pressora e taquicárdica (entrada) como mostrado na figura 6A. Subseqüentemente, a pressão arterial e a frequência cardíaca permanecem elevadas durante a presença do animal no novo ambiente e um novo pico de resposta pressora e taquicárdica são observados quando do retorno do animal à sua caixa de origem (retirada).

As alterações médias máximas na PA e FC evocadas pelo CSS em ambos os grupos controles no momento de entrada são ilustradas na figura 6B. O grupo intacto apresentou um aumento de PA de  $60 \pm 2$  mmHg e de FC de  $119 \pm 12$  bpm e o grupo veículo apresentou um aumento de  $60 \pm 3$  mmHg na PA e de  $121 \pm 11$  bpm na FC. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os dois grupos (grupos controles)

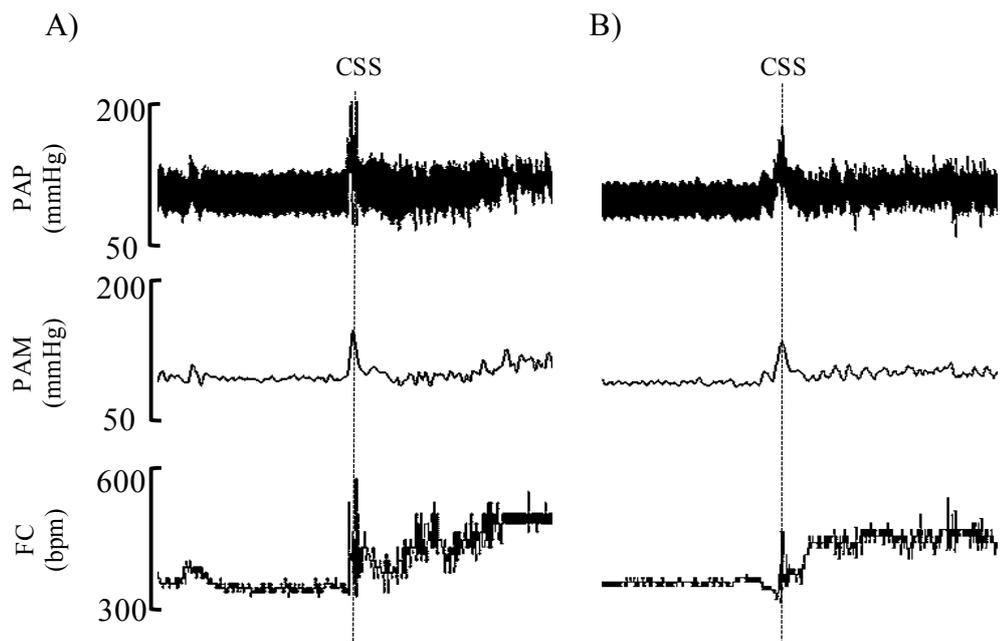
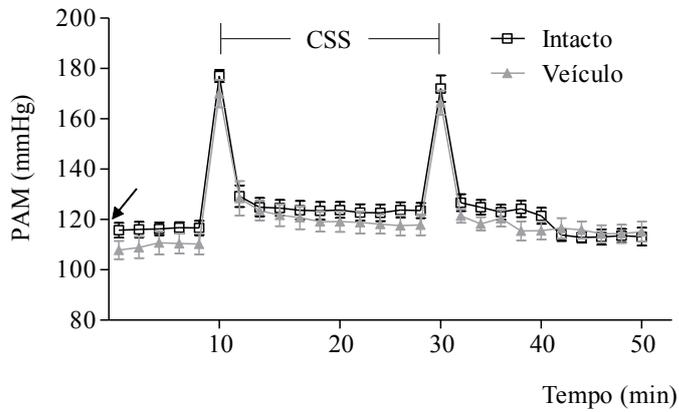


Figura 5. Traçados representativos das respostas de pressão arterial (PA) e de frequência cardíaca (FC) de ratos submetidos à exposição aguda ao estresse por mudança de ambiente (CSS) A: grupo intacto; B grupo veículo HDM.

A)



B)

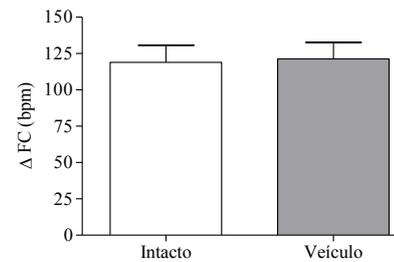
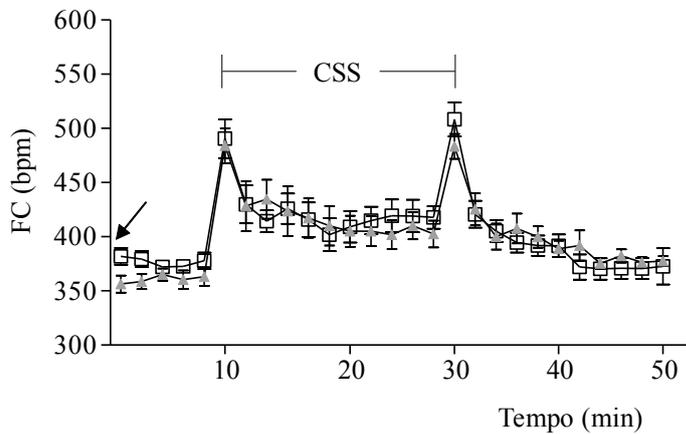
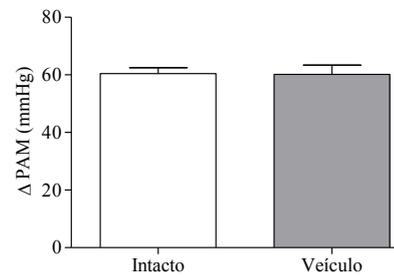
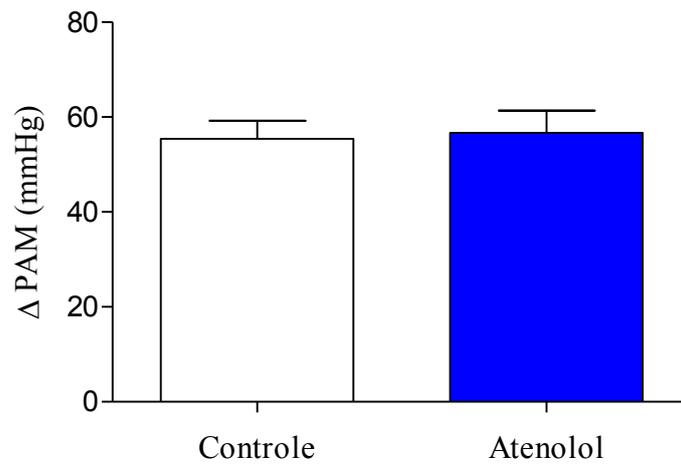


Figura 6. A: Alterações da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) induzidas pelo estresse por mudança de ambiente (CSS; t10-t30) ao longo do tempo. Cada rato foi submetido a um único tratamento experimental; intacto (símbolo aberto, n=9) e veículo HDM (salina 100nl, símbolo fechado, n=7). O momento da microinjeção está representado pela seta. B: alterações médias da PA e FC em relação aos valores basais pela manipulação do rato no momento de entrada ao estresse (t10). A: ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni. B: T test

## **5.2- Avaliação do componente simpático sobre as alterações cardiovasculares induzidos pelo CSS**

Com o intuito de avaliar se as respostas pressora e taquicárdica observadas nos momentos de manipulação do animal não seriam provenientes da presença de artefatos mas sim originários da reatividade fisiológica promovida pelo paradigma de CSS, foi realizado o bloqueio dos receptores  $\beta_1$  adrenérgicos. Para isso, em um grupo separado, os ratos foram tratados previamente com atenolol intravenoso na concentração de 2 mg/kg. Após estabilização dos parâmetros cardiovasculares os animais foram expostos ao CSS. A injeção i.v. de atenolol (n=6) promoveu redução nos valores basais de FC ( $413 \pm 27$  bpm basal vs  $378 \pm 27$  bpm após o atenolol,  $p < 0,03$ ), sem alterar a PA ( $108 \pm 12$  mmHg basal vs  $112 \pm 12$  mmHg após o atenolol). O bloqueio de receptores  $\beta_1$  adrenérgicos praticamente aboliu a reatividade cardíaca à exposição ao CSS sem alterar a resposta pressora (figura 7).

A)



B)

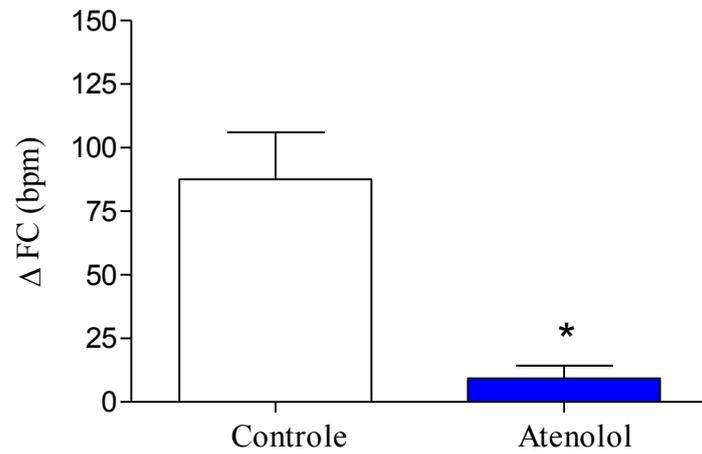
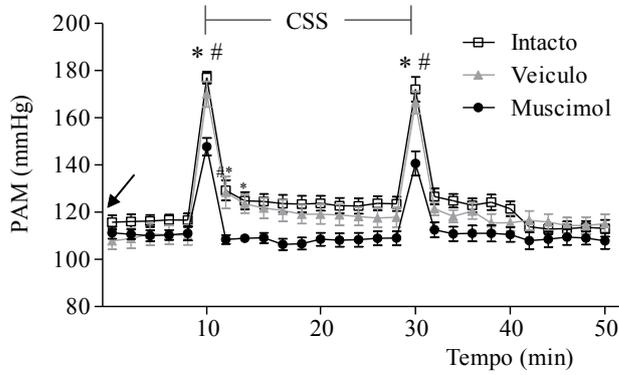


Figura 7. Alterações médias máximas de PA (mmHg) e FC (bpm) induzidas pelo CSS no momento de entrada ao paradigma em ratos controle (barra branca n=6) ou em ratos tratados com atenolol (i.v. 2 mg/kg, barra azul n=6). Teste T, \*P<0.05.

### **5.3- Efeito da inibição do Hipotálamo Dorsomedial sobre a resposta cardiovascular induzida pelo CSS**

A inibição bilateral do HDM por meio da microinjeção do agonista gabaérgico muscimol na dose de 100 pmol/100 nl (n=8) foi capaz de atenuar as respostas pressora ( $\Delta$ PAM: 37 $\pm$ 4 mmHg muscimol, 60  $\pm$  3 mmHg veículo e 60  $\pm$  2 mmHg intacto) e taquicárdica ( $\Delta$ FC: 62 $\pm$ 7 bpm muscimol, 121  $\pm$  11 bpm veículo e 119  $\pm$  12 bpm intacto) induzidas pelo CSS. No grupo muscimol os parâmetros cardiovasculares permaneceram abaixo dos valores observados nos grupos controles ao longo de todo o período de estresse. (Figura 8).

A)



B)

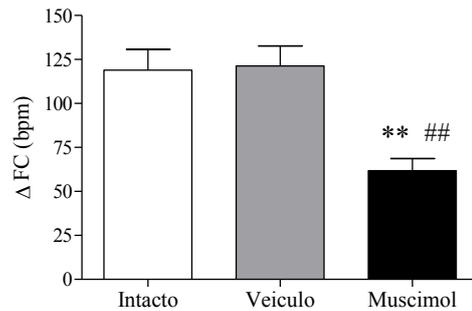
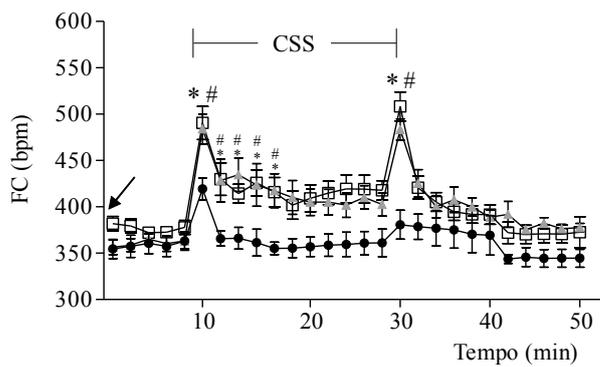
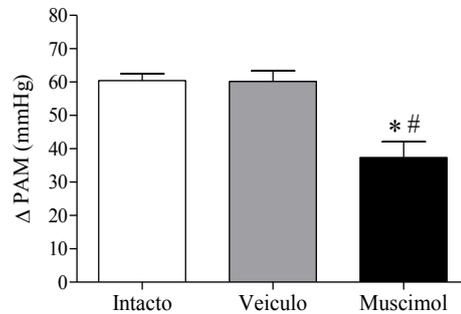


Figura 8. Efeito da microinjeção de muscimol no HDM sobre parâmetros cardiovasculares de ratos submetidos ao CSS. A: Alterações de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) em função do tempo produzidas pelo CSS após a microinjeção de salina (100 nl; símbolos cinza), ou muscimol no HDM (100 pmol/100 nl; símbolo preto) e grupo intacto (símbolo branco) seguidos da realização do CSS (t10 min até t30 min). A seta indica o momento da microinjeção para os grupos veículo ou muscimol no HDM (t0) B: Alterações média máxima (delta $\Delta$ ) da PAM e da FC no t10 em relação ao basal. A: ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni. B: ANOVA one-way seguido pelo teste de Newman Keuls. Diferença significativa entre a resposta ao estresse. \*  $P < 0.05$  ou \*\* $P < 0.01$  para grupo intacto vs muscimol HDM e #  $P < 0.05$  ou ## $P < 0.01$  para grupo veículo vs muscimol HDM.

#### **5.4- Efeito do bloqueio dos receptores NMDA no HDM sobre as respostas cardiovasculares provocadas pelo CSS**

Com o intuito de avaliar o envolvimento de receptores de EAA no HDM na geração da resposta cardiovascular ao CSS, avaliamos o efeito da microinjeção do antagonista dos receptores EAA, AP-5, no HDM sobre as respostas induzidas pelo CSS. Como observado na figura 8, a microinjeção do antagonista dos receptores NMDA, AP-5 (100 pmol/100 nl) no HDM reduziu de maneira importante a resposta pressora (AP-5 HDM  $\Delta$ PAM  $38 \pm 3$  mmHg, veículo HDM  $60 \pm 3$  mmHg e intacto  $60 \pm 2$  mmHg) e a resposta taquicárdica (AP-5 HDM  $\Delta$ FC  $31 \pm 7$  bpm, veículo HDM  $121 \pm 11$  bpm e intacto  $119 \pm 12$  bpm) em ratos expostos ao CSS.

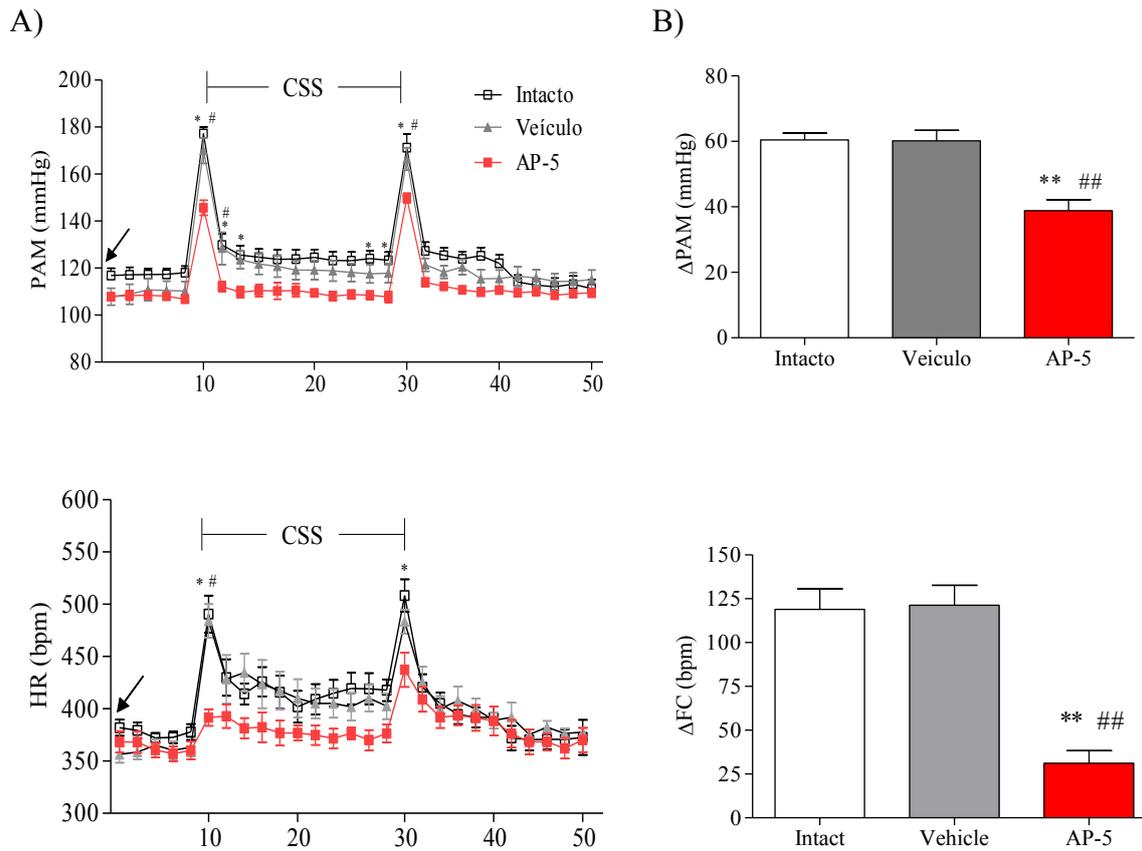


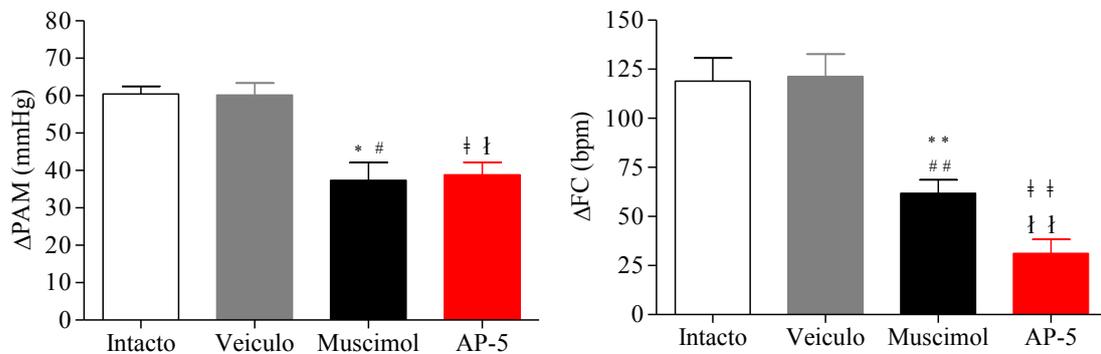
Figura 9. Efeito da microinjeção de AP-5 no HDM. A: Alterações de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) em função do tempo (minutos) produzidas pelo CSS após a microinjeção de salina (100 nL; símbolos cinza), ou AP-5 HDM (100 pmol/100 nL; símbolo vermelho) e do grupo intacto (símbolo aberto) seguidos da realização do estresse por mudança de ambiente (t10 min até t30 min). A seta indica o momento da microinjeção para os grupos veículo ou AP-5 no HDM (t0). B: Alterações média máximas (delta  $\Delta$ ) da PAM e da FC no t10 em relação ao basal. A: ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni. B: ANOVA one-way seguido pelo teste de Newman Keuls. Diferença significativa entre a resposta ao estresse. \*  $P < 0.05$  ou \*\*  $P < 0.01$  para AP-5 HDM vs grupo intacto e #  $P < 0.05$  ou ##  $P < 0.01$  para AP-5 HDM vs grupo veículo.

A microinjeção de AP-5 no HDM foi capaz de atenuar a resposta pressora e bloquear a resposta taquicárdica no momento de entrada ( $t=10$ ). Durante a permanência do animal no novo ambiente o grupo AP-5 mostrou valores de PAM significativamente abaixo dos valores encontrados nos grupos controles. No entanto, a FC apresentou-se abaixo dos valores dos grupos controles durante o período de permanência no estresse. Entretanto, estes valores não foram diferentes estatisticamente quando comparados aos grupos controles (figura 8A).

Quando analisados em conjunto é possível observar que tanto as microinjeções de muscimol como de AP-5 no HDM atenuaram as respostas cardiovasculares frente ao CSS. Este efeito pode ser visualizado de forma mais expressiva nos momentos de entrada e retirada do animal do ambiente estressor (Figura 9).

Já no momento de retirada do animal do estresse observa-se um novo pico de reatividade cardiovascular que foi atenuado na presença da microinjeção de muscimol tanto para a pressão arterial como para a frequência cardíaca. Por outro lado, o bloqueio dos receptores NMDA não atenuou significativamente as respostas pressora e taquicárdica no momento de retirada como observado no momento de entrada do animal (figura 9B).

### A) Entrada



### B) Retirada

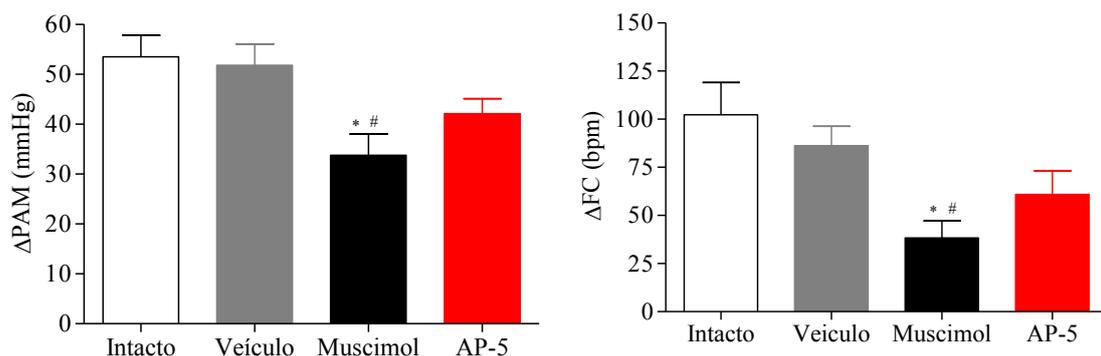


Figura 10. Alterações médias máximas de pressão arterial (PA) ou de frequência cardíaca (FC) observadas nos momentos de entrada (A) ou retirada (B) do animal no paradigma de CSS no grupo intacto (barra branca) ou nos grupos submetidos à microinjeção no HDM de: veículo (barra cinza, salina 100 nl), muscimol (barra preta, 100 pmol/100 nl) ou AP-5 (barra vermelha, 100 pmol/100 nl). \* $P < 0,05$  para diferenças entre o grupo Intacto vs muscimol, # grupo Muscimol vs Veículo. † grupo AP-5 vs Intacto e ‡ grupo veículo vs AP-5 ou \*\* $P < 0,01$  para diferenças entre o grupo Intacto vs muscimol, ## grupo Veículo vs Muscimol. †† grupo Intacto vs AP-5 e ‡‡ grupo veículo vs AP-5. ANOVA one way seguido de Newman Keuls.

A tabela 1 mostra os valores máximos de PA e FC coletados no momento de entrada (t10 min) e retirada (t30 min) do animal no paradigma de CSS em todos os grupos experimentais. Os efeitos observados nos grupos intacto e veículo no HDM indicam que não houve adaptação da resposta cardiovascular dos animais entre os dois momentos. No entanto, no grupo AP-5 pode-se observar que a resposta taquicárdica no momento de retirada foi significativamente maior que no momento de entrada do animal no estresse.

Tabela 1 Valores da variação/delta de PAM e FC produzidas durante os momentos t10 min (entrada) e retirada (t30 min) do animal no Cage Switch Stress.

Grupo	Entrada	Retirada	Entrada	Retirada
	(t=10 min)	(t=30 min)	(t=10min)	(t=30 min)
	$\Delta$ PAM(mmHg)		$\Delta$ FC(bpm)	
Intacto	60 $\pm$ 2	53 $\pm$ 4	119 $\pm$ 12	102 $\pm$ 17
Veículo	60 $\pm$ 8	52 $\pm$ 4	121 $\pm$ 11	86 $\pm$ 10
Muscimol	37 $\pm$ 4	32 $\pm$ 4	62 $\pm$ 7	38 $\pm$ 9
AP-5	39 $\pm$ 3	42 $\pm$ 3	31 $\pm$ 7	61 $\pm$ 12*

Valores são média  $\pm$  EPM. PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca. \* P<0,05 comparado com o efeito observado sobre a respectiva variável no momento de entrada do estresse do *cage switch* (teste t pareado).

### **5.5- Efeito da exposição ao CSS na geração de arritmias cardíacas; contribuição dos receptores EAA no HDM**

Com o objetivo de avaliar a possível geração de batimentos ectópicos, o ECG foi avaliado durante a exposição ao CSS em grupos separados de animais. A análise do ECG mostrou que durante o momento de manipulação do animal para transferi-lo de caixa (momento de entrada) no grupo veículo (n=6) houve a presença de batimentos ectópicos ( $3\pm 1,3$ ). Em sua maioria os eventos são característicos pela presença de extra sístoles ventriculares. No grupo submetido à microinjeção de AP-5 no HDM a taquicardia no momento de entrada foi reduzida como anteriormente observado bem como o número de arritmia foi diminuído ( $1,5\pm 0,8$ ;  $P=0,0362$ ) (figuras 10 e 11).

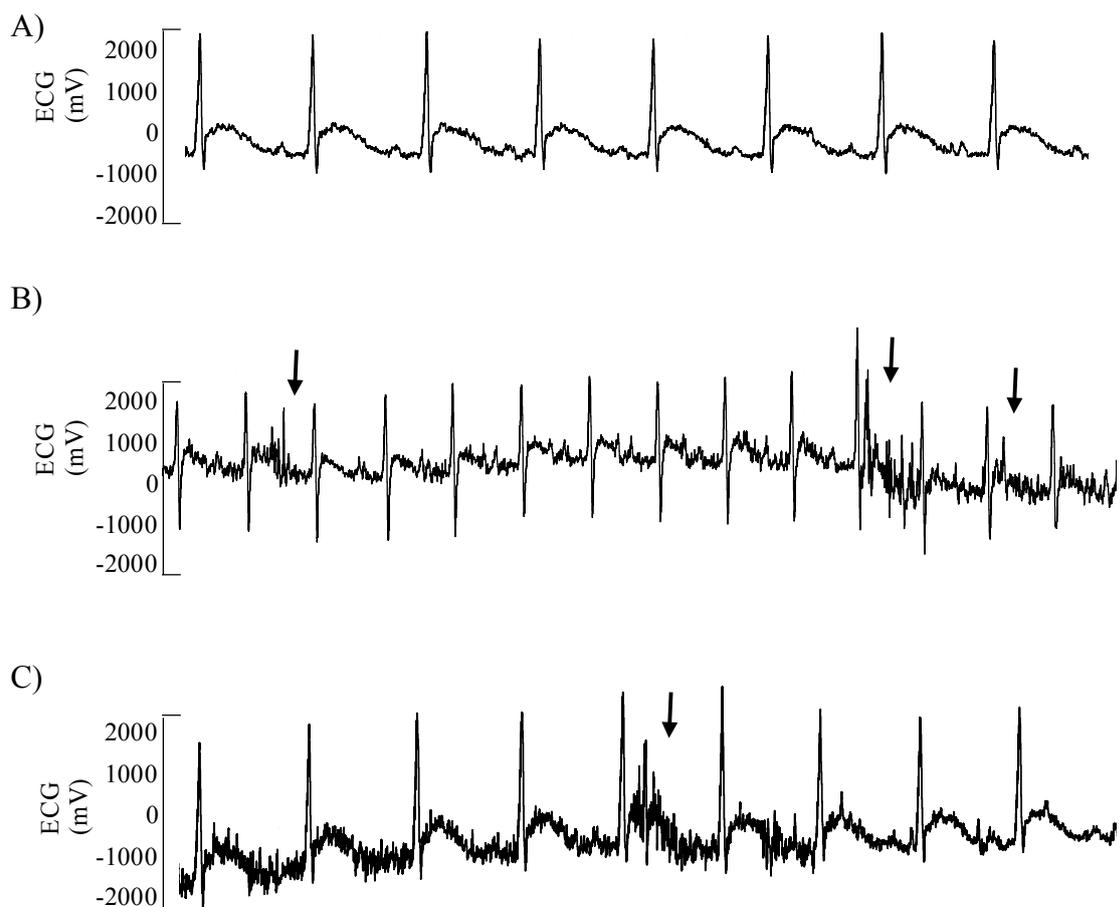


Figura 11. Traçado representativo do ECG dos ratos no momento de entrada do CSS. A: representa o traçado normal durante o período basal, B: grupo veículo durante o momento de entrada e C: do grupo AP-5 durante o momento de entrada. As setas indicam eventos ectópicos.

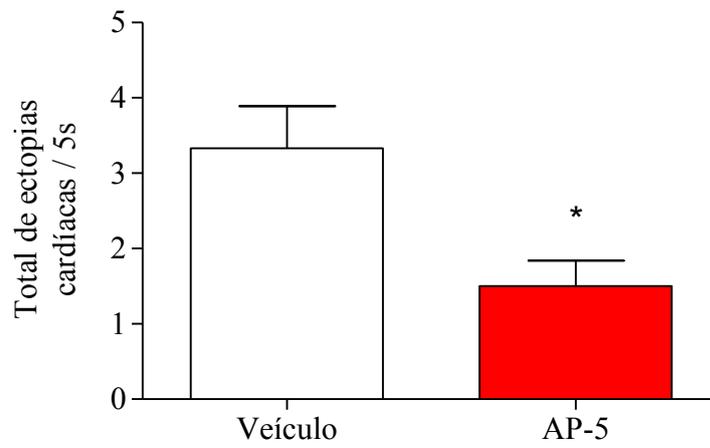


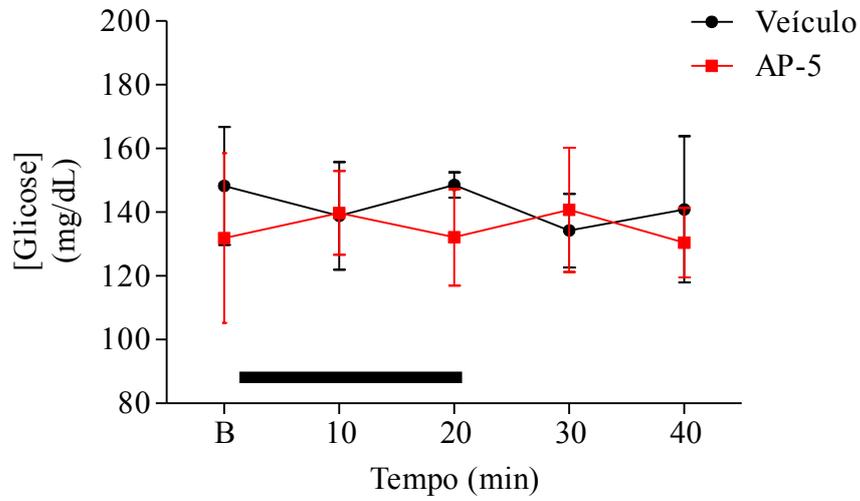
Figura 12. Batimentos ectópicos presentes no momento de entrada do CSS (tempo total de 5s). A coluna branca representa o grupo que recebeu microinjeção de veículo no HDM (salina 0,9%) e a barra vermelha representa o grupo AP-5 no HDM (100 pmol/100 nl). Teste T, \*P<0,05.

## **5.6- Efeito do CSS sobre a concentração sanguínea de glicose e corticosterona**

Considerando que glicose e corticosterona são parâmetros metabólicos importantes como marcadores da resposta ao estresse, nós avaliamos o efeito do CSS sobre estes parâmetros. Como observado na figura 12 não foram encontradas alterações nas concentrações plasmáticas de glicose e corticosterona, resultantes da exposição ao CSS nos grupos veículo HDM nem mesmo no grupo AP-5 HDM (100 pmol/100 nl).

Para a contraprova destes resultados, um grupo separado de animais foi exposto ao estresse por contenção e foi realizada a colheita do sangue conforme realizado no CSS. Observa-se que, durante e após o estresse por contenção a glicose sanguínea apresentou-se elevada em comparação aos demais grupos veículo HDM e AP-5 HDM (apêndice 2).

A)



B)

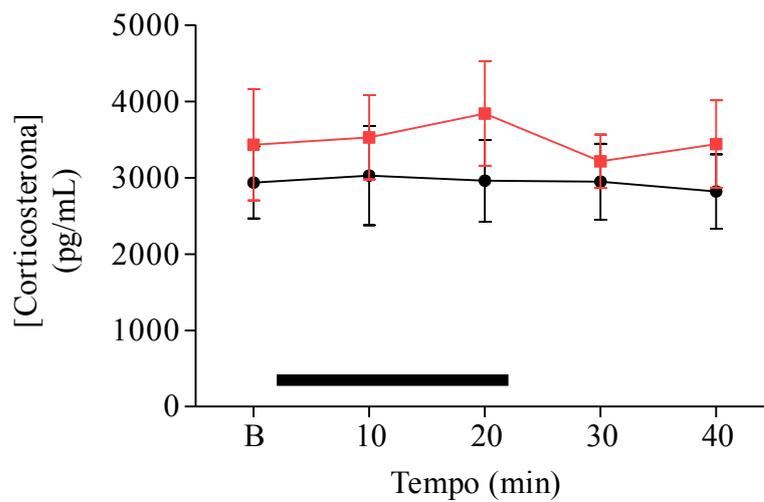


Figura 13. Análise temporal (em minutos) dos valores plasmáticos de glicose (A) e corticosterona (B) de ratos submetidos ao CSS. A barra preta representa o momento do estresse. B: valores basais, t=10 e t=20 valores obtidos nos tempos 10' e 20' durante o estresse e t=30 e t=40 valores obtidos no período de recuperação.

## 5.7- Análise histológica

A análise histológica confirmou que todos os sítios de injeção dos experimentos incluídos na análise experimental estavam localizados na região do HDM (Paxinos & Watson, 1998). Experimentos em que os sítios de microinjeção encontravam-se fora do HDM não foram incluídos nesta análise

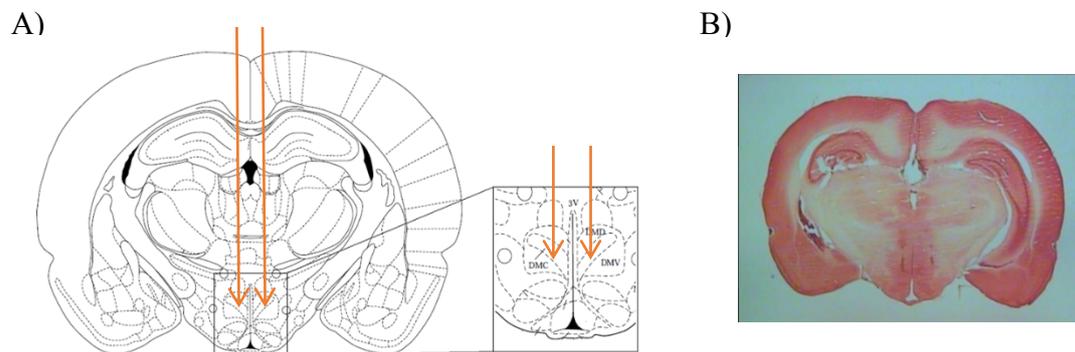


Figura 14. Diagrama esquemático das secções coronais de cérebro de rato ilustrando os sítios de microinjeção no HDM. A) Representação esquemática do cérebro de rato ilustrando os sítios de microinjeção no HDM. B) Fotomicrografia de um corte coronal (80  $\mu$ m) para verificação histológica do sítio de microinjeção na região do HDM.

## 6 Discussão

Este estudo procurou caracterizar as alterações cardiovasculares e metabólicas ao paradigma de estresse por mudança de ambiente (*Cage Switch Stress- CSS*). A partir dos experimentos baseados neste paradigma confirmamos que o HDM é um núcleo crítico para a geração das respostas cardiovasculares em diferentes situações de estresse agudo. Adicionalmente, nossos resultados confirmaram estudos prévios indicando que os receptores NMDA no HDM estão envolvidos na geração das respostas cardiovasculares ao estresse.

Achados prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que a ativação (por meio da microinjeção de NMDA) da região infra-límbica, uma região envolvida nas respostas autonômicas e neuroendócrinas ao estresse emocional, atenua as respostas cardiovasculares ao estresse pelo jato de ar. No entanto, a ativação desta região não foi capaz de produzir o mesmo efeito quando o rato foi exposto ao CSS (Müller-Ribeiro *et al.*, 2012). Nesse sentido, o papel do HDM no controle autonômico ao estresse agudo tem sido explorado em um único modelo de estresse, o estresse por jato de ar (Lisa *et al.*, 1989, Soltis e DiMicco, 1992, Stotz Potter, 1996 a,b, Xavier *et al.*, 2009). Sendo assim, o presente estudo optou por avaliar a participação do HDM no controle das respostas cardiovasculares ao estresse agudo frente a um diferente paradigma. O paradigma de jato de ar é considerado um modelo de estresse agudo potente por combinar estressores físicos e emocionais. Já, o paradigma de CSS é caracterizado por ser um modelo psicossocial mediado por estímulos olfatórios e capaz de produzir alterações cardiovasculares sustentadas (Davern, *et al.*, 2009). Em confirmação a estudos prévios (Lisa *et al.*, 1989, Stotz Potter, 1996 a, b, DiMicco *et al.*, 2002), no presente estudo, a microinjeção bilateral do agonista dos receptores GABA<sub>A</sub> muscimol no HDM atenuou as alterações

cardiovasculares tanto no momento de entrada quanto ao longo da exposição do rato frente ao CSS. O muscimol é um potente inibidor neuronal (Brown et al., 1981). Dessa forma, é possível afirmar que o HDM está envolvido na modulação das respostas cardiovasculares frente a diferentes situações de estresse agudo.

Nossos dados mostraram que nos grupos controle (intacto e veículo HDM), o CSS causou aumento marcante da pressão arterial e frequência cardíaca no momento de entrada do rato no novo ambiente. Estas alterações cardiovasculares foram mantidas ao longo dos 20 minutos de exposição ao estresse e uma nova reatividade cardiovascular foi observada quando o rato foi novamente manipulado para ser retirado do CSS e recolocado em sua caixa de origem. Os registros das alterações cardiovasculares foram obtidos por meio da canulação da arterial femoral. Desta forma, poderia ser questionado que a presença dos picos de PA e de FC poderiam ser consequentes da presença de artefatos resultantes da manipulação destes animais. Esta possibilidade pode ser descartada visto que o bloqueio dos receptores  $\beta_1$  adrenérgicos foi capaz de praticamente abolir a resposta taquicárdica provocada pela manipulação do animal no momento de entrada no CSS. Entretanto, a resposta pressora no momento de entrada no CSS não foi afetada com o bloqueio dos receptores  $\beta_1$  adrenérgicos. Estes resultados corroboram com os achados de Lee e colaboradores em 2004 que observaram que camundongos previamente tratados com atenolol na água de beber durante sete dias tiveram a FC atenuada durante a manipulação do CSS, entretanto a resposta pressora provocada pela manipulação não foi afetada (Lee *et al.*, 2004). Dessa forma, duas conclusões podem ser levantadas em função destes resultados. Primeiro, observa-se que o momento de manipulação do rato no CSS resulta em uma resposta taquicárdica marcante mediada por aumento do tônus simpático para o coração. Segundo, a observação de que o atenolol não alterou a magnitude da resposta pressora no CSS sugere que a resposta pressora seja mediada, principalmente,

pelo aumento da resistência vascular periférica. Este fenômeno pode ser explicado pela presença de vias distintas para o controle da PA e da FC nas respostas ao estresse emocional agudo controlados pelo HDM (Fontes *et al.*, 2014). Quando ativado, o HDM estimula a raphe pallidus (RP) que é considerado um núcleo importante para a resposta taquicárdica essencialmente simpatoexcitatória provocada pelo estresse, e concomitantemente o HDM estimula o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) responsável pela resposta vasomotora ao estresse emocional agudo (Fontes *et al.*, 2001)

As investigações sobre a importância do HDM na modulação das respostas autonômicas durante o estresse agudo não é algo recente. Um estudo pioneiro de Lisa e colaboradores em 1989 observaram que o HDM desempenha um papel crucial no controle dos mecanismos centrais responsáveis pelas respostas cardiovasculares ao estresse por jato de ar (Lisa *et al.*, 1989). Posteriormente, Stotz-Potter e colaboradores em 1996 confirmaram os achados e Lisa e colaboradores a respeito da importância do HDM não somente nas respostas cardiovasculares ao estresse agudo como também estenderam a sua importância no controle das respostas neuroendócrinas (Stotz-Potter 1996a, b). Mais recentemente, Xavier e colaboradores em 2009 não só reafirmaram a importância do HDM no controle das respostas autonômicas ao estresse agudo como também evidenciaram que a influência do HDM nestas respostas ocorre de maneira assimétrica pelos hemisférios cerebrais, mostrando a existência de uma lateralização funcional durante o estresse emocional agudo, sendo que o lado direito do HDM (Xavier *et al.*, 2009) está mais relacionado com a resposta cronotrópica ao estresse e a geração de ectopias (Xavier *et al.*, 2013).

No presente estudo, o bloqueio dos receptores NMDA no HDM atenuou as respostas pressora e taquicárdica no momento de entrada ao CSS. Estudos anteriores

confirmam a participação dos receptores NMDA no HDM na geração das respostas cardiovasculares ao estresse. A microinjeção dos agonistas dos receptores EAA (NMDA, AMPA e KA) no HDM de ratos acordados é capaz de produzir aumentos da frequência cardíaca acompanhado por aumentos modestos na pressão arterial. Dando continuidade a estes achados, a microinjeção do ácido quinurênico um antagonista não seletivos dos receptores glutamatérgicos no HDM é capaz de atenuar as respostas pressora e taquicárdica quando o rato é exposto ao estresse por jato de ar (Soltis & DiMicco, 1992). Por outro lado, no período de permanência do CSS, o bloqueio dos receptores NMDA no HDM atenuou apenas a resposta pressora não sendo eficiente para atenuar a taquicardia durante o período de permanência do CSS. Estudos prévios de Soltis e DiMicco demonstraram que o bloqueio dos receptores EAA no HDM com AP-5 reduziu a resposta taquicárdica evocada pelo estresse por jato de ar enquanto que a resposta pressora foi preservada (Soltis & DiMicco, 1992). Estes mesmos autores mostraram que o bloqueio simultâneos dos receptores NMDA e não-NMDA no HDM foi capaz de potencializar a atenuação da resposta taquicárdica ao estresse por jato de ar em aproximadamente 60%. Desta forma, o fato de não termos observado atenuação da FC no período de permanência do rato no CSS pode ser explicado pela atividade de receptores não-NMDA, provavelmente responsáveis pela reatividade cardíaca durante o período de permanência animal no paradigma. Vale a pena ressaltar, entretanto, que os experimentos realizados por Soltis e DiMicco mostraram que esta atenuação da FC, quando do bloqueio dos receptores NMDA, foi também observada por um curto prazo somente nos primeiros 5 minutos de estresse por jato de ar.

Outros fatores podem ser apontados para justificar o motivo pelo qual o bloqueio dos receptores NMDA não atenuou a FC durante o período de permanência do rato no CSS. Observa-se nos grupos controles (intacto e veiculo HDM) que o aumento da FC

ocorre de forma súbita e sustentada ao longo de todo o estresse. Como sugerido por Soltis e DiMicco, isto pode indicar que a concentração dos aminoácidos excitatórios nas sinapses do HDM pode continuar a subir superando o bloqueio farmacológico dos receptores (Soltis e DiMicco, 1992). Uma outra possibilidade é a participação de outros neurotransmissores, não só glutamatérgicos, que podem estar envolvidos na mediação das alterações cardiovasculares evocadas pelo CSS.

Ao contrário do observado no momento de entrada no CSS, nossos experimentos mostraram que o bloqueio dos receptores NMDA no HDM não atenuou a resposta pressora ou taquicárdica induzida pelo momento de retirada. Como sugerido por Soltis e DiMicco (1992) isso pode ser explicado pela duração do efeito do AP-5, sendo limitada pela sua difusão ou metabolismo o que pode justificar a ineficácia desta droga em atenuar as repostas cardiovasculares no momento de retirada do animal do CSS (Soltis e DiMicco, 1992).

Estudos populacionais mostram um aumento na incidência de morte súbita após períodos de estresse psicológico, como desastres naturais ou guerras. Como exemplo pode-se citar o atentado no dia 11 de setembro de 2001 com o ataque ao *World Trade Center* em que houve um aumento de dois terços no número de arritmias ventriculares 30 dias após o atentado (Steinberg *et al.*, 2004). O estresse emocional é apontado como um fator de risco que leva ao surgimento de doenças cardiovasculares (Sgoifo *et al.*, 2015) e de arritmias cardíacas por meio de perturbações autonômicas (Lampert *et al.*, 2000; Ziegelstein RC, 2007; Dimsdale JE, 2008). A estimulação simpática e/ou redução do tônus vagal tem sido estabelecidas como fatores pro-arrítmicos, enquanto que o aumento do tônus parassimpático é considerado como um fator protetor. Neste sentido, estas

alterações podem ser um gatilho para a geração de arritmias tanto atriais quanto ventriculares (Taggart *et al.*, 2011, Lampert R. 2015).

Os mecanismos, embora incompletamente compreendidos, incluem o processamento central até a electrofisiologia do miocárdio (Taggart *et al.*, 2011). Evidências indicam que emoções negativas, como um estresse emocional agudo, têm efeito assimétrico sobre a atividade cortical com maior ativação do hemisfério direito em comparação ao esquerdo. Esta ativação assimétrica influencia vários outros núcleos como o núcleo do trato solitário, o tálamo e o hipotálamo incluindo o HDM (Fukuda *at el.*, 2015) de maneira ipsilateral. Ipsilateralmente, este estímulo continua sendo transmitido do tronco encefálico para os nervos autonômicos que por sua vez são distribuídos assimetricamente no miocárdio ventricular (Taggart *et al.*, 2011). Estudos do nosso laboratório mostraram que as vias descendentes originadas no HDM são lateralizadas no controle das respostas cronotrópicas e inotrópicas com predomínio do lado do lado direito (Xavier *et al.*, 2013). Os experimentos dos presente estudo mostraram que o bloqueio do receptores NMDA com a microinjeção de AP-5 no HDM foi eficaz na atenuação das ectopias cardíacas. Nossos resultados confirmam que o HDM é um núcleo crítico no controle das respostas cardiovasculares ao estresse agudo bem como é importante na geração das ectopias cardíacas.

Não menos importante, o presente estudo mostra que a simples manipulação do animal é capaz de provocar alterações marcantes nos parâmetros cardiovasculares o que deve ser levado em consideração em pesquisas futuras que envolvam estresse ou simplesmente a manipulação de animais.

As respostas fisiológicas ao estresse emocional agudo consistem não só na alteração da resposta cardiovascular como também alterações no padrão endócrino. Nesse

sentido o HDM também está relacionado diretamente com a regulação neuroendócrina, mobilizando o eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA) (Bailey and DiMicco, 2001). A microinjeção de BMI ou do agonista dos receptores glutamatérgicos no HDM resulta no aumento da concentração plasmática de ACTH e de corticosterona (Keim and Shekhar, 1996). Em contrapartida, a microinjeção de muscimol atenua a elevação plasmática de ACTH induzida pelo estresse por jato de ar (Stotz-Potter *et al.*, 1996b).

No presente trabalho, não observamos aumento da concentração plasmática de corticosterona pela exposição ao CSS. Resultados que corroboram com os achados de Dishman e colaboradores em 1998 no qual observam um aumento expressivo nas concentrações plasmáticas de ACTH após exposição ao CSS não havendo aumento nos níveis da corticosterona e prolactina plasmática (Dishman *et al.*, 1998).

Com relação à glicemia, da mesma forma como a corticosterona, esta também não apresentou alterações durante o CSS. Para nos certificarmos destes resultados, realizou-se a dosagem da glicemia plasmática de animais expostos ao estresse por contenção. Ao contrário do CSS, o estresse por contenção foi capaz de evocar um aumento significativo da concentração plasmática de glicose. Os nossos dados estão de acordo com estudo anterior de Armario e colaboradores que observaram que a manipulação do ratos por um minuto e colocado em um novo ambiente não alterou a concentração da glicose plasmática. Outros estressores como a restrição e imobilização, resultaram em aumentos expressivos da glicose plasmática sendo este aumento maior no estresse por imobilização (Armario *et al.*, 1990). Uma outra possibilidade é a de que a glicose produzida durante o CSS pode ter sido imediatamente utilizada como fonte de energia já que a atividade locomotora do animal durante o estresse encontra-se aumentada.

O fato de não termos observado alterações nas concentrações plasmáticas de glicose e corticosterona neste paradigma de CSS sugere que o controle está de acordo com a especificidade das vias centrais para diferentes estressores. Assim as vias são distintas não somente para a atividade do eixo HPA, mas também para a regulação do fluxo simpatoneural e adrenomedular (Pacak & Palkovits, 2001). Fatores como duração, intensidade e tipo de estresse agudo são determinantes na mobilização do eixo HPA (Orr *et al.*, 1990).

## **7 Conclusão**

Utilizando-se de um outro paradigma de estresse emocional agudo, o CSS, o presente estudo mostrou que o HDM é um núcleo chave para o controle das respostas cardiovasculares ao estresse emocional agudo, principalmente caracterizada pelo aumento da atividade eferente simpática cardíaca.

Nossos resultados demonstram a presença de arritmias cardíacas induzida pelo CSS, que são atenuadas com o bloqueio dos receptores NMDA do HDM.

Desta forma, nosso estudo confirma o envolvimento de receptores NMDA no HDM para a geração de taquicardia oriunda do estresse emocional agudo com geração de ectopias cardíacas.

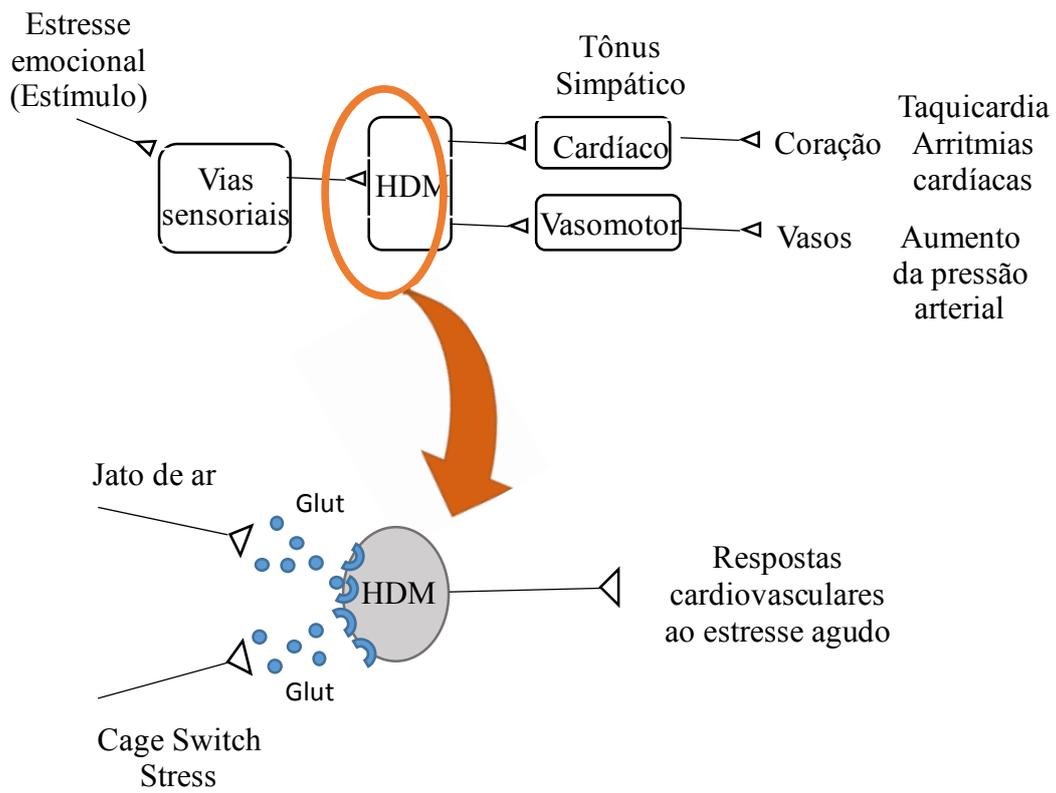
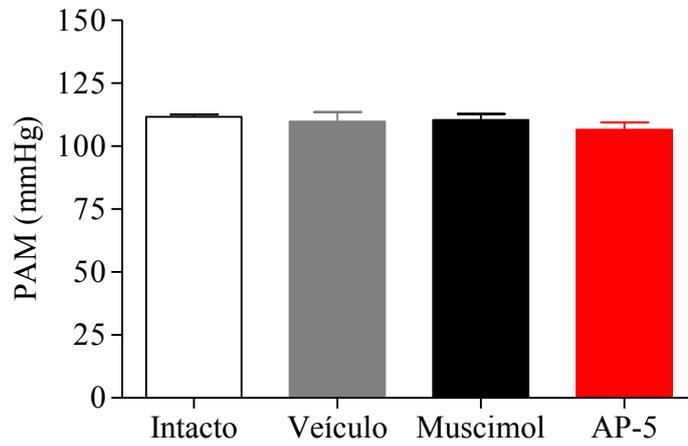


Figura 15: Esquema representando as vias centrais ao estresse agudo.

## 8 Apêndice

### Apêndice 1

A)



B)

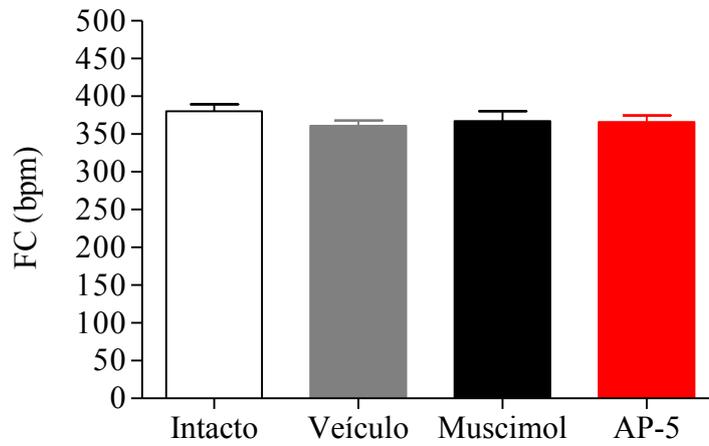


Figura 16. Parâmetros cardiovasculares em condições basais, PAM em mmHg (A) e FC em bpm (B), coletados imediatamente antes da exposição dos ratos ao CSS.

Apêndice 2

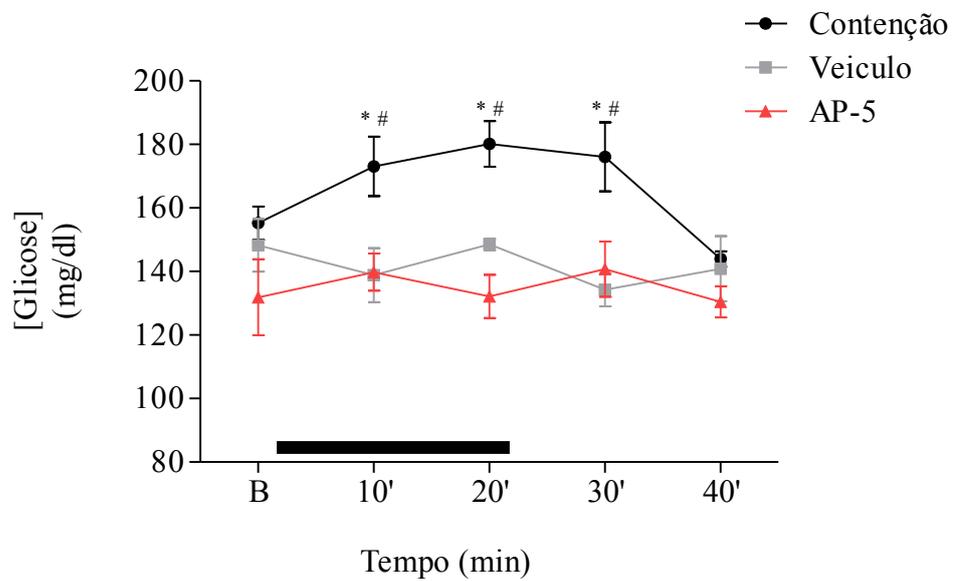


Figura 17. Análise temporal (em minutos) dos valores plasmáticos de glicose de ratos submetidos ao estresse por contenção. A barra preta representa o momento do estresse.

## 9 Referências

Adell A., Casanovas J.M., Artigas F. Comparative Study in the Rat of the Actions of Different Types of Stress on the Release of 5-HT in Raphe Nuclei and Forebrain Areas. *Neuropharmacology*, 36, 415, 735–741, 1997

Armario A., Marti J., Gil M. The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology*, 15, 5&6, 341-347, 1990.

Bailey T.W., Dimicco J.A. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 280: R8–R15, 2001.

Brown D.A., Higgins A.J., Marsh S., Smart T.G. Actions of GABA on mammalian neurones, axons, and nerve terminals. *Adv Biochem Psychopharmacol* 29:321-326, 1981

Cannon WB. Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 9:399–431, 1929.

Cao WH, Fan W, Morrison SF. Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience* 126:229-240, 2004.

Davern PJ, Chen D, Head GA, Chavez CA, Walther T, Mayorov DN. Role of angiotensin II Type 1A receptors in cardiovascular reactivity and neuronal activation after aversive stress in mice. *Hypertension* 54:1262-1268, 2009

DiMicco JA. and Abshire YM. Evidence for a GABAergic inhibition of a hypothalamic sympathoexcitatory mechanism in anesthetized rats. *Brain Res.* 402, 1-10, 1987.

DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV & Zaretsky DV. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav* 71, 469–480, 2002.

Dimsdale J.E. Psychological Stress and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology.* 51, 13, 2008

Dishman R.K., Bunnell B.N., Youngstedt S.D., Yoo H.S., Mougey E.H., Meyerhoff J.L. Activity Wheel Running Blunts Increased Plasma Adrenocorticotrophin (ACTH) after Footshock and Cage-Switch Stress. *Physiology & Behavior*, Vol. 63, No. 5, pp. 911–917, 1998

Fontes M.A., Tagawa T., Polson J.W., Cavanagh S.J., Dampney R.A. Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2891-2901.2001.

Fontes M.A., Xavier C.H., de Menezes R.C., Dimicco J.A. The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience* 184:64-74, 2011.

Fontes M.A., Xavier C.H., Marins F.R., Limborço-Filho M., Vaz G.C., Muller-Ribeiro, F.C., Nalivaiko E. Emotional stress and sympathetic activity: contribution of dorsomedial hypothalamus to cardiac arrhythmias. *Brain Res* 1554: 49-58, 2014.

Fukuda K.K.H., Aizawa Y., Ardell J.L., Shivkumar K. Cardiac innervation and sudden cardiac death. *Circulation research* 116:2005-2019. 2015

Greenwood B and DiMicco JA. Activation of the hypothalamic dorsomedial nucleus stimulates intestinal motility in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 268: G514–G521, 1995.

Johnson Rowsey P, Yang Y.L, Gordon C.J. Peripheral cholinergic pathway modulates hyperthermia induced by stress in rats exposed to openfield stress. *J Appl Physiol* 92:789-794.2002).

Keim S.R., Shekhar A. The effects of GABAA receptor blockade in the dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterone secretion in male rats. *Brain Research* 739, 46-51, 1996.

Lampert, R., Jain, D., Burg, M.M., Batsford, W.P., McPherson, C.A. Destabilizing effects of mental stress on ventricular arrhythmias in patients with implantable cardioverter-defibrillators. *Circulation* 101, 158–164, 2000.

Lampert R. Behavioural influences on cardiac arrhythmias. *Trends Cardiovasc Med*. 2015.

Lee D.L., Webb C. R., Brands M. W. Sympathetic and angiotensin-dependent hypertension during cage-switch stress in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1394–R1398, 2004.

Long N.C., Vander A.J., Kunkel S.L., Kluger M.J. Antiserum against tumor necrosis factor increases stress hyperthermia in rats. *Am J Physiol* 258:R591-595.1990.

Muller-Ribeiro, F.C., Zaretsky, D.V., Zaretskaia, M.V., Santos, R.A., DiMicco, J.A., Fontes, M.A. Contribution of infralimbic cortex in the cardiovascular response to acute stress. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 303, R639–R650, 2012.

Lisa ME. Marmo JH. Wible Jr and DiMicco J A. Injection of muscimol into posterior hypothalamus blocks stress-induced tachycardia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 257:R246-R251, 1989.

Lovallo Wr., And Gerin W. Psychophysiological Reactivity: Mechanisms and Pathways to Cardiovascular Disease. *Psychosomatic Medicine* 65:36–45, 2003.

Orr T.E., Meyerhoff J.L., Mougey E.H., Bunnell B.N. Hyperresponsiveness of the rat neuroendocrine system due to repeated exposure to stress. *Psychoneuroendocrinology*, 15, 5&6, 317-328, 1990.

Pacak, K., Palkovits, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22, 502–548, 2001.

Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press, 1986.

Schadt JC and Hasser EM. Hemodynamic effects of acute stressors in the conscious rabbit. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274:R814-R821, 1998

Selye H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 138:32, 1936.

Sgoifo A, Stilli D, Medici D, Gallo P, Aimi B, Musso E (Electrode positioning for reliable telemetry ECG recordings during social stress in unrestrained rats. *Physiol Behav* 60:1397-1401.1996.

Sgoifo A, Carnevali L, Alfonso M.L.A.P., Amore M. Autonomic dysfunction and heart rate variability in depression. *Stress The International Journal on the Biology of Stress.* Maio, 2015.

Shekhar A. GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures. *Brain Research*, 627 9-16, 1993.

Soltis R.P., DiMicco J.A. GABAA and excitatory amino acid receptors in dorsomedial hypothalamus and heart rate in rats. *Am J Physiol* 260:R13-20. 1991a.

Soltis R.P., DiMicco J.A. Interaction of hypothalamic GABAA and excitatory amino acid receptors controlling heart rate in rats. *Am J Physiol* 261:R427-433. 1991b

Soltis R.P., DiMicco J.A. Hypothalamic excitatory amino acid receptors mediate stress-induced tachycardia in rats. *Am J Physiol* 262:R689-697.1992.

Soltis R.P., Cook J.C., Gregg A.E., Stratton J.M., Flickinger K.A. EAA receptors in the dorsomedial hypothalamic area mediate the cardiovascular response to activation of the amygdala. *Am J Physiol* 275:R624-631, 1998.

Steinberg J.S., Arshad A., Kowalski M., Kukar A., Suma V., Vloka M., Ehlert F., Herweg B., Donnelly J., Philip J., Reed G, Rozanski A. Increased Incidence of Life-Threatening Ventricular Arrhythmias in Implantable Defibrillator Patients After the World Trade Center Attack. *Journal of the American College of Cardiology*. Vol. 44, No. 6, 2004.

Stotz-Potter E.H., Morin S.M., DiMicco J.A. Effect of microinjection of muscimol into the dorsomedial or paraventricular hypothalamic nucleus on air stress-induced neuroendocrine and cardiovascular changes in rats. *Brain Res* 742:219-224. 1996a.

Stotz-Potter E.H., Willis L.R., DiMicco J.A. Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. *J Neurosci* 16:1173-1179. 1996b.

Xavier, C.H., Nalivaiko, E., Beig, M.I., Menezes, G.B., Cara, D.C., Campagnole-Santos, M.J., Fontes, M.A. Functional asymmetry in the descending cardiovascular pathways from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience* 164, 1360–1368. 2009.

Xavier C.H., Beig M.I., Ianzer D., Fontes M.A., Nalivaiko E. Asymmetry in the control of cardiac performance by dorsomedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304: R664–R674. 2013.

Ziegelstein R.C. Acute Emotional Stress and Cardiac Arrhythmias. *JAMA*. 298(3):324-329, 2007.