

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLÓGIA E FARMACOLOGIA

EFEITOS CARDIOVASCULARES PRODUZIDOS PELO BLOQUEIO
DOS RECEPTORES GABA OU INIBIÇÃO DA ENZIMA
GLUTAMATO-DESCARBOXILASE NO HIPOTÁLAMO
DORSOMEDIAL DE RATOS ACORDADOS: INVESTIGAÇÃO DE
ASSIMETRIA FUNCIONAL.

ALINE CRISTINA OLIVEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO ANTÔNIO PELIKY FONTES

BELO HORIZONTE

2012

ALINE CRISTINA OLIVEIRA

EFEITOS CARDIOVASCULARES PRODUZIDOS PELO BLOQUEIO
DOS RECEPTORES GABA OU INIBIÇÃO DA ENZIMA
GLUTAMATO-DESCARBOXILASE NO HIPOTÁLAMO
DORSOMEDIAL DE RATOS ACORDADOS: INVESTIGAÇÃO DE
ASSIMETRIA FUNCIONAL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas – ICB, UFMG, para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO ANTÔNIO PELIKY FONTES

BELO HORIZONTE

2012

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por estar sempre ao meu lado e se fazer presente nos meus dias, me dando provas do seu amor e sendo meu porto seguro quando não acreditava ser possível, mas principalmente por ter colocado todas as pessoas abaixo no meu caminho.

Aos meus pais, que abriram mão de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Como tenho orgulho de ser filha de vocês. Obrigada pelo amor incondicional e por me mostrarem o caminho certo a seguir não somente com palavras, mas principalmente como o melhor exemplo de ser humano que eu poderia pedir. Palavras nunca conseguirão agradecer o suficiente ou explicar o sentimento que tenho por você. Por isso, a vocês o meu respeito, eterno amor e gratidão.

A minha irmã Érika, pelo grande carinho, compreensão e apoio em todos os momentos. O mesmo a minha prima Joyce, que considero como grande irmã também. A minha grande amiga de infância Karla, pois todas vocês me ajudaram muito nos momentos fora dos muros da UFMG, fazendo com que eu pudesse retornar sempre com mais garra e força de vontade.

Ao André, pela torcida, amizade, carinho, por sempre me dar forças, estando sempre ao meu lado e por acreditar em mim muitas vezes mais até do que eu mesma.

Aos meus padrinhos, pessoas abençoadas que meus pais escolheram por intermédio de Deus, para serem também anjos da guarda, desculpem a ausência necessária, mas vocês estão, e sempre terão um espaço guardado no meu coração e na minha história. Muito obrigada.

Aos meus avós, meus tios, primos enfim a minha família inteira, que sempre foi tão unida, e que é o alicerce da minha vida, a todos vocês muito obrigada por tudo, por me ajudarem a superar cada obstáculo que apareceu no meu caminho, por me encorajar, e torcer sempre por mim.

Gostaria de agradecer também aos primeiros a acreditarem em mim como pesquisadora, pessoas por quem sempre terei um enorme respeito e gratidão por tudo que fizeram por mim durante a minha vida acadêmica, pessoas que se tornaram muito além de 2 professores. Quero ter vocês sempre perto de mim, Raul e Gonzaga, muito obrigada por tudo, nunca me esquecerei de vocês.

Gostaria de agradecer também a todos os professores que conheci durante este caminho, principalmente aqueles que demonstraram o verdadeiro sentido de ser professor e que despertaram em mim também essa mesma paixão pela profissão.

Aos meus amigos do laboratório de hipertensão, Renata, Fernanda, Marilene, Marcos Melo, Ariane, Gigi, Driely, grande Zezé, Profa. Andréa que coloco aqui entre os amigos com muito carinho e respeito, obrigada pelos diversos momentos de divã. Enfim, a todos vocês que me ajudaram a tornar essa caminhada mais alegre e divertida, e que dividiram comigo muitas das minhas dúvidas, dificuldades e por isso divido com eles também essa vitória.

Aos Prof. Robson, e seu aluno Marcos Melo, ao INCT, a Profa. Gracie Schenatto Pereira e sua aluna Brisa Marina, obrigada pela grande colaboração na realização deste trabalho, e por acrescentar na minha formação.

Por fim, ao Prof. Marco Antônio, meu orientador, muito obrigada pela oportunidade, e mais, por ser sempre tão presente durante esses 4 anos de laboratório. Muito obrigada por me ensinar tanto neste tempo, e tenho certeza continuarei aprendendo muito ainda. Meu eterno respeito e carinho.

LISTA DE ABREVIATURAS

- BMI – bicuculina metiodide
- DC – débito cardíaco
- DMH – hipotálamo dorsomedial
- DMH-D – indica injeção no DMH lado direito
- DMH-E – indica injeção no DMH lado esquerdo
- EAA – aminoácidos excitatórios
- FC – frequência cardíaca
- FE – fração de encurtamento
- FEj – fração de ejeção
- GABA – Ácido Gama-amino-butírico
- GABA_A – receptor para ácido gama-amino-butírico (subtipo A)
- GABA_B – receptor para ácido gama-amino- butírico (subtipo B)
- GAD – glutamato-descarboxilase
- I.P. – intraperitoneal
- I.V. – intravenosa
- L-AG – l-allylglicina
- PA – Pressão arterial
- PAM – pressão arterial média
- PAP – pressão arterial pulsátil

RESUMO

O estresse emocional exige que o Sistema Nervoso Central (SNC) produza uma série de alterações comportamentais, autonômicas e endócrinas para manter a homeostase corporal (Clark et al., 1997). Nesse sentido estudos demonstraram que os neurônios do hipotálamo dorsomedial (DMH) estão envolvidos na geração de uma resposta integrada ao estresse. A ativação de neurônios do DMH, via bloqueio de receptores GABA_A, provoca mudanças fisiológicas que mimetizam as respostas classicamente descritas como luta e fuga (Shekhar, 1993, Stotz-Potter et al. 1996, Fontes et al., 2001, DiMicco et al., 2002).

Estudos prévios do nosso laboratório demonstraram que em ratos anestesiados, a ativação dos neurônios do DMH evocada pela nanoinjeção do antagonista GABA_A bicuculina methiodide (BMI) causou uma taquicardia maior quando injetada à direita (DMH-D) em comparação com o lado esquerdo do DMH (DMH-E) indicando que o DMH-D possui um controle predominante sobre o controle da frequência cardíaca (FC) (Xavier et al, Neuroscience 2009).

Os principais achados deste estudo foram: i) a nanoinjeção aguda de L-AG 10 µg/100 nl no DMH de ratos acordados é capaz de produzir respostas semelhantes às observadas no comportamento defensivo; ii) a dose mais elevada de L-AG avaliada (10µg/100nl) produziu taquicardia mais pronunciada quando injetada no DMH-D; iii) a duração da taquicardia produzida pelo bloqueio dos receptores GABA_A utilizando a nanoinjeção de BMI 10 pmol/ 100 nl no DMH-D foi quase duas vezes maior que a produzida pela nanoinjeção no DMH-E; iv) o bloqueio dos receptores GABA_B com Saclofeno (10 pmol/100 nl) não produziu aumentos significativos na pressão arterial ou frequência cardíaca quando nanoinjetada no DMH-D e DMH-E, v) a dose de 1 µg/ 100 nl de L-AG no DMH foi capaz de induzir nos animais sensibilidade à infusão de lactato de sódio periférica em ambos os grupos. As respostas cardiovasculares não foram diferentes quando comparamos os grupos que receberam a injeção de L-AG no DMH-D e DMH-E.

Em conclusão nossos resultados estendem os resultados de estudos anteriores mostrando que o DMH-D tem um controle diferenciado sobre o cronotropismo cardíaco via receptores GABA_A. Nossos dados permitem especular sobre a existência de um input GABAérgico diferencial para o DMH Direito também em animais acordados.

ABSTRACT

Emotional stress requires that central nervous system (CNS) produce a series of behavioral, autonomic and endocrine responses for maintaining body homeostasis (Clark et al. 1997). According to the studies, they have shown that neurons in the dorsomedial hypothalamus (DMH) are involved in the generation of an integrated response to stress. The activation of neurons in the DMH, after the blockade of GABA_A receptors, causes physiological changes that resemble the responses classically described as fight or flight (Shekhar, 1993, Stotz-Potter et al.1996, Fontes et al., 2001, DiMicco et al. , 2002).

Previous studies from our laboratory demonstrated that in anesthetized rats, the DMH neuron activation evoked by nanoinjection GABA antagonist bicuculline methiodide (BMI) caused a greater tachycardia when injected on the right side (DMH-R) compared to the left side of DMH (DMH-L) indicating that the DMH-R has a dominant control over the heart beat rate control (HR) (Xavier et al, Neuroscience 2009).

The main findings of this study were: i) the nanoinjection acute L-AG 10 µg/100 nl of DMH in conscious rats can produce responses similar to those described as defensive behavioral, ii) the highest dose of L-AG evaluated (10 µg/100nl) produced more pronounced tachycardia when injected in DMH-R; iii) the duration of the tachycardia produced by blockade of GABA_A receptors using nanoinjection BMI of 10 pmol/100 nl in DMH-R was nearly twice that produced in the DMH-L, iv) blockade of GABA_B receptors with Saclofen (10 pmol/100 nl) have no changes in blood pressure or heart rate when nanoinjected in DMH-R and DMH-L v) the dose of 1 µg/100nl of L-AG in DMH was able to induce in animals sensitivity of the peripheral infusion of sodium lactate in both groups. The cardiovascular responses were not different when comparing the groups that received the injection of L-AG in the DMH-R or DMH-L.

In conclusion our results extend the results of earlier studies showing that DMH-R has a different control on cardiac chronotropy mainly through GABA_A receptors. Our data points to a differential input GABAergic DMH in awake rats.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Estresse	11
1.1.1 A resposta fisiológica ao estresse emocional	12
1.1.2 A resposta cardiovascular ao estresse emocional	14
1.2 O Hipotálamo e a resposta cardiovascular ao estresse emocional	15
1.3 O Hipotálamo dorsomedial e as vias neurais envolvidas na resposta cardiovascular ao estresse emocional	18
1.4 Participação do GABA no controle do Sistema Cardiovascular	21
1.5 Influência da assimetria de função encefálica no controle cardiovascular	23
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Animais	27
3.2 Anestésicos	27
3.3 Confeção e implante de cânulas-guia	28
3.4 Canulação da artéria e veia femoral	29
3.5 Registro dos parâmetros Cardiovasculares	30

3.6	Confecção de cânulas injetoras e procedimento de injeção	30
3.7	Infusão de Lactato	31
3.8	Análise do Comportamento	31
3.8.1	Atividade locomotora	31
3.8.2	Teste de Interação social (SI)	32
3.9	Histologia	33
3.10	Procedimentos Experimentais	33
	Protocolo 1: Objetivo: Comparar os efeitos cardiovasculares produzidos pela interferência com a síntese GABA do Hipotálamo Dorsomedial à Direita e à Esquerda	33
3.10.1	Protocolo 2: Objetivo 1: Comparar a participação dos receptores GABAA nos lados Direito e Esquerdo do DMH: Investigação de Assimetria funcional	35
3.10.1.1	Protocolo 2: Objetivo 2: Avaliar a participação dos receptores GABAB nos lados Direito e Esquerdo do DMH: Investigação de Assimetria funcional	35
3.10.2	Protocolo 3: Objetivo: Avaliar as alterações morfofuncionais do coração durante ativação dos neurônios do DMH Direito ou Esquerdo	36
3.10.3	Protocolo 4: Objetivo: Avaliar os efeitos produzidos pela disfunção GABA no Hipotálamo Dorsomedial Direito e Esquerdo após a infusão de Lactato de Sódio	37
3.11	Drogas	38
3.12	Análise dos Dados	39
3.13	Análise Estatística	39
4.	RESULTADOS	40
4.1	Protocolo 1: Objetivo: Comparar os efeitos cardiovasculares produzidos pela interferência com a síntese GABA do Hipotálamo Dorsomedial à Direita e à Esquerda	40

4.2 Protocolo 2: Objetivo 1: Comparar a participação dos receptores GABA_A nos lados Direito e Esquerdo do DMH: Investigação de Assimetria funcional	43
4.2.1 Protocolo 2: Objetivo 2: Avaliar a participação dos receptores GABA_B nos lados Direito e Esquerdo do DMH: Investigação de Assimetria funcional	45
4.3 Protocolo 3: Objetivo: Avaliar as alterações morfofuncionais do coração durante ativação dos neurônios do DMH Direito ou Esquerdo	47
4.4 Protocolo 4: Objetivo: Avaliar os efeitos produzidos pela disfunção GABA no Hipotálamo Dorsomedial Direito e Esquerdo após a infusão de Lactato de Sódio....	54
4.5 Análise Histológica	59
5. DISCUSSÃO	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse

Desde os primórdios da fisiologia é descrito que o estado de saúde é associado ao equilíbrio. No entanto, o impacto do mundo moderno sobre o homem tem feito com que este equilíbrio seja afetado e o estresse seja cada vez mais parte do cotidiano dos seres humanos tornando-se foco de estudos há mais de um século (Strang, 2004).

O primeiro a levantar a ideia de que um meio interno constante era um pré-requisito para a saúde, foi um médico e fisiologista francês, Claude Bernard, conceito que foi posteriormente refinado por Cannon em 1929 utilizando o termo “homeostase” para descrever “processos fisiológicos coordenados que mantêm a maior parte dos estados estacionários do organismo.” Cannon também foi o primeiro a discutir sobre especificidade de resposta ao estresse, entretanto Cannon nunca utilizou o termo “estresse” (Cannon, 1929b, a, Pacak and Palkovits, 2001, Noble, 2008)

O primeiro a utilizar o termo “estresse” foi Hans Selye, em referência à perturbação da homeostase, termo esse que era utilizado somente na física referindo-se à força que produz uma deformação em um determinado material. O termo “estresse” foi então introduzido e popularizado como uma condição resultante, ou seja, as respostas fisiológicas frente a um estímulo estressor, enquanto o termo “estressor” foi utilizado para o agente causador. Em seus experimentos, Selye expôs os animais a estímulos como: frio, injúria tecidual, excesso de exercícios e intoxicações, observando uma tríade comum nas respostas como: ulceração gastrointestinal, hipertrofia das supra-renais e

involução do timo e glândulas linfáticas, independente do estímulo utilizado. (Selye, 1936, Pacak and Palkovits, 2001).

Em contraste com as ideias de Selye, Cannon reconhecia a importância do psicológico de cada indivíduo como oposto às respostas fisiológicas durante o estresse. De forma semelhante, Mason criticava principalmente a ideia de não especificidade da resposta descrita por Selye, e que o medo e ansiedade poderiam ser os principais fatores para respostas não específicas a diferentes estressores (Cannon, 1929b, a, Mason, 1971).

Chrousos e Gold definiram estresse como um “estado de desarmonia ou de ameaça a homeostase, evocando respostas específicas e não-específicas (Chrousos and Gold, 1992). Goldstein definiu o estresse como uma “condição em que as expectativas, seja geneticamente programada ou estabelecidas por aprendizado prévio podem não coincidir com percepções atuais do ambiente interno ou externo. E que essa discrepância entre o que é observado, e o que é esperado ou programado provocam de forma padronizada, as respostas compensatórias” (Goldstein, 1995). Além desses, muitos autores tentaram definir o termo estresse. Embora nenhuma das definições é completamente aceita, todas têm contribuído para o entendimento desse fenômeno (Pacak and Palkovits, 2001).

1.1.1 A resposta fisiológica ao estresse emocional

O estresse emocional exige que o Sistema Nervoso Central (SNC) produza uma série de alterações comportamentais, autonômicas e endócrinas para manter a homeostase corporal. Durante a evolução, circuitos específicos se aperfeiçoaram permitindo que o organismo responda de forma rápida e eficaz às diferentes ameaças ao organismo, facilitando a sobrevivência das espécies (Clark et al., 1997).

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) está relacionado ao controle da vida vegetativa, ou seja, controla funções como a respiração, circulação sanguínea, temperatura e digestão. Este é subdividido em dois componentes, simpático e parassimpático. As respostas fisiológicas apresentadas frente a um estímulo estressor são devido ao aumento expressivo da atividade simpática, onde a norepinefrina é o principal neurotransmissor envolvido entre a fibra pós-ganglionar e os órgãos alvo (Maier and Watkins, 2005, Goto et al., 2007).

A ativação generalizada do sistema simpático é classicamente descrito como resposta de luta-ou-fuga, que se refere às alterações observadas durante situações consideradas extremas (Cannon, 1914). Para tal todos os recursos são mobilizados: aumento do fluxo sanguíneo para músculos esqueléticos, coração e encéfalo e diminuição do fluxo sanguíneo para pele (descrito como direcionamento de fluxo); aumento da liberação de glicose pelo fígado; diminuição da atividade do trato gastrointestinal; dilatação da pupila (midríase); aumento da Pressão Arterial (PA) e Frequência Cardíaca (FC) (Selye, 1936, Linthorst and Reul, 2008).

Uma importante marca da resposta ao estresse é a ativação do córtex da adrenal, através do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) que ocorre quando o hipotálamo através da secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) estimula a hipófise anterior (pituitária) a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que estimula o córtex da supra-renal a secretar o cortisol. O principal efeito do aumento de cortisol durante o estresse é o aumento da mobilização de combustíveis, ou seja, aumenta as concentrações plasmáticas de aminoácidos, glicose, glicerol e ácidos graxos livres, efeitos que são essenciais para atender a uma situação estressante (Spiess et al., 1981, Vale et al., 1981, Liang and Lee, 1988, Pacak and Palkovits, 2001).

Em conjunto, todas as alterações descritas acima são de extrema importância para a sobrevivência do indivíduo, pois uma resposta adequada ao estresse é vantajosa e proporciona a capacidade de responder prontamente às diferentes ameaças do meio. No entanto, quando ocorre dificuldade para que o indivíduo se adapte às situações, e estas se tornarem sustentadas e altamente repetitivas, o estresse pode estar diretamente relacionado com o aparecimento de estados patológicos em seres humanos, como desordens da motilidade gastrointestinal ou formação de ulcerações duodenais (Fossey and Lydiard, 1990), aumento da suscetibilidade a infecções (Kiecolt-Glaser and Glaser, 1995), além de desordens cardiovasculares que são foco do nosso trabalho.

1.1.2 A resposta cardiovascular ao estresse emocional

As alterações cardiovasculares são importantes componentes dessa resposta complexa que é ativada frente a um estímulo estressor. A norepinefrina liberada pelos nervos simpáticos diretamente no miocárdio, associada à epinefrina plasmática, atuam sobre os receptores beta-adrenérgicos aumentando a contratilidade ventricular e a velocidade de condução do impulso nervosa no Nó Átrio Ventricular (NAV) e aumentam a frequência cardíaca através dos receptores β_1 no Nó Sino Atrial (NSA). Além disso, a epinefrina plasmática também aumenta a resposta pressora através da alteração do tônus vascular em leitos específicos (Callahan et al., 1989).

Como parte essencial ativada durante o estresse, muitos estudos têm correlacionado o aumento do estresse emocional com o aumento de patologias cardiovasculares, como a hipertensão Arterial (HA) arritmias cardíacas (Leor et al., 1996, Critchley et al., 2005, Xavier, 2010), infarto do miocárdio e pode levar inclusive a morte súbita (Amiragova, 1985, Meerson, 1994b, a, DiMicco et al., 2002). Além disso,

outros distúrbios do estresse, como por exemplo, o transtorno do pânico também possui uma correlação com a HA (Davies et al., 1999).

1.2 O Hipotálamo e a resposta cardiovascular ao estresse emocional

Estudos de Bard em 1928 demonstram que uma resposta adequada a um estímulo agressor necessita de um hipotálamo intacto. Com isso, diversos outros estudos mostraram a participação do hipotálamo como integrador de componentes somáticos, autonômicos e neuroendócrinos frente a um estímulo aversivo (Bard, 1928, Bandler et al., 1972, Soltis and DiMicco, 1991a, b, Pacak and Palkovits, 2001).

Nesse sentido, já foram identificados sub-regiões que participam na organização das respostas comportamentais e cardiovasculares frente ao estresse emocional, dentre essas regiões pode ser destacado o Hipotálamo Dorsomedial (DMH) (Shekhar and DiMicco, 1987, Shekhar et al., 1987, DiMicco et al., 2002).

No rato, o DMH é adjacente ao terceiro ventrículo, caudal e ventral ao núcleo paraventricular (PVN), dorsal ao núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) e ventral ao trato mamilotalâmico. Lateralmente, o DMH é delimitado pelo fórnix e região perifornical da área lateral do hipotálamo (Figura 1). Sua fronteira caudal é menos distinta e delimitada pela área hipotalâmica posterior (DiMicco et al., 2002, Fontes et al., 2011).

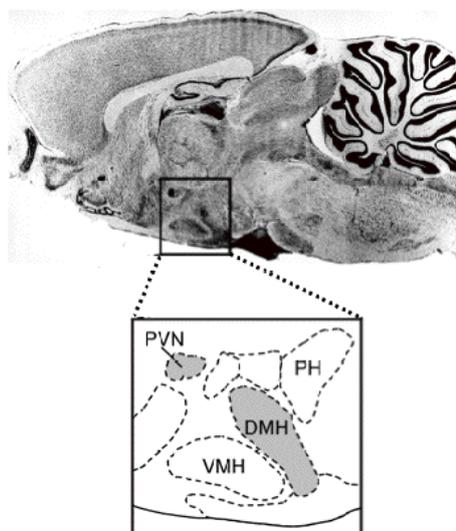


Figura 1: Vista lateral dos principais núcleos hipotalâmicos (Fontes et al., 2001).

O DMH é ainda subdividido em duas porções distintas; uma porção difusa e uma porção compacta (Paxinos & Watson, 1986), sendo este último claramente delimitado na parte posterior do DMH (Fontes et al., 2006) (Figura 2). Estudos em ratos demonstraram que a zona compacta tem sido relatada como sendo a estrutura mais responsiva do DMH à microinjeção de aminoácidos excitatórios (De Novellis et al., 1995) ou de antagonistas do receptor $GABA_A$ (Fontes et al., 2001, Horiuchi et al., 2004). Uma vez que esta organização é homóloga ao que é encontrada em macacos e humanos (Koutcherov et al., 2004), o DMH parece ser altamente conservado durante curso da evolução dos mamíferos, nos permitindo especular que este núcleo possa exercer a mesma função cardiovascular ao estresse emocional em seres humanos (Fontes et al., 2011).

Estudos demonstraram que os neurônios do DMH estão implicados na geração de respostas integradas ao estresse em ratos. A microinjeção do agonista $GABA_A$, muscimol, no DMH é capaz de reduzir significativamente a taquicardia em ratos submetidos a protocolos de estresse experimental, como por exemplo, o estresse por

jato de ar, abolindo quase completamente as respostas cardiovasculares frente ao estímulo aversivo (Stotz-Potter et al., 1996a, Stotz-Potter et al., 1996b).

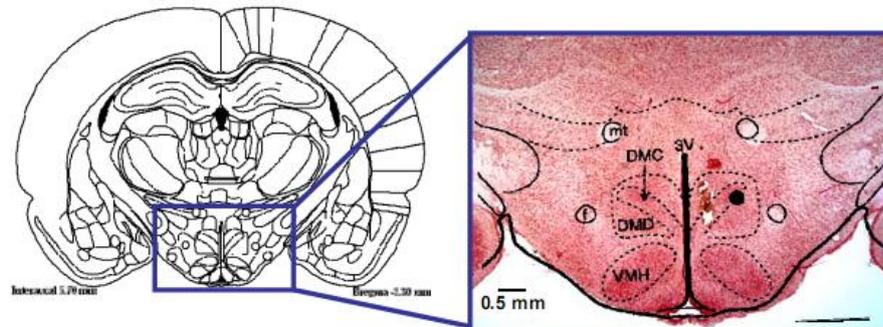


Figura 2: O hipotálamo dorsomedial e suas sub-porções: porção compacta (DMC) e difusa (DMD). 3V: Terceiro ventrículo; VMH: Hipotálamo ventromedial. . Adaptado de PAXINOS G., WATSON C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 1986. (Xavier, 2008).

Por outro lado, a desinibição ou ativação do DMH utilizando a microinjeção do antagonista GABA_A, bicuculina metiodide (BMI) ou agonistas de aminoácidos excitatórios (EAA) (Soltis and DiMicco, 1991b) resulta em aumento considerável na frequência cardíaca e frequência respiratória em ratos, e aumento modesto na pressão arterial média (PAM) (DiMicco et al., 1986, DiMicco, 1987, Soltis and DiMicco, 1991b) além da elevação da atividade simpática para o nervo renal (RSNA) (Wible et al., 1988, Fontes et al., 2001) e para o nervo cardíaco (Cao and Morrison, 2003), aumento de catecolaminas plasmáticas (Wible et al., 1988) e aumento dos níveis circulantes de ACTH (Bailey and Dimicco, 2001). Além disso, microinjeções de BMI na região compacta do DMH em doses variando 0,1 - 40 pmol resultam em aumentos dose-resposta na pressão arterial média (PAM), FC e atividade simpática (Horiuchi et al., 2004), entretanto, o bloqueio dos receptores EAA no DMH suprime essa resposta produzida pela injeção de BMI (Soltis and DiMicco, 1991b), demonstrando que a

resposta produzida pelo bloqueio dos receptores GABA é dependente da ativação local de receptores EAA.

O aumento da PA concomitante ao aumento FC durante a ativação do DMH só é possível devido à modulação do barorreflexo que é parte do controle neural da pressão arterial e é considerado um sistema de ajuste rápido, no qual em resposta a aumentos na PA responde com bradicardia barorreflexa, o que não ocorre durante a ativação do DMH (Hatton et al., 1997, McDowall and Dampney, 2006, McDowall et al., 2006).

De maneira conjunta esses dados demonstram que a ativação ou desinibição dos neurônios do DMH gera uma resposta integrada, semelhante às alterações fisiológicas classicamente descritas como reação de luta e fuga (Cannon, 1929c, Shekhar, 1993, Stotz-Potter et al., 1996b, Fontes et al., 2001, DiMicco et al., 2002), no entanto é importante ressaltar que o DMH não possui ou possui poucos neurônios que se projetam diretamente com a coluna intermediolateral da medula (IML) responsável por transmitir os sinais eferentes gerados por neurônios pré-motores simpáticos. Dessa forma o controle simpatoexcitatório exercido pelo DMH é realizado de forma indireta através de outros núcleos encefálicos.

1.3 O Hipotálamo dorsomedial e as vias neurais envolvidas na resposta cardiovascular ao estresse emocional

As projeções eferentes do DMH são direcionadas para áreas do SNC envolvidas na manutenção da atividade simpática e estresse emocional, funcionando como relés sinápticos do DMH, dentre eles podemos destacar: o bulbo rostroventrolateral (RVLM) promovendo alterações na PA e atividade simpática do nervo renal (RSNA); enquanto que a Rafe *Pallidus* (RPa) parece estar envolvida nos efeitos cronotrópicos produzidos

pela ativação do DMH (Hosoya et al., 1989, Fontes et al., 2001, Cao and Morrison, 2003, Cao et al., 2004, Horiuchi et al., 2004, Menezes and Fontes, 2007).

A Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) parece ser também uma área que atua como relé sináptico do DMH. Da Silva e colaboradores demonstraram que a resposta cardiovascular produzida pelo DMH era abolida quando a porção l/dl da PAG estava inibida farmacologicamente (da Silva et al., 2003, Da Silva et al., 2006), de forma coerente com dados da literatura que destacam que este núcleo controla entre outras funções a modulação da dor, respostas autonômicas e comportamentais relacionadas com padrões de defesa (Basbaum and Fields, 1984, Carrive et al., 1988).

Estudos demonstram que a modulação da bradicardia barorreflexa durante a ativação do DMH, ocorre via estímulo dos neurônios da PAG. No entanto, estudos anatômicos demonstraram que o DMH envia projeções para as porções lateral e ventral da PAG mas não para a porção l/dl (Thompson et al., 1996), que é a porção mais responsiva as alterações cardiovasculares como descrito previamente (da Silva et al., 2003, Da Silva et al., 2006, de Menezes et al., 2006). Utilizando estudos anatômicos e funcionais prévios de que o núcleo cuneiforme recebe projeções do DMH (Bernard et al., 1989), e que este núcleo participa do controle da resposta defensiva em ratos, recentemente, Netzer e colaboradores pioneiramente demonstraram a via neural envolvida na modulação barorreflexa durante a ativação do DMH. Foi demonstrado que a inibição barorreflexa realizada pelo DMH ocorre via ativação dos neurônios do núcleo cuneiforme e que este núcleo possui neurônios que se conectam com a porção l/dl da PAG, funcionando como um relé sináptico nesta via (Netzer et al., 2011).

A relação do DMH com o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) está principalmente relacionada com alterações endócrinas promovidas pela ativação do DMH, onde os neurônios do DMH teriam um papel crucial na ativação dos neurônios

do PVN que são responsáveis pelo recrutamento do eixo HPA em algumas formas de estresse, como o estresse emocional (DiMicco et al., 2002).

As projeções aferentes do DMH são principalmente da medula espinhal, lócus ceruleus, RPa, Núcleo do Trato Solitário (NTS), PAG, PVN, Hipotálamo lateral, Hipocampo e Amígdala (Conrad and Pfaff, 1976a, b, Saper et al., 1976, Soltis et al., 1998, Anand and Shekhar, 2003, Shekhar et al., 2003). Dentre estes podemos destacar a amígdala que tem sido implicado como provável núcleo responsável por ativar o DMH após estímulos emocionais, pois esta estrutura está envolvida nas respostas de medo condicionado ou amplamente conhecida como memória emocional (Soltis et al., 1998, LeDoux, 2000, LeDoux, 2003).

O córtex pré-frontal medial (mPFC) era um dos núcleos candidatos a origem do tônus inibitório para o DMH, pois é uma estrutura envolvida na regulação da informação emocional e cognitiva, envia projeções para o DMH, no entanto, os estudos funcionais apresentaram resultados controversos (Bush et al., 2000, McDougall et al., 2004, Radley et al., 2009), até que mais recentemente, estudos do nosso laboratório sugerem que essa região não está tonicamente envolvida no controle cardiovascular e termogênico durante o estresse (Muller-Ribeiro, 2012).

Observações clínicas apontavam para uma estreita relação entre o córtex cerebral e o controle cardíaco. Atualmente é bem descrito que a estimulação do Córtex insular (CI) resulta em alteração da PA e FC. A ativação da região mais rostral do CI resulta em taquicardia, enquanto a ativação da região mais caudal resulta em bradicardia (Oppenheimer and Cechetto, 1990, Oppenheimer et al., 1992), além disso, estudos anatômicos e funcionais evidenciam uma conexão entre o CI e o DMH (Cechetto and Chen, 1990).

Outro núcleo proposto é a área pré-óptica medial (mPOA). Este núcleo parece ser a principal fonte do tônus inibitório para o DMH, pois a inibição farmacológica da mPOA, associada a injeção de veículo no DMH, produziu respostas semelhantes a ativação do DMH, dessa forma os autores sugerem que a inibição da mPOA promoveu a retirada do tônus inibitório sobre o DMH, permitindo assim que as respostas cardiovasculares características da ativação deste núcleo pudessem ser evidenciadas (Hunt et al., 2010).

1.4 Participação do GABA no controle do Sistema Cardiovascular

O Ácido Gama-amino-butírico (GABA) (Fig. 3A) é considerado o mais importante neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos (Jorgensen, 2005, Bowery and Smart, 2006). Como já citado anteriormente, é um neurotransmissor de extrema importância nos núcleos que controla a função cardiovascular (Gordon and Sved, 2002).

A síntese do GABA inicia-se pela descarboxilação de seu precursor, o glutamato, pela enzima glutamato-descarboxilase (GAD), que é amplamente encontrada em áreas hipotalâmicas (Tappaz et al., 1977). Interessantemente a GAD está reduzida em ratos espontaneamente hipertensos (Kramer et al., 2000). Com isso podemos especular sobre a patogênese de doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial, como sendo proveniente da disfunção GABAérgica em núcleos hipotalâmicos.

Os receptores GABA_A são o principal alvo do GABA no controle de respostas cardiovasculares como descrito previamente. Estes receptores são estruturas pentâmeras que possuem sua ação inibitória devido ao seu acoplamento a canais de Cl⁻, e são formados por diferentes subunidades (α , β , γ , δ , ϵ). A ativação desse receptor ocorre após a ligação sequencial de duas moléculas de GABA ao complexo, levando a abertura

do canal. Hiperpolarizando os neurônios pós-sinápticos, resultando na ação inibitória (Figura 3a) (Schofield et al., 1987).

Os receptores GABA_B são receptores ligados a Proteína G (Figura 3b), e são expressos em concentrações mais baixas que os receptores GABA_A. Os receptores GABA_B atuam como heterodímeros que inibem adenilato ciclase. Sendo expressos tanto no nível pré quanto pós-sináptico. Os receptores pré-sinápticos inibem a liberação de neurotransmissores através da inibição de canais de Ca²⁺ voltagem dependente. Enquanto que os receptores pós-sinápticos produzem potenciais inibitórios pós-sinápticos (PIPS) lentos, através da ativação dos canais iônicos de K⁺, que semelhante ao aumento da condutância aos íons Cl, impulsiona a voltagem da membrana para potenciais de “repouso” (próximo de -65 mv) devido ao seu potencial de equilíbrio próximo à -70mv (Waldmeier et al., 1994, Misgeld et al., 1995, Li and Guyenet, 1996).

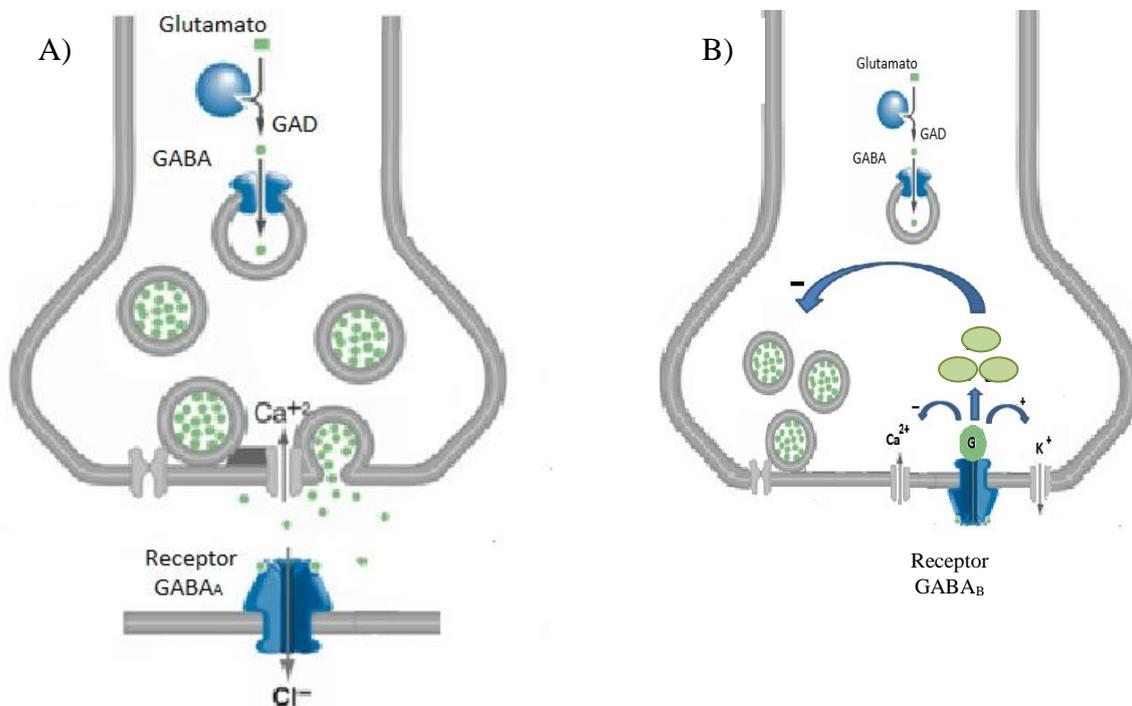


Figura 3: Neurônio e Receptores GABAérgicos (Jorgensen, 2005). A: Figura representativa dos receptores GABA_A. B: Figura representativa dos receptores GABA_B. GAD: enzima que catalisa a reação para conversão do Glutamato em GABA (glutamato-descarboxilase); ● GABA.

Poucos estudos demonstram papel fisiológico para os receptores GABA_B no controle cardiovascular. Estudos piloto de Abshire e colaboradores não observaram alterações cardiovasculares quando antagonista ou agonista GABA_B foram administrados no DMH de ratos anestesiados. Mas a injeção do agonista Baclofen no DMH foi capaz de suprimir a taquicardia induzida pela injeção do antagonista GABA_A BMI (DiMicco and Monroe, 1998).

As respostas produzidas pela disfunção GABAérgica no DMH pode ser observada interferindo na síntese GABAérgica utilizando a L-allylglicina (L-AG) que é o precursor do 2-keto-4-acido pentanóico, um inibidor não específico das isoformas das enzimas glutamato-descarboxilase (GAD65 e GAD67) (Orlowski et al., 1977) como demonstrado por Abshire e cols., onde a microinjeção de L-AG no DMH resulta em aumento na FC, PAM e diminuição nos níveis locais de GABA em animais anestesiados (Abshire et al., 1988).

A intervenção na síntese GABA parece ser crucial para o desencadeamento da síndrome do Pânico. Shekhar e colaboradores têm demonstrado que ratos submetidos à infusão crônica de L-allylglicina (L-AG) por cinco dias no DMH, seguido da infusão de Lactato de Sódio, desenvolvem respostas similares aos pacientes com síndrome do pânico (Shekhar et al., 1996).

Os animais submetidos à disfunção crônica de GABA apresentaram significativamente menor tempo no teste de interação social (SI) e de movimentação nos braços abertos no labirinto em cruz elevada (Shekhar and DiMicco, 1987), indicando aumento da ansiedade (Pellow et al., 1985). Quando esses animais receberam a infusão de lactato de sódio, eles apresentaram um significativo aumento na PA e FC quando comparado aos animais sem a disfunção GABA no DMH. Essa resposta fisiológica em

consequência da infusão de lactato é semelhante à resposta observada em pacientes com Síndrome do Pânico, onde a taquicardia é observada espontaneamente (Freedman et al., 1985) ou pode ser induzida pela infusão de lactato (Liebowitz et al., 1986). Este modelo demonstrou pela primeira vez que uma específica alteração central pode induzir uma sensibilidade à infusão periférica de lactato. Apontando assim, o DMH como parte do “circuito do pânico” através da modulação dos níveis de GABA neste núcleo (Shekhar et al., 1996, Shekhar et al., 2003, Shekhar et al., 2006, Johnson et al., 2010).

1.5 Influências da assimetria de função encefálica no controle cardiovascular

Diferenças entre os lados esquerdo-direito nas propriedades funcionais de regiões bilaterais do sistema nervoso constituem um fenômeno conhecido como assimetria de função. Esse fenômeno tem sido observado em diferentes estruturas cerebrais e em diferentes níveis (Harris et al., 1996, Toga and Thompson, 2003). Em algumas condições, uma possível função assimétrica das regiões do encéfalo pode resultar em desequilíbrio lateralizado de eferência autonômica para o coração, podendo levar a arritmias cardíacas e isto inclui condições de estresse mental (Lane et al., 1992a, Lane et al., 1992b, Critchley, 2005).

Mais especificamente, Wittling e cols., observaram assimetria do encéfalo humano no controle autonômico para o coração. Foram observadas diferenças funcionais entre os dois hemisférios cerebrais, onde o lado esquerdo apresenta papel predominante na modulação parassimpática, enquanto o lado direito apresenta papel predominante na geração da atividade simpática para o miocárdio (Wittling et al., 1998a, Wittling et al., 1998b).

Estudos de Barrion e colaboradores, acompanhando pacientes com acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico, demonstraram que lesões encefálicas unilaterais podem causar um desbalanço autonômico cardíaco e os pacientes que sofreram AVE no hemisfério direito apresentaram maior incidência de arritmias cardíacas (Barron et al., 1994).

Mais especificamente, Butcher e colaboradores demonstraram, em ratos, que a lesão isquêmica no CI produz aumento na atividade simpática do nervo renal e aumento significativo na pressão arterial (Butcher and Cechetto, 1995). Corroborando com estes dados, estudos em humanos demonstraram que pacientes com AVE isquêmico apresentam aumento significativo da atividade simpática, e que esse aumento era mais pronunciado quando a lesão era localizada no hemisfério direito (Christensen et al., 2005).

Recentemente, estudos do nosso laboratório, em animais anestesiados, demonstraram que a microinjeção de BMI no DMH-D e DMH-E, resultaram em aumento significativo na FC, atividade simpática do nervo renal (RSNA) e redistribuição de fluxo com redução do fluxo sanguíneo da artéria renal (RBF), e aumento no fluxo femoral direito (FBF). Dentre essas variáveis, podemos destacar a FC que apresentou valores maiores quando o DMH-D foi ativado, demonstrando que possivelmente as respostas cronotrópicas máximas atingidas durante o estresse emocional são possivelmente mediadas pela ativação predominante do DMH-D (Xavier et al., 2009).

Além disso, a inibição farmacológica do DMH-D atenuou de forma mais pronunciada a taquicardia evocada pelo estresse por jato de ar comparado com a inibição do DMH-E. Esses resultados indicam que as vias de controle cardiovascular descendente que são originadas no DMH são predominantemente lateralizadas, e que o

DMH-D pode exercer um controle predominante na reatividade cardíaca durante o estresse emocional (Xavier et al., 2009).

Entretanto a comparação da resposta cardiovascular produzida pelo bloqueio dos receptores GABA ou inibição de suas vias de síntese do lado direito e esquerdo do DMH em animais acordados, ainda não foram avaliadas.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Observar em animais acordados os efeitos cardiovasculares produzidos pelo bloqueio dos receptores GABA ou interferência com sua via de síntese no hipotálamo dorsomedial, sob a perspectiva da ocorrência de assimetria funcional neste núcleo.

Objetivos Específicos

- Comparar, em animais acordados, os efeitos cardiovasculares produzidos pela interferência farmacológica com a síntese de GABA no Hipotálamo dorsomedial à direita e à esquerda.
- Comparar, em animais acordados, os efeitos cardiovasculares produzidos pelo bloqueio de receptores GABA_A no Hipotálamo dorsomedial à direita e à esquerda.
- Comparar, em animais acordados, os efeitos cardiovasculares produzidos pelo bloqueio de receptores GABA_B no Hipotálamo dorsomedial à direita e à esquerda.
- Avaliar as alterações morfofuncionais do coração produzidas pela ativação dos neurônios do Hipotálamo Dorsomedial resultantes do bloqueio dos receptores GABA_A.
- Avaliar a contribuição da disfunção GABAérgica no Hipotálamo dorsomedial à direita e à esquerda em um modelo experimental de ataque de pânico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (n = 72) com peso entre 290 e 330g provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em local adequado com controle da temperatura ambiente (21-23 graus Célsius) e luminosidade (14 horas de luz), em caixas de polipropileno com livre acesso a água e comida. Os experimentos e cirurgias foram realizados no laboratório de Hipertensão.

Todos os experimentos realizados nesse projeto foram aprovados pelo Comitê de ética em Experimentação Animal (CETEA – UFMG) - 160/2011.

3.2 Anestésicos e Analgésico

- Tribromoetanol na dose de 2,5mg/Kg de peso, por via i.p.
- Uretana na dose de 1.4g/kg de peso por via i.p.
- Tiopental na dose de 50mg/kg i.p .
- Banamine na dose de 2,2mg/kg s.c.

Suplementações anestésicas foram ofertadas em doses menores quando necessário. O emprego de cada um dos anestésicos foi especificado em cada procedimento ou protocolo.

3.3 Confeção e implante de cânulas-guia:

Para o direcionamento das agulhas de microinjeção ao Hipotálamo Dorsomedial (DMH), foram confeccionadas cânulas guia de 16 mm, a partir de agulhas 22G hipodérmicas de aço inoxidável.

Os animais foram anestesiados utilizando tribromoetanol na dose de 2,5mg/Kg de peso, por via i.p., após confirmação da anestesia, foram posicionados em um aparelho estereotáxico (STOELTING, IL, USA), onde essas cânulas foram acopladas a torre do estereotáxico com o auxílio de um suporte. A barra incisiva do estereotáxico foi posicionada em 3,3mm acima da linha interaural.

Após a assepsia do local, foi realizada a injeção subcutânea de anestésico local contendo vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% + epinefina 1:200000), seguido de uma incisão mediana para exposição do crânio, e localização do bregma, que será o ponto de referencia para a leitura dos parâmetros: ântero-posterior, látero-lateral e dorso-ventral. Dois parafusos foram fixados ao crânio para ancoragem das cânulas-guia.

O implante das cânulas guia foi realizado de acordo com as coordenadas estabelecidas para o DMH pelo Atlas de Paxinos e Watson (1986). As coordenadas de localização do DMH são: -3.2 mm ântero-posterior, -7.8mm dorso-ventral e + 0.6mm ou - 0.6mm látero-lateral a partir do bregma.

De acordo com o grupo experimental os animais receberam o implante de cânula guia unilateral no DMH-D ou no DMH-E. Posteriormente, as cânulas-guia foram fixadas com auxílio de um acrílico dental autopolimerisável e de pequenos parafusos de aço inoxidável inseridos na calota craniana. Um oclisor metálico de 16 mm foi introduzido na cânula-guia para evitar uma possível obstrução.

Durante todo o procedimento, os animais foram mantidos em local aquecido até a recuperação da anestesia utilizando Heat Pad (Insight Equipamentos/SP). Ao término

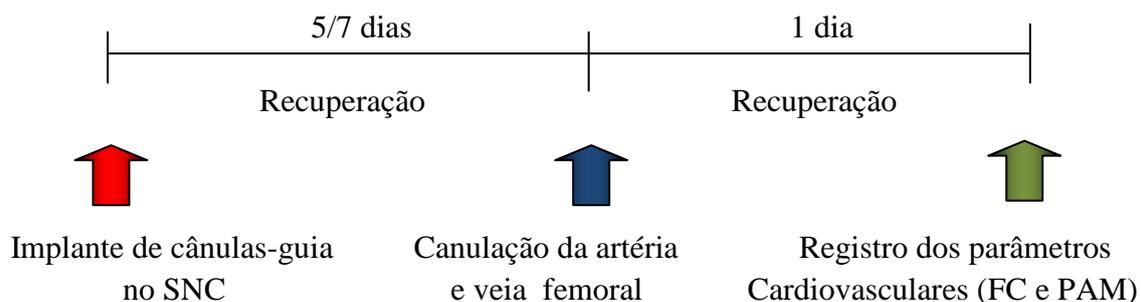
dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam uma dose intramuscular de pentabiótico veterinário (1:200000 UI) e uma dose subcutânea de 0,2 ml do antiinflamatório Banamine na dose de 2,2mg/kg s.c. posteriormente retornaram para o biotério do laboratório, onde foram mantidos em caixas de polipropileno com livre acesso a água e comida.

3.4 Canulação da artéria e veia femoral

Para medida dos parâmetros cardiovasculares, após 5 a 7 dias de recuperação da cirurgia para implante das cânulas guia, os animais foram novamente anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg i.p. suplementado se necessário) e submetidos à cirurgia para implante de cânulas de polietileno na artéria e na veia femoral. Este cateter era preenchido previamente com solução salina (0,9%). Após a introdução dos cateteres, estes eram passados pelo tecido subcutâneo do animal até a sua exteriorização na região interescapular. Todas as incisões foram suturadas. Ao término dos procedimentos cirúrgicos, os animais eram levados para recuperação.

As cânulas de polietileno foram confeccionadas utilizando 4 cm de PE-10 (Clay Adams, 0.011 ID) para a artéria e 2 cm de PE-10 para a veia, soldado por aquecimento ao PE-50 de 15cm para ambos.

O curso temporal dos procedimentos cirúrgicos descritos nos itens 3.3 e 3.4 estão sumarizados no seguinte protocolo:



3.5 Registro dos parâmetros Cardiovasculares

Sempre no turno da manhã, os animais foram transferidos para uma caixa preta, onde os experimentos eram realizados para análise da atividade locomotora. Após 30 minutos a cânula inserida na artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão, ligado a um sistema de aquisição de dados (Biopac Systems model MP-100/MP-150 ACE, CA, USA). Por todo o experimento, a Frequência Cardíaca e Pressão arterial foram registradas continuamente.

3.6 Confecção de cânulas injetoras e procedimento de injeção:

Para a microinjeção de drogas no sistema nervoso central, cânulas injetoras foram confeccionadas a partir de agulhas gengivais 30G curtas. As agulhas foram cortadas no tamanho de 17mm, conectadas a um tubo de polietileno (Norton 0.010 I.D) e a uma seringa Hamilton de 5 µl preenchida com água destilada. O polietileno foi preenchido com droga ou veículo, e entre a água destilada e a substância contida no polietileno havia uma pequena bolha de ar.

Para o controle do volume injetado, a seringa Hamilton foi posicionada em uma bomba de infusão (Kd Scientific). O volume de 0.1µl foi injetado durante um minuto. A injetora foi mantida no sítio de injeção por 45 segundos para maximizar a difusão (CUNHA, 2010). Durante a administração das substâncias, o movimento da bolha de ar indicou o sucesso da injeção. Adicionalmente, para verificar se não havia obstrução na injetora, estas eram testadas após a sua remoção do parênquima cerebral. Cada animal recebeu apenas uma microinjeção, no DMH-D ou DMH-E.

3.7 Infusão de Lactato

No protocolo 5, os animais com movimentação livre na caixa preta, receberam a infusão intravenosa de lactato de sódio 0.5M em veículo (10ml/kg durante 15 min). Este procedimento é similar às infusões realizadas na clínica para teste de Transtorno do pânico (Liebowitz et al., 1986). As respostas cardiovasculares foram registradas, assim como a atividade locomotora do animal. Este protocolo foi previamente descrito por Shekhar e cols., 1996.

3.8 Análise do Comportamento

3.8.1 Atividade locomotora:

Nos experimentos em que a atividade locomotora foi avaliada, os animais foram ambientalizados por 1 hora antes dos experimentos em uma caixa preta, com 47 centímetros de comprimento, 30 centímetros de largura e 16 centímetros de altura. Foram realizadas filmagens dos animais através de uma webcam (Genius NB-300), por um período de 5 minutos em cada fase do experimento. Os vídeos foram armazenados no computador e posteriormente foram analisados.

Para análise da atividade locomotora, a caixa foi dividida em 4 quadrantes de igual tamanho (Figura 4), e foi considerado 1 episódio de locomoção cada vez que o rato passava de um quadrante para outro (running), ou elevava-se sobre as patas traseiras na tentativa de observação do ambiente externo à caixa (jumping), os valores foram expressos como episódios/min.

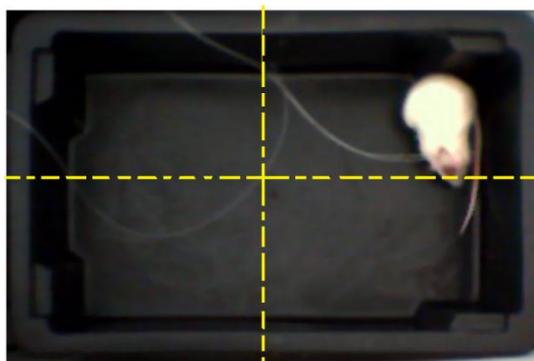


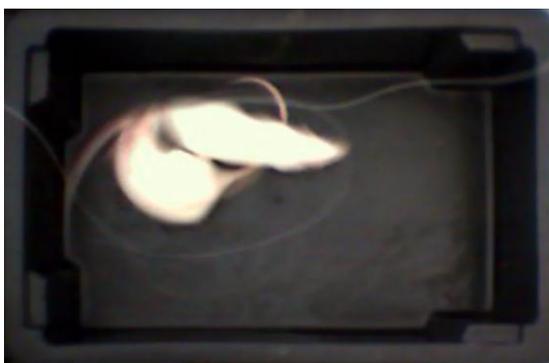
Figura4: Caixa preta onde os animais foram posicionados para realização dos experimentos. A linha tracejada amarela ilustra a linha imaginária utilizada para quantificar a atividade locomotora dos animais.

3.8.2 Teste de Interação social (SI):

O teste de interação social é um teste amplamente validado para teste de ansiedade experimental em ratos e consiste em apresentar um animal estranho ao animal testado durante 5 minutos, dentro da caixa preta na qual o animal testado está ambientalizado (Figura 5). Com auxílio de um cronômetro o tempo de interação é mensurado, este é disparado a cada vez que o animal testado interage com o animal estranho.

É considerada como interação, a exploração olfatória exercida pelo animal testado. Os valores foram expressos como uma média do tempo real de interação dos animais (segundos de interação/5 minutos).

Figura 5: Figura de um animal representativo demonstrando o momento de interação social.



3.9 Histologia

Ao fim de cada experimento os animais foram anestesiados com Tiopental (50mg/kg i.p.), e foi microinjetado 100 nl do corante Alcian Blue DMH, para subsequente confirmação dos sítios das microinjeções.

Após esternotomia, a aorta abdominal foi bloqueada com uma pinça hemostática, para preconizar a perfusão cerebral. Com o auxílio de uma agulha introduzida no ventrículo esquerdo, os animais foram perfundidos com PBS-heparinizado (5 ml de 100 USP de heparina por litro de PBS, aquecido a 37°C) seguido por uma solução de formaldeído 10%.

Os cérebros dos ratos foram removidos e armazenados em formaldeído 10% por no mínimo 24 horas e posteriormente foram transferidos para uma solução de sacarose 20% por 48 horas.

Após esse período, foram feitos cortes transversais de 50 µm de espessura das regiões de interesse, utilizando um criostato. Esses cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas e corados com vermelho neutro 1% através da técnica de Nissl. Os cortes foram analisados por microscopia óptica para confirmação dos sítios de microinjeção utilizando como referência o Atlas de Paxinos e Watson (1986).

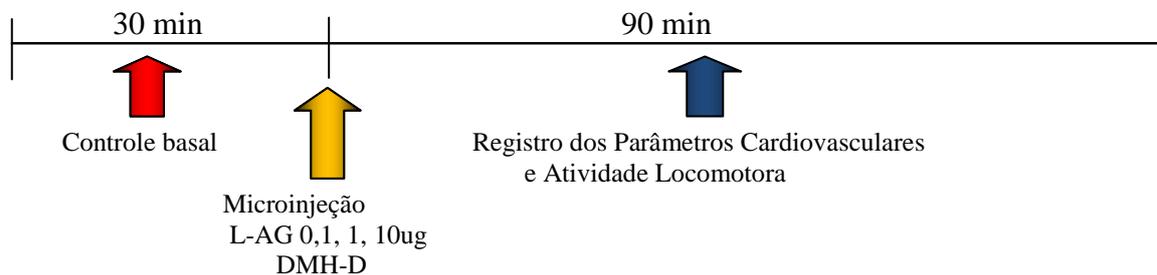
3.10 Procedimentos Experimentais

Protocolo 1: Objetivo: Comparar os efeitos cardiovasculares produzidos pela interferência com a síntese GABA do Hipotálamo Dorsomedial à Direita e à Esquerda

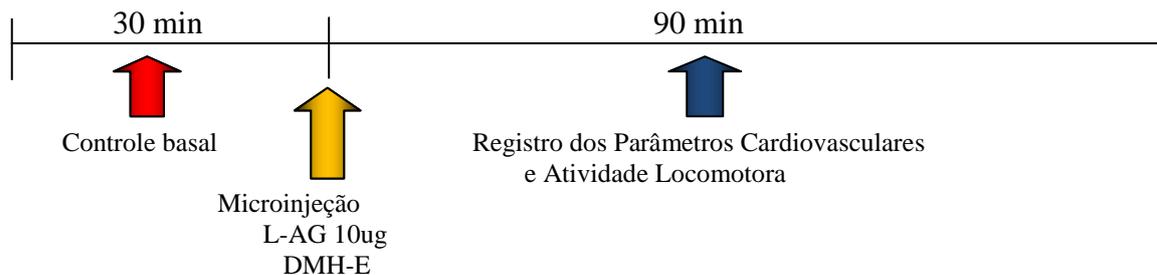
Antes de realizar a comparação dos efeitos cardiovasculares produzidos pela

L-AG nos lados direito e esquerdo do hipotálamo, a primeira parte do protocolo consistiu em realizar uma curva dose resposta de L-AG com as doses de 0,1, 1, 10 μ g/100nl em um dos lados do hipotálamo com o foco nas respostas cardiovasculares, onde cada animal recebeu apenas uma injeção (n = 6, para cada dose).

A curva foi realizada no DMH-D, após a análise dos dados, foi escolhida para comparação com o lado esquerdo à dose de 10 μ g/100 nl (n = 6), capaz de produzir os efeitos descritos na literatura após desinibição do hipotálamo (Shekhar and DiMicco, 1987), efeitos estes que mimetizam uma resposta de luta e fuga, ou seja, uma resposta ampla, que foi avaliada pela resposta conjunta do sistema cardiovascular associado à resposta comportamental. Abaixo o protocolo experimental para a curva dose resposta:



O mesmo protocolo foi realizado com a dose de 10 μ g/100nl para comparação dos efeitos no lado esquerdo do Hipotálamo Dorsomedial:



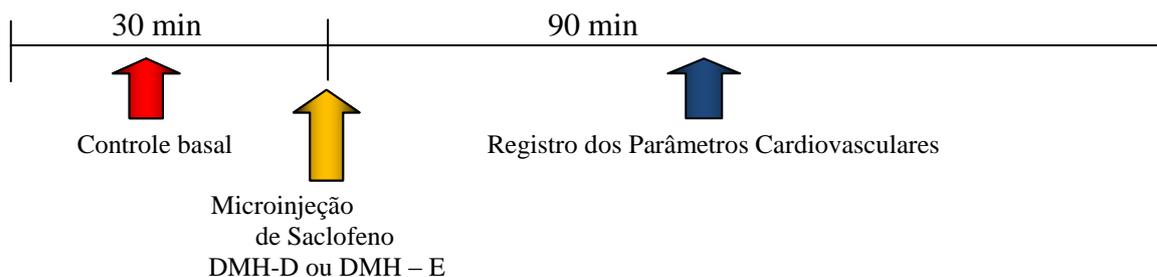
Protocolo 2: Objetivo 1: Comparar a participação dos receptores GABA_A nos lados direito e esquerdo do DMH: investigação de assimetria funcional

Após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares por cerca de 30 minutos, o primeiro grupo de animais recebeu a microinjeção de BMI no DMH-D enquanto o segundo recebeu a microinjeção no DMH-E. O registro seguiu até o retorno aos valores basais. A magnitude e a duração da resposta pressora e taquicárdica produzida pela microinjeção de BMI (10 pmol/100 nl) foram avaliadas neste protocolo (n = 6).



Protocolo 2: Objetivo 2: Avaliar a participação dos receptores GABA_B nos lados direito e esquerdo do DMH: Investigação de Assimetria funcional

Semelhante ao protocolo descrito no objetivo 1, os parâmetros cardiovasculares foram registrados, entretanto neste protocolo, observando se havia resposta cardiovascular após a microinjeção do antagonista GABA_B Saclofeno (10 pmol/100 nl).

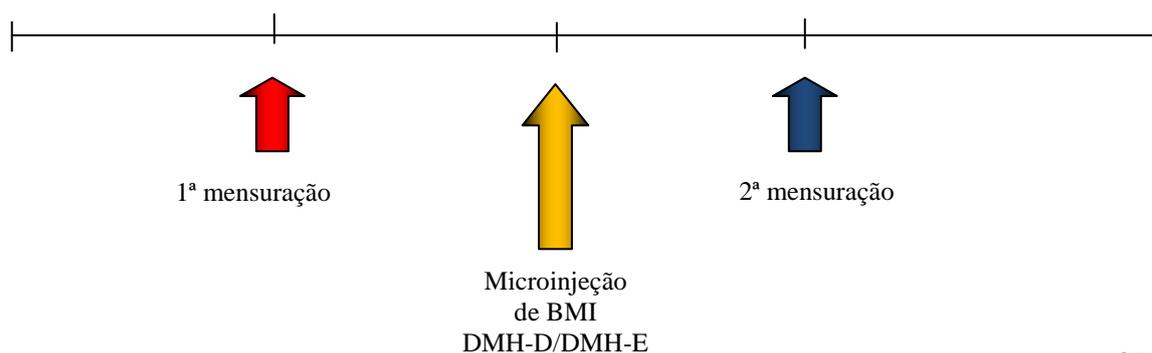


Protocolo 3: Objetivo: Avaliar as alterações morfofuncionais do coração durante ativação dos neurônios do DMH Direito ou Esquerdo

Morfologia e função cardíaca foram avaliados utilizando ultrassonografia de alta resolução, com um sistema Vevo 2100 equipado com transdutor bifrequencial (16/21 MHz, Visual Sonics, Toronto, Canadá). Após indução anestésica com Uretana 1.4g/kg de peso, os ratos foram colocados em posição supina em uma mesa equipada, onde foram submetidos a tricotomia do tórax e abdômen, seguido de traqueostomia para permitir melhor ventilação durante todo o experimento (n=5).

A mesa é equipada com eletrodos para monitorização com eletrocardiograma e sistema de aquecimento para manutenção da temperatura corporal do animal em 37 ° C. Imagens de alta resolução foram obtidas em posição paraesternal direita e esquerda e foram obtidas imagens do eixo longo, eixo curto e apicais. As imagens registradas e os cálculos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

Foram demonstradas as seguintes medidas em Modo-M: as dimensões internas do VE, em diástole e sístole (LVED e LVES respectivamente), espessura da parede posterior do VE (PPVE) e septo interventricular (SIV) na diástole e sístole. A partir dessas medidas foram calculados pelo software: os volumes diastólico final e sistólico final (VDF e VSF), fração de encurtamento (FE), fração de ejeção (FEj) do VE, o volume de ejeção (VS), o débito cardíaco (DC) e a frequência cardíaca (FC).

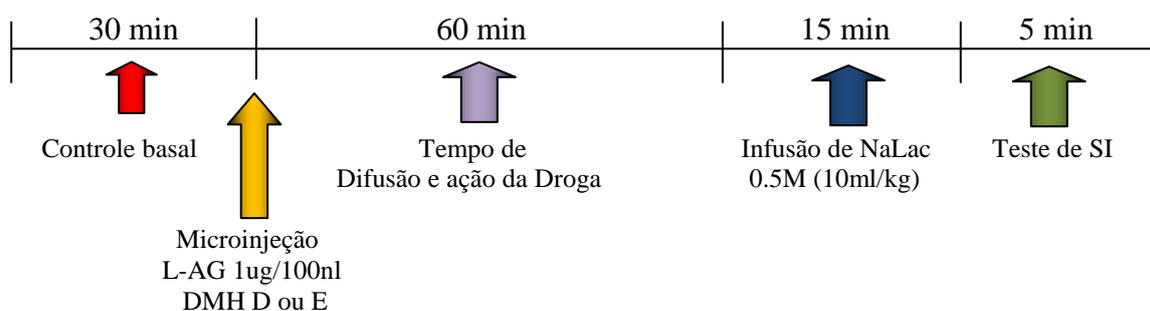


Protocolo 4: Objetivo: Avaliar os efeitos produzidos pela disfunção GABA no Hipotálamo Dormedial direito e esquerdo após a infusão de Lactato

Para realizar um experimento agudo produzindo um ataque de pânico em ratos adaptamos o protocolo previamente descrito por SHEKHAR, 1996, e para tal, utilizamos os dados da curva dose resposta 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g}/100\text{nl}$, descrita no protocolo 1.

Selecionamos a dose de $1\mu\text{g}/100\text{nl}$, que não resultou em alteração cardiovascular nem em aumento da atividade locomotora, mas que o animal dava sinais de ansiedade, como descrito por Shekhar, 1996, além disso estudos realizados por Cunha 2010, observou o comportamento apresentado pelos animais após a injeção desta mesma dose na PAG, observou que esses animais apresentaram um aumento principalmente no “Freezing” que é uma comportamento característico de animais com ansiedade. Dessa forma, a dose de $1\mu\text{g}/100\text{nl}$ foi selecionada e testada no protocolo de ataque de Pânico descrito abaixo (n=5):

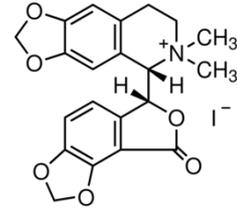
Após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares por 30 cerca de 30 min, os animais receberam a microinjeção de L-allylglicina $1\mu\text{g}/100\text{nl}$ ou Salina no DMH à Esquerda ou à Direita, após 60 minutos, foi iniciada a infusão de Lactato de Sódio (NaLac) 0.5 M durante 15 min utilizando uma bomba de infusão. Ao final da infusão, foi realizado o teste de interação social.



3.11 Drogas

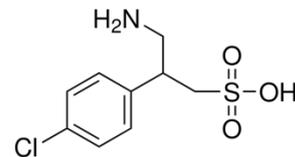
- **Bicuculina Metiodide (BMI);**

Sintetizado a partir da Bicuculina antagonista de receptores GABA_A – C₂₁H₂₀INO₆ – PM: 209.29 – Dose: 10 pmol/100 nL.



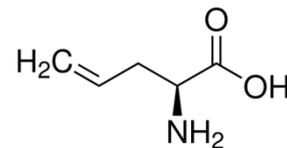
- **Saclofeno;**

Antagonista seletivo de receptores GABA_B – C₉H₁₂ClNO₃S – Peso molecular: 249,71 – Dose: 10 pmol/100 nL.



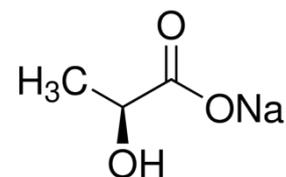
- **L-allylglicine (L-AG);**

Inibidor não específico das isoformas da enzima glutamato-descarboxilase (GAD65 e GAD67) – C₅H₉NO₂ – Peso Molecular: 333.38 – Dose: 0,1 µg, 1 µg e 10 µg/100 nl.



- **Lactato de sódio (NaLac);**

Produzido a partir do piruvato durante a glicólise anaeróbica – C₃H₅NaO₃ – Peso Molecular: 112.06 - 0 Dose: 0,5 M –10 ml/kg.



3.12 Análise dos Dados

Para construção da curva com os valores de Frequência Cardíaca (FR) e Pressão Arterial Média (PAM), esses dados foram coletados a partir de uma média durante 30 segundos a cada 2 minutos de registro no Biopac.

Para facilitar a visualização dos dados, os períodos mais relevantes também foram expressos no gráfico de barras e/ou em delta das variações, subtraindo os valores pós injeção da média dos valores basais.

As demais análises foram descritas em conjunto com o protocolo na qual esta foi empregada.

3.13 Análise Estatística

As comparações entre os dois grupos foram analisadas pelo teste *t* de Student. Comparações no mesmo grupo pré e pós intervenção, foram analisadas utilizando o teste *t* de Student pareado. Para comparação das respostas entre mais de dois grupos utilizamos o teste de análise de variância de uma via (one way ANOVA) seguido de Newman keuls.

A comparação entre dois grupos com os fatores droga e tempo foi utilizado o teste de análise de variância de duas vias (two way ANOVA) seguido de Bonferroni.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prisma. O nível de significância foi fixado quando o $P < 0,05$. Todos os valores foram expressos como médias \pm erro padrão da média (EPM).

4. RESULTADOS

Protocolo 1: Objetivo: Avaliar os efeitos da nanoinjeção aguda de L-allylglicina no DMH de ratos acordados

A figura 4.1 mostra as alterações na PAM, FC e Atividade Locomotora produzidas pela injeção de L-AG no DMH de ratos acordados. A menor dose utilizada na curva, 0,1µg/100nl, não produziu qualquer alteração cardiovascular ou comportamental nos animais avaliados, apresentando resposta semelhante aos valores basais.

A dose intermediária de 1µg/100nl também não resultou em alterações cardiovasculares, no entanto, vale a pena ressaltar que, mesmo embora não tenhamos realizado uma análise quantitativa da ansiedade, esses animais pareciam estar em alerta a qualquer movimento externo e pequeno aumento da atividade locomotora, mas sem diferença estatística do grupo salina.

A nanoinjeção aguda de L-AG 10µg no DMH foi a única capaz de produzir resposta cardiovascular e comportamental significativamente diferente do controle (Tabela 1). Desta forma, esta foi a dose de escolha para comparação com o DMH-E, esses dados são mostrados na figura 4.2, onde é possível observar também que a nanoinjeção de 10µg de L-AG no DMH-D e DMH-E promoveram importante aumento na PA, FC e atividade locomotora em animais acordados.

Tabela 1	L-AG 10 µg/100 nl	L-AG 1 µg/100 nl	L-AG 0,1 µg/100 nl	Salina
Δ FC (bpm)	132 ± 10 *	20 ± 3	2 ± 5	7 ± 1
Δ PAM (mmHg)	20 ± 2 *	7 ± 1	1 ± 2	2 ± 1
Δ AL (episódios/min)	17 ± 2 *	3 ± 1	0 ± 1	0 ± 0

Tabela 1: Tabela com os dados de Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC) e Atividade Locomotora (AL) apresentada após a injeção de doses crescentes de L-AG.* P < 0,05. Teste: One Way ANOVA seguido do pós teste de Newmn-Keuls.

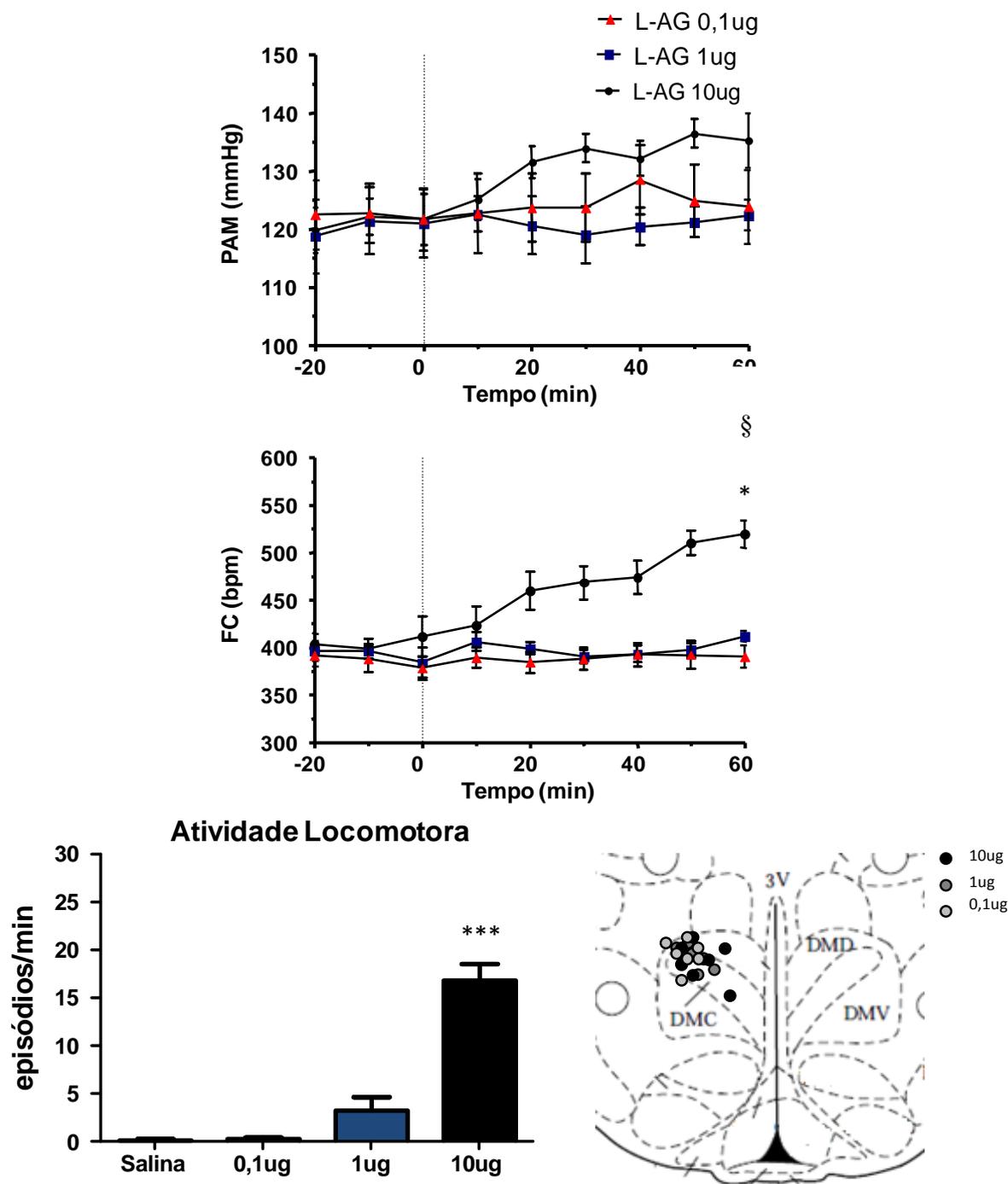


Figura 4.1 – Alterações na Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC) e Atividade locomotora produzidas pela nanoinjeção de doses crescentes de L-Allylglicina (L-AG) (0,1, 1, 10 μ g/100nl) no DMH-D. No painel superior é possível observar a resposta pressora e um diagrama esquemático ilustrando os sítios de injeção dos animais incluídos neste protocolo. No painel inferior, podemos observar a FC apresentada de forma dose dependente e o mesmo na resposta comportamental analisada pela atividade locomotora apresenta pelos animais. § P<0,01 para 10 μ g vs 0,1 e 1 μ g/100nl. Teste: two way ANOVA seguido de Bonferroni; *** P<0,01 para 10 μ g vs salina, 0,1 e 1 μ g. Teste: one way ANOVA. (n=6).

Quando comparamos os grupos, foi possível observar que a resposta cardiovascular produzida pela microinjeção de L-AG 10 µg/100 nl à esquerda começa a estabilizar por volta de 40 minutos, enquanto que a taquicardia produzida pela microinjeção à direita continuou aumentando até o termino do período experimental. Dessa forma, somente aos 60 minutos a resposta promovida pela microinjeção à direita foi significativamente maior quando comparado com o lado esquerdo ($\Delta FC = DMH - D: 132 \pm 10$ bpm; $DMH - E: 51 \pm 18$ bpm; Salina: 2 ± 5).

A resposta comportamental não diferiu nos grupos direito e esquerdo ($DMH-D: 17 \pm 2$ episódios/min; $DMH-E: 15 \pm 2$ episódios/min), os animais apresentaram reações de defesa e exploração descoordenadas.

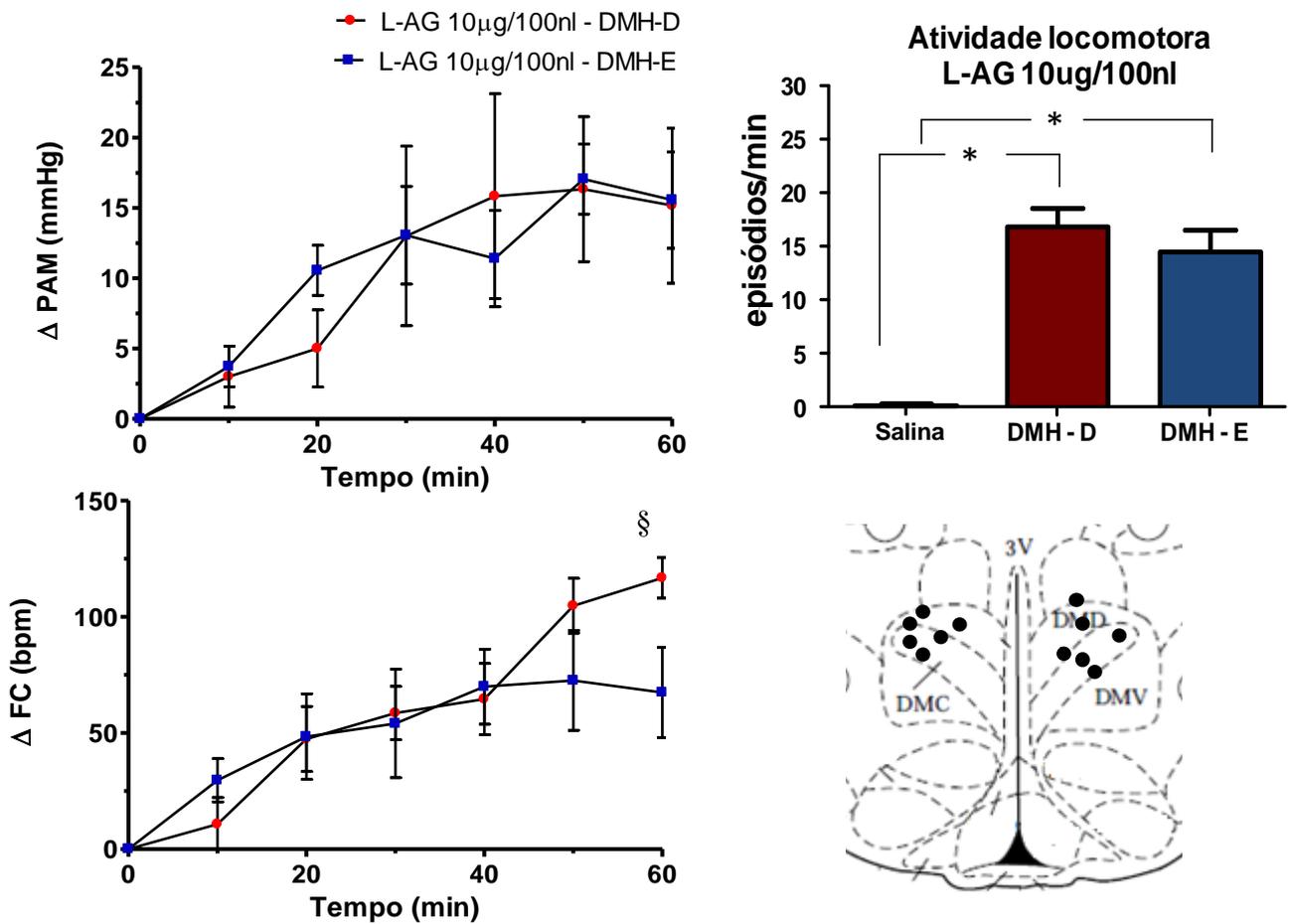


Figura 4.2 – Comparação das respostas cardiovasculares e comportamentais produzidas pela nanoinjeção de L-AG 10ug nos lados direito e esquerdo do DMH. No painel superior é possível observar o delta da resposta pressora e abaixo, podemos observar a FC apresentada após a injeção nos diferentes lados do DMH. No painel inferior está representada a análise da atividade locomotora apresentada pelos animais e um diagrama esquemático ilustrando os sítios de injeção dos animais incluídos neste protocolo (n=6). § $P < 0,01$ teste two way ANOVA seguido de Bonferroni - DMH-D vs DMH-E aos 60min. *** $P < 0,01$ Teste: One way ANOVA seguido de Newman Keuls.

Protocolo 2: Objetivo: Avaliar a participação dos receptores GABA_A nos lados direito e esquerdo do DMH: investigação de assimetria funcional

Como descrito em estudos prévios a nanoinjeção de BMI (10 pmol/100 nl) no DMH produziu importante aumento na FC, acompanhado de um aumento mais discreto na PAM quando comparado com os valores basais em ambos os grupos (Figura 4.3).

Nossos dados mostraram que as alterações médias máximas na PAM e FC entre os grupos não diferiu, como pode ser visto na figura 4.4. No entanto, a duração da taquicardia produzida pela nanoinjeção à direita durou quase o dobro da taquicardia produzida pela nanoinjeção à esquerda (DMH - D: 37 ± 3 min; DMH - E: 19 ± 3 min) como pode ser observado pelo traçado representativo na figura 4.3.

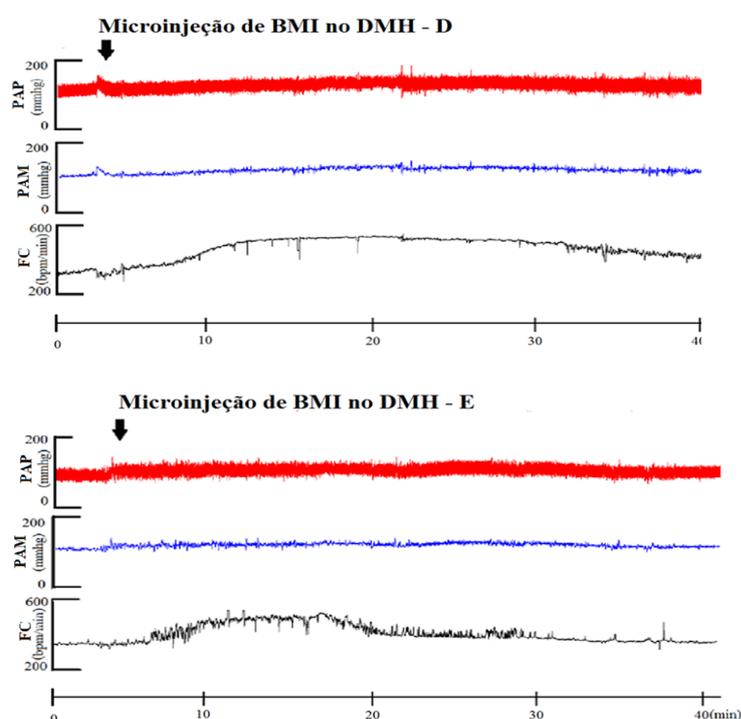
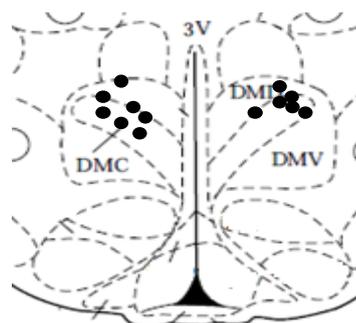


Figura 4.3 - Traçado representativo das alterações evocadas pela injeção de BMI. No painel superior, registro de um animal representativo do grupo DMH-D 10pmol/100nl e no painel inferior, registro de um animal representativo do grupo DMH-E 10pmol/100nl. Ao lado, diagrama esquemático dos sítios de injeção dos animais incluídos neste grupo. PAP = Pressão Arterial Pulsátil; PAM = Pressão Arterial Média; FC = Frequência Cardíaca.



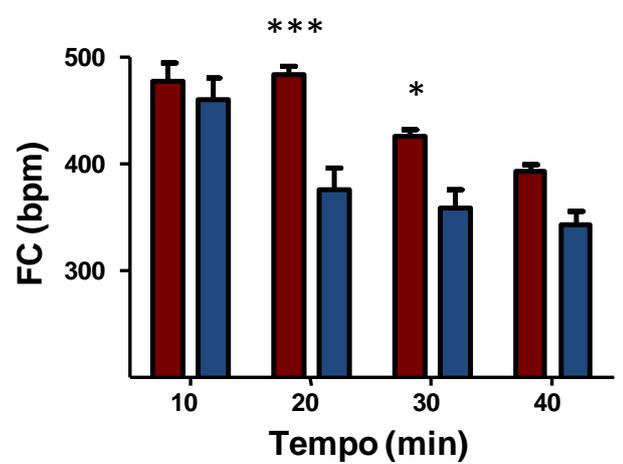
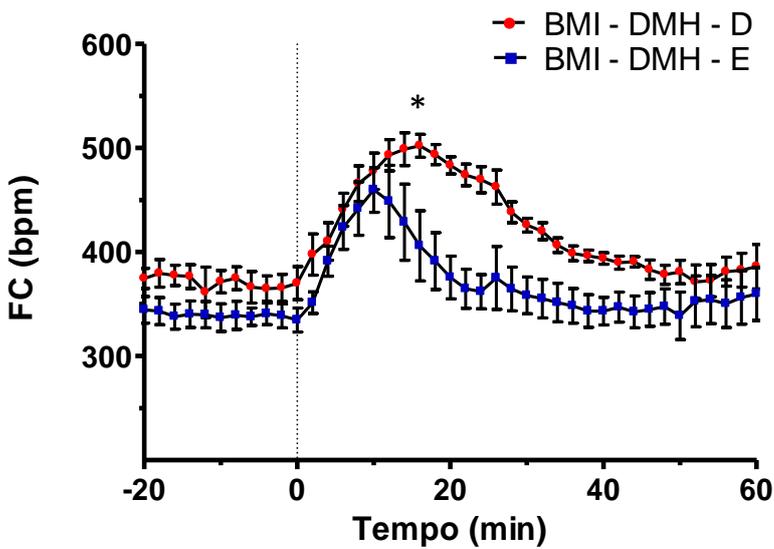
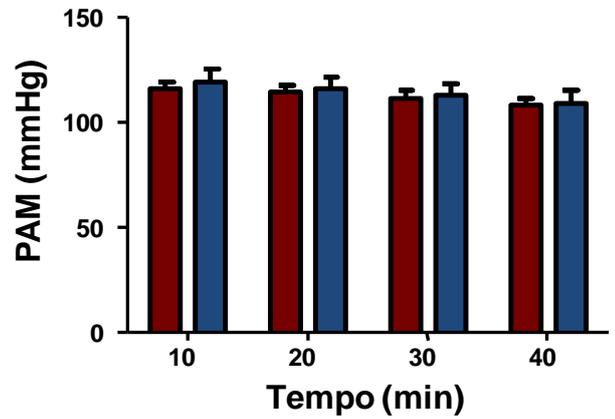
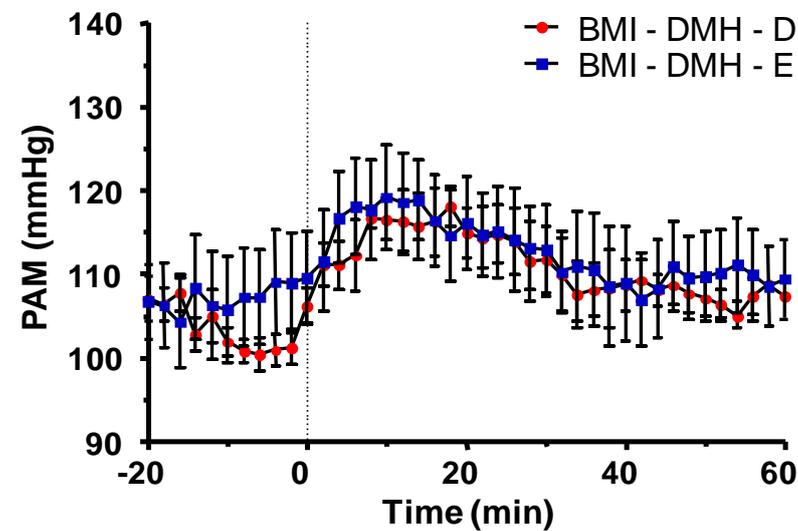


Figura 4.4 – No painel superior está demonstrado a comparação da resposta pressora produzida pela nanoinjeção de BMI (10 μ mol/100nl) no DMH à Direita e à Esquerda. E no painel inferior está demonstrada a comparação da resposta taquicárdica produzida pela nanoinjeção de BMI (10 μ mol/100nl) no DMH à direita e à esquerda. Em ambos, à direita é possível observar o traçado com os dados obtidos, enquanto à esquerda está ilustrado os mesmos dados mas expressos no gráfico de barras no período mais relevante do traçado à direita (n=6). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,01$ DMH – D vs DMH – E. Teste: Two way ANOVA seguido de Bonferroni.

Objetivo 2: Avaliar a participação dos receptores GABAB nos lados direito e esquerdo do DMH: investigação de assimetria funcional

O bloqueio dos receptores GABA_B no DMH utilizando o antagonista Saclofeno (100 pmol/100 nl) não resultou em alterações significativas na pressão arterial (DMH – D: $\Delta 5 \pm 2$ mmHg; DMH – E: $\Delta 4 \pm 3$ mmHg), e na frequência cardíaca (DMH-D: $\Delta 2 \pm 9$ bpm; DMH-E: $\Delta 26 \pm 5$ bpm) como pode ser observado na figura 4.5 e 4.6.

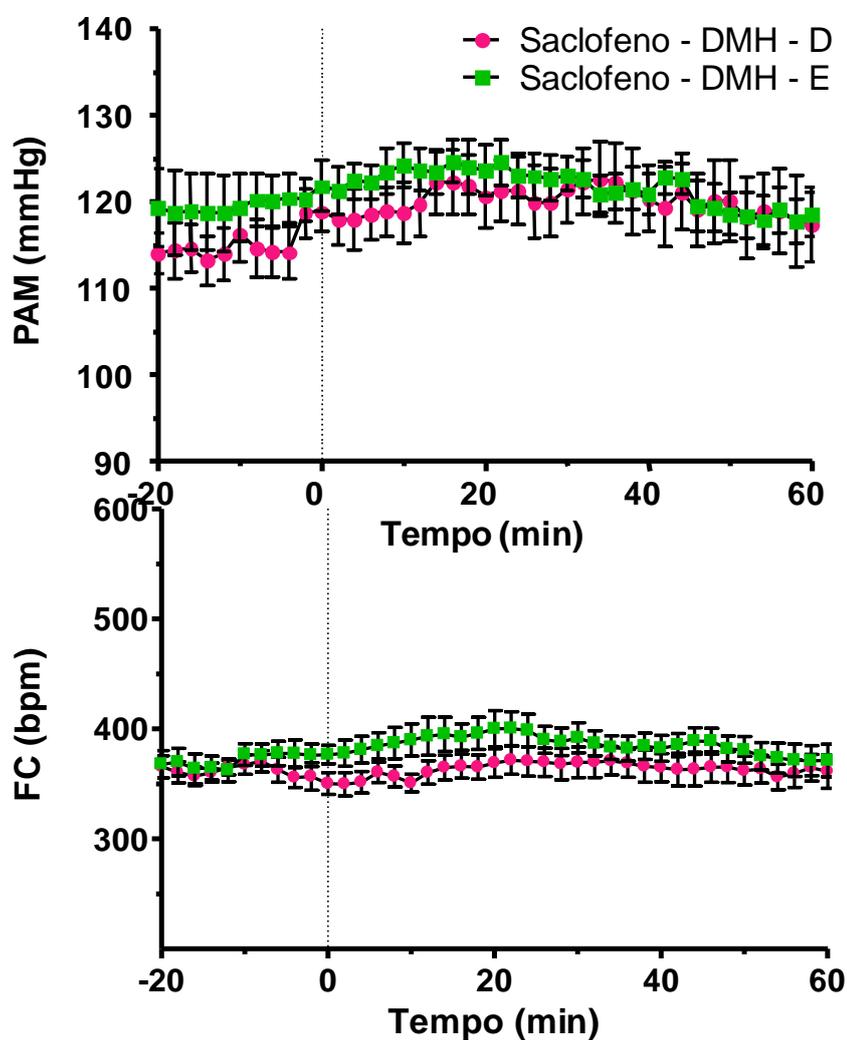
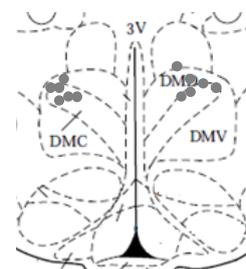


Figura 4.5 – Comparação das respostas cardiovasculares produzidas pela nanoinjeção de Saclofeno (10pmol/100nl) no DMH à direita e à esquerda. No painel superior é possível observar a resposta pressora, no painel inferior podemos observar a Frequência Cardíaca apresentada após a injeção nos diferentes lados do DMH, e ao lado o digrama esquemático com os sítios de injeção dos animais adicionados ao grupo. Teste: Two way ANOVA seguido de Bonferroni (n=6).



Quando comparamos os deltas das respostas cardiovasculares máximas produzidas pela nanoinjeção de BMI com as respostas produzidas pelo Saclofeno, é possível observar que a magnitude da resposta cardiovascular produzida pela nanoinjeção de BMI foi muito maior quando comparada à injeção de saclofen (DMH-D: BMI: 141 ± 14 bpm/ 18 ± 2 mmHg; Saclofen: 2 ± 9 bpm/ 5 ± 2 mmHg) (DMH-E: BMI: 125 ± 15 bpm/ 16 ± 2 mmHg; Saclofen: 26 ± 5 bpm/ 5 ± 3 mmhg) .

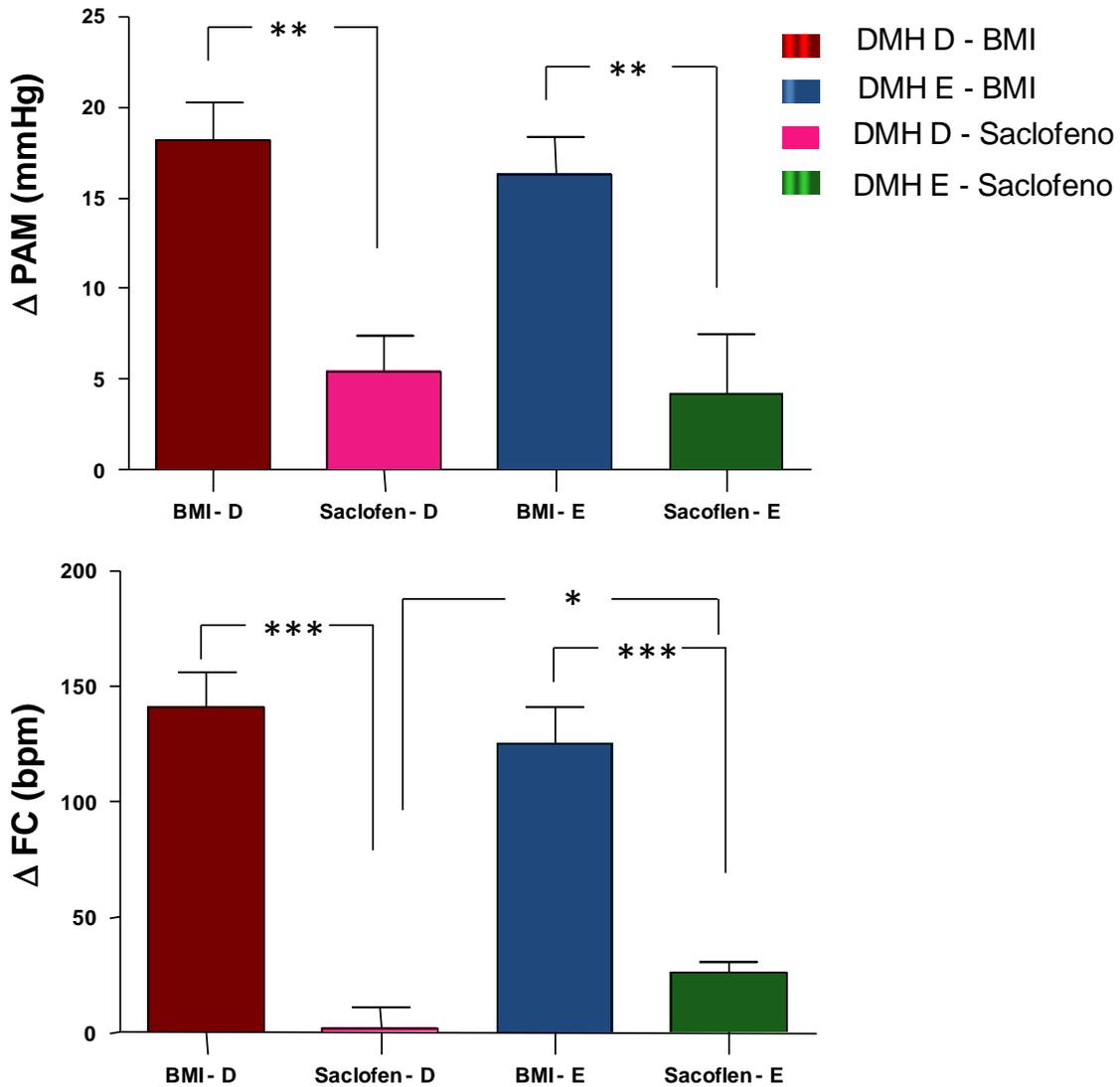


Figura 4.6 – Delta das respostas cardiovasculares médias máximas produzidas pela nanoinjeção de Saclofeno (10pmol/100nl) ou BMI no DMH à direita e à esquerda. As alterações na Pressão Arterial Média são demonstradas no painel superior, enquanto o painel inferior demonstra o efeito sobre a Frequência Cardíaca dos animais observados. ** P<0,03 e ***P<0,001 BMI vs Saclofen (n=6). Teste: One way ANOVA seguido de Newman-keuls.* P<0.05 DMH-D VS DMH-E pós injeção de Saclofen. Teste: test t não-pareado

Protocolo 3: Objetivo: Avaliar as alterações morfofuncionais do coração durante ativação dos neurônios do DMH direito ou esquerdo

A ecocardiografia realizada antes e após a nanoinjeção de BMI 40pmol/100nl evidenciou um aumento importante na atividade cardíaca proveniente do bloqueio dos receptores GABA_A do DMH. Foi observado aumento da FC (DMH - D: 445±8; DMH - E: 434±13) e da Fração de encurtamento (DMH - D: 80%±2; DMH - E: 81%±2) em ambos os grupos como demonstrado nas figuras representativas dos grupos 4.7 e 4.8, e nos gráficos a seguir (Figura 4.10,4.11 e 4.12).

Em concordância com esses dados, na avaliação morfológica foi observada uma diminuição do diâmetro (DMH - D: 0.98mm ± 0.1; DMH - E: 0.83mm ± 0,1) e do volume da câmara ventricular esquerda ao final da Sístole (DMH - D: 2ul ±2; DMH - E: 1.6ul ±0.8) como pode ser observado na figura 4.11, mas que não foi traduzido em aumento de DC (Figura 4.10). No entanto, a comparação entre os grupos DMH-D e DMH-E, não apresentou diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados pelo ecocardiograma.

A figura 4.9, apenas foi adicionada para descrever um fato ocorrido em um dos animais que receberam a microinjeção de BMI no DMH-D, a presença de focos ectópicos ventriculares com pausa compensatória após a injeção.

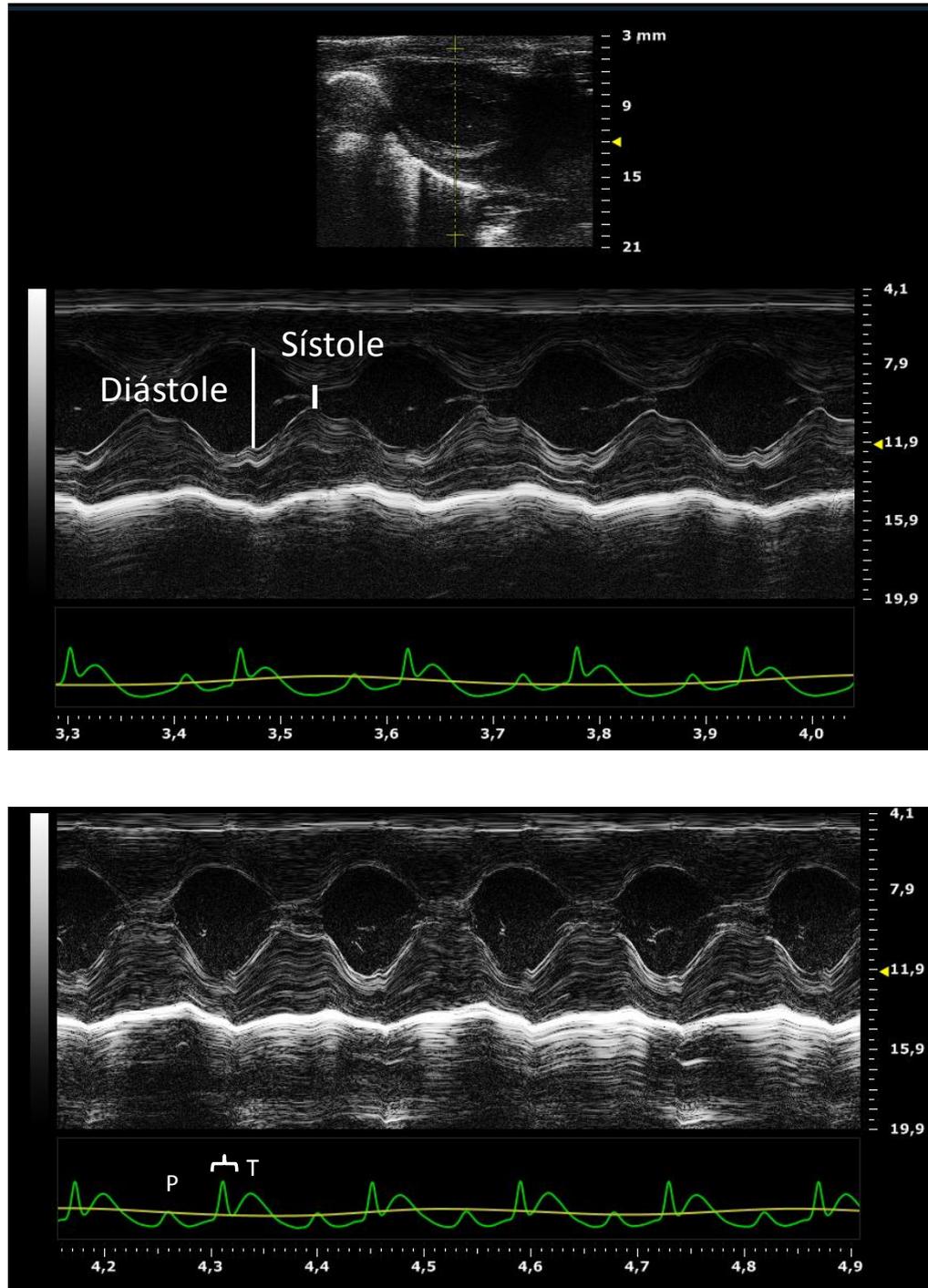


Figura 4.7 – Figura representativa da avaliação morfofuncional cardíaca realizada utilizando o Ecocardiograma Modo M - eixo longo nos períodos pré (painel superior) e pós injeção (painel inferior) de BMI (40pmol/100nl) no DMH - D. ECG = eletrocardiograma; a chave representa o complexo QRS do traçado eletrocardiográfico.

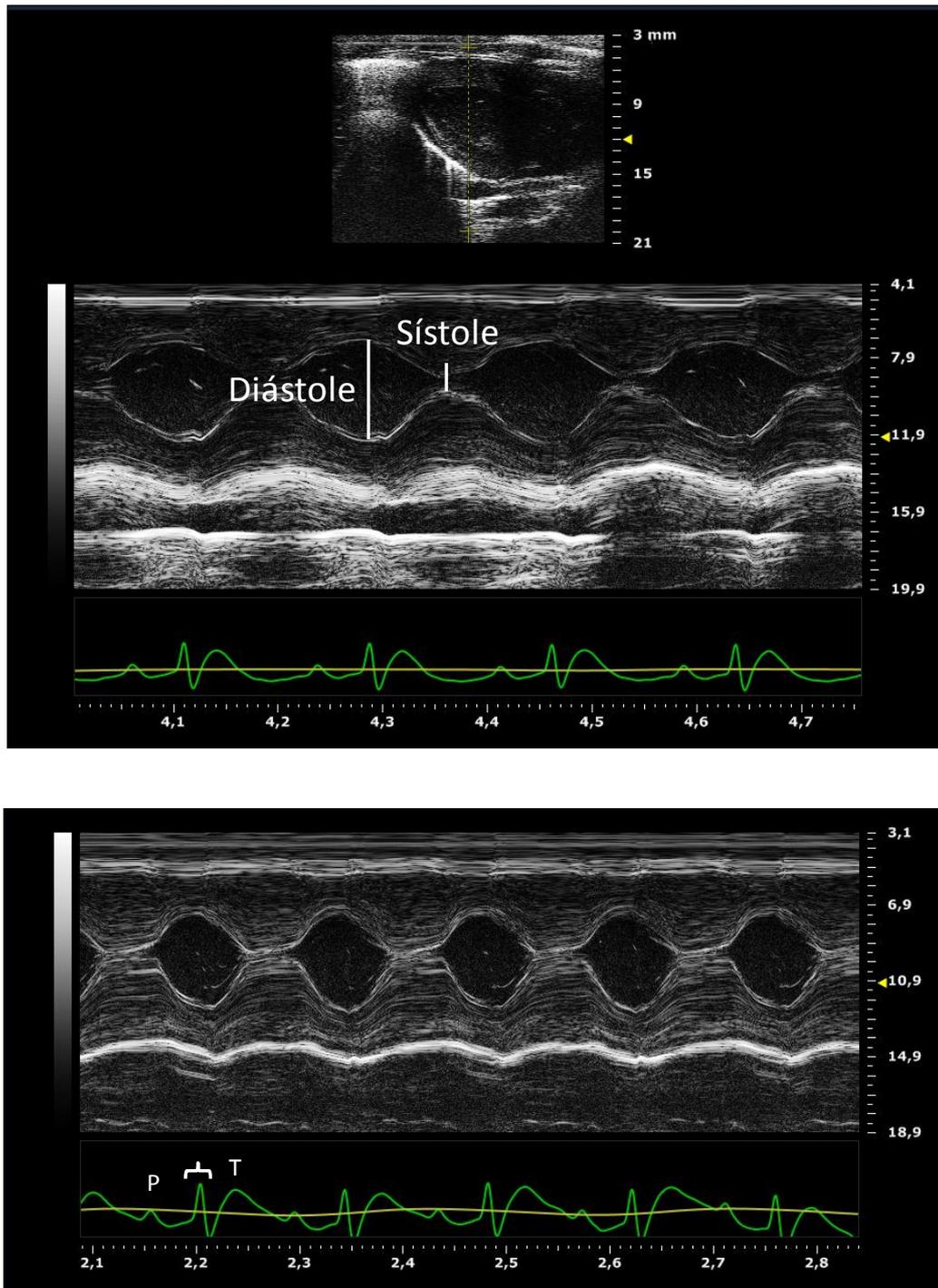


Figura 4.8 – Figura representativa da avaliação morfofuncional cardíaca realizada utilizando o Ecocardiograma Modo M - eixo longo nos períodos pré (painel superior) e pós injeção (painel inferior) de BMI (40pmol/100nl) no DMH - E. ECG = eletrocardiograma; a chave representa o complexo QRS do traçado eletrocardiográfico.

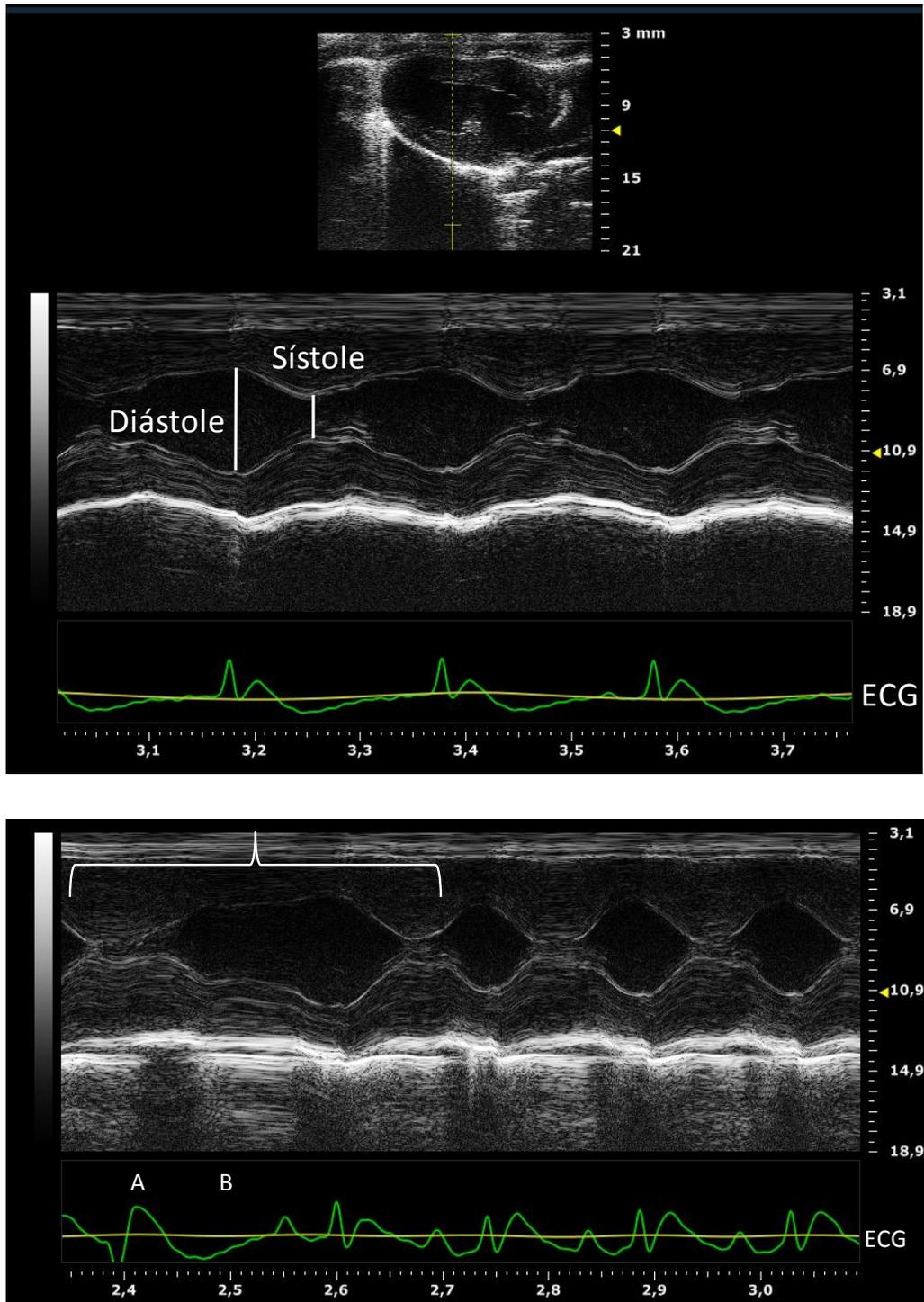


Figura 4.9 – Figura representativa de um animal do grupo de BMI (40pmol/100nl) no DMH - D utilizando o Ecocardiograma Modo M - eixo longo períodos pré (painel superior) e pós injeção (painel inferior), onde foi evidenciado a presença de arritmia cardíaca pós injeção. ECG = eletrocardiograma; a chave representa o período em que ficou evidenciada a arritmia cardíaca; A = complexo ventricular isolado e B = pausa compensatória.

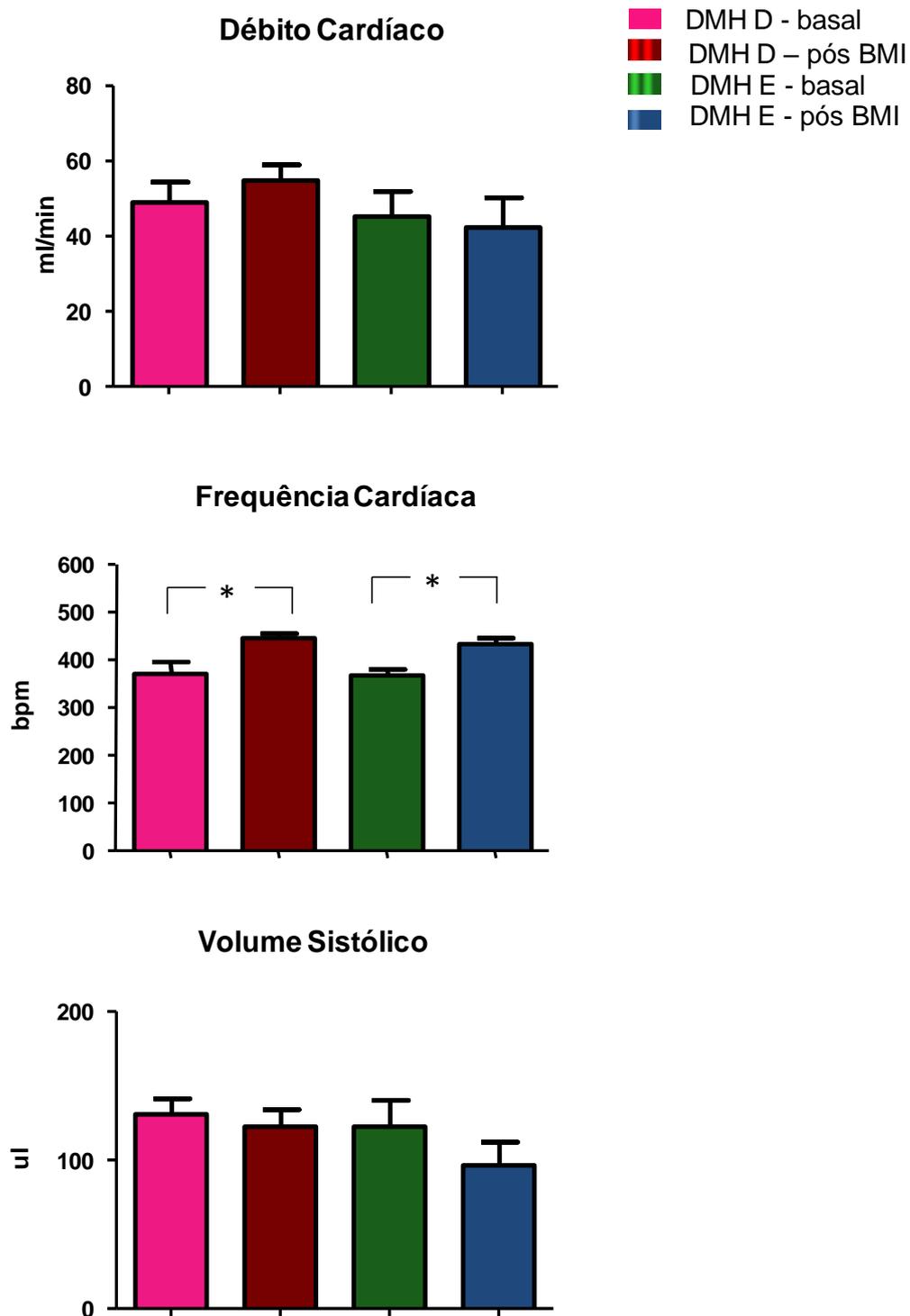


Figura 4.10 – Avaliação Morfofuncional Cardíaca para comparação das respostas cardiovasculares produzidas pela nanoinjeção de BMI (40pmol/100nl) no DMH à direita e à esquerda. O débito cardíaco se refere ao volume de sangue bombeado por cada ventrículo por minuto. Este é determinado pela FC e o volume de sangue ejetado durante cada sístole (VS), e pode ser expresso pela forma matemática: $DC = FC \times VS$. O VS é calculado pela diferença do volume diastólico final (VDF) e volume sistólico final (VSF). * $p < 0,05$ Pré e pós – BMI. Teste: One way ANOVA seguido de Newman Keuls (n=5).

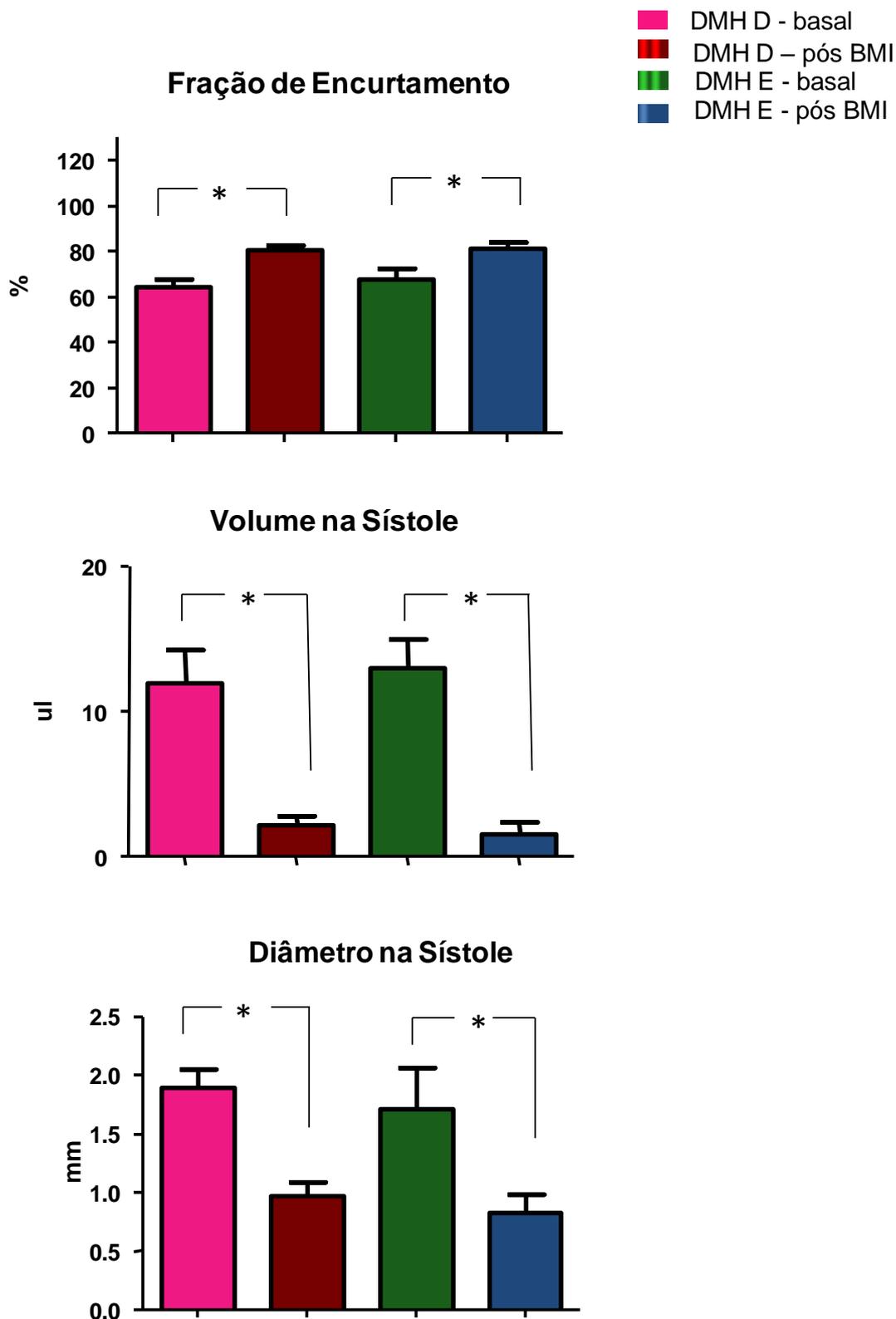


Figura 4.11 – Avaliação Morfofuncional Cardíaca para comparação das respostas cardiovasculares produzidas pela nanoinjeção de BMI (40pmol/100nl) no DMH à direita e à esquerda. A fração de encurtamento do ventrículo esquerdo representa a mudança percentual do diâmetro do eixo menor do ventrículo esquerdo que ocorre na sístole. É calculada pela diferença entre a dimensão diastólica final (LVED) e a dimensão sistólica final (LVES), normalizada pela dimensão diastólica final, e expressada como $SF = (LVED - LVES)/LVED \times 100$. * $p < 0,05$ Pré e pós – BMI. Teste: One way ANOVA seguido de Newman Keuls (n=5).

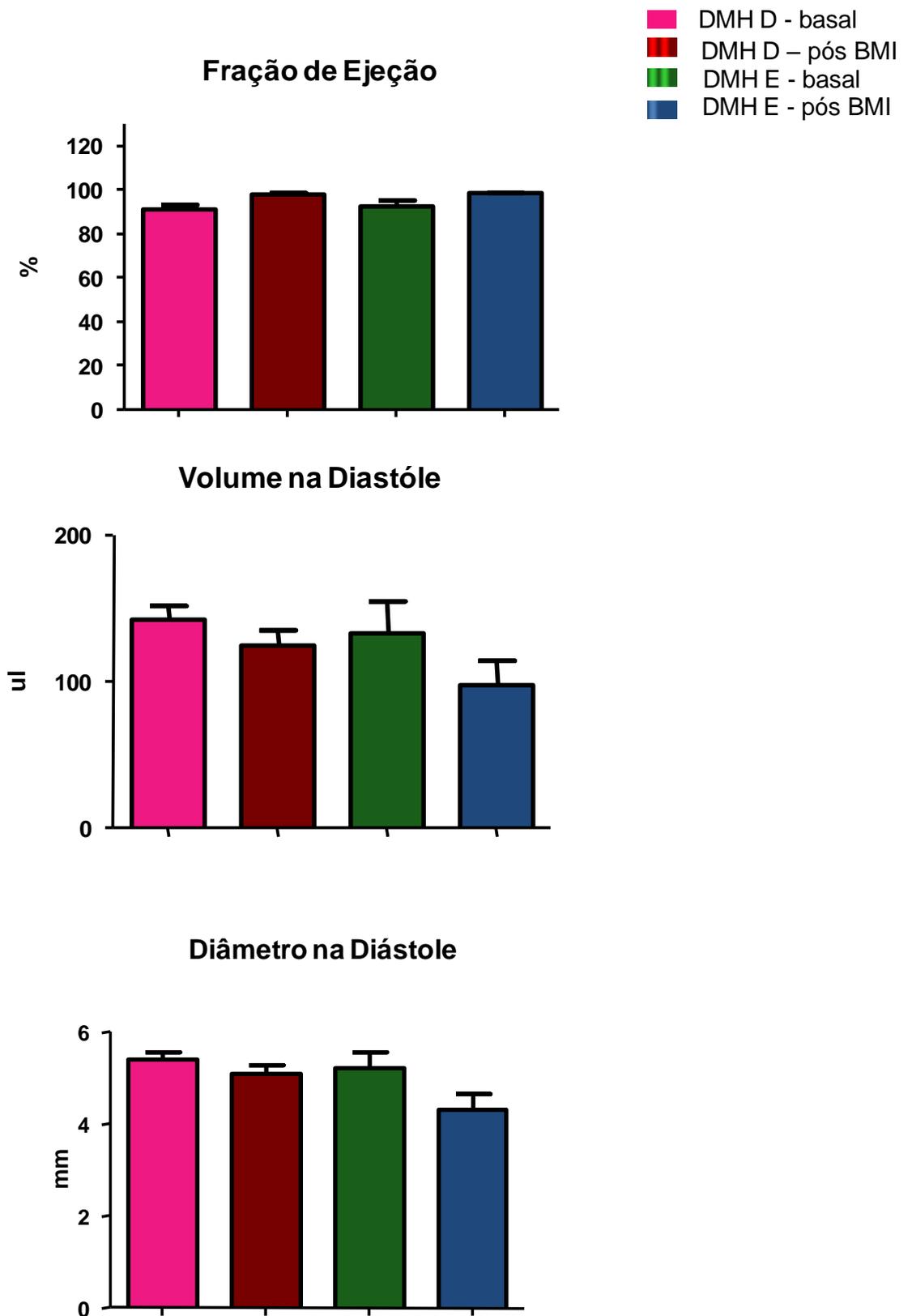


Figura 4.12 – Avaliação Morfofuncional Cardíaca para comparação das respostas cardiovasculares produzidas pela nanoinjeção de BMI (40pmol/100nl) no DMH à direita e à esquerda. Fração de ejeção se refere à fração do volume de sangue recebido durante a diástole que é ejetada durante a sístole: FE = VS/VDF Teste: One way ANOVA seguido de Newman Keuls (n=5).

Protocolo 4: Objetivo: Avaliar a participação da disfunção GABA no Hipotálamo Dormedial direito e esquerdo após a infusão de lactato

Como demonstrado anteriormente, a injeção de L-AG 1 μ g/100nl, não foi capaz de promover alterações cardiovasculares ou comportamentais quando realizado isoladamente, no entanto, com este protocolo foi possível observar que esta dose foi capaz de alterar a responsividade das variáveis cardiovasculares (Figura 4.13) e comportamentais à infusão periférica de lactato de sódio. Este fenômeno é semelhante aquele descrito por Shekhar e colaboradores em estudos abordando o modelo de transtorno do pânico em ratos.

Durante a infusão de lactato, foi possível observar um aumento na pressão arterial (Figura 4.14), da frequência cardíaca (Figura 4.15) e da atividade locomotora (Figura 4.16) somente nos grupos que receberam a nanoinjeção de L-AG no DMH-D ou DMH-E. A infusão de lactato 60 minutos após a injeção de salina no DMH não resultou em resposta cardiovascular e comportamental significativamente diferente do basal, demonstrando assim, que a disfunção produzida pela L-AG no DMH foi preponderante para induzir essa sensibilidade a infusão de lactato. Analisando as respostas cardiovasculares produzidas pelos animais que receberam a injeção de L-AG no DMH-D ou DMH-E, não conseguimos observar diferença significativa entre os grupos. No entanto, ambos foram diferentes estatisticamente do grupo salina.

A infusão de lactato após a injeção de L-AG 1 μ g/100nl no DMH-E produziu um aumento significativo da resposta locomotora quando comparado ao grupo salina, enquanto que a injeção de L-AG 1 μ g/100nl no DMH-D seguido da infusão do lactato produziu uma diminuição significativa no teste de interação social comparado também ao grupo salina.

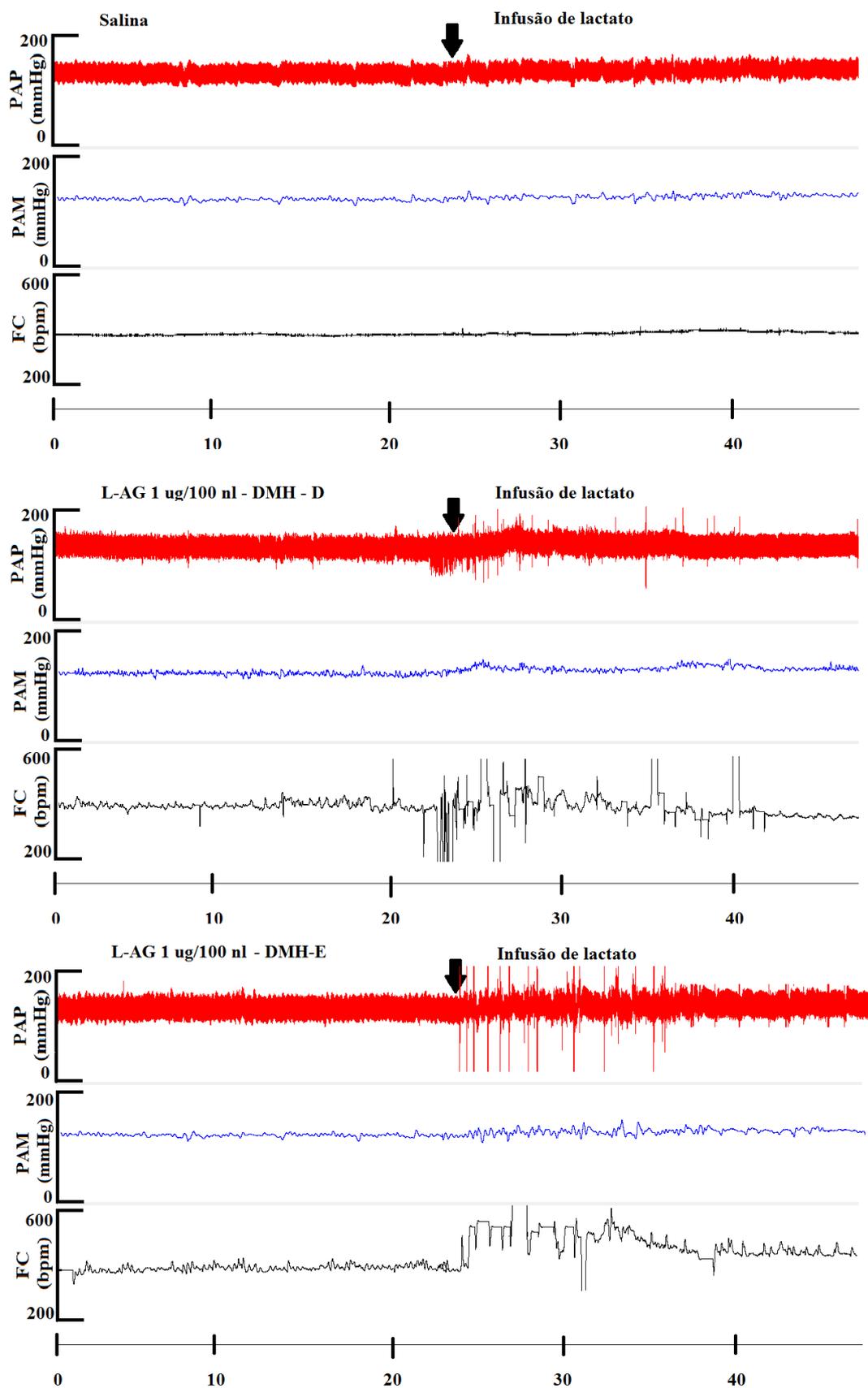


Figura 4.13 - Traçado representativo das alterações evocadas pela injeção de L-AG 1 $\mu\text{g}/100$ nl seguido da infusão de lactato de sódio. No painel superior, registro de um animal representativo do grupo controle, abaixo um animal representativo do grupo DMH-D e no painel inferior, registro de um animal representativo do grupo DMH-E.

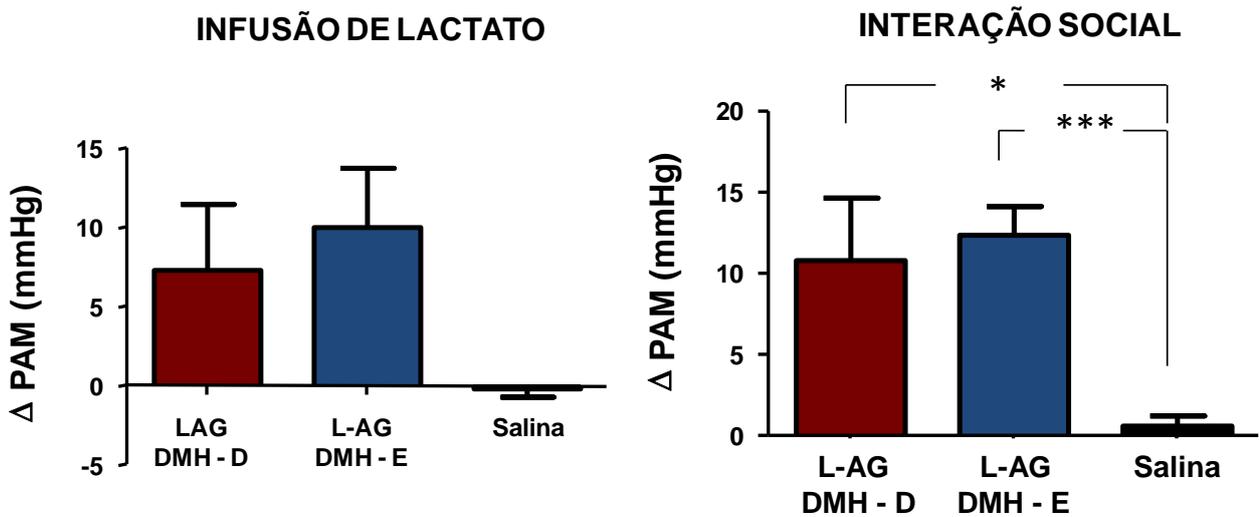
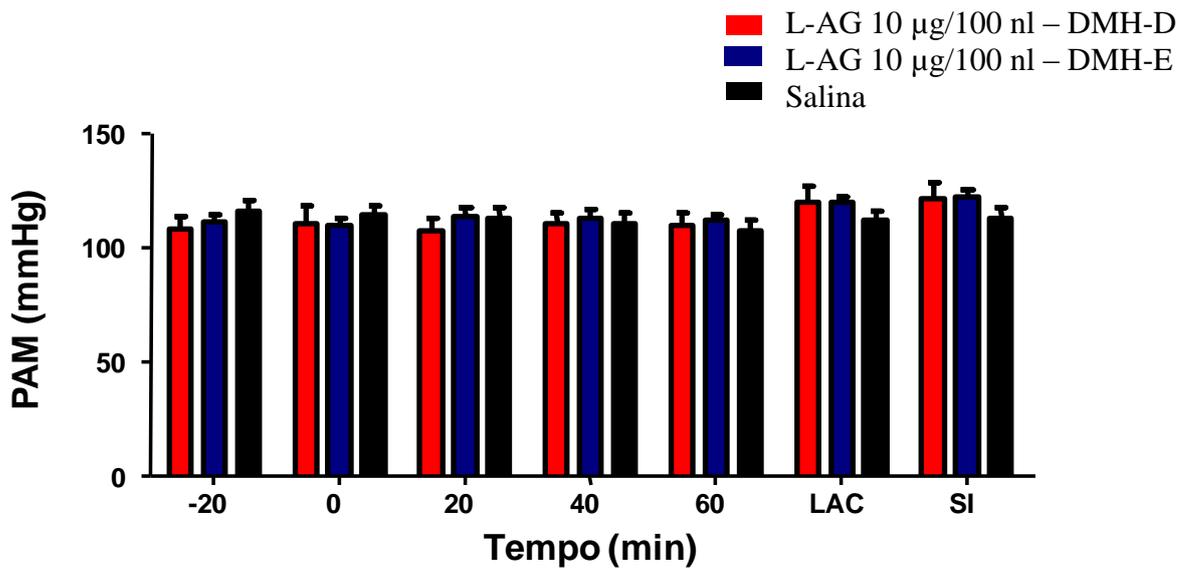


Figura 4.14 – Alterações na Pressão Arterial Média após injeção de L-AG 1µg/100nl no Hipotálamo Dorsomedial à Direita e à Esquerda ou Salina no Hipotálamo Dorsomedial à Direita seguido da infusão de Lactato de Sódio 0,5M. No painel superior é possível observar as resposta ao longo de todo o registro, enquanto o painel inferior é possível observar o delta das alterações mais relevantes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,01$. Teste: One way ANOVA seguido de Newman Keuls (n=5).

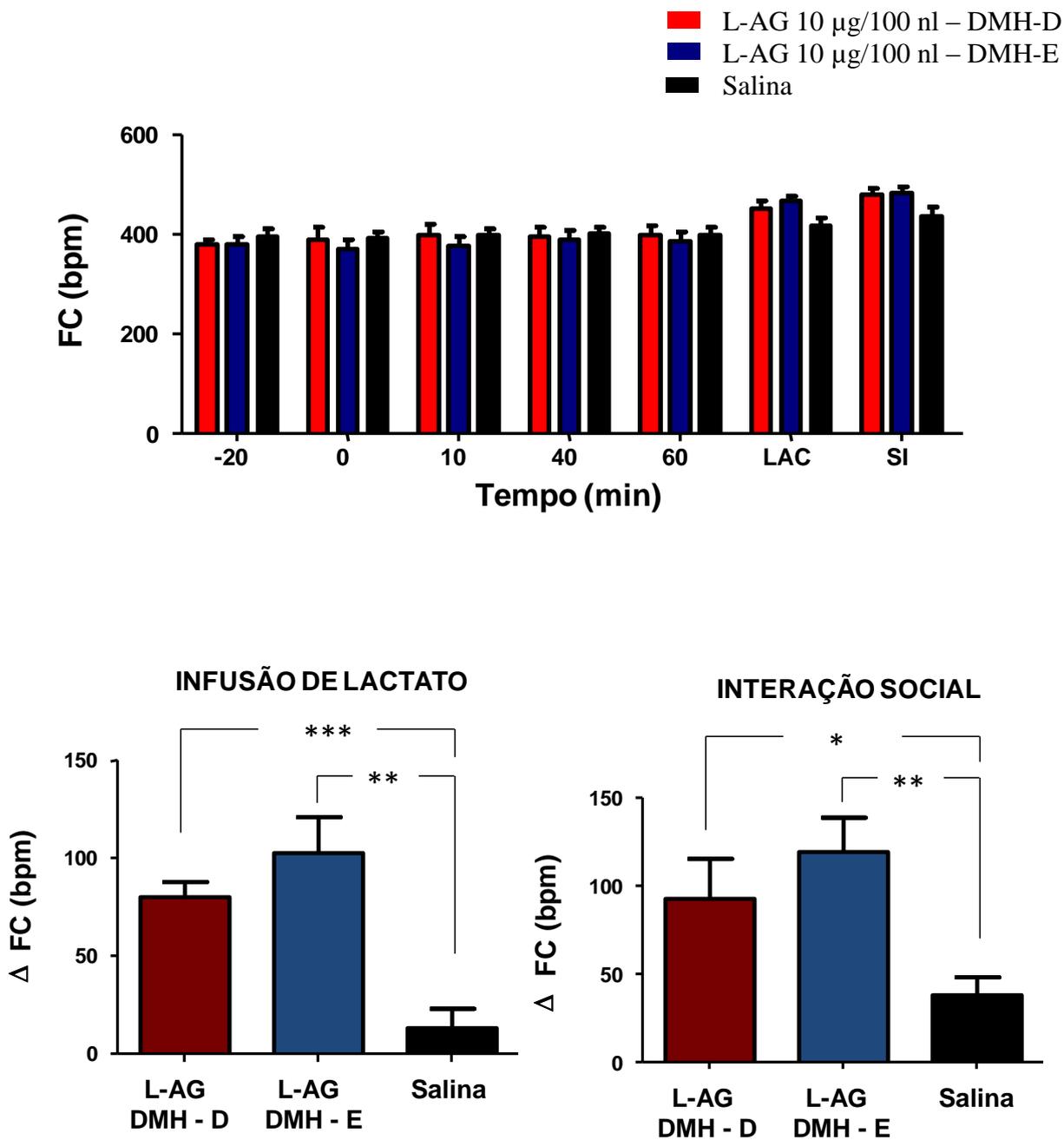


Figura 4.15 – Alterações na Frequência cardíaca após injeção de L-AG 1ug/100nl ou Salina no DMH à Direita e à Esquerda seguido da infusão de Lactato de Sódio 0,5M. No painel superior é possível observar as resposta ao longo de todo o registro, enquanto o painel inferior é possível observar o delta das alterações mais relevantes. * p<0,05, **p<0,03 e *** p<0,01. Teste: One way ANOVA seguido de Newman Keuls (n=5).

Embora a comparação entre os grupos L-AG no DMH-D e DMH-E, não tenha demonstrado diferença significativa na atividade locomotora, como mostrado na figura 4.16, foi possível observar durante os experimentos que os animais que receberam a nanoinjeção de L-AG 1µg/100n no DMH-D apresentaram menor atividade locomotora que os animais que receberam a nanoinjeção no DMH-E (DMH-D: 5 ± 4 episódios/min; DMH-E: 12 ± 3 episódios/min), acreditamos que essa resposta não foi significativa, pois um dos animais que recebeu a injeção de L-AG no DMH-D apresentou resposta semelhante aos animais que receberam a injeção no DMH-E.

O teste de interação social foi positivo para ansiedade nos animais submetidos à injeção de L-AG (DMH-D: 72 ± 9 seg; DMH-E: 90 ± 19 seg; Salina: 142 ± 24 seg), que como descrito previamente, é positivo quando o tempo de interação é menor ou igual a 90 segundos de interação durante os 5 minutos de teste. No entanto, o teste estatístico escolhido não evidenciou diferença estatística do grupo salina.

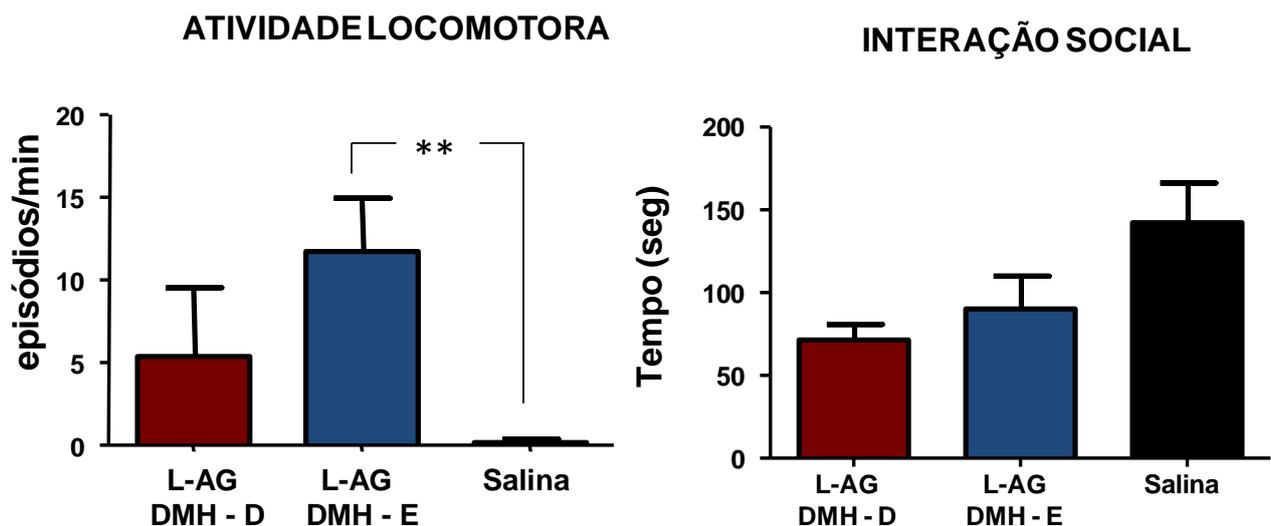


Figura 4.16: Atividade locomotora apresentada pelos animais durante a infusão de lactato e a resposta em segundos ao teste de interação social, indicando o tempo de interação apresentado pelos animais após a infusão de lactato. Os grupos representam animais que receberam a injeção de L-AG 1µg/100nl ou DMH à Direita e à Esquerda ou Salina noDMH-D, em todos os grupos a injeção foi seguido da infusão de Lactato de Sódio 0.5M. **p<0,03 (n=5).

4.5: Análise Histológica

Os locais de microinjeção foram demonstrados juntamente com os resultados de cada protocolo experimental utilizando um diagrama esquemático baseado no Atlas de Paxinos e Watson ao nível de 3.3 posterior ao bregma como demonstrado na figura 4.16 (Paxinos, 1986).

Em todos os experimentos os sítios de microinjeção dos animais adicionados aos grupos estavam localizados próximo à zona compacta do DMH. Os animais em que a microinjeção encontrava-se fora dos limites do DMH não foram utilizados na análise.

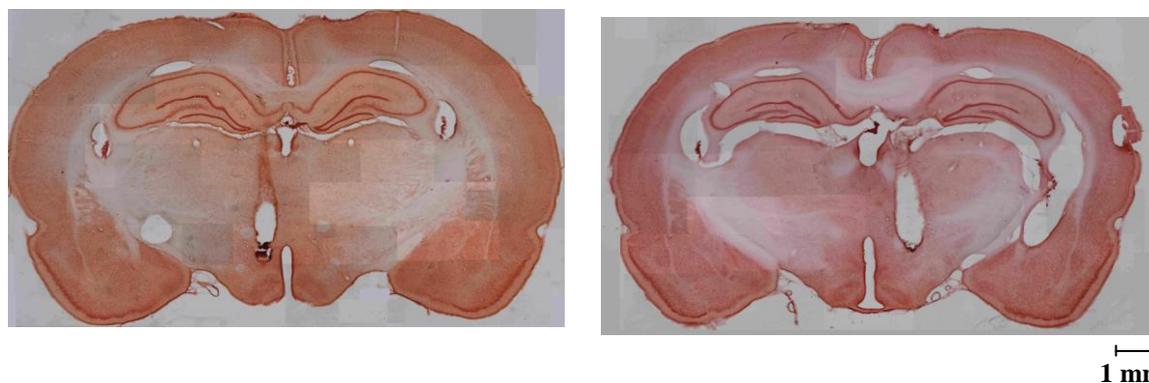
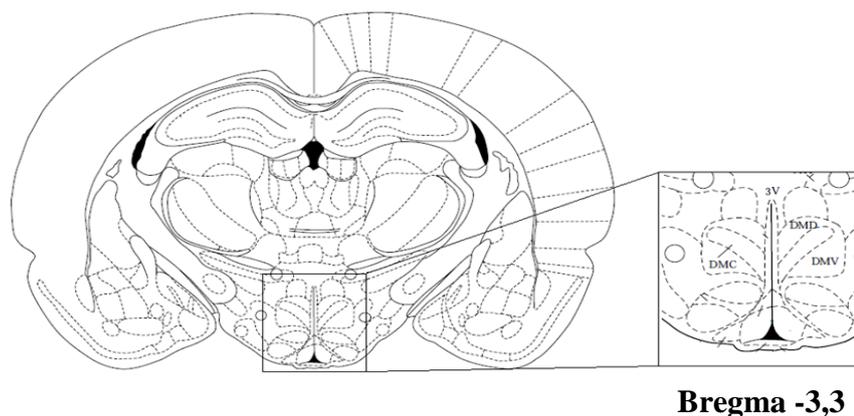


Figura 4.17: Desenho esquemático de uma secção de cérebro de rato mostrando a localização do hipotálamo dorsomedial (Paxinos e Watson, 1986) e Fotomicrografia representativa de animais que receberam a microinjeção à direita ou à esquerda do Hipotálamo Dorsomedial, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram: i) a nanoinjeção aguda de L-AG 10 $\mu\text{g}/100\text{ nl}$ no DMH de ratos acordados é capaz de produzir respostas semelhantes às observadas no comportamento defensivo; ii) a dose mais elevada de L-AG avaliada (10 $\mu\text{g}/100\text{nl}$) produziu taquicardia mais pronunciada quando injetada no DMH-D; iii) a duração da taquicardia produzida pelo bloqueio dos receptores GABA_A utilizando a nanoinjeção de BMI 10 pmol/ 100 nl no DMH-D foi quase duas vezes maior que a produzida pela nanoinjeção no DMH-E; iv) o bloqueio dos receptores GABA_B com Saclofeno (10 pmol/100 nl) não produziu alterações significativas na pressão arterial e frequência cardíaca quando nanoinjetada no DMH-D e DMH-E em animais acordados; v) a dose de 1 $\mu\text{g}/100\text{ nl}$ de L-AG no DMH foi capaz de induzir nos animais sensibilidade à infusão de lactato de sódio periférica em ambos os grupos. Mas as respostas cardiovasculares não foram diferentes quando comparamos os grupos que receberam a injeção de L-AG no DMH-D e DMH-E.

Para realização dos experimentos de comparação da resposta cardiovascular promovida pela L-AG, e posterior tentativa de observar um ataque de pânico após a infusão de lactato de sódio, foi necessário a realização de uma curva dose resposta dos efeitos cardiovasculares produzidos pela injeção de L-AG no DMH. A L-AG já é amplamente utilizada na literatura para estudos que visam observar os efeitos da disfunção GABAérgica no sistema nervoso central (Abshire et al., 1988, Shekhar et al., 1996). No entanto, é importante ressaltar que o presente trabalho demonstra pela

primeira vez uma curva dose-resposta para o uso da L-AG de forma aguda em animais acordados observando os parâmetros cardiovasculares.

A escolha das doses para configuração da curva baseou-se principalmente nos estudos que utilizaram a L-AG de forma aguda no SNC. Abshire e colaboradores com estudos realizados utilizaram 12.5 µg e 25 µg em 200nl no DMH de ratos anestesiados. Recentemente Cunha e colaboradores utilizaram a L-AG em animais acordados, no entanto para estudos de ansiedade envolvendo a PAG. Neste último estudo foi realizada uma curva dose resposta com 1, 3 e 5 µg/200 nl, mas sem avaliar as respostas cardiovasculares. Com volume de injeção reduzido (100 nl), nós procuramos uma curva dose resposta que pudesse compreender a faixa utilizada entre esses dois estudos para possível efeito de comparação. Desta forma, realizamos a nossa curva com as doses 0,1, 1 e 10 µg/100 nl. O volume de nossas injeções foi reduzido pela metade, de 200nl para 100 nl, visando minimizar o espalhamento da droga para regiões adjacentes e assim aumentar a confiabilidade dos resultados (Abshire et al., 1988, CUNHA, 2010).

A menor dose testada em nosso estudo, 0,1 µg/100 nl, não produziu resposta significativa em nenhum dos parâmetros avaliados, assemelhando se ao controle realizado com salina. A dose intermediária de 1 µg/100 nl, pode ser comparada à utilizada por Cunha e colaboradores (1 µg/200 nl) na substância cinzenta periaquedutal (PAG) que é um núcleo amplamente conhecido como mediador de repostas de comportamento defensivo em ratos (Bandler and Carrive, 1988). Neste estudo de Cunha e colaboradores foi demonstrado durante os primeiros 15 minutos como comportamento predominante o “Freezing”, que é descrito como um aumento no tempo em que o animal permanece imóvel, característica observada em situações de medo (CUNHA, 2010).

Em nossos experimentos, o comportamento foi avaliado quantificando a atividade locomotora dos animais. No grupo 1 µg/100 nl de L-AG no DMH, observamos um pequeno aumento na atividade locomotora mas sem diferença estatística, quando comparamos aos animais que receberam a dose de 0,1 µg/100 nl ou salina. No entanto, nenhuma alteração cardiovascular significativa foi observada neste grupo.

A maior dose testada de 10 µg/100 nl, dose mais próxima à dose utilizada por Abshire e colaboradores em animais anestesiados (12,5 µg/200 nl). Em nosso estudo, realizado em animais acordados, esta dose produziu uma importante resposta cardiovascular e comportamental, que se assemelhou às características observadas durante comportamentos de defesa.

A utilização de um inibidor da síntese de GABA, que é sintetizado a partir de outro neurotransmissor, o glutamato, nos faz questionar se as respostas cardiovasculares encontradas no DMH são produto da diminuição de um neurotransmissor ou o aumento do seu precursor. Chapman e colaboradores avaliaram a concentração dos principais neurotransmissores aminoácidos: Aspartato, Glutamato, GABA, Glutamina e Taurina em regiões como Córtex, Cerebelo e Hipocampo após a infusão de L-AG. Este estudo demonstrou que a infusão de L-AG periférica produziu uma queda de 20-40% nos níveis de GABA encefálico (Chapman et al., 1984), o que justifica a forma com que alguns autores relatam que a injeção de L-AG promove uma disfunção GABAérgica (Abshire et al., 1988, Shekhar et al., 1996, Johnson and Shekhar, 2006).

Diferente do que era esperado, não foram observadas alterações nos níveis de Glutamato em nenhuma das regiões avaliadas. No entanto foi observado um aumento de Glutamina e estes autores especulam que não foi possível observar o aumento de Glutamato, pois este poderia estar sendo liberando para fluido extracelular (Chapman et

al., 1984). Dessa forma não podemos descartar a possível contribuição do glutamato nas respostas observadas após a injeção de L-AG e futuros estudos serão necessários para elucidar esta questão.

Em estudos realizados especificamente no hipotálamo, Abshire e colaboradores, conseguiram demonstrar em uma análise de regressão linear a existência de correlação entre a taquicardia produzida pela injeção de L-AG no DMH e a diminuição na concentração de GABA, demonstrando então que as alterações nos níveis de GABA no hipotálamo são cruciais para o desencadeamento das respostas provenientes da injeção de L-AG (Abshire et al., 1988). Adicionalmente, Soltis & Dimicco mostraram que a ativação dos neurônios do DMH após bloqueio dos receptores GABA_A é dependente de sinapses excitatórias (Soltis and DiMicco, 1991b, a, Soltis et al., 1998).

Para observar a interferência nos níveis de GABA em ambos os lados do DMH, realizamos a comparação das respostas cardiovasculares produzidas pela nanoinjeção de 10 µg/100 nl de L-AG no DMH-D, com as respostas produzidas pela injeção no DMH-E. Foi observada uma estabilização da taquicardia produzida pela injeção à esquerda, próximo aos 40 minutos pós-injeção, por outro lado, os animais que receberam a injeção à direita, apresentaram uma resposta taquicárdica que se acentuou 40 minutos após a injeção.

A resposta cronotrópica positiva após a injeção no DMH-D foi significativamente diferente da resposta produzida pela injeção no DMH-E próximo aos 60 minutos pós-injeção. Demonstrando que o DMH-D pode exercer um controle diferenciado nas mudanças da FC durante o estresse emocional, corroborando com estudos prévios do nosso laboratório realizados em animais anestesiados (Xavier et al., 2009), indicando que o DMH-D pode receber um input GABAérgico diferencial comparado ao DMH-E.

As vias do DMH são predominantemente lateralizadas, e são organizadas com espelhos ipsilaterais, onde um lado parece não se comunicar com o outro (Thompson et al., 1996). Estudos utilizando a expressão de C-Fos, um marcador da atividade neuronal, demonstrou que a ativação do DMH com BMI unilateral, promove o aumento na sua expressão em diferentes núcleos relacionados ao controle das respostas fisiológicas ao estresse como RPa, PVN, NTS, RVLM, com marcação bilateral, no entanto, com aumento significativo ipsilateral à injeção (Zaretskaia et al., 2008).

Os estudos prévios do nosso laboratório, citados anteriormente, avaliaram a participação mais especificamente dos receptores GABA_A em animais anestesiados, e propuseram que as vias descendentes de controle cardiovascular, que são originadas no DMH, são predominantemente lateralizadas, e que o DMH-D pode exercer um controle predominante na reatividade cardíaca durante o estresse emocional. Nesse presente estudo, entretanto, a nanoinjeção de BMI em ratos acordados promoveu respostas semelhantes dos lados direito e esquerdo do DMH quando observamos a magnitude das respostas cardiovasculares. Embora a resposta máxima não tenha diferido entre os grupos DMH-D e DMH-E, a duração da taquicardia observada após a injeção de BMI no DMH-D foi praticamente o dobro daquela após a injeção no DMH-E, como demonstrado na Figura 4.4. Dessa forma, nossos resultados confirmam dados anteriores, sugerindo a existência de um input GABAérgico diferencial para o DMH-D no controle da função cardíaca.

Estudos em humanos demonstraram que indivíduos submetidos à situação de estresse têm assimetria na atividade encefálica, demonstrando maior ativação do hemisfério direito. Essa assimetria no controle simpático ao longo da superfície cardíaca ocasionou a perturbação na homogeneidade eletrofisiológica da repolarização ventricular, aumentando a vulnerabilidade desses indivíduos à arritmia (Critchley et al.,

2005). Um fenótipo similar foi detectado também em estudos do nosso laboratório em ratos, onde um grande número de batimentos ectópicos foi observado após a injeção de BMI no DMH-D (Xavier, 2010). No entanto, o mecanismo preciso pelo qual o estresse causa estas alterações precisa ser avaliado em experimentos adicionais.

Nesse caso, se as respostas mediadas pelo DMH-D promovem alterações mais sustentadas que a ativação do DMH-E e estudos sugerem que situações de estresse repetidas ou ocorridas de forma prolongada podem resultar em arritmias cardíacas, podemos especular que a ativação dos receptores GABA_A do DMH-D pode estar predominantemente implicada com a patofisiologia dos distúrbios cardiovasculares resultantes do estresse.

Em nossos experimentos, avaliamos também a contribuição dos receptores GABA_B no DMH de ratos acordados, pois estudos de DiMicco e colaboradores (1998) demonstraram em animais anestesiados que estes receptores estavam ativos e funcionais no DMH e que a microinjeção do agonista Baclofeno foi capaz de suprimir a taquicardia produzida pela microinjeção do antagonista GABA_A, BMI em animais anestesiados com uretana (DiMicco and Monroe, 1998). Neste mesmo estudo, foi relatado que em experimentos piloto, a injeção do agonista ou antagonista de receptores GABA_B, Baclofeno e Saclofeno respectivamente não produziram efeitos cardiovasculares. No entanto, esses experimentos foram realizados em animais anestesiados com uretana, e estudos de Hara e colaboradores demonstraram que este anestésico pode aumentar o tônus GABAérgico e inibir a neurotransmissão Glutamatérgica de forma dose-dependente, ou seja resultados diferentes podem ser observados em animais acordados ou anestesiados com uretana (Hara and Harris, 2002).

Neste protocolo, observamos as alterações na PA e FC após a injeção do antagonista GABA_B Saclofeno 10 pmol/100 nl no DMH-E e DMH-D. No entanto, as

respostas não foram estatisticamente significativas em nenhum dos pontos da curva quando avaliadas pelo teste two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni comparando os grupos DMH-D e DMH-E. Além disso, quando comparamos as respostas produzidas pelo bloqueio dos receptores GABA_A com as respostas produzidas pelo bloqueio dos receptores GABA_B (figura 4.6), fica claro que os receptores GABA_A são os receptores mais importantes para manutenção do tônus GABAérgico para os neurônios do DMH no controle cardiovascular.

As vias descendentes para o DMH a partir de outras áreas encefálicas como o córtex insular (CI) precisam ser consideradas como uma possível explicação para a ativação assimétrica da atividade simpática cardíaca. Existem evidências anatômicas e funcionais de conexões entre o CI e o DMH. Além disso, dados da literatura demonstram que o CI participa no controle da atividade cardíaca e lesões no CI causa alterações na repolarização cardíaca, havendo um consenso na literatura acerca da atividade arritmogênica do CI em pacientes com acidentes vasculares, principalmente envolvendo o córtex insular direito (Cechetto and Chen, 1990, Oppenheimer and Cechetto, 1990, Oppenheimer et al., 1992, Butcher and Cechetto, 1995, Oppenheimer, 2006).

Nosso estudo enfatizou a atividade dos neurônios do DMH e o balanço entre as vias inibitórias, com intuito de avaliar a possibilidade de assimetria no tônus GABAérgico para o DMH. Estudos envolvendo o tônus glutamatérgico, entretanto, também serão necessários para compreender a atividade assimétrica observada neste núcleo. Soltis e colaboradores demonstraram que a principal fonte do tônus excitatório para o DMH através dos receptores de EAA é a Amígdala (Soltis et al., 1998), que é apontado como o provável núcleo responsável por ativar o DMH após estímulos

emocionais. Dessa forma, estudos comparando as respostas produzidas pela ativação da amígdala à direita e à esquerda serão necessários.

Uma questão importante a ser levantada seria o mecanismo pelo qual o DMH-D produz um controle predominante sobre o cronotropismo cardíaco. Sabe-se que a ativação do DMH produz um aumento na expressão de Fos maior ipsilateral à injeção (Zaretskaia et al., 2008). No entanto, o controle da atividade cronotrópica cardíaca promovida pela ativação do DMH parece ser dependente de um relé sináptico medializado, a Rafe *Pallidus* (RPa). E durante esses estudo de Zaretskaia e colaboradores foi demonstrado que a injeção unilateral de BMI promoveu a ativação de neurônios dispersos por toda a RPa, sem prevalência em um dos lados. Dessa forma uma especulação plausível sobre a resposta cronotrópica assimétrica poderia ser que de acordo com a intensidade do estímulo proveniente do DMH, um número maior ou menor de neurônios de limiares diferentes são recrutados na RPa. Ou seja, se estímulo proveniente do DMH-D for maior que o estímulo proveniente do DMH-E, isso poderia resultar em maior recrutamento neuronal e dessa forma apresentar um cronotropismo positivo maior para o coração.

Neste estudo procuramos também avaliar as alterações morfofuncionais cardíacas utilizando um ecocardiograma para melhor compreendermos os eventos cardíacos durante a desinibição dos neurônios do DMH, em resposta ao bloqueio dos receptores GABA_A, utilizando a BMI. Foi observado um aumento característico da FC corroborando com dados prévios da literatura (DiMicco et al., 1986, DiMicco et al., 1987, Shekhar, 1993, De Novellis et al., 1995, Fontes et al., 2001, Cao et al., 2004, Horiuchi et al., 2004, Fontes et al., 2011), além disso, pudemos observar também o aumento da fração de encurtamento e uma diminuição no volume de sangue e do diâmetro ao fim da sístole, indicando um aumento na contratilidade. Não observamos,

entretanto, alterações significativas na fração de ejeção (FEj), pois os valores do volume sistólico e do volume diastólico final também não diferiram.

Em geral, os experimentos demonstraram um aumento na atividade contrátil cardíaca. No entanto, de forma inesperada esse aumento não se traduziu em aumento no débito cardíaco (DC). A manutenção da FEj e do DC pode ser explicado pelo menor tempo de enchimento devido ao aumento da FC. Ainda é plausível especular sobre a diminuição do volume de sangue circulante, diminuindo o retorno venoso ou seja a pré-carga, que pode ser causada pelo anestésico utilizado. Nesse sentido, é descrito que a Uretana promove extravasamento de líquido intersticial (Maggi and Meli, 1986c, b, a). Este fato foi observado após o sacrifício dos animais, que apresentavam grande quantidade de líquido na cavidade abdominal, o que nos permitem especular sobre a interferência do anestésico sobre a resposta observada no débito cardíaco.

Nesses experimentos não evidenciamos diferenças entre os grupos que receberam a injeção de BMI no DMH-D ou DMH-E. Acreditamos que isso ocorreu possivelmente devido às limitações técnicas do estudo, uma vez que esse estudo exige que animal esteja anestesiado. É bem sabido que a anestesia produz alterações importantes no controle cardiovascular dos indivíduos. É importante ressaltar, que este é o primeiro trabalho a utilizar o ecoDopplercardiografia de alta resolução para quantificar morfologia e função cardíaca em tempo real na observação dos efeitos de uma ativação central de um núcleo específico. Os efeitos cardiovasculares produzidos pela ativação do DMH já haviam sido amplamente estudados, mas até então, não havia sido observado pela análise fornecida pela ecocardiografia.

Finalmente, visto que a injeção de L-AG aguda foi capaz de promover uma disfunção no DMH de ratos acordados de forma significativa, tentamos propor em nosso laboratório um modelo de ataque de pânico, utilizando uma dose aguda de L-AG

que não promovesse alteração cardiovascular, mas que realizasse uma alteração central específica para induzir a sensibilidade à infusão periférica de lactato. Esta abordagem foi descrito por Shekhar e colaboradores no protocolo descrito como Transtorno do pânico (Shekhar et al., 1996). De forma interessante, a dose escolhida, de 1 µg/100 nl, foi capaz de alterar a sensibilidade ao lactato de sódio, fazendo com que após 60 minutos da sua injeção, os animais respondessem com aumento da frequência cardíaca e pressão arterial à infusão de lactato de sódio de maneira diferente do que foi observado no controle. No entanto, a magnitude das respostas cardiovasculares avaliadas após este procedimento não diferiram entre os grupos DMH-D e DMH-E.

O mecanismo preciso pelo qual a infusão de lactato desencadeia a síndrome ou o ataque de pânico em animais com disfunção GABA ainda é desconhecido, no entanto o grupo de Shekhar e colaboradores têm trabalhado extensivamente neste sentido. Foi especulado que a infusão de lactato poderia promover alterações na osmolaridade sanguínea, e que dessa forma centros respiratórios poderiam ser ativados devido ao aumento de níveis centrais de CO₂. No entanto, este grupo demonstrou que infusões hipertônicas de NaCl (como um estressor de Na) e NaLac (como um controle positivo) (0.5M), mas não de D-mannitol (um estressor osmótico) resultaram em respostas cardiovasculares e comportamentais semelhantes ao pânico, suportando a hipótese de que o sódio, e não a osmolaridade ou o lactato sejam críticos no desencadeamento das respostas associadas a síndrome do pânico (Molosh et al., 2010).

Vale ressaltar que o motivo para a escolha da dose de 1µg/100nl ocorreu devido aos fatores já descritos anteriormente sobre as características comportamentais apresentadas por esses animais após a injeção, demonstrando sinais de ansiedade, semelhante aos estudos realizados por Cunha e colaboradores (CUNHA, 2010).

O comportamento ansioso especulado anteriormente foi observado em ambos os grupos, os animais demonstraram resposta compatível ao teste de interação social (IS), com diminuição no tempo de exploração ao animal estranho (valor médio abaixo de 90 seg de exploração durante os 5 min de teste), como descrito por Shekhar e colaboradores, no entanto, quando realizamos o teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman Keuls, não foi observada resposta diferente entre os grupos.

Durante a infusão de lactato, a locomoção dos animais foi quantificada, e os animais que receberam a injeção de L-AG no DMH-E apresentaram um aumento significativo na atividade locomotora quando comparado ao grupo salina. De maneira oposta, os animais que receberam a injeção no DMH-D permaneceram, de maneira geral, imóveis, mas é importante comentar que um desses animais apresentou comportamento semelhante ao grupo que recebeu a injeção no DMH-E, o que acreditamos justificar o fato de que o teste estatístico não apontou diferença entre os grupos DMH-D e DMH-E.

Em conclusão, nossos resultados estendem os resultados de estudos anteriores mostrando que o DMH-D tem um controle diferenciado sobre o cronotropismo cardíaco. Nossos dados permitem especular sobre a existência de um input GABAérgico diferencial para o DMH Direito também em animais acordados. No entanto mais estudos ainda precisam ser realizados na tentativa de elucidar o mecanismo e os efeitos da assimetria encefálica no controle cardiovascular.

6. REFERÊNCIAS

- Abshire VM, Hankins KD, Roehr KE, DiMicco JA (Injection of L-allylglycine into the posterior hypothalamus in rats causes decreases in local GABA which correlate with increases in heart rate. *Neuropharmacology* 27:1171-1177.1988).
- Amiragova MG (Neurophysiological analysis of the development of endocrine and hypertensive reactions in prolonged emotional stress. *Brain Res* 344:303-315.1985).
- Anand A, Shekhar A (Brain imaging studies in mood and anxiety disorders: special emphasis on the amygdala. *Ann N Y Acad Sci* 985:370-388.2003).
- Bailey TW, Dimicco JA (Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R8-15.2001).
- Bandler R, Carrive P (Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Res* 439:95-106.1988).
- Bandler RJ, Jr., Chi CC, Flynn JP (Biting attack elicited by stimulation of the ventral midbrain tegmentum of cats. *Science* 177:364-366.1972).
- Bard P (A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system. *Am J Physiol* 84:490-515.1928).
- Barron SA, Rogovski Z, Hemli J (Autonomic consequences of cerebral hemisphere infarction. *Stroke* 25:113-116.1994).

- Basbaum AI, Fields HL (Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 7:309-338.1984).
- Bernard JF, Peschanski M, Besson JM (Afferents and efferents of the rat cuneiformis nucleus: an anatomical study with reference to pain transmission. *Brain Res* 490:181-185.1989).
- Bowery NG, Smart TG (GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S109-119.2006).
- Bush G, Luu P, Posner MI (Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends Cogn Sci* 4:215-222.2000).
- Butcher KS, Cechetto DF (Autonomic responses of the insular cortex in hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol* 268:R214-222.1995).
- Callahan MF, Kirby RF, Cunningham JT, Eskridge-Sloop SL, Johnson AK, McCarty R, Gruber KA (Central oxytocin systems may mediate a cardiovascular response to acute stress in rats. *Am J Physiol* 256:H1369-1377.1989).
- Cannon WB (Important Request. *Cal State J Med* 12:302.1914).
- Cannon WB (Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage. New York.1929a).
- Cannon WB (Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 9:399–431.1929b).
- Cannon WB (Pharmacological Injections and Physiological Inferences. *Science* 70:500-501.1929c).
- Cao WH, Fan W, Morrison SF (Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience* 126:229-240.2004).
- Cao WH, Morrison SF (Disinhibition of rostral raphe pallidus neurons increases cardiac sympathetic nerve activity and heart rate. *Brain Res* 980:1-10.2003).

- Carrive P, Bandler R, Dampney RA (Anatomical evidence that hypertension associated with the defence reaction in the cat is mediated by a direct projection from a restricted portion of the midbrain periaqueductal grey to the subretrofacial nucleus of the medulla. *Brain Res* 460:339-345.1988).
- Cechetto DF, Chen SJ (Subcortical sites mediating sympathetic responses from insular cortex in rats. *Am J Physiol* 258:R245-255.1990).
- Chapman AG, Westerberg E, Premachandra M, Meldrum BS (Changes in regional neurotransmitter amino acid levels in rat brain during seizures induced by L-allylglycine, bicuculline, and kainic acid. *J Neurochem* 43:62-70.1984).
- Christensen H, Boysen G, Christensen AF, Johannesen HH (Insular lesions, ECG abnormalities, and outcome in acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:269-271.2005).
- Chrousos GP, Gold PW (The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267:1244-1252.1992).
- Clark JD, Rager DR, Calpin JP (Animal well-being. II. Stress and distress. *Lab Anim Sci* 47:571-579.1997).
- Conrad LC, Pfaff DW (Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J Comp Neurol* 169:185-219.1976a).
- Conrad LC, Pfaff DW (Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. II. An autoradiographic study of the anterior hypothalamus. *J Comp Neurol* 169:221-261.1976b).
- Critchley HD (Neural mechanisms of autonomic, affective, and cognitive integration. *J Comp Neurol* 493:154-166.2005).
- Critchley HD, Taggart P, Sutton PM, Holdright DR, Batchvarov V, Hnatkova K, Malik M, Dolan RJ (Mental stress and sudden cardiac death: asymmetric midbrain activity as a linking mechanism. *Brain* 128:75-85.2005).
- CUNHA JM, Zanovelia J. M., Ledvinka-Filhoa E., Brandão L. B. (2010) l-Allylglycine dissociates the neural substrates of fear in the periaqueductal gray of rats. In: *Brain Research Bulletin*, vol. 81, pp 416–423.

- da Silva LG, de Menezes RC, dos Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA (Role of periaqueductal gray on the cardiovascular response evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 984:206-214.2003).
- Da Silva LG, Menezes RCA, Villela DC, Fontes MAP (Excitatory amino acid receptors in the periaqueductal gray mediate the cardiovascular response evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons. *Neuroscience* 139:1129-1139.2006).
- Davies SJ, Ghahramani P, Jackson PR, Noble TW, Hardy PG, Hippisley-Cox J, Yeo WW, Ramsay LE (Association of panic disorder and panic attacks with hypertension. *Am J Med* 107:310-316.1999).
- de Menezes RCA, Zaretsky DV, Fontes MAP, DiMicco JA (Microinjection of muscimol into caudal periaqueductal gray lowers body temperature and attenuates increases in temperature and activity evoked from the dorsomedial hypothalamus. *Brain Research* 1092:129-137.2006).
- De Novellis V, Stotz-Potter EH, Morin SM, Rossi F, DiMicco JA (Hypothalamic sites mediating cardiovascular effects of microinjected bicuculline and EAAs in rats. *Am J Physiol* 269:R131-140.1995).
- DiMicco JA (Evidence for control of cardiac vagal tone by benzodiazepine receptors. *Neuropharmacology* 26:553-559.1987).
- DiMicco JA, Abshire VM, Hankins KD, Sample RH, Wible JH, Jr. (Microinjection of GABA antagonists into posterior hypothalamus elevates heart rate in anesthetized rats. *Neuropharmacology* 25:1063-1066.1986).
- DiMicco JA, Monroe AJ (GABAB receptors in the dorsomedial hypothalamus and heart rate in anesthetized rats. *Brain Res* 788:245-250.1998).
- 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).
- Fontes MA, Tagawa T, Polson JW, Cavanagh SJ, Dampney RA (Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2891-2901.2001).

- Fontes MA, Xavier CH, de Menezes RC, Dimicco JA (The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience* 184:64-74.2011).
- Fossey MD, Lydiard RB (Anxiety and the gastrointestinal system. *Psychiatr Med* 8:175-186.1990).
- Freedman RR, Ianni P, Ettetdgui E, Puthezhath N (Ambulatory monitoring of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 42:244-248.1985).
- Goldstein DS (Stress, catecholamines, and cardiovascular disease. New York: Oxford University Press.1995).
- Gordon FJ, Sved AF (Neurotransmitters in central cardiovascular regulation: glutamate and GABA. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:522-524.2002).
- Goto Y, Otani S, Grace AA (The Yin and Yang of dopamine release: a new perspective. *Neuropharmacology* 53:583-587.2007).
- Hara K, Harris RA (The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesth Analg* 94:313-318, table of contents.2002).
- Harris JA, Guglielmotti V, Bentivoglio M (Diencephalic asymmetries. *Neurosci Biobehav Rev* 20:637-643.1996).
- Hatton DC, Brooks V, Qi Y, McCarron DA (Cardiovascular response to stress: baroreflex resetting and hemodynamics. *Am J Physiol* 272:R1588-1594.1997).
- Horiuchi J, McAllen RM, Allen AM, Killinger S, Fontes MA, Dampney RA (Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R824-832.2004).
- Hosoya Y, Sugiura Y, Zhang FZ, Ito R, Kohno K (Direct projection from the dorsal hypothalamic area to the nucleus raphe pallidus: a study using anterograde transport with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *Exp Brain Res* 75:40-46.1989).

- Hunt JL, Zaretsky DV, Sarkar S, Dimicco JA (Dorsomedial hypothalamus mediates autonomic, neuroendocrine, and locomotor responses evoked from the medial preoptic area. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:R130-140.2010).
- Johnson PL, Shekhar A (Panic-prone state induced in rats with GABA dysfunction in the dorsomedial hypothalamus is mediated by NMDA receptors. *J Neurosci* 26:7093-7104.2006).
- Johnson PL, Truitt W, Fitz SD, Minick PE, Dietrich A, Sanghani S, Traskman-Bendz L, Goddard AW, Brundin L, Shekhar A (A key role for orexin in panic anxiety. *Nat Med* 16:111-115.2010).
- Jorgensen EM (Gaba. *WormBook* 1-13.2005).
- Kiecolt-Glaser JK, Glaser R (Psychoneuroimmunology and health consequences: data and shared mechanisms. *Psychosom Med* 57:269-274.1995).
- Koutcherov Y, Mai JK, Ashwell KW, Paxinos G (Organisation of the human dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroreport* 15:107-111.2004).
- Kramer JM, Plowey ED, Beatty JA, Little HR, Waldrop TG (Hypothalamus, hypertension, and exercise. *Brain Res Bull* 53:77-85.2000).
- Lane JD, Adcock RA, Burnett RE (Respiratory sinus arrhythmia and cardiovascular responses to stress. *Psychophysiology* 29:461-470.1992a).
- Lane RD, Wallace JD, Petrosky PP, Schwartz GE, Gradman AH (Supraventricular tachycardia in patients with right hemisphere strokes. *Stroke* 23:362-366.1992b).
- LeDoux J (The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol* 23:727-738.2003).
- LeDoux JE (Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.2000).
- Leor J, Poole WK, Kloner RA (Sudden cardiac death triggered by an earthquake. *N Engl J Med* 334:413-419.1996).

- Li YW, Guyenet PG (Activation of GABAB receptors increases a potassium conductance in rat bulbospinal neurons of the C1 area. *Am J Physiol* 271:R1304-1310.1996).
- Liang KC, Lee EH (Intra-amygdala injections of corticotropin releasing factor facilitate inhibitory avoidance learning and reduce exploratory behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 96:232-236.1988).
- Liebowitz MR, Gorman JM, Fyer A, Dillon D, Levitt M, Klein DF (Possible mechanisms for lactate's induction of panic. *Am J Psychiatry* 143:495-502.1986).
- Linthorst AC, Reul JM (Stress and the brain: solving the puzzle using microdialysis. *Pharmacol Biochem Behav* 90:163-173.2008).
- Maggi CA, Meli A (Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General considerations. *Experientia* 42:109-114.1986a).
- Maggi CA, Meli A (Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: Cardiovascular system. *Experientia* 42:292-297.1986b).
- Maggi CA, Meli A (Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations. Part 3: Other systems and conclusions. *Experientia* 42:531-537.1986c).
- Maier SF, Watkins LR (Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev* 29:829-841.2005).
- Mason JW (A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory. *J Psychiatr Res* 8:323-333.1971).
- McDougall SJ, Widdop RE, Lawrence AJ (Medial prefrontal cortical integration of psychological stress in rats. *Eur J Neurosci* 20:2430-2440.2004).

- McDowall LM, Dampney RA (Calculation of threshold and saturation points of sigmoidal baroreflex function curves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2003-2007.2006).
- McDowall LM, Horiuchi J, Killinger S, Dampney RA (Modulation of the baroreceptor reflex by the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical area. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R1020-1026.2006).
- Meerson FZ (Stress-induced arrhythmic disease of the heart--Part I. *Clin Cardiol* 17:362-371.1994a).
- Meerson FZ (Stress-induced arrhythmic disease of the heart--Part II. *Clin Cardiol* 17:422-426.1994b).
- Menezes RC, Fontes MA (Cardiovascular effects produced by activation of GABA receptors in the rostral ventrolateral medulla of conscious rats. *Neuroscience* 144:336-343.2007).
- Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W (A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 46:423-462.1995).
- Molosh AI, Johnson PL, Fitz SD, Dimicco JA, Herman JP, Shekhar A (Changes in central sodium and not osmolarity or lactate induce panic-like responses in a model of panic disorder. *Neuropsychopharmacology* 35:1333-1347.2010).
- Muller-Ribeiro FCZ, 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*.2012).
- Netzer F, Bernard JF, Verberne AJ, Hamon M, Camus F, Benoliel JJ, Sevoz-Couche C (Brain circuits mediating baroreflex bradycardia inhibition in rats: an anatomical and functional link between the cuneiform nucleus and the periaqueductal grey. *J Physiol* 589:2079-2091.2011).
- Noble D (Claude Bernard, the first systems biologist, and the future of physiology. *Exp Physiol* 93:16-26.2008).
- Oppenheimer S (Cerebrogenic cardiac arrhythmias: cortical lateralization and clinical significance. *Clin Auton Res* 16:6-11.2006).

- Oppenheimer SM, Cechetto DF (Cardiac chronotropic organization of the rat insular cortex. *Brain Res* 533:66-72.1990).
- Oppenheimer SM, Gelb A, Girvin JP, Hachinski VC (Cardiovascular effects of human insular cortex stimulation. *Neurology* 42:1727-1732.1992).
- Orlowski M, Reingold DF, Stanley ME (D-and L-stereoisomers of allylglycine: convulsive action and inhibition of brain L-glutamate decarboxylase. *J Neurochem* 28:349-353.1977).
- Pacak K, Palkovits M (Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22:502-548.2001).
- Paxinos GW, C. (The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd Edition New York.1986).
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149-167.1985).
- Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE (A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci* 29:7330-7340.2009).
- Saper CB, Swanson LW, Cowan WM (The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol* 169:409-442.1976).
- Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA, et al. (Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328:221-227.1987).
- Selye H (A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* 138:32.1936).
- 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 Res* 627:9-16.1993).

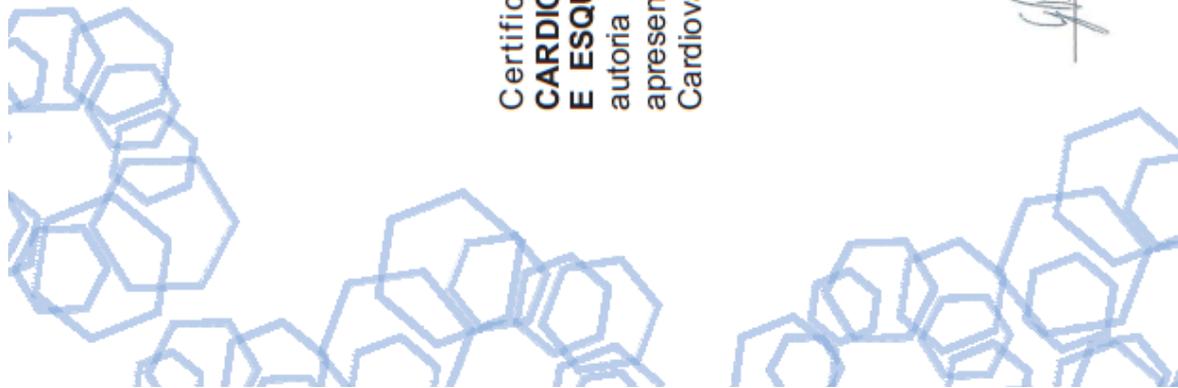
- Shekhar A, DiMicco JA (Defense reaction elicited by injection of GABA antagonists and synthesis inhibitors into the posterior hypothalamus in rats. *Neuropharmacology* 26:407-417.1987).
- Shekhar A, Hingtgen JN, DiMicco JA (Selective enhancement of shock avoidance responding elicited by GABA blockade in the posterior hypothalamus of rats. *Brain Res* 420:118-128.1987).
- Shekhar A, Johnson PL, Sajdyk TJ, Fitz SD, Keim SR, Kelley PE, Gehlert DR, DiMicco JA (Angiotensin-II is a putative neurotransmitter in lactate-induced panic-like responses in rats with disruption of GABAergic inhibition in the dorsomedial hypothalamus. *J Neurosci* 26:9205-9215.2006).
- Shekhar A, Keim SR, Simon JR, McBride WJ (Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions. *Pharmacol Biochem Behav* 55:249-256.1996).
- Shekhar A, Sajdyk TJ, Gehlert DR, Rainnie DG (The amygdala, panic disorder, and cardiovascular responses. *Ann N Y Acad Sci* 985:308-325.2003).
- Soltis RP, Cook JC, Gregg AE, Stratton JM, Flickinger KA (EAA receptors in the dorsomedial hypothalamic area mediate the cardiovascular response to activation of the amygdala. *Am J Physiol* 275:R624-631.1998).
- Soltis RP, DiMicco JA (GABAA and excitatory amino acid receptors in dorsomedial hypothalamus and heart rate in rats. *Am J Physiol* 260:R13-20.1991a).
- Soltis RP, DiMicco JA (Interaction of hypothalamic GABAA and excitatory amino acid receptors controlling heart rate in rats. *Am J Physiol* 261:R427-433.1991b).
- Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W (Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:6517-6521.1981).
- Stotz-Potter EH, Morin SM, DiMicco JA (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 EH, Willis LR, DiMicco JA (Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. *J Neurosci* 16:1173-1179.1996b).
- Strang EPWHRKT (2004) *Fisiologia Humana - Os mecanismos das funções corporais*.
- Tappaz ML, Brownstein MJ, Kopin IJ (Glutamate decarboxylase (GAD) and gamma-aminobutyric acid (GABA) in discrete nuclei of hypothalamus and substantia nigra. *Brain Res* 125:109-121.1977).
- Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW (Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 376:143-173.1996).
- Toga AW, Thompson PM (Mapping brain asymmetry. *Nat Rev Neurosci* 4:37-48.2003).
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J (Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213:1394-1397.1981).
- Waldmeier PC, Wicki P, Feldtrauer JJ, Mickel SJ, Bittiger H, Baumann PA (GABA and glutamate release affected by GABAB receptor antagonists with similar potency: no evidence for pharmacologically different presynaptic receptors. *Br J Pharmacol* 113:1515-1521.1994).
- Wible JH, Jr., Luft FC, DiMicco JA (Hypothalamic GABA suppresses sympathetic outflow to the cardiovascular system. *Am J Physiol* 254:R680-687.1988).
- Wittling W, Block A, Genzel S, Schweiger E (Hemisphere asymmetry in parasympathetic control of the heart. *Neuropsychologia* 36:461-468.1998a).
- Wittling W, Block A, Schweiger E, Genzel S (Hemisphere asymmetry in sympathetic control of the human myocardium. *Brain Cogn* 38:17-35.1998b).
- Xavier CB, MI; Ianzer, D; Fontes, MA; Nalivaiko E. (Cardiac Chronotrop and inotropic responses evoked from right and left sides of dorsomedial hypothalamus. *FASEB J* 24:1019-1020.2010).

Xavier CH (2008) O hipotálamo dorsomedial e suas sub-porções: porção compacta (DMC) e difusa (DMD).

Xavier CH, Nalivaiko E, Beig MI, Menezes GB, Cara DC, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA (Functional asymmetry in the descending cardiovascular pathways from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience* 164:1360-1368.2009).

Zaretskaia MV, Zaretsky DV, Sarkar S, Shekhar A, DiMicco JA (Induction of Fos-immunoreactivity in the rat brain following disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 1200:39-50.2008).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Extensão e Cultura

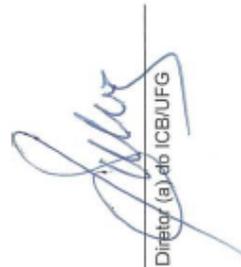
MENÇÃO HONROSA

Certificamos que o trabalho intitulado “**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES PRODUZIDOS PELA DESINIBIÇÃO DOS LADOS DIREITO E ESQUERDO DO HIPOTÁLAMO DORSOMEDIAL EM RATOS ACORDADOS**” de autoria de Oliveira AC e Fontes MAP recebeu **MENÇÃO HONROSA** pela brilhante apresentação sob a forma de painel durante o XVI Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, realizado na cidade de Goiânia-GO, de 08 a 11 de Fevereiro de 2012.

Goiânia 11 de Fevereiro de 2012


Gleiverson
Coordenadores da Ação


Coordenador (a) de Extensão e Cultura
ICBI/UFMG


Diretor (a) do ICBI/UFMG