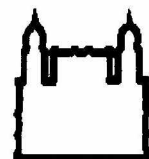




**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-graduação em Patologia Humana**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EFEITO DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES OPIOIDES  
MU, KAPPA E DELTA CENTRAIS SOBRE A  
HIPOTENSÃO INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DOS  
RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT<sub>3</sub> CENTRAIS**

**ELENILDA FARIAS DE OLIVEIRA**

**Salvador – Bahia – Brasil  
2010**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-graduação em Patologia Humana**

**EFEITO DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES OPIOIDES  
MU, KAPPA E DELTA CENTRAIS SOBRE A  
HIPOTENSÃO INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DOS  
RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT<sub>3</sub> CENTRAIS**

Elenilda Farias de Oliveira

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Josmara Bartolomei Fregoneze

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Mestre.

Salvador – Bahia – Brasil  
2010





Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

O48f Oliveira, Elenilda Farias  
Efeito do bloqueio dos receptores opioides MU, KAPPA e DELTA centrais sobre a hipotensão induzida pela ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> centrais. [manuscrito] / Elenilda Farias Oliveira. - 2010.  
80 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

**Dissertação (mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Universidade Federal da Bahia, 2010.**

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup> Josmara Bartolomei Fregoneze.

1. Serotonina. 2. Receptores Opióide. 3. Frequência Cardíaca. 4. Pressão Sanguínea. I. Título.

CDU 616.8:616.12

PHL  
MAN 3598  
CC 41573

FIG. 616.12  
416

“PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES UM, DELTA E KAPPA-OPIOIDES NA RESPOSTA HIPERTENSIVA À ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE AGONISTA DOS RECEPTORES 5HT3.”

ELENILDA FARIAS DE OLIVEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



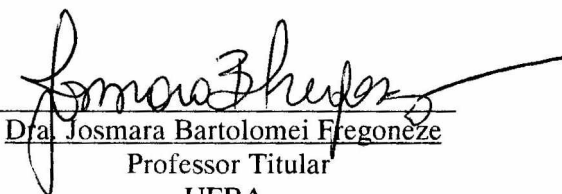
Dr. Luis Claudio Lemos Correia

Professor Adjunto  
EBMSP



Dr. Ramon dos Santos El-Bachá

Professor Associado  
UFBA



Dra. Josmara Bartolomei Fregoneze

Professor Titular  
UFBA

*A maior parte das coisas importantes  
no mundo foi realizada por pessoas que  
continuaram tentando quando parecia  
não haver esperança de modo algum.*

Dale Carnegie.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, criador e mantenedor da vida, por me conceder mais esta vitória.

À minha família querida que sempre me apoiou; meus pais, Edson (*im*) e Neuza; meus irmãos, Edileuza, Edilene, Edson e Érica; meus sobrinhos, Síria, Elgle, Lara, Alisson e Vitória. Amo vocês!

A meu esposo, Eliseu, pela compreensão e paciência nos momentos de ausência e pelo companheirismo e amor.

Todos meus tios e primos pelo carinho e torcida.

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Josmara Bartolomei Fregoneze pelo seu conhecimento e orientação na condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Emílio José de Castro e Silva pelas idéias e co-orientação na realização deste trabalho.

A Hilda Silva Ferreira que me introduziu no mundo da pesquisa e da ciência durante a graduação e pela co-orientação durante o mestrado.

A Vanilson Souza por me ensinar e encorajar durante a iniciação científica.

A José pela paciência e principalmente por ter me ensinado a perder o medo dos animais.

Aos amigos do laboratório: Fernando, Carla Patrícia, Rejane, Janeide, Lília, Anderson, Dina, Patrícia e Ana Isabel pelo apoio e convivência.

Aos estudantes de iniciação científica: João, Daniela, Átila, Diana, Amanda, Mariana, Vanessa, Rebeca, Camila e Regina pelo trabalho e pela oportunidade de orientação.

Aos meus amigos que sempre confiaram em mim e acreditaram em mais esta vitória.

# ÍNDICE

Índice de gráficos	7
Lista de abreviaturas	8
<b>I. Resumo</b>	10
<b>II. Introdução</b>	12
<b>III. Revisão da Literatura</b>	14
III.1. Características farmacológicas e anatômicas das vias serotoninérgicas e opiatérgicas centrais	14
III.1.1. Sistema serotoninérgico	14
III.1.2. Sistema opiatérgico	17
III.2. Interação entre vias serotoninérgicas e opiatérgicas	19
III.3. Serotonina na regulação cardiovascular	20
III.4. Opióides na regulação cardiovascular	21
III.4.1. Efeitos cardiovasculares dos receptores mu-opioides	23
III.4.1. Efeitos cardiovasculares dos receptores kappa-opioides	25
III.4.1. Efeitos cardiovasculares dos receptores delta-opioides	26
<b>IV. Objetivos</b>	28
<b>V. Hipóteses</b>	29
<b>VI. Metodologia do Estudo</b>	30
<b>VII. Resultados</b>	37
<b>VIII. Discussão</b>	52
<b>IX. Conclusões</b>	62
<b>X. Referências</b>	63

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Efeitos da administração de mCPBG 160 nmol ou salina 0,9% no ventrículo lateral cerebral de ratos Wistar, sobre a pressão sanguínea e frequência cardíaca. ....	43
GRÁFICO 2: Efeitos da administração de ondansetrona 80 nmol, m-CPBG 160 nmol após pré-tratamento com ondansetrona 80 nmol; m-CPBG 160 nmol ou salina 0,9% no ventrículo lateral cerebral de ratos Wistar, sobre a pressão sanguínea e frequência cardíaca. ....	45
GRÁFICO 3: Efeitos da administração dos antagonistas opioides – naloxona 30 nmol ou nor-BNI 10 nmol ou naltrindole 1 nmol ou salina 0,9% no ventrículo lateral cerebral de ratos Wistar, sobre a pressão sanguínea e frequência cardíaca. ....	47
GRÁFICO 4: Efeitos da administração do antagonista opiatérgico preferencial do tipo $\mu$ -opioide (naloxona – 30 nmol) sobre a PAM e FC à resposta hipotensora após administração do agonista dos receptores 5-HT <sub>3</sub> . ....	49
GRÁFICO 5: Efeito da administração do antagonista dos receptores do tipo $\kappa$ -opioide (nor-BNI – 10 nmol), sobre a PAM e FC à resposta hipotensora após administração do agonista dos receptores 5-HT <sub>3</sub> . ....	51
GRÁFICO 6: Efeito da administração do antagonista dos receptores $\delta$ -opóide (naltrindole – 1 nmol) sobre a PAM e FC à resposta hipotensora após administração do agonista dos receptores 5-HT <sub>3</sub> . ....	53
GRÁFICO 7: Efeitos da administração intravenosa de prazosin 3 mg/mL, após microinjeção ICV de antagonistas opioides + mCPBG no ventrículo lateral cerebral de ratos Wistar, sobre a pressão sanguínea ou frequência cardíaca. ....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

### PRODUTOS

5-HT - serotonina

EM-1 – endomorfina 1

EM-2 – endomorfina 2

Leu-encefalina – leucina-encefalina

MAO - monoamina oxidase

N/OFQ – nociceptinas/orfaninas

Met-encefalina – metionina-encefalina

PDIN – prodinorfina

PENC – proencefalina

POMC – pró-opiomelanocortina

PN/OFQ – pronociceptina/orfanina

### RECEPTORES

$\mu$  - receptor mu opioide

$\kappa$  – receptor kappa opioide

$\delta$  – receptor delta opioide

### REGIÕES CEREBRAIS

HL – hipotálamo lateral

ICV – intracerebroventricular

III V – terceiro ventrículo

NTS – núcleo do trato solitário

PAG – substância periaquedutal cinzenta

POM – núcleo pré-óptico medial

PVN – núcleo paraventricular

RVLM – região rostral ventral lateral do bulbo

SNC – sistema nervoso central

VL – ventrículo lateral

### DROGAS

8-OH-DPAT – [8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)]tetralina – agonista 5-HT<sub>1</sub>

CTAP – [D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Pen-Thr-NH<sub>2</sub>] – antagonista  $\mu$

DADLE - [D-Ala<sup>2</sup>,DLeu<sup>5</sup>]- encefalina – agonista  $\delta$

DALDA - [Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>] – agonista  $\mu$

DAMGO - [D-Ala<sup>2</sup>,MePhe<sup>4</sup>,Gly<sup>5</sup>ol]encefalina – agonista  $\mu$

DPDPE – [D-Phe<sup>2</sup>,D-Phe<sup>5</sup>]encefalina – agonista  $\delta$

mCPBG – m-cloro-fenil-biguanida

nor-BNI – nor-binaltorfimina

### DIVERSOS

HHA – eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

SHR – ratos espontaneamente hipertensos

PAM – pressão arterial média

FC – frequência cardíaca

IV - endovenoso



## I RESUMO

EFEITO DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES OPIOIDES MU, KAPPA E DELTA CENTRAIS SOBRE A HIPOTENSÃO INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT<sub>3</sub> CENTRAIS. Estudos mostram a participação das vias serotoninérgicas e opiatérgicas centrais no controle da pressão sanguínea. A existência de interação entre vias serotoninérgicas e opiatérgicas centrais tem sido demonstrada por diferentes autores. Objetivo: O presente trabalho foi desenvolvido para investigar a participação dos receptores do tipo  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opiatérgicos centrais na resposta hipotensora induzida por ativação serotoninérgica e o papel do sistema nervoso simpático. Material e Métodos: Foram utilizados ratos Wistar (280 a 320g) submetidos a cirurgia de estereotaxia com canulação do ventrículo lateral. Um dia antes da sessão experimental, os animais foram submetidos à cateterização da artéria carótida para registro da pressão sanguínea e da veia jugular para infusão de drogas. A pressão sanguínea e frequência cardíaca foram registradas continuamente por 120 min após a injeção das drogas (Sistema de Aquisição de Dados - AqDados) e expressas como delta da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) em relação aos valores pré-injeção. Resultados: A administração de m-CPBG, agonista serotoninérgico 5-HT<sub>3</sub> (160 nmol) em animais pré-tratados com salina causou redução significativa da pressão sanguínea. A administração de ondansetrona, antagonista serotoninérgico 5-HT<sub>3</sub> (80 nmol) promoveu aumento significativo da pressão sanguínea. O pré-tratamento com ondansetrona bloqueou a resposta hipotensora decorrente da ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>. O pré-tratamento com os antagonistas opiatérgicos naloxona, (30 nmol) e nor-binaltorfimina (10 nmol) bloqueou resposta hipotensora decorrente da ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub>, enquanto o pré-tratamento com o antagonista naltrindole (1 nmol) promoveu resposta hipertensora. A administração dos antagonistas isoladamente não promoveu alterações significativas da pressão sanguínea e frequência cardíaca. O bloqueio simpático periférico com prazosin (3mg/mL), antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, impediu bloqueio à hipotensão promovido pelo antagonista nor-binaltorfimina, e reduziu parcialmente o bloqueio promovido pelos antagonistas naloxona e naltrindole. Conclusões principais: Os dados sugerem que a resposta hipotensora decorrente da ativação farmacológica dos receptores 5-HT<sub>3</sub> centrais é dependente da integridade funcional dos receptores opioides tipo  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  localizados no sistema nervoso central e é justificada por um mecanismo de inibição da atividade simpática.

Palavras-chaves: 1. serotonina; 2. opioide; 3. pressão sanguínea 4. frequência cardíaca; 5. atividade simpática.

## ABSTRACT

HYPOTENSIVE RESPONSE INDUCED BY CENTRAL 5-HT<sub>3</sub> RECEPTOR STIMULATION DEPENDS ON THE FUNCTIONAL INTEGRITY OF CENTRAL  $\mu$ ,  $\kappa$  AND  $\delta$  OPIOID RECEPTORS AND RELIES ON A SYMPATHOINHIBITORY MECHANISM. Central serotonergic and opiate pathways participate in the mechanisms regulating blood pressure. Furthermore, interaction between serotonergic and opiate circuits at the central nervous system has been demonstrated. In the present study, we investigated the role of central  $\mu$ ,  $\kappa$  and  $\delta$  opioid receptors in the hypotensive response obtained after pharmacological activation of central 5-HT<sub>3</sub> receptors, as well as the role of the sympathetic nervous system in this response. Wistar male rats (280-320 g) had the right lateral ventricle cannulated 5 days before the experimental sessions; polyethylene catheters were inserted into the left carotid artery (for blood pressure monitoring) and into the right jugular vein (for drug administration) 24h before the experiments. Blood pressure and heart rate were monitored for the next 2 hours after the administration of the drugs (Data Acquisition System by AqDados). Data were expressed as delta mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR). The MAP value at the end of the stabilization period was considered the reference blood pressure at time zero and delta values are presented throughout the experiments. The central administration of m-CPBG, a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist (160 nmol) induced a significant decrease in MAP in control (saline-pretreated) animals. Conversely, the central administration of ondansetron, a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist (80 nmol), evoked a significant increase in MAP. Pretreatment with ondansetron abolished the hypotensive response obtained after the stimulation of central 5-HT<sub>3</sub> receptors by m-CPBG. Pretreatment with naloxone (30 nmol), a non-selective opioid antagonist, and with nor-binaltorfimine (NOR-BNI), a selective  $\kappa$ -opioid receptor antagonist, blocked the hypotensive response observed after central 5-HT<sub>3</sub> receptor stimulation. On the other hand, pretreatment with naltrindole (1 nmol), a selective  $\delta$ -opioid antagonist, blocked the hypotensive response generated by central 5-HT<sub>3</sub> receptor stimulation and promoted, after 15 minutes, a significant hypertensive response. The administration of each one of the opioid antagonists alone was unable to promote any significant change in MAP and HR. The blockade of sympathetic function by the peripheral administration of prazosin ( $\alpha$ 1 receptor blocker) abolished the blockade of the hypotensive response observed after 5-HT<sub>3</sub> receptor stimulation induced by the  $\kappa$ -opioid receptor antagonist NOR-BNI and blunted the blockade of the hypotensive response previously seen in animals treated with m-CPBG and pretreated with the opioid antagonists naloxone and naltrindole. The data presented here suggest that the hypotensive response obtained after the central stimulation of 5-HT<sub>3</sub> receptors depends on the functional integrity of central  $\mu$ ,  $\kappa$  and  $\delta$  opioid receptors and relies on a sympathoinhibitory mechanism.

Key words: 1- serotonin; 2 – opioid; 3 – blood pressure; 4 – heart rate; 5 – sympathetic activity

## II INTRODUÇÃO

Os mecanismos centrais e periféricos envolvidos na regulação da pressão sanguínea e da frequência cardíaca têm sido extensivamente estudados, por diversos pesquisadores, utilizando diferentes procedimentos experimentais (Philippu, 1988; Dampney *et al.*, 1994 e 2002; Evans *et al.*, 2005; Guyenet, 2006). Entretanto, apesar da grande quantidade de informação já existente, ainda não são totalmente claros os mecanismos cerebrais de controle da pressão sanguínea e frequência cardíaca.

Sabe-se que respostas cardiovasculares são desencadeadas por diferentes estímulos, como a prática de exercício (O'hagan *et al.*, 1997; Nauli *et al.*, 2001), estímulo nociceptivo (George *et al.*, 1994; Houdi *et al.*, 1996; Bruehl & Chung, 2004; Brink *et al.*, 2006; Hamurtekin *et al.*, 2007; Lo *et al.*, 2007), estresse (Kiritsy-Roy *et al.*, 1986; Houdi *et al.*, 1996; Drolet *et al.*, 2001; Carrasco & Van de Kar, 2003; Motzer & Hertig, 2004), além de situações comportamentais como ansiedade, inquietação e medo que também evocam respostas de taquicardia e hipertensão (Graeff, 1993; Gray, 1993; Bodnar, 2003 e 2008).

Há evidências sugerindo que a liberação de opioides em situações de estresse faz parte do mecanismo de defesa do organismo. Opioides diminuem a atividade do eixo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), atuando como *feedback* negativo (Adam & Epel, 2007), enquanto a injeção de antagonistas opioides promove estimulação do eixo HHA, sugerindo que os opioides reduzam as respostas ao estresse (Drolet *et al.*, 2001).

Conexões neuroanatômicas entre os núcleos da rafe, região cerebral produtora de serotonina, e as áreas cerebrais envolvidas com respostas ao estresse apontam para a participação das vias serotoninérgicas nas situações estressoras. Dados do nosso laboratório mostram que a ativação de receptores 5-HT<sub>3</sub>, através da administração de seu agonista, m-cloro-fenil-biguanida (mCPBG), no III V, produz hipotensão em ratos normais e impede a hipertensão induzida por estresse em ratos submetidos a estresse de restrição (Ferreira *et al.*, 2004).

Com uma ampla variedade de funções, as vias serotoninérgicas e opiatérgicas atuam em uma imensa variedade de funções, regulando diversos parâmetros fisiológicos, incluindo a regulação cardiovascular. Apresentando ampla distribuição no sistema nervoso central e periférico, as vias serotoninérgicas e opiatérgicas também estão envolvidas em uma variedade de funções, devido à variedade de receptores

existentes, embora poucos sejam estudados (Kraychete, 2006). Apesar de todo conhecimento a respeito destas vias e da importância destas na regulação cardiovascular, tal conhecimento ainda é bastante limitado e controverso, necessitando de mais aprofundamento (Holaday (a, b), 1983; Feuertein & Sirén, 1987; Vaccarino & Kastin, 2001; Bodnar & Hadjimarkou, 2003; Bodnar, 2008). Além disso, drogas opiatérgicas, bem como serotoninérgicas, são usadas frequentemente na prática clínica, entre estas, podem-se citar a morfina, o tramal, a codeína, a fluoxetina, e a sibutramina. Assim, a compreensão dos mecanismos de controle da pressão sanguínea e da participação das vias opiatérgicas e serotoninérgicas neste controle são de grande importância e pode permitir a clínico-terapêutica com maior segurança.

### III REVISÃO DA LITERATURA

#### III.1 CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS E ANATÔMICAS DAS VIAS SEROTONINÉRGICAS E OPIATÉRGICAS CENTRAIS

##### III.1.1 SISTEMA SEROTONINÉRGICO

A serotonina (5-HT)<sub>5</sub> exerce efeitos tanto no sistema nervoso central, quanto em nível periférico, atuando como neurotransmissor e/ou neuromodulador. Nos tecidos periféricos, 95% da 5-HT é produzida pelo trato gastrointestinal (Gershon, 1999). Já os níveis de 5-HT no sistema nervoso central correspondem somente a cerca de 1 a 2% da quantidade total encontrada no organismo, estando seus neurônios produtores concentrados nos núcleos da rafe (Jacobs & Azmitia, 1992).

A participação das vias serotoninérgicas centrais no controle de parâmetros fisiológicos tem sido demonstrada na literatura, produzindo seus efeitos através de uma variedade de receptores, que são encontrados no sistema nervoso periférico e central. Entre os principais efeitos resultantes da estimulação serotoninérgica estão a regulação do ciclo sono-vigília, apetite, nocicepção, humor, termorregulação, sede, estresse, comportamento maternal ou sexual, peristaltismo gastrointestinal, coagulação sanguínea e manutenção da pressão sanguínea e do equilíbrio hidroeletrólítico (Hoyer, 2002). Suas múltiplas ações fisiológicas são geralmente atribuídas à variedade de receptores serotoninérgicos, os quais se encontram amplamente distribuídos em vários órgãos e tecidos, e ao sistema serotoninérgico neuronal (Barnes & Sharp, 1999).

Disfunções orgânicas são observadas quando ocorre variação na concentração de serotonina no organismo. Ela está envolvida na etiologia de muitas doenças como depressão, ansiedade, fobia social, esquizofrenia, distúrbio obsessivo-compulsivo, autismo, distúrbio do pânico, enxaqueca, abuso e dependência de drogas, hipertensão arterial sistêmica, hipertensão pulmonar, distúrbio do apetite, vômito, síndrome do intestino irritável e arritmia cardíaca (Saxena, 1995; Hoyer, 2002; Côté *et al.*, 2004; Chameau & Van Hooft, 2006).

Em relação ao sistema cardiovascular, estudos trazem evidências que diminuição dos níveis da serotonina sanguínea leva à falência cardíaca, hipertensão arterial sistêmica e pulmonar sugerindo que o nível de serotonina circulante pode ser um dos fatores que contribui com a manutenção da atividade cardiovascular normal (Côté *et al.*,

2004). Além disso, os efeitos da serotonina sobre a regulação cardiovascular envolvem efeitos distintos como hipertensão ou hipotensão, bradicardia ou taquicardia, vasoconstrição ou vasodilatação que parecem depender de diversos fatores, como a área cerebral e os receptores envolvidos (Côté *et al.*, 2004; Ramage, 2001).

A síntese de 5-HT ocorre em duas etapas: o aminoácido precursor da serotonina, o triptófano, é hidroxilado a 5-hidroxitriptófano pela ação da enzima triptófano hidroxilase e em seguida é descarboxilado a 5-hidroxitriptamina na presença da 5-hidroxitriptófano-decarboxilase (Legay, 1982). Ela é metabolizada pela monoamina oxidase do tipo A (MAO-A), presente no fígado, no endotélio vascular pulmonar e no sistema nervoso central (SNC) (Goldberg *et al.*, 1998).

Os receptores serotoninérgicos são agrupados em sete famílias de receptores – 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub> - e cerca de quatorze subtipos, que são encontrados em quase todos os tecidos. Classificados de acordo com a estrutura e o modo de transdução de sinal, a diversidade observada nos receptores serotoninérgicos tem sido utilizada para explicar, pelo menos parcialmente, a amplitude funcional deste neurotransmissor (Barnes & Sharp, 1999; Hoyer, 2002).

Estudos de biologia molecular mostram que os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub> são acoplados à proteína G e atuam modulando os níveis de AMPc ou no caso de receptores 5-HT<sub>2</sub>, a fosfolipase C (Barnes & Sharp, 1999).

Os receptores 5-HT<sub>3</sub> são o único exemplo de receptores serotoninérgicos acoplados a canal iônico (Niesler *et al.*, 2008). Estes receptores fazem parte da superfamília de receptores com alça de Cys ligada ao canal semelhante aos receptores nicotínicos e GABA<sub>A</sub> (Reeves & Lummis 2002; Peters *et al.*, 2005). Foram identificadas 5 subunidades que formam um anel em torno do canal iônico central que podem se apresentar dispostas de forma homomérica, e neste caso o receptor é denominado de 5HT<sub>3A</sub>, (Maricq *et al.* 1991; Miyake *et al.*, 1995); ou dispostas de forma heteromérica (subunidades A e B) levando a denominação de 5HT<sub>3AB</sub> (Davies *et al.*, 1999). Cada receptor mostra diferentes características de condutância do canal iônico, mas apresenta pouca diferença farmacológica em resposta a antagonistas 5HT<sub>3</sub> e à própria serotonina (Reeves e Lummis 2002; Peters *et al.*, 2005).

Outras 3 subunidades do receptor 5HT<sub>3</sub> foram identificadas em humanos (subunidades C, D, e E) (Karnovsky *et al.*, 2003; Niesler *et al.* 2003). Entretanto



receptores 5HT<sub>3</sub> com a presença destas subunidades são restritos a tecidos periféricos com alto nível no trato gastrointestinal (Niesler *et al.* 2003) e parecem ser ausentes em roedores (Karnovsky *et al.* 2003; Niesler *et al.* 2003).

A distribuição dos receptores com suas diversas subunidades tem se mostrado não apenas espécie específica, como também tecido-específica. Em roedores são encontrados apenas os subtipos 5HT<sub>3A</sub> e 5HT<sub>3B</sub>, enquanto em humanos são encontrados todos os subtipos. Verificou-se em roedores que os neurônios do gânglio nodoso que se projetam para o núcleo do trato solitário (NTS) possuem RNAm tanto para 5HT<sub>3A</sub>, quanto para 5HT<sub>3B</sub> ou apenas para 5HT<sub>3A</sub> (Morales and Wang, 2002). Além disso, tem sido demonstrada a presença de receptores 5HT<sub>3A</sub> e de receptores 5HT<sub>3AB</sub> em diferentes terminais neuronais neste núcleo, o que sugere diferente resposta modulatória, desde que a permeabilidade dos canais pode variar de acordo com o tipo de subunidade presente no receptor (Davies *et al.*, 1999). Estudos anatômicos e eletrofisiológicos mostram que os receptores 5HT<sub>3</sub> facilitam a liberação de glutamato no núcleo dorsal do vago e no NTS participando das respostas baroreflexas (Glaum *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1998; Funahashi *et al.*, 2004; Jeggo *et al.*, 2005).

Os receptores 5-HT<sub>3</sub> são encontrados em diversas áreas cerebrais, tais córtex frontal, complexo amigdalóide, núcleo accumbens, área tegmental ventral e dorsal, bulbo olfatório, área prostroma e núcleo do trato solitário (Waeber *et al.*, 1989; Barnes *et al.*, 1989, 1990; Jones *et al.*, 1992; Tecott *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 1996, Thompson & Lummis, 2007). Os neurônios hipocámpais que expressam receptores 5-HT<sub>3A</sub> e apresentam RNAm para estes receptores são exclusivamente interneurônios GABAérgicos (Tecott *et al.*, 1993; Morales and Bloom, 1997; Spier *et al.*, 1999; Miquel *et al.*, 2002). Por outro lado, a expressão dos receptores 5-HT<sub>3B</sub> no hipocampo, em roedores, é controversa (Hooft and Yakel, 2003; Jensen *et al.*, 2008).

Embora os estudos da estrutura do receptor 5-HT<sub>3</sub> tenham avançado, ainda não dispomos de agentes farmacológicos específicos que possam levar à ativação destes receptores com diferentes conformações e arranjos de suas subunidades. Vale ressaltar que os estudos mostram que não há diferença na interação da serotonina e dos antagonistas atualmente disponíveis, com os receptores 5-HT<sub>3</sub> em diferentes conformações. No futuro, com o desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas é possível que este quadro mude e funções diversas sejam identificadas.

### III.1.2 SISTEMA OPIATÉRGICO

Os peptídeos opioides originam-se de quatro famílias de proteínas distintas, a pró-opiomelanocortina (POMC), a proencefalina (PENC), a prodinorfina (PDIN) e a pronociceptina/orfanina (PN/OFQ), que são moléculas precursoras da beta-endorfina, das encefalinas, das dinorfinas e das nociceptinas/orfaninas (N/OFQ), respectivamente (Lazarus *et al.*, 1996; van den Brink *et al.*, 2003; Waldhoer *et al.*, 2004).

A existência de ao menos três receptores opiatérgicos é bem estabelecida: os receptores mu ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ) e delta ( $\delta$ ), que apresentam diversidades quanto à sua distribuição no sistema nervoso central e nos tecidos periféricos, além de outros tipos de receptores, como os receptores sigma ( $\sigma$ ), os receptores epsolon ( $\epsilon$ ), e os receptores de nociceptina/orfanina, embora pouco estudados (Mansour *et al.*, 1995). Estudos farmacológicos e bioquímicos mostram que os receptores se subdividem em subtipos, como mu ( $\mu_1, \mu_2, \mu_3$ ), kappa ( $\kappa_1, \kappa_2, \kappa_3$ ) e delta ( $\delta_1, \delta_2$ ) (Gavériaux-Ruff *et al.*, 1997). A  $\beta$ -endorfina tem seletividade pelos receptores opiatérgicos do tipo mu, enquanto as encefalinas ligam-se, seletivamente, aos receptores delta, e a dinorfina aos receptores kappa (Li *et al.*, 1993). Entretanto há relatos de que a  $\beta$ -endorfina pode atuar também em receptores do tipo delta (Bicknell, 1985; Zadina, 2002).

Estudos de biologia molecular mostram que os receptores opiatérgicos são acoplados à proteína G, sendo ativados tanto por peptídeos opioides endógenos, como por drogas opiatérgicas exógenas (Waldhoer *et al.*, 2004; Trescot *et al.*, 2008). Alguns receptores acoplados à proteína G apresentam atividade de sinalização basal e podem ativar proteína G mesmo na ausência de agonistas opiatérgicos. Este fenômeno parece contribuir para o desenvolvimento de tolerância e dependência (Waldhoer *et al.*, 2004), além de outros fatores que também contribuem - como longos períodos de tratamento com agonistas opiatérgicos, que podem levar à dessensibilização de receptores (Reisine *et al.*, 1996).

Em 1997, o grupo de Zadina identificou dois novos agonistas endógenos para o receptor opioide do tipo mu: as endomorfina 1 (EM-1) e 2 (EM-2). Estruturalmente diferentes dos peptídeos opioides endógenos, estes novos peptídeos são caracterizados como tetrapeptídeos seletivos, diferindo entre si em apenas um aminoácido: Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub> (EM-1) e Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> (EM-2) (Horvath, 2000). Estes peptídeos, além de ativar a proteína G, ativam também canais de potássio e inibem canais de cálcio (Wang *et al.*, 2002). A EM-1 é considerada o primeiro agonista do receptor mu que



produz analgesia sem sinais de comportamento de dependência, o que representa um grande avanço para seu uso na prática clínica (Wang *et al.*, 2002).

A distribuição dos peptídeos opioides no sistema nervoso central é ampla, havendo diferenças regionais quanto à localização de cada um dos subtipos de receptores opioides. Os receptores do tipo delta-opioides são mais abundantes em regiões corticais e subcorticais, enquanto os receptores do tipo mu-opioides apresentam maior densidade em áreas talâmicas e epitalâmicas, e os receptores do tipo kappa-opioides encontram-se em maior densidade em áreas hipotalâmicas e subtalâmicas. Os três tipos de receptores foram encontrados no hipocampo, gyrus dentado, caudato putamen e NA, sendo nestes últimos sua distribuição diferenciada por regiões (George *et al.*, 1994).

As vias opiatérgicas estão envolvidas em uma variedade de funções, a saber: dor e analgesia, estresse, tolerância e dependência, aprendizado e memória, ingestão alimentar e hídrica, alcoolismo e uso abusivo de drogas, atividade sexual e controle hormonal, gravidez, desenvolvimento e endocrinologia, doenças mentais e do humor, desordens neurológicas, neurofisiologia e atividade elétrica, atividade locomotora, funções hepáticas, gastrointestinais e renais, respostas cardíacas, respiratórias, termorregulação e respostas imunológicas (Bodnar, 2003 e 2008; Vaccarino & Kastin, 2001). A presença destes receptores no hipotálamo também revela o envolvimento em funções autonômicas, comportamento ingestivo e balanço hidroeletrolítico (George *et al.*, 1994).

Um dos desafios no estudo com opioides é a ausência de drogas seletivas, que tenham afinidade exclusiva por um único subtipo de receptor. Devido à grande semelhança química e estrutural que os receptores opioides apresentam, a maioria das drogas disponíveis possuem afinidades mistas por mais de um receptor, o que dificulta a interpretação.

Os peptídeos opioides têm sido empregados com eficácia no tratamento da dor crônica e no tratamento da dependência alcoólica e de heroína (Boyd *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2006), entretanto seus efeitos colaterais tornam-se frequentes e podem incluir hipotensão e bradicardia (Sun *et al.*, 1996) e usuários destas drogas comumente revelam hipotensão ortostática (Holaday (b), 1983).

Semelhante aos efeitos cardiovasculares da serotonina, os efeitos de opioides na regulação cardiovascular também expressam respostas distintas, de hipertensão ou

hipotensão, taquicardia ou bradicardia, dependendo de diversos fatores, como a área cerebral e os receptores envolvidos (Holaday (b), 1983).

### III.2 INTERAÇÃO ENTRE VIAS SEROTONINÉRGICAS E OPIATÉRGICAS

Alguns estudos têm buscado conhecer a relação entre o sistema serotoninérgico e opiatérgico. Tem sido mostrada a existência de interação molecular entre as vias neuronais serotoninérgica e opiatérgica, em diversos níveis. Yoshioka e colaboradores (1992) demonstraram que a ativação de receptores do tipo mu-opioides diminui a concentração de serotonina no hipocampo. Estes resultados contrastam com resultados obtidos pelo grupo de Tao e colaboradores (Grauer *et al.*, 1992; Tao *et al.*, 1994) que encontraram aumento dos níveis extracelulares de serotonina, no núcleo dorsal da rafe e região do neocórtex, acima do tálamo, após ativação dos receptores do tipo mu-opioides. Administração de morfina na substância periaquedutal cinzenta (PAG) também promove aumento na concentração serotoninérgica do fluido cérebro-espinhal lombar, enquanto sua administração no núcleo da rafe aumenta a concentração de 5-HT no hipocampo e estriado, sendo este aumento acentuado quando a enzima monoamina oxidase (MAO) e os sistemas de recaptção serotoninérgica estão inibidos. Em 1998, também, o grupo de Tao encontrou que aumento na concentração de serotonina em decorrência da exposição à morfina pode apresentar diferenças quando há desenvolvimento de tolerância.

Em contrapartida, tem sido demonstrado que as vias serotoninérgicas também influenciam a atividade opiatérgica. Song e colaboradores (2007) encontraram que a estimulação elétrica dos neurônios do corno dorsal da medula induz a produção de peptídeos opioides e este aumento na liberação de peptídeos opioides é inibido após ativação de receptores do tipo 5-HT<sub>1A</sub>. Observou-se também que a administração ICV de fentanil, um agonista opioide, inibe respostas reflexas musculares após estimulação elétrica, e que este efeito pode ser mediado por receptores dos tipos 5-HT<sub>1B/1D</sub> e 5-HT<sub>2</sub>, uma vez que a administração de antagonistas destes receptores diminuiu a inibição reflexa promovida pelo fentanil (Lo *et al.*, 2004). Chu e colaboradores (2009), considerando a participação de antagonistas dos receptores 5-HT<sub>3</sub> na dependência a opioides, mostraram que tanto em humanos quanto em camundongos, ondansetrona diminui os comportamentos de dependência opiatérgica em modelos de abstinência precipitada com naloxone.

Em relação ao controle cardiovascular, parece que a interação opioide-serotoninérgica também é importante. Em nível periférico observou-se queda de pressão sanguínea após injeção endovenosa de  $\beta$ -endorfina, e que este efeito poderia ser bloqueado por depleção serotoninérgica prévia com p-clorofenilalanina. Além disso, verificou-se que a administração de fluoxetina, um inibidor da recaptação serotoninérgica, potencializa o efeito depressor (Lemaire, 1978).

Ao contrário, verificou-se que a administração de naloxona, antagonista opiatérgico, via intraperitoneal, impede a hipotensão decorrente da inibição da recaptação serotoninérgica, em ratos hipertensos espontâneos (Goldstein *et al.*, 1987). Em relação ao SNC, observou-se que a hipotensão provocada por agonistas opioides ICV é bloqueada por antagonistas opioides ou serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>1</sub> (Berger & Ramirez, 1988), corroborando assim a hipótese da interação entre o sistema serotoninérgico e opiatérgico, tanto em nível central quanto em nível periférico da regulação cardiovascular.

### III.3 SEROTONINA NA REGULAÇÃO CARDIOVASCULAR

Com exceção dos receptores 5-HT<sub>6</sub>, para os quais ainda não foi atribuído envolvimento na regulação cardiovascular (Ramage & Villalón, 2008), os demais receptores participam no controle da pressão sanguínea e frequência cardíaca, sendo os mais importantes 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, e 5-HT<sub>3</sub>, com efeitos opostos como hipertensão ou hipotensão, bradicardia ou taquicardia, vasoconstrição ou vasodilatação que parecem depender da área cerebral em que estão localizados e dos tipos de receptores envolvidos (Côté *et al.*, 2004; Ramage, 2001).

A ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da região da rafe e do bulbo gera hipotensão e bradicardia que parece depender de uma redução da atividade simpática e aumento do tônus vagal, enquanto a ativação destes receptores em áreas prosencefálicas produz o resultado oposto (McCall & Clement, 1994). Quanto à administração ICV de agonistas destes receptores, os resultados parecem contraditórios: diminuição da pressão sanguínea, aumento do fluxo sanguíneo renal e diminuição da atividade simpática renal têm sido relatados (Ramage *et al.*, 1988), em contraste com dados de simpatoexcitação e liberação de adrenalina, em ratos anestesiados (Ramage & Villalón, 2008). Esta aparente controvérsia pode ser justificada, em parte, pela ausência de especificidade do

agonista utilizado, 8-OH-DPAT, que possui afinidade por receptores do tipo 5-HT<sub>7</sub>, além de 5-HT<sub>1A</sub>.

A estimulação dos receptores 5-HT<sub>2</sub> no hipotálamo lateral (HL) e núcleo paraventricular (PVN) leva a aumento da pressão sanguínea e da frequência cardíaca (Lin & Lin, 1996). Ao contrário, a ativação destes receptores no NTS leva a hipotensão e bradicardia, enquanto a estimulação destes receptores na região rostral-ventral-lateral do bulbo (RVLM) induz hipotensão sem alterar a frequência cardíaca (Mandal *et al.*, 1990). Alguns estudos mostram que a resposta pressora decorrente da ativação dos receptores 5-HT<sub>2</sub> pode envolver liberação de angiotensina e vasopressina (McCall & Clement, 1994; Ramage & Villalón, 2008). Dados prévios do nosso laboratório mostram que a ativação dos receptores 5-HT<sub>2</sub> pela administração de agonista específico no terceiro ventrículo induz hipertensão. Além disso, verificamos que a função normal destes receptores é essencial para a hipertensão ocorrida durante o estresse de contenção (Ferreira *et al.*, 2005).

Quanto aos receptores 5-HT<sub>3</sub>, os dados ainda são inconsistentes. Tem sido sugerido que a nível do NTS estes receptores promovem bradicardia vagal mediada pela ativação dos receptores cardiopulmonares (Ramage & Villalón, 2008). Dados do nosso laboratório mostram que a ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> centrais evoca uma significativa hipotensão em ratos e o bloqueio destes mesmos receptores resulta num significativo aumento da pressão, mostrando que estes receptores parecem exercer um tônus inibitório sobre a pressão e que esta ação parece ser dependente de um mecanismo simpato-inibitório, sem influências sobre o componente parassimpático (Ferreira *et al.*, 2004).

### III.4 OPIOIDES NA REGULAÇÃO CARDIOVASCULAR

Estimulação de vias opiatérgicas no sistema nervoso central pode produzir respostas de hipertensão ou hipotensão, taquicardia ou bradicardia, dependendo do tipo de receptor estudado, da dose dos agentes opioides utilizados, da localização cerebral, das espécies animais estudadas e da condição de consciência dos animais. Há relatos de que os opioides podem apresentar tanto atividade inibitória quanto excitatória, sobre a transmissão neuronal (Holaday (b), 1983).

Em estudos com modelos animais com alteração genética, que apresentam deficiência de expressão dos receptores do tipo kappa-opioide, observa-se desenvolvimento de hipertensão, sugerindo que estes receptores estejam envolvidos na regulação da pressão sanguínea (Pugsley, 2002). Por outro lado, o bloqueio dos receptores kappa opioides diminui a hipertensão induzida por angiotensina ICV e altera a sensibilidade do barorreflexo (Rabkin, 2007).

Há quase duas décadas mostrou-se a distribuição de morfina no SNC após sua administração periférica. Bhargava e colaboradores (1992) observaram altas concentrações de morfina na medula e hipotálamo e baixa concentração na amígdala após 5 minutos de sua administração IV. Estes resultados foram semelhantes tanto em animais normotensos quanto em animais hipertensos espontâneos. Entretanto, após 4 horas, a concentração de morfina no hipotálamo, no córtex e na medula de ratos hipertensos espontâneos foi maior do que em ratos normotensos, o que pode contribuir para a compreensão dos efeitos mais rápidos de drogas opioides em animais hipertensos. Este resultado corrobora dados prévios do mesmo grupo de pesquisadores mostrando maior densidade de receptores opioides no cérebro de animais hipertensos espontâneos do que em animais normotensos.

Muitos dos sinais e sintomas de overdose por drogas opiatérgicas descritos assemelham-se à sintomatologia do choque circulatório. De fato, alguns estudos revelam a participação das endorfinas na fisiopatologia do choque, desde que a administração do antagonista inespecífico para os receptores opioides, naloxona, aumenta a sobrevivência ao choque endotóxico, ao hemorrágico e ao neurogênico de diferentes espécies animais estudadas (camundongos, ratos, coelhos, gatos, cães, ovelhas, porcos, cavalos e macacos) (Holaday (a), 1983). A recuperação do choque induzida pelo naloxona não parece ser dependente de aumento de atividade simpática periférica (Feuerstein *et al.*, 1981). Diversos receptores opioides parecem estar envolvidos nas respostas ao choque. Verificou-se que os receptores do tipo kappa e delta opioides parecem mais importantes para o choque endotóxico e traumático, enquanto os receptores do tipo mu, além dos receptores dos tipos kappa e delta parecem participar do choque hemorrágico (Liu *et al.*, 2005; Frithiof *et al.*, 2006 e 2007; Cavun *et al.*, 2001).

### III.4.1 EFEITOS CARDIOVASCULARES DOS RECEPTORES MU-OPIOIDES

Ativação central de receptores mu opioides no PVN de ratos Wistar-Kyoto aumenta a atividade simpática e a produção de catecolaminas, associado ao aumento da pressão sanguínea e da frequência cardíaca. Confirmando estes resultados, Bachelard e colaboradores (1995) também encontraram respostas de hipertensão, taquicardia e vasoconstrição renal após estimulação dos receptores mu-opioides no PVN. Por outro lado, durante o estresse, a ativação destes receptores impede o aumento das catecolaminas e da frequência cardíaca, possivelmente através de mecanismos vagais, uma vez que a atropina reverte esta resposta. O bloqueio dos receptores mu opioides durante o estresse, pela administração de naloxona no PVN, leva a aumento da secreção de epinefrina induzida pelo estresse, sugerindo a participação destes receptores na regulação cardiovascular durante o estresse (Kiritsy-Roy *et al.*, 1986).

De modo contrário, Sun e colaboradores (1996) obtiveram hipotensão e bradicardia, tanto em ratos normotensos anestesiados, quanto em hipertensos espontâneos, após ativação destes receptores no PVN, através da administração do agonista DAMGO. Estes efeitos foram revertidos pelo pré-tratamento com o antagonista naloxona, traduzindo resposta de hipertensão e taquicardia. De modo semelhante, Lessard e colaboradores (2002) também encontraram respostas de hipertensão e taquicardia, embora pequena e transitória, durante o bloqueio dos receptores do tipo mu opioides no PVN, através dos antagonistas naloxona e  $\beta$ -funaltrexamina. A hipertensão induzida pelo bloqueio dos receptores do tipo mu opiatérgicos foi abolida pela administração de antagonista vasopressinérgico, apontando para uma provável interação opiatérgica-vasopressinérgica.

No núcleo pré-óptico medial (POM), a ativação de receptores do tipo mu-opioides, através da administração do agonista DAMGO também aumenta a pressão sanguínea e frequência cardíaca em ratos normotensos, bem como em ratos hipertensos espontâneos a dose baixa apresenta efeito pressor, enquanto a dose maior causa hipotensão, sendo estes efeitos antagonizados pela administração de naloxona. (Feuerstein *et al.*, 1983). De modo contrário, no mesmo ano, Faden e colaboradores mostraram que a ativação destes receptores em animais anestesiados causa hipotensão e taquicardia.



Shen e colaboradores (1999) mostraram que ativação de receptores mu-opioides na região do hipocampo, em ratos normotensos e hipertensos espontâneos anestesiados, não leva a efeitos significativos sobre pressão sanguínea e frequência cardíaca.

Diversos estudos têm procurado conhecer as respostas cardiovasculares após administração de agentes opioides nos ventrículos cerebrais, porém os dados ainda são inconsistentes. No ventrículo lateral (VL), DAMGO produz aumento da pressão sanguínea e do fluxo simpatoadrenal e reduz a frequência cardíaca. O pré-tratamento com o antagonista,  $\beta$ -funaltrexamina, produz taquicardia, reduz a concentração de adrenalina e atenua o aumento da pressão sanguínea em ratos normais. Em animais submetidos a estresse, a injeção deste antagonista no VL atenua a taquicardia, enquanto o agonista promove bradicardia (Houdi *et al.*, 1996). Por outro lado, Rao e colaboradores (2003) encontraram resultados contraditórios. Com a administração de DAMGO, no VL, em doses baixas, encontraram hipertensão e vasoconstricção no leito ilíaco, e em doses maiores observaram hipotensão e vasodilatação do leito ilíaco. A administração do antagonista,  $\beta$ -funaltrexamina, no VL, reduz a pressão sanguínea e causa vasodilatação do leito mesentérico. Estes autores atribuíram esta variabilidade dos efeitos obtidos à difusão da droga, em diferentes concentrações, para diferentes sítios cerebrais, sugerindo que o efeito hipertensor da ativação dos receptores do tipo mu-opioides seja devido à ativação de neurônios do PVN e seu efeito hipotensor seja decorrente de ativação de neurônios do RVLM.

Barnes, Rao e colaboradores, no ano seguinte, mostraram que a obesidade induzida por dieta aumenta a expressão central de receptores mu hipotalâmicos. Ao administrar  $\beta$ -endorfina via ICV houve diminuição da pressão sanguínea em ratos normais e aumento da pressão sanguínea em ratos obesos, confirmando a maior expressão dos receptores do tipo mu-opioides na região hipotalâmica dos animais obesos. Estas alterações cardiovasculares produzidas pela injeção ICV de  $\beta$ -endorfina foram mais sensíveis ao bloqueio dos receptores do tipo mu-opioide do que ao bloqueio dos receptores do tipo kappa-opioides.

Em 2006, Hill-Pryor, Rao e colaboradores mostraram que DAMGO ICV aumenta a pressão sanguínea e a frequência cardíaca em ratos normais e em ratos obesos apenas nas maiores doses. Já seu antagonista, CTAP, aumenta a pressão sanguínea e a frequência cardíaca em ratos normais e obesos. Estes resultados, contudo contrastam com resultados prévios deste mesmo grupo, em que obtiveram respostas de

hipertensão, após administração de DAMGO em doses baixas, enquanto com doses altas observaram hipotensão.

Em áreas mais caudais, Sun e colaboradores (1996) encontraram efeitos de hipotensão e bradicardia em ratos normotensos e hipertensos espontâneos após ativação dos receptores do tipo mu-opioides no RVLM. Estes resultados foram semelhantes aos resultados obtidos por estes autores após administração do agonista DAMGO no PVN. Estas respostas foram revertidas pela administração do antagonista naloxona, sugerindo uma provável influência inibitória dos receptores do tipo mu-opioides no controle cardiovascular. Na região periaquedutal cinzenta ventrolateral, administração de DAMGO evoca hipertensão e taquicardia (Keay *et al.*, 1997). Resposta semelhante é observada com a administração deste agonista no NTS. Outro agonista mu-opioide, metionina-encefalina, no NTS, também produz aumento na pressão sanguínea e frequência cardíaca. Já a  $\beta$ -endorfina nesta região produz diminuição da pressão sanguínea e da frequência cardíaca, mostrando que a regulação cardiovascular pelos peptídeos opioides varia de acordo com a localização central de seus receptores (Hassen *et al.*, 1984).

Em ratos anestesiados com halotano que receberam os agonistas opioides, morfina e DAMGO, na região intratecal, observou-se bloqueio dose-dependente das mudanças cardiovasculares evocadas pelo teste de retirada da cauda em água quente, sendo estes efeitos revertidos pelo naloxona. Estes resultados apontam para o envolvimento destes receptores na modulação autonômica evocada por estímulo térmico doloroso (Nagasaka & Yaksh, 1995).

#### III.4.2 EFEITOS CARDIOVASCULARES DOS RECEPTORES KAPPA-OPIOIDES

Ativação central de receptores tipo kappa opioides no PVN (Bachelard & Pître, 1995; Sun *et al.*, 1996); no RVLM (Sun *et al.*, 1996) e na PAG ventrolateral (Keay *et al.*, 1997) de ratos Wistar-Kyoto, não altera a pressão sanguínea e frequência cardíaca. O bloqueio destes receptores no PVN também não teve efeito significativo sobre a pressão sanguínea e a frequência cardíaca (Lessard & Bachelard, 2002).

Diferente da estimulação dos receptores do tipo mu-opioide na região hipocampal, que não apresenta efeitos significativos sobre a pressão sanguínea e a frequência cardíaca, alguns estudos mostram efeitos cardiovasculares significantes com a estimulação dos receptores do tipo kappa-opioides nesta região. Entre estes estudos,



pode-se citar o de Zhai e colaboradores (1988) que mostraram em animais normotensos e hipertensos espontâneos, hipotensão e bradicardia, quando os animais foram tratados com agonistas kappa-opioides seletivos, no hipocampo, e estes efeitos foram bloqueados pela administração do antagonista nor-binaltorfimina. Confirmando estes resultados, Shen e colaboradores (1999), obtiveram resultados semelhantes de hipotensão e bradicardia em ratos normotensos e hipertensos espontâneos anestesiados e tais respostas também foram bloqueadas pelo antagonista nor-binaltorfimina (nor-BNI). Wright e colaboradores (2003) também confirmaram estes efeitos de hipotensão após administração, tanto aguda quanto crônica, de agonistas kappa-opioides no hipocampo. E também obtiveram respostas de hipertensão e bradicardia após administração crônica hipocampal de nor-BNI, em ratos normotensos e em ratos com hipertensão induzida por isolamento social, confirmando dados anteriores dos autores que mostraram que a hipertensão induzida por isolamento social promove diminuição da expressão dos receptores kappa hipocampais.

Outro estudo mostra que a injeção de dinorfina A (1-8) no hipocampo também reduz a pressão sanguínea e a frequência cardíaca de modo dose dependente, enquanto a injeção de nor-BNI abole estes efeitos. Os autores sugerem que estes efeitos sejam consequência de aumento da excitação dos neurônios hipocampais induzida pelos estímulos dos receptores kappa-opioides e que este efeito poderia ser mediado parcialmente por ativação vagal e inibição simpática (Wang & Ingenito, 1992).

Rao e colaboradores (2003) encontraram resultados mais consistentes após ativação de receptores kappa-opioides do que com receptores mu-opioides. Administração de dinorfina no VL diminui a pressão sanguínea e causa vasodilatação do leito mesentérico superior e seu antagonista, nor-binaltorfimina, aumenta a pressão sanguínea e vasoconstrição do leito mesentérico e do leito ilíaco (Rao *et al.*, 2003).

### III.4.3 EFEITOS CARDIOVASCULARES DOS RECEPTORES DELTA-OPIOIDES

Ativação e bloqueio de receptores do tipo delta-opioides no PVN de ratos Wistar-Kyoto, não produz efeitos significantes sobre a pressão sanguínea e frequência cardíaca (Bachelard & Pître, 1995; Lessard & Bachelard, 2002), de modo semelhante aos resultados obtidos com os receptores kappa nesta região. Contudo, Sun e colaboradores (1996) demonstraram resultados diversos, em que a ativação dos receptores delta-opioides tanto no PVN quanto no RVLM leva a hipotensão e

bradicardia em ratos normotensos e hipertensos espontâneos e estas respostas são revertidas pelo antagonista naloxona, apontando para um envolvimento possivelmente inibitório dos receptores delta-opioides no controle cardiovascular.

Feuerstein e colaboradores (1983) mostraram que ativação dos receptores delta, no POM, aumenta a pressão sanguínea e a frequência cardíaca em ratos normotensos e hipertensos espontâneos. Ao contrário, Faden e colaboradores (1983) verificaram hipotensão e taquicardia em animais anestesiados, com a administração de agonista delta na POM.

Sun e colaboradores (1996) encontraram que a ativação dos receptores do tipo delta-opioides no hipocampo de ratos normotensos e hipertensos causa hipotensão e bradicardia que são revertidas pelo naloxona, produzindo respostas de hipertensão e taquicardia. De forma controversa, Shen e colaboradores (1999) mostraram que injeção do agonista delta no hipocampo de ratos normotensos e hipertensos espontâneos anestesiados, não apresenta efeitos significativos sobre a pressão sanguínea e a frequência cardíaca.

A ativação de receptores do tipo delta-opioides no tronco cerebral leva a respostas cardiovasculares diversas das encontradas pela ativação dos mesmos receptores em áreas prosencefálicas, sendo este efeito bloqueado pelo naloxona (Hassen & Feuerstein, 1984). Administração de agonista dos receptores delta-opioides no NTS e na região periaquedutal cinzenta ventrolateral leva a hipotensão e bradicardia (Keay *et al.*, 1997; Feldman *et al.*, 1996). Estes efeitos foram bloqueados pelos antagonistas naloxona e ICI 154,129 (Feldman *et al.*, 1996).

De modo semelhante à ativação de receptores mu-opioides, ativação de receptores delta por injeção intratecal de agonistas delta-opioide em ratos anestesiados com halotano leva ao bloqueio dose-dependente das mudanças cardiovasculares evocadas pelo teste de retirada da cauda em água quente, sendo estes efeitos revertidos pelo naloxona, apontando para o envolvimento dos receptores mu- e delta-opioides na modulação autonômica evocada por estímulo térmico doloroso (Nagasaka & Yaksh, 1995).

## **IV OBJETIVOS**

### **IV.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a interação entre receptores serotoninérgicos 5HT<sub>3</sub> e receptores opiatérgicos,  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ , nas respostas cardiovasculares em ratos.

### **IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudar o efeito do bloqueio dos receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opiatérgicos centrais sobre a resposta hipotensora decorrente da ativação de receptores 5HT<sub>3</sub> centrais.
- Estudar a participação simpática na resposta cardiovascular induzida pela ativação do receptor 5HT<sub>3</sub> e bloqueio dos receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opioides.
- Verificar se o bloqueio dos receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opioides no sistema nervoso central modifica a pressão sanguínea e frequência cardíaca.

## V HIPÓTESES

### V.1 HIPÓTESES NULAS

- V.1.1 – A ativação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>3</sub> centrais não promove hipotensão em ratos.
- V.1.2 – O bloqueio dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>3</sub> centrais não promove hipertensão em ratos.
- V.1.3 – A hipotensão mediada pela ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> centrais não depende da integridade funcional dos receptores mu, kappa e delta opioides centrais.
- V.1.4 – A interação entre os sistemas serotoninérgicos e opiatérgicos no controle da pressão sanguínea não depende do sistema nervoso simpático.

### V.2 HIPÓTESES TESTES

- V.2.1 – A ativação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>3</sub> centrais promove hipotensão em ratos.
- V.2.2 – O bloqueio dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>3</sub> centrais promove hipertensão em ratos.
- V.2.3 – A hipotensão mediada pela ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> centrais depende da integridade funcional dos receptores mu, kappa e delta opioides centrais.
- V.2.4 – A interação entre os sistemas serotoninérgicos e opiatérgicos no controle da pressão sanguínea depende do sistema nervoso simpático.

## VI METODOLOGIA DO ESTUDO

### VI.1 ANIMAIS

Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar (280 a 320g) num total de 158 animais distribuídos em diferentes grupos experimentais e controles. Devido a ocorrência de *downregulation* de receptores opióide com administrações repetidas de drogas opiatérgicas, cada animal foi utilizado em apenas um experimento.

Os ratos foram provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com controle de temperatura (22-24°C) e luz, com ciclo claro/escuro das 06h às 19h. Tiveram livre acesso à água e ração (Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, Brasil) durante todo o período experimental.

### VI.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais foram submetidos a dois procedimentos cirúrgicos sob anestesia com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (11,5 mg/kg) via intra-peritoneal: a primeira para implante de cânula guia no ventrículo lateral cerebral direito (VL) e a segunda para cateterização da artéria carótida e veia femoral.

Na primeira cirurgia foi implantada cânula guia no VL, utilizando as seguintes coordenadas: 1,2 mm posterior ao bregma, 1,5 mm lateral e 4,0 mm vertical abaixo da calota craniana (Paxinos & Watson, 1998). As cânulas foram confeccionadas com agulhas hipodérmicas de aço inoxidável com diâmetro de 0,7 mm e comprimento padronizado de 12 mm. A fim de prevenir possíveis obstruções, as mesmas foram ocluídas com mandris removíveis feitos com fios de aço inoxidável. As cânulas foram fixadas ao crânio com auxílio de parafusos e de acrílico dentário autopolimerizante. Após as cirurgias, os animais receberam antibiótico veterinário profilático (Pentabiótico: Benzilpenicilina benzatina 600.000 UI / 3 mL; Benzilpenicilina procaína 300.000 UI / 3 mL; Benzilpenicilina potássica 300.000 UI / 3 mL; Diidroestreptomicina base 250 mg / 3 mL; Estreptomicina base 250 mg / 3 mL) no volume 0,1 mL por via intramuscular e analgésico dipirona 500 mg / mL, uma gota por via oral. Durante o

período pós-cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais com água e ração livres durante 4 dias e foram diariamente manipulados de forma similar às condições experimentais, com o objetivo de reduzir o estresse.

Na segunda cirurgia, trinta e seis horas antes dos experimentos, os animais tiveram a artéria carótida comum esquerda e a veia femoral direita cateterizadas. O cateter foi confeccionado com polietileno PE50 para artéria carótida e PE10 para a veia femoral. Durante o ato cirúrgico, os cateteres foram preenchidos com solução salina heparinizada (500UI/mL), e após colocação, exteriorizados subcutaneamente na região dorsal do pescoço do rato. Após esta cirurgia, os animais receberam mais uma dose do antibiótico veterinário e do analgésico.

Hirots e colaboradores (1999) mostraram que o anestésico cetamina interage com receptores opioides  $\mu_2$ , possivelmente antagonizando estes receptores, embora promova analgesia. Apesar da interação existente entre o anestésico utilizado neste protocolo experimental e os receptores opioides do tipo  $\mu_2$ , pode-se afirmar que tal interação não prejudica os resultados encontrados, uma vez que a última dose de anestésico utilizado foi aplicada 36 horas antes das sessões experimentais e a cetamina apresenta fase de distribuição que dura cerca de 30 minutos, com uma meia-vida de 7 a 17 minutos e com meia-vida de eliminação em torno de 2,5 a 3 horas (Kraychete, 2006).

### VI.3 REGISTRO DA PRESSÃO SANGUÍNEA E FREQUÊNCIA CARDÍACA

A pressão sanguínea foi continuamente monitorada através do cateter carotídeo conectado a um transdutor de pressão (World Precision Instruments) cujo sinal foi amplificado e digitalizado por um programa analógico-digital (AqDados, Lynx Tecnologia Eletrônica, São Paulo, Brasil, versão 7.0) e gravado (1kHz) em um computador para análise posterior. A pressão arterial média e a frequência cardíaca foram calculadas a partir da pressão pulsátil usando o software Spike 2, versão 2,3, desenvolvido pela Cambridge Electronic Design 2000, Cambridge, England.

Após um período de estabilização, de cerca de 15 minutos, os animais receberam as microinjeções no VL e a pressão sanguínea foi registrada continuamente por 120 min e expressas como delta da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) em relação aos valores pré-injeção.

## VI.4 DROGAS E MICROINJEÇÕES

As seguintes drogas foram utilizadas no presente trabalho: mCPBG 160 nmol (agonista específico dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>); ondansetrona 80 nmol (antagonista específico dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>); naloxona 30 nmol (antagonista dos receptores opioides); Nor-binaltorfimina 10 nmol (nor-BNI) antagonista seletivo dos receptores  $\kappa$  opioides; naltrindole 1 nmol (antagonista seletivo dos receptores  $\delta$  opioides). Todas as drogas foram diluídas em solução salina isotônica estéril.

As microinjeções no VL foram realizadas com microseringas Hamilton (Hamilton Co. Inc.) conectadas, através de tubo de polietileno (PE10), à agulha gengival, do tipo 30G, 0,5mm maior do que a cânula guia. O volume de injeção central, sempre de 2  $\mu$ L, foi administrado durante aproximadamente 30 segundos. O volume de injeção intravenosa foi de 0,1 mL por rato.

Também foi utilizada droga periférica: prazosin 3 mg/mL (antagonista  $\alpha$ -adrenérgico) diluído em solução salina isotônica estéril.

## VI.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo *software* Graphpad, versão 5.00, (GraphPad Software Inc., San Diego, California), sendo submetidos à ANOVA “Two Way” para Medidas Repetidas seguida do pós-teste de Bonferroni, em todos os grupos, exceto o último grupo experimental, submetido a tratamento periférico com prazosin, cujos resultados foram submetidos à ANOVA “One Way” para Medidas Repetidas seguida do pós-teste de Bonferroni. Os grupos foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

## VI.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As sessões experimentais ocorreram sempre no turno vespertino, a partir das 13h.

No início das sessões experimentais, uma extensão de polietileno (PE 50) foi conectada ao transdutor e à cânula carótida para permitir o registro da pressão pulsátil com os animais em livre movimento em suas gaiolas.

Após cerca de 30 minutos de estabilização da pressão pulsátil, os registros foram iniciados tomando-se os quinze minutos iniciais como valores basais (- 45 min). A seguir, os animais recebiam as microinjeções intracerebroventriculares (ICV) com intervalo de 30 minutos e o registro permanecia por mais 120 minutos.

Durante o experimento com administração de drogas periféricas, foram utilizados os mesmos procedimentos descritos acima, exceto que após 30 minutos da 2ª ICV, os animais receberam injeção de prazosin intravenoso (IV) e o registro da pressão pulsátil permanecia.

No final das sessões experimentais, os animais foram sacrificados através da inalação de dióxido de carbono. O corante Blue Evans foi injetado no VL, através da cânula guia, o que permitiu a verificação de seu posicionamento. Apenas os dados referentes aos animais cujas cânulas estavam localizadas no VL foram analisados.

## VI.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS

GRUPO I – Confirmação da resposta hipotensora decorrente da ativação dos receptores serotoninérgicos 5HT<sub>3</sub> centrais.

A finalidade deste grupo foi confirmar dados prévios do laboratório em que agonistas e antagonistas dos receptores serotoninérgicos 5HT<sub>3</sub> centrais foram injetados no terceiro ventrículo (IIIIV), diferentemente do presente estudo em que as drogas foram administradas no VL. Desta forma, realizou-se ativação dos receptores serotoninérgicos 5HT<sub>3</sub> a partir da administração de seu agonista, mCPBG 160 nmol, no VL de ratos.

GRUPO II – Verificação da especificidade do agonista m-CPBG em ativar os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> gerando resposta hipotensora, através do bloqueio destes receptores com o antagonista seletivo, ondansetrona.

A finalidade deste grupo foi verificar o efeito do bloqueio dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> centrais sobre a resposta cardiovascular. Desta forma, realizou-se o bloqueio destes receptores a partir da administração do seu antagonista, ondansetrona 80 nmol + salina, ondansetrona 80 nmol + mCPBG 160 nmol, no VL dos



animais, comparados a animais controles (salina +salina) ou tratados com mCPBG 160 nmol.

GRUPO III – Verificação do bloqueio dos receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opiatérgicos centrais sobre a pressão sanguínea e frequência cardíaca.

A finalidade deste grupo foi verificar o efeito do bloqueio dos receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opiatérgicos centrais sobre a resposta cardiovascular. Desta forma, realizou-se o bloqueio destes receptores a partir da administração dos antagonistas opioides, naloxona 30 nmol – antagonista opioide inespecífico; nor-BNI 10 nmol - antagonista  $\kappa$  opioide ou naltrindole 1 nmol - antagonista  $\delta$  opioide, no VL dos animais.

GRUPO IV - Estudo do bloqueio dos receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opiatérgicos centrais sobre a resposta hipotensora decorrente da ativação de receptores 5HT<sub>3</sub> centrais.

A finalidade deste grupo foi estudar o bloqueio dos receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opiatérgicos centrais sobre a resposta hipotensora decorrente da ativação de receptores 5HT<sub>3</sub> centrais. Desta forma, realizou-se ativação dos receptores serotoninérgicos 5HT<sub>3</sub> a partir da administração de seu agonista, mCPBG 160 nmol, após pré-tratamento com os antagonistas opioides citados previamente, no VL dos animais.

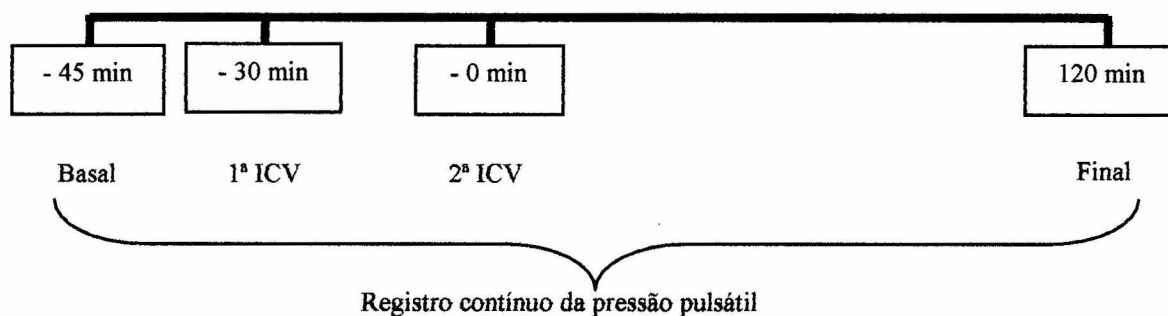
GRUPO V - Estudo da participação simpática na resposta cardiovascular induzida pela ativação do receptor 5HT<sub>3</sub> e bloqueio dos receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opioides.

A finalidade deste grupo foi estudar o bloqueio simpático periférico sobre a resposta de pressão sanguínea e frequência cardíaca decorrente da ativação de receptores 5HT<sub>3</sub> centrais após pré-tratamento com os antagonistas  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opiatérgicos. Desta forma, após repetição dos passos descritos para realização do quarto grupo experimental, realizou-se bloqueio simpático  $\alpha$ -adrenérgico através da administração intravenosa de prazosin 3 mg/mL.

Todos os grupos experimentais foram comparados a grupos controles, com animais que receberam duas microinjeções ICV de solução salina isotônica estéril.

## VI.8 DESENHOS EXPERIMENTAIS

### GRUPOS I, III e IV



**Grupo I A** – 1ª ICV - salina e 2ª ICV – salina

**Grupo I B** – 1ª ICV - salina e 2ª ICV – mCPBG 160 nmol

**Grupo III A** – 1ª ICV – salina e 2ª ICV – salina

**Grupo III B** – 1ª ICV – naloxona 30 nmol e 2ª ICV – salina

**Grupo III C** – 1ª ICV – Nor-BNI 10 nmol e 2ª ICV – salina

**Grupo III D** – 1ª ICV – naltridole 1 nmol e 2ª ICV – salina

**Grupo IV A** – 1ª ICV – salina e 2ª ICV – salina

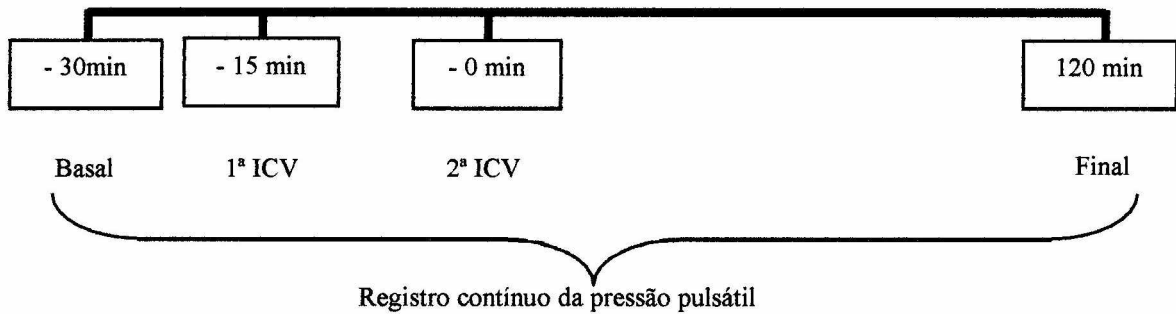
**Grupo IV B** – 1ª ICV – salina e 2ª ICV – mCPBG 160 nmol

**Grupo IV C** – 1ª ICV – naloxone 30 nmol e 2ª ICV – mCPBG 160 nmol

**Grupo IV D** – 1ª ICV – Nor-BNI 10 nmol e 2ª ICV – mCPBG 160 nmol

**Grupo IV E** – 1ª ICV – naltridole 1 nmol e 2ª ICV – mCPBG 160 nmol

## **GRUPO II**



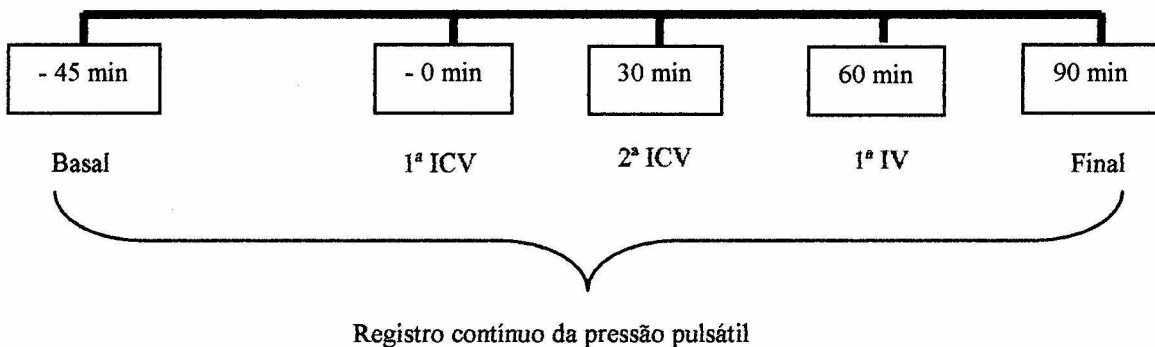
**Grupo II A** – 1ª ICV – salina e 2ª ICV – salina

**Grupo II B** – 1ª ICV – salina e 2ª ICV – mCPBG 160 nmol

**Grupo II C** – 1ª ICV – ondansetrona 80 nmol e 2ª ICV – salina

**Grupo II D** – 1ª ICV – ondansetrona 80 nmol e 2ª ICV – mCPBG 160 nmol

## **GRUPO V**



**Grupo V A** – 1ªICV – salina e 2ªICV – salina

seguido de prazosin 3mg/mL i.v.

**Grupo V B** – 1ªICV – salina e 2ªICV – mCPBG 160 nmol

seguido de prazosin 3mg/mL i.v.

**Grupo V C** – 1ªICV – naloxone 30nmol e 2ªICV–mCPBG 160nmol

seguido de prazosin 3mg/mL i.v.

**Grupo V D** – 1ª ICV – Nor-BNI 10 nmol e 2ª ICV – mCPBG 160 nmol

seguido de prazosin 3mg/mL i.v.

**Grupo V E** – 1ª ICV – naltridole 1 nmol e 2ª ICV – mCPBG 160 nmol

seguido de prazosin 3mg/mL i.v.

## VII RESULTADOS

VII.1 GRUPO EXPERIMENTAL I – Investigar o efeito hipotensor decorrente da ativação dos receptores serotoninérgicos 5HT<sub>3</sub> centrais.

A figura 1 mostra o efeito da administração de mCPBG, agonista dos receptores 5HT<sub>3</sub>, no VL, sobre a PAM (painel A) e FC (painel B).

No painel A, verifica-se que a administração ICV de mCPBG, na dose de 160 nmol, promoveu diminuição significativa da pressão sanguínea ( $p < 0,01$ ), quando comparada com a do grupo controle que recebeu solução salina isotônica, desde os primeiros 5 minutos após a injeção. O valor mínimo de hipotensão alcançado foi de  $-12,12 \pm 1,61$  mmHg no grupo experimental (salina + mCPBG,  $n=5$ ) e de  $2,62 \pm 1,36$  mmHg no grupo controle (salina + salina,  $n=6$ ) aos 25 minutos. A pressão sanguínea se manteve baixa durante todo o período de observação, sendo que PAM nos animais tratados com mCPBG foi de  $-8,91 \pm 0,59$  mmHg e no grupo controle foi de  $1,44 \pm 0,46$  mmHg aos 120 minutos após as injeções ICV.

No painel B, verifica-se que, tanto a administração de solução salina, quanto a de mCPBG, não modificaram a FC de forma significativa até o final de 2 horas de observação. Ressalta-se que no grupo tratado com mCPBG esperava-se aumento reflexo da FC à queda da PAM, entretanto isso não foi observado.

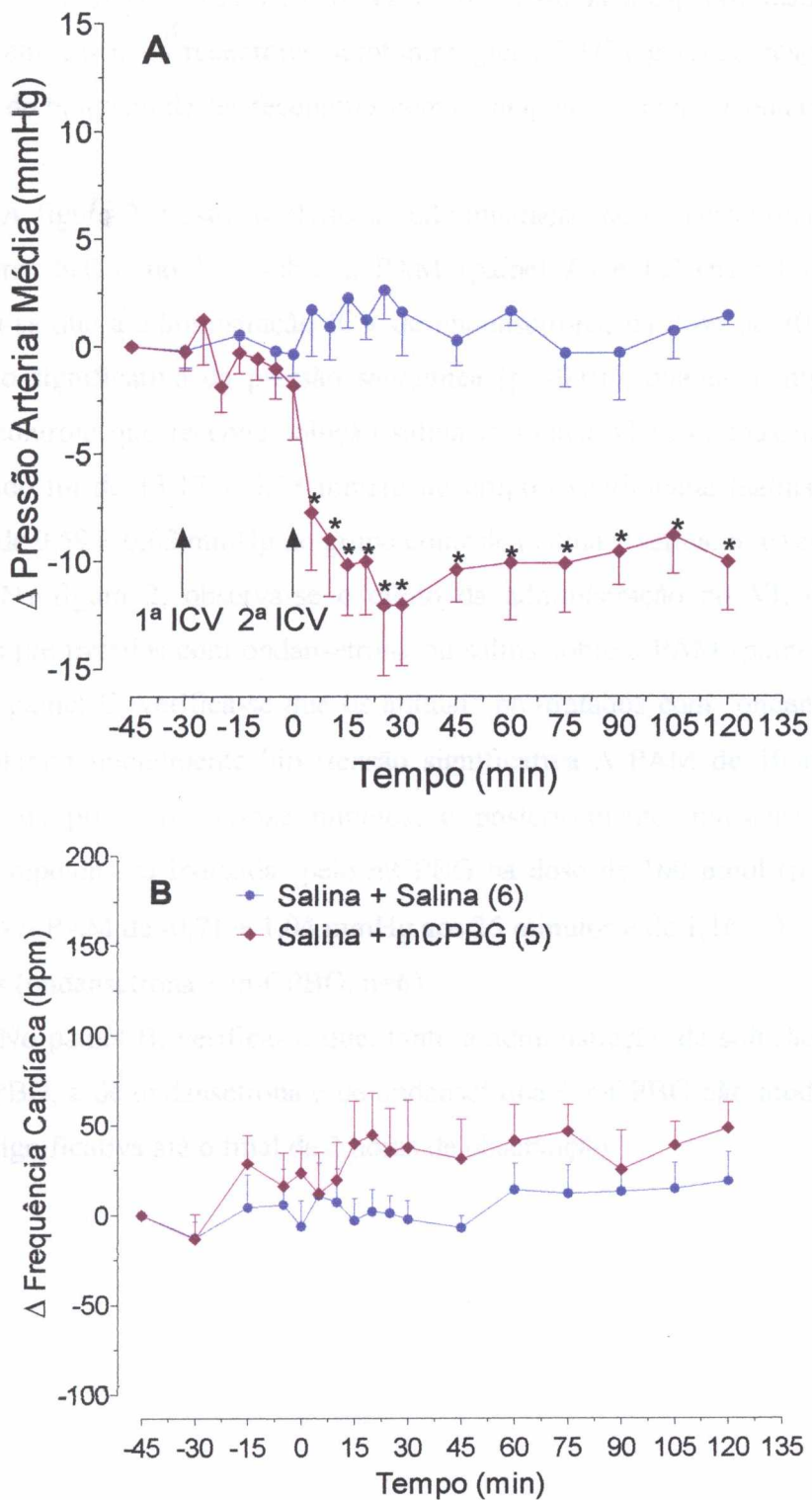


FIGURA 1: Efeito da administração de mCPBG 160 nmol (◆) ou salina 0,9% (●) no ventrículo lateral cerebral (VL) de ratos Wistar, sobre a pressão sanguínea (**painel A**) ou frequência cardíaca (**painel B**). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. As setas indicam as microinjeções com intervalos de 30 min. Entre parênteses está indicado o número de animais em cada grupo. O símbolo \* representa a diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo tratado com salina.

VII.2 GRUPO EXPERIMENTAL II – Estudar a especificidade do agonista m-CPBG em ativar os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> gerando resposta hipotensora, através do bloqueio destes receptores com o antagonista seletivo, ondansetrona.

A figura 2 mostra o efeito da administração de ondansetrona, antagonista dos receptores 5HT<sub>3</sub>, no VL, sobre a PAM (painel A) e FC (painel B). No painel A, verifica-se que a administração ICV de ondansetrona, na dose de 80 nmol, promoveu aumento significativo da pressão sanguínea ( $p < 0,01$ ), quando comparada com a do grupo controle que recebeu solução salina isotônica. O valor máximo de hipertensão alcançado foi de  $13,17 \pm 0,78$  mmHg no grupo experimental (salina + ondansetrona,  $n=6$ ) e de  $0,59 \pm 0,62$  mmHg no grupo controle (salina + salina,  $n=6$ ) aos 120 minutos.

Na figura 2, observa-se o efeito da administração no VL de m-CPBG, em animais pré-tratados com ondansetrona ou salina sobre a PAM (painel C) e FC (painel D). No painel C, verifica-se que os animais pré-tratados com ondansetrona 80 nmol, apresentaram inicialmente hipertensão significativa  $\Delta$  PAM de  $10,47 \pm 0,72$  mmHg durante os primeiros quinze minutos, e posteriormente apresentaram bloqueio da resposta hipotensora induzida pelo mCPBG na dose de 160 nmol ( $p < 0,01$ ), sendo o valor do  $\Delta$  PAM de  $-0,71 \pm 1,04$  mmHg aos 25 minutos e de  $1,16 \pm 1,36$  mmHg aos 120 minutos (ondansetrona + m-CPBG,  $n=6$ ).

No painel B, verifica-se que, tanto a administração de solução salina, quanto a de mCPBG, a de ondansetrona e de ondansetrona + mCPBG não modificaram a FC de forma significativa até o final de 2 horas de observação.

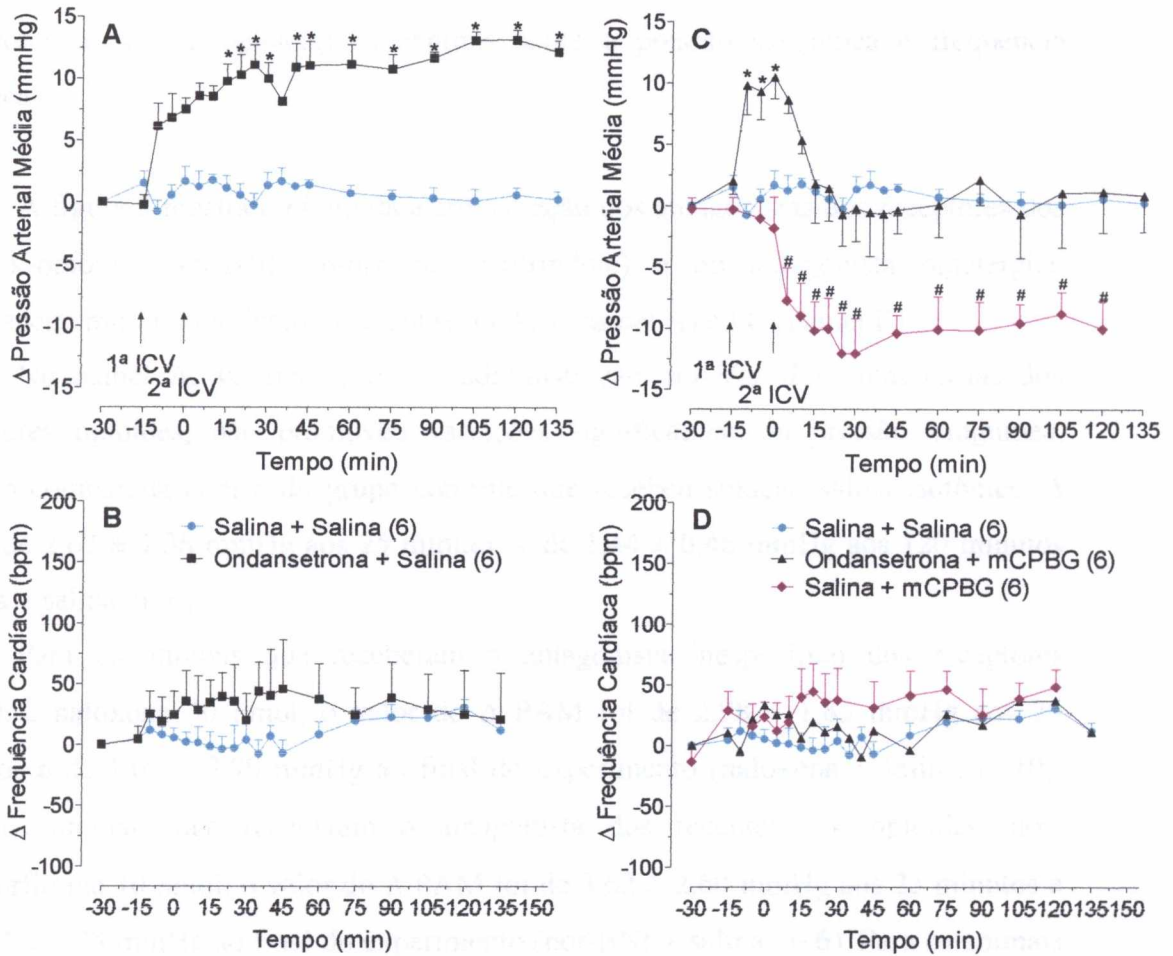


FIGURA 2: Efeito da administração de ondansetrona 80 nmol (■); administração de mCPBG 160 nmol após pré-tratamento com ondansetrona 80 nmol (▲); administração de mCPBG 160 nmol (◆) ou salina 0,9% (●) no ventrículo lateral cerebral (VL) de ratos Wistar, sobre a pressão sanguínea (painéis A e C) ou frequência cardíaca (painéis B e D). Os dados são expressos como média ± EPM. As setas indicam as microinjeções com intervalos de 15 min. Entre parênteses está indicado o número de animais em cada grupo. O símbolo \* representa a diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo tratado com salina. O símbolo # representa a diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo tratado com ondansetrona + mCPBG.

VII.3 GRUPO EXPERIMENTAL III – Verificar o efeito do bloqueio dos receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opiatérgicos centrais sobre a pressão sanguínea e frequência cardíaca.

A figura 3 mostra o efeito da administração dos antagonistas dos receptores dos tipos  $\kappa$ -opioide (nor-BNI),  $\delta$ -opioide (naltrindole) e do antagonista opiatérgico preferencial  $\mu$ -opioide (naloxona) sobre a PAM (painel A) e FC (painel B).

No painel A, verifica-se que a administração, no VL, dos antagonistas dos receptores opioides, não promoveu variações significativas da pressão sanguínea, quando comparada com a do grupo controle que recebeu solução salina isotônica:  $\Delta$  PAM de  $2,62 \pm 1,36$  mmHg aos 25 minutos e de  $1,44 \pm 0,46$  mmHg aos 120 minutos (salina + salina, n=6).

Para os animais que receberam o antagonista inespecífico dos receptores opioides, naloxona 30 nmol, o valor do  $\Delta$  PAM foi de  $2,98 \pm 1,85$  mmHg aos 25 minutos e de  $1,09 \pm 2,90$  mmHg ao final do experimento (naloxona + salina, n=10). Para os animais que receberam o antagonista dos receptores  $\kappa$  opioides, nor-binaltorfimina 10 nmol, o valor do  $\Delta$  PAM foi de  $3,62 \pm 2,60$  mmHg aos 25 minutos e de  $0,01 \pm 3,24$  mmHg ao final do experimento (nor-BNI + salina, n=6). Para os animais que receberam o antagonista dos receptores  $\delta$  opioides, naltrindole 1 nmol, o valor do  $\Delta$  PAM foi de  $1,46 \pm 1,20$  mmHg aos 25 minutos e de  $1,69 \pm 2,30$  mmHg ao final do experimento (naltrindole + salina, n=6).

No painel B, verifica-se que, tanto a administração de solução salina, quanto a dos três antagonistas opiatérgicos utilizados, não modificaram a FC de forma significativa até o final de 2 horas de observação.



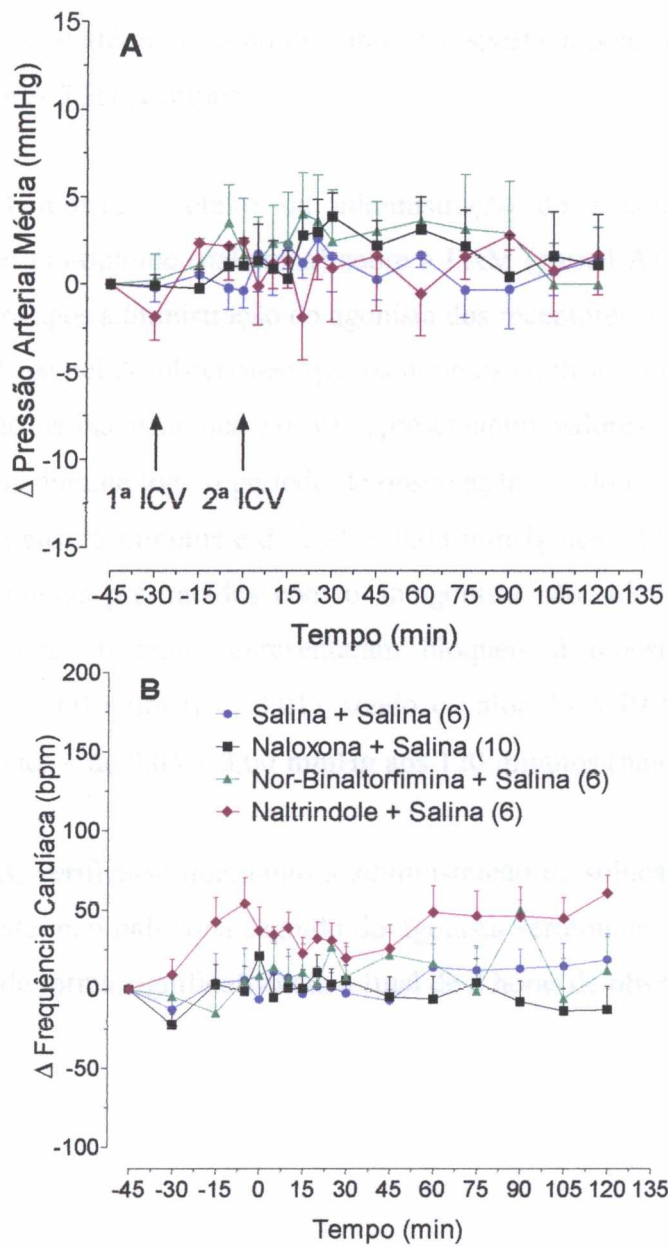


FIGURA 3: Efeito da administração dos antagonistas opioides – naloxona 30 nmol (■) ou nor-binaltorfimina 10 nmol (▲) ou naltrindole 1 nmol (◆) ou salina 0,9% (●) no ventrículo lateral cerebral (VL) de ratos Wistar, sobre a pressão sanguínea (**painel A**) ou frequência cardíaca (**painel B**). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. As setas indicam as microinjeções com intervalos de 30 min. Entre parênteses está indicado o número de animais em cada grupo.

VII.4 GRUPO EXPERIMENTAL IV – Verificar o efeito do bloqueio dos receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opiatérgicos centrais sobre a resposta hipotensora induzida pela ativação de receptores 5-HT<sub>3</sub> centrais.

A figura 4 mostra o efeito da administração do antagonista opiatérgico preferencial do tipo mu-opioide (naloxona) sobre a PAM (painel A) e FC (painel B) à resposta hipotensora após administração do agonista dos receptores 5-HT<sub>3</sub>.

Na figura 4, painel A, observa-se que os animais controles que receberam duas injeções de solução salina isotônica no VL apresentaram valores para PAM que se mantiveram estáveis durante todo o período de observação, sendo o valor do  $\Delta$  PAM de  $0,26 \pm 0,69$  mmHg aos 25 minutos e de  $2,25 \pm 0,03$  mmHg aos 120 minutos (salina + salina, n=6). Os animais pré-tratados com o antagonista não seletivo dos receptores opiatérgicos, naloxona 30 nmol, apresentaram bloqueio à resposta hipotensora do mCPBG na dose de 160 nmol ( $p < 0,01$ ), sendo o valor do  $\Delta$  PAM de  $3,90 \pm 2,81$  mmHg aos 25 minutos e de  $0,05 \pm 3,00$  mmHg aos 120 minutos (naloxona + m-CPBG, n=7).

No painel B, verifica-se que, tanto a administração de solução salina, quanto a do antagonista opiatérgico naloxona seguido do agonista serotoninérgico mCPBG, não modificaram a FC de forma significativa até o final de 2 horas de observação.

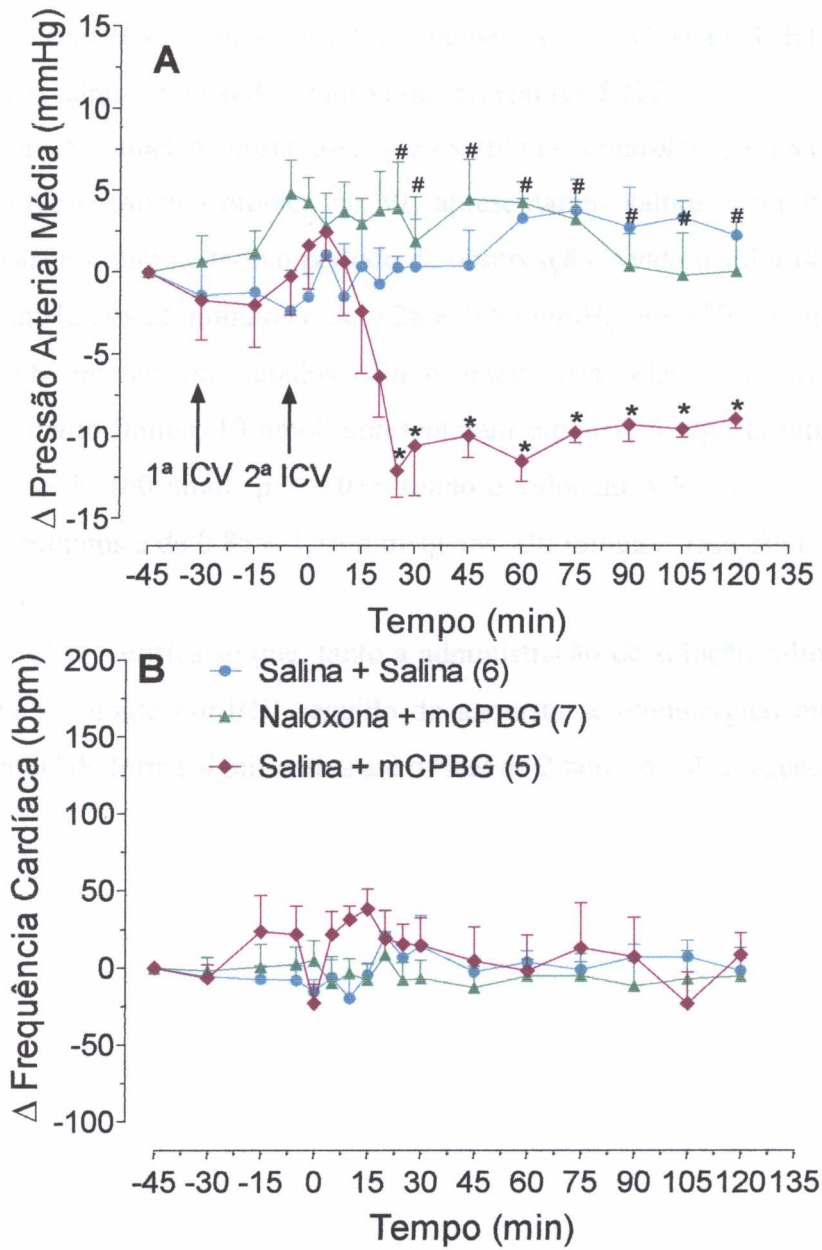


FIGURA 4: Efeito da administração de mCPBG após pré-tratamento com antagonista opioide no ventrículo lateral cerebral (VL) de ratos Wistar. **Painel A** representa efeito sobre a pressão sanguínea após pré-tratamento com naloxona (● = salina 0,9%; ▲ = naloxona 30 nmol + mCPBG 160 nmol; ◆ = mCPBG 160 nmol). **Painel B** representa efeito sobre a frequência cardíaca. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. As setas indicam as microinjeções com intervalos de 30 min. Entre parênteses está indicado o número de animais em cada grupo. O símbolo \* representa a diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo tratado com salina. O símbolo # representa a diferença estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo tratado com salina + mCPBG.

A figura 5 mostra o efeito da administração do antagonista dos receptores do tipo  $\kappa$ -opioide (nor-BNI), sobre a PAM (painel A) e FC (painel B) à resposta hipotensora após administração do agonista dos receptores 5-HT<sub>3</sub>.

Na figura 5, painel A, observa-se que os animais controles que receberam duas injeções de solução salina isotônica no VL apresentaram valores para PAM que se mantiveram estáveis durante todo o período de observação, sendo o valor do  $\Delta$  PAM de  $2,32 \pm 0,68$  mmHg aos 25 minutos e de  $0,28 \pm 0,60$  mmHg aos 120 minutos (salina + salina, n=6). Os animais pré-tratados com o antagonista seletivo dos receptores  $\kappa$ -opioides, nor-binaltorfimina, 10 nmol, apresentaram bloqueio à resposta hipotensora do mCPBG na dose de 160 nmol ( $p < 0,01$ ), sendo o valor do  $\Delta$  PAM de  $- 2,02 \pm 1,46$  mmHg aos 25 minutos e de  $0,85 \pm 1,16$  mmHg aos 120 minutos (nor-BNI + m-CPBG, n=10).

No painel B, verifica-se que, tanto a administração de solução salina, quanto a do antagonista  $\kappa$ -opioide nor-BNI seguido do agonista serotoninérgico mCPBG, não modificaram a FC de forma significativa até o final de 2 horas de observação.

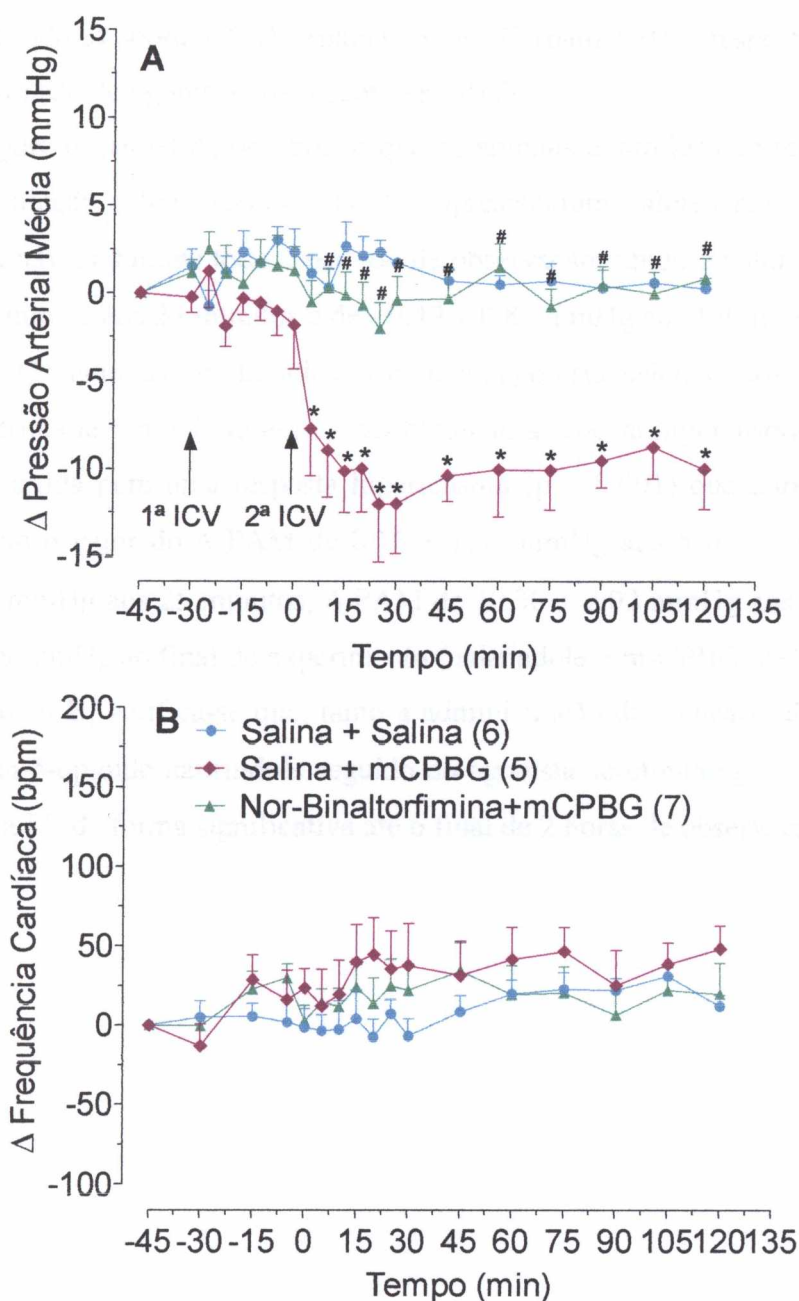


FIGURA 5: Efeito da administração de mCPBG após pré-tratamento com antagonista opioide no ventrículo lateral cerebral (VL) de ratos Wistar. **Painel A** representa o efeito sobre a pressão sanguínea após pré-tratamento com nor-Binaltorfimina (● = salina 0,9%; ▲ = nor-Binaltorfimina 10 nmol + mCPBG 160 nmol; ◆ = mCPBG 160 nmol). **Painel B** representa o efeito sobre a frequência cardíaca. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. As setas indicam as microinjeções com intervalos de 30 min. Entre parênteses está indicado o número de animais em cada grupo. O símbolo \* representa a diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo tratado com salina. O símbolo # representa a diferença estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo tratado com salina + mCPBG.

A figura 6 mostra o efeito da administração do antagonista dos receptores  $\delta$ -opioide (naltrindole) sobre a PAM (painel A) e FC (painel B) à resposta hipotensora após administração do agonista dos receptores 5-HT<sub>3</sub>.

Na figura 6, painel A, observa-se que os animais controles que receberam duas injeções de solução salina isotônica no VL apresentaram valores para PAM que se mantiveram estáveis durante todo o período de observação, sendo o valor do  $\Delta$  PAM de  $-1,70 \pm 1,67$  mmHg aos 25 minutos e de  $-0,49 \pm 0,86$  mmHg aos 120 minutos (salina + salina, n=6). Os animais pré-tratados com o antagonista seletivo dos receptores  $\delta$ -opioides, naltrindole 1 nmol, apresentaram bloqueio à resposta hipotensora do mCPBG, e esta foi revertida para uma resposta hipertensora ( $p < 0,001$ ) que dura cerca de 90 minutos, sendo o valor do  $\Delta$  PAM de  $8,16 \pm 1,81$  mmHg aos 5 minutos;  $\Delta$  PAM de  $10,14 \pm 1,60$  mmHg aos 25 minutos;  $\Delta$  PAM de  $10,30 \pm 2,02$  mmHg aos 75 minutos e de  $2,33 \pm 2,39$  mmHg ao final do experimento (naltrindole + m-CPBG, n=8).

No painel B, verifica-se que, tanto a administração de solução salina, quanto a do antagonista  $\delta$ -opioide naltrindole seguido do agonista serotoninérgico mCPBG, não modificaram a FC de forma significativa até o final de 2 horas de observação.



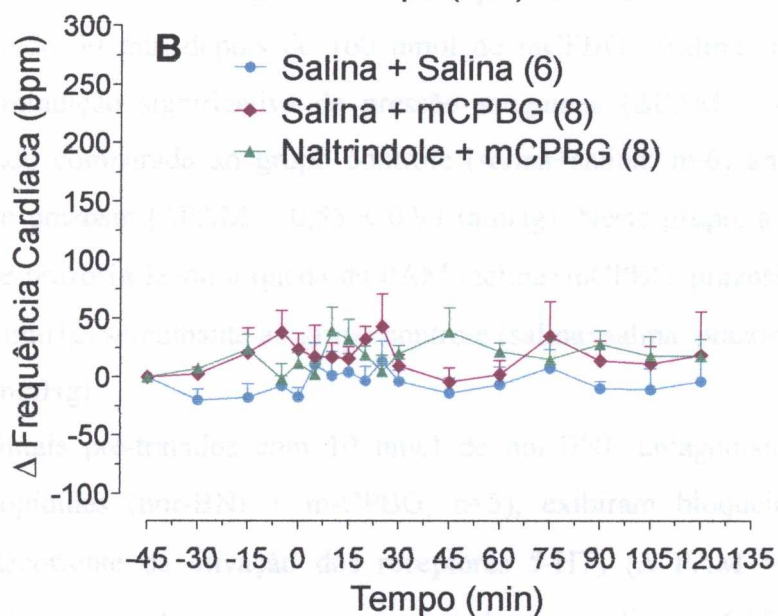
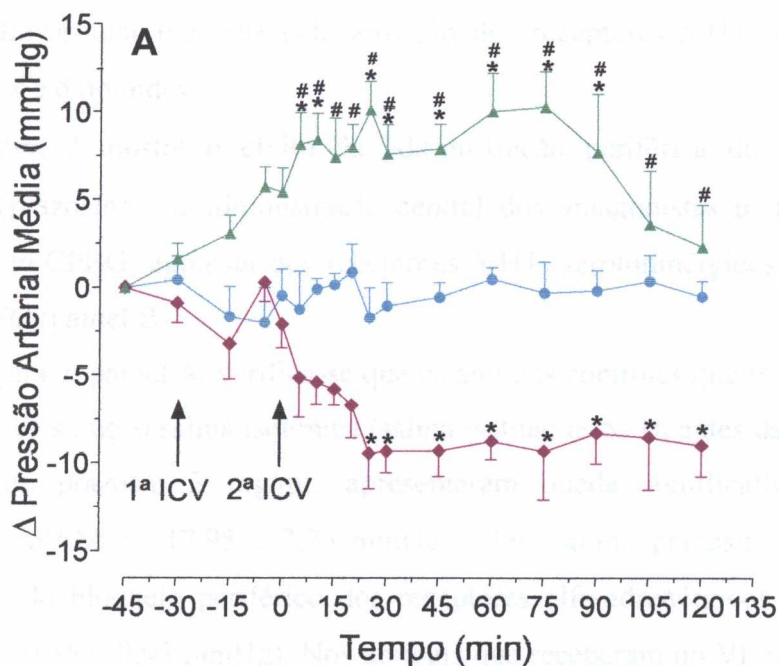


FIGURA 6: Efeito da administração de mCPBG após pré-tratamento com antagonistas opioides no ventrículo lateral cerebral (VL) de ratos Wistar. **Panel A** representa efeito sobre a pressão sanguínea após pré-tratamento com naltrindole (● = salina 0,9%; ▲ = naltrindole 1 nmol + mCPBG 160 nmol; ◆ = mCPBG 160 nmol). **Panel B** representa efeito sobre a frequência cardíaca. Os dados são expressos como média ± EPM. As setas indicam as microinjeções com intervalos de 30 min. Entre parênteses está indicado o número de animais em cada grupo. O símbolo \* representa a diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo tratado com salina. O símbolo # representa a diferença estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo tratado com salina + mCPBG.

VII.5 GRUPO EXPERIMENTAL V - Estudo da participação simpática na resposta cardiovascular induzida pela ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> e bloqueio dos receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opioides.

A figura 7 mostra o efeito da administração periférica do antagonista  $\alpha$ -adrenérgico (prazosin) e a administração central dos antagonistas  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opioides associada ao m-CPBG, agonista dos receptores 5-HT<sub>3</sub> serotoninérgicos, sobre a PAM (painel A) e FC (painel B).

Na figura 7, painel A, verifica-se que os animais controles que receberam no VL duas injeções de solução salina isotônica (salina+salina; n=6) 1h antes da administração endovenosa de prazosin 3 mg/mL apresentaram queda significativa da pressão sanguínea de  $\Delta$ PAM =  $-17,95 \pm 2,33$  mmHg (salina+salina\_prazosin) em relação ao período antes do bloqueio periférico dos receptores alfa-adrenérgicos (salina+salina; n=6;  $\Delta$ PAM =  $0,55 \pm 0,93$  mmHg). Nos animais que receberam no VL a administração de salina seguido 30 min depois de 160 nmol de mCPBG (salina+m-CPBG; n=8) observa-se diminuição significativa da pressão sanguínea ( $\Delta$ PAM =  $-11,05 \pm 1,66$  mmHg), quando comparada ao grupo controle (salina+salina; n=6) antes da injeção endovenosa de prazosin ( $\Delta$ PAM =  $0,55 \pm 0,93$  mmHg). Neste grupo, a administração endovenosa de prazosin levou a queda da PAM (salina+mCPBG\_prazosin;  $\Delta$ PAM =  $-21,24 \pm 3,00$  mmHg) semelhante ao grupo controle (salina+salina\_prazosin;  $\Delta$ PAM =  $-17,95 \pm 2,33$  mmHg).

Os animais pré-tratados com 10 nmol de nor-BNI, antagonista seletivo dos receptores  $\kappa$ -opioides (nor-BNI + m-CPBG, n=5), exibiram bloqueio da resposta hipotensora decorrente da ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> ( $\Delta$  PAM =  $0,64 \pm 1,14$  mmHg), quando comparados com os animais tratados com salina+m-CPBG ( $\Delta$ PAM =  $-11,05 \pm 1,66$  mmHg). O bloqueio alfa-adrenérgico periférico nestes animais levou a queda da pressão sanguínea (nor-BNI+m-CPBG\_prazosin;  $\Delta$ PAM=  $-21,73 \pm 2,22$  mmHg) de intensidade semelhante ao grupo controle submetido ao bloqueio simpático (salina+salina\_prazosin;  $\Delta$ PAM =  $-17,95 \pm 2,33$  mmHg). Quando comparado com o grupo tratado com m-CPBG (salina+mCPBG\_prazosin;  $\Delta$ PAM =  $-21,24 \pm 3,00$  mmHg) verifica-se que em ambos os grupos a hipotensão apresenta a mesma intensidade.

Os animais pré-tratados com 30 nmol de naloxona, antagonista não-seletivo dos receptores opiatérgicos, (naloxona+m-CPBG, n=7), exibiram bloqueio da resposta hipotensora decorrente da ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> ( $\Delta$  PAM =  $0,05 \pm 1,54$



mmHg), quando comparados com os animais tratados com salina+m-CPBG ( $\Delta$ PAM =  $-11,05 \pm 1,66$  mmHg). O bloqueio alfa-adrenérgico periférico nestes animais levou a queda da pressão sanguínea (naloxona+m-CPBG\_prazosin;  $\Delta$ PAM=  $-7,97 \pm 2,75$  mmHg) embora menos acentuada do que o grupo controle (salina+salina\_prazosin;  $\Delta$ PAM =  $-17,95 \pm 2,33$  mmHg). Quando comparado com o grupo tratado com m-CPBG (salina+mCPBG\_prazosin;  $\Delta$ PAM =  $-21,24 \pm 3,00$  mmHg) verifica-se que com bloqueio dos receptores mu-opioide a inibição simpática vascular é menos intensa do que o bloqueio dos receptores kappa-opioide.

Os animais pré-tratados com 1 nmoI de naltrindole, antagonista seletivo dos receptores  $\delta$ -opioides, (naltrindole + m-CPBG, n=6), exibiram hipertensão após ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> ( $\Delta$  PAM =  $9,56 \pm 0,14$  mmHg). O bloqueio alfa-adrenérgico nestes animais levou a queda da pressão sanguínea (naltrindole + m-CPBG\_prazosin,  $-4,78 \pm 1,80$  mmHg), porém menos acentuada que o grupo controle submetido ao bloqueio simpático (salina+salina\_prazosin;  $\Delta$ PAM =  $-17,95 \pm 2,33$  mmHg). Quando comparado com o grupo tratado com m-CPBG (salina+mCPBG\_prazosin;  $\Delta$ PAM =  $-21,24 \pm 3,00$  mmHg) verifica-se que com bloqueio dos receptores delta-opioide a inibição simpática vascular é menos intensa do que o bloqueio dos receptores kappa-opioide.

No painel B, verifica-se que, que não houve alteração significativa da frequência cardíaca em nenhum dos protocolos.

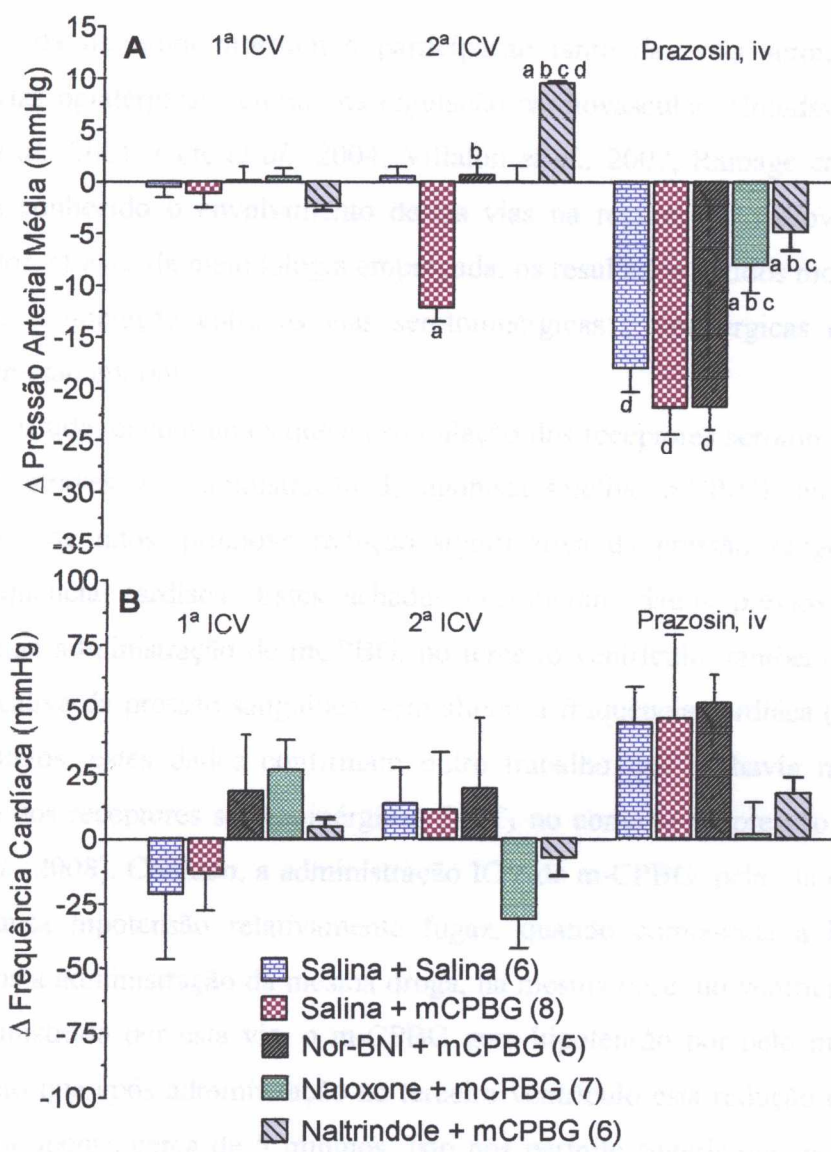


FIGURA 7: Efeito da administração intravenosa de prazosin 3 mg/mL, após microinjeção ICV de antagonistas opioides + mCPBG no ventrículo lateral cerebral (VL) de ratos Wistar, sobre a pressão sanguínea (**painel A**) ou frequência cardíaca (**painel B**). Os dados são expressos como média ± EPM. O intervalo entre as drogas foi de 30 min. Entre parênteses está indicado o número de animais em cada grupo. A letra “a” representa a diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo tratado com salina. A letra “b” representa a diferença estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo tratado com salina + mCPBG. A letra “c” representa a diferença estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo tratado com nor-BNI + mCPBG. A letra “d” representa a diferença estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo tratado com naloxona + mCPBG.

## VIII DISCUSSÃO

Dados da literatura mostram a participação tanto das vias serotoninérgicas, quanto das vias opiatérgicas centrais na regulação cardiovascular (Holaday (b), 1983; Vaccarino *et al.*, 2001; Cotê *et al.*, 2004; Villalón *et al.*, 2007; Ramage *et al.*, 2008). Embora seja conhecido o envolvimento destas vias na regulação cardiovascular, de modo inovador, através da metodologia empregada, os resultados obtidos mostram, pela primeira vez, a interação entre as vias serotoninérgicas e opiatérgicas centrais no controle da pressão arterial.

Neste estudo, encontramos que a estimulação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> centrais, através da administração do agonista seletivo mCPBG, no ventrículo lateral cerebral de ratos, promove redução significativa da pressão sanguínea, sem alterar a frequência cardíaca. Estes achados corroboram dados prévios do nosso laboratório, cuja administração de mCPBG, no terceiro ventrículo, também promoveu queda significativa da pressão sanguínea, sem alterar a frequência cardíaca (Ferreira *et al.*, 2004). Juntos, estes dados confirmam outro trabalho que já havia mostrado o envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> no controle da pressão sanguínea (Ramage *et al.*, 2008). Contudo, a administração ICV de m-CPBG, pela via do terceiro ventrículo, causa hipotensão relativamente fugaz, quando comparada à hipotensão observada após a administração da mesma droga, na mesma dose, no ventrículo lateral. De fato, administrado por esta via, o m-CPBG gera hipotensão por pelo menos duas horas, enquanto que após administração no terceiro ventrículo esta redução da pressão sanguínea dura apenas cerca de 5 minutos. Isto nos permite sugerir que as estruturas atingidas pelo composto, quando administrado diretamente no ventrículo lateral, são capazes de deflagrar e manter redução da pressão sanguínea, enquanto que as estruturas atingidas pelo m-CPBG após a sua administração no terceiro ventrículo não são capazes de induzir redução prolongada deste parâmetro.

Os resultados obtidos com a administração do antagonista dos receptores serotoninérgicos 5HT<sub>3</sub>, ondansetrona, mostram elevação da pressão sanguínea, sem alterar a frequência cardíaca, sugerindo ativação do sistema nervoso simpático com um provável envolvimento deste receptor na regulação da pressão arterial possivelmente através de um tônus simpato-inibitório. Além disso, a ativação destes receptores através

do seu agonista, m-CPBG, induziu resposta hipotensora que mostrou ser inibida pelo antagonista ondansetrona.

Estes resultados corroboram dados prévios de nosso laboratório, que previamente mostraram que a ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> centrais, através da injeção ICV de m-CPBG reduz a pressão arterial, e que o antagonista ondansetrona produz o resultado oposto em ratos acordados. Além disso, dados prévios já haviam mostrado que administração deste agonista em ratos submetidos ao estresse de contenção impediu a resposta hipertensora secundária ao estresse, sugerindo que os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> tenham influência inibitória tônica sobre o controle da pressão arterial (Ferreira *et al* , 2004).

Ademais, dados da literatura mostram que estes receptores medeiam respostas excitatórias através da liberação de glutamato, em áreas como núcleo dorsal do vago e NTS (Wang *et al*, 1998), áreas importantes para regulação cardiovascular e nas quais há presença destes receptores (Ramage & Villalón, 2008).

A barreira hemato-encefálica limita a entrada e saída de substâncias, protegendo desta forma o encéfalo. Apesar da existência desta barreira, muitas substâncias conseguem alcançar o encéfalo, seja através de locais onde esta barreira é deficiente, ou através de artefatos que aumentam a lipossolubilidade de tais compostos à barreira (Witt *et al.*, 2006). Desta forma, a realização de estudos com injeção de drogas nos ventrículos cerebrais permite simular o que pode estar acontecendo, quando da administração periférica de substâncias, que eventualmente atravessam a barreira hemato-encefálica alcançando regiões cerebrais diversificadas. Outra vantagem desta metodologia é poder afastar a interferência dos efeitos periféricos que a administração por via oral ou endovenosa de uma droga poderia ocasionar.

Embora com a metodologia utilizada de injeção de droga no ventrículo cerebral não seja possível definir com precisão quais áreas do sistema nervoso central poderiam estar sendo ativadas para gerar as repostas encontradas, analisando-se a dinâmica da hipotensão observada, pode-se presumir que tal efeito hipotensor, obtido após ativação central dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>, seja consequência da difusão do mCPBG por áreas cerebrais localizadas em regiões prosencefálicas. No entanto, não se deve descartar a possibilidade de difusão da droga para áreas romboencefálicas.

Dados da literatura têm mostrado que a ativação de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> pode promover simpato-excitação ou simpato-inibição, dependendo da região cerebral estudada. No NTS, a ativação destes receptores produz hipertensão decorrente

de simpato-excitação (Nosjean *et al.*, 1995). Por outro lado, dados prévios do nosso laboratório mostram que após a administração do mesmo agonista dos receptores 5-HT<sub>3</sub> no terceiro ventrículo produz hipotensão através de inibição simpática (Ferreira *et al.*, 2004). Dados de outro grupo também tem mostrado que a ativação de receptores serotoninérgicos centrais do tipo 5-HT<sub>1A</sub> pode produzir hipotensão, enquanto a ativação de receptores 5-HT<sub>2</sub> pode levar a hipertensão (Ramage, 2001).

No presente estudo, também verificamos os efeitos cardiovasculares desencadeados pela administração, no ventrículo lateral, dos antagonistas opioides naloxona, nor-binaltorfimina (nor-BNI) e naltrindole. Após administração de naloxona, antagonista não específico, na dose de 30 nmol, não observamos variações significativas da pressão sanguínea e frequência cardíaca. Corroborando nossos resultados, dados da literatura mostram que a administração ICV de naloxona não produz efeitos significantes sobre a pressão sanguínea (Holaday (a), 1983; Frithiof & Rundgren, 2006). Perifericamente, via intravenosa, a administração de naloxona também não produz alterações significantes sobre a pressão sanguínea (Shweta *et al.*, 1999). Contudo, Sun e colaboradores (1996) mostraram que a administração de naloxona no RVLM, PVN e hipocampo produz hipertensão, sendo que quando injetado no RVLM, a hipertensão é acompanhada de taquicardia.

Além disso, verifica-se que a administração de naloxona endovenoso restaura a pressão sanguínea após hipotensão induzida por hemorragia, e este aumento é devido a aumento na contratilidade cardíaca. Verifica-se também que a administração de naloxona aumenta a sobrevivência a distintos tipos de choque em diferentes espécies animais estudadas, por promover uma reversão simpato-inibitória (Feuerstein *et al.*, 1981). Estudos da literatura mostram dados contraditórios a respeito do papel dos receptores do tipo mu-opioides na regulação cardiovascular. Alguns autores mostram que a ativação dos receptores mu-opioides no PVN (Kiritsy-Roy *et al.*, 1986; Bachelard & Pitre, 1995), NTS e núcleo ambíguo (Hassen *et al.*, 1984) leva a hipertensão e aumento da atividade simpática, enquanto outros autores mostram que ativação destes receptores no PVN (Sun *et al.*, 1996), POM (Faden & Feuerstein, 1983), e RVLM (Sun *et al.*, 1996) produzem hipotensão e inibição simpática.

A administração de agentes mu-opioides no VL também leva a respostas contraditórias com aumento da pressão sanguínea (Houdi *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 2003; Hill-Pryour *et al.*, 2006) e diminuição da pressão sanguínea (Rao *et al.*, 2003), estes efeitos parecem depender da dosagem utilizada do agonista DAMGO: enquanto doses



menores parecem mediar hipertensão, doses maiores desta droga parecem promover hipotensão. Contudo, estes resultados contrastam com resultados prévios destes mesmos grupos de pesquisadores (Houdi *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 2003; Hill-Pryour *et al.*, 2006). A existência de tais controvérsias no estudo com opioides pode ser associada a vários fatores, desde a metodologia empregada – modelo animal, estado de alerta, até questões bioquímicas, envolvendo homo e heterodimerização de receptores, além de tempo de estabilidade da droga utilizada e ausência de especificidade de drogas agonistas e antagonistas a seus respectivos receptores.

No presente estudo, também investigamos o papel dos receptores do tipo kappa-opioides no controle da pressão sanguínea. A administração, no VL, de nor-BNI, antagonista seletivo dos receptores do tipo kappa-opioides, na dose de 10 nmol, não leva a variações significativas da pressão sanguínea e frequência cardíaca. Corroborando nossos resultados, dados mostram que a administração ICV de nor-BNI não produz efeitos significantes sobre a pressão sanguínea (Frithiof, 2007). Entretanto, outros estudos mostram que a ativação dos receptores do tipo kappa-opioides, no hipocampo, produz respostas de hipotensão e inibição simpática (Wang & Ingenito, 1992; Shen & Ingenito, 1999; Wright e Ingenito, 2003).

Já a administração de agentes kappa-opioides no VL produz resultados mais consistentes: administração de dinorfina diminui a pressão sanguínea e seu antagonista, nor-binaltorfimina, produz o resultado oposto (Rao *et al.*, 2003).

Outro receptor opioide estudado no presente trabalho foi o tipo delta-opioide. Após administração de naltrindole, antagonista seletivo dos receptores do tipo delta-opioides, na dose de 1 nmol, não observamos variações significativas da pressão sanguínea e frequência cardíaca. Nossos resultados são similares com dados da literatura mostrando que a administração de naltrindole na PAG não produz efeitos significantes sobre a pressão sanguínea (Cavun *et al.*, 2001). Por outro lado, outros estudos mostram que a ativação dos receptores do tipo delta-opioides, no NTS, POM e núcleo ambiguo, produz respostas de hipertensão e aumento da atividade simpática, (Feuerstein *et al.*, 1983; Hassen & Feuerstein, 1984), enquanto outros estudos mostram que a estimulação destes receptores no PVN e hipocampo (Sun *et al.*, 1996), RVLM (Sun *et al.*, 1996), NTS (Feldman *et al.*, 1996) e PAG (Keay *et al.*, 1997) leva a hipotensão e inibição simpática.

Estudando as possíveis interações que o sistema serotoninérgico pode apresentar com outros neurotransmissores, e reconhecendo a existência de uma provável interação

serotoninérgica e opiatérgica em diversos aspectos, tanto em nível anatômico, havendo modulação dos níveis extracelulares de 5-HT em diversas regiões cerebrais após ativação de receptores opioides (Grauer *et al.*, 1992; Yoshioka *et al.*, 1992; Nauli *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 1994, 1998, 2007) bem como interação molecular e funcional, incluindo tratamento com cocaína (D'addario *et al.*, 2007), tratamento de abstinência (Lo *et al.*, 2004), controle da dor (Song *et al.*, 2007; Nozaki & Kamei, 2006; Gao *et al.*, 1998), regulação respiratória (Negri *et al.*, 1998) e regulação cardiovascular (Nauli *et al.*, 2001; Berger & Ramirez, 1988; Goldstein *et al.*, 1987; Lemaire *et al.*, 1978), resolveu-se investigar se tal resposta hipotensora promovida pela ativação serotoninérgica central seria dependente de liberação endógena de opioide e/ou se seria dependente de ativação de receptores opioides localizados em neurônios serotoninérgicos.

Assim, procedeu-se ao bloqueio dos receptores opiatérgicos e subsequente ativação dos receptores serotoninérgicos para conhecer sua participação na resposta hipotensora decorrente da ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>. O efeito hipotensor produzido pela ativação central dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> centrais foi significativamente bloqueado por receptores do tipo mu-opioide e kappa-opioide, enquanto o bloqueio dos receptores do tipo delta-opioides reverteu a resposta hipotensora induzida pela ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> e gerou resposta hipertensora. É possível que nestes resultados, o bloqueio central dos receptores delta opióides tenha promovido resposta hipertensora por ativar outras vias que também induzem à elevação da pressão arterial.

Dados da literatura mostram que o efeito bradicárdico promovido pela ação da cocaína pode ser atenuado através do antagonista opiatérgico naltrindole, embora o bloqueio dos receptores delta opióides não tenha modificado o efeito hipertensivo causado pela cocaína. Os autores do trabalho associam estes efeitos a mecanismos de origem central, visto que foram obtidos apenas quando da administração intracisternal do naltrindole, e não foram visualizados quando da administração endovenosa deste antagonista (Patterson *et al.*, 1997).

Ademais, de acordo com dados da literatura, parece que a ativação dos receptores delta-opioides em regiões como PVN e RVLN leva a hipotensão e bradicardia tanto em ratos normotensos quanto em hipertensos espontâneos (Sun *et al.*, 1996), enquanto na região do POM promove hipertensão e taquicardia em animais

normotensos e hipertensos espontâneos acordados (Feuerstein *et al.*, 1983) ou hipotensão e taquicardia nos animais anestesiados (Faden *et al.*, 1983).

Dados do nosso laboratório mostraram que a ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> centrais evoca uma significativa hipotensão em ratos e o bloqueio destes mesmos receptores resultou num significativo aumento da pressão, mostrando que estes receptores parecem exercer um tônus inibitório sobre a pressão e que esta ação parece ser dependente de um mecanismo simpato-inibitório, sem influências sobre o componente parassimpático (Ferreira *et al.*, 2004). Acreditando que semelhante aos dados prévios obtidos por Ferreira e colaboradores, em 2004, a ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> por administração de mCPBG no VL evoca significativa hipotensão que pode ser mediada por inibição simpática. Considerando ainda que o efeito preponderante da ativação dos receptores opioides centrais é hipotensão mediada provavelmente por tônus parassimpático aumentado e / ou tônus simpático diminuído (Holaday (a), 1983), é possível que o bloqueio farmacológico dos receptores opioides, no presente estudo, tenha impedido a inibição simpática e consequente hipotensão gerada pela ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub>. Ou seja, para que a ativação de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> promova inibição simpática, faz-se necessária a presença de atividade opiatérgica, e quando este componente é retirado através de bloqueio farmacológico mu- e kappa-opioide, a inibição simpática deixa de existir e o tônus basal normotensor prevalece.

Com toda a diversidade de efeitos promovida pela ativação ou pelo bloqueio dos receptores opioides, torna-se difícil tecer conclusões acerca do papel destas vias neurotransmissoras no controle cardiovascular, visto que a variedade de respostas encontradas na literatura não pode ser atribuída somente à diferença na localização dos receptores estudados, pois há dados na literatura de trabalhos que empregaram mesma metodologia, mesma espécie animal, mesmas drogas e doses, mesma área cerebral e mesmo estado de consciência e apresentam resultados controversos, inclusive pelo mesmo grupo de pesquisadores (Rao *et al.*, 2003; Hill-Pryor *et al.*, 2006).

Considerando que antagonistas opioides têm sido utilizados para tentar impedir hipotensão de diversas etiologias: por choques endotóxico, traumático, hemorrágico (Liu *et al.*, 2005; Frithiof *et al.*, 2006 e 2007; Cavun *et al.*, 2001) e também por inibição simpática, acredita-se que a naloxona exerça efeitos terapêuticos em casos de choque por melhorar a função inotrópica (Holaday (a), 1983). Logo, parece claro que o uso de antagonistas opioides para evitar, bloquear ou impedir a hipotensão parece ser uma ferramenta farmacológica útil na prática clínica. Ainda mais, considerando que a



recuperação ao choque através da naloxona não seja dependente de aumento de atividade simpática periférica (Feuerstein *et al.*, 1981), pode-se inferir que está havendo aumento de atividade simpática de origem central. Os dados do presente estudo contribuem com o conhecimento acerca do papel funcional dos receptores opioides centrais no controle cardiovascular.

Com o objetivo de verificar se a ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> centrais leva a hipotensão devido à inibição simpática, procedeu-se ao bloqueio dos receptores alfa-adrenérgicos através da administração endovenosa do antagonista prazosin. Como a hipotensão gerada pelo prazosin nos animais tratados com m-CPBG foi de intensidade semelhante ao dos animais controles (salina+salina) pode-se inferir que a hipotensão induzida pela ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> centrais não se deve apenas a efeito simpático vascular. Entretanto, quando os animais são pré-tratados com Nor-BNI, antagonista dos receptores kappa-opioide, o efeito hipotensor do m-CPBG foi abolido. Estes dados sugerem que o bloqueio dos receptores kappa-opioide ativa o simpático, especialmente no seu componente vascular, impedindo a manifestação do efeito hipotensor observado pela estimulação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> centrais. Esta hipótese foi confirmada quando o bloqueio  $\alpha$ -adrenérgico periférico, nestes animais, levou a queda da pressão semelhante a dos animais controles.

Com o uso da naloxona, seguido do tratamento com prazosin, observamos apenas discreta hipotensão de intensidade intermediária ao valor mínimo alcançado após bloqueio  $\alpha$ -adrenérgico periférico no grupo controle. Embora a naloxona seja antagonista preferencial dos receptores do tipo mu-opioide, também pode bloquear a atividade dos receptores do tipo kappa- e delta-opioide, em altas concentrações, cerca de dez vezes maior do que a necessária para antagonizar receptores do tipo mu-opioide (Sitsapesan & Parratt, 1989, Rabkin, 2007). A dose utilizada neste trabalho tem atividade antagonista em receptores do tipo mu-opioide, contudo não se pode excluir a possibilidade de bloqueio de outros receptores.

Resposta semelhante foi observada com o bloqueio delta-opioide, havendo hipotensão de intensidade intermediária ao valor mínimo alcançado após bloqueio  $\alpha$ -adrenérgico periférico no grupo controle.

Comparando-se as respostas obtidas com os antagonistas naloxona e naltrindole, após bloqueio simpático periférico, percebe-se que em ambos tratamentos, a queda da pressão foi semelhante e de menor intensidade do que o grupo controle, o que sugere

que além do efeito vascular simpático outras vias pressóricas, tais com vasopressina, ou angiotensina, possam estar envolvidas na capacidade destes antagonistas mu- e delta-opioide de impedir a resposta hipotensora induzida pela estimulação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> centrais. Pode-se supor também que além da influência mu- e delta-opioide no sistema simpático, outras vias neurotransmissoras estejam envolvidas nas respostas aqui observadas.

De acordo à nossa hipótese inicial, sendo a ativação serotoninérgica dependente de liberação endógena de opioide, a ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> centrais produziu hipotensão por estimular a atividade de vias opiatérgicas centrais. Mais do que isto, a ausência da atividade funcional dos receptores do tipo mu- e kappa-opioides impediu a inibição simpática promovida pelos receptores 5-HT<sub>3</sub>, de forma que a ativação simpática manteve-se normal e o efeito produzido foi o restabelecimento da pressão sanguínea normal, enquanto a ausência de atividade dos receptores do tipo delta-opioide parece não apenas impedir a inibição simpática promovida pelos receptores 5-HT<sub>3</sub>, mas ainda promoveu hipertensão que parece em parte ser mediada pelo simpático, e pode também ter a participação de algum outro sistema neurotransmissor tais como a angiotensina II ou a vasopressina que geram hipertensão.

Em vista destes resultados encontrados, pode-se sugerir que o sistema nervoso simpático esteja envolvido nas respostas cardiovasculares mediadas pelas vias serotoninérgicas e opiatérgicas, uma vez que houve alteração no padrão das repostas após bloqueio simpático com prazosin. Hassen e colaboradores (1987) já haviam mostrado que as respostas cardiovasculares desencadeadas pela estimulação dos receptores mu opioides no NTS são mediadas por atividade do nervo simpático aumentada e atenuação da função barorreflexa. Além disso, o bloqueio dos receptores do tipo kappa-opioide diminui a hipertensão induzida por angiotensina ICV e altera a sensibilidade do barorreflexo (Rabkin, 2007).

Corroborando dados prévios existentes na literatura (Feuerstein *et al.*, 1981; Holaday (a), 1983; Liu *et al.*, 2005; Frithiof *et al.*, 2006 e 2007; Cavun *et al.*, 2001), antagonistas opioides como naloxona são úteis para impedir hipotensão de etiologias distintas, por promover aumento da atividade simpática, o que foi confirmado neste trabalho. De modo inovador, conseguimos também demonstrar a eficácia de outros antagonistas opioides, como nor-BNI e naltrindole, em impedir a hipotensão por inibição do sistema nervoso simpático. Tais respostas obtidas pelo naloxona e naltrindole, não tendo sido completamente anuladas pelo prazosin, apontam para o

envolvimento de outros fatores, além do sistema nervoso simpático, que podem estar determinando este resultado, mas que não foram objetos do presente estudo.

Os resultados obtidos com o presente trabalho contribuem para a compreensão dos efeitos apresentados na clínica pelos pacientes que fazem uso de drogas agonistas e antagonistas serotoninérgicos, como zofran (ondasetrona), fluoxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina); e opiatérgicos, como morfina, codeína, tramal. O uso de tais drogas promove alterações cardiovasculares diversas, que frequentemente não são associadas ao emprego destas farmacoterapia. Sendo assim, nossos resultados oferecem conhecimento adicional com possível aplicabilidade futura na prática clínica, através da difusão destas recentes descobertas.

Uma informação importante a respeito dos opioides, e que não deve ser negligenciada, é a facilidade com que os receptores opioides podem sofrer dimerização. Diversos trabalhos apontam a ocorrência de heterodimerização entre receptores mu/kappa-opioides (Gavériaux-Ruff *et al.*, 1997), mu/delta-opioides (D'amato & Holaday, 1984; George *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2000, 2002, 2004; Law *et al.*, 2005; Snook *et al.*, 2006; Rozenfeld *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009), e delta/kappa-opioides (Jordan & Devi, 1999; Wang *et al.*, 2005; White *et al.*, 2008). Alguns trabalhos também mostram que tais receptores podem sofrer também homodimerização (Wang *et al.*, 2005, Pascal & Milligan, 2005). Além de sofrer heterodimerização com outros subtipos de receptores opioides, dados da literatura mostram que os receptores opioides também sofrem heterodimerização com receptores de outros neurotransmissores como quimiocina (Chen *et al.*, 2004; Hereld & Jin, 2008), somatostatina (Pfeiffer *et al.*, 2002), substância P (Pfeiffer *et al.*, 2003) e endocanabinóides (Hojo *et al.*, 2008). Tais estudos parecem contribuir para o esclarecimento da diversidade de resultados encontrados na literatura quanto ao uso de drogas agonistas e antagonistas opioides, uma vez que dependendo do estado conformacional do receptor, forma monomérica, dimérica, oligomérica, ou heteromérica, os efeitos obtidos podem variar (Cvejic & Devi, 1997).

Dados da literatura também mostram a existência de homo e heterodimerização entre receptores serotoninérgicos. Os receptores 5-HT<sub>3</sub> são acoplados a canal iônico (Niesler *et al.*, 2008) semelhante aos receptores nicotínicos e GABA<sub>A</sub> (Reeves and Lummis 2002; Peters *et al.* 2005). Foram identificadas 5 subunidades que podem se apresentar dispostas de forma homomérica, e neste caso o receptor é denominado de 5HT<sub>3A</sub>, (Maricq *et al.*, 1991; Miyake *et al.* 1995); ou dispostas de forma heteromérica (subunidades A e B) levando a denominação de 5HT<sub>3AB</sub> (Davies *et al.* 1999). Cada

conformação do receptor mostra diferentes características de condutância do canal iônico, mas apresenta pouca diferença farmacológica em resposta a antagonistas 5HT<sub>3</sub> e à própria serotonina (Reeves and Lummis 2002; Peters et al., 2005). A distribuição dos receptores com suas diversas subunidades tem se mostrado não apenas espécie específica, como também tecido-específica. Em roedores são encontrados apenas os subtipos 5HT<sub>3A</sub> e 5HT<sub>3B</sub>, enquanto em humanos são encontrados todos os subtipos (subunidades C, D, e E) (Karnovsky et al. 2003; Niesler et al. 2003).

Apesar da existência de homo e heterodimerização entre diversos receptores que são acoplados à proteína G, como os receptores serotoninérgicos e opiatérgicos, os resultados encontrados nesta pesquisa utilizando a metodologia clássica de ferramentas farmacológicas para bloquear e ativar receptores isoladamente é válida. Enquanto não houver disponibilidade de drogas específicas para os subtipos de receptores opioides e novas drogas para os homo e heterodímeros formados por estes receptores, e enquanto o entendimento acerca de homo e heterodimerização for limitado, continuarão a existir trabalhos empregando esta metodologia utilizada neste trabalho.

Entretanto, já se pode beneficiar das informações hoje existentes, em trabalhos como o de Jordan e Devi (1999), que afirmando heterodimerização entre receptores kappa- e delta- opioides, mostraram que na forma de heterodímero, o receptor  $\kappa$ - $\delta$ -opioide possui afinidade reduzida por antagonista como a naloxona, que possui afinidades maiores para estes receptores quando expressos sozinhos.

Além disso, não poderia deixar de comentar sobre a ausência de drogas específicas para os receptores opioides. Devido à grande semelhança estrutural que estes receptores apresentam (Wang *et al.*, 1995; Xue *et al.*, 1994), além da possibilidade de sofrer homo e heterodimerização, diversas drogas como a naloxona não possuem especificidade para nenhum dos subtipos de receptores opioides, o que dificulta a observância dos resultados e a relação de causa e efeito entre os receptores e as respostas. Além disso, acredita-se também que altas doses do antagonista naloxona podem torná-lo agonista, uma vez que ele se liga a auto-receptores e estimula a liberação de opioide endógeno (Petty & Reid, 1982).

## IX. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que a estimulação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> produz uma resposta hipotensiva por inibir a atividade simpática através de um mecanismo que parece ser dependente dos receptores dos tipos  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  opioides.

Além disso, os dados sugerem que os receptores do tipo kappa-opioide medeiam a hipotensão gerada pela estimulação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> exclusivamente por inibição simpática. Enquanto os receptores do tipo mu- e delta-opioides parecem inibir não apenas o componente simpático, mas também inibem outras vias neurotransmissoras que estudos futuros poderão esclarecer.

## X. REFERÊNCIAS

1. ADAM, Tanja C.; EPEL, Elissa S.. *Stress, eating and the reward system. **Physiol. Beh.** 91; 2007; 449-458.*
2. BACHELARD, Hélène; PÎTRE, Maryse. *Regional haemodynamic effects of  $\mu$ -,  $\delta$ -, and  $\kappa$ -opioid agonists microinjected into the hypothalamic paraventricular nuclei of conscious, unrestrained rats. **Brit. J. Pharmacol.** 115; 1995; 613-621.*
3. BARNES, J.M.; BARNES, N.M; CHAMPANERIA, S.; COSTALL, B.; NAYLOR, R.J.. *Characterization and autoradiographic localization of the 5-HT<sub>3</sub> receptor recognition sites identified with [<sup>3</sup>H]-(s)-zacopride in the forebrain of the rat. **Neuropharmacol.** 29; 1990; 1037-1045.*
4. BARNES, J.M.; BARNES, N.M; COSTALL, B.; IRONSIDE, J.W.; NAYLOR, R.J.. *Identification and characterization of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> recognition sites in human brain tissue. **J. Neurochem.** 53; 1989; 1787-1793.*
5. BARNES, Maria J.; CATHERINE JEN, K.L.; DUNBAR, Joseph C. *The effects of CNS opioid on autonomic nervous and cardiovascular responses in diet-induced obese rats. **Pept.** 25; 2004; 71-79.*
6. BARNES, Nicholas M.; HALES, Tim G.; LUMMIS, Sarah C.R.; PETERS, John A.. *The 5-HT<sub>3</sub> receptors – the relationship between structure and function. **Neuropharmacol.** 56; 2009; 273-284.*
7. BARNES, Nicholas M.; SHARP, Trevor. *A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmac.** 38; 1999; 1083-1152.*
8. BERGER, Arturo; RAMIREZ, Agustin J. *The central hypotensive effect induced by methionin-enkephalin involves a serotonergic pathway. **J. Hypert.** 6 (suppl 4); 1988; S514-S517.*
9. BERTHOUBE, Magali; AYOUB, Mohammed; RUSSO, Olivier; RIVAIL, Lucie; SICSIC, Sames; FISCHMEISTER, Rodolphe; BERQUE-BESTEL, Isabelle; JOCKERS, Ralf; LEZOUALC'H, Frank. *Constitutive dimerization of human serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptors in living cells. **FEBS Letters.** 579-2005; 2973-2980.*
10. BHARGAVA, Hemendra N.; VILLAR, Vincent M.; RAHMANI, Nafasat H.; LARSEN, A. Karl. *Time course of the distribution of morphine in brain regions and spinal cord after intravenous injection to spontaneously*

- hypertensive and normotensive wistar-kyoto rats. J. Pharmacol. Exp. Therap.* 261; 3; 1992; 1008-1014.
11. BICKNELL, R.J. *Endogenous opioid peptides and hypothalamic neuroendocrine neurons. J. Endocr.* 107; 1985; 437-446.
  12. BODNAR, Richard J. *Endogenous opiates and behavior: 2007. Pept.* XXX; 2008; XXX-XXX.
  13. BODNAR, Richard J.; HADJIMARKOU, Maria M. *Endogenous opiates and behavior: 2002. Pept.* 24; 2003; 1241-1302.
  14. BORROTO-ESCUELA, Dasiel O.; NARVAEZ, Manuel; MARCELLINO, Daniel; PARRADO, Concepción; NARVAEZ, José Angel; TARAKANOV, Alexander O.; AGNATI, Luigi F.; DÍAZ-CABIALE, Zaida; FUXE, Kjell. *Galanin receptor-1 modulates 5-hydroxytryptamine-1<sup>α</sup> signaling via heterodimerization. Biochem Biophys. Res. Com.* 393; 2010; 767-772.
  15. BOYD, J.J.; KUISMA, M.J.; ALASPÄÄ, A.O.; VUORI, E.; REPO, J.V.; RANDELL, T.T. *Recurrent opioid toxicity after pre-hospital care of presumed heroin overdose patients. Acta Anaest. Scand.* 50; 2006; 1266-1270.
  16. BRINK, Thaddeus S.; HELLMAN, Kevin M.; LAMBERT, Aaron M.; MASON, Peggy. *Raphe magnus neurons help protect reactions to visceral pain from interruption by cutaneous pain. J. Neurophysiol.* 96; 2006; 3423-3432.
  17. BRUEHL, Stephen; CHUNG, Ok Yung. *Interactions between the cardiovascular and pain regulatory systems: an updated review of mechanisms and possible alterations in chronic pain. Neurosc. Biobehav. Rev.* 28; 2004; 395-414.
  18. CARRASCO, G.A.; VAN de KAR, L.. *Neuroendocrine pharmacology of stress. Eur. J. Pharmacol.* 463; 2003; 235-272.
  19. CAVUN, Sinan; RESCH, Garth E.; EVEG, Adam D.; RAPACON-BAKER, Michelle M.; MILLINGTON, William R. *Blockade of delta opioid receptors in the ventrolateral periaqueductal gray region inhibits the fall in arterial pressure evoked by hemorrhage. J. Pharmac. Exp. Ther.* 297; 2; 2001; 612-619.
  20. CHAMEAU, Pascal; VAN HOOFT, Johannes A. *Serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptors in the central nervous system. Cell Tissue Res.* 326; 2006; 573-581.



21. CHEN, Chongguang; LI, Jin; BOT, George; SZABO, Imre; ROGERS, Thomas J.; LIU-CHEN, Lee-Yuan. *Heterodimerization and cross-desensitization between the  $\mu$ -opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor.* ***Eur. J. Pharmacol.*** 483; 2004; 175-186.
22. CHU, Larry F.; LIANG, De-Yong; LI, Xiangqi; SAHBAIE, Peyman; D'ARCY, Nicole; LIAO, Guochun; PELTZ, Gary; CLARK, J. David. *From mouse to man: the 5-HT<sub>3</sub> receptor modulates physical dependence on opioid narcotics.* ***Pharmacogen. Genom.*** 19; 3; 2009; 193-205.
23. CÔTÉ, Francine; FLIGNY, Cécile; FROMES, Yves; MALLET, Jacques; VODJDANI, Guilan. *Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function.* ***Trends Molec. Med.*** 10; 5; 2004; 232-238.
24. CVEJIC, Svetlana; DEVI, Lakshmi A. *Dimerization of the  $\delta$  Opioid receptor: implication for a role in receptor internalization.* ***J. Biol. Chem.*** 272; 43; 1997; 26959-26964.
25. DAMPNEY, R.A.L. *Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system.* ***Phys. Rev.*** 74; 2; 1994; 323-363.
26. DAMPNEY, R.A.L.; COLEMAN, M.J.; FONTES, M.A.P.; HIROOKA, Y.; HORIUCHI, J.; LI, Y-W; POLSON, J.W.; POTTS, P.D.; TAGAWA, T.. *Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system.* ***Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*** 29; 2002; 261-268.
27. DAVIES, P.A.; PISTIS, M.; HANNA, M.C.; PETERS, J.A.; LAMBERT, J.J.; HALES, T.G.; KIRKNESS, E.F.. *The 5-HT<sub>3B</sub> subunit is a major determinant of serotonin receptor function.* ***Nature.*** 397; 1999; 359-363.
28. D'ADDARIO, C.; BENEDETTO, M.Di; IZENWASSER, S.; CANDELETTI, S.; ROMUALDI, P.. *Role of serotonin in the regulation of the dynorphinergic system by a  $\kappa$ -opioid agonist and cocaine treatment in rat CNS.* ***Neurosci.*** 144; 2007; 157-164.
29. D'AMATO, Robert; HOLADAY, John W. *Multiple opioid receptors in endotoxic shock: evidence for  $\delta$  involvement and  $\mu$ - $\delta$  interactions in vivo.* ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*** 81; 1984; 2898-2901.
30. DROLET, Guy; DUMONT, Éric C.; GOSSELIN, Isabelle; KINKEAD, Richard; LAFOREST, Sylvie; TROTTIER, Jean-François. *Role of*



- endogenous opioid system in the regulation of the stress response. Prog. Neuro-Psychopharmac. Biol. Psych.* 25; 2001; 729-741.
31. EVANS, Roger G.; MALPAS, Simon C.; OSBORN, John W.; FINK, Gregory D.. *Neural, hormonal and renal interactions in long-term blood pressure control. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32; 2005; 372-373.
  32. FADEN, Alan I.; FEUERSTEIN, Giora. *Hypothalamic regulation of the cardiovascular and respiratory systems: role of specific opiate receptors. Brit. J. Pharmac.* 79; 1983; 997-1002.
  33. FELDMAN, Peter D.; PARVEEN, Nibras; SEZEN, Sena. *Cardiovascular effects of Leu-enkephalin in the nucleus tractus solitaries of the rat. Brain Res.* 709; 1996; 331-336.
  34. FERREIRA, Hilda S.; OLIVEIRA, Elenilda; FAUSTINO, Thiallan N.; CASTRO-E-SILVA, Emilio de; FREGONEZE, Josmara B. *Effect of the activation of central 5-HT<sub>2C</sub> receptors by the 5-HT<sub>2C</sub> agonist mCPP on blood pressure and heart rate in rats. Brain Res.* 1040; 2005; 64-72.
  35. FERREIRA, Hilda S.; CASTRO-E-SILVA, Emilio de; COINTEIRO, Carla; OLIVEIRA, Elenilda; FAUSTINO, Thiallan N.; FREGONEZE, Josmara B. *Role of central 5-HT<sub>3</sub> receptors in the control of blood pressure in stressed and non-stressed rats. Brain Res.* 1028; 2004; 48-58.
  36. FEUERSTEIN, Giora; CHIUEH, Chuang C.; KOPIN, Irwin J. *Effect of Naloxone on the cardiovascular and sympathetic response to hypovolemic hypotension in the rat. Eur. J. Pharmac.* 75; 1981; 65-69.
  37. FEUERSTEIN, Giora; SIRÉN, Anna-Leena. *The opioid peptides. A role in hypertension? Hypert.* 9; 6 1987; 561-565.
  38. FEUERSTEIN, Giora; SIRÉN, Anna-Leena. *The opioid system in cardiac and vascular regulation of normal and hypertensive states. Circul.* 75(suppl I); 1987; I-12-I-129.
  39. FEUERSTEIN, Giora; ZERBE, Robert L.; FADEN, Alan I. *Opiate receptors and cardiovascular control in conscious SHR and WKY rats. Hypert.* 5; 1983; 663-671.
  40. FRITHIOF, R.; RUNDGREN, M. *Activation of central opioid receptors determines the timing of hypotension during acute hemorrhage-induced hypovolemia in conscious sheep. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291; 2006; R987-R996.

41. FRITHIOF, R.; ERIKSSON, S.; RUNDGREN, M. *Central inhibition of Opioid receptor subtypes and its effect on haemorrhagic hypotension in conscious sheep. Acta Physiol.* 191; 2007; 25-34.
42. FUNAHASI, M.; MITOH, Y.; MATSUO, R.. *Activation of presynaptic 5-HT<sub>3</sub> receptors facilitates glutamatergic synaptic inputs to area prostroma neurons in rat brain slices. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 26; 2004; 615-622.
43. GAO, Keming; CHEN, David O.; GENZEN, Jonathan R.; MASON, Peggy. *Activation of serotonergic neurons in the raphe magnus is not necessary for morphine analgesia. J. Neurosci.* 18; 5; 1998; 1860-1868.
44. GAVÉRIAUX-RUFF, Claire; PELUSO, Jean; BEFORT, Katia; SIMONIN, Frédéric; ZILLIOX, Christelle; KIFFER, Brigitte L.. *Detection of opioid receptor mRNA by RT-PCR reveals alternative splicing for the delta- and kappa-opioid receptors. Mol. Brain Res.* 48;1997; 298-304.
45. GAZYAKAN, E.; HENNEGRIFF, M.; HAAF, A. *Characterization of opioid receptor types modulating acetylcholine release in septal regions of the rat brain. Naun. Schm. Arch. Pharmacol.* 362; 2000; 32-40.
46. GEORGE, Susan R.; ZASTAWNY, Roman L.; BRIONES-URBINA, Rosario; CHENG, Regina; NGUYEN, Tuan; HEIBER, Michael; KOUVELAS, Angeliki; CHAN, Audrey S.; O'DOWD, Brian F.. *Distinct distributions of mu, delta and kappa opioid receptor mRNA in rat brain. Biochem. Biophysical Res. Com.* 205; 2; 1994; 1438-1444.
47. GEORGE, Susan R.; FAN, Theresa; XIE, Zhidong; TSE, Roderick; TAM, Vincent; VARGHESE, George; O'DOWD, Brian. *Oligomerization of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptor. Generation of novel functional properties. J. Biol. Chem.* 275; 34; 2000; 26128-26135.
48. GERSHON, M.D.. *Review article: serotonin receptors and transporters – roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. Alim. Pharmacol.* 13; 1999; 15-30.
49. GLAUM, S.R.; BROOKES, P.A.; SPYER, K.M.; MILLER, R.J.. *5-hydroxytryptamine-3 receptors modulate synaptic activity in the rat nucleus tractus solitaries in vitro. Brain Res.* 589; 1992; 62-68.
50. GOLDBERG, Ira E.; ROSSI, Grace C.; LETCHWORTH, Sharon R.; MATHIS, John P.; RYAN-MORO, Jennifer; LEVENTHAL, Liza; SU,

- Wendy; EMMEL, David; BOLAN, Elizabeth A.; PASTERNAK, GAVRIL, W.. *Pharmacological characterization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mouse brain. J. Pharmac. Exp. Therap.* 286; 2; 1998; 1007–1013.
51. GOLDSTEIN, Daniel J.; KULAKOWSKI, Elliott C.; ROPCHAK, Thomas G.; BROWN, Phyllis; KEISER, Harry R.. *Naloxone reverses the serotonin dependent hypotensive action of CGP 6085 A. Life Sci.* 41; 1987; 1369-1373.
52. GOMES, Ivone; GUPTA, Achla; FILIPOVSKA, Julija; SZETO, Hazel H.; PINTAR, John E.; DEVI, Lakshmi A.. *A role for heterodimerization of  $\mu$  and  $\delta$  opiate receptors in enhancing morphine analgesia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA;* 101; 14; 2004; 5135-5139.
53. GOMES, I.; JORDAN, B.A.; GUPTA, A.; TRAPAIÐZE, N.; NAGY, V.; DEVI, L.A.. *Heterodimerization of  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors: a role in opiate synergy. J. Neurosci.* 20; RC 110; 2000; 1-5.
54. GOMES, Ivone; FILIPOVSKA, Julija; JORDAN, Bryen A.; DEVI, Lakshmi A.. *Oligomerization of opioid receptors. Methods* 27; 2002; 358-365.
55. GRAEFF, F.G.. *Role of 5-HT in defensive behavior e anxiety. Rev. Neurosci.* 4; 1993; 181-211.
56. GRAUER, Steven M.; TAO, Rui; AUERBACH, Sidney B. *Morphine induces an increase in extracellular serotonin in the rat diencephalon. Brain Res.* 599; 1992; 277-282.
57. GRAY, T.S.. *Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to stress. Ann. NY Acad Sci.* 697; 1993; 53-60.
58. GUYENET, Patrice G.. *The sympathetic control of blood pressure. Nature Rev. Neurosci.* 7; 2006; 335-346.
59. HAMURTEKIN, Emre; BAGDAS, Deniz; GURUN, M. Sibel. *Possible involvement of supraspinal opioid and GABA receptors in CDP-choline-induced antinociception in acute pain models in rats. Neurosci. Let.* 420; 2007; 116-121.
60. HASSEN, A.H.; FEUERSTEIN, G.  *$\mu$ -Opioid receptors in NTS elicit pressor responses via sympathetic pathways. Am. J. Physiol.* 252; 1987; H156-H162.

61. HASSEN, A.H.; FEUERSTEIN, G.; FADEN, A.I. *Kappa opioid receptors modulate cardiorespiratory function in hindbrain nuclei of rat.* **J. Neurosci.** 4; 9; 1984; 2213-2221.
62. HERELD, Dale; JIN, Tian. *Slamming the DOR on chemokine receptor signaling: heterodimerization silences ligand-occupied CXCR4 and  $\delta$ -opioid receptors.* **Eur. J. Immunol.** 38; 2008; 334-337.
63. HILL-PRYOR, Crystal; LINDSEY, DaShawnda; LAPANOWSKI, Karen; DUNBAR, Joseph C.. *The cardiovascular responses to mu opioid agonist and antagonist in conscious normal and obese rats.* **Pept.** 27; 2006; 1520-1526.
64. HIROTA, Kazuyoshi; SIKAND, Kulvinder S.; LAMBERT, David G.. *Interaction of ketamine with  $\mu_2$  opioid receptors in SH-SY5Y HUMAN neuroblastoma cells.* **J. Anesth.** 13; 1999; 107-109.
65. HOJO, Minoru; SUDO, Yuka; ANDO, Yuko; MINAMI, Koichiro; TAKADA, Masafumi; MATSUBARA, Takehiro; KANAIDE, Masato; TANIYAMA, Kohtarō; SUMIKAWA, Koji; UEZONO, Yasuhito.  *$\mu$ -opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid  $CB_1$  receptor: electrophysiological and FRET assay analysis.* **J. Pharmacol. Sci.** 108; 2008; 308-319.
66. HOLADAY, John W. *Cardiovascular consequences of endogenous opiate antagonism.* **Biochem. Pharmacol.** 32; 4; 1983a; 573-585.
67. HOLADAY, John W. *Cardiovascular effects of endogenous opiate systems.* **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 23; 1983b; 541-594.
68. HOLBROOK, Joanna D.; GILL, Catherine H.; ZEBDA, Nouredine; SPENCER, Jon P.; LEYLAND, Rebecca; RANCE, Kim H.; TRINH, Han; BALMER, Gemma; KELLY, Fiona M.; YUSAF, Shahnaz P.; COURTENAY, Nicola; LUCK, Jane; RHODES, Andrew; MODHA, Sundip; MOORE, Stephen E.; SANGER, Garteh J.; GUNTHORPE, Martin J.. *Characterization of 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub> and 5-HT<sub>3E</sub> receptors subunits: evolution, distribution and function.* **J. Neurochem.** 108; 2009; 384-396.
69. HORVATH, Gyöngyi. *Endomorphin-1 and endomorphin-2: pharmacology of the selective endogenous  $\mu$ -opioid receptor agonists.* **Pharmac. Ther.** 88; 2000; 437-463.

70. HOUDI, Abdulghani A.; *et al.* *Effects of  $\beta$ -FNA on sympathoadrenal cardiovascular, and analgesic responses to DAMPGO at rest and during stress.* **Pharmac. Biochem. Behav.** 53; 4; 1996; 927-933.
71. HOYER, D.; HANNO, J.P.; MARTIN, G.R.. *Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors.* **Pharmacol. Biochem. Beh.** 71; 2002; 533-554.
72. JACOBS, B.L.; AZMITIA, E.C. *Structure and function of the brain serotonin system.* **Physiological Review.** 2:165-229, 1992.
73. JAMES, Iain F.; GOLDSTEIN, Avram. *Site-directed alkylation of multiple opioid receptors. I. Binding selectivity.* **Mol. Pharmacol.** 25; 1984; 337-342.
74. JEGGO, R.D.; KELLETT, D.O.; WANG, Y.; RAMAGE, A.G.; JORDAN, D.. *The role of central 5-HT<sub>3</sub> receptors in vagal reflex inputs to neurons in the nucleus tractus solitaries of anaesthetized rats.* **J. Physiol.** 566; 2005; 939-953.
75. JEGGO, R.D.; WANG, Y.; JORDAN, D.; RAMAGE, A.G.. *Activation of 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors in the rat nucleus tractus solitaries: opposing action on neurons that receive an excitatory vagal C-fibre afferent input.* **Br. J. Pharmacol.** 150; 2007; 987-995.
76. JENSEN, A.A.; DAVIES, P.A.; BRÄUNER-OSBORNE, H.; KRZYWKOWSKI, K.. *3B but which 3B? And that's just one of the questions: the heterogeneity of human 5-HT<sub>3</sub> receptors.* **Trends. Pharmacol. Sci.** 29; 9; 2008; 437-444.
77. JOLAS, T.; NESTLER, E.J.; AGHAJANIAN, G.K. *Chronic morphine increases GABA tone on serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus: association with an up-regulation of the cyclic AMP pathway.* **Neurosc.** 95; 2; 2000; 433-443.
78. JORDAN, Bryen A.; DEVI, Lakshmi, A.. *G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function.* **Nature.** 399; 1999; 697-700.
79. KARNOVSKY, A.M.; GOTOW, L.F.; MCKINLEY, D.D.; PIECHAN, J.L.; RUBLE, C.L.; MILLS, C.J.; SCHELLIN, K.A.; SLIGHTOM, J.L.; FITZGERALD, L.R.; BENJAMIM, C.W.; ROBERDS, S.L.. *A cluster of novel serotonin receptor 3-like genes on human chromosome 3.* **Gene.** 319; 2003; 137-148.

80. KEAY, Kevin A.; CROWFOOT, Laura J.; FLOYD, Nicole S.; HENDERSON, Luke A.; CHRISTIE, MacDonald J.; BANDLER, Richard. *Cardiovascular effects of microinjections of opioid agonists into the 'depressor region' of the ventrolateral periaqueductal gray region.* **Brain Res.** 762; 1997; 61-71.
81. KIEFFER, Brigitte L.; BEFORT, Katia; GAVERIAUX-RUFF, Claire; HIRTH, Christian. *The delta-opioid receptor: Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization.* **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 89; 1992; 12048-12052.
82. KIRITSY-ROY, Judith A.; APPEL, Nathan M.; BOBBITT, Frances G.; VAN LOON, Glen R.. *Effects of mu-opioid receptor stimulation in the hypothalamic paraventricular nucleus on basal and stress-induced catecholamine secretion and cardiovascular responses.* **J. Pharmac. Exp. Ther.** 239; 3; 1986; 814-822.
83. KRAYCHETE, Durval. Opioides. In: **Farmacologia**. 7ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006.
84. JONES, D.N.; BARNES, N.M.; COSTALL, B.; DOMENEY, A.M.; KILPATRICK, G.J.; NAYLOR, R.J.; TYERS, M.B.. *The distribution of 5-HT<sub>3</sub> recognition sites in the marmoset brain.* **Eur. J. Pharmacol.** 215; 1992; 63-67.
85. LAW, Ping-Yee; ERICKSON-HERBRANDSON, Laurie J.; ZHA, Qin Q.; SOLBERG, Jon; CHU, Ji; SARRE, Aili; LOH, Horace H.. *Heterodimerization of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors occurs at the cell surface only and requires receptor-G protein interactions.* **J Biol. Chem.** 280; 12; 2005; 11152-11164.
86. LAZARUS, Lawrence H.; BRYANT, Sharon D.; SALVADORI, Severo; ATTILA, Martti; JONES, Leslie Sargent. *Opioid infidelity: novel opioid peptides with dual high affinity for  $\delta$ - and  $\mu$ -receptors.* **Trends Neurosc.** 19; 1996; 31-35.
87. LEGAY, C.; TERNAUX, J.P.. *Regulatory aspects of 5-HT biosynthesis in the intestinal tracts of the rat.* **Scand J. Gastroent. Suppl.** 71; 1982; 167.

88. LEMAIRE, Irma; TSENG, Richard; LEMAIRE, Simon. *Systemic administration of  $\beta$ -endorphin: potent hypotensive effect involving a serotonergic pathway.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 75; 12; 1978; 6240-6242.
89. LESSARD, Andrée; BACHELARD, Hélène. *Tonic inhibitory control exerted by opioid peptides in the paraventricular nuclei of the hypothalamus on regional hemodynamic activity in rats.* **Brit. J. Pharmac.** 136; 2002; 753-763.
90. LI, Shuixing; ZHU, Jinmin; CHEN, Chongguang; CHEN, Yung-Wu; DERIEL, J. Kim; ASHBY, Barrie; LIU-CHEN, Lee-Yuan. *Molecular cloning and expression of a rat  $\kappa$  opioid receptor.* **Biochem. J.** 295; 1993; 629-633.
91. LIN, Lieh-Sheng; LIN, Mao-Tsun. *Hypothalamic serotonin release and raised blood pressure after raphe nuclei stimulation in rats.* **Brain Res Bull.** 39; 5; 1996; 305-309.
92. LIU, Liang-ming; HU, De-yao; PAN, Xue-kun; LU, Ru-quan; DAN, Fei-jun. *Subclass opioid receptors associated with the cardiovascular depression after traumatic shock and the antishock effects of its specific receptor antagonists.* **Shock.** 24; 5; 2005; 470-475.
93. LIU, Xin; KAI, Ming; JIN, Lian; WANG, Rui. *Computational study of the heterodimerization between  $\mu$  and  $\delta$  receptors.* **J. Comput. Aided Mol. Des.** 2009
94. LO, W. Caroline; JACKSON, Elizabeth; MERRIMAN, Andrew; HARRIS, John; CLARKE, Rob W.. *5-HT receptors involved in opioid-activated descending inhibition of spinal withdrawal reflexes in the decerebrated rabbit.* **Pain** 109; 2007; 162-171.
95. MANDAL, A.K.; KELLAR, K.J.; NORMAN, W.P.; GILLIS, R.A.. *Stimulation of serotonin<sub>2</sub> receptors in the ventrolateral medulla of the cat results in uniform increases in sympathetic outflow.* **Circul. Res.** 67; 1990; 1267-1280.
96. MANSOUR, Alfred; FOX, Charles A.; AKIL, Huda; WATSON, Stanley J.. *Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications.* **Trends Neurosci.** 18; 1995; 22-29.



97. MARICQ, A.V.; PETERSON, A.S.; BRAKE, A.J.; MYERS, R.M.; JULIUS, D.. *Primary structure and functional expression of the 5-HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gated ion channel. **Science.** 254; 1991; 432-437.*
98. MATSUMURA, Kiyoshi; ABE, Isao; TOMINAGA, Mitsuhiro; TSUCHIHASHI, Takuya; KOBAYASHI, Kazuo; FUJISHIMA, Masatoshi. *Differential modulation by  $\mu$ - and  $\delta$ -opioids on baroreceptor reflex in conscious rabbits. **Hypert.** 19; 1992; 648-652.*
99. McCALL, Robert B.; CLEMENT, Mark E. *Role of serotonin<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2</sub> receptors in the central regulation of the cardiovascular system. **Pharmacol. Rev.** 46; 3; 1994; 231-243.*
100. MIQUEL, M-C.; EMERIT, M.B.; NOSJEAN, A.; SIMON, A.; RUMAJOGEE, P.; BRISORGUEIL, M.J.; DOUCET, E.; HAMON, M.; VERGÉ, D.. *Differential subcellular localization of the 5-HT<sub>3</sub>-As receptor subunit in the rat central nervous system. **Eur. J. Neurosci.** 15; 2002; 449-457.*
101. MIYAKE, A.; MOCHIZUKI, S.; TAKEMOTO, Y.; AKUSAWA, S.. *Molecular cloning of human 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor: heterogeneity in distribution and function among species. **Mol. Pharmacol.** 48; 1995; 407-416.*
102. MORALES, M.; BLOOM, F.E.. *The 5-HT<sub>3</sub> receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. **J. Neurosci.** 17; 1997; 3157-3167.*
103. MORALES, M.; WANG, S.D.. *Differential composition of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors synthesized in the rat CNS and peripheral nervous system. **J. Neurosci.** 22; 2002; 6732-6741.*
104. MOTZER, Sandra Adams; HERTIG, Vicky. *Stress, stress response, and health. **Nurs. Clin. N. Am.** 39; 2004; 1-17.*
105. NAGASAKA, Hiroshi; YAKSH, Tony L. *Effects of intrathecal  $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$  agonists on thermally evoked cardiovascular and nociceptive reflexes in halothane-anesthetized rats. **Anesth. Analg.** 80; 1995; 437-443.*
106. NAULI, SURYA M.; MAHER, Timothy J.; PEARCE, William J.; ALLY, Ahmmed. *Effects of opioid receptor activation on cardiovascular responses and extracellular monoamines within the rostral ventrolateral*



- medulla during static contraction of skeletal muscle. Neurosci. Res.* 41; 2001; 373-383.
107. NEGRI, Lucia; LATTANZI, Roberta; TABACCO, Fabio; MELCHIORRI, Pietro. *Respiratory and cardiovascular effects of the  $\mu$ -opioid receptor agonist [Lys<sup>7</sup>]dermorphin in awake rats. Brit. J. Pharmac.* 124; 1998; 345-355.
108. NIESLER, B.; FRANK, B.; KAPPELLER, J.; RAPPOLD, G.A.. *Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT<sub>3</sub> serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. Gene.* 310; 2003; 101-111.
109. NIESLER, Beate; KAPPELLER, Johannes; HAMMER, Christian; RAPPOLD, Gudrun. *Serotonin type 3 receptors genes: HTR3A, B, C, D, E. Pharmacogenom.* 9; 5; 2008; 501-504.
110. NOSJEAN, A.; FRANC, B.; LAGUZZI, R. *Increased sympathetic nerve discharge without alteration in the sympathetic baroreflex response by serotonin<sub>3</sub> receptor stimulation in the nucleus tractus solitaries of the rat. Neurosci. Letter* 186; 1995; 41-44.
111. NOZAKI, Chihiro; KAMEI, Junzo. *Possible involvement of opioidergic systems in the antinociceptive effect of the selective serotonin reuptake inhibitors in sciatic nerve-injured mice. Eur. J. Pharmac.* 552; 2006; 99-104.
112. O'HAGAN, K.P.; CASEY, S.M.; CLIFFORD, P.S.. *Muscle chemoreflex increases renal sympathetic nerve activity during exercise. J. Appl. Physiol.* 82; 1997; 1818-1825.
113. OU, Xiao-Ming; STORRING, John M.; KUSHWAHA, Neena; ALBERT, Paul R.. *Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor gene. J. Biol. Chem.* 276; 17; 2001; 14299-14307.
114. PARKER, R.M.; BARNES, J.M.; GE, J.; BARBER, P.C.; BARNES, N.M.. *Autoradiographic distribution of [<sup>3</sup>H]-(s)-zacopride-labelled 5-HT<sub>3</sub> receptors in human brain. J. Neurol. Sci.* 144; 1996; 119-127.
115. PASCAL, Geraldine; MILLIGAN, Graeme. *Functional complementation and the analysis of Opioid receptor homodimerization. Mol. Pharmacol.* 68; 3; 2005; 905-915.
116. PATTERSON, A.B.; GORDON, F.J.; HOLTZMAN, S.G.. *Naltrindole, a selective delta-opioid receptor antagonist, potentiates the lethal effects of*

- cocaine by a central mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 20; 1997; 333; 1; 47-54.
117. PAXINOS, George; WATSON, Charles. *The rat brain: in stereotaxic coordinates*. 4<sup>th</sup> edition. Academic Press, California, 1998.
118. PETERS, J.A.; HALES, T.G.; LAMBERT, J.J. *Molecular determinants of single-channel conductance and ion selectivity in the Cys-loop family: insights from the 5-HT<sub>3</sub> receptor*. *Trends Pharmacol. Sci.* 26; 2005; 587-594.
119. PETTY, M.A.; REID, J.L. *The effect of opiates on arterial baroreceptor reflex function in the rabbit*. *Naunyn-Schim. Arch. Pharmacol.* 319; 1982; 206-211.
120. PFEIFFER, Manuela; KIRSCHT, Susanne; STUMM, Ralf; KOCH, Thomas; WU, Daifei; LAUGSCH, Magdalena; SCHRÖDER, Helmut; HÖLLT, Volker; SCHULZ, Stefan. *Heterodimerization of substance P and  $\mu$ -opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization*. *J. Biol. Chem.* 278; 2003; 51630-51637.
121. PFEIFFER, Manuela; KOCH, Thomas; SCHRÖDER, Helmut; LAUGSCH, Magdalena; HÖLLT, Volker; SCHULZ, Stefan. *Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization and desensitization*. *J. Biol. Chem.* 277; 22; 2002; 19762-19772.
122. PHILIPPU, Athineos. *Regulation of blood pressure by central neurotransmitters and neuropeptides*. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 111; 1988; 1-115.
123. PUGSLEY, Michael K. *The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system*. *Pharmacol. Ther.* 93; 2002; 51-75.
124. RABKIN, Simon W. *Endogenous kappa opioids mediate the action of brain angiotensin II to increase blood pressure*. *Neuropep.* 41; 2007; 411-419.
125. RAO, Sumangala P.; CONLEY, Alexandria; DUNBAR, Joseph C. *Cardiovascular responses to central administration of mu and kappa opioid receptor agonist and antagonist in normal rats*. *Pept.* 24; 2003; 745-754.
126. RAMAGE, A.G. *Central cardiovascular regulation and 5-hydroxytryptamine receptors*. *Brain Res. Bull.* 56; 5; 2001; 425-439.

127. RAMAGE, Andrew G.; VILLALÓN, Carlos M. *5-Hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. Trends Pharmacol. Sci.* 29; 9; 2008; 472-481.
128. RAMAGE, A.G.; WOUTERS, W.; BEVAN, P. *Evidence that the novel antihypertensive agent, flexinolan, causes differential sympathoinhibition and also increases vagal tone by a central action. Eur. J. Pharmacol.* 151; 1988; 373-379.
129. REEVES, D.C.; LUMMIS, S.C.R.. *The molecular basis of structure and function of the 5-HT<sub>3</sub> receptor: a model ligand-gated ion channel. Mol. Memb. Biol.* 9; 2002; 11-26.
130. REISINE, Terry; LAW, Susan F.; BLAKE, Allan; TALLENT, Melanie. *Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G proteins and effector systems. Ann. NY Acad. Sci.* 780; 1996; 168-175.
131. ROZENFELD, Raphael; ABUL-HUSN, Noura S.; GOMES, Ivone; DEVI, Lakshmi A.. *An emerging role for the delta Opioid receptor in the regulation of mu Opioid receptor function. Sci. World J.* 7 (S2); 2007; 64-73.
132. SAVCI, Vahide; *et al.* *Cardiovascular effects of intracerebroventricularly injected CDP-choline in normotensive and hypotensive animals: the involvement of cholinergic system. Naun. Schm. Arch Pharmacol.* 365; 2002; 388-398.
133. SAXENA, P.R.. *Serotonin receptors: subtypes, functional response and therapeutic relevance. Pharmacol. Therap.* 66; 1995; 339-368.
134. SHEN, Shang; INGENITO, Alphonse J. *Comparison of cardiovascular responses to intra-hippocampal  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$  opioid agonists in spontaneously hypertensive rats and isolation-induced hypertensive rats. J. Hypert.* 17; 1999; 497-505.
135. SHWETA, Amany; MALPAS, Simon C.; ANDERSON, Warwick P.; EVANS, Roger G.. *Effects of naloxone on the haemodynamic and renal functional responses to plasma volume expansion in conscious rabbits. Eur. J. Physiol.* 439; 1999; 150-157.
136. SITSAPESAN, Rebecca; PARRATT, J.R. *The effects of drugs interacting with opioid receptors on the early ventricular arrhythmias arising from myocardial ischaemia. Br. J. Pharmacol.* 97; 1989; 795-800.

137. SNOOK, Laelie A.; NILLIGAN, Graeme; KIEFFER, Brigitte L.; MASSOTTE, Dominique.  *$\mu$ - $\delta$  Opioid receptor functional interaction: insight using receptor-G protein fusions.* **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 318; 2; 2006; 683-690.
138. SONG, Bingbing; CHEN, Wenling; MARVIZÓN, Juan C. G. *Inhibition of opioid release in the rat spinal cord by serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors.* **Brain Res.** XX; 2007; XXX-XXX.
139. SPIER, A.D.; WOTHERSPOON, G.; NAYAK, S.V.; NICHOLS, R.A.; PRIESTLEY, J.V.; LUMMIS, S.C.R.. *Antibodies against the extracellular domains of the 5-HT<sub>3</sub> receptor label both native and recombinant receptors.* **Mol Brain Res.** 67; 1999; 221-230.
140. STENFORS, C.; ROSS, S.B., 2004. Changes in extracellular 5-HIAA concentrations as measured by in vivo microdialysis technique in relation to changes in 5-HT release. **Psychopharmacol.** 172; 119-128.
141. SULLIVAN, Maria A.; VOSBURG, Suzanne K.; COMER, Sandra D. *Depot naltrexone: antagonism of the reinforcing, subjective, and physiological effects of heroin.* **Psychopharmac.** 189; 2006; 37-46.
142. SUN, Shu-Yu; LIU, Zhi; LI, Peng; INGENITO, Alphonse J.. *Central effects of opioid agonists and Naloxone on blood pressure and heart rate in normotensive and hypertensive rats.* **Gen. Pharmac.** 27; 7; 1996; 1187-1194.
143. TAO, Rui; AUERBACH, Sidney B. *Increased extracellular serotonin in rat brain after systemic or intraraphe administration of morphine.* **J. Neurochem.** 63; 1994; 517-524.
144. TAO, Rui; MA, Zhiyuan; AUERBACH, Sidney B.. *Alteration in regulation of serotonin release in rat dorsal raphe nucleus after prolonged exposure to morphine.* **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 286; 1; 1998; 481-488.
145. TECOTT, Laurence H.; MARICQ, Andres V.; JULIUS, David. *Nervous system distribution of the serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptors mRNA.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 90; 1993; 1430-1434.
146. THOMPSON, A.J.; LUMMIS, S.C.R.. *5-HT<sub>3</sub> receptors.* **Curr. Pharm. Des.** 12; 28; 2006; 3615-3630.
147. THOMPSON, A.J.; LUMMIS, S.C.R.. *The 5-HT<sub>3</sub> receptors as a therapeutic target.* **Expert Opin Ther Targets.** 11; 4; 2007; 527-540.

148. TRESKOT, Andrea M.; DATTA, Sukdeb; LEE, Marion; HANSEN, Hans. *Opioid pharmacology. Pain Physician*. 11; 2008; S133-S153.
149. VACCARINO, Anthony, L.; KASTIN, Abba J. *Endogenous opiates: 2000. Pept*. 22; 2001; 2257-2328.
150. van HOOFT, J.A.; YAKEL, J.L.. *5-HT<sub>3</sub> receptors in the CNS: 3B or not 3B? Trends Pharmacol. Sci*. 24; 4; 2003; 157-160.
151. van den BRINK, Olivier W.V.; DELBRIDGE, Lea M.; ROSENFELDT, Franklin L.; PENNY, Daniel; ESMORE, Donald S.; QUICK, Deahne; KAYE, David M.; PEPE, Salvatore. *Endogenous cardiac opioids: enkephalins in adaptation and protection of the heart. Heart, Lung Circul*. 12; 2003; 178-187.
152. VILLALÓN, Carlos M.; CENTURIÓN, David. *Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors / mechanisms involved and therapeutic implications. Naun. Schm.'s Arch Pharmacol*. 376; 2007; 45-63.
153. WAEBER, C.; HOYER, D.; PALACIOS, J.M.. *5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors in the human brain: autoradiographic visualization using [<sup>3</sup>H]ICS 205-930. Neurosci*. 31; 1989; 393-400.
154. WALDHOER, Maria; BARTLETT, Selena E.; WHISTLER, Jennifer. *Opioid receptors. Ann Rev. Biochem*. 73; 2004; 953-990.
155. WANG, Danxin; SUN, Xiaochun; BOHN, Laura M.; SADÉE, Wolfgang. *Opioid receptor homo- and heterodimerization in living cells by quantitative bioluminescence resonance energy transfer. Mol. Pharmacol*. 67; 6; 2005a; 2173-2184
156. WANG, Hung-Li; HSU, Chia-Yu; HUANG, Pei-Chen; KUO, Yo-Li; LI, Allen H.; YEH, Tu-Hsueh; TSO, An-Swe; CHEN, Ying-Ling. *Heterodimerization of Opioid receptor-like 1 and  $\mu$ -opioid receptors impairs the potency of  $\mu$  receptor agonist. J. Neurochem*. 92; 2005b; 1285-1294.
157. WANG, John Q.; INGENITO, Alphonse J. *Centrally mediated cardiovascular actions of dynorphin A(1-8) on rat hippocampal formation. J. Pharmac. Exp. Ther*. 261; 2; 1992; 678-685.
158. WANG, Qing-Ping; ZADINA, James E. GUAN, Jian-Lian; SHIODA, Seiji. *Recent advances in the search for the  $\mu$ -opioidergic system.*

- Morphological studies of the endomorphinergic neurons in the central nervous system. Jpn. J. Pharmac.* 89; 2002; 209-215.
159. WANG, William W.; SHAHRESTANIFAR, Mandana, JIN Jin; HOWELLS, Richard D.. *Studies on mu and delta opioid receptor selectivity utilizing chimeric and site-mutagenized receptors. Proc Natl Acad Sci USA.* 92; 1995; 12436- 12440.
160. WANG, Y.; RAMAGE, A.G.; JORDAN, D.. *Presynaptic 5-HT<sub>3</sub> receptors evoke an excitatory response in dorsal vagal preganglionic neurons in anaesthetized rat. J. Physiol.* 509; 1998; 683-694.
161. WHITE, David A.; BALLARD, Michael E.; HARMON, Alvin C.; HOLTZMAN, Stephen. *Acute delta- and kappa-opioid agonist pretreatment potentiates opioid antagonist-induced suppression of water consumption. Brain Res. Bull.* 76; 2008; 597-604.
162. WITT, Ken A.; DAVIS, Thomas P. CNS drug delivery: opioid peptides and the blood-brain barrier. *AAPS J.* 8; 1; 2006; E76-E88.
163. WRIGHT, Rebecca C.; INGENITO, Alphonse J. *Blockade of dorsal hippocampal kappa-opioid receptors increases blood pressure in normotensive and isolation-induced hypertensive rats. Neuropep.* 37; 2003; 127-132.
164. XUE, Ji-Chun; CHEN, Chongguang; ZHU, Jinmin; KUNAPULI, Satya; DeRIEL, J. Kim; YU, Lei; LIU-CHEN, Lee-Yuan. *Differential binding domains of peptide and non-peptide ligands in the cloned rat  $\kappa$  opioid receptor. J. Neurochem.* 269; 48; 1994; 30195-30199.
165. YOSHIOKA, Mitsuhiro; MATSUMOTO, Machiko; TOGASHI, Hiroko; SMITH, Charles B.; SAITO, Hideya. *Opioid receptor regulation of 5-hydroxytryptamine release from the rat hippocampus measured by in vivo microdialysis. Brain Res.* 613; 1992; 74-79.
166. XIE, Zhidong; LEE, Samuel P.; O'DOWD, Brian F.; GEORGE, Susan R.. *Serotonin 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. FEBS Letters.* 456; 1999; 63-67.
167. ZADINA, James E. *Recent advances in the search for the  $\mu$ -opioidergic system. Isolation and distribution of endomorphins in the central nervous system. Jpn. J. Pharmac.* 89; 2002; 203-208.

168. ZADINA, James E.; HACKLER, Laszio; GE, Lin-Jun; KASTIN, Abba J.. *A potent and selective endogenous agonist for the  $\mu$ -opiate receptor.* *Nature* 386; 1997; 499–502.