



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES E
NEUROPEPTÍDEOS NO NÚCLEO PÓSTERO-DORSAL DA
AMÍGDALA MEDIAL NO CONTROLE CARDIOVASCULAR EM
RATOS**

EDSON QUAGLIOTTO

**PORTO ALEGRE
2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES E
NEUROPEPTÍDEOS NO NÚCLEO PÓSTERO-DORSAL DA
AMÍGDALA MEDIAL NO CONTROLE CARDIOVASCULAR EM
RATOS**

Edson Quagliotto

**Orientador: Prof. Dr. Alberto Antônio Rasia Filho
Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro Dal Lago**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências.

**PORTO ALEGRE
2011**

“...nada justifica que se ignore quase tudo sobre quase tudo, já que sobra muita memória para acumular cultura em múltiplos campos. (...) O conhecimento da massa é imenso porém o conhecimento de cada um é muito limitado, o que a mim parece humilhante. (...) Como admirador da civilização grega, a mais importante de toda a História, adoto o critério helênico de que todo o saber deve ser unificado, no que os gregos chamavam "filosofia" (isto é, afinidade pelo saber) ou no que hoje deveríamos chamar "ciência" (palavra que significa conhecimento, em latim).

Acercando-me do fim de minha vida, não posso deixar de apelar todos os aqui presentes, bem mais jovens do que eu, para que almejem tornar-se "linces", como eram considerados os membros da primeira academia do mundo.

Que enxerguem muito longe, abrangendo um ângulo acadêmico de saber muito amplo e passando essa atitude para seus alunos. Precisamos deixar de formar formiguinhas, treinadas para carregar pedacinhos de folhas de um lugar a outro quase que cegamente, e voltar a formar linces. E, talvez o que seja ainda pior, formiguinhas que redescubram freqüentemente o que já foi descoberto antes, por não mais lerem artigos que tenham mais de 5 anos de existência. Como dizia o grande professor Bernardo A. Houssay, um dos inventores da neuroendocrinologia, que descobriu a circulação porta hipotálamo-hipofisária e realizou o primeiro cateterismo intracardíaco, tem-se inventado reiteradamente a bicicleta, assim como a roda, o fogo e outras invenções antiquíssimas que os mais jovens desconhecem porque à sua faina de se comportarem como formiguinhas juntam a de só conhecerem as pesquisas dos últimos anos. Por tudo o que acabo de dizer, permitam-me pedir-lhes mais uma vez que tentem quebrar a medíocre tendência destes nossos tempos e tornem-se linces, linces de verdade, não apenas meras formiguinhas. Não é necessário pesquisar em diversos campos da ciência mas é imperativo que se leia sobre todo o conhecimento humano.”

Professor Cesar Timo-Iaria

(Conferência de Abertura da Reunião da FeSBE de 2002)

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Alberto Rasia Filho e Prof. Dr. Pedro Dal Lago, pelo carinho com que me acolheram, minha total gratidão pelo incentivo, oportunidade, paciência, confiança e orientação.

A minha querida namorada Gilvana, pela total dedicação, compreensão, carinho, amor e pelo apoio recebido.

Aos meus queridos pais, pela total dedicação e compreensão tanto nas horas boas quanto nas difíceis, principalmente pelo apoio recebido.

À minha querida filha Duda pelo incentivo, apoio, compreensão, carinho e amor.

As bolsistas Julia B. Silva e Juliane Scaberlot pela colaboração na realização das técnicas experimentais, apoio e amizade.

Aos meus colegas do laboratório de Fisiologia da UFCSPA, em especial Ananda Rucatti, Aline Dall'Oglio, Ana Amélia Machado Duarte, Bruna Dietrich, Marli Sitta, Denielli Bós, Douglas Rossato, Leonardo Calegari, Jadson Alves, Rodrigo B. Jaenisch, Ramiro Barcos Nunes, Vitor Hentschke, pelas sugestões, colaboração e, principalmente, a amizade.

À Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen por proporcionar sua colaboração técnica na realização da avaliação cardiovascular.

À Dra. Karina Kasali por se disponibilizar na colaboração técnica na realização da análise espectral.

Ao Prof. Dr. Airton Scheneider pela oportunidade de uso do laboratório de Ciências Morfológicas da UFRGS.

À Profa. Dra. Matilde Achaval pela colaboração no empréstimo do vibrátomo e pelo uso do laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS .

Às técnicas do laboratório de Fisiologia Carmen Rocha, Rosângela Bjerk, Teresinha Stein e Rosalva Tereza Meurer no preparo de alguns dos materiais empregados e na coloração das lâminas histológicas.

Ao Mário Pereira pelo apoio no fornecimento de animais para os experimentos.

A todas as amigadas que fizeram parte e que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento do trabalho e participaram da convivência durante esses anos.

Ao PPG em Neurociências e seus professores pela oportunidade e ensinamentos.

À comunidade científica da UFRGS e da UFCSPA com que tive contato, pela oportunidade acolhedora e incentivadora durante todo o desenvolvimento técnico deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES e à FAPERGS pelas bolsas e financiamento para execução deste trabalho.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	135
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 AMÍGDALA	17
1.2 O NÚCLEO MEDIAL DA AMÍGDALA E SUA SUBDIVISÃO	24
1.3 CONEXÕES E CORRELAÇÕES FUNCIONAIS DOS SUBNÚCLEOS DA AMÍGDALA MEDIAL	27
1.4 CONTROLE NEURAL DO SISTEMA CARDIOVASCULAR	38
1.5 NEUROTRANSMISSORES NOS SUBNÚCLEOS DA AMÍGDALA MEDIAL	47
1.6 NEURÔNIOS GLUTAMATÉRGICOS E GABAÉRGICOS	48
1.7 NEUROPEPTÍDEOS NA AMÍGDALA MEDIAL	52
1.8 NEURÔNIOS ANGIOTENSINÉRGICOS	54
1.9 NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS	58
1.10 NEURÔNIOS SOMATOSTATINÉRGICOS	62
2 JUSTIFICATIVA	69
3 OBJETIVOS	70
3.1 GERAIS	70
3.2 ESPECÍFICOS	70
4 ADENDO	72
5 ESTUDO I	73
6 ESTUDO II	113
7 ESTUDO III	148
8 MATERIAIS E MÉTODOS	149
8.1 ANIMAIS	149
8.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	149
8.3 CANULAÇÃO ARTERIAL E VENOSA	150
8.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS BARORRECEPTORES	152
8.5 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS QUIMIORRECEPTORES	154
8.6 VARIABILIDADE NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA (ANÁLISE ESPECTRAL MODELAMENTO AUTO-REGRESSIVO)	155
8.7 PERFUSÃO CARDÍACA E ANÁLISE HISTOLÓGICA:	155
9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	157

10	RESULTADOS	159
11	DISCUSSÃO	177
12	CONCLUSÃO	184
13	PERSPECTIVAS	186
14	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	187
15	ANEXOS	224

ABREVIATURAS

AA	Amígdala anterior
AAP	Área amigdalar piriforme
ABL	Amígdala basolateral
ABLa	Amígdala basolateral anterior
ABLp	Amígdala basolateral posterior
ABMa	Amígdala basomedial anterior
ABMp	Amígdala basomedial posterior
ACe	Amígdala central
ACh	Acetilcolina
ACOa	Amígdala cortical anterior
ACOm	Amígdala cortical medial
ACOl	Amígdala cortical lateral
ACOp	Amígdala cortical posterior
ACOPm	Amígdala cortical pósteromedial
ACOPl	Amígdala cortical pósterolateral
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
AHA	Área hipotalâmica anterior
AL	Amígdala lateral
AMeAD	Amígdala medial ântero-dorsal
AMeAV	Amígdala medial ântero-ventral
AMePD	Amígdala medial pósterodorsal
AMePDI	Amígdala medial pósterodorsal, coluna lateral
AMePDi	Amígdala medial pósterodorsal, coluna intermediária
AMePDM	Amígdala medial pósterodorsal, coluna medial
AMePV	Amígdala medial póstero-ventral
Ang II	Angiotensina II
AOB	Bulbo olfativo acessório
AP	Arterial pressure
Arc	Núcleo arqueado
AVPV	Núcleo periventricular ântero-ventral
Bpm	“batimentos” por minuto
BST	Núcleo próprio da estria terminal
BSTMP	Núcleo próprio da estria terminal, porção medial
BSTpi	Porção pósterointermediária do núcleo próprio da estria terminal
BSTpm	Porção pósteromedial do núcleo próprio da estria terminal
BVL	Bulbo ventrolateral
BVLc	Bulbo ventrolateral caudal
BVml	Bulbo ventromedial lateral
BVLr	Bulbo ventrolateral rostral
DAP	diastolic arterial pressure
DMV	Núcleo motor dorsal do vago
DP	Desvio padrão

EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
GABA	Ácido δ -amino butírico
GLU	Glutamato
HF	Componente de alta frequência do sistograma
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HR	Heart rate
LF	Componente de baixa frequência do sistograma
MAP	Mean arterial pressure
MeA	Núcleo medial da amígdala
NA	Núcleo ambíguo
NPB	Núcleo parabraquial
NTS	Núcleo do trato solitário
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
Pa	Núcleo paraventricular
Pe	Núcleo periventricular
PI	Pulse interval
PM	Núcleo pré-mamilar
PMV	Núcleo pré-mamilar ventral
POA	Área pré-óptica
RPT	Resistência periférica total
SAP	Systolic arterial pressure
SN	Sistema nervoso
ST	Estria terminal
SST	Somatostatina
SSTr	Receptor de somatostatina
SON	Núcleo supra óptico
TO	Trato óptico
VMH	Núcleo ventromedial hipotalâmico
VMHvl	Núcleo ventromedial hipotalâmico, parte ventrolateral
VMN	Núcleo ventromedial hipotalâmico
OT	Ocitocina
OTr	Receptor de ocitocina
OVLt	Órgão vascular da lâmina terminal

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Classificação dos núcleos que compõe a amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais 23
- FIGURA 2** Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar os quatro subnúcleos da amígdala medial 26
- FIGURA 3** Esquema representativo de corte coronal do encéfalo do rato onde se observa a íntima relação existente entre a amígdala medial pósterodorsal, o trato óptico e a estria terminal 30
- FIGURA 4** Médias (\pm DP) das variações da frequência cardíaca, da pressão arterial sistólica, da pressão arterial diastólica, e da pressão arterial média nos grupos estudados em situação basal, pré-microinjeção, e após a microinjeção de salina, ocitocina nas doses de 10 ng ou 25 pg, somatostatina nas doses de 1 μ M ou 15 fmol e angiotensina II nas doses de 50 fmol ou 50 pmol, na amígdala medial pósterodorsal de ratos..... 166
- FIGURA 5** Médias (\pm DP) da variação da frequência cardíaca obtidas após injeção sistêmica de diferentes doses de KCN nos animais microinjetados com salina, ocitocina nas doses de 10 ng ou 25 pg, somatostatina nas doses de 1 μ M ou 15 fmol e angiotensina II nas doses de 50 fmol ou 50 pmol, na amígdala medial pósterodorsal de ratos 167
- FIGURA 6** Médias (\pm DP) da variação da pressão arterial média obtidas após injeção sistêmica de diferentes doses de KCN nos animais microinjetados com salina, ocitocina nas doses de 10 ng ou 25 pg, somatostatina nas doses de 1 μ M ou 15 fmol e angiotensina II nas doses de 50 fmol ou 50 pmol, na amígdala medial pósterodorsal de ratos 168
- FIGURA 7** Médias (\pm DP) da variação da diferença do valor de PA no ponto de maior inclinação da curva (PA₅₀) obtida após microinjeção de salina, ocitocina nas doses de 10 ng ou 25 pg, somatostatina nas doses de 1 μ M ou 15 fmol e angiotensina II nas doses de 50 fmol ou 50 pmol, na amígdala medial pósterodorsal de ratos..... 169
- FIGURA 8** Médias (\pm DP) da variação da diferença entre a resposta de queda máxima da FC (em bpm) induzido pelo aumento da PA (em mmHg; platô de bradicardia) obtida após a microinjeção de salina, ocitocina nas doses de 10 ng ou 25 pg, somatostatina nas doses de 1 μ M ou 15 fmol e angiotensina II nas doses de 50 fmol ou 50 pmol, na amígdala medial pósterodorsal de ratos 170
- FIGURA 9** Médias (\pm DP) da variação da diferença entre a resposta de aumento máxima da FC (em bpm) induzido pelo decréscimo da PA (em mmHg; platô de taquicardia) obtida após a microinjeção de salina, ocitocina nas doses de 10 ng ou 25 pg, somatostatina nas doses

- de 1 μ M ou 15 fmol e angiotensina II nas doses de 50 fmol ou 50 pmol, na amígdala medial pósterodorsal de ratos 171
- FIGURA 10** Médias (\pm DP) da variação da diferença da sensibilidade média do barorreflexo (Ganho bpm/mmHg) obtida após microinjeção de salina, ocitocina nas doses de 10 ng ou 25 pg, somatostatina nas doses de 1 μ M ou 15 fmol e angiotensina II nas doses de 50 fmol ou 50 pmol, na amígdala medial pósterodorsal de ratos 172
- FIGURA 11** Médias (\pm DP) da variação da diferença da amplitude da FC (em bpm) obtida após microinjeção de salina, ocitocina nas doses de 10 ng ou 25 pg, somatostatina nas doses de 1 μ M ou 15 fmol e angiotensina II nas doses de 50 fmol ou 50 pmol, na amígdala medial pósterodorsal de ratos 173
- FIGURA 12** Curva da modificação da pressão arterial média de acordo com a variação da frequência cardíaca, como teste da resposta reflexa mediada pelos barorreceptores, após microinjeção de salina, ocitocina nas doses de 10 ng ou 25 pg, somatostatina nas doses de 1 μ M ou 15 fmol e angiotensina II nas doses de 50 fmol ou 50 pmol, na amígdala medial pósterodorsal de ratos 174

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** Parâmetros da análise espectral que foram calculados a partir de dados cardiovasculares de ratos que compuseram seis grupos experimentais obtidos após a microinjeção de salina, ocitocina nas doses de 10 ng ou 25 pg, somatostatina nas doses de 1 μ M ou 15 fmol e angiotensina II na dose de 50 pmol, na amígdala medial pósterodorsal de ratos 175
- TABELA 2** Parâmetros da análise simbólica que foram calculados a partir de dados cardiovasculares de ratos que compuseram seis grupos experimentais obtidos após a microinjeção de salina, ocitocina nas doses de 10 ng ou 25 pg, somatostatina nas doses de 1 μ M ou 15 fmol e angiotensina II na dose de 50 pmol, na amígdala medial pósterodorsal de ratos 176

RESUMO

O subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial (AMePD) de ratos modula comportamentos sociais, como é o reprodutivo, e respostas a estímulos estressantes. Para tanto, são necessários ajustes concomitantes da função cardiovascular. Dada sua notável presença no AMePD, o glutamato (GLU), o ácido δ -aminobutírico (GABA), a ocitocina (OT), a somatostatina (SST) e a angiotensina II (Ang II) poderiam estar envolvidos em tais ajustes homeostáticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da microinjeção de GLU, GABA, OT, SST e Ang II microinjetados diretamente no AMePD de ratos não anestesiados sobre o controle cardiovascular em situação basal e após estimulação dos barorreceptores e quimiorreceptores. Ratos machos Wistar (3 meses de idade) foram mantidos em condições padrão de biotério e cuidados éticos. Os animais foram anestesiados e submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação unilateral de cânula no AMePD, lado direito. No quinto dia pós-cirúrgico, os animais foram novamente anestesiados e submetidos à colocação de cateter de polietileno na luz da artéria aorta abdominal e outro na veia cava inferior. Um dia após a canulação dos vasos, os animais foram microinjetados no AMePD com solução salina (0,3 μ l; n = 8), GLU na dose de 2 μ g/0,3 μ l (n = 7), GABA nas doses de 61 ng/0,3 μ l (n = 7) e de 100 μ g/0,3 μ l (n = 7), OT nas doses de 10 ng/0,3 μ l (n = 7) e de 25 pg/0,3 μ l (n = 6), SST nas doses de 1 μ M/0,3 μ l (n = 8) e de 15 fmol/0,3 μ l (n = 5) e Ang II nas doses de 50 fmol/0,3 μ l (n = 7) e de 50 pmol/0,3 μ l (n = 7). Dados de frequência cardíaca (FC) e de pressão arterial (PA) foram registrados por 15 minutos em período basal, controle, e, a seguir, foram microinjetadas as substâncias mencionadas e testadas as variáveis de interesse. Os reflexos pressóricos foram testados pela injeção de fenilefrina (8 μ g/ml) e nitroprussiato de sódio (100 μ g/ml) e os quimiorreceptores, pela de cianeto de potássio (doses crescentes desde 60 até 180 μ g/kg). O modelo autoregressivo de análise espectral e a análise simbólica foram utilizados para avaliar a variabilidade da FC e da PA e as atividades simpática e vagal responsáveis pela variabilidade nos dados registrados. Os dados foram comparados pelo teste da análise da variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas e pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls ou pela ANOVA de uma via e pelo teste de Tukey, conforme apropriado. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados nos valores de FC, PA sistólica, PA diastólica e PA média em situação basal ou após as diferentes microinjeções nos grupos microinjetados com neurotransmissores ou com os neuropeptídeos estudados ($p > 0,05$). Microinjeções de salina, de GLU (2 μ g) ou GABA (61 ng ou 100 μ g; n = 7 cada grupo) não afetaram os parâmetros basais ou respostas do quimiorreflexo. Os valores correspondentes à curva da modificação da PAM de acordo com a variação da FC foram estatisticamente diferentes entre os grupos estudados, sendo que a curva após a microinjeção de GABA 61 ng no AMePD foi diferente dos grupos que receberam salina ou GABA na maior dose (100 μ g; $p < 0,05$ em ambos os casos). No que se refere ao platô de taquicardia, a curva de inclinação dos dados referente à sensibilidade média do barorreflexo foi diferente entre os grupos que receberam GLU ou GABA em ambas as doses em comparação com o que recebeu salina ($p < 0,01$). O GLU aumentou valores índices das análises espectral e simbólica simpáticos relacionados com modulações cardíaca e

vascular ($P < 0,05$). A administração de GABA (61 ng) também induziu os maiores valores de variabilidade na FC ($P < 0,05$) que pode ser associado a uma ativação parassimpática central. No grupo de animais microinjetados com salina, OT (10 ng e 25 pg), SST (1 μ M e 15 fmol) e Ang II (50 fmol e 50 pmol) no AMePD, os valores mais próximos do basal foram obtidos com a menor dose de KCN (60 μ g/kg) e ocorreu, conforme o esperado, uma redução estatisticamente significativa maior na FC quando foram aumentadas as doses injetadas de KCN para 100 μ g/kg, 140 μ g/kg ou 180 μ g/kg (teste de Newman-Keuls, $p < 0,001$ em todos os casos, quando comparadas com a menor dose injetada). Ang II na dose de 50 pmol microinjetada no AMePD gerou maior diminuição reflexa na FC quando comparado com o grupo controle após a estimulação dos quimiorreceptores com KCN nas doses de 60 e 140 μ g/kg ($p < 0,05$). Ang II na dose de 50 pmol microinjetada no AMePD gerou maior diminuição reflexa na PA quando comparado com o grupo controle após a estimulação dos quimiorreceptores com KCN na dose de 140 μ g/kg ($p < 0,05$). Os valores referentes ao ponto de maior inclinação da curva pressórica referente a respostas geradas pelos barorreceptores, (PA_{50}), após injeções de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, foram menores nos ratos que receberam OT na dose de 10 ng ou SST na dose de 1 μ M microinjetadas no AMePD, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Os valores referentes à sensibilidade média do barorreflexo (ganho em bpm/mmHg), após injeções de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, foi maior no grupo que recebeu OT na dose de 10 ng quando comparado com a Ang II na dose de 50 pmol. Houve maior variabilidade na PA sistólica, na FC, no componente de baixa e de alta frequência do tacograma e no índice de atividade simpático-vagal da análise espectral nos grupos que receberam OT nas doses de (10 ng e 25 pg), SST (1 μ M e 15 fmol) e Ang II na dose de 50 pmol ($p < 0,05$). Tais dados, indicam que o AMePD se vale de sua atividade glutamatérgica, GABAérgica, ocitocinérgica, somatostatinérgica e angiotensinérgica local, por circuitaria própria ou devido a aferências neurais, para modificar variáveis cardiovasculares provavelmente concomitantemente à organização de comportamentos.

PALAVRAS CHAVE: Barorreflexo, pressão arterial, controle central cardiovascular, amígdala expandida, análise espectral, quimiorreflexo.

ABSTRACT

The postero-dorsal subnucleus of the medial amygdala (MePD) modulates social behavior of rats, such as reproduction, and responses to stressful stimuli. To this end, concomitant adjustments of the cardiovascular function are modulated. Given its remarkable presence in the MePD, glutamate (GLU), Gamma-amino butyric acid (GABA), oxytocin (OT), somatostatin (SST) and angiotensin II (Ang II) could be involved in such homeostatic adjustments. The objective of this study was to evaluate the effect of microinjection of GLU, GABA, OT, SST and Ang II microinjected directly into the rats MePD on non-anesthetized cardiovascular control under basal conditions and after stimulation of baroreceptors and chemoreceptors. Male Wistar rats (3 months old) were maintained under standard laboratory conditions and ethical care. The animals were anesthetized and submitted to unilateral stereotactic surgery for implantation of the cannula in the right MePD. On the fifth postoperative day, the animals were again anesthetized and underwent placement of polyethylene catheter in the abdominal aorta and inferior vena cava. One day after the cannulation of the vessels, the animals were microinjected with saline solution, GLU (2 $\mu\text{g}/0,3 \mu\text{l}$, $n = 7$), GABA (61 $\text{ng}/0,3\mu\text{l}$, $n = 7$ and 100 $\mu\text{g}/0,3 \mu\text{l}$, $n = 7$), OT (10 $\text{ng}/0,3 \mu\text{l}$, $n = 7$ and 25 $\text{pg}/0,3 \mu\text{l}$, $n = 6$), SST (1 $\mu\text{M}/0,3\mu\text{l}$, $n = 8$ and 15 $\text{fmol}/0,3\mu\text{l}$, $n = 5$) and Ang II (50 $\text{fmol}/0,3 \mu\text{l}$, $n = 7$ and 50 $\text{pmol}/0,3 \mu\text{l}$, $n = 7$) in the MePD. Data for heart rate (HR) and blood pressure (BP) were recorded for 15 minutes at baseline and then were microinjected the substances aforementioned and tested the variables of interest. Baroreceptor function was tested by phenylephrine (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and sodium nitroprusside (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) injections. Chemoreflex was tested by potassium cyanide (60 – 180 $\mu\text{g}/\text{ml}$) injections. The autoregressive model of symbolic analysis and spectral analysis were used to evaluate the variability of HR and BP and the sympathetic and vagal activities responsible for variability in the data recorded. The data were compared by a two-way analysis of variance (ANOVA) test for repeated measures and the *post hoc* Newman-Keuls or an one-way analysis of variance (ANOVA) test for repeated measures and the *post hoc* Newman-Keuls whenever appropriate. The level of statistical significance was set at $P \leq 0.05$. There was no statistical difference between groups in the values of HR, systolic BP, diastolic BP and mean BP at baseline or after microinjections in the different groups ($P > 0.05$). Microinjections of saline, GLU (2 μg) or GABA (61 ng or 100 μg ; $n = 7$ each group) did not affect the basal or responses of chemoreflex. The values of the curve of change in the MAP in accordance to the variation of HR, were statistically different between groups, and the curve after the microinjection of GABA 61 ng in the MePD was different in the groups that received saline or the highest GABA dose (100 μg , $P < 0.05$ in both cases). With regard to the plateau of tachycardia, the slope of the data on the average baroreflex sensitivity was different among the groups receiving GLU or GABA at both doses compared to that received saline ($P < 0.01$). GLU increased power spectral and symbolic sympathetic indexes related with both cardiac and vascular modulations ($P < 0.05$). The GABA administration (61 ng , but not 100 μg) also induced higher values of HR variability ($P < 0.05$), rather associated with a parasympathetic activation. In the group of animals microinjected with saline, OT (10 ng and 25 pg), SST (1 μM and 15 fmol) and Ang II (50 fmol and 50 pmol) in MePD, there was as expected, a statistically significant greater reduction in HR increasing when the injected doses of KCN to 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$ or 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Newman-Keuls test, $P < 0.001$ in all cases when compared with the lower injected dose). Ang II at the dose of 50 pmol generated a higher

reflex decrease in HR compared to the control group after stimulation of the chemoreceptors with KCN at doses of 60 and 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0.05$). Ang II at the dose of 50 pmol generated a higher reflex decrease in BP compared with the control group after stimulation of the chemoreceptors with KCN at the dose of 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0.05$). The values for the point of greatest slope of the AP response generated by baroreceptors (MAP_{50}) was lower in rats given OT at the dose of 10 ng or SST at the dose of 1 μM compared to the control group ($P < 0.05$). The average values for the baroreflex sensitivity (gain in bpm/mm Hg) after the injection of phenylephrine and sodium nitroprusside was greater in the group receiving OT at the dose of 10 ng compared with Ang II at the dose of 50 pmol. There was a greater variability in systolic BP, HR, the component of low and high frequency of tachogram and the sympathovagal index studied by spectral analysis in the groups that received OT (10 ng and 25 μg), SST (1 μM and 15 fmol) and Ang II (50 pmol; $P < 0.05$). These data indicate that the MePD has a glutamatergic, GABAergic, ocitocinergeric, somatostatinergic angiotensinergic modulatory activity on cardiovascular response most likely involved in the central organization of behaviors.

KEY WORDS: Extended amygdala, central cardiovascular control, heart rate, blood pressure, baroreceptor reflex, chemoreceptor reflex, power spectral analysis, symbolic analysis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 AMÍGDALA

A amígdala, ou complexo amigdaliano¹, constitui-se de núcleos subcorticais interconectados que se situam no lobo temporal, lateral ao hipotálamo e ventral ao estriado no encéfalo de primatas (ALHEID *et al.*, 1995; EVERITT, 1995; SWANSON & PETROVICH, 1998; DE OLMOS *et al.*, 2004). Em ratos situa-se lateralmente ao trato óptico (TO), na parte ventral do telencéfalo, tendo como limite rostral uma região pouco definida próxima do núcleo do trato olfativo lateral e, caudalmente, limítrofe à zona de transição amígdalo-hipocampal (DE OLMOS *et al.*, 2004).

O termo amígdala adveio de estudos anatômicos nos quais vários núcleos colocados rostralmente à cauda do núcleo caudado, ao hipocampo e ao corno temporal do ventrículo lateral pareciam, agrupadamente, ter uma conformação esferóide e alongada, a qual lembrava a forma de uma amêndoa (do grego adveio seu nome, embora não tenha esse mesmo aspecto em todos os animais estudados até o momento).

¹ Embora a terminologia anatômica nomeie esta estrutura como “corpo amigdalóide” na parte basilar do telencéfalo, por definição encontrada em dicionário da língua portuguesa, “amigdaliano” é algo relativo ou pertencente à amígdala, enquanto amígdalóide é semelhante à amígdala (RASIA-FILHO; HILBIG, 2005).

Há, no entanto, consideráveis debates sobre sua subdivisão em núcleos em várias espécies animais e, por isso, são comuns referências ao núcleo inteiro como complexo amigdaliano embora isso não seja mais adequado (BRODAL, 1981; SWANSON & PETROVICH, 1998; NEWMAN, 1999; PITKANEN, 2000; RASIA-FILHO *et al.*, 2000). Sabe-se que a amígdala não tem função unitária simples, mas sim um papel de integração das atividades comportamentais, endócrinas, simpáticas e parassimpáticas que são importantes para a relação dos animais com seu ambiente (BRODAL, 1981; LEDOUX, 1992b; DAVIS & SHI, 2000; RASIA-FILHO *et al.*, 2000).

Alguns dos primeiros estudos descreveram que a amígdala representava a maior via de ligação entre as regiões medial e basal do telencéfalo, conforme descrito por (KAMAL & TOMBOL, 1975). Historicamente, um dos primeiros indícios do envolvimento da amígdala na modulação do comportamento emocional foi obtido com a ablação bilateral do terço anterior do lobo temporal em macacos, ocorrendo, a partir disso, perda da agressividade e as manifestações comportamentais relacionadas com medo, alteração da percepção de estímulos aversivos, comportamento sexual inapropriado e tendência a investigar com a boca toda a sorte de objetos colocados ao alcance do animal (KLUVER & BUCY, 1997).

Em ratos, a amígdala é composta por núcleos e subnúcleos que formam uma complexa rede estrutural inter-relacionada e multifuncional, anatomicamente e funcionalmente heterogênea (ALHEID *et al.*, 1995; EVERITT, 1995; SWANSON & PETROVICH, 1998; RASIA-FILHO *et al.*, 2000; PETROVICH *et al.*, 2001; RASIA-FILHO *et al.*, 2004a), cuja atividade recebe aferência de diferentes modalidades sensoriais que permitem que se associem a ajustes homeostáticos e comportamentos sociais específicos (LEDOUX, 1992b; PITKANEN *et al.*, 1997; NEWMAN, 1999; RASIA-FILHO *et al.*, 2000; KNAPSKA *et al.*, 2007; RASIA-FILHO *et al.*, 2008).

Os limites anatômicos extremos da amígdala e a classificação de suas subdivisões permanecem, no entanto, ainda controversos (SWANSON & PETROVICH, 1998; DE OLMOS & HEIMER, 1999; NEWMAN, 1999; DE OLMOS *et al.*, 2004).

A amígdala já foi dividida de diversas maneiras por diferentes autores ao longo do tempo. Prince e colaboradores (1987) propuseram um esquema único de classificação dos núcleos amigdalianos de ratos, gatos e macacos dividindo a amígdala desses animais em três grandes porções: núcleo basolateral (ABL), do qual fazem parte os subnúcleos lateral, basal, e basal acessório e que estariam amplamente interconectados com o neocórtex; núcleo amigdalilar cortical-medial (ACOM), que corresponderia aos núcleos cortical e medial (MeA), córtex periamigdalóide, e núcleo do trato olfativo lateral, relacionados com o sistema olfativo principal e acessório; e, por último, o núcleo central (ACe) e a área amigdaliana anterior (AA), que estariam envolvidos com atividades “vegetativas” que neste texto, serão tratadas como simpáticas e parassimpáticas (para comentário em contrário ao emprego do termo “vegetativo” ou “autônomo” veja-se; RASIA-FILHO, 2006).

Entretanto, SWANSON e PETROVICH, (1998) sugeriram que a amígdala pudesse agrupar um número de núcleos que parecem ser partes diferenciadas do córtex cerebral, do cláustro e do estriado, pertencendo a quatro sistemas funcionais: 1) simpático e parassimpático, composto pela ACe; 2) cortical fronto-temporal, composto pelos núcleos ABL e ABL anterior (ABLa) e lateral; 3) relacionado com o bulbo olfativo acessório (AOB) conectado ao MeA, tema desta tese e para o qual dar-se-á maior atenção a seguir; e, 4) relacionados com a via olfativa principal, onde estariam os demais núcleos. Com mais detalhes, estruturalmente, a amígdala poderia se consistir de uma divisão estriatal, constituída pela AA, pelo MeA e ACe, e de uma divisão cortical que corresponderia à ABLa e posterior (ABLp), aos núcleos basomedial anterior (ABMa) e posterior (ABMp), cortical pósteromedial (ACOPm) e pósterolateral (ACOPl), cortical anterior (ACOA), lateral (ACOL) e

posterior (ACOp), área amigdaliana piriforme (AAP) e área piriforme de transição (SWANSON & PETROVICH, 1998; PETROVICH *et al.*, 2001; PETROVICH *et al.*, 2005; PETROVICH & LOUGEE, 2011).

Neste sentido, em descrição anatômica comumente empregada da amígdala do rato, propôs-se que ela fosse classificada em quatro regiões, segundo a sua disposição citoarquitetônica e hodológica: 1) amígdala “expandida”, assim denominada por se estender além de seus limites anatômicos e subdividindo-se em ACe e MeA; 2) amígdala cortical, subdividida em complexo basolateral (BL) e em porções que se conectam às vias olfativas e vomeronasal; 3) áreas de transição, localizadas entre a porção ventral dos núcleos da base e a amígdala “expandida”; 4) núcleos ainda não classificados, constituídos por um grande grupo de células dispersas na substância branca, substância *inominata* e porções do núcleo próprio da estria terminal (Figura 1; ALHEID *et al.*, 1995; DE OLMOS *et al.*, 2004).

É importante destacar o conceito aqui apresentado, ou seja, o MeA é um grande núcleo amigdaliano superficial, considerado como uma parte da divisão medial da "amígdala expandida" (ALHEID *et al.*, 1995; DE OLMOS *et al.*, 2004), que compartilha algumas características estruturais com a parte anterior, ventral e posterior do BST, a parte intra-amigdaliana da BST, a divisão medial do BST supracapsular, e a divisão medial da amígdala expandida sublenticular em ratos (ALHEID *et al.*, 1995). O MeA tem origens histogenética diferentes em camundongos, incluindo-se subdivisões ou grupos de células que derivam do “subpallium”, “pallium” (“ventralpallium”) ou células progenitoras de origem hipotalâmico/diencefálico, algumas comparáveis ao claustró e relacionadas com o desenvolvimento do córtex cerebral (“pallium”) ou com os núcleos da base (“subpallium”; GARCIA-LOPEZ *et al.*, 2008). Funcionalmente, a amígdala parece fazer parte de três grandes sistemas: 1) relacionado com respostas hipotalâmicas e do tronco encefálico e mediada por eferências do ACe; 2) o frontotemporal, que compreende a amígdala lateral (AL) e o ABL; e,

3) o sistema relacionado com as vias olfativa principal e acessória, onde estão envolvidos os demais núcleos amigdalianos e onde está o MeA (SWANSON & PETROVICH, 1998; PETROVICH *et al.*, 2001).

Algumas funções foram descritas para o complexo amigdaliano de ratos. Por exemplo, demonstram também a interrelação entre esses núcleos amigdalianos a AL, o ABL e o ACe possuem um papel importante na modulação do medo, pois suas aferências e eferências associam informações e desencadeiam respostas comportamentais, endócrinas, simpáticas e parassimpáticas frente a estímulos ameaçadores inatos e condicionados (DAVIS, 1992a; DAVIS & WHALEN, 2001; DAVIS *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011; PANTAZOPOULOS *et al.*, 2011; SCHUMANN *et al.*, 2011). Para tanto, tais núcleos da amígdala recebem aferências de diferentes modalidades sensoriais: olfativa, gustativa, auditiva, visual, somatosensorial e visceral (SAH *et al.*, 2003; SAH & WESTBROOK, 2008; DELANEY *et al.*, 2010; POLEPALLI *et al.*, 2010; SPAMPANATO *et al.*, 2011). Ou seja, para participar dessas atividades, os núcleos amigdalianos recebem vários tipos de informações sensoriais interoceptivas e exteroceptivas, modificam sua própria atividade, no que se supõe seja uma etapa na apreciação emocional da informação recebida, e estimulam diversas regiões do sistema nervoso (SN) central para que se inicie a resposta ao estímulo percebido (KNUEPFER *et al.*, 1995; QUIRK *et al.*, 1995; WATANABE *et al.*, 2010; SIERRA-MERCADO *et al.*, 2011). Circuitos intra-amigdalianos complexos permitem que se associem ajustes homeostáticos e alostáticos com a emissão de comportamentos específicos (PITKANEN, 1998; JOLKKONEN *et al.*, 2001; HAYWARD *et al.*, 2010).

De fato, o papel dos núcleos da amígdala tornou-se mais claro nas últimas décadas (DAVIS, 1992c; b; a; KLING & BROTHERS, 1992; LEDOUX, 1992a; DAYAS *et al.*, 1999; DAVIS, 2000; RASIA-FILHO *et al.*, 2000; CHOI *et al.*, 2010; DIAZ-MATAIX *et al.*, 2011; JOHNSON *et al.*, 2011; OSTROFF *et al.*, 2011). Por exemplo, frente a um estímulo aversivo

visual ou auditivo, aferências provenientes do tálamo e do córtex cerebral chegam às regiões amigdalianas do AL e do ABL. A seguir são transmitidos principalmente à ACe e esta emite eferências para vários núcleos do hipotálamo e do tronco encefálico, onde as respostas comportamentais relacionadas com medo e as respostas simpáticas e parassimpáticas são organizadas concomitantemente. Isso faz com que o animal pare os demais comportamentos que vinha fazendo e fique preferentemente em posição imóvel, aumente sua atenção em relação ao ambiente, fique taquipnéico e taquicárdico, tenha elevação da PA, possa defecar e urinar ou, ainda aumentar a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH; BENNETT *et al.*, 1985; BEAULIEU *et al.*, 1986; BEAULIEU *et al.*, 1987; AGGLETON *et al.*, 1989; DAVIS, 1992a; ADAMEC *et al.*, 2005a; ADAMEC *et al.*, 2005b; ADAMEC *et al.*, 2011a; ADAMEC *et al.*, 2011b). Não obstante, o MeA também tem relevância na organização dessa resposta comportamental e neuroendócrina ao estímulo estressante (DAYAS *et al.*, 1999; MARCUZZO *et al.*, 2007). A seguir, mais detalhamento será feito para o MeA de ratos.

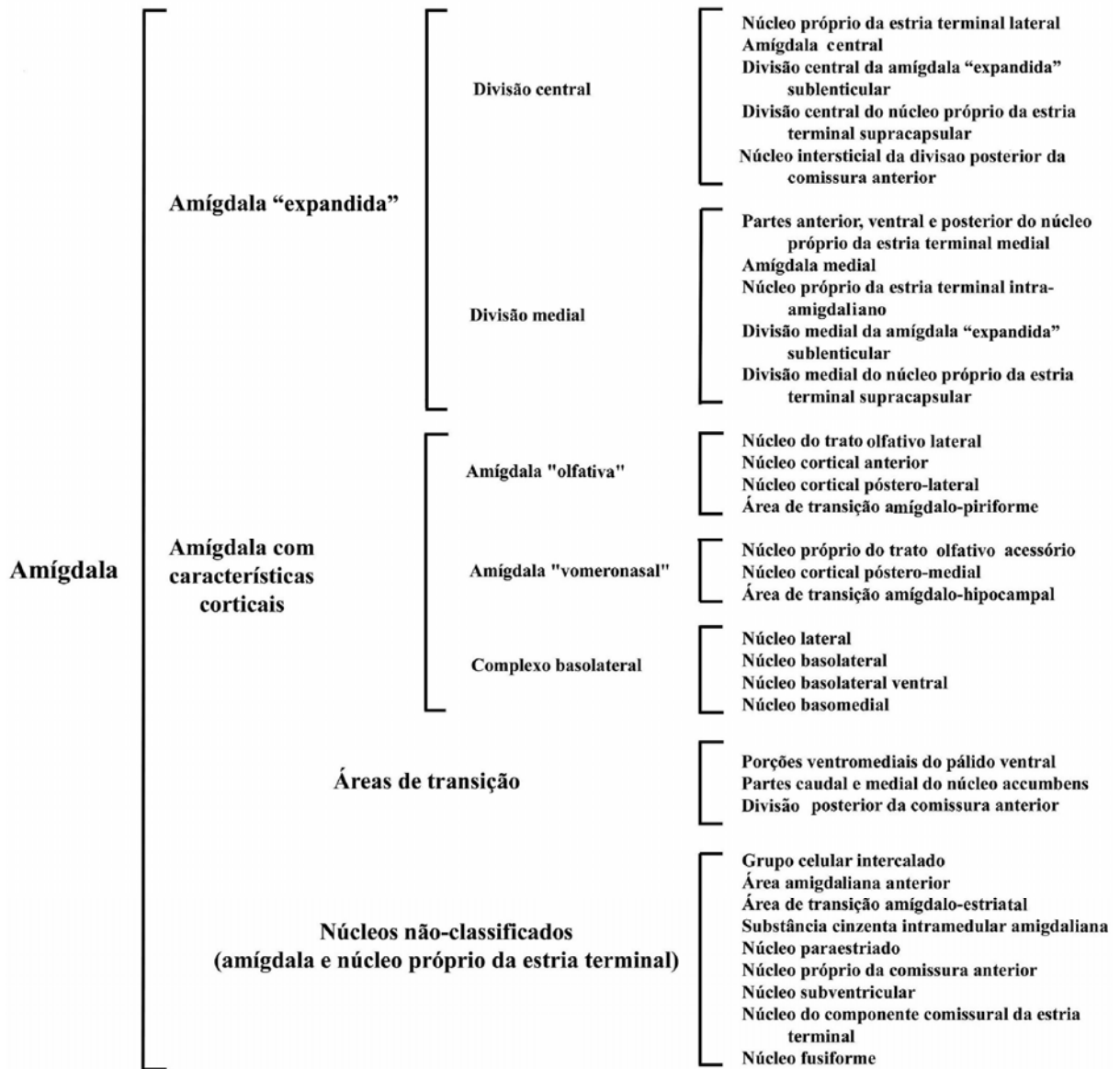


Figura 1 Classificação dos núcleos que compõe a amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais, conforme descrito por Alheid e colaboradores (1995) e modificado por Rasia-Filho e colaboradores (2000); rerepresentado de Quagliotto (2006).

1.2 O NÚCLEO MEDIAL DA AMÍGDALA E SUA SUBDIVISÃO

Em ratos, o MeA é uma estrutura heterogênea que, ao longo de sua extensão, está em contato direto com a região lateral do TO, ventral à estria terminal (ST) em sua parte mais posterior, em posição medial e posterior ao núcleo do trato olfativo e ao hipotálamo anterior e tendo como limite posterior onde surgem as porções temporais dos ventrículos cerebrais (DE OLMOS *et al.*, 2004; Figura 2). O MeA dorsalmente é separado da porção medial do ACe por uma região pobre em células, a qual é substituída mais ventralmente e caudalmente pelo BST (ALHEID *et al.*, 1995). Caudalmente, o grupo de núcleos intercalados da amígdala separa o MeA do ABL. Também caudalmente, e em posição dorsal, grupos de fibras que ascendem dentro da ST são interpostos entre o MeA e outros núcleos amigdalianos (ALHEID *et al.*, 1995; PITKANEN, 2000; PETROVICH *et al.*, 2001; DE OLMOS *et al.*, 2004). O MeA é considerado parte da amígdala “expandida”, conforme mencionado, embora ainda haja controvérsias se o mesmo é uma continuação ventral do estriado ou não (CANTERAS *et al.*, 1995; SWANSON & PETROVICH, 1998; DE OLMOS & HEIMER, 1999; NEUMANN, 2002; CANTERAS *et al.*, 2010). Dados histogenéticos, no entanto, muito recentes não encontraram evidências para uma origem estriatal desse núcleo (BUPESCH *et al.*, 2011).

O MeA é uma estrutura complexa que apresenta subnúcleos com citoarquitetura, conexões e características neuroquímicas e funcionais diferentes, classificados em quatro partes, a saber: subnúcleos ântero-dorsal (AMeAD), ântero-ventral (AMeAV), pósterodorsal (AMePD) e póstero-ventral (AMePV; Figura 2; ALHEID *et al.*, 1995; CANTERAS *et al.*, 1995; PETROVICH *et al.*, 2001; DE OLMOS *et al.*, 2004; RASIA-FILHO *et al.*, 2004a; DALL'OGGIO *et al.*, 2008a; b). O AMeAD consiste basicamente de neurônios de pequeno e médio tamanho de corpo celular, entremeados com alguns de maior porte, e tem uma localização rostro-caudal notável dentro do MeA (ALHEID *et al.*, 1995; RASIA-FILHO *et al.*, 1999). O AMeAV é o menor subnúcleo e o que menos foi estudado até o momento

(CARRILLO *et al.*, 2007; BLAKE & MEREDITH, 2010; 2011). O AMePD, que tem recebido mais atenção recentemente pode ainda ser dividido em três colunas de neurônios, encontrados em posição paralela e lateralmente ao TO e ventralmente à ST (Figura 3; COOLEN *et al.*, 1997a; DE OLMOS *et al.*, 2004). O MePV não tem essa mesma característica colunar, mas parece ter uma parte externa de prolongamentos celulares em torno de uma parte interna onde estão preferentemente os corpos celulares, o que é mais evidente quando se estuda os prolongamentos gliais locais (RASIA-FILHO *et al.*, 2000; MARTINEZ *et al.*, 2006).

Em cortes histológicos coronais corados pela técnica de Nissl, o AMePD aparece com a forma de um triângulo alongado, com uma base ventral que se estende no terço caudal do MeA (ALHEID *et al.*, 1995; DE OLMOS *et al.*, 2004). O AMePD apresenta, como característica citoarquitetônica, uma região de células densas medialmente que se estende superficialmente e profundamente, separada por uma região intermediária de células esparsas e, novamente, uma terceira coluna de células orientada paralelamente e mais lateralmente (ALHEID *et al.*, 1995; DE OLMOS *et al.*, 2004; Figura 3). A parte celular do AMePD é circundada, no seu lado medial, por uma “camada molecular” constituída de poucas células dispersas e que se estreita dorsalmente e rostralmente até desaparecer por completo no AMeAD (DE OLMOS *et al.*, 2004), o que corresponde ao feixe de axônios que formam a via eferente do núcleo próprio da via olfativa acessória (DE OLMOS *et al.*, 2004). De acordo com suas conexões, foi sugerido que o MeA pudesse estar organizado em uma região anterior ou rostral, da qual fariam parte o AMeAD, o AMeAV e o AMePV, e uma região posterior ou caudal, da qual faria parte o AMePD, embora grandemente interconectada com os demais subnúcleos (CANTERAS *et al.*, 1995).

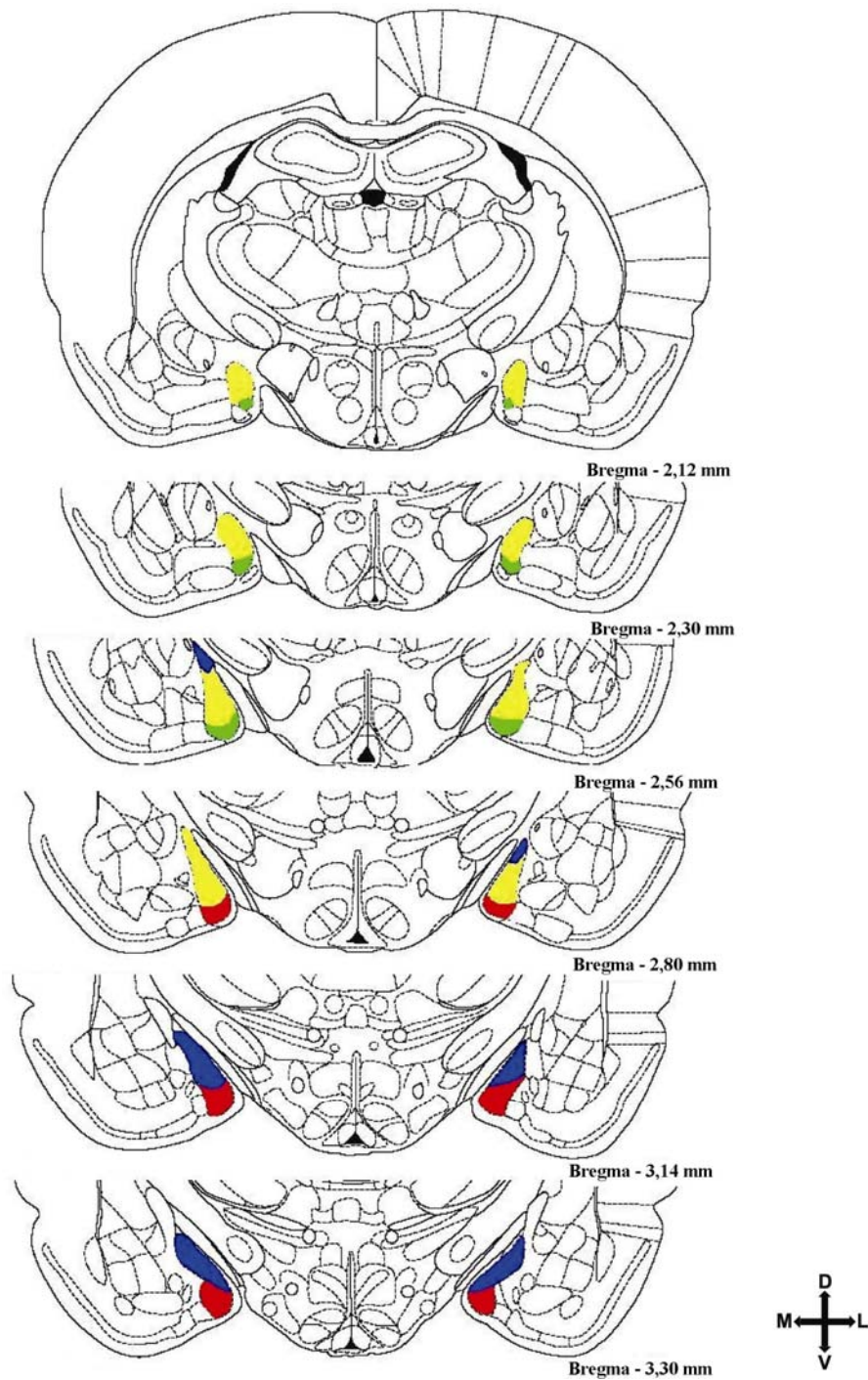


Figura 2 Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar os quatro subnúcleos da amígdala medial, a saber: ântero dorsal (AMeAD, em amarelo), ântero-ventral (AMeAV, em verde), póstero-dorsal (AMePD, em azul) e póstero-ventral (AMePV, em vermelho). Os valores em mm colocados no lado direito das imagens referem-se às distâncias posteriores ao bregma. As coordenadas espaciais referem-se ao hemisfério direito e são dorsal (D), ventral (V), medial (M) e lateral (L). Figuras e abreviaturas baseadas no atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998), rerepresentado de Quagliotto (2006).

Essa divisão rostral tem sido questionada mais recentemente e parece haver inconsistências para sua aceitação (DALL'OGGIO *et al.*, 2008a; b).

1.3 CONEXÕES E CORRELAÇÕES FUNCIONAIS DOS SUBNÚCLEOS DA AMÍGDALA MEDIAL

O MeA de ratos possui uma ampla rede de conexões neurais entre seus subnúcleos, com outros núcleos da amígdala e também com núcleos extra-amigdalianos, o que parece dar sua condição de modular diversos comportamentos sociais e os ajustes homeostáticos ou alostáticos relacionados com essas atividades (ALHEID *et al.*, 1995; CANTERAS *et al.*, 1995; MCDONALD *et al.*, 1999; NEWMAN, 1999; RASIA-FILHO *et al.*, 2011). Os subnúcleos do MeA estabelecem conexões intra-amígdaliana com o AA, o ACe, o ABL, os núcleos corticais, o AL, o núcleo posterior, o AAP e o trato olfatório acessório (CANTERAS *et al.*, 1995). A maioria das aferências neuronais que chegam aos subnúcleos do MeA são provenientes diretamente do AOB, que envolve estímulos dos ferômonios que atuam no órgão vomeronasal; porém, há, ainda, aferências mais modestas de regiões do telencéfalo basal, as quais possuem conexões recíprocas, do tálamo, da região dorsal da ponte relacionada com informações somáticas e viscerais, de grupos celulares da rafe mesencefálica e do *locus ceruleus* (JONES & MOORE, 1977; AZMITIA & SEGAL, 1978; OTTERSEN & BEN-ARI, 1979; OTTERSEN, 1980; 1981; GROVE, 1988; OHTAKE & YAMADA, 1989; HERBERT *et al.*, 1990; JONES *et al.*, 1999; HERBERT *et al.*, 2009; JONES *et al.*, 2010; SOLOMON *et al.*, 2010; CARVALHO-NETTO *et al.*, 2011; HERBERT *et al.*, 2011; MARTINEZ *et al.*, 2011). Outras aferências são provenientes do córtex cerebral pré-frontal, do BST e de vários núcleos do hipotálamo envolvidos com a modulação da atividade neuroendócrina e da emissão de vários comportamentos (ALHEID *et al.*, 1995; CANTERAS *et al.*, 1995;

PITKANEN, 2000), como é o caso da atividade sexual e de aprendizado, onde o componente emocional está envolvido (RASIA-FILHO *et al.*, 1991; CANTERAS *et al.*, 1995; NEWMAN, 1999). No entanto, cada um dos subnúcleos do MeA tem suas próprias conexões características.

O AMeAD recebe projeções da (i) divisão infralimbica do córtex pré-frontal medial, o que pode ser uma área olfativa de ordem superior capaz de integrar informações olfativas com entradas polimodais não olfativa (MCDONALD, 1998), bem como (ii) estímulos socialmente relevantes de ordem vomeronasal e provenientes do AOB (MEREDITH & WESTBERRY, 2004; PERENO *et al.*, 2010). Axônios do AOB também alcançam o AMePD (ICHIKAWA, 1988) ou informações olfativas e vomeronasal também agem sobre outros núcleos da amígdala (por exemplo, o cortical) para fornecer entradas indiretas adicionais para o AMePD (NISHIZUKA & ARAI, 1983; CANTERAS *et al.*, 1992). E conexões extra-amigdalíacas com o AOB, núcleo olfativo anterior, córtex pré-frontal, córtex piriforme, núcleo endopiriforme, a faixa diagonal de Broca, o estriado e o claustró, o núcleo *accumbens*, a área septal, a área entorrinal e o subículo, a substância *inominata*, o BST, vários núcleos hipotalâmicos (pré-óptico, anterior, ventromedial, dorsomedial, lateral, arqueado, periventricular, posterior e pré-mamilar ventral), vários núcleos do tálamo, a substância cinzenta central mesencefálica, a área tegmental ventral e os núcleos da rafe (CANTERAS *et al.*, 1995; GUILLAMON & SEGOVIA, 1997; NEUMANN, 2002; SAHA, 2005). Ademais, outros estudos em ratos indicam que os subnúcleos do MeA projetam-se para núcleos hipotalâmicos envolvidos com diversos comportamentos sociais por via direta ou, indiretamente, via hipocampo ventral (PETROVICH *et al.*, 2001; PETROVICH *et al.*, 2005; PETROVICH & LOUGEE, 2011).

A maioria dos axônios de projeção extra-amigdalíacas deixam os subnúcleos do MeA via ST ou pela “ansa peduncularis” (via amígdalo-fugal) indo, a seguir, em direção a regiões

telecefálicas ou diencefálicas. O AMeAD e o AMePV utilizam como via principal a “ansa pedicularis”, enquanto o AMePD utiliza-se da ST como via eferente proponderante (SWANSON & COWAN, 1979; BENNETT *et al.*, 1985; CANTERAS *et al.*, 1992; PAREDES *et al.*, 2000; DE OLMOS *et al.*, 2004; PERENO *et al.*, 2010).

WOOD e NEWMAN, (1995) propuseram que a região anterior do MeA estaria principalmente sendo influenciada por informações olfativas e a região posterior, pelos hormônios gonadais. Essa divisão anátomo-funcional não é absolutamente restritiva, porque há receptores para esteróides sexuais e conexões sinápticas recíprocas em ambas as regiões do MeA (LEHMAN & WINANS, 1982; OSTERLUND *et al.*, 1998; PAREDES *et al.*, 2000; NEUMANN, 2002). Mesmo assim, poder-se-ia sugerir que as regiões anterior e posterior do MeA fossem estudadas separadamente a fim de que particularidades tanto morfológicas quanto funcionais dessas duas porções pudessem ser melhor detectadas. Isto é, ao contrário de identificar propriedades únicas para uma mesma estrutura heterogênea, com esse maior detalhamento é possível que diferenças sutis entre subnúcleos do MeA possam ser encontradas (LEHMAN & WINANS, 1982; MAREN, 1996; OSTERLUND *et al.*, 1998; NEWMAN, 1999; RASIA-FILHO *et al.*, 1999; RASIA-FILHO *et al.*, 2000; RASIA-FILHO *et al.*, 2004a; ZIMMERMAN & MAREN, 2011). Maior destaque será dado ao conhecimento do AMePD e sua implicação funcional nesta tese. Não obstante, dadas às condições técnicas experimentais durante décadas, muitos resultados foram obtidos para o MeA com um todo. Como esses dados também são relevantes, serão descritos a seguir igualmente.

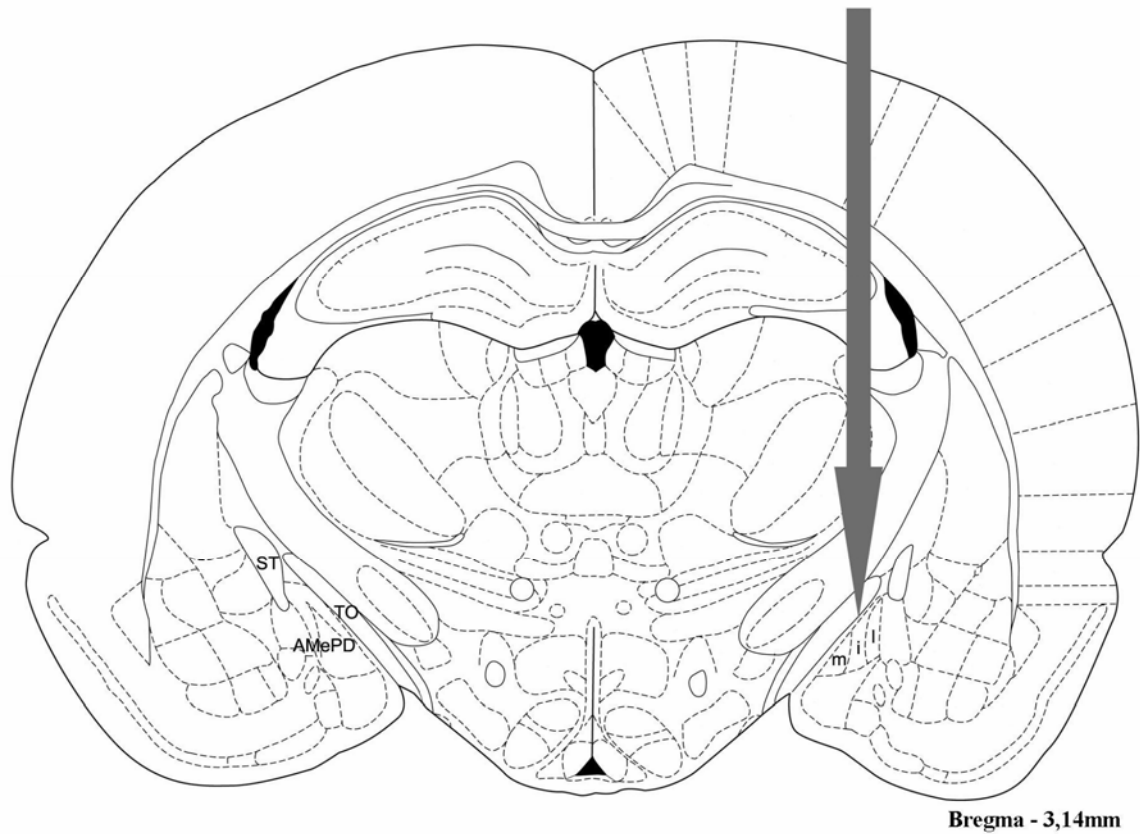


Figura 3 Esquema representativo de corte coronal do encéfalo do rato, 3,14 mm posterior à sutura bregmática, onde se observa a íntima relação existente entre a amígdala medial pósterodorsal (AMePD), o trato óptico (TO) e a estria terminal (ST), demonstrando sua localização, e suas camadas celulares medial (m), intermediária (i) e lateral (l). Adaptada de Paxinos e Watson (1998), reapresentado de Quagliotto (2006).

Neste sentido, os subnúcleos do MeA têm papéis relevantes na interpretação das informações olfativas/vomeronasal e genitosensorial (GUILLAMON & SEGOVIA, 1997; PFAUS & HEEB, 1997; DIELENBERG & MCGREGOR, 2001; MEREDITH & WESTBERRY, 2004), na modulação do comportamento sexual de machos e fêmeas e no comportamento maternal (COOLEN *et al.*, 1996; NEWMAN, 1999; SHEEHAN *et al.*, 2001; RASIA-FILHO *et al.*, 2004a; LEHMANN & ERSKINE, 2005; DE CASTILHOS *et al.*, 2006; DE CASTILHOS *et al.*, 2008), a ocorrência de comportamentos agressivos e defensivos (NEWMAN, 1999; SAVONENKO *et al.*, 1999; RASIA-FILHO *et al.*, 2008), ansiedade e medo condicionado ou inato (BLANCHARD & BLANCHARD, 1972; ADAMEC & MORGAN, 1994; DUNCAN *et al.*, 1996), e respostas neuroendócrinas ao estresse (DAYAS *et al.*, 1999; MARCUZZO *et al.*, 2007).

O MeA também pode modular respostas a estímulos estressantes que são seguidas por respostas neuroendócrinas de ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e, ao mesmo tempo, interagir com os efeitos das catecolaminas e com a corticosterona circulantes. Ou seja, a presença das catecolaminas liberadas pela adrenal na circulação sanguínea é percebida por terminações vagais que atingem o núcleo do trato solitário (NTS) e, deste, gera-se maior atividade aferente ao complexo amigdaliano (MCGAUGH, 1992; ROOZENDAAL *et al.*, 2009b; MCREYNOLDS *et al.*, 2010; SIMMONS & YAHR, 2011). Isso modifica a ação do MeA e do ABL na consolidação de memórias condicionadas conjugando-se, em paralelo, respostas inatas e aprendidas (ALLEN & ALLEN, 1974; BENNETT *et al.*, 1985; BEAULIEU *et al.*, 1987; AGGLETON *et al.*, 1989; MCGAUGH, 1992; CANTERAS *et al.*, 1995; ROOZENDAAL & MCGAUGH, 1996; SAJDYK & SHEKHAR, 1997; HATFIELD & MCGAUGH, 1999; DAVIS & SHI, 2000; EBNER *et al.*, 2000; SINGEWALD *et al.*, 2000; ROOZENDAAL *et al.*, 2009b; RAY *et al.*, 2011; SIMMONS & YAHR, 2011). Tal ação foi notavelmente observada em situações emocionalmente intensas como a exposição do animal

ao seu predador natural (HARVEY *et al.*, 1984; KLING & BROTHERS, 1992; MCGAUGH, 1992; KNUEPFER *et al.*, 1995; ROOZENDAAL & MCGAUGH, 1996; MARTINA *et al.*, 1999; ROOZENDAAL *et al.*, 2009a; ROOZENDAAL *et al.*, 2009b). É interessante que, em ratos, a lesão do ACe, do MeA e do ACo aumentou a investigação social em seus próprios predadores (BLANCHARD & BLANCHARD, 1972; YOUNG & LEATON, 1996; FERRIS *et al.*, 2008) e gerou uma perda total da retenção da informação necessária para a adaptação comportamental relacionada com a dominação social (BOLHUIS *et al.*, 1984). O MeA constitui-se no primeiro componente facilitatório do sistema límbico para a ocorrência do comportamento defensivo e o ataque predatório (QUIRK *et al.*, 1995; PREWITT & HERMAN, 1997; 1998; RADLEY & MORRISON, 2005; SIERRA-MERCADO *et al.*, 2011). De forma concordante, lesões excitotóxicas no MeA de ratos suprimiram respostas do eixo HPA quando os animais foram expostos a um evento estressor (isolamento social do animal estudado), bloqueando também a liberação de ocitocina (OT) nos núcleos supra-óptico e paraventricular do hipotálamo (ITOH *et al.*, 1991; MIYATA *et al.*, 1995; DAYAS *et al.*, 1999; SHIRASU *et al.*, 2011). De forma muito importante, o MeA é uma área relevante na amígdala responsável pelo controle do HPA e pelas respostas secretórias ocitocinérgicas frente a um evento estressor emocional incondicionado (DAYAS *et al.*, 1999). Como observado em testes de esquiva inibitória (BEAULIEU *et al.*, 1986; BEAULIEU *et al.*, 1987; MCGAUGH, 1992; MCGAUGH *et al.*, 1996; ROOZENDAAL & MCGAUGH, 1996; SIMMONS & YAHR, 2011), nas respostas neuroendócrinas a um evento estressor, e em uma série de testes de comportamentos sociais, tais como o agressivo, defensivo e sexual, há modificações marcantes nas atividades cardiovasculares basais e em suas respostas reflexas relacionadas com esses comportamentos, o que indica a necessidade de ajustes homeostáticos serem concomitantes à emissão de tais atividades (HARVEY *et al.*, 1984; GELSEMA *et al.*, 1987; TIMO-IARIA, 1988; MCGAUGH, 1992; ROOZENDAAL & MCGAUGH, 1996;

RASIA-FILHO *et al.*, 2000; RASIA-FILHO, 2006). Esse é um dos motivos da presente tese: estudar as alterações cardiovasculares possivelmente gerados por subnúcleos do MeA. Porém, é preciso descrever quem poderia ser o subnúcleo mais envolvido nesta modulação.

O papel do MeA no comportamento sexual pode ser influenciado por hormônios gonadais (MASCO & CARRER, 1984; RASIA-FILHO *et al.*, 1991; ROBBINS & EVERITT, 1996; GUILLAMON & SEGOVIA, 1997; KONDO *et al.*, 1998; VINADER-CAEROLS *et al.*, 1998; NEWMAN, 1999; KONDO & SAKUMA, 2005; DHUNGEL *et al.*, 2011). A lesão da parte anterior do MeA e do ACO diminuiu a ocorrência de comportamento sexual em ratas, a estimulação dessas mesmas regiões promoveu o efeito oposto (MASCO & CARRER, 1980; 1984). Em machos, a lesão da região posterior do MeA prejudicou a ocorrência de ejaculação (HARRIS & SACHS, 1975; VOCHTELOO & KOOLHAAS, 1987). Já a estimulação dessa mesma região provocou comportamento e registros eletroencefalográfica praticamente indistinguíveis da atividade pós-ejaculatória em ratos (KONDO *et al.*, 1998; SMOCK *et al.*, 1998; DHUNGEL *et al.*, 2011). Mais especificamente, é o AMePD quem apresenta grande papel na modulação do comportamento sexual em ratos (DE CASTILHOS *et al.*, 2006). Notavelmente, o AMePD, além de ter conexão sináptica com o AL, o ABL e o ACe dentro do próprio complexo amigdaliano, estabelece conexões sinápticas recíprocas com o córtex entorrinal, o qual envia conexões para os componentes do sistema olfativo, inclusive o ABL (CANTERAS *et al.*, 1995; SMITH & DUDEK, 1996; VINADER-CAEROLS *et al.*, 1998; PETROVICH *et al.*, 2001; PETROVICH & LOUGEE, 2011). O AMePD é influenciado por informações vomeronasais provenientes do AOB que chegam primeiramente no AMeAD (BRESSLER & BAUM, 1996; GUILLAMON & SEGOVIA, 1997; MCDONALD, 1998; BACCIOTTINI *et al.*, 2002; MEREDITH & WESTBERRY, 2004; BLAKE & MEREDITH, 2010; 2011). Este, por sua vez, reconhece a relevância social do estímulo olfativo e, via núcleos intercalados da amígdala, determinam se o AMePD será

estimulado ou não (BRESSLER & BAUM, 1996; GUILLAMON & SEGOVIA, 1997; MCDONALD, 1998; BACCIOTTINI *et al.*, 2002; MEREDITH & WESTBERRY, 2004; BLAKE & MEREDITH, 2010; BLAKE & MEREDITH, 2011). A seguir, tanto o AMeAD e o AMePD, conjugam informações olfativas oriundas do órgão vomeronasal e do bulbo olfativo, que afetam a atividade de áreas motoras e neuroendócrinas do hipotálamo e também do tronco encefálico (LEHMAN & WINANS, 1982; FISHER & BROWN, 1991; CANTERAS *et al.*, 1995; KONDO *et al.*, 1998; KRUKOFF, 1998; FERGUSON & LATCHFORD, 2000; DOMINGUEZ & HULL, 2001; FERGUSON *et al.*, 2001; PETROVICH *et al.*, 2001; KONDO & SAKUMA, 2005; SHIN *et al.*, 2008; DHUNGEL *et al.*, 2011). Essas projeções são enviadas diretamente para os núcleos hipotalâmicos (CANTERAS *et al.*, 1995; PETROVICH *et al.*, 2001; CAVALCANTE *et al.*, 2006; DONATO *et al.*, 2010) ou, indiretamente, via componentes do BST (DONG *et al.*, 2001; POLSTON *et al.*, 2001). No hipotálamo, eferências do AMePD atingem o núcleo periventricular ântero-ventral, os núcleos da área pré-óptica, o núcleo anterior (embora aparentemente com fibras de passagem), a cápsula em torno da parte central e ventrolateral do núcleo ventromedial, as regiões adjacentes do núcleo tuberal, e o núcleo ventral pré-mamilar, as regiões adjacentes à parte ventral do núcleo posterior, o entorno da região caudal do núcleo mamilar medial e o núcleo supramamilar (CANTERAS *et al.*, 1995). Várias dessas regiões relacionam-se à emissão do comportamento sexual masculino, colocando o AMePD como uma estrutura relevante para a geração desta atividade (NEWMAN, 1999; DE CASTILHOS *et al.*, 2006).

Ademais, a existência de uma circuitaria neural envolvida com a geração de comportamentos defensivos a gênese ou a modulação a elaboração de estados emocionais aversivos, poderia envolver os núcleos do hipotálamo medial, os subnúcleos do MeA conjuntamente com outros núcleos amigdalianos, a substância cinzenta periqueadutal dorsal, o colículo inferior e camadas do colículo superior (HATFIELD & MCGAUGH, 1999). Esse

circuito processaria principalmente estímulos e respostas comportamentais incondicionadas, produzindo um aumento da atividade dirigida para o ataque ou a fuga, além de estímulos condicionados que produziram comportamentos de esquiva ou de “freezing” (HATFIELD & MCGAUGH, 1999). A estimulação elétrica em várias dessas estruturas produz um padrão característico de respostas com atividade motora intensa, incluindo corridas e saltos nas caixas de observação, além de aumento da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial (PA) (GELSEMA *et al.*, 1987; CHEN & HERBERT, 1995; COOLEN *et al.*, 1996; COOLEN *et al.*, 1997a; COOLEN *et al.*, 1997b; TOYODA *et al.*, 2011). A reação de defesa é o resultado de alterações do padrão comportamental e cardiovascular frente a estímulos ameaçadores ou estressantes. É interessante notar que respostas condicionadas como aumento da PA, bradicardia e antinocicepção ficam muito diminuídas após lesão ampla da amígdala (IWATA *et al.*, 1987; KAPLAN, 2001). Diferentes projeções eferentes amigdalianas parecem mediar as respostas de medo. Projeções para o núcleo pontino caudal medeiam o sobressalto potencializado pelo medo, eferências para o hipotálamo lateral e para o bulbo relacionam-se às respostas cardiovasculares e, projeções para a substância cinzenta periqueadotal são críticas para comportamentos de “freezing”, à “fuga ou luta” e à antinocicepção relacionada à estimulação estressante intensa (LEDOUX, 1994; BUSH *et al.*, 2010; DEBIEC *et al.*, 2010; DIAZ-MATAIX *et al.*, 2011; JOHNSON *et al.*, 2011; OSTROFF *et al.*, 2011). Ademais, as áreas do SN central envolvidas nessas atividades relacionam-se com aferências espinais somática, que trafegam em conjunto com fibras simpáticas, ou com as regiões que integram informação visceral aferente por via vagal ou glossofaríngea (DAVIS, 1992c; LEDOUX, 1994; LAWRENCE, 1995; TAKENAKA *et al.*, 1996; SCHAFFAR *et al.*, 1997; OBERTO *et al.*, 2001; ANDRADE-FRANZE *et al.*, 2010a; ANDRADE-FRANZE *et al.*, 2010b; ANDRUS *et al.*, 2010; BUSH *et al.*, 2010; DIAZ-MATAIX *et al.*, 2011; JOHNSON *et al.*, 2011; OSTROFF *et al.*, 2011). Por sua relação funcional, o AMePD pode ser candidato a

participar deste circuito e seu papel na modulação do comportamento agressivo mas, não interessante, de medo inato como demonstrado recentemente (RASIA-FILHO *et al.*, 2011).

Os dados hodológicos acima mencionados são relevantes para entender a demanda sináptica que é integrada no tempo e no espaço pelos neurônios de acordo com cada situação em curso (NEWMAN, 1999; RASIA-FILHO, 2006). Um esquema funcional que busca elucidar o papel do AMePD deve considerar que os neurônios atuam em circuitos paralelos e sobrepostos que podem ter funções moduladoras envolvidas com diferentes comportamentos sociais (NEWMAN, 1999; RASIA-FILHO *et al.*, 2009; RASIA-FILHO *et al.*, 2011). Isso coloca o AMePD em circuitos neurais que fazem o animal perceber e avaliar estímulos sensoriais relevantes e selecionar o comportamento mais adequado (ou possível) dentre o repertório dessas atividades (RASIA-FILHO, 2006; RASIA-FILHO *et al.*, 2009).

Também é plausível supor que a regulação cardiovascular destina-se a respostas hemodinâmicas apropriadas durante a geração e a execução de vários comportamentos sociais (RASIA-FILHO, 2006; LONGHURST, 2008; QUAGLIOTTO *et al.*, 2008). O controle central do sistema cardiovascular envolve dois conjuntos de elementos interativos funcionais: um constituído de áreas do SN central que mantém atividade basal ou tônica simpática/parassimpática para o coração e leitos vasculares enquanto o outro se relaciona com informações sensoriais fásicas para modular a atividade neural que atinge os órgãos efetores (LONGHURST, 2008). Neste último, por exemplo, reflexos neurais a curto prazo envolvem os barorreceptores carotídeos e aórticos e as vias neuronais dos quimiorreceptores periféricos que convergem principalmente a áreas do tronco encefálico, embora outras regiões do prosencéfalo também sejam relevantes para a resposta cardiovascular final (LONGHURST, 2008). Barorreceptores respondem tanto ao aumento e quanto à diminuição PA e quimiorreceptores periféricos são sensíveis à pressão parcial de dióxido de carbono, à pressão parcial de oxigênio, e ao pH sanguíneos, entre outros estímulos químicos e não químicos

(LONGHURST, 2008). Respostas mediadas e em decorrência da ação do barorreflexo ajustam a FC, a resistência vascular e o sistema renina-angiotensina às mudanças dos valores pressóricos; o quimiorreflexo promove alteração na ventilação e modula respostas simpáticas para modificar o débito cardíaco e a vasoconstrição parassimpáticas na FC (TURNER *et al.*, 1986; LONGHURST, 2008; QUAGLIOTTO *et al.*, 2008). Como será descrito a seguir, atuando em uma rede funcional, vários núcleos do SN central contribuem com ajustes neurais e hormonais de variáveis cardiovasculares. Entre elas, as projeções do MeA inervam áreas previamente envolvidas com a organização central cardiovascular (CANTERAS *et al.*, 1995; PETROVICH *et al.*, 2001), tais como: (1) o ACe e cuja ativação elétrica levou a uma maior FC, primeiro devido à diminuição da atividade vagal e, posteriormente, a um aumento do tônus simpático (TURNER *et al.*, 1986); (2) as células noradrenérgica A1 do bulbo ventrolateral caudal e, (3) as células A2 noradrenérgica do NTS (CANTERAS *et al.*, 1995; DAYAS *et al.*, 1999; DAYAS & DAY, 2002; SAHA *et al.*, 2005). O AMePD também inerva as partes neuroendócrinas e simpática/parassimpática relacionadas com a zona periventricular do hipotálamo de ratos (PETROVICH *et al.*, 2001), que poderia permitir um papel integrador das respostas cardiovasculares em associação com a ocorrência de comportamentos (QUAGLIOTTO *et al.*, 2008; DAVERN *et al.*, 2010; DAVERN & HEAD, 2011). Assim, o AMePD parece estar envolvido na regulação da FC e PA em condições adaptativas e patológicas (KUBO *et al.*, 2004; QUAGLIOTTO *et al.*, 2008). Por exemplo, a estimulação elétrica do AMePD aumentou a PA em camundongos e lesões bilaterais do AMePD por agentes neurotóxicos atenuou o desenvolvimento do aumento da PA em ratos espontaneamente hipertensos (FUKUMORI *et al.*, 2004). O controle neural da atividade cardiovascular precisa ser mais detalhado e, a seguir, quais são os transmissores químicos candidatos à modulação dessa atividade no AMePD de ratos.

1.4 CONTROLE NEURAL DO SISTEMA CARDIOVASCULAR

Conforme revisado por (RASIA-FILHO *et al.*, 2004b), os animais estão submetidos a situações tanto de origem interna como advindas do meio externo que requerem modificações homeostáticas ou adaptativas, imediatas ou a longo prazo, na atividade cardiovascular. Neste sentido, a pressão de perfusão para os diversos órgãos deve ser ajustada a partir de um valor basal e de acordo com necessidades variáveis. Os ajustes cardiovasculares podem ocorrer por respostas reflexas (ajustados por mecanismo de retroação) e/ou por mudanças que precedem ou são concomitantes à ocorrência dos mais diversos reflexos e comportamentos (TIMO-IARIA, 1988; RASIA-FILHO, 2006; LONGHURST, 2008).

As regiões do seio carotídeo e também do arco aórtico apresentam grande número de estruturas sensíveis a mudanças de pressão no interior desses vasos. Tais estruturas se comportam como mecanorreceptores estimulados pela deformação da parede do vaso, e, com isso, percebem modificações da tensão sobre sua parede (DALL'AGO *et al.*, 1997; DALL'AGO *et al.*, 2007). O reflexo mediado pelos barorreceptores é responsável por controlar alterações abruptas da PA e, desta forma, manter os níveis dentro de limites estreitos para gerar perfusão tecidual de maneira adequada, assegurando o metabolismo local em função da necessidade de cada tecido (HALL, 1999; GANONG, 2003).

As informações originadas nos barorreceptores são transmitidas pelo nervo glossofaríngeo, no caso dos receptores carotídeos, e pelo nervo vago, no caso dos receptores aórticos, até o NTS (LONGHURST, 2008). Desta forma, aumentos na PA resultam em aumentos na frequência de potenciais de ação ao longo dessas vias e reduções na PA geram o efeito oposto. A partir do NTS os neurônios de segunda-ordem nesta via se projetam para várias regiões encefálicas incluindo-se vários núcleos do hipotálamo, regiões do mesencéfalo e outros grupos de neurônios bulbares, como anteriormente discutido. Todas essas estruturas são importantes locais de controle da atividade simpática e parassimpática. Os barorreceptores

arteriais geram um efeito inibitório tônico sobre o tônus simpático, controlando desta forma a resistência periférica total (RPT) e o débito cardíaco (TIMMERS *et al.*, 2003). Outras evidências, no entanto, demonstram que a modulação da FC pelos barorreceptores é devida primariamente à estimulação de neurônios vagais localizados no núcleo ambíguo (NA) e no núcleo motor dorsal do vago (DMV; SPYER, 2002; SPYER & GOURINE, 2009). Conseqüentemente, a disfunção dos barorreceptores associa-se com aumentos da atividade simpática e principalmente, reduções da atividade parassimpática, aumentando a FC e elevando a variabilidade da PA, o que tem consequências importantes no controle cardiovascular. É interessante notar que a sensibilidade do barorreflexo pode ser modificada durante a ocorrência de diversos comportamentos, como no sono, notavelmente nas execuções de comportamentos de defesa ou em exercícios físicos (RASIA-FILHO, 2006). Por exemplo, durante o sono sincronizado profundo (de ondas lentas), a PA, a FC e a atividade simpática normalmente diminuem. Por outro lado, nos períodos do sono dessincronizado ocorre um aumento da FC e da atividade simpática, juntamente com variações que podem ser amplas da PA e da respiração (MIFFLIN *et al.*, 1988; THAMES *et al.*, 1994; SAHA *et al.*, 2000; DAMPNEY *et al.*, 2002; MCKINLEY *et al.*, 2003; SAHA, 2005; SAHA *et al.*, 2005). Essas variações são relevantes também quando se estuda animais anestesiados, (dependendo da ação de cada anestésico) ou em vigília.

Os quimiorreceptores periféricos localizados no corpo carotídeo e no arco aórtico são importantes para ajustes ventilatórios em resposta à hipercapnia, à hipoxemia e à redução do pH plasmático. Além disso, essas respostas são mediadas pela interação entre os quimiorreceptores periféricos e centrais. Hipercapnia e acidose também aumentam a atividade dos quimiorreceptores periféricos e essas condições potencializam o efeito da hipóxia. As aferências dos quimiorreceptores carotídeos e aórticos chegam ao NTS pelos nervos glossofaríngeo e vago, respectivamente. No bulbo essas aferências desencadeiam aumento da

ventilação, aumento da atividade simpática periférica e aumento da atividade vagal no coração (THAMES *et al.*, 1994). A resultante disso promove uma menor FC, mas um volume de ejeção maior por aumento da força contrátil cardíaca. O papel funcional dessas adaptações envolve a manutenção das trocas gasosas (aumento da ventilação), manutenção da perfusão em órgãos vitais como o coração e o SN central, o que pode causar vasoconstrição em leitos vasculares momentaneamente não tão vitais como músculos esqueléticos, mesentério e rins, juntamente com vasodilatação coronariana (por ativação vagal cardíaca) e vasodilatação em território nervoso (por causa metabólica).

Historicamente, porém, o bulbo foi considerado como o principal local de integração de informações para uma ação tônica ou fásica sobre o sistema cardiovascular. Isso fez com que se cunhasse, em certo período, o termo “centro”. O conceito de “centro”, que sugere que uma função está restrita a uma única região e que a periferia tem ação menos importante, pode fazer com que não se compreenda a organização longitudinal e integrada das diversas áreas do SN central e periférico necessárias para a elaboração de um resultado final adequado a cada momento. Preferentemente, há estruturas interconectadas na direção rostro-caudal formando circuitos, pois que não seriam poucos os “centros” nomeados assim com o sentido de “local de convergência” de informação (TURNER *et al.*, 1986; DALL'AGO *et al.*, 1997; RASIA-FILHO *et al.*, 2004a; DALL'AGO *et al.*, 2007). Sobre o bulbo será feita uma breve revisão funcional, o que servirá para os comentários sobre o AMePD a seguir.

A concepção sobre o mecanismo de controle neural da atividade cardiovascular modificou-se nas últimas décadas. Como mencionado, atualmente se aceita que existam dois mecanismos interativos geradores e/ou reguladores da PA: um que consiste de áreas do SN central que mantêm uma atividade tônica ou basal (com células marca-passo ou em circuitos geradores de atividade) e que, pelos sistemas parassimpático e simpático, influenciam

continuamente o coração e os vasos sanguíneos e, outro, que atua de maneira fásica e individualizada nos órgãos-alvo, como nos reflexos cardiovasculares. O desafio é descobrir e testar quem medeia cada atividade. Há como considerar que o primeiro mediador da PA seja a função renal e sua capacidade de excreção diária de sódio, cloro e água, para o que importa a hemodinâmica renal e as ações neurais e hormonais sobre este órgão (HALL, 1999). Este ponto não será explorado nesta tese, embora seja muito relevante.

Já está bem estabelecido que vias neurais que chegam ao encéfalo são capazes de modificar a atividade cardiovascular, compor circuitos envolvidos com reflexos somáticos e viscerais e gerar atividade integrada comportamental no indivíduo (TIMO-IARIA, 1983; TIMO-IARIA, 1988; TIMO-IARIA, 1999). Por exemplo, as vias nociceptivas que ascendem pelo trato espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico e espinosolitário, dentre outras, geram colaterais ou se terminam em áreas do tronco encefálico e tálamo que promovem respostas simpáticas e parassimpáticas relacionadas com o estímulo percebido (ALMEIDA *et al.*, 2004). Neurônios do trato espinoreticular são sensíveis a estímulos químicos (bradicinina) ou mecânicos ventriculares (sístoles “prematuros”) e projetam-se indiretamente para a região intralaminar do tálamo, a qual está relacionada com a elaboração de emoções (LONGHURST, 2008). O trato espinomesencefálico atua, em parte, na região cinzenta periaquedutal onde estão neurônios relacionados com resposta de fuga ou imobilidade comportamental mais os ajustes cardiovasculares necessários para tanto (BANDLER *et al.*, 2000). Outras regiões do SN central estão envolvidas com a modulação das emoções e sua estimulação cursa com alterações comportamentais e cardiovasculares como é o caso do córtex límbico e sua relação com vários núcleos hipotalâmicos (GANONG, 2003). Da mesma forma, a estimulação de alguns núcleos na amígdala pode também gerar taquicardia em ratos e no ser humano, dentro de um conjunto de manifestações relacionadas com medo (RASIA-FILHO *et al.*, 2000). Adicionalmente, a atividade cardiovascular participa

da plena e adequada elaboração da motricidade voluntária, como na execução de um exercício, onde atuam o córtex motor, pré-motor e motor suplementar e os campos H1 e H2 de Forel (no subtálamo) juntamente com informações proprioceptivas e de quimiorreceptores da musculatura esquelética (LONGHURST, 2008).

É, todavia, no NTS que chegam fibras mielinizadas e não mielinizadas provenientes dos barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares (MICHELINI & MORRIS, 1999) e que utilizam GLU como neurotransmissor (ou também catecolaminas, acetilcolina, GABA, substância P, angiotensina, óxido nítrico e opióides). O NTS recebe informações convergentes, sobre grandes vasos sangüíneos, sobre a atividade cardíaca, os pulmões e o trato gastrointestinal (TIMO-IARIA, 1988; DALL'AGO *et al.*, 1997; MATSUMURA *et al.*, 1999; MIYAWAKI *et al.*, 2002; RASIA-FILHO *et al.*, 2004b; DALL'AGO *et al.*, 2007). Associam-se outras áreas do tronco encefálico para a gênese e o controle da PA, a saber: um grupo neuronal localizado na região bulbar ventrolateral (BVL), caudal (BVLc), que contém neurônios noradrenérgicos na região A1, mas também de outros tipos na região retro-periambigual e periambigual caudal, outro na região bulbar ventrolateral rostral (BVLr), igualmente chamado de núcleo retrofacial e cuja localização coincide com a dos neurônios adrenérgicos da região C1), o núcleo parabraqüial na ponte, o campo tegmental lateral, a área postrema e os núcleos vestibulares (LONGHURST, 2008). O NTS estimula diretamente o BVLc (por ação do GLU e da angiotensina II; Ang II) e este, por sua vez, inibe o BVLr e o grupamento celular A5 na parte rostral do bulbo ventro-lateral. A região BVLr emite projeções diretas para as regiões da medula espinal (é a principal origem dos axônios da via simpática retículo-espinal e que se termina principalmente na coluna intermédio-lateral da medula espinal) que, em conjunto, são tônicas na atividade simpática responsável pela manutenção da PA e críticas para a ocorrência dos reflexos cardiovasculares (DALL'AGO *et al.*, 1997; MICHELINI, 1999; DALL'AGO *et al.*, 2002; RASIA-FILHO *et al.*, 2004b;

DALL'AGO *et al.*, 2007; LONGHURST, 2008; MICHELINI & STERN, 2009; CAVALLERI *et al.*, 2011). É notável que neurônios nesta região tenham potenciais de ação marca-passo e sincronizados com o ritmo cardíaco. Coadjuvantes na gênese da atividade simpática estão outros agrupamentos de neurônios na região bulbar ventromedial rostral, na região noradrenérgica A5 na ponte, na região da rafe caudal e no núcleo paraventricular hipotalâmico. Apresentando atividade marca-passo em circuito estão o BVLr, o núcleo da rafe caudal, as regiões pontinas caudal ventro-lateral e dorso-lateral, o campo tegmental lateral e, possivelmente, o BVLC servindo para manter a atividade tônica simpática (LONGHURST, 2008; GUO *et al.*, 2009).

A estimulação da região BVLr promove aumento da FC, do volume de ejeção e da RPT, o que deve aumentar a PA. Das várias aferências que chegam ao BVLr, a proveniente da região BVLC é capaz de reduzir o tônus simpático e a PA e utiliza como neurotransmissor o GABA (LONGHURST, 2008; FU & LONGHURST, 2009). Ademais, o NTS também estabelece conexão com os núcleos da rafe, o ACE, núcleos hipotalâmicos como o paraventricular (e dele com a região ântero-ventral do terceiro ventrículo) e supra-óptico (supostamente para regulação da liberação de vasopressina, conjuntamente com a atividade do grupo celular A1), a região hipotalâmica lateral, a substância cinzenta mesencefálica e o *locus ceruleus*. Por outro lado, em situações de aumento súbito da PA, e por aumento da excitação dos barorreceptores, o NTS é excitado e estimula o núcleo dorsal do vago (DMV) e o NA os quais, por sua vez, geram aumento do tônus parassimpático. Alguns neurônios desses núcleos têm atividade sincronizada com o ciclo cardíaco; estão sob ação do GABA, da galanina, da serotonina, de opióides e do peptídeo relacionado com o gene da calcitonina; e, recebem aferências dos barorreceptores, quimiorreceptores periféricos, receptores cardíacos e do nervo trigêmio. É interessante notar que a estimulação elétrica do NA no lado direito é capaz de

diminuir a atividade sinusal enquanto no lado esquerdo inibe a condução pelo nodo átrio-ventricular (VIARD *et al.*, 2002; LONGHURST, 2008).

Dessa forma, nesse circuito, quando a PA aumenta, excitam-se os núcleos relacionados com a resposta mediada pelo sistema parassimpático no coração e, via BVLc, inibe-se o BVLr reduzindo-se, assim, ao mesmo tempo e de maneira colaboradora para um resultado final, a atividade simpática sobre coração e vasos sanguíneos (MICHELINI *et al.*, 1999; DALL'AGO *et al.*, 2003; RASIA-FILHO *et al.*, 2004b; DALL'AGO *et al.*, 2007 MICHELINI *et al.*, 2009) e, para comentário adicional, veja-se (RASIA-FILHO, 2006). E o oposto é verdadeiro quando há diminuição da PA, necessitando-se, portanto, que ocorra aumento da atividade simpática e diminuição da atividade parassimpática (esta provavelmente também por ação do neuropeptídeo Y que é co-liberado nas terminações simpáticas; GANONG, 2003). Para uma resposta completa e eficaz, os barorreceptores também afetam a liberação de vários hormônios que modulam a PA. É o caso, por exemplo, da liberação de adrenalina pela medula adrenal, da vasopressina e do aumento dos níveis plasmáticos de renina (em parte por ação simpática). Assim, por efeito das catecolaminas circulantes há aumento do débito cardíaco (e veja-se a ação da adrenalina e da noradrenalina sobre seus receptores), mas diferentes efeitos sobre os diversos leitos vasculares (DALL'AGO *et al.*, 2003; DALL'AGO *et al.*, 2007).

Estudos anteriores com estimulação elétrica da amígdala (como um todo) em gatos e macacos geraram freqüentemente diminuição na PA, mas aumentos nessa variável quando as frequências dos estímulos passavam a ser mais altas (CECHETTO *et al.*, 2001; ALMAGUER-MELIAN *et al.*, 2010). Em gatos anestesiados, um estímulo de baixa intensidade produzia aumento na PA quando os eletrodos estavam localizados na sua região dorso-medial, enquanto uma resposta hipotensora era evocada na região lateral da amígdala (GALENO *et al.*, 1983; FRYSSINGER *et al.*, 1984; RANDALL, 1984; SHARMA *et al.*, 1995;

GESELMA, 1987; IWATA, 1987; SATO, 2001; CECHETTO *et al.*, 2001; SALEH *et al.*, 2003; LUZ *et al.*, 2007). Em macacos, a estimulação do ACe primariamente produzia um aumento na FC e na PA, já a ativação do ABL provocava bradicardia (GALENO *et al.*, 1983; FRYSINGER *et al.*, 1984; IWATA, 1987; GESELMA, 1987; SATO, 2001; CECHETTO *et al.*, 2001; LUZ *et al.*, 2007; SHIRASU *et al.*, 2011). Outros estudos têm demonstrado que a estimulação elétrica e química do MeA desencadeia mudanças na FC e na PA em animais normotensos e hipertensos (GALENO *et al.*, 1983; GESELMA, 1987; IWATA, 1987; SHARMA *et al.*, 1995). O MeA, em conjunto com o septo lateral, a área pré-óptica medial (MPOA), o hipotálamo anterior, o VMN (núcleo ventromedial hipotalâmico) e o hipotálamo ventrolateral, a substância cinzenta periqueadutal e o tegmento adjacente formam um circuito integrado que influencia uma variedade de comportamentos sociais que dependem de ajustes cardiovasculares amplos para sua ocorrência (SWANSON *et al.*, 1979; CANTERAS *et al.*, 1995; SWANSON & PETROVICH, 1988; COLEEN *et al.*, 1998; SIMERLY, 2004; RODAROS *et al.*, 2007; COOKE & WOOLLEYCOOKE, 2005; CANTERAS *et al.*, 2010). Como exemplo, a administração intra-amigdaliana de fenilefrina, substância simpático-mimética, causa aumento da PA e é capaz de gerar respostas simpáticas sistêmicas implicando os diversos núcleos da amígdala na patogênese da hipertensão arterial em ratos (SINGEWALD *et al.*, 2000; TASAN *et al.*, 2010).

Conjuntamente com o MeA (nesses experimentos sem considerar sua subdivisão), e dele recebendo aferências, o ACe projeta extensivamente para o núcleo dorsal medial do tálamo, o qual se conecta com o córtex infralímbico e insular, formando um circuito responsável pela integração ou mesmo iniciação de respostas homeostáticas ou adaptativas em muitas variáveis orgânicas (GALENO & BRODY, 1983; DAVIS, 1992; CECHETTO & GELB, 2001; LUZ *et al.*, 2007; SHIRASU *et al.*, 2011). De fato, o ACe envia projeções para vários núcleos hipotalâmicos e núcleos bulbares envolvidos nas funções cardiovasculares

como, por exemplo, BVL (SAHA *et al.*, 2000; SAHA *et al.*, 2005a; b). Além das projeções do MeA, direta ou indiretamente para núcleos do hipotálamo relacionados com o controle cardiovascular, há conexões com o núcleo parabraquial (NPB), o NTS e o DMV, estruturas que promovem o controle da atividade do coração, vasos sanguíneos e rins (SILVERMAN *et al.*, 1981; TRIBOLLET & DREIFUSS, 1981; DAVIS, 1992; MACHADO & BONAGAMBA, 1992; ONAT *et al.*, 1998; KARSON *et al.*, 1999; TSUCHIHASHI, *et al.*, 2000; CECHETTO & GELB, 2001; SAHA *et al.*, 2000; SAHA *et al.*, 2005a; b).

Em coelhos, injeções de antagonista dos receptores α -adrenérgicos no interior do MeA induziu resposta bradicárdica em teste de medo condicionado, sugerindo uma importante interação entre a tal área, o ACe e a área hipotalâmica lateral na resposta cardiovascular para estímulos condicionados (DAVIS, 1992; CECHETTO & GELB, 2001). Experimentos em ratos não sedados têm demonstrado que a estimulação elétrica do ACe resulta em um aumento na FC e na PA, enquanto em ratos anestesiados obtêm-se uma diminuição de ambos os parâmetros (REIS & OLIPHANT, 1964; GALENO & BRODY, 1983; FRYSSINGER *et al.*, 1984; GELSELMA *et al.*, 1987; IWATA *et al.*, 1987; ARNOLDA *et al.*, 1992; VARDHAN *et al.*, 1993; BURNSTOCK, 1995; CECHETTO & GELB, 2001; RAU & ELBERT, 2001; WANG *et al.*, 2002; PONOMAREV *et al.*, 2010). A dependência de estado do animal para o tipo de resposta cardiovascular evocada é adicionalmente demonstrado pelo achado de que a resposta pressora promovida pela estimulação ampla da amígdala é extremamente atenuada durante o sono nesses animais (FRYSINGER, 1984; IWATA *et al.*, 1987; CECHETTO & GELB, 2001).

1.5 NEUROTRANSMISSORES NOS SUBNÚCLEOS DA AMÍGDALA MEDIAL

No AMePD pode-se encontrar vários neurotransmissores e neuromoduladores como GLU, GABA, histamina, colecistoquinina, encefalinas, SST, OT, substância P e Ang II, por exemplo (FLODD *et al.*, 1998; KAKINOKI *et al.*, 1998; HERBERT *et al.*, 1990; JONES *et al.*, 1999; MATSUMURA *et al.*, 1999; AVERILL & DIZ *et al.*, 2000; DAMPNEY *et al.*, 2002; YILMAZER-HANKE *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2005; HERBERT *et al.*, 2011). Pela sua hodologia e, em especial, com a presença de vários neurotransmissores e neuropeptídeos, esta tese buscou esclarecer se o AMePD participa do controle neural da FC e da PA e quais efeitos diferentes esses transmissores seriam capazes de gerar.

De fato, há vários neurotransmissores e/ou neuromoduladores encontrados no AMePD que poderiam servir como candidatos a modular respostas cardiovasculares. Entre esses, o GLU foi detectado em neurônios do MeA de gerbilos e correspondem a cerca de 70% de todas as células no AMePD que são ativadas na ejaculação (SIMMONS & YAHR, 2003). Receptores glutamatérgicos dos tipos AMPA1 (alfa 1) e NMDA1 e 2B são muito encontradas no AMePD de camundongos (ALLEN MOUSE BRAIN ATLAS, 2009). Em relação ao GABA, há uma notável presença do mRNA da enzima de síntese descarboxilase do ácido glutâmico-65 (GAD-65), em ratos (PETROVICH & SWANSON, 1998), e imunorreatividade ao GABA no MeA de gerbilos (SIMMONS & YAHR, 2003) e ratos (NITECKA & BEN-ARI, 1987; STEFANOVA, 1998; COOKE & WOOLLEY, 2005), principalmente no neurópilo (GLOOR, 1997). Além disso, mRNA para outra enzima de síntese GAD-67, é abundantemente expressa no AMePD de ratos e possivelmente relacionado com a modulação de comportamentos agonísticos masculinos (DONATO *et al.*, 2010). Há imunomarcção notável para ambos os receptores GABA_A e GABA_B no AMePD de camundongos (ALLEN MOUSE BRAIN ATLAS, 2009).

Adicionalmente, para citar alguns exemplos, a presença das enzimas colina acetiltransferase e a acetilcolinesterase para acetilcolina foram encontradas muito menos concentradas no MeA do que nos outros núcleos da amígdala de ratos (BEN-ARI *et al.*, 1977 b). Há receptores noradrenérgicos $\alpha 1$ e $\beta 1$ no AMePD de camundongos embora menos abundantes, e não há evidência para a presença de receptores D2 (ALLEN MOUSE BRAIN ATLAS, 2009). Receptores serotoninérgicos 5-HT1A foram encontrados na parte posterior do MeA de ratos (FLÜGGE *et al.*, 1999), e a ativação desses receptores, pelo agonista 8-OH-DPAT, é capaz facilitar o comportamento sexual masculino de ratos (DE CASTILHOS *et al.*, 2006). Para a histamina, a atividade de sua enzima de síntese histidina descarboxilase, apresentou os níveis mais elevados no MeA dentre os demais núcleos amigdalianos (BEN-ARI *et al.*, 1977a).

1.6 NEURÔNIOS GLUTAMATÉRGICOS E GABAÉRGICOS

Claro está que todas estas alterações da FC e da PA por seu controle neural envolvem sinapses e seus neurotransmissores (AVERILL & DIZ *et al.*, 2000; DAMPNEY *et al.*, 2002). O GLU e o GABA, por serem os principais neurotransmissores excitatório e inibitório do SN central, são bastante investigados quanto ao seu envolvimento na modulação da atividade cardiovascular (TAKENAKA *et al.*, 1996; OZAWA *et al.*, 1998; KARSON *et al.*, 1999; TANAKA *et al.*, 2000; TAPIERO *et al.*, 2002). Além disso, acredita-se que o GLU é o principal neurotransmissor liberado da aferência vagal (LAWRENCE, 1995; SCHAFFAR *et al.*, 1997), implicando-o como um potencial mediador do barorreflexo (LAWRENCE, 1995; DUNCAN *et al.*, 2011) e do quimiorreflexo cardiovascular (VARDHAN *et al.*, 1993).

O GLU é sintetizado nos terminais pré-sinápticos a partir da glutamina e pela ação da glutaminase e estocado em vesículas onde sua concentração pode chegar a 100 mM (MELDRUM, 2000), podendo também provir do α -cetoglutarato aminotransferase (OZAWA

et al., 1998; MATSUMURA *et al.*, 1999; TSUCHIHASHI *et al.*, 2000; TAPIERO *et al.*, 2002; HINOI *et al.*, 2005; DADSETAN *et al.*, 2011; KRISTENSEN *et al.*, 2011; AHMED *et al.*, 2011). A captação vesicular é independente de Na⁺, mediada pela ação de transportadores de membrana, sendo sua incorporação possível devido a um potencial interno de membrana positivo que é gerado por uma H⁺-ATPase vacuolar, a qual medeia o transporte de H⁺ para dentro da vesícula (NAKAMURA *et al.*, 2011). As enzimas de síntese e de degradação do GLU têm sido encontradas predominantemente nos neurônios e nas células gliais (TRAYNELIS *et al.*, 2010). Nos neurônios glutamatérgicos, o GLU encontra-se em grandes concentrações por toda extensão celular, mas ele é particularmente abundante na região pré-sináptica (OZAWA *et al.*, 1998; MATSUMURA *et al.*, 1999; TSUCHIHASHI *et al.*, 2000; TAPIERO *et al.*, 2002; HINOI *et al.*, 2005). Na despolarização dos terminais pré-sinápticos glutamatérgicos, ocorre a liberação do GLU das vesículas para a fenda sináptica por exocitose dependente da concentração de cálcio citossólico (OZAWA *et al.*, 1998; MATSUMURA *et al.*, 1999; TSUCHIHASHI *et al.*, 2000; TAPIERO *et al.*, 2002; HINOI *et al.*, 2005). Os receptores para o GLU são classificados em ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs). Os iGluRs estão ligados estruturalmente a canais iônicos e, com base em agonistas específicos, são divididos em três subtipos: receptores do tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) e cainato. Os mGluRs, por sua vez, são receptores acoplados a proteínas ligantes de guanosina trifosfato mediada por proteína G e, baseado na seqüência de aminoácidos que apresentam, podem ser agrupados em três grupos distintos: Grupo I, do qual fazem parte os subtipos mGluR1 e mGluR5; Grupo II, que inclui os subtipos mGluR2 e mGluR3; e Grupo III, que compreende os subtipos mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 (OZAWA *et al.*, 1998; ; MATSUMURA *et al.*, 1999). Esta subdivisão também leva em consideração características farmacológicas e os mecanismos de transdução dos diferentes subtipos de mGluRs. Os mGluRs do Grupo I estimulam a

fosfolipase C e a hidrólise de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, enquanto os mGluRs dos Grupos II e III inibem a adenilato ciclase e, conseqüentemente, a síntese de adenosina monofosfato cíclica (OZAWA *et al.*, 1998; MATSUMURA *et al.*, 1999; TSUCHIHASHI *et al.*, 2000; TAPIERO *et al.*, 2002; HINOI *et al.*, 2005). Ambos os grandes tipos de receptores glutamatérgicos, iGluRs e mGluRs, podem modular respostas cardiovasculares (JONES *et al.*, 1999). Estudos realizados em ratos demonstraram que a microinjeção de GLU no BVLr é capaz de gerar um aumento da PA (TSUCHIHASHI *et al.*, 2000; DE PAULA & MACHADO, 2001) e da FC (TSUCHIHASHI *et al.*, 2000). Por outro lado, quando GLU é microinjetado no NTS produz uma diminuição dessas duas variáveis (MACHADO & BONAGAMBA, 1992; JONES *et al.*, 1999; MATSUMURA *et al.*, 1999; VIARD & SAPRU, 2002; STUBER *et al.*, 2010; RAYMOND *et al.*, 2011).

Evidências fisiológicas e bioquímicas sugerem que o GABA também modula respostas cardiovasculares no SN central (SPYER, 1994; COLEMAN & DAMPNEY, 1998; OLZEN & BETZ, 2006). GABA é sintetizado a partir do GLU pela enzima ácido glutâmico descarboxilase e, tradicionalmente, exerce seus efeitos via receptores ionotrópicos GABA_A e/ou metabotrópicos GABA_B (BURT, 2003). Outros estudos indicaram a existência de uma terceira classe de receptores GABA, os quais se distinguem farmacologicamente e estruturalmente dos receptores GABA_A e GABA_B (BORMANN & FEIGENSPAN, 1995; BORMANN, 2000; HARTMANN, 2004). Esses receptores, intitulados GABA_C, têm sido melhor identificados em células da retina de vertebrados, porém uma das subunidades da qual são compostos (a subunidade $\rho 2$) também é significativamente expressa em outras partes do SN central, mais notavelmente no hipocampo e no córtex cerebral (BORMANN & FEIGENSPAN, 1995). O receptor GABA_A na maior parte das vezes é capaz de gerar hiperpolarização por possuir um canal de Cl⁻ que tem sítios não só para fármacos agonistas GABAérgicos, como o muscimol, ou antagonistas, como a bicuculina, mas também para

diferentes grupos de moduladores como benzodiazepínicos, barbitúricos, neuroesteróides e etanol (McDONALD & OLSEN, 1994; BURT, 2003; CORTEEN, 2011; SIEGHART, 2011). Receptores do tipo GABA_B, por sua vez, estão acoplados à proteína G e a sistemas de segundos-mensageiros que podem produzir uma variedade de efeitos incluindo a inibição da adenilato ciclase, inibição da síntese de inositol trifosfato, aumento do efluxo de K⁺ ou diminuição do influxo de Ca²⁺ para a célula (BOWERY, 1993; BORMANN, 2000; COUVE *et al.*, 2000; BONANSCO *et al.*, 2011). Os receptores GABA_B podem hiperpolarizar neurônios pós-sinápticos mediante abertura de canais de K⁺ (BOWERY, 1993; McDONALD *et al.*, 2004; FROESTL *et al.*, 2011). As ações inibitórias de GABA sobre a atividade cardiovascular podem ser observadas após a injeção intracerebroventricular de muscimol que é capaz de provocar uma diminuição da PA (TAKENAKA, 1996; ONAT, 1998) e da FC (TAKENAKA, 1996). O mesmo efeito acontece quando baclofên, um agonista dos receptores GABA_B, é microinjetado nas regiões ventromedial e posterior do hipotálamo (TAKENAKA, 1996).

Muitos dos neurônios de segunda ordem que partem do NTS (por exemplo, para as regiões BVLc, BVLr, NA e DMV), utilizam GLU e GABA como neurotransmissores (ARNOLDA *et al.*, 1992; DAMPNEY *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2002; MIYAWAKI *et al.*, 2002; DAMPNEY & HORIUCHI, 2003; GUYENET *et al.*, 2004; GRIFFIOEN *et al.*, 2004); Além disso, GLU e GABA provêm a principal transmissão sináptica na amígdala (DAVIS *et al.*, 1994; MAREN, 1996; SMITH & DUDEK, 1996; SINGEWALD, 2000; OBERTO *et al.*, 2001). O ACe, por sua vez, emite projeções GABAérgicas diretas ao NTS (SAHA *et al.*, 2000) e o MeA para o BST e para o núcleo ântero-ventral periventricular hipotalâmico (SIMERLY, 2004).

Contudo, ainda são escassos os estudos que demonstram qual a participação da atividade glutamatérgica e GABAérgica do MeA sobre o controle cardiovascular basal e das

respostas reflexas até o momento. Recentemente, em um estudo com ratos anestesiados, foi evidenciado que o GLU e GABA microinjetados no MeA não foram capazes de alterar a PA basal (HAGIWARA *et al.*, 2005). Já em ratos acordados, apesar de não ter afetado a PA basal, muscimol microinjetado bilateralmente na mesma estrutura inibiu a resposta pressora causada pelo estresse de contenção (KUBO *et al.*, 2004; MURATA *et al.*, 2011; TANAKA *et al.*, 2011). E isto passa a ser um dado relevante dado a presença marcada de GLU e GABA no AMePD, da modulação de comportamentos que necessitam de ajustes de FC e PA concomitantes e que têm supostamente ações diferenciadas de acordo com o circuito neural onde se encontram.

1.7 NEUROPEPTÍDEOS NA AMÍGDALA MEDIAL

Uma variedade de neuropeptídeos foram encontrados no MeA, por vezes mais no AMePD, e parecem estarem localizados em neurônios de projeção que enviam fibras para a ST ou à via ventral amigdalofugal (GLOOR, 1997). Quantidades moderadas a abundante de SST, substância P, colecistoquinina e vasopressina foram encontrados nos corpos das células, fibras e terminais sinápticos nos subnúcleos do MeA (MICEVYCH *et al.*, 1988; ORO *et al.*, 1988; MALS BURY & MCKAY, 1994; GLOOR, 1997; DE VRIES & SIMERLY, 2002; SINGEWALD *et al.*, 2008). No AMePD encontra-se notavelmente alta imunomarcagem para substância P em ratos o qual diminui após a castração de machos adultos (MALS BURY & MCKAY, 1994). Colecistoquinina também está preferentemente no AMePD com um dimorfismo sexual claro e uma variação relacionada com o nível dos hormônios gonadais em circulação (ORO *et al.*, 1988; DE VRIES & SIMERLY, 2002).

Notável presença de OT foi detectada preferencialmente nas camadas medial e lateral do AMePD de rato e de forma moderada na camada intermediária (VEINANTE & FREUND-MERCIER, 1997). A OT no MeA de camundongos foi capaz de facilitar a

aquisição da memória social para a identificação de parceiros sexuais e a reprodução (FERGUNSON *et al.*, 2001). Receptores para SST 1, 2, e 4 foram encontrados no AMePD, embora não em níveis elevados (ALLEN MOUSE BRAIN ATLAS, 2009). Imunorreatividade para SST pode ser colocalizadas em interneurônios contendo GABA em alguns núcleos da amígdala (TUUNANEN *et al.*, 1996), embora esse peptídeo possa promover uma resposta dose-dependente inibitória direta ou indiretamente, ativando a transmissão sináptica Gabaérgica no MeA de ratos (LU *et al.*, 1995). Para a Ang II a expressão da subunidade 1A de seus receptores é consideravelmente maior do que a subunidade 1B nesta área do encéfalo (ALLEN MOUSE BRAIN ATLAS, 2009). A microinjeção de Ang II na parte posterior do MeA inibe o comportamento sexual de ratos machos (BREIGEIRON *et al.*, 2002).

As integrações dos papéis fisiológicos dos neurotransmissores e neuropeptídeos no AMePD são atualmente desconhecidas. Portanto, é de grande interesse estudar se esses diferentes transmissores ou moduladores podem evocar alterações cardiovasculares basais ou reflexas quando, agindo diretamente no AMePD de ratos acordados. Alguns possíveis candidatos para esta modulação existem. Por exemplo, após a aplicação intracerebroventricular (icv) ou injeção em outras áreas central (núcleo dorsomedial do hipotálamo, por exemplo), o GLU e o GABA geraram alterações marcantes nas respostas cardiovasculares, induzindo efeitos excitatórios ou inibitórios na FC e PA, respectivamente (MAGRI *et al.*, 1984; GOREN *et al.*, 1996; GOREN *et al.*, 2000; GOREN *et al.*, 2003). A OT pode reduzir as respostas cardiovasculares ao estresse agudo em ratos (WSOL *et al.*, 2009), e aumento na PA média (PAM) induzida por fenilefrina intravenosa foi reduzido em ratos quando injetados com OT por via subcutânea (ONDREJAKOVA *et al.*, 2010). Ambos os efeitos sugerem uma modulação do sistema simpático por esse peptídeo. A SST poderia promover efeitos inibitórios semelhantes aos induzidos pelo GABA (LU *et al.*, 1995; TUUNANEN *et al.*, 1997). Já, a injeção i.c.v. de Ang II aumentou a PAM, apesar de uma

elevação concomitante dos níveis plasmáticos de OT (REIS *et al.*, 2010). Tal aumento na PA por Ang II pode ser mediado centralmente, em parte pela ativação simpática do SN central, e em parte pela elevação plasmática de noradrenalina e dos níveis de adrenalina (TURNER *et al.*, 1986).

1.8 NEURÔNIOS ANGIOTENSINÉRGICOS

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema hormonal, cujo produto final é a produção de vários peptídeos biologicamente ativos (SAAD *et al.*, 2004). Desempenha importante função no controle central da PA, homeostase dos fluídos corporais e eletrólitos, e função celular (SANTOS *et al.*, 2003; SAAD *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008). A importância do SRA sobre a regulação da PA está bem estabelecida e, a atividade elevada deste sistema pode ser um dos contribuintes para as alterações da PAM e FC (BENABE & MARTINEZ-MALDONADO, 1998; CONTRERAS *et al.*, 2002; ARÁGUIZ-URROZ *et al.*, 2009). A Ang II é um octapeptídeo multifuncional, e é, fisiologicamente, a forma mais importante de angiotensina, produzindo uma variedade de respostas mediadas pelo SN central e receptores periféricos, sistemicamente em diversos tecidos, abrangendo respostas celulares e comportamentais (TOUYZ & SCHIFFRINTOUYZ, 2000; BADER, 2001; BADER *et al.*, 2001a; b; SAVOIA & VOLTAVOIA, 2011; SAVOIA *et al.*, 2011a; b; NGUYEN DINH CAT & TOUYZ, 2011; STECKELINGS *et al.*, 2011). A Ang II, produz seus efeitos celulares por meio de proteínas reguladoras G acopladas aos receptores de membrana celular que fazem à mediação, dependendo do tecido, inibindo a adenilato ciclase e diminuindo as concentrações intracelulares de AMPc, ativando a fosfolipase C e aumentando o inositol trifosfato e diacilglicerol ou promovendo a abertura dos canais de cálcio da membrana celular, aumentando as concentrações de cálcio citosólico

(JEFFRIES & PETTINGER, 1989; TOUYZ *et al.*, 2000; BADER, 2001; BADER *et al.*, 2001a; BADER *et al.*, 2001b; SAVOIA & VOLPESAVOIA, 2011; SAVOIA *et al.*, 2011a; SAVOIA *et al.*, 2011b; NGUYEN DINH CAT & TOUYZ, 2011; STECKELINGS *et al.*, 2011).

Tradicionalmente a Ang II é reconhecida por suas funções endócrinas, incluindo a estimulação da síntese de aldosterona pela adrenal e interações com o SN central, pelos órgãos circunventriculares, ou pela Ang II produzida no próprio SN central incluindo estímulo da ingestão de água, apetite ao sal e liberação do hormônio hipofisário (vasopressina), além de modular a atividade simpática e parassimpática e modulador das funções relacionadas com a resposta do estresse (STEELE *et al.*, 1983; STEELE *et al.*, 1985; PHILLIPS, 1987; FRANCI *et al.*, 1990; STEELE, 1992; STEELE *et al.*, 1992; WRIGHT & HARDING, 1992; PHILLIPS *et al.*, 1993; FRANCI *et al.*, 1997; DORNELLES & FRANCI *et al.*, 1998a; b; DUMONT *et al.*, 1999; PAN, 2004; DONADIO *et al.*, 2009; CECCONELLO *et al.*, 2010). Ações no balanço hidro-eletrolítico e na função cardiovascular incluem aumento na PA, por produzir vasoconstrição arteriolar, e facilitação da liberação de noradrenalina nas terminações nervosas simpáticas (ZIMMERMAN, 1981; ZIMMERMAN, 1984; PHILLIPS, 1987; WRIGHT & HARDING, 1992; ZIMMERMAN & MAREN, 2011; ZUCKER & ZIMMERMANZUCKER, 2011).

Altos níveis de angiotensinogênio e de mRNA correspondente foram encontrados no hipotálamo, no MeA, BST, no NTS e no cerebelo e estão relacionados com a patogênese da hipertensão espontânea em ratos (SANVITTO *et al.*, 1997; PAN, 2004; HAGIWARA & KUBO, 2005a; b; c; STRAGIER *et al.*, 2005; HAGIWARA & KUBO, 2007; STRAGIER *et al.*, 2008; CECCONELLO *et al.*, 2010). Os astrócitos e oligodendrócitos representam o principal tipo de célula sintetizadora de angiotensinogênio. A renina e a ECA também já foram detectadas no encéfalo (BADER *et al.*, cols, 2001a; b; c; GUIMARÃES *et al.*, 2011a;

b; STECKELINGS *et al.*, 2011). A detecção de imunorreatividade para a Ang II no encéfalo após nefrectomia foi uma importante evidência que o SRA encefálico é regulada independentemente do SRA periférico. As concentrações deste peptídeo no tecido nervoso são relativamente baixas e difíceis de serem mensuradas, estando aproximadamente 50 fmol/g de tecido encefálico (PHILLIPS, 1987), variando, em ratos, de 590 fmol/g de tecido no hipotálamo a 15 fmol/g de tecido no córtex (HERMAN *et al.*, 1984; PAN, 2004).

Barorreceptores, receptores cardiopulmonares, quimiorreceptores, osmoreceptores gástricos e hepáticos estimulam a atividade em aferências vagais, glossofaríngeas e gástricas NTS e daí para a AP e o núcleo dorsal da rafe (DNR) de onde partem conexões para o núcleo parabraquial lateral (NPBL), núcleo paraventricular (PVN), MeA dentre outras (LANCA & VAN DER KOOY, 1985; FRANCHINI & KRIEGER *et al.*, 1994; SHAPIRO *et al.*, 1994; SHAPIRO *et al.*, 2010). O MeA recebe projeções angiotensinérgicas dos órgãos circumventriculares, particularmente do órgão subfornical, e aferências viscerais provenientes da AP, NTS e NPB (MASSI, 1990; JOHNSON & THUNSHORST, 1997; MCKINLEY *et al.*, 2003, VON BOHLEN UND HALBACH & ALBRECHT, 2006; USCHAKOV *et al.*, 2009; JOHNSON *et al.*, 2011; XUE *et al.*, 2011). Por causa de sua meia-vida curta, tem sido difícil demonstrar as funções da Ang II (HARDING & FELIX, 1987; HARDING *et al.*, 1992). Suas ações são mediadas por dois receptores de membrana, AT1 (divididos em AT1a e AT2b, em roedores) e AT2, embora em algumas áreas coexistam tanto AT1 quanto AT2, como, por exemplo, no AMePD, onde se encontram altas densidades e expressão de ambos receptores AT1 e AT2 (GEHLERT *et al.*, 1991; BREIGEIRON *et al.*, 2002; DE OLMOS *et al.*, 2004). Estes receptores, são acoplados a proteína G, possuem sete domínios transmembrana hidrofóbicos, sendo o N- e C-terminal são hidrofílicos, sendo que o receptor AT1 envolve fosfolipase C, geração do inositol trifosfato e mobilização de Ca^{++} (RICHARDS & NICHOLLS, 1999). O receptor AT2, não tem bem esclarecido seu mecanismo de transdução

de sinal, mas provavelmente esteja envolvido no fechamento de canais de K^+ (JACKSON *et al.*, 1988; AMBROZ *et al.*, 1991; VON BOHLEN UND HALBACH *et al.*, 2000; VON BOHLEN UND HALBACH & ALBRECHT, 2006; WANG *et al.*, 2011a; b). É interessante que altas concentrações dos receptores AT1 foram também encontrados nos NTS, BVLc, BVLr, PVN, SFO e núcleo supra-óptico (SON), regiões chave no controle cardiovascular, em especial no barorreflexo e no quimiorreflexo, e que evidências indicam que a densidade de receptores AT1 no NTS de ratos espontaneamente hipertensos seja maior do que em ratos normotensos (PHILLIPS *et al.*, 1977; CAMPBELL, 1995a; b; MORISHITA *et al.*, 1995; TERUYA *et al.*, 1995; MURATANI *et al.*, 1996; HEAD, 1996; AVERILL & DIZ, 2000; BREIGEIRON *et al.*, 2002; HAGIWARA *et al.*, 2005a; b; c; d; e; STRAGIER *et al.*, 2005; STRAGIER *et al.*, 2006; STRAGIER *et al.*, 2008).

A estimulação dos receptores de Ang II aumentou a PA em várias espécies (PHILLIPS, 1987). Microinjeções de Ang II na dose de 1 ng dentro da parte medial do NTS resultou em uma resposta depressora monofásica, enquanto microinjeções de 100 ng promoveu uma resposta bifásica, com aumento da PA e da FC, sugerindo que a Ang II provavelmente potencialize o barorreflexo no NTS (RETTINGER *et al.*, 1986; PAN, 2004). Diversos estudos têm demonstrado que a Ang II participa da neurotransmissão excitatória dos núcleos que fazem parte das vias neurais do quimiorreflexo (KASPAROV & PATON, 1999). Microinjeções de losartan (antagonista dos receptores de angiotensina), nas doses de 500 e 150 pmol no BVLr de animais acordados, atenuou a resposta pressora à ativação do quimiorreflexo, mostrando uma participação destes receptores na neuromodulação da via simpático-excitatória. Entretanto, concentrações próximas a doses fisiológicas da Ang II na parte comissural do NTS de ratos potencializou a neurotransmissão do quimiorreflexo. Já microinjeções de Ang II na dose de 100 e 150 fmol na área hipotalâmica anterior (AHA) de

ratos aumenta as respostas pressóricas cardiovasculares (HAGIWARA *et al.*, 2005a; b; c; d; e).

Os efeitos cardiovasculares dos receptores AT₂ (redução da PA) parecem ser relativamente sutis, opondo-se somente em parte aos dos receptores AT₁ (ICHIKI *et al.*, 1995). Alguns estudos com ratos mostraram que a microinjeção de Ang II na dose de 10, 25, 50, 100 e 150 fmol no MeA de forma geral é capaz de inibir o comportamento sexual de ratos machos via receptores AT₁ e AT₂, mas resulta em um aumento da FC e da PA, provavelmente devido a suas conexões com regiões alvos do hipotálamo e tronco encefálico (BREIGEIRON *et al.*, 2002; HAGIWARA *et al.*, 2005a; b; c; d; e; STRAGIER *et al.*, 2005). Esses dados também se associam a hipótese de que a resposta de ativação cardiovascular mediada por um estímulo emocional possa envolver a Ang II no MeA, especialmente o AMePD (HAGIWARA *et al.*, 2005a; b; c; d; e).

Com isso as doses de Ang II, que foram utilizadas na presente tese são doses em níveis fisiológicos e farmacológicos eficazes, baseadas em estudos anteriores que mostraram resultados notáveis em diferentes áreas encefálicas, incluindo-se alguns núcleos do MeA estudados em conjunto (BREIGEIRON *et al.*, 2002).

1.9 NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS

OT é um peptídeo preferentemente sintetizado nos núcleos PVN e SON do hipotálamo (KANG & PARK, 2000). Quando secretado na circulação sanguínea, não é capaz de influenciar diretamente o SN central, uma vez que este peptídeo tem dificuldade de passar a barreira hematoencefálica (KANG & PARK, 2000). A OT também é liberada por neurônios no PVN que se termina em diversas áreas encefálicas (BUJIS *et al.*, 1978a; b; BUJIS, 1983a; b; KENDRICK *et al.*, 1986; BUIJS & VAN ELDEREN *et al.*, 2000; GIMPL &

FAHRENHOLZ *et al.*, 2001). Quando a OT atua centralmente age como neurotransmissor ou neuromodulador em diversos processos envolvidos na regulação de funções comportamentais relacionadas com, o comportamento sexual masculino modulando a ereção peniana e a ejaculação (CARTER, 1998; UVNAS-MOBERG *et al.*, 1992a; b; UVNAS-MOBERG, 1998; INSEL *et al.*, 2001; YOUNG, 2001; HEIRICHS *et al.*, 2009; VIERO *et al.*, 2010; BALES *et al.*, 2011), a reprodução em fêmeas, e no comportamento maternal (PEDERSEN & PRANGE, 1979; BOSCH *et al.*, 2005; CONSIGLIO *et al.*, 2005; BOSCH, 2011), ingestão de alimentos (VERBALIS *et al.*, 1986a; b; c; d) e sódio (STRICKER & VERBALIS, 1986; STRICKER & VERBALIS, 2004), memória social (FERGUSON & LATCHFORD, 2000; FERGUSON *et al.*, 2001), comportamento exagerado de autolimpeza (PEDERSEN & PRANGE, 1979) resposta ao estresse, reduzindo a liberação do ACTH (GIBBS, 1984; GIBBS *et al.*, 1984; GIBBS, 1986a; b; WINDLE *et al.*, 1997; WINDLE *et al.*, 2004), dentre outras ações. A OT atua na homeostase hidroeletrólítica e na regulação da atividade cardiovascular atuando, modificando as atividades simpáticas e parassimpáticas (DE-BOLD *et al.*, 1981; DE-BOLD *et al.*, 1996; ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 1997; GUTKOWSKA *et al.*, 1997; JANKOWSKI *et al.*, 1998a; b; GUTKOWSKA *et al.*, 2000; DE-BOLD *et al.*, 2001; ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004; DANALACHE *et al.*, 2010; JANKOWSKI *et al.*, 2010). Estudos demonstraram que a OT reduziu em longo prazo a PA de ratos (PETERSSON *et al.*, 1996). Ou seja, microinjeções i.c.v. de OT na dose de 20 pmol diminuem a PA, enquanto que a inibição da síntese de OT aumenta a PA em ratos (VERBALLIS *et al.*, 1986a; b; c; d). A administração do anti-hipertensivo hidralazina, provocou uma queda da PA de 30%, aumentou a expressão de Fos entre 46-66% nos neurônios ocitocinérgicos localizados no PVN e SON respectivamente (DANALACHE *et al.*, 2010; JANKOWSKI *et al.*, 2010). Tal hipotensão também promoveu aumento na concentração plasmática de OT de valores inferiores a 20 pg/ml até valores máximos superiores a 100 pg/ml durante todo o período

experimental de 90 minutos (DANALACHE *et al.*, 2010; JANKOWSKI *et al.*, 2010). A OT aumenta a excreção renal de eletrólitos em diversas espécies, e os efeitos natriuréticos e caliuréticos são independentes da ação da vasopressina (KADEKARO *et al.*, 1992a; b; c; SUMMY-LONG *et al.*, 1992). Sendo assim, há evidências que os níveis plasmáticos elevados de OT produzem natriurese e a OT localmente sintetizada e armazenada em grandes vasos sanguíneos desempenha um papel fisiológico importante no tônus vascular (DANALACHE *et al.*, 2010; JANKOWSKI *et al.*, 2010).

Os receptores para OT (OTR) pertencem à família dos receptores hetero-triméricos ligados à proteína G e são encontrados em determinadas células, e em diferentes estruturas como neurônios, cardiomiócitos e células endoteliais (GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001; ZINGG & LAPORTE, 2003; DEVOST *et al.*, 2008; VIERO *et al.*, 2010; VIERO *et al.*, 2011). Os efeitos dos receptores intracelulares podem ser associados tanto à proteína $G_{q/11}$, que ativam a fosfolipase C capaz de quebrar o fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) em inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol, os quais, por sua vez, medeiam uma série de efeitos intracelulares, incluindo a liberação de cálcio do retículo endoplasmático (VIERO *et al.*, 2010; VIERO *et al.*, 2011). No entanto, existem receptores associados à proteína G_i que provocam a inibição da enzima adenilatociclase, reduzindo os níveis intracelulares de AMP cíclico, promovem a abertura de canais de potássio e o fechamento de canais de cálcio, inibindo assim a atividade da célula (VIERO *et al.*, 2010; VIERO *et al.*, 2011).

As regiões que contêm mRNA para OTR em grandes quantidades incluem o ACe, o MeA e o BNST (KREMARK *et al.*, 1993; CONDES-LARA *et al.*, 1994; MCCARTHY *et al.*, 1996; GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001; MANTELLA *et al.*, 2003; CONDES-LARA *et al.*, 2009a; b). Os mecanismos pelo qual a OT induz a redução da atividade cardiovascular não estão totalmente esclarecidos, apesar de algumas hipóteses (DE BOLD *et al.*, 1981; JANKOWSKI *et al.*, 1998a; b; DE BOLD *et al.*, 1996; GUTKOWSKA *et al.*, 1997;

GUTKOWSKA *et al.*, 2000; DE BOLD *et al.*, 2001; DANALACHE *et al.*, 2010; JANKOWSKI *et al.*, 2010). A OT tem um papel importante na regulação cardiovascular, neuroendócrina, nas atividades cardiovasculares ao exercício, e nos ajustes dos reflexos (barorreflexas e quimiorreflexas) em resposta a um estímulo estressor agudo ou em comportamentos de ansiedade que envolve estruturas específicas do encéfalo, é o caso do MeA (MICHELINI, 1994; MICHELINI, 1999; MICHELINI & MORRIS, 1999; WIGGER & NEUMANN, 2002; MICHELINI *et al.*, 2003; BOSCH *et al.*, 2005; HIGA-TANIGUCHI *et al.*, 2009a; b; BOSCH, 2011). Há uma grande quantidade de fibras ocitocinérgicas e OTRs localizados principalmente no ACe, no MeA e em diferentes regiões da amígdala expandida, como o BST (EBNER *et al.*, 2000; EBNER *et al.*, 2005). O MeA como um todo, tem conexões diretas e indiretas com neurônios ocitocinérgicos originários do PVN, relacionados com a secreção do hormônio corticotrópico (CRH) e pelas respostas simpáticas, parassimpáticas e neuroendócrinas a um estímulo aversivo estressante (NEUMANN, 1999; NEUMANN *et al.*, 2000a; b; NEUMANN, 2002; WALDHERR *et al.*, 2010), e que se projetam para importantes regiões como o NTS, o NA, o *locus ceruleus*, o NMDV e o núcleo dorsal da rafe envolvidas nas respostas simpáticas e parassimpáticas da FC e da PA (BUIJS *et al.*, 1978; BUIJS, 1983; BUIJS *et al.*, 1983; HERMAN *et al.*, 1984; HERMAN *et al.*, 1996; SAWCHENKO *et al.*, 1996; HERMAN & CULLINAN, 1997; SAWCHENKO *et al.*, 1999; BRAGA *et al.*, 2000; BUIJS & VAN EDEN BUIJS, 2000; HERMAN *et al.*, 2005). A condição de estresse aumenta a secreção de OT na circulação sanguínea, aumenta a concentração de OT no líquido cerebrospinal e no espaço extracelular de várias regiões do encéfalo de ratos, diminuindo assim, a FC e a PA (DAYAS *et al.*, 1999; NEUMANN, 1999; NEUMANN *et al.*, 2000a; b; DAYAS & DAY, 2002; NEUMANN, 2002; WALDHERR *et al.*, 2010). Estímulos estressantes como nado forçado (WOTJAK *et al.*, 1998; NEUMANN, 1999; NEUMANN *et al.*, 2000a; b; WOTJAK *et al.*, 2001), andar em plataformas

(HASHIGUCHI *et al.*, 1997; NISHIOKA *et al.*, 1998) e afastamento social (EBNER *et al.*, 2000; ENGELMANN *et al.*, 2000; NEUMANN *et al.*, 2002; EBNER *et al.*, 2005; TOBIN *et al.*, 2010) induzem a liberação da secreção central e periférica de OT em roedores. Alguns estudos em roedores demonstram que a administração exógena de OT na dose de 1 a 10 ng em um volume de 2 µl durante 2 minutos diminui o estresse e a ansiedade e, conjuntamente ocorre diminuição da FC e da PA (AMICO *et al.*, 2004a; b; AMICO *et al.*, 2008a; b).

Com base nesses dados comportamentais e neuroendócrinos, restou determinar se a OT no AMePD é capaz de modular a atividade basal ou modular respostas reflexas gerados pelos barorreceptores e quimiorreceptores em ratos. As doses de OT, utilizados na presente tese foram aplicados para mimetizar valores fisiológicos e para desencadear respostas farmacológicas, e foram baseadas em estudos anteriores que mostraram resultados eficazes em diferentes áreas encefálicas, incluindo-se alguns núcleos da amígdala (ISHIZUKA *et al.*, 1993; CONSIGLIO *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2005).

1.10 NEURÔNIOS SOMATOSTATINÉRGICOS

SST um polipeptídeo da família dos ciclopeptídeos inicialmente conhecido como fator de inibição da liberação de somatotropina sintetizado nos núcleos paraventricular e arqueado do hipotálamo (BRAZEAU *et al.*, 1973; ZHENG *et al.*, 1997). Nos mamíferos, sabe-se que a SST existe em duas isoformas ativas, um tetradecapeptídeo SRIF-14 e o SRIF-28, tendo ações mediadas por receptores com alta afinidade acoplados à proteína G (BRAZEAU *et al.*, 1973; PRADAYROL *et al.*, 1980; DEVOS *et al.*, 2002; MOLLER *et al.*, 2003; KRANTIC *et al.*, 2004; PLESS, 2005). De fato, a SST-14 é um peptídeo cíclico com estrutura primária conservada na maioria das classes de seres vivos (GUGGER *et al.*, 2004). Existem formas múltiplas de SST estendida na região N-terminal, como a SST-28 também de mamíferos, as SST-22, -25 e -28 de peixes em geral e as SST-34 e -37 identificadas somente nas lampreias

(GUGGER *et al.*, 2004). De modo geral, a SST-28 é a variante mais potente dos mamíferos por inibir o hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH), o hormônio de crescimento (GH), a prolactina (PRL) e o hormônio tireotrófico (TSH) e a secreção de insulina, enquanto a SST-14 é mais seletiva nas suas atividades inibidoras, agindo especificamente sobre a secreção do glucagônio, sobre a secreção exócrina gástrica, sobre o fluxo sanguíneo esplâncnico (proveniente das vísceras e sobre a motilidade intestinal; GUGGER *et al.*, 2004).

Os receptores de SST são divididos em 6 tipos (*sst1*, *sst2A*, *sst2B*, *sst3*, *sst4* e *sst5*) e pertencem à família de receptores acoplados à proteína G (PANETTA *et al.*, 1994; OLIAS *et al.*, 2004; SIEHLER *et al.*, 2008;). Apesar da SST possuir afinidade a todos seus receptores a afinidade é distinta a cada um dos subtipos. A maior afinidade é observada com o receptor *sst2* e SST em concentração nanomolar já é suficiente para ocupar 50% dos receptores (LAMBERTS *et al.*, 1990; LAMBERTS *et al.*, 1996). A SST pode desencadear efeitos intracelulares distintos dependendo de cada receptor, mas uma das funções é desencadear a inibição da adenilciclase que resulta em diminuição dos níveis intracelulares de AMPc e redução dos influxos de Ca^{++} (LAMBERTS *et al.*, 1990; LAMBERTS *et al.*, 1996).

A SST, pode agir como neurotransmissor ou como neuromodulador, e por ter a capacidade de modular a liberação ou inibição de outros neurotransmissores, como a serotonina, o GABA, o GLU e a acetilcolina (GENUTH & HOPPEL, 1981; REICHLIN, 1983; REICHLIN *et al.*, 1983; EPELBAUM, 1986, EPELBAUM *et al.*, 1986a; b; SCHINDLER *et al.*, 1996; SCHINDLER *et al.*, 1999; KRANTIC *et al.*, 2004; GUGGER *et al.*, 2004; VIOLLET *et al.*, 2008; FENG *et al.*, 2011; VIOLLET & ANDREELLI, 2011). No SN central de mamíferos, neurônios somatostatinérgico são encontrados em maior número e dão origem a uma extensa rede de vias neuronais atuando em seus receptores específicos como reguladores parácrino/autócrinos (LENGYEL & TANNENBAUM, 1987), e podem ser

distinguidos em duas categorias: os que projetam para uma distância de seu soma e os que agem dentro de microcircuitos de curta distância e afetam neurônios GABAérgicos (interneurônios). No entanto, existe uma abundância de receptores de SST na amígdala como um todo, habênula, septo e no hipocampo; com níveis intermediários no córtex cerebral, estriado e substância nigra (REUBI & MAURER, 1985; UHL *et al.*, 1985; SCHINDLER *et al.*, 1996) e baixos, no cerebelo e no bulbo olfatório (EPELBAUM, 1986; EPELBAUM *et al.*, 1986a; b; BENOIT *et al.*, 1982a; b; c). Os efeitos neuromoduladores da SST são, na sua maioria, pré-sinápticos como por exemplo, para inibir a liberação pré-sináptica de GLU (LANNEAU *et al.*, 2000a; b; ZABORSZKY, 2002; BARABAN & TALLENT, 2004; GRILLI *et al.*, 2004; MOMIYAMA & ZABORSZKY, 2006;).

Dois sistemas de projeção somatostatinérgico surgem nas áreas laterais da amígdala e formam projeções distantes para o núcleo pré-óptico medial e os diferentes núcleos da amígdala, com exceção do ACe. Nos núcleos amigdalianos a SST pode funcionar como um neurotransmissor inibitório já que, microinjeções na dose de 1µM diretamente na amígdala, de forma ampla, preveniu a propagação de convulsões localmente (HIGUCHI *et al.*, 1986). A ação da SST pode ser complexa porque estudos mostraram que a microinjeção de SST na dose de 100 nM no hipocampo de ratos também causou um aumento significativo extracelular de dopamina e de serotonina em um modelo de epilepsia induzida pela pilocarpina (STRAGIER *et al.*, 2005; STRAGIER *et al.*, 2008; AOURZ *et al.*, 2011). A SST é co-liberada juntamente com o GABA no ACe e no ABL (VEZZANI & HOYER, 1999; CSABA & DOURNAUD, 2001; MCDONALD & MASCAGNI, 2002; SAHA *et al.*, 2002; CSABA *et al.*, 2004; MCDONALD *et al.*, 2011). No MeA, de um modo geral, a SST exerce ação inibitória, atuando diretamente sobre seus receptores ou indiretamente envolvendo sinapses GABAérgicas via receptor GABA_A (OSADCHII & POKROVSKII, 1998a; b). A SST é um

peptídeo que possui atividades cardiopépticas pronunciada (OSADCHII & POKROVSKII, 1998a; b).

A SST foi identificada em neurônios pré-sinápticos de terminações vagais, juntamente com acetilcolina, e pode ser liberado pela maior frequência de estimulação do nervo vago (OSADCHII & POKROVSKII, 1998a; b). Os principais efeitos cardíacos da SST são a desaceleração da FC, diminuição da contratilidade do miocárdio e a redução da velocidade de propagação da atividade elétrica ao longo do sistema de fibras de condução do coração (OSADCHII & POKROVSKII, 1998a; b). A SST desempenha um papel na ritmogênese cardíaca e modifica as propriedades eletrofisiológicas de marcapasso cardíaco, modula a ação cronotrópica cardíaca do sistema simpático e parasimpático e impede taquiaritmias supraventriculares e podem resultar de sua ação modulatória sobre a liberação pré-sináptica de noradrenalina e acetilcolina no coração (OSADCHII & POKROVSKII, 1998a; b). Outros estudos têm relacionando a SST no SN central com o controle cardiovascular (RETTIG *et al.*, 1989). A administração i.c.v. de SST é capaz de gerar um aumento dose-dependente da PAM, uma diminuição da FC, bem como um aumento da concentração de vasopressina plasmática (RETTIG *et al.*, 1989). No ACE, a microinjeção de SST na dose de 100 nM causa aumento da PAM e diminuição da FC (RETTIG *et al.*, 1989). A porção dorsomedial da BNST, que tem conexões com o AMePD projeta axônios que liberam SST para muitas regiões do tronco encefálico envolvidos nas funções simpáticas e parassimpáticas do controle cardiovascular, tais como núcleo parabraquial, o NMDV e o NTS (DONG *et al.*, 2001; DONG & SWANSON, 2007; SWANSON, 2007a; b; c). Não há até o momento descrições das ações da SST no AMePD no controle cardiovascular de ratos. As doses de SST, utilizados na presente tese foram aplicados para mimetizar valores fisiológicos e para desencadear respostas farmacológicas, e foram baseadas em estudos anteriores que mostraram resultados eficazes

em diferentes áreas encefálicas, incluindo-se alguns núcleos da amígdala (RAKOVSKA *et al.*, 2002; MOMIYAMA & ZABORSZKY, 2006; DE BUNDEL *et al.*, 2010).

É importante ressaltar, no entanto, que não há estudos até o momento que demonstrem qual a participação da atividade glutamatérgica, GABAérgica, angiotensinérgica, ocitocinérgica, somatostatinérgica no AMePD sobre o controle cardiovascular de ratos não anestesiados até o momento. E isto passa a ser relevante dado a presença marcada desses neurotransmissores e peptídeos e de seus respectivos receptores no AMePD, à modulação de comportamentos sociais que necessitam de ajustes de FC e PA concomitantes para sua ocorrência e para o que o AMePD é parte integrante importante de vários circuitos neurais. Como esses dados ainda são inéditos na literatura, mas há embasamento teórico que fundamenta as pesquisas e suas ações, os objetivos desta tese foram os de estudar, o papel de vários transmissores químicos microinjetados diretamente no AMePD sobre a atividade cardiovascular e nas respostas reflexas mediadas por barorreceptores e quimiorreceptores periféricos. Os presentes dados podem muito bem contribuir para o estudo da neurofisiologia envolvida com o controle neural central da função cardiovascular e, teoricamente, serem aplicáveis também à fisiopatologia de diversos distúrbios do sistema cardiovascular.

Além disso, quando se analisa detalhadamente o traçado eletrocardiográfico, observam-se variações da FC de “batimento a batimento”, o que pode ser facilmente evidenciado medindo os intervalos R-R. Essas variações são resultados da ação dos sistemas simpáticos e parassimpáticos sobre o nodo sinusal, ou seja, modulando a FC por estímulos simpáticos ou vagal, os quais se apresentam como componentes distintos. Desta forma, o grau de variabilidade da FC, em relação à FC média, pode ser utilizado para avaliar as funções simpáticas e parassimpáticas, embora seja preciso cuidado na interpretação dos dados pois pode haver interferência de uma na outra nas medidas obtidas (SALGADO *et al.*, 2007). As medidas de variabilidade da FC são fáceis de serem realizadas, não invasivas e têm boa

reprodutibilidade. São elas: cálculo de índices baseados em operações estatísticas sobre os intervalos R-R (análise no domínio do tempo) ou análise espectral de uma série de intervalos R-R (análise no domínio da frequência). A maioria dos índices de domínio do tempo e da frequência correlaciona-se muito bem com o tônus cardíaco vagal em repouso (HAYANO *et al.*, 1991), o que indica que eles provêm medida acurada deste tônus. Mas, a análise espectral da FC também é método sensível, e permite melhor discriminação das influências vagais e simpáticas do que a análise no domínio do tempo (MALPAS & MALING, 1990; MALPAS *et al.*, 1991; SPALLONE & MENZINGER, 1997; MALPAS, 2002).

Assim como a FC, também a PA apresenta variações em relação a medidas, o que é igualmente importante fonte de informação quanto aos mecanismos de regulação cardiovascular. A variabilidade da PA tem sido avaliada pelo cálculo da média dos desvios padrões da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e PAM obtida da análise, batimento a batimento, de medidas de PA obtidos. E, nesta tese, utilizar-se-á a análise espectral para avaliar a variabilidade da FC e da PA (MALPAS & MALING, 1990; HAYANO *et al.*, 1991; MALLIANI *et al.*, 1991; MALPAS *et al.*, 1991; MONTANO *et al.*, 1994; PARATI *et al.*, 1995; PAGANI *et al.*, 1996; PAGANI *et al.*, 1997; SPALLONE & MENZINGER, 1997; JULIEN *et al.*, 2001; MALPAS *et al.*, 2001; NOLLO *et al.*, 2001; MALPAS, 2002; FAZAN *et al.*, 2005; SALGADO *et al.*, 2007) após microinjeção de substâncias no AMePD, como será descrito adiante no texto. Mais recentemente a análise simbólica soma-se a este tipo de estudo, gerando dados complementares a análise espectral (GUZZETTI *et al.*, 2005; PORTA *et al.*, 2007; TOBALDINI *et al.*, 2009a; b).

Em conjunto, a presente tese teve por objetivo avanços nos conhecimentos sobre o papel do AMePD de ratos no controle da atividade cardiovascular basal e reflexa utilizando-se de procedimento clássico de microinjeção de substância neste subnúcleo e análise dos dados

diretamente obtidos e incluindo-se também abordagem matemática adicional para a análise da variabilidade das variáveis testadas.

2 JUSTIFICATIVA

Baseados em dados experimentais que demonstraram que o AMePD é região encefálica relacionada com a modulação de diversos comportamentos e que igualmente pode estar envolvida no controle da atividade cardiovascular por causa de suas eferências com o ACe e com núcleos hipotalâmicos necessários para as respostas endócrinas, simpáticas e parassimpáticas, a hipótese inicial deste trabalho é de que a abundante presença de GLU, GABA, Ang II, OT e SST no AMePD possam estar relacionadas com a gênese e/ou modulação central da atividade cardiovascular basal e/ou modular as respostas reflexas geradas pelos barorreceptores e pelos quimiorreceptores periféricos em ratos não anestesiados. Porém não há relatos na literatura sobre a atuação desses neurotransmissores e neuropeptídeos no AMePD no controle cardiovascular em ratos.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

Em sentido amplo, busca-se estudar qual a participação de uma área específica do SN central, o AMePD, no controle da FC e da PA e seus ajustes homeostáticos relacionando-os com a atividade glutamatérgica, GABAérgica, angiotensinérgica, ocitocinérgica e somatostatinérgica locais. Os resultados advindos do presente estudo podem contribuir para avançar o conhecimento sobre a base neural do controle central de tais parâmetros além do tronco encefálico. Ademais, busca-se revelar qual a base neuroquímica dessa atividade, colaborando com os dados existentes na literatura, mas desvendando algo ainda inédito que é a contribuição desses neurotransmissores e neuromoduladores no AMePD para o controle da atividade cardiovascular basal e na faixa de atuação reflexa mediada por estimulação barorreceptora e quimiorreceptora em ratos.

3.2 ESPECÍFICOS

1- Estudar a atividade cardiovascular basal, avaliado pelos parâmetros de FC e PA em ratos adultos não anestesiados após microinjeção no AMePD de salina, GLU, GABA, Ang II, OT e SST.

2 - Avaliar a resposta cardiovascular reflexa da FC e da PA desencadeada pela estimulação dos barorreceptores e quimiorreceptores periféricos em ratos adultos não anestesiados após microinjeção direta no AMePD de salina, GLU, GABA, Ang II, OT e SST.

3 – Determinar a variabilidade nas respostas cardiovasculares de FC e PA, pela análise espectral e análise simbólica desses parâmetros, desencadeada pela microinjeção direta no AMePD de salina, GLU, GABA, Ang II, OT e SST.

4 ADENDO

Há que se comentar que, dado o desenho experimental empregado, os resultados dos grupos microinjetados com GLU e GABA foram os primeiros a ser terminados. Com um dos resultados desta tese foi apresentar os dados inéditos referentes a esse primeiro grande experimento com esses neurotransmissores, eles compuseram um artigo inicial, submetido e aprovado. Quase que concomitantemente, realizou-se um levantamento dos dados já disponíveis obtidos para o AMePD de ratos e fez-se uma descrição crítica em capítulo de livro que foi aprovado após revisão. Por fim os dados desta tese permitirão compor uma terceira publicação com os dados experimentais dos neuropeptídeos testados. A seguir, apresentar-se-ão esses três trabalhos.

5 ESTUDO I

Book – Insights into the amygdala: Structure, function and implications for disorders
Nova Science Publishers

Neurotransmitter and neuropeptidergic modulation of cardiovascular responses evoked by the posterodorsal medial amygdala of adult male rats

Chapter Proposed**Book – Insights into the amygdala: Structure, function and implications for disorders****Nova Science Publishers****Neurotransmitter and neuropeptidergic modulation of cardiovascular responses evoked by the posterodorsal medial amygdala of adult male rats**Edson Quagliotto^{1,2}, Karina R. Casali³, Pedro Dal Lago⁴, and Alberto A. Rasia-Filho^{1,2}¹Department of Basic Sciences/Physiology, Federal University of Health Sciences, R. Sarmiento Leite 245, Porto Alegre RS 90050-110, Brazil² Graduate Course in Neurosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS 90050-170, Brazil³ Institute of Cardiology of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90620-000, Brazil.⁴ Department of Physical Therapy, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil**Corresponding author:** Prof. Alberto A. Rasia-Filho, Department of Basic Sciences/Physiology, Federal University of Health Sciences, R. Sarmiento Leite 245, Porto Alegre RS 90050-110, Brazil. E-mail: rasiafilho@pq.cnpq.br, aarf@ufcspa.edu.br.

ABSTRACT

The posterodorsal medial amygdala (MePD) has remarkable connections with hypothalamic nuclei that modulate emotional/social behaviors and sympathetic/parasympathetic-related responses. The MePD is relevant for the integration of chemosensory, genitosensory and olfactory information and, hypothetically, also for the concomitant, moment-to-moment cardiovascular responses needed to adjust heart rate and blood pressure according to the animal's ongoing demands. At the brainstem level, heart rate and blood pressure are not regulated independently but are connected through a negative feedback loop called the baroreflex, in which a sudden drop in arterial blood pressure causes an increase in heart rate and vice versa. It is thought that upstream brain regions, including the MePD and hypothalamus, can change the baroreflex gain, measured as the ratio of heart rate and blood pressure, depending on the behavioral demands and emotional status of an individual. However, the neurochemical basis of this dynamic regulation by the MePD is still unknown. Here it is depicted that microinjections of specific neurotransmitters and neuropeptides in the MePD can promote selective changes in cardiovascular responses in adult male rats. When compared with control data, glutamate and GABA modulated specifically the central control of the baroreflex response, leading to lower values in its maximum gain. GABA also decreased the upper plateau of the baroreflex curve. Histamine decreased the parasympathetic component of the heart rate variability, enhanced the sympathetic/parasympathetic balance at basal conditions and led to a significant impairment in the chemoreflex bradycardic response. Angiotensin II induced higher values in the maximum gain of the baroreflex responses and decreased the heart rate frequency following chemoreflex stimulation. Oxytocin and somatostatin switched the maximum range sensitivity of the baroreflex to lower levels, but had no effects on chemoreflex display. It is suggested that distinct synaptic inputs to the MePD can induce a broad range of baroreceptor- and chemoreceptor-reflex responses, allowing adjustment to the animal's behavior, and these responses might be driven intentionally. Moreover, this functional plasticity of the MePD in the central organization of the cardiovascular system can have relevant implications under homeostatic and allostatic conditions.

KEYWORDS: Baroreceptor reflex, blood pressure, central cardiovascular control, chemoreceptor reflex, extended amygdala, power spectral analysis.

1. THE MEDIAL AMYGDALOID NUCLEUS

Since its earliest descriptions, the “amygdala” (from the Greek word for “almond”), located in the basal forebrain, was not considered a single anatomical unit (e.g., Johnston, 1923). In addition, the term “amygdala” represents a morphologically but also functionally heterogeneous brain region (Brodal, 1981; Swanson and Petrovich, 1998). The rodent amygdala is composed of several interconnected nuclei and subnuclei process emotionally-loaded sensory information and modulate social behavior (reviewed in Davis, 1992; LeDoux, 1992; Pitkänen et al., 1997; Newman, 1999; Rasia-Filho et al., 2000; Knapska et al., 2007; Rasia-Filho et al., 2008).

The medial nucleus of the amygdala (MeA) is a large superficial amygdaloid nucleus regarded as part of the medial division of the “extended amygdala” (Alheid et al., 1995; de Olmos et al., 2004) that shares some structural features with the anterior, ventral and posterior parts of the medial bed nucleus of the stria terminalis (BST), the intra-amygdaloid BST, the medial division of the supracapsular BST and the medial division of the sublenticular extended amygdala in rodents (Alheid et al., 1995). Recently, the subnuclei of the MeA and other components of the medial extended amygdala were shown to have various histogenetic origins in mice, including cell groups that derive mainly from a caudoventral pallidal subdivision and, to a lesser extent, from the ventral pallidum, the commissural preoptic area and the supraoptoparaventricular domain of the hypothalamus (Bupesh et al., 2011). These developmental data, however, did not support the striatal nature of the MeA in mice (García-López et al., 2008). Various methodological approaches studying the cytoarchitectonic, chemoarchitectonic, hodological and functional characteristics of the rat MeA allowed its subdivision into four parts, named the anterodorsal (MeAD), anteroventral (MeAV), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) subnuclei (Alheid et al., 1995; Canteras et al., 1995; de Olmos et al., 2004; Dall’Oglio et al., 2008a,b). The MeAD consists of small- to medium-sized neurons intermingled with some large ones, and has a notable rostro-caudal location within the MeA (Alheid et al., 1995; Rasia-Filho et al., 1999). Little information is available about the MeAV (e.g., see Carrillo et al., 2007; Blake & Meredith, 2011). The MePD, the subnucleus that has received more attention recently (Figure 1), can be further divided into three columns of neurons lying ventral to the stria terminalis (ST) and parallel and lateral to the optic tract (e.g., Coolen et al., 1997; de Olmos et al., 2004). The MePV does not have the same columnar characteristic, but appears to have an outer cellular part

surrounding an inner core that is more evident when studying its embryonic origin (Bupesh et al., 2011) or local glial processes (Rasia-Filho et al., 2002; Martinez et al., 2006).

There are extensive connections among the MeA subnuclei (Canteras et al., 1995). Their projections can reach other brain areas passing dorsally through the ST, a bidirectional pathway that also conveys afferents to the MePD, probably to provide feedback and/or feed-forward controls, or ventrally through the posteroventral sectors of the so-called “substantia innominata,” accompanying the ventral amygdalofugal/ansa peduncularis pathway (de Olmos et al., 2004). These projections can relay emotionally relevant olfactory information to the accumbens nucleus or medial hypothalamic nuclei, among other important targets (de Olmos et al., 2004). However, each of the subnuclei of the MeA has its own characteristic connections. The MeAD receives projections from: (i) the infralimbic division of the medial prefrontal cortex, which may be a higher-order olfactory area able to integrate olfactory information with polymodal non-olfactory inputs (McDonald, 1998), as well as (ii) socially-relevant vomeronasal stimuli from the accessory olfactory bulb (Meredith & Westberry, 2004; Pereno et al., 2011). Local γ -aminobutyric acid (GABA)-containing neurons colocalize Fos after male or female rats have been exposed to the airborne volatiles emanating from soiled bedding of the opposite sex (Pereno et al., 2011). From the MeAD, the processing of pheromonal signals is sent to the intercalated nuclei of the amygdala, and then through inhibitory GABAergic efferents to the MePD (Meredith & Westberry, 2004). Axons from the accessory olfactory bulb (AOB) reach the MePD either directly (Ichikawa, 1988) or indirectly through other amygdaloid nuclei (e.g., the posterior and posterior cortical ones), which provide additional olfactory and vomeronasal input to the MePD (Nishizuka & Arai, 1983; Canteras et al., 1992). As a result of this neural processing, neurons in the MeA subnuclei, including the MePD, show an increase in Fos immunoreactivity when animals are exposed to sex-related pheromonal stimuli (Bressler & Baum, 1996; Blake & Meredith, 2011; Dhungel et al., 2011; Veyrac et al., 2011), whereas oxytocin, a peptide known to be important for social recognition, can block the increase in Fos expression in the MeA that is induced by conspecific or heterospecific chemical stimuli (Samuelsen & Meredith, 2011).

There are only a few commissural axons connecting the ipsi- and contralateral MePD in both hemispheres; rather, the MePD projects to the ipsilateral posteromedial cortical, posterior and posterolateral cortical amygdaloid nuclei (Canteras et al., 1995). The MePD innervates different hypothalamic nuclei through direct projections (Canteras et al., 1995; Petrovich et al., 2001; Cavalcante et al., 2006), or indirectly via some components of the BST

(Dong et al., 2001; Polston et al., 2004). Furthermore, efferent connections to the hypothalamic anteroventral, periventricular and preoptic nuclei, mainly via the ST, enable the MePD to regulate the neuroendocrine secretion of gonadotrophin-releasing hormone, and to regulate sexual and maternal behaviors (Rasia-Filho et al., 1991; Canteras et al., 1995; Pfau & Heeb, 1997; Petrovich et al., 2001; Sheehan et al., 2001; Simerly, 2004; Choi et al., 2005; Lehmann & Erskine, 2005). The MePD also modulates prolactin secretion in proestrus females (Polston & Erskine, 2001). Other hypothalamic areas innervated by the MePD include the anterior hypothalamic area (although apparently by varicose fibers-of-passage), the capsule surrounding the central and ventrolateral parts of the ventromedial nucleus, the adjacent regions of the tuberal nucleus, the ventral premammillary nucleus, the adjacent ventral regions of the posterior hypothalamus, the fiber capsule around caudal regions of the medial mammillary nucleus and the supramammillary nucleus (Canteras et al., 1995).

The MePV can relay pheromonal information to the medial part of the preoptic nucleus (Veyrac et al., 2011) and hormonal and/or pelvic viscerosensory information to the ventromedial hypothalamic nucleus to regulate female reproductive behavior (Pfau & Heeb 1997; Shelley & Meisel 2005). The MePV can further modulate a “neuroendocrine motor zone”, a “visceromotor pattern generator network” and parts of the defensive behavior control system in the hypothalamus (Dong et al., 2001; Petrovich et al., 2001). Thus, these MeA subnuclei show remarkable sexually-dimorphic features, and the morphology of their neurons can be influenced by gonadal hormones, including the number of post-synaptic dendritic spines (reviewed in Rasia-Filho et al., 2009).

2. INTEGRATED FUNCTIONS OF THE SUBNUCLEI OF THE MEDIAL AMYGDALA

The aforementioned hodological data are relevant to understanding the synaptic demand that is temporally and spatially integrated by neurons to adapt to dynamic situation (Newman, 1999; Rasia-Filho, 2006). In this sense, the MeA subnuclei have important roles in the interpretation of olfactory/vomeronasal and genitosensory information (Guillamón & Segovia, 1997; Pfau & Heeb, 1997; Dielenberg & McGregor, 2001; Meredith & Westberry, 2004), modulation of sexual behavior of both sexes and maternal/parental care (Coolen et al., 1996; Newman, 1999; Sheehan et al., 2001; Rasia-Filho et al., 2004; Lehmann & Erskine, 2005; de Castilhos et al., 2006, 2008), aggressive and defensive behaviors (Newman, 1999; Savonenko et al., 1999; Rasia-Filho et al., 2008), anxiety, conditioned or innate fear (Adamec

& Morgan, 1994; Duncan et al., 1996; Blanchard et al., 2005) and neuroendocrine stress responses (Dayas et al., 1999; Marcuzzo et al., 2007; Lin et al., 2011).

A functional scheme aimed at elucidating the role of the MePD must consider that neurons may act on parallel or overlapping circuits modulating different social behaviors (Newman, 1999). Indeed, MePD neurons are sexually dimorphic, as indicated by their differential activation by sex steroids, and are embedded within circuitries that receive information from different somatosensory pathways, as well as intra-MeA connections. It has been hypothesized that time and space integration of synaptic inputs by MePD neurons will determine their firing pattern, helping the animal to select the most adequate behavior out of their behavioral repertoire (Rasia-Filho, 2006; Rasia-Filho et al., 2009).

Central regulation of the cardiovascular system must ensure appropriate hemodynamic responses during generation and execution of social behaviors (Rasia-Filho, 2006; Longhurst, 2008; Quagliotto et al., 2008). It involves two sets of interactive functional components, one consisting of nervous system areas that maintain the basal or tonic sympathetic/parasympathetic output to the heart and vascular beds, the other providing phasic sensory information to neural circuits that modulate the activity of effector organs (Longhurst, 2008). The latter component mainly includes short-term brainstem reflexes with convergent input from carotid/aortic baroreceptors and chemoreceptors, although forebrain regions are also involved in the modulation of cardiovascular responses (Longhurst, 2008). Baroreceptors respond to both increases and decreases in arterial blood pressure (AP), whereas peripheral chemoreceptors are sensitive to the blood partial pressure of carbon dioxide, partial pressure of oxygen and pH, among other chemical and non-chemical stimuli (Longhurst, 2008). Baroreflex responses adjust heart rate (HR), vascular resistance and the renin–angiotensin system to the perceived pressoric condition; chemoreflexes increase ventilation, promote a sympathetically-mediated increase in cardiac pumping, vasoconstriction and a vagally-mediated bradycardia (Quagliotto et al., 2008 and references therein).

As part of a functional network, various central regions contribute to the ultimate cardiovascular responses. Among them, projections from the MeA subnuclei reach many brain areas involved in the central cardiovascular organization (Canteras et al., 1995; Petrovich et al., 2001). These include projections to the: (i) central amygdaloid nucleus (CeA), which innervates various hypothalamic nuclei related with defense reactions (Davis, 1992), and whose electrical activation led to a higher HR due to vagal withdrawal and, thereafter, to an increased sympathetic tone (Turner et al., 1986); (ii) A1 noradrenergic cells

of the caudal ventrolateral medulla; and (iii) A2 noradrenergic cells of the nucleus of the solitary tract (Canteras et al., 1995; Dayas & Day, 2001; Saha, 2005). The MePD also innervates the neuroendocrine and sympathetic/parasympathetic-related parts of the periventricular zone in the hypothalamus of rats (Petrovich et al., 2001), potentially integrating cardiovascular and behavioral responses (Quagliotto et al., 2008; Davern et al., 2009, 2011). Accordingly, the MePD appears to be involved in the regulation of HR and AP under both adaptive and pathological conditions (Kubo et al., 2004; Quagliotto et al., 2008). This is supported by findings in normal Wistar and spontaneously hypertensive rats showing both increased c-fos immunoreactivity in the posterior MeA subnuclei after an air jet stress protocol (Porter & Hayward, 2011). In addition, electrical stimulation of the MePD increased AP in mice (Zhang et al., 2009) inappropriate activation of the mouse MeA after fear or aversive stress led to sympathetic activation and neurogenic hypertension (Davern & Head, 2011; Davern et al., 2010) and bilateral MePD and MePV neurotoxic lesions attenuated the development of high AP in spontaneously hypertensive rats (Fukumori et al., 2004).

2.1 NEUROTRANSMITTERS IN THE MEDIAL AMYGDALA

There are an increasing number of neurotransmitters and/or neuromodulators found in the MePD that are promising candidates in the modulation of cardiovascular responses. Among those, glutamate was detected in neurons in the MeA of male gerbils, these neurons accounting for almost 70% of all ejaculation-activated cells in the MePD (Simmons & Yahr, 2003). Glutamatergic AMPA1 (alpha 1) and NMDA1 and 2B receptors are prominent in the MePD of mice (Allen Mouse Brain Atlas, 2009). Stimulation of the MeA with glutamate (Lehmann & Erskine, 2005) and the activation of NMDA receptors in the MePD bring about long-term changes in prolactin secretion needed for pregnancy/pseudopregnancy, normally induced by mating/vaginal stimulation in female rats (Polston et al., 2001; Lehmann et al., 2005). The MeA is also rich in GABAergic neurons and innervations, as there is a notable presence of the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase-65 (GAD-65) mRNA in the MeA of rats (Swanson & Petrovich, 1998), and GABA immunoreactive neurons and boutons in the MeA of gerbils (Simmons & Yahr, 2003) and rats (Nitecka & Ben-Ari, 1987; Stefanova, 1998; Cooke & Woolley, 2005), the latter mainly found in the neuropil (Gloor, 1997). Moreover, mRNA for GAD-67, another GABA-synthesizing enzyme, is abundantly expressed in MePD neurons activated by conspecific male odors for agonistic behaviors (Donato et al., 2010). From the MePD, GABAergic inhibitory projections are sent

to the medial hypothalamus in rats (Choi et al., 2005). Notable immunolabeling was also found for both GABA_A and GABA_B receptors in the MePD of mice (Allen Mouse Brain Atlas, 2009).

Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase concentrations are much lower in the MeA than in other amygdaloid nuclei in rats (Ben-Ari et al., 1977b). Yet in the MePD of mice, muscarinic acetylcholine and glycine receptors were evident, although nicotinic acetylcholine receptors (despite presence of α -bungarotoxin cholinergic binding sites in dendrites; Arimatsu et al., 1981) or noradrenergic α 1 and β 1 receptors were less abundant, and there was no clear-cut evidence for the presence of dopamine D2 receptors (Allen Mouse Brain Atlas, 2009). Serotonergic 5-HT_{1A} receptors were found in the posterior MeA of rats (Flügge et al., 1999), and an activation of these receptors with the agonist 8-OH-DPAT facilitated male sexual behavior (de Castilhos et al., 2006). Among all amygdaloid nuclei, the histamine-synthesizing enzyme histidine decarboxylase showed the highest levels in the MeA and CeA, together with the ventral BST (Ben-Ari et al., 1977a).

2.2 NEUROPEPTIDES AND STEROID RECEPTORS IN THE MEDIAL AMYGDALA

A variety of neuropeptides are found in the MeA, although many of them are more abundant in the MePD. They seem to be localized in projection neurons that send fibers to the ST or the ventral amygdalofugal pathway (Gloor, 1997). Moderate to large amounts of somatostatin, substance P, cholecystokinin and vasopressin are found in the cell bodies, fibers and terminals in the MeA subnuclei (Micevych et al., 1988; Oro et al., 1988; Malsbury & McKay, 1994; Gloor, 1997; De Vries & Simerly, 2002; Singewald et al., 2008). Substance P-immunoreactive fiber staining is not restricted to the MePD and could also be evidenced in the MePV, decreasing in both regions weeks after castration of adult male rats (Malsbury & McKay, 1994). In contrast, the number of cholecystokinin-immunoreactive cells showed a clear sexual dimorphism and an estrous cycle variation in the MePD and other functionally integrated gonadal hormone-responsive brain areas of rats (Oro et al., 1988; De Vries & Simerly, 2002).

Notable oxytocin binding was observed preferentially in the medial and lateral layers of the rat MePD, whereas binding was moderate in the intermediate layer (Veinante & Freund-Mercier, 1997). Oxytocin application to the mouse MeA facilitated social memory

acquisition important for reproduction (Ferguson et al., 2001; Samuelsen & Meredith, 2011). Somatostatin receptors 1, 2 and 4 were found in the mouse MePD, although not at high levels (Allen Mouse Brain Atlas, 2009). Somatostatin is probably localized in GABAergic inhibitory interneurons in amygdaloid nuclei with a cortex-like architecture (Tuunanen et al., 1996), although its localization in MeA neurons is less clear. However, somatostatin could promote a dose-dependent inhibition of MeA neurons either directly or by activating GABAergic synaptic transmission in the rat MeA (Lu et al., 1995). The expression of the 1A subunit of angiotensin II (Ang II) receptors is considerably higher than that of the 1B subunit in this brain area (Allen Mouse Brain Atlas, 2009). The microinjection of Ang II into the MeA inhibits sexual behavior of male rats (Breigeiron et al., 2002). In the MePD, delta opioid receptors are associated with axon terminals around cell bodies (Wilson et al., 2002). Neuropeptide Y receptors subunits 1 and 5 have a low staining intensity or are not detected in the rat MeA (Wolak et al., 2003).

Glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA occurs in cells of the anterior and posterior MeA, as shown by light and electron microscopic studies and *in situ* hybridization (Morimoto et al., 1996; Brunton et al., 2011). The MeA subnuclei express the mRNAs for mineralocorticoid and glucocorticoid receptors (weaker for the former than the latter; Herman et al., 2005) with a possible functional implication in stress responses and memory modulation (Roozendaal & McGaugh, 1996). In addition, mRNA of gonadal hormone receptors is highly expressed in the MeA of both male and female rats, as revealed by *in situ* hybridization. Androgen receptor mRNA and receptor fluorescent labeling are evident in the posterior MeA, though mainly in the MePD rather than in the MePV (Simerly et al., 1990; Gréco et al., 1998). In contrast, both estrogen receptor α and β mRNA are found in the MeAD and MePV (Simerly et al., 1990; Shughrue et al., 1997; Österlund et al., 1998), although their expression is highest in the MePD with a differential dorsal to ventral distribution (Gréco et al., 2001, 2003). Progesterone receptor mRNA is present in the MePD and MePV (De Vries & Simerly, 2002). Prolactin receptors are also abundantly expressed in the mice MePD (Allen Mouse Brain Atlas, 2009). Furthermore, the rat MePD displays numerous NADPH-diaphorase positive neurons (de Castilhos et al., 2009), and Fos co-localized with androgen receptor and nitric oxide synthase in the lateral MePD in recently mated male gerbils that ejaculated (Simmons & Yahr, 2011). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF; Kaloustian et al., 2008), and the cAMP response element-binding protein (CREB) were also detected in the MePD (Zhou et al., 2005). For further information on the

chemoarchitectonics of the MeA in different species, see reviews on the anatomical organization of the amygdala (Gloor, 1997; de Olmos et al., 2004).

3. CARDIOVASCULAR MODULATION BY THE POSTERODORSAL MEDIAL NUCLEUS

The integrative physiological role of transmitters and peptides in the MePD is currently unknown. Therefore, it is of major interest to study whether these different neurotransmitters/neuropeptides can evoke cardiovascular changes by acting directly in the rat MePD. Some possible candidates for this modulation exist. For example, after intracerebroventricular (i.c.v.) or intracerebral injection (e.g., into the dorsomedial hypothalamic nucleus), glutamate and GABA have marked effects on the regulation of central cardiovascular responses. The former transmitter induces excitatory and the latter inhibitory effects on the HR and AP (Magri et al., 1984; Gören et al., 1996, 2000, 2003). The GABA-mediated hypotensive responses could be due to a reduced sympathetic outflow (Turner et al., 1986). Histamine, when applied centrally, can promote peripheral vasoconstriction, and increase the HR and AP (Rao & Dunbar, 2005) by activating sympathetic mechanisms (Akins & Bealer, 1991) and the renin-angiotensin system or by facilitating vasopressinergic effects (Jochem, 2004). Furthermore, oxytocin might reduce cardiovascular responses to acute stress in rats (Wsól et al., 2009). An increase in the mean AP (MAP) that should be induced by intravenous phenylephrine was reduced in subcutaneously oxytocin-treated rats (Ondrejčáková et al., 2010). Both effects suggest a modulation of the sympathetic system by this peptide. Somatostatin might promote inhibitory effects resembling those induced by GABA (Lu et al., 1995; Tuunanen et al., 1997). Finally, i.c.v. injection of Ang II increased the MAP despite a concomitant elevation in plasma oxytocin levels (Reis et al., 2010). Such an increase in the AP by Ang II might be mediated centrally, partly by activating the central sympathetic nervous system, and partly by elevating plasma noradrenaline and adrenaline levels (Turner et al., 1986).

Experimental results demonstrate that the MePD plays an active role in central cardiovascular regulation in awake rats. We have investigated the effects of these candidate neurotransmitters/neuropeptides in adult male Wistar rats after microinjection directly into the MePD. All animals were anesthetized with ketamine and xylazine and stereotaxically implanted with a cannula (0.6 mm of outer diameter, OD) aiming at the right MePD, which was chosen based on previous data that demonstrated modulation of behavioral and

cardiovascular activities by this hemisphere (Adamec & Morgan, 1994; de Castilhos et al., 2006; Quagliotto et al., 2008). Five days after surgery, rats were implanted with a vascular catheter into the left femoral artery and vein, again under anesthesia. The arterial and venous catheters were used for direct hemodynamic measurements and drug administration, respectively. One day later, each arterial catheter was connected to a strain-gauge pressure transducer and the recorded data were analyzed on a beat-to-beat basis to quantify the parameters of interest. Initial HR and AP signals within normal ranges served as baseline recordings before microinjection of saline (0.3 μ l, n = 5) to serve as a control, and of glutamate (2 μ g/0.3 μ l, n = 7), GABA (61 ng/0.3 μ l and 100 μ g/0.3 μ l, n = 7 in both groups), histamine (30 μ g/0.3 μ l and 300 μ g/0.3 μ l, n = 8 in both groups), oxytocin (10 ng/0.3 μ l, n = 6), somatostatin (1 μ M/0.3 μ l, n = 6) or Ang II (50 pmol/0.3 μ l, n = 6) into the MePD. These doses were based on previous studies that showed effective results in different brain areas, some including amygdaloid nuclei. The dose of glutamate is close to physiological values (Fillenz, 1995). The doses of GABA (Timmerman & Westerink, 1997; Genest et al., 2007), histamine (Itoh et al., 1991; Jiang et al., 2005), oxytocin (Ishizuka et al., 1993; Consiglio et al., 2005; Lee et al., 2005), somatostatin (Rakovska et al., 2002; Momiyama & Zaborszky, 2006; De Bundel et al., 2010) and Ang II (Casto & Phillipis, 1985; Fontes et al., 1997; Breigeiron et al., 2002) were applied at pharmacologically effective doses. Five minutes after each microinjection, new cardiovascular recordings were obtained for the next 15 min. Before testing baroreceptor- and chemoreceptor-mediated reflexes, two other MePD microinjections were carried out, one for each respective procedure. Therefore, every rat received a total of three microinjections of each substance assigned to its experimental group: one to test MePD microinjection effects on HR and BP values, one before testing baroreflex responses and one before testing chemoreflex responses. The order for testing baroreflex or chemoreflex activities was randomly chosen for each rat in the different experimental groups. Recordings were started when hemodynamic values returned to baseline levels and remained stable, as previously reported (Quagliotto et al., 2008). The microinjections to the MePD were related to the measurement of the baroreflex and chemoreflex in terms of their functional relevance and cardiovascular responses, avoiding evident carry-over effects before each microinjection.

Acute baroreflex-mediated changes were evaluated during peak increases or decreases in the MAP following venous injections (0.1 ml) of a single dose of phenylephrine (8 μ g/ml) or sodium nitroprusside (100 μ g/ml), respectively. Sigmoidal logistic equation and curves were made as described elsewhere (Quagliotto et al., 2008). Chemoreflex sensitivity was

tested by administering increasing doses of potassium cyanide (KCN; 60, 100, 140 and 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.; injected volumes ranging from 0.06 to 0.18 ml), which causes a cytotoxic hypoxia. Mean HR and MAP were measured continuously 10 s before and 15 s after each KCN injection. Inter-injection intervals between KCN applications were around 4 min, and a new dose was administered only when appropriate HR and MAP baseline levels had been reestablished (Quagliotto et al., 2008).

Power spectral analysis was also performed to study the effects of some of the tested substances. As described previously, mathematical approaches detect the different oscillatory components involved in the variability of the HR and BP (Fazan et al., 2005; Malliani et al., 1991; Montano et al., 1994; Nollo et al., 2001; Quagliotto et al., 2008; Tobaldini et al., 2009a,b). After microinjections into the MePD, power spectral analyses were calculated for the systolic arterial pressure (SAP) and pulse interval (PI), generating a tachogram and a systogram, respectively. Frequency domain analysis of HR variability (HRV) and AP variability (APV) were obtained with an autoregressive algorithm (Malliani et al., 1991; Nollo et al., 2001) on randomly chosen stationary sequences (Porta et al., 2008). The low-frequency (LF, 0.2–0.75 Hz) and high-frequency (HF, 0.75–3.0 Hz) spectral components of SAP and PI were expressed in both absolute and normalized units (Montano et al., 1994). Accordingly, the present method estimates the center frequency and power of each relevant oscillatory component, indicating the possible involvement of the sympathetic/parasympathetic systems in the central control of cardiovascular responses. The LF/HF ratio can serve as a synthetic expression of the sympathovagal balance. In addition, the alpha-index was calculated from the ratio between the R-R interval and the SAP variability within the LF ranges, adding to the evaluation of the baroreflex sensitivity (Malliani et al., 1991; Montano et al., 1994; Nollo et al., 2001; Fazan et al., 2005).

At the end of the experiments, the microinjection site in the MePD was histologically determined and compared to the images of an atlas (Figure 1, see Paxinos & Watson, 1998). Rats with microinjection cannulae placed in the vicinity of the MePD were assigned to the “non-target” groups ($n = 7$ rats for each microinjected substance). Their results served as controls for the spread of the drugs and unspecific effects in the vicinity of the MePD (de Castilhos et al., 2006; Quagliotto et al., 2008). No data from these additional control groups resembled the effects obtained after microinjections hit the MePD (data not shown), and no significant statistical difference was found in the basal HR, SAP, diastolic AP and MAP

following microinjections of any one of the tested substance when compared to saline ($P>0.05$ in all cases).

In contrast, reflex responses were affected by many neurotransmitters/neuromodulators microinjected directly into the MePD. Contrasted with the control group, glutamate and both doses of GABA reduced the maximum gain of the baroreflex responses. The lower dose of GABA (61ng) promoted the highest effect in the MePD by decreasing the upper plateau of the baroreflex curve ($P<0.05$ in all cases; Figure 2). No effect was found on the HR and AP following chemoreflex activation (Neckel, 2007). Histamine (30 μ g) significantly altered the maximum range sensitivity of the baroreflex, shifting values to hypertensive levels ($P<0.05$, Figure 3), although probably not by inducing a higher sympathetic activity, as discussed earlier (Quagliotto et al., 2008). The higher dose of this neurotransmitter (300 μ g) did not affect the baroreflex activity, but increased the LF component of the HRV when compared with the saline or 30 μ g histamine (lower dose) groups. It decreased the variability in the parasympathetic activity, enhanced the sympathetic/parasympathetic balance, and led to an impaired chemoreflex bradycardic response following the intermediate dose of KCN ($P<0.05$ in all cases, Figure 4; Quagliotto et al., 2008).

Compared to the control data and oxytocin or somatostatin, Ang II microinjected into the MePD led to significantly higher values in the maximum gain of the baroreceptor reflex responses ($P<0.05$, Figure 5). In contrast, both oxytocin and somatostatin injections into the MePD reduced the maximum range sensitivity of the baroreflex to lower pressoric levels ($P<0.05$ in both cases, Figure 5). Chemoreflex responses were affected mainly by Ang II at the dose of KCN 140 μ g/kg, showing a remarkable decrease in the heart rate frequency following reflex stimulation ($P<0.05$), whereas oxytocin and somatostatin did not differ from saline in their results ($P>0.05$ in both cases, Figure 6).

4. FUNCTIONAL IMPLICATIONS

These present data clearly indicate that the MePD is a relevant component of the central cardiovascular organization in rats. This adds the MePD to the network modulating baroreceptor and chemoreceptor reflexes responses. As pointed out by Turner et al. (1986), “The state of knowledge largely depends upon the techniques currently available to investigate a given question. Thus, for many years our understanding of the central

organization of cardiovascular control was based on experiments in which areas of brain were lesioned or electrically stimulated. From such experiments, the concept of a 'vasomotor centre' located in the medulla and controlling the circulation emerged (see Alexander, 1946). However, in more recent studies it has become increasingly evident that, although the idea of such a 'centre' in the medulla happened to be both an elaborate and convenient one, there is really no good evidence in support of this mythical structure dominating cardiovascular control (Peiss, 1965; Hilton, 1975). In contrast, it is now clear that several inter-connected structures located throughout the rostro-caudal brain axis (in a manner analogous to that of somatomotor control) play an important role in cardiovascular regulation, suggesting a functional network of ascending and descending projections, which together mediate the complex response patterns inherent in 'sympathetic/parasympathetic' control" (page 340; sympathetic/parasympathetic was used rather than 'autonomic' since the literal meaning of the latter term does not represent an actual characteristic of the nervous system organization and can induce misconceptions; see Rasia-Filho, 2006). This statement above also fits quite well with the "theory of the functional systems" of the central nervous system, in which anatomically distinct structures are integrated for functional purposes (Anokhin, 1974; Timolaria, 1983).

Turner et al. (1986) further described that "...some insight into the role of the amygdala in central cardiovascular control, particularly with respect to integrative processes occurring within the amygdaloid complex during arousal, was provided by Stock et al. (1983). This group has shown that cardiovascular responses, accompanying mild behavioral arousal, can be elicited in the awake cat by electrical stimulation within the CeA. These effects include an increase in vascular resistance in both the femoral and mesenteric beds, but not in the renal vessels, and an ensuing rise in arterial blood pressure. Heart rate is increased, initially by vagal withdrawal and thereafter by an enhanced sympathetic tone. The renin-angiotensin system is also activated, an effect mediated by β -adrenoceptors. During the early phase of this response, baroreceptor reflex sensitivity is decreased. A similar pattern of response can be observed when unrestrained cats are confronted with natural stimuli, such as mice or another cat. Furthermore, when single neuronal activity is recorded from the CeA during the response period evoked by such stimuli, then a clear relationship between the level of arousal and the rate of unit firing is obtained... This relationship also exists during periods of decreased arousal, such as those during natural sleep (Reich et al., 1983). These results indicate that the

amygdala is not only of importance in the integration of cardiovascular adaptive changes, but also in the complex pattern of behavioral arousal itself.” (page 353).

It is highly conceivable that the MePD can also elicit contextual homeostatic or adaptive general adjustments in the context of emotional/social stimuli processing (Dayas et al., 1999; Rasia-Filho et al., 2004; 2009). Previously, the lateral, basolateral and CeA nuclei were associated with the interpretation and evoked responses to fearful stimuli, for which the connections, mainly from the central nucleus, to different hypothalamic areas and the brain stem were associated with behavioral and sympathetic/parasympathetic responses (reviewed in Rasia-Filho et al., 2000). Like the MeA, the CeA is also part of the “extended amygdala,” although it differs considerably from the MeA in the extent of its downstream brainstem connections (Alheid, 2003; de Olmos et al., 2004). However, there is some evidence that the MeA, rather than the CeA, is involved in neuroendocrine responses to an emotional stressor (Dayas et al., 1999). More than this latter nucleus, neurotoxic fiber-sparing lesions of the rat MeA reduced the neuronal activation (assumed by Fos expression) in the medial part of the hypothalamic paraventricular nucleus, where cells that produce corticotrophin-releasing hormone are found, and in the hypothalamic supraoptic and paraventricular oxytocinergic cells that accompany stress-induced adrenal responses (Dayas et al., 1999). Therefore, the MePD should not only be included into subcortical networks modulating emotional and social behaviors, but also cardiovascular responses in awake rats. As previously described (Quagliotto et al., 2008), the MePD might modulate the baroreceptor- and chemoreceptor-reflexes and broaden their ranges to adjust homeostatic responses to the animals’s needs during execution of an intended behavior (additional explanation in Rasia-Filho, 2006). Hence the MePD may contribute to the coordination of sympathetic and parasympathetic responses during ongoing behavior. This would provide the animal with a dynamic mechanism of cardiovascular control suitable for the display of social behaviors, in which the MePD is a relevant component in differently integrated brain circuits (Newman, 1999; Quagliotto et al., 2008; Rasia-Filho et al., 2008).

The effects induced by different neurotransmitters/neuropeptides microinjected into the MePD suggest that this subnucleus contributes more to phasic changes of cardiovascular reflexes than to basal HR or AP levels. While glutamate and GABA application into the MePD affected the baroreflex response, histamine influenced both the baro- and chemoreflex. Moreover, glutamate in the MePD seems to potentiate the central sympathetic cardiovascular system, whereas GABA increases the central parasympathetic control of the heart, a

hypothesis that deserves further investigation. Histamine showed a complex response, with the lower dose modulating part of the baroreflex response, but the higher doses specifically changing the chemoreflex response. Interestingly, Ang II in the MePD promoted the opposite effect by increasing the maximum gain of the baroreflex response compared to glutamate or GABA. However, oxytocin and somatostatin led to decreased pressoric values following baroreceptor stimulation, in contrast to increased values following histamine microinjection. These data suggest that the MePD neurons involved in cardiovascular reflexes are responsive to different neurotransmitters, probably coding distinct synaptic inputs for specific “fine-tuning” of the cardiovascular system.

Additional effort is required to expand the present results by testing other central receptors and their interactions, and the peripheral sympathico-vagal balance. Furthermore, it is important to consider that neurotransmitter/neuropeptide actions in the MePD depend on their concentration in the extracellular space and the local neuro-glial network, which can be dynamically affected by the integrated synaptic activity. Concomitant release of main neurotransmitters together with neuromodulators depends on the firing pattern and calcium concentration inside the pre-synaptic axon terminals, and tonic or phasic activation by intra-amygdaloid or extra-amygdaloid inputs. As shown for the CeA (Paré et al., 2003), it is possible that transmitter-mediated excitatory, inhibitory and/or disinhibitory mechanisms in the MePD can promote a flexible, dose- and context-dependent modulation of the reflex sympathetic/parasympathetic cardiovascular activity.

5. CONCLUSION

The present work reinforces that the MePD is relevant for the central regulation of the baroreflex and chemoreflex cardiovascular responses by promoting selective responses according to the neurotransmitter/neuromodulator acting in this brain area. This is an important research field opened to novel contributions.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to Editorial comments and reviewing and also to Ms Barb Bittner (Creighton University, USA). Grants from the Brazilian Agencies CNPq and CAPES. PDL and AARF are CNPq researchers.

LEGENDS

Figure 1. Schematic drawing of coronal sections of the ventral part of the rat brain, showing the rat posterodorsal medial amygdala (MePD) close to the optic tract (opt), the stria terminalis (st) and lateral ventricle (lv). Coordinates placed on the right side of the images refer to the distance after Bregma (from -2.4 to 3.60 mm). Figures and abbreviations based on the atlas of Paxinos & Watson (1998).

Figure 2. Changes (values are mean \pm standard deviation) in the **(A)** maximum gain (in heart beats per minute/mmHg or bpm/mm Hg) and in the **(B)** upper plateau (in bpm) of the baroreflex of rats that received microinjections in the right MePD of saline (0.3 μ l, n = 5), glutamate (GLU 2 μ g/0.3 μ l) or GABA (61ng/0.3 μ l or 100 μ g/0.3 μ l; n = 7 in these other groups). ** $P < 0.01$ when compared to saline (one-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test). * $P < 0.05$ when compared to saline and GABA 100 μ g (one-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test).

Figure 3. Pressoric values (mean \pm standard deviation in mm Hg) found at half of the heart rate range evoked by the baroreflex response (MAP₅₀) of rats that received microinjections of saline (0.3 μ l, n = 10) or histamine (30 μ g/0.3 or 300 μ g/0.3 μ l; n = 8 in both groups) into the right MePD. * $P < 0.05$ when compared to saline (one-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test). Adapted from Quagliotto et al. (2008) with permission from Elsevier.

Figure 4. (A) Changes (Δ) in heart rate (HR, values are mean + standard deviation) in response to increasing doses of potassium cyanide (KCN). Experimental groups were microinjected saline (0.3 μ l, n = 10) or histamine (30 μ g and 300 μ g dissolved in 0.3 μ l of saline, n = 8 in both groups) into the right MePD. * $P < 0.01$ compared with the 60 μ g/kg KCN in the control group. ‡ $P < 0.05$ compared with the 60 μ g/kg KCN in the group that received histamine 300 μ g. † $P < 0.05$ compared with the 100 μ g/kg KCN in the in the group that received histamine 300 μ g (two-way ANOVA for repeated measures and Newman-Keuls *post hoc* test). (B) Changes (Δ) in mean arterial pressure (MAP, values are mean + standard

deviation) in response to increasing doses of potassium cyanide (KCN). Experimental groups are the same as in (A). No statistically significant differences were found among groups. Adapted from Quagliotto et al. (2008) with permission from Elsevier.

Figure 5. Changes (values are mean \pm standard deviation) in the **(A)** maximum gain (in bpm/mm Hg) and the **(B)** pressoric values (mean \pm standard deviation in mm Hg) found at half of the heart rate range evoked by the baroreflex response (MAP₅₀) of rats that received microinjections of saline (0.3 μ l), oxytocin (oxt, 10 ng/0.3 μ l), somatostatin (som, 1 μ M/0.3 μ l) or angiotensin II (Ang II, 50 pmol/0.3 μ l, n = 6 in all experimental groups) into the right MePD. * P <0.05 when compared to saline (one-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test).

Figure 6. (A) Changes (Δ) in heart rate (HR, values are mean + standard deviation) in response to increasing doses of potassium cyanide (KCN). Experimental groups were microinjected into the right MePD with saline (0.3 μ l), oxytocin (oxt, 10 ng/0.3 μ l), somatostatin (som 1 μ M/0.3 μ l) or angiotensin II (Ang II 50 pmol/0.3 μ l, n = 6 in all experimental groups). * P <0.05 compared with the 60 μ g/kg dose of KCN in the group microinjected with saline. † P <0.05 compared with the 60 μ g/kg dose of KCN in the Oxt 10 ng group. ‡ P <0.05 compared with the 140 μ g/kg dose of KCN in the saline group. + P <0.05 compared with the 100 μ g/kg dose of KCN in the oxt 10 ng group (two-way ANOVA for repeated measures and Newman-Keuls *post hoc* test). (B) Changes (Δ) in mean arterial pressure (MAP, values are mean + standard deviation) in response to increasing doses of potassium cyanide (KCN). Experimental groups are the same as in (A). * P <0.05 compared with the 60 μ g/kg dose of KCN in the group microinjected with Ang II 50 pmol (two-way ANOVA for repeated measures and Newman-Keuls *post hoc* test).

REFERENCES

- Adamec, R.E. & Morgan, H.D. (1994). The effect of kindling of different nuclei in the left and right amygdala on anxiety in the rat. *Physiol Behav.* 55, 1-12.
- Akins, V.F. & Bealer, S.L. (1991). Central nervous system histamine regulates peripheral sympathetic activity. *Am. J. Physiol.*, 260, H218-H224.
- Alexander, R.S. (1946). Tonic and reflex functions of medullary sympathetic centers. *J. Neurophysiol.*, 9, 205-217 (*apud* Turner et al., 1986).
- Allen Mouse Brain Atlas. Allen Mouse Brain Atlas [Internet]. Seattle (WA): Allen Institute for Brain Science. ©2009. Available from: <http://mouse.brain-map.org>.
- Alheid, G.F. (2003). Extended amygdala and basal forebrain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 985, 185-205.
- Alheid, G.F., de Olmos, J.S. & Beltramino, C.A. Amygdala and extended amygdala. In: Paxinos, G., editor. *The rat nervous system*. San Diego: Academic Press; 1995: 495-578.
- Anokhin, P.K. *Biology and Neurophysiology of the Conditioned Reflex and its Role in Adaptive Behaviour*. Oxford: Pergamon, 1974.
- Arimatsu, Y., Seto, A. & Amano, T. (1981). Sexual dimorphism in α -bungarotoxin binding capacity in the mouse amygdala. *Brain Res.*, 213, 432-437.
- Ben-Ari, Y., Le Gal La Salle, G., Barbin, G., Schwartz, J.C. & Garbarg, M. (1977a). Histamine synthesizing afferents within the amygdaloid complex and bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res.*, 138, 285-294.
- Ben-Ari, Y., Zigmond, R.E., Shute, C.C. & Lewis, P.R. (1977b). Regional distribution of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase within the amygdaloid complex and stria terminalis system. *Brain Res.*, 120, 435-444.
- Blake, C.B. & Meredith, M. (2011). Change in number and activation of androgen receptor-immunoreactive cells in the medial amygdala in response to chemosensory input. *Neuroscience*, 190, 228-238.
- Blanchard, D.C., Canteras, N.S., Markham, C.M., Pentkowski, N.S. & Blanchard, R.J. (2005). Lesions of structures showing Fos expression to cat presentation: effects on responsivity to a cat, cat odor, and nonpredator threat. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29, 1243-1253.

Breigeiron, M., Morris, M., Lucion, A.B. & Sanvitto, G.L. (2002). Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Horm Behav.*, *41*, 267-274.

Bressler, S.C. & Baum, M.J. (1996). Sex comparison of neuronal fos immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. *Neuroscience*, *71*, 1063-1072.

Brodal, A. *Neurological Anatomy*. New York: Oxford University Press, 1981.

Brunton, P.J., Donadio, M.V. & Russell, J.A. (2011). Sex differences in prenatally programmed anxiety behavior in rats: Differential corticotrophin-releasing hormone receptor mRNA expression in the amygdaloid complex. *Stress*, PMID: 21854167.

Bupesh, M., Legaz, I., Abellán, A. & Medina, L. (2011). Multiple telencephalic and extratelencephalic embryonic domains contribute neurons to the medial extended amygdala. *J. Comp. Neurol.*, *519*, 1505-1525.

Canteras, N.S., Simerly, R.B & Swanson, L.W. (1992). Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J. Comp. Neurol.*, *324*, 143-245.

Canteras, N.S., Simerly, R.B & Swanson, L.W. (1995). Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, *360*, 213-245.

Carrillo, B., Pinos, H., Guillamón, A., Panzica, G. & Collado, P. (2007). Morphometrical and neurochemical changes in the anteroventral subdivision of the rat medial amygdala during estrous cycle. *Brain Res.*, *1150*, 83-93.

Casto, R. & Phillips, M. I. (1985). Neuropeptide action in nucleus tractus solitarius: angiotensin specificity and hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, *249*, 341-347.

Cavalcante, J.C., Sita, L.V., Mascaro, M.B., Bittencourt, J.C. & Elias, C.F. (2006). Distribution of urocortin 3 neurons innervating the ventral premammillary nucleus in the rat brain. *Brain Res.*, *1089*, 116-125.

Choi, G.B., Dong, H-W., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Swanson, L.W. & Anderson, D.J. (2005). Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*, *46*, 647-660.

Consiglio, A.R., Borsoi, A., Pereira, G.A. & Lucion, A.B. (2005). Effects of oxytocin microinjected into the central amygdaloid nucleus and bed nucleus of stria terminalis on maternal aggressive behavior in rats. *Physiol Behav*, 85, 354-362.

Cooke, B.M. & Woolley, C.S. (2005). Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *J. Neurosci.*, 25, 10759-10767.

Coolen, L.M., Peters, H.J.P.W. & Veening, J.G. (1997). Distribution of Fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain. *Neuroscience*, 77, 1151-1161.

Coolen, L.M., Peters, H.J.P.W. & Veening, J.G. (1996). Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res.*, 738, 67-82.

Dall'Oglio, A., Gehlen, G., Achaval, M. & Rasia-Filho, A.A. (2008a). Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: Further data based on the Golgi method. *Neurosci. Lett.*, 430, 151-156.

Dall'Oglio, A., Gehlen, G., Achaval, M. & Rasia-Filho, A.A. (2008b). Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the "ventral" medial amygdala subnuclei of adult male and female rats. *Neurosci Lett.*, 439, 287-292.

Dayas, C.V., Buller, K.M. & Day, T.A. (1999). Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for the involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 2312-2322.

Dayas, C.V. & Day, T.A. (2001). Opposing roles for medial and central amygdala in the initiation of noradrenergic cell responses to a psychological stressor. *Eur. J. Neurosci.*, 15, 1712-1718.

Davern, P.J., Jackson, K.L., Nguyen-Huu, T.P., La Greca, L. & Head, G.A. (2010). Cardiovascular reactivity and neuronal activation to stress in Schlager genetically hypertensive mice. *Neuroscience*, 170, 551-558.

Davern, P.J., Nguyen-Huu, T.P., La Greca, L., Abdelkader, A. & Head, G.A. (2009). Role of the sympathetic nervous system in Schlager genetically hypertensive mice. *Hypertension*, 54, 852-859.

Davern, P.J. & Head, G.A. (2011) Role of the medial amygdala in mediating responses to aversive stimuli leading to hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, *38*, 136-143.

Davis, M. The role of the amygdala in conditioned fear. In: Aggleton J.P., editor. *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss; 1992: 255-306.

De Bundel, D., Aourz, N., Kiagiadaki, F., Clinckers, R., Hover, D., Kastellakis, A., Michotte, Y., Thermos, K. & Smolders, I. (2010). Hippocampal sst(1) receptors are autoreceptors and do not affect seizures in rats. *Neuroreport*, *21*, 254-258.

de Castilhos, J., Forti, C.D., Achaval, M. & Rasia-Filho, A.A. (2008). Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: A Golgi study. *Brain Res.*, *1240*, 73-81.

de Castilhos, J., Marcuzzo, S., Forti, C.D., Frey, R.M., Stein, D., Achaval, M. & Rasia-Filho, A.A. (2006). Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: Dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. *Brain Res. Bull.*, *69*, 131-139.

de Castilhos, J., Rigon, P., Xavier, L.L., Rasia-Filho, A. & Achaval, M. (2009). Sex differences in NADPH-diaphorase activity in the rat posterodorsal medial amygdala. *Brain Res.*, *1305*, 31-39.

de Olmos, J.S., Beltramino, C.A. & Alheid, G. Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. In: Paxinos G, editor. *The Rat Nervous System*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2004: 509-603.

De Vries, G.J. & Simerly, R.B. Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. In: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT, editors. *Hormones, Brain and Behavior*. San Diego: Academic Press; 2002: 137-191.

Dhungel, S., Urakawa, S., Kondo, Y. & Sakuma, Y. (2011). Olfactory preference in the male rat depends on multiple chemosensory inputs converging on the preoptic area. *Horm. Behav.*, *59*, 193-199.

Dielenberg, R.A. & McGregor, I.S. (2001). Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, *25*, 597-609.

Donato Jr., J., Cavalcante, J. C., Silva, R.J., Teixeira, A.S., Bittencourt, J.C. & Elias, C.F. (2010). Male and female odors induce Fos expression in chemically defined neuronal population. *Physiol. Behav.*, *99*, 67-77.

Dong, H.-W., Petrovich, G. & Swanson, L.W. (2001). Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res. Rev.*, *38*, 192-246.

Duncan, G. E., Knapp, D. J. & Breese, G. R. (1996). Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res.*, *713*, 79-91.

Fazan Jr., R., de Oliveira, M., da Silva, V.J., Joaquim, L.F., Montano, N., Porta, A., Chapleau, M.W. & Salgado, H.C. (2005). Frequency-dependent baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variability in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *289*, H1968-1975.

Ferguson, J.N., Aldag, J.M., Insel, T.R. & Young, L.J. (2001). Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J. Neurosci.*, *21*, 8278-8285.

Fillenz, M. (1995). Physiological release of excitatory amino acids. *Behav Brain Res*, *71*, 51-67.

Flügge, G., Pfender, D., Rudolph, S., Jarry, H. & Fuchs, E. (1999). 5-HT_{1A}-receptor binding in the brain of cyclic and ovariectomized female rats. *J. Neuroendocrinol.*, *11*, 243-249.

Fontes, M.A., Martins, M.C., Naves, V., Campagnole, M.J., Lopes, O.U., Khosla, M.C. & Santos, R.A. (1997). Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensin and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats. *Brain Res*, *750*, 305-310.

Fukumori, R., Nishigori, Y., Goshima, Y. & Kubo, T. (2004). Contribution of the medial amygdaloid nucleus to the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett*, *365*, 128-131.

García-López, M., Abellán, A., Legaz, I., Rubenstein, J.L.R., Puelles, L. & Medina, L. (2008). Histogenetic compartments of the mouse centromedial and extended amygdala based on gene expression patterns during development. *J. Comp. Neurol.*, *506*, 46-74.

Genest, S-E., Balon, N., Laforest, S., Drolet, G. & Kinkead, R. (2007). Neonatal maternal separation and enhancement of the hypoxic ventilatory response in rat: the role of

GABAergic modulation within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Physiol.*, 583, 299-314.

Gloor, P. *The Temporal Lobe and Limbic System*. New York: Oxford University Press, 1997.

Gören, M.Z., Akici, A., Berkman, K. & Onat, F. (2000). Cardiovascular responses to NMDA injected into nuclei of hypothalamus or amygdala in conscious rats. *Pharmacology*, 61, 257-262.

Gören, M.Z., Yananli, H.R., Berkman, K., Onat, F. & Aker, R. (2003). The influence of dorsomedial hypothalamic nucleus on contralateral paraventricular nucleus in NMDA-mediated cardiovascular responses. *Brain Res.*, 968, 219-226.

Gören, Z., Aslan, N., Berkman, K., Oktay, S. & Onat, F. (1996). The role of amygdala and hypothalamus in GABAA antagonist bicuculline-induced cardiovascular responses in conscious rats. *Brain Res.*, 722, 118-124.

Gréco, B., Allegretto, E.A., Tetel, M.J. & Blaustein, J.D. (2001). Coexpression of ER β with ER α and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology*, 142, 5172-5181.

Gréco, B., Blasberg, M.E., Kosinski, E.C. & Blaustein, J.D. (2003). Response of ER α -IR and ER β -IR cells in the forebrain of female rats to mating stimuli. *Horm. Behav.*, 43, 444-453.

Gréco, B., Edwards, D.A., Michael, R.P. & Clancy, N.A. (1998). Androgen receptors and estrogen receptors are colocalized in male rat hypothalamic and limbic neurons that express Fos immunoreactivity induced by mating. *Neuroendocrinology*, 67, 18-28.

Guillamón, A. & Segovia, S. (1997). Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res. Bull.*, 44, 377-382.

Herman, J.P., Ostrander, M.M., Mueller, N.K. & Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 29, 1201-1213.

Hilton, S.M. (1975). Ways of viewing the central nervous control of the circulation - old and new. *Brain Res.*, 87, 213-219 (*apud* Turner et al., 1986).

Ichikawa, M. (1988). Plasticity of intra-amygdaloid connections following the denervation of fibers from accessory olfactory bulb to medial amygdaloid nucleus in adult rat: immunohistochemical study of anterogradely transported lectin (*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin). *Brain Res.*, 451, 248-254.

Ishizuka, T., Wei, X. & Kubo, T. (1993). Cardiovascular effects of microinjections of thyrotropin-releasing hormone, oxytocin and other neuropeptides into the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 322, 35-44.

Itoh, Y., Oishi, R., Nishibori, M. & Saeki, K. (1991). Characterization of histamine release from the rat hypothalamus as measured by in vivo microdialysis. *J. Neurochem.*, 56, 769-774.

Jiang, X., Chen, A. & Li, H. (2005). Histaminergic modulation of excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience*, 131, 691-703.

Jochem, J. (2004). Involvement of the renin-angiotensin system in endogenous central histamine-induced reversal of critical haemorrhagic hypotension in rats. *J. Physiol. Pharmacol.*, 55, 39-55.

Johnston, J.B. (1923). Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J. Comp. Neurol.*, 35, 337-481.

Kaloustian, S., Wann, B.P., Bah, T.M., Girard, S.A., Apostolakis, A., Ishak, S., Mathieu, S., Ryvlin, P., Godbout, R. & Rousseau, G. (2008). Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat. *Brain Res.*, 1216, 87-91.

Knapska, E., Radwanska, K., Werka, T. & Kaczmarek, L. (2007). Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiol. Rev.*, 87, 1113-1173.

Kubo, T., Okatani, H., Nishigori, Y., Hagiwara, Y., Fukumori, R. & Goshima, Y. (2004). Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats. *Neurosci. Lett.*, 354, 84-86.

LeDoux, J.E. Emotion and amygdala. In: Aggleton, J.P., editor. *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss; 1992: 339-352.

Lee, P. R., Brady, D. L., Shapiro, R. A., Dorsa, D. M. & Koenig, J. L. (2005). Social interaction deficits caused by chronic phencyclidine administration are reversed by oxytocin. *Neuropsychopharmacology*, 30, 1883-1894.

Lehmann, M.L. & Erskine, M.S. (2005). Glutamatergic stimulation of the medial amygdala induces steroid dependent *c-fos* expression within forebrain nuclei responsive to mating stimulation. *Neuroscience*, *136*, 55-64.

Lehmann, M.L., McKellar, H. & Erskine, M.S. (2005). Coding for the initiation of pseudopregnancy by temporally patterned activation of amygdalar NMDA receptors. *J. Neurosci.*, *25*, 8696-8703.

Lin, Y., Li, X., Lupi, M., Kinsey-Jones, J.S., Shao, B., Lightman, S.L. & O'Byrne, K.T. (2011). The role of the medial and central amygdala in stress-induced suppression of pulsatile LH secretion in female rats. *Endocrinology*, *152*, 545-555.

Longhurst, J. Neural regulation of the cardiovascular system. In: Squire, L., Berg, D., Bloom, F., Dulac, S., Ghosh, A., Spitzer, N., editors. *Fundamental Neuroscience*. Burlington: Academic Press; 2008: 829-853.

Lu, Y.F., Hattori, Y., Moriwaki, A., Hayashi, Y. & Hori, Y. (1995). Inhibition of neurons in the rat medial amygdaloid nucleus in vitro by somatostatin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, *73*, 670-674.

Magri, V., Trimarchi, G. R., Quattrone, G., Squadrito, F., Di Giorgio, R. M., Costa, G. & Caputi, A.P. (1984). Increased cardiovascular responsiveness to GABAergic stimulation in DOCA-salt hypertensive rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, *45*, 107-118.

Malliani, A., Pagani, M., Lombardi, F. & Cerutti, S. (1991). Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*, *84*, 482-492.

Malsbury, C.W. & McKay, K. (1994). Neurotrophic effects of testosterone on the medial nucleus of the amygdala in adult male rats. *J. Neuroendocrinol.*, *6*, 57-69.

Marcuzzo, S., Dall'Oglio, A., Ribeiro, M.F., Achaval, M. & Rasia-Filho, A.A. (2007). Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. *Neurosci. Lett.*, *424*, 16-21.

Martinez, F.G., Hermel, E.E., Xavier, L.L., Viola, G.G., Riboldi, J., Rasia-Filho, A.A. & Achaval, M. (2006). Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats. *Brain Res.*, *1108*, 117-126.

McDonald, A.J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog. Neurobiol.*, *55*, 257-332.

Meredith, M. & Westberry, J.M. (2004). Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. *J. Neurosci.*, *24*, 5719-5725.

Micevych, P.E., Matt, D.W. & Go, V.L.W. (1988). Concentrations of cholecystokinin, substance P, and bombesin in discrete regions of male and female rat brain: sex differences and estrogen effects. *Exp. Neurol.*, *100*, 416-425.

Momiyama, T. & Zaborszky, L. (2006). Somatostatin presynaptically inhibits both GABA and glutamate release onto rat basal forebrain cholinergic neurons. *J Neurophysiol.*, *96*, 686-694.

Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K. & Kawata, M. (1996). Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and *in situ* hybridization study. *Neurosci. Res.*, *26*, 235-269.

Montano, N., Ruscone, T.G., Porta, A., Lombardi, F., Pagani, M. & Malliani, A. (1994). Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation*, *90*, 1826-1831.

Neckel, H. (2007). Efeito da microinjeção de glutamato e GABA no núcleo pósterodorsal da amígdala medial sobre o controle da pressão arterial em ratos. *Master Thesis*, Federal University of Rio Grande do Sul/Program in Neurosciences, Brazil.

Newman, S.W. (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann. NY Acad. Sci.*, *877*, 242-257.

Nishizuka, M. & Arai, Y. (1983). Male-female differences in the intra-amygdaloid input to the medial amygdala. *Exp. Brain Res.*, *52*, 328-332.

Nitecka, L. & Ben-Ari, Y. (1987). Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *J. Comp. Neurol.*, *266*, 45-55.

Nollo, G., Porta, A., Faes, L., Del Greco, M., Disertori, M. & Ravelli, F. (2001). Causal linear parametric model for baroreflex gain assessment in patients with recent myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *280*, H1830-1839.

Ondrejčáková, M., Bakos, J., Garafova, A., Kovacs, L., Kvetnansky, R. & Jezova, D. (2010). Neuroendocrine and cardiovascular parameters during simulation of stress-induced rise in circulating oxytocin in the rat. *Stress*, *13*, 314-22.

Oro, A.E., Simerly, R.B. & Swanson, L.W. (1988). Estrous cycle variations in levels of cholecystokinin immunoreactivity within cells of three interconnected sexually dimorphic forebrain nuclei. *Neuroendocrinology*, *47*, 225-235.

Österlund, M., Kuiper, G.G.J.M., Gustafsson, J-A. & Hurd, Y.L. (1998). Differential distribution and regulation of estrogen receptor- α and - β mRNA within the female rat brain. *Mol. Brain Res.*, *54*, 175-180.

Paré, D., Royer, S., Smith, Y. & Lang, E.J. (2003). Contextual inhibitory gating of impulse traffic in the intra-amygdaloid network. *Ann. NY Acad. Sci.*, *985*, 78-91.

Paxinos, G. & Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 1998.

Peiss, C.N. Concepts of cardiovascular regulation: past, present, future. In: Randall, W.C., editor. *Nervous Control of the Heart*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1965: 154-197 (*apud* Turner et al., 1986).

Pereno, G.L., Balaszczuk, V. & Beltramino, C.A. (2011). Detection of conspecific pheromones elicits fos expression in GABA and calcium-binding cells of the rat vomeronasal system-medial extended amygdala. *J. Physiol. Biochem.*, *67*, 71-85.

Petrovich, G.D., Canteras, N.S. & Swanson, L.W. (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res. Rev.*, *38*, 247-289.

Pfaus, J.G. & Heeb, M.M. (1997). Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Res. Bull.*, *44*, 397-407.

Pitkänen, A., Savander, V. & LeDoux, J.E. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.*, *11*, 517-523.

Polston, E.K. & Erskine, M.S. (2001). Excitotoxic lesions of the medial amygdala differentially disrupt prolactin secretory responses in cycling and mated female rats. *J. Neuroendocrinol.*, *13*, 13-21.

Polston, E.K., Heitz, M., Barnes, W., Cardamone, K. & Erskine, M.S. (2001). NMDA-mediated activation of the medial amygdala initiates a downstream neuroendocrine memory responsible for pseudopregnancy in the female rat. *J. Neurosci.*, *21*, 4104-4110.

Polston, E.K., Gu, G. & Simerly, R.B. (2004). Neurons in the principal nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis provide a sexually dimorphic GABAergic input to the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience*, *123*, 793-803.

Porta, A., Casali, K. R., Casali, A. G., Gneccchi-Ruscione, T., Tobaldini, E., Montano, N., Lange, S., Geue, D., Cysarz, D. & Van Leeuwen, P. (2008). Temporal asymmetries of short-term heart period variability are linked to autonomic regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *295*, R550-557.

Porter, K. & Hayward, L.F. (2011). Stress-induced changes in c-Fos and corticotrophin releasing hormone immunoreactivity in the amygdala of the spontaneously hypertensive rat. *Behav. Brain Res.*, *216*, 543-551.

Quagliotto, E., Neckel, H., Riveiro, D.F., Casali, K.R., Mostarda, C., Irigoyen, M.C., Dall'Ago, P. & Rasia-Filho, A.A. (2008). Histamine in the posterodorsal medial amygdala modulates cardiovascular reflex responses in awake rats. *Neuroscience*, *157*, 709-719.

Rakovska, A., Kiss, J. P., Raichev, P., Lazarova, M., Kalfin, R. & Milenov, K. (2002). Somatostatin stimulates striatal acetylcholine release by glutamatergic receptors: an in vivo microdialysis study. *Neurochem. Int.*, *40*, 269-275.

Rao, S.P. & Dunbar, J.C. (2005). A role for the central histaminergic system in the leptin-mediated increase in cardiovascular dynamics. *Brain Res. Bull.*, *64*, 425-432.

Rasia-Filho, A.A. (2006). Is there anything "autonomous" in the nervous system? *Adv. Physiol. Educ.*, *30*, 9-12.

Rasia-Filho, A.A., Brusco, J. & Moreira, J.E. Spine plasticity in the rat medial amygdala. In: Baylog, L.R. editor. *Dendritic Spines: Biochemistry, Modeling and Properties.*, Hauppauge: Nova Science Publishers; 2009: 67-90.

Rasia-Filho, A.A., Fabian, C., Rigoti, K. & Achaval, M. (2004). Influence of sex, estrous cycle and motherhood in dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience*, *126*, 839-847.

Rasia-Filho, A.A., Giovenardi, M. & de Almeida, R.M. (2008). Drugs and aggression. *Recent Patents CNS Drug Discov.*, *3*, 40-49.

Rasia-Filho, A.A., Londero, R.G. & Achaval, M. (2000). On some functional activities of the amygdala: an overview. *J. Psychiatry Neurosci.*, *25*: 14-23.

Rasia-Filho, A.A., Londero, R.G. & Achaval, M. (1999). Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. *Brain Res. Bull.*, 48, 173-183.

Rasia-Filho, A.A., Peres, T.M.S., Cubilla-Gutierrez, F.H. & Lucion, A.B. (1991). Effect of estradiol implanted in the corticomедial amygdala on the sexual behavior of castrated male rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 24, 1041-1049.

Rasia-Filho, A.A., Xavier, L.L., Santos, P., Gehlen, G. & Achaval, M. (2002). Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats. *Brain Res. Bull.*, 58, 67-75.

Reich, H., Rupprecht, U., Stumpf, H. & Stock, G. (1983). Modulation of unit activity in the amygdala of unrestrained cats during the sleep-waking cycle. *Neurosci. Lett.*, 35, 209-214 (*apud* Turner et al., 1986).

Reis, W.L., Saad, W.A., Camargo, L.A., Elias, L.L. & Antunes-Rodrigues, J. (2010). Central nitrenergic system regulation of neuroendocrine secretion, fluid intake and blood pressure induced by angiotensin-II. *Behav. Brain Funct.*, 6, 64.

Roosendaal, B. & McGaugh, J.L. (1996). Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 65, 1-8.

Saha, S. (2005). Role of the central nucleus of the amygdala in the control of blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 32, 450-456.

Samuelsen, C.L. & Meredith, M. (2011). Oxytocin antagonist disrupts male mouse medial amygdala response to chemical-communication signals. *Neuroscience*, 180, 96-104.

Savonenko, A., Filipkowski, R. K., Werka, T., Zielinski, K. & Kaczmarek, L. (1999). Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. *Neuroscience*, 94, 723-733.

Sheehan, T.P., Paul, M., Amaral, E., Numan, M.J. & Numan, M. (2001). Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. *Neuroscience*, 106, 341-356.

Shelley, D.N. & Meisel, R.L. (2005). The effects of mating stimulation on c-fos immunoreactivity in the female hamster medial amygdala are region and context dependent. *Horm. Behav.*, *47*, 212-222.

Shughrue, P.J., Lane, M.V. & Merchenthaler, I.J. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, *388*, 507-525.

Simerly, R.B. Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: Paxinos, G. editor. *The Rat Nervous System*. San Diego: Academic Press; 2004: 335-368.

Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M. & Swanson, L.W. (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An *in situ* hybridization study. *J. Comp. Neurol.*, *294*, 76-95.

Simmons, D.A. & Yahr, P. (2003). GABA and glutamate in mating activated cells in the preoptic area and medial amygdala of male gerbils. *J. Comp. Neurol.*, *459*, 290-300.

Simmons, D.A. & Yahr, P. (2011). Nitric oxidergic cells related to ejaculation in gerbil forebrain contain androgen receptor and respond to testosterone. *J. Comp. Neurol.*, *519*, 900-915.

Singewald, N., Chicchi, G.G., Thurner, C.C., Tsao, K.L., Spetea, M., Schmidhammer, H., Sreepathi, H.K., Ferraguti, F., Singewald, G.M. & Ebner, K. (2008). Modulation of basal and stress-induced amygdaloid substance P release by the potent and selective NK1 receptor antagonist L-822429. *J. Neurochem.*, *106*, 2476-2488.

Stefanova, N. (1998). γ -Aminobutyric acid-immunoreactivity neurons in the amygdala of the rat - sex differences and effect of early postnatal castration. *Neurosci. Lett.*, *255*, 175-177.

Stock, G., Schmelz, M., Kneuper, M.M. & Forssman, W.G. Functional and anatomic aspects of central nervous cardiovascular regulation. In: Ganten, D., Pfaff, D., editors. *Central Cardiovascular Control - Basic and Clinical Aspects*. Berlin: Springer-Verlag; 1983: 1-30 (*apud* Turner et al., 1983).

Swanson, L.W. & Petrovich, G.D. (1998). What is the amygdala? *Trends Neurosci.*, *21*, 323-331.

Timmerman, W. & Westerink, B.H. (1997). Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse*, *27*, 242-261.

Timo-Iaria, C. Organização Geral do Sistema Nervoso. In: Canelas, H.M., Assis, J.L., Scaff, M. *Fisiopatologia do Sistema Nervoso*. São Paulo: Sarvier; 1983: 453-470.

Tobaldini, E., Montano, N., Wei, S.G., Zhang, Z.H., Francis, J., Weiss, R.M., Casali, K.R., Felder, R.B. & Porto A. (2009a). Autonomic cardiovascular modulation. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, 28, 79-85.

Tobaldini, E., Porta, A., Wei, S.G., Zhang, Z.H., Francis, J., Casali, K.R., Weiss, R.M., Felder, R.B. & Montano, N. (2009b). Symbolic analysis detects alterations of cardiac autonomic modulation in congestive heart failure rats. *Auton. Neurosci.*, 150, 21-26.

Turner, S.A., Stock, G. & Ganten, D. Cardiovascular regulation. In: Lightman, S.L., Everitt, B.J. editors. *Neuroendocrinology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1986: 331-359.

Tuunanen, J., Halonen, T. & Pitkänen, A. (1997). Decrease in somatostatin-immunoreactive neurons in the rat amygdaloid complex in a kindling model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.*, 26, 315-327.

Tuunanen, J., Halonen, T. & Pitkänen, A. (1996). Status epilepticus causes selective regional damage and loss of GABAergic neurons in the rat amygdaloid complex. *Eur. J. Neurosci.*, 8, 2711-2725.

Veinante, P. & Freund-Mercier, M-J. (1997). Distribution of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the rat extended amygdala: a histoautoradiographic study. *J. Comp. Neurol.*, 383, 305-325.

Veyrac, A., Wang, G., Baum, M.J. & Bakker, J. (2011). The main and accessory olfactory systems of female mice are activated differentially by dominant versus subordinate male urinary odors. *Brain Res.*, 1402, 20-29.

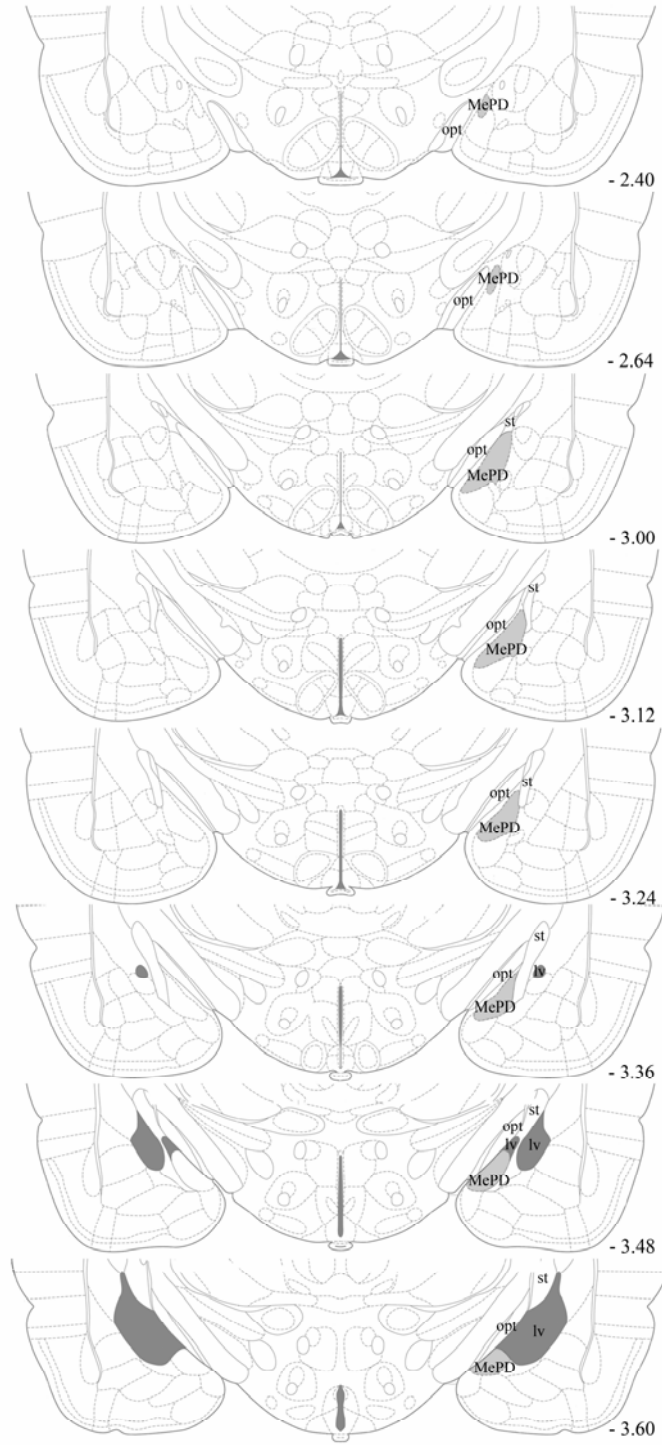
Wilson, M.A., Mascagni, F. & McDonald, A.J. (2002). Sex differences in delta opioid receptor immunoreactivity in rat medial amygdala. *Neurosci. Lett.*, 328, 160-164.

Wolak, M., deJoseph, M.R., Cator, A.D., Mokashi, A.S., Brownfield, M.S. & Urban, J.H. (2003). Comparative distribution of neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in the rat brain by using immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.*, 464, 285-311.

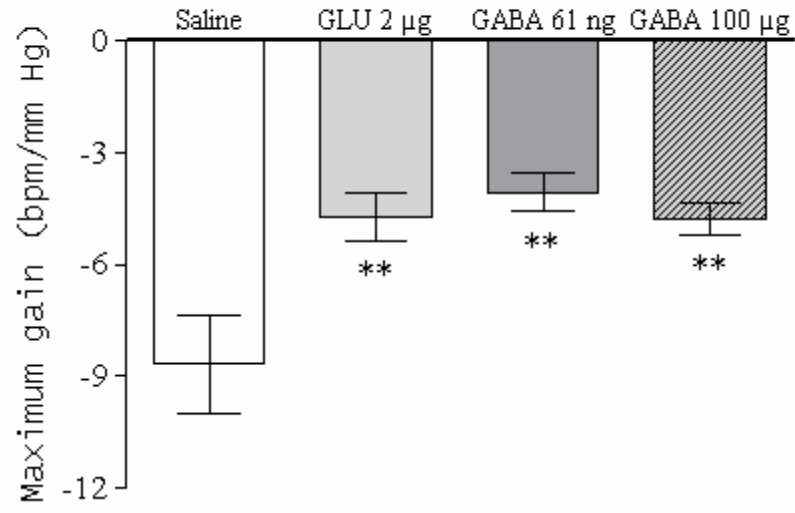
Wsól, A., Cudnoch-Je drzejewska, A., Szczepanska-Sadowska, E., Kowalewski, S. & Dobruch, J. (2009). Central oxytocin modulation of acute stress-induced cardiovascular responses after myocardial infarction in the rat. *Stress* 12, 517-525.

Zhang, W., Zhang, N., Sakurai, T., & Kuwaki, T. (2009). Orexin neurons in the hypothalamus mediate cardiorespiratory responses induced by disinhibition of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res.*, *1262*, 25-37

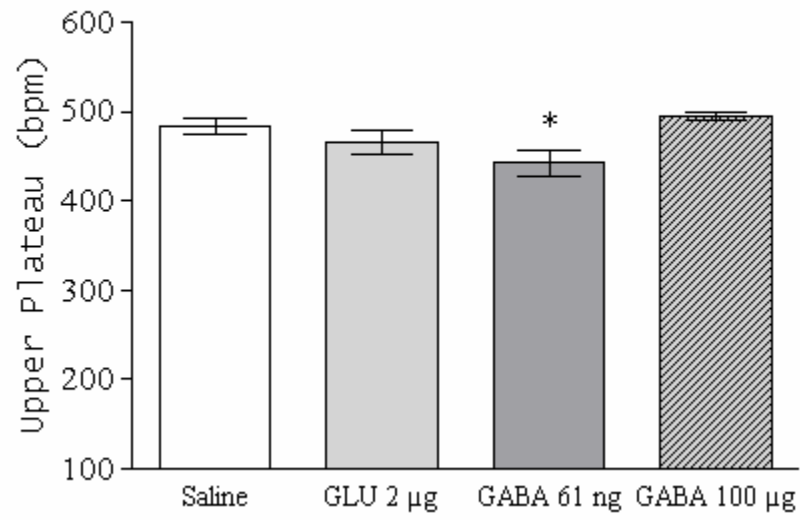
Zhou, J., Zhang, H., Cohen, R.S. & Pandey, S.C. (2005). Effects of estrogen treatment on expression of BDNF and CREB expression and phosphorylation in rat amygdaloid and hippocampal structures. *Neuroendocrinology*, *81*, 294-310.

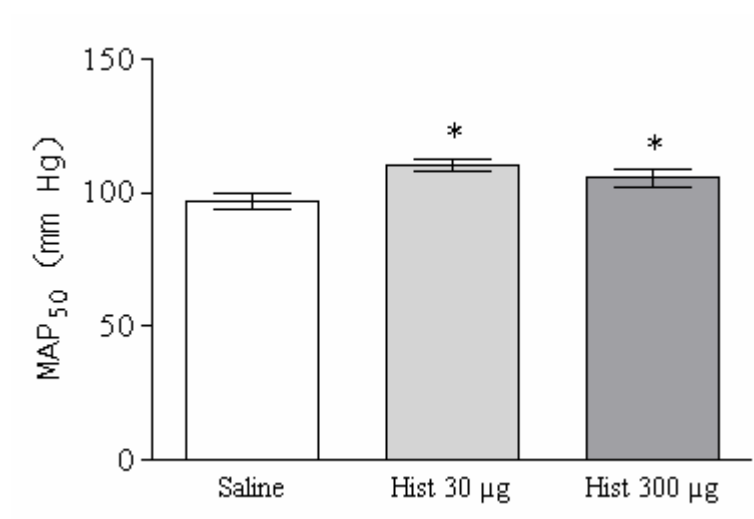


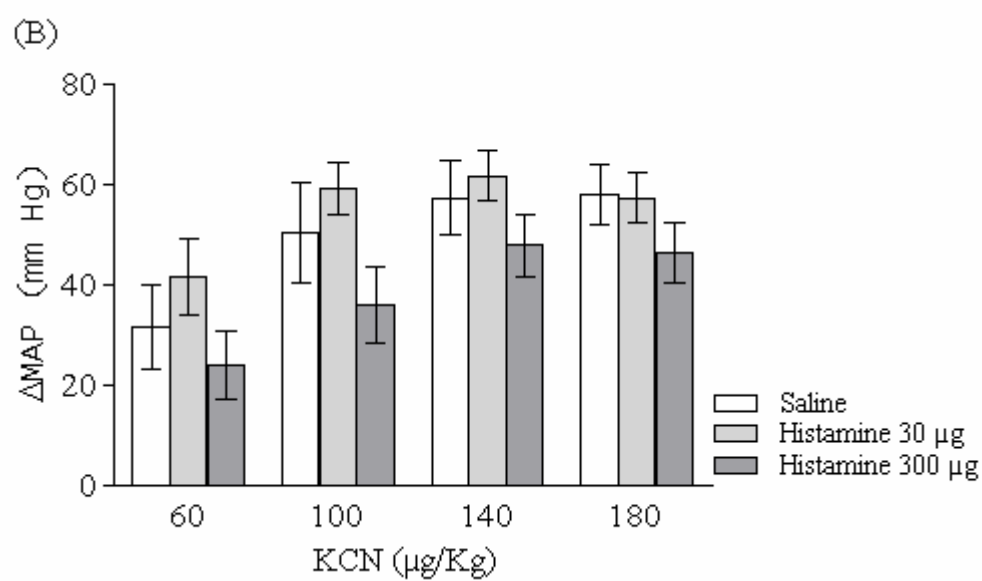
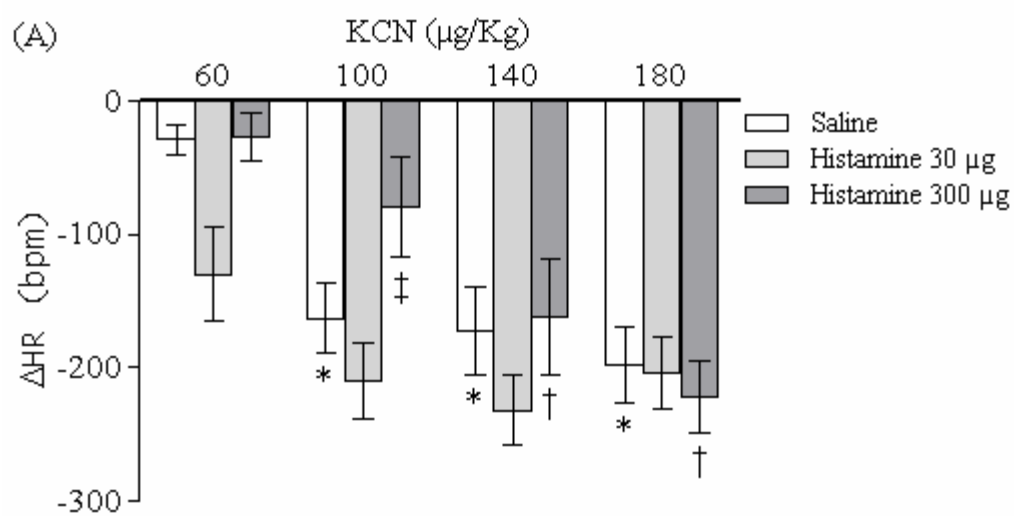
(A)



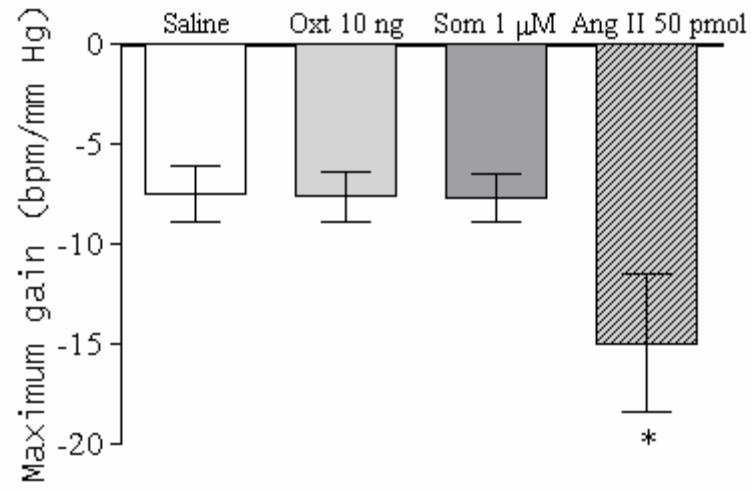
(B)



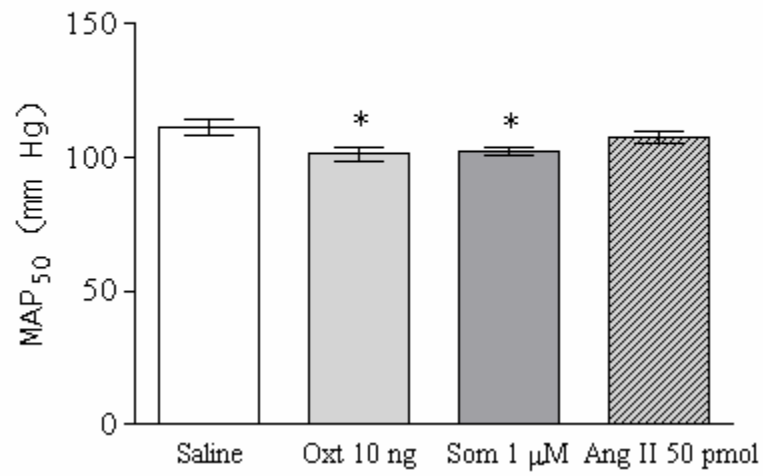


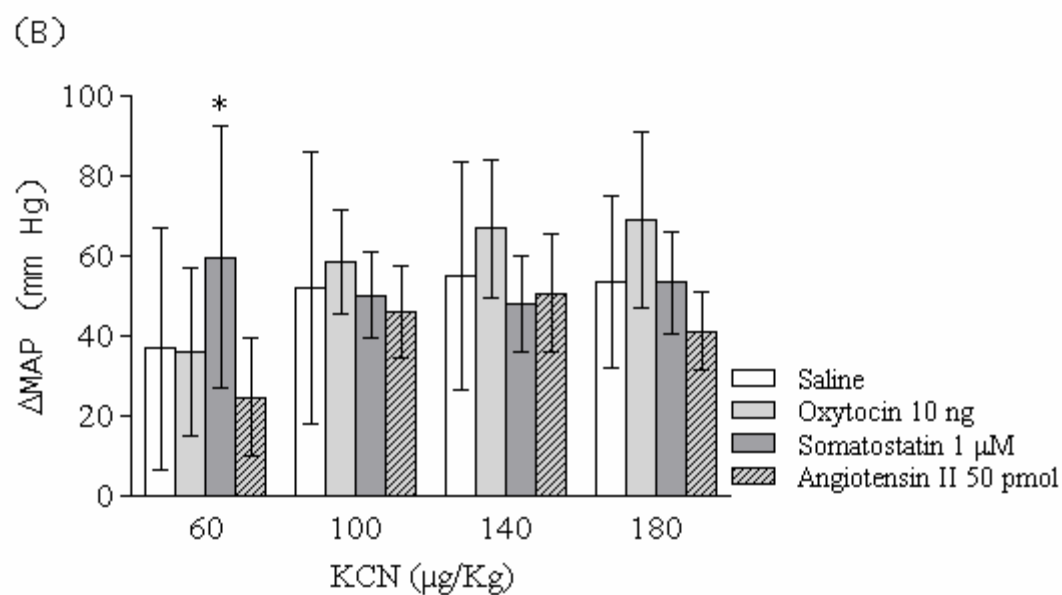
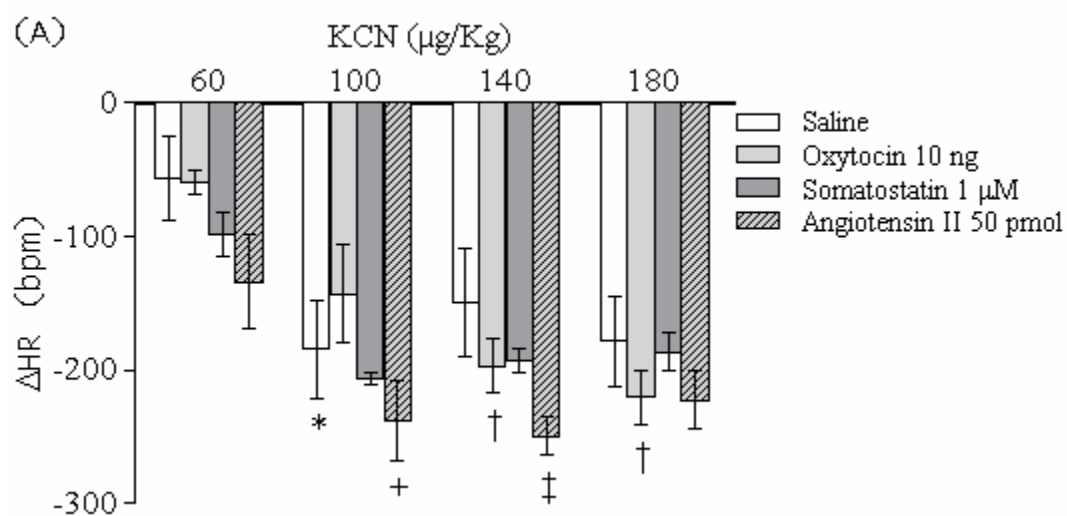


(A)



(B)





6 ESTUDO II

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

*Glutamate and GABA in the medial amygdala induce selective central
sympathetic/parasympathetic cardiovascular responses*

Glutamate and GABA in the medial amygdala induce selective central sympathetic/parasympathetic cardiovascular responses

Helinton Neckel^{1,2*}, Edson Quagliotto^{1,2*}, Karina R. Casali^{3*}, Nicola Montano⁴, Pedro Dal Lago⁵ and Alberto A. Rasia-Filho^{1,2}

¹ Department of Basic Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

² Graduate Course in Neurosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS 90050-170, Brazil

³ Institute of Cardiology of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90620-000, Brazil.

⁴ Department of Clinical Sciences, Internal Medicine II, L. Sacco Hospital, University of Milan, 20157 Milan, Italy

⁵ Department of Physical Therapy, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

* These authors contributed equally to the present work.

Corresponding author: Prof. Alberto A. Rasia-Filho. UFCSPA/DCBS, R. Sarmiento Leite 245, Porto Alegre 90170-050 RS, Brazil. Phone: + 55 51 91161643. Fax: + 55 51 33038752.

E-mail: rasiafilho@pq.cnpq.br, aarf@ufcspa.edu.br.

Abstract

Glutamate and GABA participate in the central cardiovascular control and are remarkably found in the rat posterodorsal medial amygdala (MePD), a forebrain area that modulates emotional/social behaviors. Here it was tested whether these neurotransmitters in the MePD could change the basal activity, the chemoreflex, and the baroreflex cardiovascular responses in awake rats. The power spectral and the symbolic analyses were used to evaluate these responses. Microinjections of saline, glutamate (2 μ g) or GABA (61 ng or 100 μ g; n= 5-7/group) did not affect basal parameters or chemoreflex responses. However, baroreflex responses showed marked changes. Glutamate increased power spectral and symbolic sympathetic indexes related with both cardiac and vascular modulations ($P < 0.05$). By its turn, the displacement of the baroreflex half-maximal HR response was associated with a GABA (61ng) mediated decrease in the upper plateau ($P < 0.05$). The GABA administration (61 ng, but not 100 μ g) also induced higher values of HR variability ($P < 0.05$), rather associated with a parasympathetic activation. These data add novel evidence that the MePD can promote selective responses in the central regulation of the cardiovascular system, i.e., glutamate in the MePD evoked a central activation of sympathetic reflex adjustments whereas GABA activated a central parasympathetic one.

Key words: Extended amygdala, central cardiovascular control, heart rate, blood pressure, baroreceptor reflex, chemoreceptor reflex, power spectral analysis, symbolic analysis.

Introduction

Glutamate and γ -aminobutyric acid (GABA) are the two major excitatory and inhibitory neurotransmitters, respectively, with widespread distribution in the adult mammalian brain (Hassel and Dingledine 2006; Olsen and Betz 2006). They have marked effects on the central cardiovascular regulation when microinjected via intracerebroventricular or directly in the brain parenchyma of rats (Goren et al. 2003; Magri et al. 1984). In the dorsomedial hypothalamic nucleus, for example, glutamate induced excitatory effects whereas GABA led to inhibitory responses of heart rate (HR) and arterial pressure (AP; Goren et al. 1996; Goren et al. 2000).

Compared with other amygdaloid nuclei, intense glutamate- and GABA-immunoreactivity in cells, fibers or terminals were found in the rat medial nucleus of the amygdala (MeA; Hassel and Dingledine 2006; Nitecka and Ben-Ari 1987; Stefanova and Ovtcharoff 2000). The MeA is a component of the “extended amygdala” in the ventral forebrain (de Olmos et al. 2004; Bupesh et al. 2011) and is composed of different subnuclei, which includes the posterodorsal one (MePD; de Olmos and Heimer 1999; Dall'Oglio et al. 2008a,b; Petrovich et al. 2001). The MePD integrates and modulates the interpretation of olfactory and pheromonal stimuli (Guillamon and Segovia 1997; Meredith and Westberry 2004), elicits contextual homeostatic or adaptive neuroendocrine adjustments according to the emotional stimuli processing (Dayas et al. 1999; Marcuzzo et al. 2007; Rasia-Filho et al. 2009; Rasia-Filho et al. 2004), and forms circuits connected with specific hypothalamic nuclei for the display of various emotional/social behaviors, including reproduction (Choi et al. 2005; de Castilhos et al. 2006; Newman 1999; Rasia-Filho et al. 2011; Rasia-Filho et al. 2004; Rasia-Filho et al. 1996). In this sense, glutamate accounts for almost 70% of all ejaculation-activated cells in the MePD of gerbils (Simmons and Yahr 2003). Also, glutamic acid decarboxylase mRNA (GAD-67), a GABA-synthesizing synthase, is abundantly expressed in neurons that are stimulated by conspecific male odors for agonistic behaviors in rats (Donato et al. 2010).

Some of the MePD output connections reach the central amygdala (Canteras et al. 1995), the A1 noradrenergic cells in the ventrolateral medulla, and the A2 noradrenergic cells in the nucleus of the solitary tract (Dayas et al. 2001), relevant areas involved with the central cardiovascular control (Longhurst, 2008; Petrovich et al. 2001; Saha 2005). Furthermore, the MePD innervates the sympathetic/parasympathetic-related parts of the hypothalamic

periventricular zone (Petrovich et al. 2001) and can affect the concomitant, beat-to-beat, cardiovascular adjustment of HR and AP associated with behavioral display (Quagliotto et al. 2008), a proposition supported by recent experimental evidence (Davern et al. 2009). However, the basal and reflex cardiovascular control evoked by glutamate or GABA directly microinjected in the MePD are not currently known. These novel data will be reported here.

Materials and Methods

Animals

Adult male Wistar rats (3–4 months old, body weight 250-300 g) were kept in groups with food and water *ad libitum*. Room temperature was maintained around 22°C in a 12 h light:dark cycle (lights off at 7 p.m.). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering. Animals were manipulated according to international laws for ethical care and use (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996, National Academy Press, USA), conformed to national guidelines, and was approved by the local Ethical Committee (Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Brazil, protocol 05/029).

Implantation of MePD cannula and of vascular catheters for hemodynamic evaluation

All animals were anesthetized with ketamine and xylazine (90 mg/kg and 10 mg/kg, i.p., respectively) and stereotaxically implanted with a cannula (0.6 mm of outer diameter, OD) aiming 2 mm above the right MePD. This hemisphere was chosen based on previous data that demonstrated behavioral and cardiovascular activities modulated by the right MePD (Adamec and Morgan 1994; de Castilhos et al. 2006; Quagliotto et al. 2008). Stereotaxic coordinates were: 3.4 mm posterior to the bregma, 3.6 mm lateral to the sagittal suture, and 5.7 mm below the dura-mater (Figures 1 and 2). Five days following surgery, and with animals displaying an apparent normal motor, feeding and drinking behavior, rats were submitted to the implantation of vascular access catheter. Under the same ketamine/xylazine anesthetic procedure, one polyethylene catheter [PE-10, inner diameter (ID) 0.28 mm, Australia] filled with saline (sterile NaCl 0.9%, pH 7.4) and heparin was placed into the

abdominal aorta and another into the inferior vena cava through the left femoral artery and vein, respectively. Each catheter was tunneled subcutaneously and exteriorized at the back of the rat neck. Gentamicin (2 mg/rat, i.m.) was injected at the end of this procedure. All rats displayed an apparent adequate behavior the day after the vascular catheter implantation (Cruz et al. 2010; Dall'Ago et al. 2007; Jaenisch et al. 2011; Quagliotto et al. 2008).

The arterial and venous catheter were used for direct hemodynamic measurements and drug administration, respectively. Each arterial catheter was attached to a 40-cm polyethylene tube (PE-50, 0.5 mm of ID, Australia) connected to a strain-gauge pressure transducer (P23 Db, Gould Statham, USA). Signals passed through a pre-amplifier (Hewlet-Packard 8805, Puerto Rico) and were delivered to a microcomputer equipped with an analog-to-digital converter board (CODAS, 1 kHz, Dataq Instruments, USA). The recorded data were analyzed on a beat-to-beat basis to quantify the parameters of interest, as described previously (Quagliotto et al. 2008).

The present study followed the same experimental procedures for HR and AP recordings as already reported (Cruz et al. 2010; Dall'Ago et al. 2007; Jaenisch et al. 2011; Quagliotto et al. 2008). That is, after catheter connection to transducer, rats were allowed to acclimate to a Plexiglas recording box (25 x 15 x 10 cm) during 20 to 30 min. Cardiovascular parameters were monitored during this time and basal values were recorded along the last 15 min. From these samples, HR and AP signals lasting 3 minutes served as baseline control recordings before each MePD microinjection. During this procedure, although rats might move inside the recording box, they rather stand quietly. Soon after, a microinjection needle (0.3 mm OD) was introduced into and 2 mm below the intracerebral guide cannula. Animals were then randomly assigned to one of the following experimental groups that were microinjected with: (a) vehicle (saline, 0.3 μ l, n = 5) to serve as the control group, (b) glutamate at the dose of 2 μ g/0.3 μ l, (c) GABA at the dose of 61 ng/0.3 μ l or (d) GABA at the dose of 100 μ g/0.3 μ l (n = 7 in each of the remaining groups; all drugs purchased from Sigma Chemicals Co., USA). The dose of glutamate was already found in brain areas (Del Arco et al., 2003; Fillenz, 1995) and the lower dose of GABA was proved to be effective in inducing central modulatory effects (Genest et al. 2007), whereas the highest dose of GABA is rather at a large concentration and is a pharmacological one (Majchrzak et al. 1992; Timmerman and Westerink 1997). This single dose of glutamate was used because it was quite able to induce evident effects on cardiovascular parameters, as reported below. Two different doses of

GABA were used to test whether the larger pharmacological dose would lead to stronger results (Majchrzak et al. 1992).

All the recorded data were obtained during the morning (from 8 to 12 AM) to avoid unpredictable circadian variations in the results. Microinjections in the MePD were done without submitting the studied rats to undue stress or discomfort and all rats were submitted to the same recording protocol. As a rule, all rats must have initial baseline values of HR and AP within a normal range. The microinjection procedure was monitored by the displacement of liquid and an air bubble inside the catheter connected to a Hamilton microsyringe (2 μ l, USA), lasted for 1 minute and the needle remained inside the cannula for an additional minute to avoid reflux. Immediately after this procedure, each rat returned to its individual recording box and, after 4 min, new cardiovascular recordings were recorded along the next 15 min. The MePD microinjections were also done before testing baroreceptor- and the chemoreceptor-mediated reflexes. That is, every rat received a total of 3 microinjections of each substance assigned to its experimental group (saline, glutamate 2 μ g, GABA 61 ng or GABA 100 μ g), as follows: one to test MePD microinjection effects on HR and BP values, one before testing baroreflex responses, and one before testing chemoreflex responses. The order for testing baroreflex or chemoreflex activities was randomly chosen for each rat in the four experimental groups. Obvious drug carrying-over effects were avoided and new recordings were only started when hemodynamic values returned to baseline levels and remained stable along the recording time. These criteria were applied to all rats in the studied groups before MePD microinjections and venous infusions were done (Quagliotto et al. 2008).

Baroreflex and chemoreflex sensitivity

Reflex responses were tested 5 minutes following each MePD microinjection. Acute baroreflex-mediated changes were measured during peak increases or decreases in mean arterial pressure (MAP) due to systemic venous injections (0.1 mL) of a single dose of phenylephrine (8 μ g/ml, Sigma Chemicals Co., USA) or sodium nitroprusside (100 μ g/ml, Sigma Chemicals Co., USA) dissolved in saline 0.1 mL (Adamec and Morgan 1994; Dall'Ago et al. 2007; Dall'Ago et al. 1997; Fukumori et al. 2004; Jaenisch et al. 2011; Quagliotto et al. 2008; Zhang et al. 2009). The changes of MAP were within the range of 10-30 mmHg and included various data points to compose sigmoidal curves. All changes in MAP and HR were

measured and baroreflex sensitivity was determined by fitting the MAP and HR changes to a sigmoidal logistic equation, as follows:

$$HR = P_1 + P_2 / [1 + \exp P_3 \cdot (MAP - P_4)]$$

where P_1 to P_4 parameters mean: P_1 = lower HR plateau (in bpm), P_2 = HR range between upper and lower curve plateaus (in bpm), P_3 = a curvature coefficient which is independent of range, and P_4 = MAP at half of the HR range (MAP_{50} , in mmHg, which is also the point for the calculation of the maximum gain. The upper plateau was calculated by the sum of P_1 and P_2 .

Chemoreflex sensitivity was tested under the same aforementioned methodological conditions and after the administration of increasing intravenous doses of potassium cyanide (KCN: 60, 100, 140, and 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Merck, Germany), as previously employed (Cruz et al. 2010; Cruz et al. 2009; Cruz et al. 2008; Dall'Ago et al. 2007; Dall'Ago et al. 1997; Quagliotto et al. 2008). Injected volumes ranged from 0.06 to 0.18 ml. Mean HR and MAP were measured continuously 10 s before and 15 s after each injection of these KCN doses. Inter-injection interval for each dose of KCN was around 4 min and a new dose was administered only when appropriate HR and MAP baseline had been re-established.

Power spectral analysis and symbolic analysis

Both analyses were depicted in previous reports and are useful for different species, including rats (Fazan et al. 2005; Maliani et al. 1991; Montano et al. 1994; Nollo et al. 2001; Quagliotto et al. 2008; Tobaldini et al. 2009a,b). They can reveal the different components in the variability of the HR and BP after the microinjections in the MePD. Power spectral analysis was applied to systolic arterial pressure (SAP) and pulse interval (PI). Tachogram and systogram were created from AP signals through the beat-to-beat PI and SAP, respectively. Frequency domain analysis of HR variability (HRV) and AP variability (APV) were obtained with an autoregressive algorithm (Malliani et al. 1991; Nollo et al. 2001) on stationary sequences of 200 beats that were randomly chosen using the stationary test (Porta et al. 2008). The low-frequency (LF, 0.2–0.75 Hz) and high-frequency (HF, 0.75–3.0 Hz) spectral components of PI and SBP were expressed in both absolute (ms^2 and mmHg^2 , respectively) and normalized units (NU). These NU were obtained by calculating the power of LF and HF and correlating them to the total power without the very low frequency component (frequencies that were < 0.2 Hz) (Montano et al. 1994). This method estimates the

center frequency and power of each relevant oscillatory component, which indicates the involvement of the central control of the sympathetic/parasympathetic systems in the cardiovascular responses. The ratio between LF and HF components (LF/HF) can be considered as a synthetic expression of the sympathovagal balance. The coherence between the R-R interval and the SAP signal variability was assessed by means of a cross-spectral analysis. Alpha-index was obtained from the square root of the ratio between the R-R interval and the SAP variability within the LF ranges and was calculated only when the magnitude of the squared coherence exceeded 0.5 (range = 0 to 1) in the LF band. Using this alpha-index for the LF component, beat-to-beat values of the R-R interval and the SAP were used to estimate the spontaneous baroreflex sensitivity (Fazan et al. 2005).

Symbolic analysis was applied on the same sequences of PI and SAP data. This method consists in the scattering of the time series over 6 bins, each of which is identified by a number (symbol) from 0 to 5. Symbolic series is a sequence of symbols for each bin, converted into patterns of 3 symbols. All possible 3 beats patterns are divided into 4 groups: (1) no variations (0V, i.e., 3 identical symbols); (2) one variation (1V, 2 identical symbols and 1 different); (3) 2 like variations (2LV); and, (4) 2 unlike variations (2UV) (Guzzetti et al. 2005). It has been demonstrated that 0V% is a marker of sympathetic modulation, whereas 2UV% is a marker of vagal modulation (Guzzetti et al. 2005; Porta et al. 2007; Tobaldini et al. 2009a,b).

Histological procedure

At the end of the experiments, rats were deeply anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, i.p.) and transcardially perfused with saline and 10% formalin solution. Brains were sectioned 60 μm -thick in a vibratome (Leica, Germany) and stained with hematoxylin-eosin. The microinjection site was determined and compared to the images of an atlas (Paxinos and Watson 1998). The procedures of this microinjection method were already validated for accurate drug administration in small brain regions (Lohman et al. 2005). Then, only those rats that had the microinjections directed to the MePD were considered for further analysis (Figures 1 and 2). Misleading results due to evident intraparenchymatous hemorrhage or mechanical lesions in the MePD or in the stria terminalis were discharged from the composition of the final experimental data.

As an inherent technical limitation of the present methodological approach, drugs may have affected all parts of local neurons, either cell bodies or the neuropil components of the MePD. The specific diffusion rate for each of the microinjected substances in the MePD were not evaluated by different techniques. No dye with distinct physico-chemical properties compared to the drugs microinjected was used to infer about the average radius of drug diffusion. Nevertheless, it is likely that the position of the guide cannula for the microinjection let the microinjected substances diffuse from the medial border of the MePD through its neuropil. In the back of the microinjection site, limiting drug diffusion, was the coarse axons of the optic tract (Figure 1). Moreover, additional “non-target” control groups ($n = 7$ rats for each microinjected substance), whose cannulae were placed in the vicinity of the MePD, were included to look for drug effects outside the intended area. I.e., their data aimed to control for the spread of the drugs and their effects in other MeA subnuclei, adjacent amygdaloid nuclei or areas close to the MePD. This same approach was used in other reports (de Castilhos et al. 2006; Quagliotto et al. 2008). These “non-target” microinjections reached the optic tract, the medial and lateral divisions of the central amygdaloid nucleus, the anterior part of the basolateral amygdaloid nucleus, the vicinity of the amygdalo-hippocampal transition area, the commissural stria terminalis, the intraamygdaloid division of the bed nucleus of the stria terminalis, and the medial globus pallidus (Figure 2).

Statistical analysis

Data fulfilled the formal requirements for the use of parametric analysis following the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests. The values of HR, SAP, diastolic AP (DAP), and MAP at basal conditions and the results of HR and AP evoked by the chemoreceptor reflex response were submitted to a two-way analysis of variance (ANOVA) test for repeated measures. Data obtained after the stimulation of the baroreflex were analyzed using an one-way ANOVA test. The *post hoc* test of Newman-Keuls for multiple comparisons was used to best fit with the ANOVA test results.

Data of the spectral and symbolic analyses, which had the normal distribution evaluated by the Bonferroni's test, were analyzed using the one way ANOVA test followed by the Tukey test. When Gaussian normality test failed, a Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks and the Dunn's test were performed. In all cases, the statistically significant level was set as $P \leq 0.05$.

Results

To be succinct, present results will be focused on the MePD results. Although all the statistical analyses have also been done in the “non target” control data, they in no way mimicked the effects obtained in rats that received MePD microinjections (ANOVA test, $P > 0.05$ in all cases; data not shown).

Hemodynamic status

The initial hemodynamic status was considered normal for adult male rats recorded under laboratory conditions. No relevant statistical difference was found in the HR, SAP, DAP, and MAP following microinjections of saline, glutamate or both doses of GABA in the MePD (Newman-Keuls test, $P > 0.05$ in all cases). There were no lasting effects of the microinjections in any group, which provided stable baseline recordings prior to the assessment of the baroreflex and chemoreflex responses in the experimental groups (Table 1).

Effects of baroreflex activation

Acute reflex control of the HR was analyzed by fitting sigmoidal curves to different data points of each animal. Mean values were calculated for each experimental group. The displacement of the half-maximal HR response following the injections of phenylephrine and sodium nitroprusside showed an overall statistically significant difference among groups [$F(3,24) = 4.44$, $P < 0.01$]. The *post hoc* comparisons revealed that the group that was microinjected with GABA 61 ng had a significantly decrease in the upper plateau when compared to saline and to the group microinjected with GABA 100 μg (Newman-Keuls test, $P < 0.05$; Table 2 and Figure 3).

An overall statistical difference was also found when the AP was increased by phenylephrine or decreased by sodium nitroprusside and the maximum gain of the reflex responses was compared among the four experimental groups [$F(3,22) = 3.76$, $P < 0.03$]. The *post hoc* comparisons revealed that glutamate and both doses of GABA induced lower values than saline (Newman-Keuls test, $P < 0.05$ in all cases; Table 2). The HR range [$F(3,24) = 1.54$, $P = 0.22$], the MAP_{50} [$F(3,24) = 0.86$, $P = 0.47$], and the lower plateau [$F(3,24) = 0.68$, $P = 0.57$] did not differ among the experimental groups (Table 2).

Effects of chemoreflex activation

No statistically significant difference was found following MePD microinjections of saline, glutamate or both doses of GABA in the HR and MAP changes induced by the chemoreflex activation ($P > 0.05$ in all cases; Table 3).

Power spectral analysis

Results are shown in Table 4. There were no statistically significant difference in APV among groups [$F(3,22) = 0.96$, $P = 0.43$]. However, glutamate promoted an increase in the LF/HF index (Kruskal-Wallis test, $P = 0.037$; Dunn's test, $P < 0.05$) compared to saline, indicating a central sympathetic predominance of cardiac modulation over the parasympathetic one. In this sense, the LF power of APV was higher than in the control group as well, an indicative of the increase in the central sympathetic vascular modulation [$F(3,22) = 4.18$, $P = 0.017$; Tukey test, $P = 0.021$]. On the other hand, GABA (61 ng) led to a higher value of HRV when compared to saline [$F(3,22) = 4.27$, $P = 0.016$; Tukey test, $P = 0.041$]. GABA 61 ng also promoted a significant difference in the oscillation frequency, f_{LF} , [$P = 0.021$] and in the power spectrum of the LF component of the HRV [$F(3,22) = 3.83$, $P = 0.024$; Tukey test, $P = 0.021$]. GABA at the dose of 100 μg did not induce these same effects when compared to control data (Tukey test, $P > 0.05$) but led to a decrease in the HRV, LF, and HF when compared to the lower dose of GABA (Tukey test, $P < 0.05$).

Symbolic analysis

Results are presented in Figure 4 and Table 5. The symbolic analysis results indicated significant alterations in the 0V pattern after glutamate microinjection in the MePD when compared to saline [$F(3,22) = 8.48$, $P < 0.001$; Tukey test, $P = 0.019$]. Both doses of GABA (61 ng and 100 μg) did not cause an evident effect when compared to the control data (Tukey test, $P > 0.05$). However, they differed in the entropy (GABA 61ng), 0V pattern (both doses), and 2LV (GABA 61ng) patterns when compared to glutamate-induced results (Tukey test, $P < 0.05$).

Discussion

The present data indicate that the MePD is relevant for the central regulation of the cardiovascular system and has distinct responses of HR and AP evoked by local microinjections of glutamate or GABA. Results indicate that saline acted as expected for a control substance and that glutamate and GABA rather altered baroreflex responses. When compared to the control data, glutamate enhanced the LF/HF ratio in the power spectral analysis and induced an increase in the “OV” pattern in the symbolic analysis, which are linked to the central sympathetic control of the cardiac function and hemodynamics. The LF power alteration in the APV reinforces this increased central sympathetic vasomotor modulation after glutamate microinjection. By its turn, GABA (61ng) decreased the upper plateau of the baroreflex curve. GABA (61 ng, but not 100 μ g) also induced higher values of HRV, which is rather linked with the central parasympathetic control of the cardiovascular system. It is noteworthy that, although the duration and the concentration of the drugs reaching brain areas may substantially vary in different experiments, the present cardiovascular effects were found 5 minutes after each microinjection and along the recording period, which indicate lasting effects of glutamate and GABA as a particularity of the rat MePD. Contrasting with other brain areas (Del Arco et al. 2003), there is no current direct explanation for this latter experimental finding or details about the turnover of glutamate and GABA specifically in the MePD of awake rats. Altogether, these novel findings indicate that glutamate promotes a central activation of sympathetic reflex adjustments whereas GABA activates part of the parasympathetic modulation when microinjected in the rat MePD.

No statistically significant differences were found in the basal HR, SAP, DAP, and MAP among groups either before or after microinjections in the MePD. Muscimol, a GABA_A receptor agonist, microinjected in the AMe was also not able to change the MAP baseline of awake rats (Kubo et al. 2004). Glutamate or GABA did not alter the chemoreflex-mediated cardiovascular responses, which contrast with the effects of histamine microinjected in the MePD (Quagliotto et al. 2008). That is, although the higher dose of histamine microinjected in the MePD (values were 30 μ g and 300 μ g) did not affect the baroreflex activity, it decreased the parasympathetic component of the HRV, enhanced the sympathetic/parasympathetic balance at basal conditions, and led to an impairment in the chemoreflex bradycardic response (Quagliotto et al. 2008). Interestingly, these data suggest

that the MePD neurons involved with the cardiovascular reflexes are responsive to different neurotransmitters which might modulate specific “fine-tunings” of the cardiovascular system.

The central sympathetic/parasympathetic contribution for the HRV and AP was studied by the power spectral and symbolic analyses. Non-linear approaches were validated as other approach to understand the neural control of the cardiovascular system in different species (Casali et al. 2008; Montano et al. 2009; Porta et al. 2008; van Leeuwen et al. 2007; van Leeuwen et al. 2007). Sympathovagal balance revealed by the power spectral LF/HF ratio expresses the relation between the central sympathetic and parasympathetic cardiac modulations (Fazan et al. 2005; Kubo et al. 2004; Montano et al. 1994; Porta et al. 2007; Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996; Yoshida et al. 2002). Symbolic analysis was applied in different experimental models for the investigation of sympathetic and parasympathetic contributions to the cardiac and hemodynamic data (Tobaldini et al. 2009a,b). The present higher LF/HF ratio in association with the increase in the 0V pattern after glutamate microinjection in the MePD indicates that glutamate was able to induce a sympathetic predominance on the central cardiac modulation of AP (Guzzetti et al. 2005; Porta et al. 2007). Also, the increase in the oscillatory component of the LF signal in the AP recordings can be linked to a central sympathetic-mediated activity on vascular beds (Stauss 2007). These results indicate that glutamate acting in the MePD is associated with the central modulation of both cardiac and vascular sympathetic activity.

Conversely, the significant increase of the HRV after the microinjection of GABA (61ng) in the MePD suggests another modulatory way for this neurotransmitter. This increase of HRV is linked to centrally-mediated vagal activation (Pagani et al. 1997) despite the absence of evident alterations in the sympathovagal balance and in symbolic analysis patterns. The fact that glutamatergic stimulation was associated with a significant change in the sympathetic/parasympathetic balance but GABA did not elicit the opposite effect might be due to a less intense action of GABA in the MePD or, what seems more likely, the possibility that rats already have a high and predominant parasympathetic drive upon the cardiac function. Additionally, GABA effects in the MePD depend on its basal concentration in the extracellular space and actions in the local neuro-glial network .

The response of HR induced by the baroreflex was significantly decreased in animals microinjected with glutamate and both doses of GABA when compared to control data. As occurs in other amygdaloid areas (Paré et al. 2003), it is possible that neurotransmitter-

mediated excitatory, inhibitory and/or disinhibitory mechanisms in the MePD can be promoting a flexible, dose- and context-dependent modulation of the reflex sympathetic/parasympathetic activity. Then, the MePD would dynamically change HR and AP responses and the range of reflex responses in homeostatic and/or allostatic conditions. For example, electrical stimulation of the MePD increased AP in mice (Zhang et al. 2009) and bilateral ibotenic acid lesions of this subnucleus attenuated the development of a higher AP in spontaneously hypertensive rats (Fukumori et al. 2004).

Furthermore, glutamatergic and GABAergic activities in the MePD promoted a greater variability in the responses of HR and AP by changing their maximum and minimum values after activation of the baroreceptors. The maximum gain of the baroreflex responses when the AP was either increased or decreased revealed that the average sensitivity of the baroreflex was significantly reduced by both glutamate and GABA in the MePD. The lower dose of GABA (61 ng) also caused a flattening in the curve of MAP when the baroreceptors were stimulated with sodium nitroprusside, thus decreasing the reflex stimulation of the HR. Having the afferent loop of the baroreflex functioning properly, present findings indicate an altered central processing of the baroreflex sensitivity with an imbalance in the sympathovagal outflow.

Present data reinforce that the MePD modulates phasic information of cardiovascular reflex responses (Quagliotto et al. 2008; Quagliotto et al. 2011). This forebrain area is relevant for the central regulation of the baroreflex sensitivity and can promote selective responses, i.e., glutamate in the MePD evoked an increase of the central sympathetic modulation of the cardiovascular system whereas GABA led to an increase in the HR variability associated with the central parasympathetic heart control in awake rats. It is an intriguing idea that MePD-mediated broadening of cardiovascular reflex responses would give adequate support for concomitantly organized emotionally-loaded social behaviors (Quagliotto et al. 2011; Rasia-Filho 2006). Further efforts can add to and expand the present contribution by testing the central receptors and the peripheral sympathovagal balance involved with these results.

Acknowledgements

Authors are thankful to Dr. Emilene Becker for her help in part of the experimental procedure. Grants from the Brazilian Federal Agency “Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento” (CNPq). PDL and AARF are CNPq researchers.

References

- Adamec, R. E., & Morgan, H. D. (1994). The effect of kindling of different nuclei in the left and right amygdala on anxiety in the rat. *Physiol Behav*, *55*(1), 1-12.
- Bupesh, M., Legaz, I., Abellán, A. & Medina, L. (2011). Multiple telencephalic and extratelencephalic embryonic domains contribute neurons to the medial extended amygdala. *J. Comp. Neurol.*, *519*, 1505-1525.
- Canteras, N. S., Simerly, R. B., & Swanson, L. W. (1995). Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol*, *360*(2), 213-245.
- Casali, K. R., Casali, A. G., Montano, N., Irigoyen, M. C., Macagnan, F., Guzzetti, S., et al. (2008). Multiple testing strategy for the detection of temporal irreversibility in stationary time series. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, *77*(6 Pt 2), 066204.
- Choi, G. B., Dong, H. W., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Swanson, L. W., et al. (2005). Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*, *46*(4), 647-660.
- Cruz, J. C., Bonagamba, L. G., Machado, B. H., Biancardi, V. C., & Stern, J. E. (2008). Intermittent activation of peripheral chemoreceptors in awake rats induces Fos expression in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience*, *157*(2), 463-472.
- Cruz, J. C., & Machado, B. H. (2009). GABA and nitric oxide in the PVN are involved in arterial pressure control but not in the chemoreflex responses in rats. *Auton Neurosci*, *146*(1-2), 47-55.
- Cruz Jde, C., Bonagamba, L. G., Stern, J. E., & Machado, B. H. (2010). Fos expression in the NTS in response to peripheral chemoreflex activation in awake rats. *Auton Neurosci*, *152*(1-2), 27-34.
- Dall'Ago, P., D'Agord Schaan, B., da Silva, V. O., Werner, J., da Silva Soares, P. P., de Angelis, K., et al. (2007). Parasympathetic dysfunction is associated with baroreflex and chemoreflex impairment in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Auton Neurosci*, *131*(1-2), 28-35.

Dall'Ago, P., Fernandes, T. G., Machado, U. F., Bello, A. A., & Irigoyen, M. C. (1997). Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*, 30(1), 119-124.

Dall'Oglio, A., Gehlen, G., Achaval, M., & Rasia-Filho, A. A. (2008a). Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the "ventral" medial amygdala subnuclei of adult male and female rats. *Neurosci Lett*, 439(3), 287-292.

Dall'Oglio, A., Gehlen, G., Achaval, M., & Rasia-Filho, A. A. (2008b). Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: further data based on the Golgi method. *Neurosci Lett*, 430(2), 151-156.

Davern, P. J., Nguyen-Huu, T. P., La Greca, L., Abdelkader, A., & Head, G. A. (2009). Role of the sympathetic nervous system in Schlager genetically hypertensive mice. *Hypertension*, 54(4), 852-859.

Davern, P. J., & Head, G. A. (2011). Role of the medial amygdala in mediating responses to aversive stimuli leading to hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 38(2), 136-143.

Dayas, C. V., Buller, K. M., & Day, T. A. (1999). Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur J Neurosci*, 11(7), 2312-2322.

Dayas, C. V., Buller, K. M., & Day, T. A. (2001). Medullary neurones regulate hypothalamic corticotropin-releasing factor cell responses to an emotional stressor. *Neuroscience*, 105(3), 707-719.

de Castilhos, J., Forti, C. D., Achaval, M., & Rasia-Filho, A. A. (2008). Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: a Golgi study. *Brain Res*, 1240, 73-81.

de Castilhos, J., Marcuzzo, S., Forti, C. D., Frey, R. M., Stein, D., Achaval, M., et al. (2006). Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. *Brain Res Bull*, 69(2), 131-139.

de Olmos, J., Beltramino, C. A., & Alheid, G. F. (2004). Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical

survey, in G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System. Elsevier Academic Press, Amsterdam*, 509-603.

Del Arco, A., Segovia, G., Fuxe, K. & Mora, F. (2003). Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions? *J Neurochem*, 85, 23-33.

Donato, J., Jr., Cavalcante, J. C., Silva, R. J., Teixeira, A. S., Bittencourt, J. C., & Elias, C. F. (2010). Male and female odors induce Fos expression in chemically defined neuronal population. *Physiol Behav*, 99(1), 67-77.

Fazan, R., Jr., de Oliveira, M., da Silva, V. J., Joaquim, L. F., Montano, N., Porta, A., et al. (2005). Frequency-dependent baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variability in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(5), H1968-1975.

Fillenz, M. (1995). Physiological release of excitatory amino acids. *Behav Brain Res*, 71(1-2), 51-67.

Fukumori, R., Nishigori, Y., Goshima, Y., & Kubo, T. (2004). Contribution of the medial amygdaloid nucleus to the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett*, 365(2), 128-131.

Genest, S-E., Balon, N., Laforest, S., Drolet, G. & Kinkead, R. (2007). Neonatal maternal separation and enhancement of the hypoxic ventilatory response in rat: the role of GABAergic modulation within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Physiol*, 583, 299-314.

Goren, M. Z., Akici, A., Berkman, K., & Onat, F. (2000). Cardiovascular responses to NMDA injected into nuclei of hypothalamus or amygdala in conscious rats. *Pharmacology*, 61(4), 257-262.

Goren, M. Z., Yananli, H. R., Berkman, K., Onat, F., & Aker, R. (2003). The influence of dorsomedial hypothalamic nucleus on contralateral paraventricular nucleus in NMDA-mediated cardiovascular responses. *Brain Res*, 968(2), 219-226.

Goren, Z., Aslan, N., Berkman, K., Oktay, S., & Onat, F. (1996). The role of amygdala and hypothalamus in GABA antagonist bicuculline-induced cardiovascular responses in conscious rats. *Brain Res*, 722(1-2), 118-124.

Guillamon, A., & Segovia, S. (1997). Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res Bull*, 44(4), 377-382.

Guzzetti, S., Borroni, E., Garbelli, P. E., Ceriani, E., Della Bella, P., Montano, N., et al. (2005). Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. *Circulation*, *112*(4), 465-470.

Hassel, B., Dingledine, R. (2006). Glutamate. In: Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T., Price, D.L. *Basic Neurochemistry: Molecular and Medical Aspects*, 7th ed. New York: Elsevier Academic Press, *23*, 267-290.

Jaenisch, R.B., Hentschke, V.S., Quagliotto, E., Cavinatto, P.R., Schmeing, L.A., et al. (2011). Respiratory muscle training improves hemodynamics, autonomic function, baroreceptors sensitivity and respiratory mechanics in rats with heart failure. *J Appl Physiol* (in press).

Kaura, S., Bradford, H. F., Young, A. M., Croucher, M. J., & Hughes, P. D. (1995). Effect of amygdaloid kindling on the content and release of amino acids from the amygdaloid complex: in vivo and in vitro studies. *J Neurochem*, *65*(3), 1240-1249.

Kubo, T., Okatani, H., Nishigori, Y., Hagiwara, Y., Fukumori, R., & Goshima, Y. (2004). Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats. *Neurosci Lett*, *354*(1), 84-86.

Lohman, R. J., Liu, L., Morris, M., et al. (2005) Validation of a method for localised microinjection of drugs into thalamic subregions in rats for epilepsy pharmacological studies. *J Neurosci Methods*, *146*, 191-197.

Longhurst, J. (2008). Neural regulation of the cardiovascular system, in L. Squire, D. Berg, F. Bloom, S. Dulac, A. Ghosh, N. Spitzer, N. (Eds.), *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, Burlington, 829-853.

Magri, V., Trimarchi, G. R., Quattrone, G., Squadrito, F., Di Giorgio, R. M., Costa, G., et al. (1984). Increased cardiovascular responsiveness to GABAergic stimulation in DOCA-salt hypertensive rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, *45*(1), 107-118.

Majchrzak, M., Brailowsky, S., & Will, B. (1992). Chronic infusion of GABA into the nucleus basalis magnocellularis or frontal cortex of rats: a behavioral and histological study. *Exp Brain Res*, *88*(3), 531-540.

Malliani, A., Pagani, M., Lombardi, F., & Cerutti, S. (1991). Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*, *84*(2), 482-492.

Marcuzzo, S., Dall'Oglio, A., Ribeiro, M. F., Achaval, M., & Rasia-Filho, A. A. (2007). Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. *Neurosci Lett*, *424*(1), 16-21.

Meredith, M., & Westberry, J. M. (2004). Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. *J Neurosci*, *24*(25), 5719-5725.

Montano, N., Porta, A., Cogliati, C., Costantino, G., Tobaldini, E., Casali, K. R., et al. (2009). Heart rate variability explored in the frequency domain: a tool to investigate the link between heart and behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, *33*(2), 71-80.

Montano, N., Ruscone, T. G., Porta, A., Lombardi, F., Pagani, M., & Malliani, A. (1994). Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation*, *90*(4), 1826-1831.

Newman, S. W. (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann N Y Acad Sci*, *877*, 242-257.

Nitecka, L., & Ben-Ari, Y. (1987). Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *J Comp Neurol*, *266*(1), 45-55.

Nollo, G., Porta, A., Faes, L., Del Greco, M., Disertori, M., & Ravelli, F. (2001). Causal linear parametric model for baroreflex gain assessment in patients with recent myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *280*(4), H1830-1839.

Olsen, R. W., Betz, H. (2006). GABA and glycine. In: Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T., Price, D.L. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 7 th ed. New York:Elsevier Academic Press, 291-301.

Pagani, M., Montano, N., Porta, A., Malliani, A., Abboud, F. M., Birkett, C., et al. (1997). Relationship between spectral components of cardiovascular variabilities and direct measures of muscle sympathetic nerve activity in humans. *Circulation*, *95*(6), 1441-1448.

Paré, D., Royer, S., Smith, Y., & Lang, E. J. (2003). Contextual inhibitory gating of impulse traffic in the intra-amygdaloid network. *Ann N Y Acad Sci*, *985*, 78-91.

Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.

Petrovich, G. D., Canteras, N. S., & Swanson, L. W. (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Brain Res Rev*, 38(1-2), 247-289.

Porta, A., Casali, K. R., Casali, A. G., Gneccchi-Ruscione, T., Tobaldini, E., Montano, N., et al. (2008). Temporal asymmetries of short-term heart period variability are linked to autonomic regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(2), R550-557.

Porta, A., Tobaldini, E., Guzzetti, S., Furlan, R., Montano, N., & Gneccchi-Ruscione, T. (2007). Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(1), H702-708.

Quagliotto, E., Neckel, H., Riveiro, D. F., Casali, K. R., Mostarda, C., Irigoyen, M. C., et al. (2008). Histamine in the posterodorsal medial amygdala modulates cardiovascular reflex responses in awake rats. *Neuroscience*, 157(4), 709-719.

Quagliotto, E., Casali, K.R., Dal Lago, P. & Rasia-Filho, A.A. (2011). Neurotransmitter and neuropeptidergic modulation of cardiovascular responses evoked by the posterodorsal medial amygdala of adult male rats. In: Yilmazer-Hanke, D. editor. *Amygdala: Structure, Functions and Disorders*. Hauppauge: Nova Science Publishers (in press).

Rasia-Filho, A. A. (2006). Is there anything "autonomous" in the nervous system? *Adv Physiol Educ*, 30(1), 9-12.

Rasia-Filho, A. A., Brusco, J., Moreira, J.E. (2009). Spine plasticity in the rat medial amygdala. In: Baylog, L.R. editor. *Dendritic Spines: Biochemistry, Modeling and Properties*. Hauppauge: Nova Science Publishers 23, 67-90.

Rasia-Filho, A. A., Fabian, C., Rigoti, K. M., & Achaval, M. (2004). Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience*, 126(4), 839-847.

Rasia-Filho, A. A., & Lucion, A. B. (1996). Effects of 8-OH-DPAT on sexual behavior of male rats castrated at different ages. *Horm Behav*, 30(3), 251-258.

Saha, S. (2005). Role of the central nucleus of the amygdala in the control of blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 32(5-6), 450-456.

Simmons, D. A., & Yahr, P. (2003). GABA and glutamate in mating-activated cells in the preoptic area and medial amygdala of male gerbils. *J Comp Neurol*, 459(3), 290-300.

Stauss, H. M. (2007). Identification of blood pressure control mechanisms by power spectral analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34(4), 362-368.

Stefanova, N., & Ovtcharoff, W. (2000). Sexual dimorphism of the bed nucleus of the stria terminalis and the amygdala. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 158, III-X, 1-78.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. (1996). Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation*, 93(5), 1043-1065.

Timmerman, W., & Westerink, B. H. (1997). Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse*, 27(3), 242-261.

Tobaldini, E., Montano, N., Wei, S. G., Zhang, Z. H., Francis, J., Weiss, R. M., et al. (2009a). Autonomic cardiovascular modulation. *IEEE Eng Med Biol Mag*, 28(6), 79-85.

Tobaldini, E., Porta, A., Wei, S. G., Zhang, Z. H., Francis, J., Casali, K. R., et al. (2009b). Symbolic analysis detects alterations of cardiac autonomic modulation in congestive heart failure rats. *Auton Neurosci*, 150(1-2), 21-26.

van Leeuwen, P., Cysarz, D., Lange, S., Geue, D., & Groenemeyer, D. (2007). Quantification of fetal heart rate regularity using symbolic dynamics. *Chaos*, 17(1), 015119.

van Leeuwen, P., Lange, S., Geue, D., & Gronemeyer, D. (2007). Heart rate variability in the fetus: a comparison of measures. *Biomed Tech (Berl)*, 52(1), 61-65.

Yoshida, S., Matsubara, T., Uemura, A., Iguchi, A., & Hotta, N. (2002). Role of medial amygdala in controlling hemodynamics via GABA(A) receptor in anesthetized rats. *Circ J*, 66(2), 197-203.

Zhang, W., Zhang, N., Sakurai, T., & Kuwaki, T. (2009). Orexin neurons in the hypothalamus mediate cardiorespiratory responses induced by disinhibition of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res*, 1262, 25-37.

Captions

Table 1. Values are means \pm S.D. Cardiovascular data obtained before (“control” data) and “after” (test data) microinjections in the rat posterodorsal medial amygdala of saline (0.3 μ l, n = 5), glutamate (GLU 2 μ g/0.3 μ l), and two doses of GABA (61ng/0.3 μ l or 100 μ g/0.3 μ l; n = 7 in these other groups). SAP, systolic arterial pressure; DAP, diastolic arterial pressure; MAP, mean arterial blood pressure; HR, heart rate. No statistically significant differences were found when comparing data among groups.

Table 2. Values are means \pm S.D. Parameters of sigmoidal fitting curve analysis of baroreceptor reflex responses and of heart rate in rats that received microinjections in the posterodorsal medial amygdala of saline (0.3 μ l, n = 5), glutamate (GLU 2 μ g/0.3 μ l), and two doses of GABA (61ng/0.3 μ l or 100 μ g/0.3 μ l; n = 7 in these other groups). HR, heart rate; MAP, mean arterial blood pressure; MAP₅₀, MAP that corresponds to the value found at half of the HR range evoked by the baroreflex response. **P* < 0.05 when compared to saline (one-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test).

Table 3. Values are means \pm S.D. Parameters of chemoreceptor reflex responses to increasing doses of potassium cyanide (KCN, from 60 to 180 μ g/kg) in rats that received microinjections in the posterodorsal medial amygdala of saline (0.3 μ l, n = 5), glutamate (GLU 2 μ g/0.3 μ l), and two doses of GABA (61ng/0.3 μ l or 100 μ g/0.3 μ l; n = 7 in these other groups). HR, heart rate; MAP, mean arterial blood pressure. No statistically significant differences were found when comparing data among groups.

Table 4. Values are means \pm S.D. Parameters of power spectral analysis were calculated from sampled cardiovascular data of rats that received microinjections in the posterodorsal medial amygdala of saline (0.3 μ l), glutamate (GLU 2 μ g/0.3 μ l; n = 5 in these groups), and two doses of GABA (61ng/0.3 μ l or 100 μ g/0.3 μ l; n = 7 in both groups). HRV, heart rate variability; f_{LF} , central low frequency; f_{HF} , central high frequency; VLF, very low frequency power; LF, low frequency power; HF, high frequency power; APV, arterial pressure variability. **P* < 0.05 when compared to saline; ***P* < 0.05 when compared to

GABA 61ng (one-way ANOVA and Tukey *post hoc* test or Kruskal-Wallis test and Dunn's *post hoc* test).

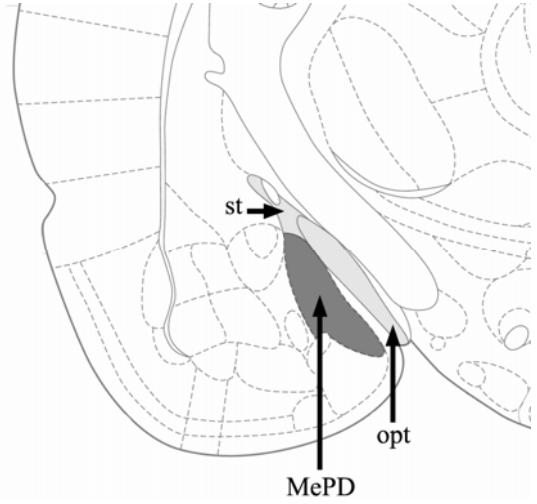
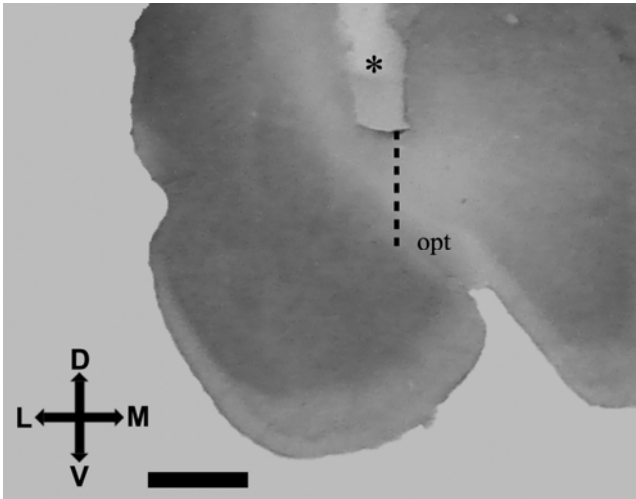
Table 5. Values are means \pm S.D. Parameters of symbolic analysis were calculated from sampled cardiovascular data of rats that received microinjections in the posterodorsal medial amygdala of saline (0.3 μ l), glutamate (GLU 2 μ g/0.3 μ l; $n = 5$ in these groups), and two doses of GABA (61ng/0.3 μ l or 100 μ g/0.3 μ l; $n = 7$ rats in both groups). * $P < 0.05$ when compared to saline and both doses of GABA; ** $P < 0.05$ when compared to GLU (in both, one-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test).

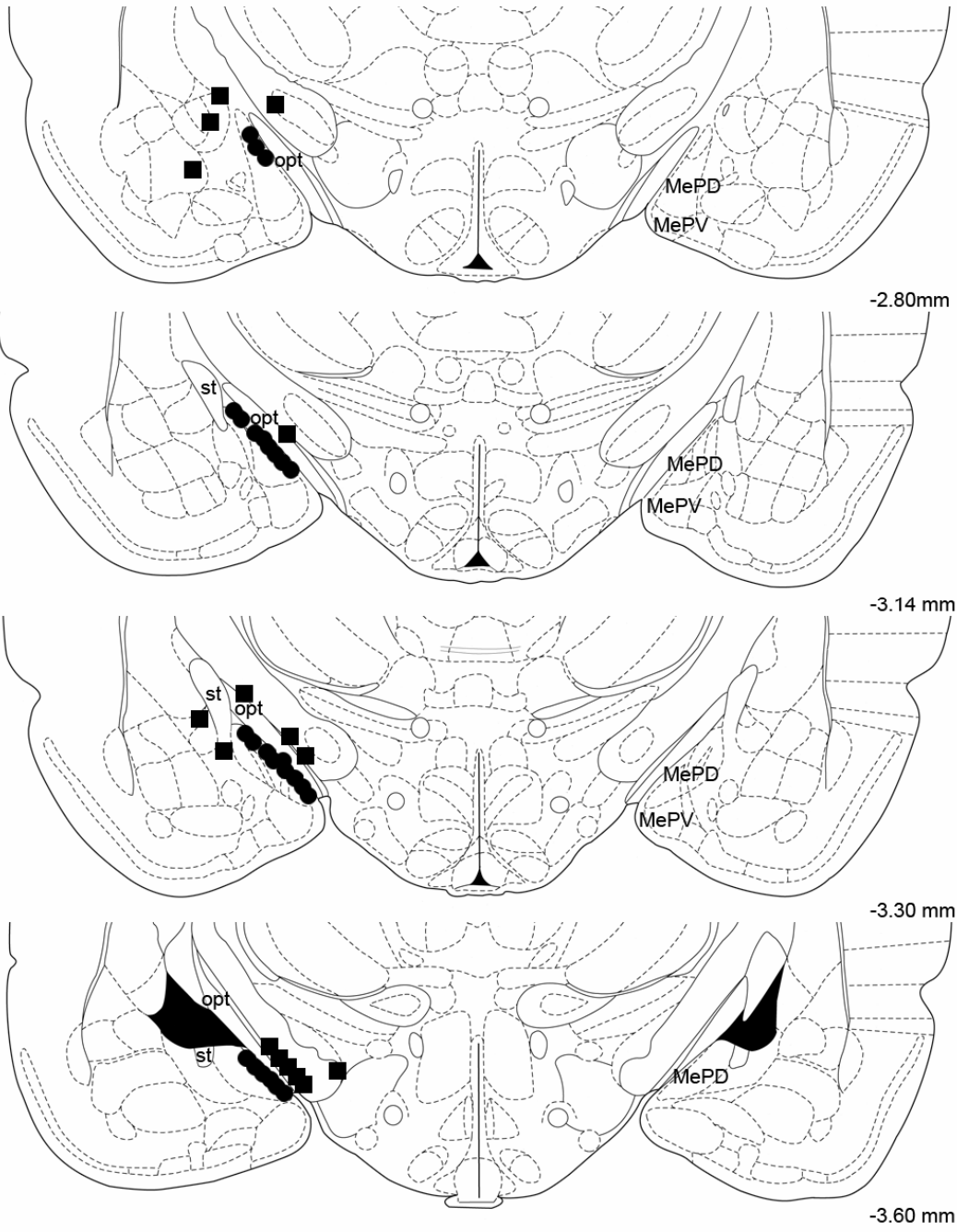
Figure 1. (left) Photomicrography of a representative rat brain coronal section near -2.8 mm posterior to the bregma showing the location of the cannula (*) implanted above the posterodorsal medial amygdala (MePD). Dashed lines represent the course of the microinjection needle, which caused a tiny mechanical lesion (not shown in details). Scale bar = 1.5 mm. **(right)** Schematic representation of a matched coronal section of the rat brain to demonstrate the location of the MePD. Other amygdaloid nuclei are represented by adjacent dashed areas, for which the reader is referred to the atlas of Paxinos and Watson (1998). opt = optic tract, st = stria terminalis. Reprinted as previously published in Quagliotto et al. (2008) with permission from Elsevier.

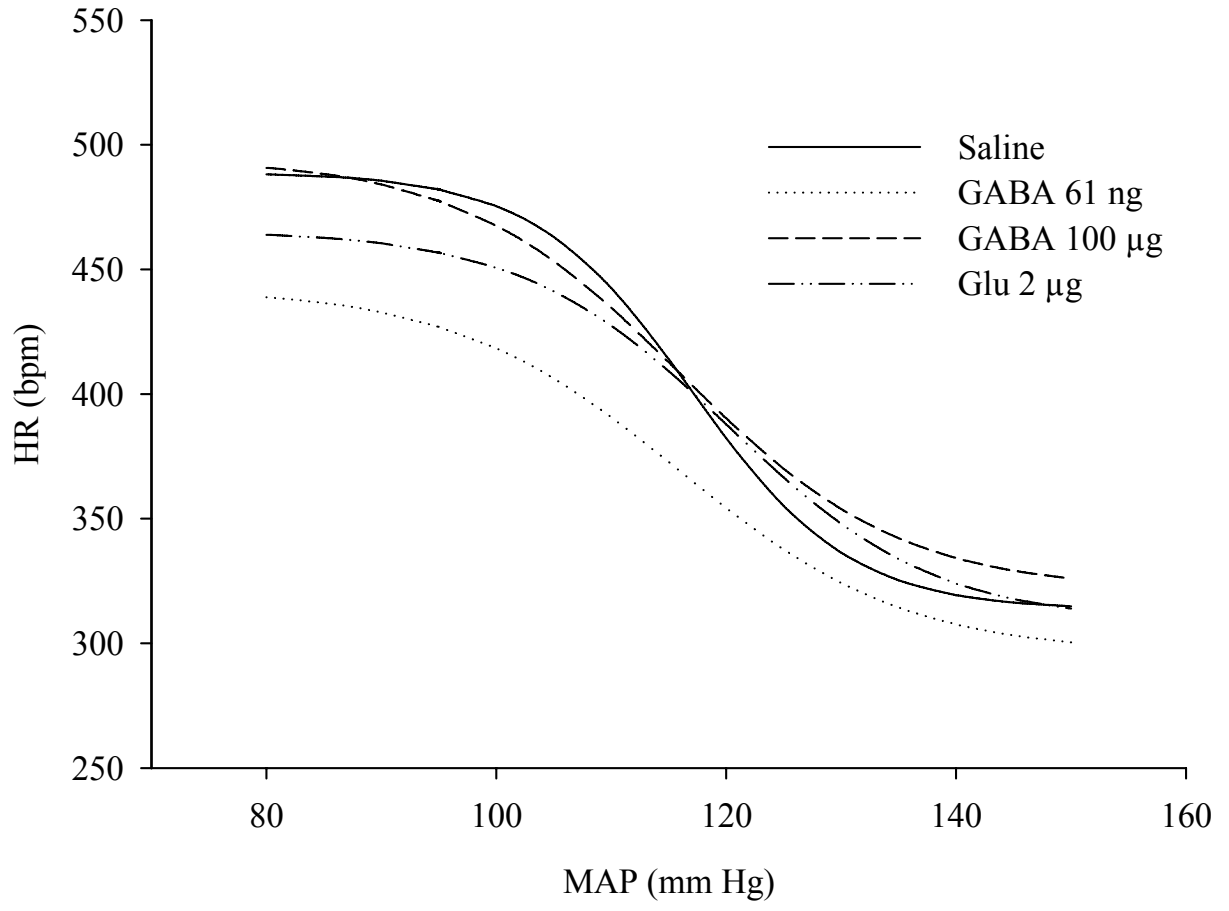
Figure 2. Schematic drawing of coronal sections of the ventral part of the rat brain showing the posterodorsal medial amygdala (MePD) and the approximate sites for the microinjections of saline, glutamate, and GABA (circles). "Non-target" sites are represented as squares. All microinjections were done in the right MePD and the points represent the approximate local for drug spread in this targeted area. Due to overlappings in the microinjections sites in different rats, there are fewer points than the number of animals studied. No evident signs of parenchymal lesions in the MePD were found in the experimental groups. Coordinates are in mm posterior to the bregma (from 2.8 to 3.8 mm). MePV, posteroventral part of the medial amygdaloid nucleus; opt, optic tract; st, stria terminalis. Adapted from Paxinos and Watson (1998).

Figure 3. Plots showing the average values of the relationship between mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR), using logistic sigmoidal baroreceptor curve analysis, of rats that received microinjections in the posterodorsal medial amygdala of saline (0.3 μ l, n = 5), glutamate (GLU 2 μ g/0.3 μ l), and two doses of GABA (61ng/0.3 μ l or 100 μ g/0.3 μ l; n = 7 in these other groups). Glutamate and both doses of GABA reduced the baroreceptor sensitivity.

Figure 4. Power spectrum and symbolic analysis applied to time series of cardiovascular parameters of rats. The columns show the pulse interval series, power spectrum and the symbolic pattern distribution for the representative data obtained from each experimental group that received microinjections in the posterodorsal medial amygdala of saline (0.3 μ l; A), glutamate (2 μ g/0.3 μ l; B; n = 5 in these groups), and two doses of GABA (61ng/0.3 μ l; C, or 100 μ g/0.3 μ l; D; n = 7 in both groups).







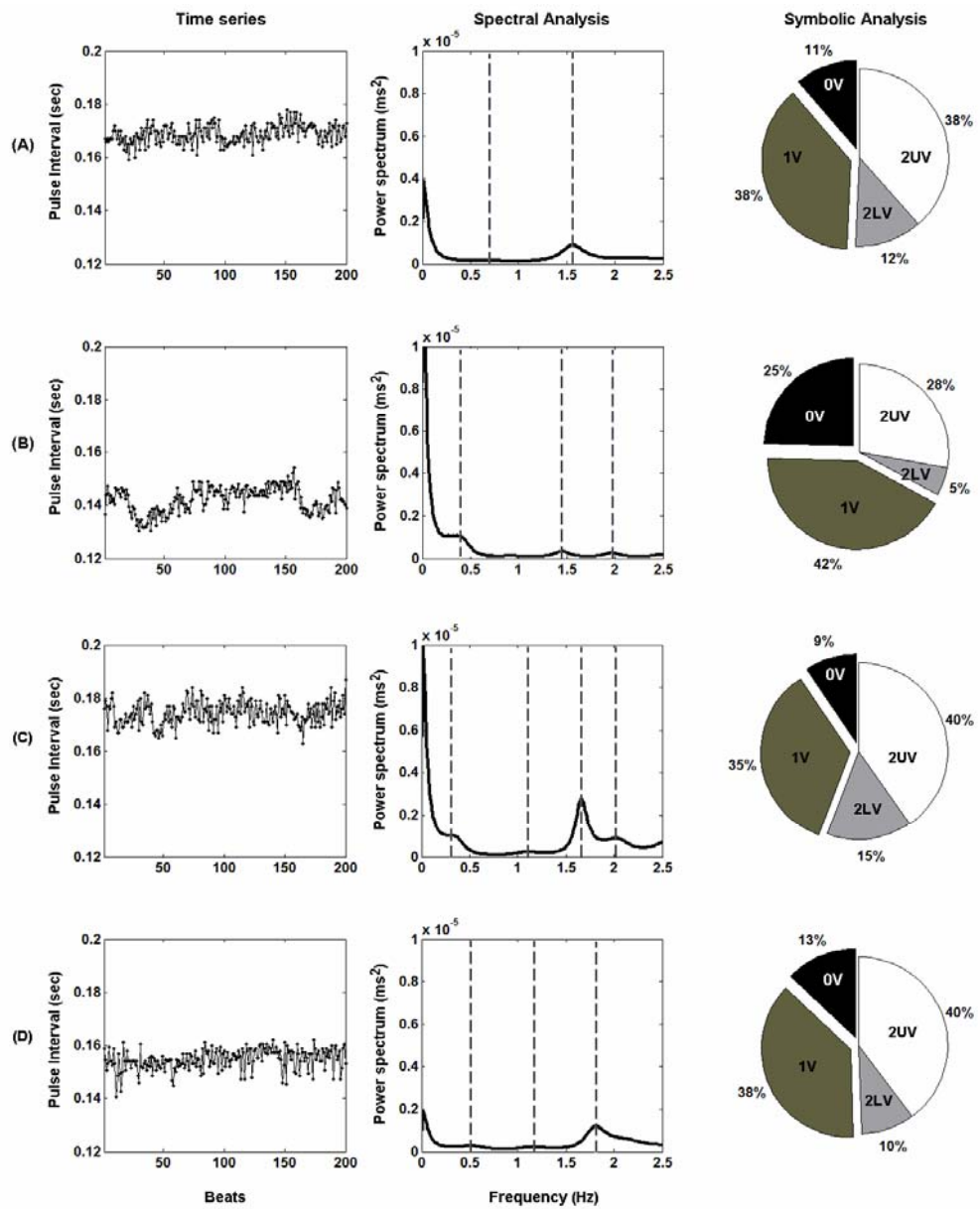


Table 1. Baseline hemodynamic status

Groups	SAP, mmHg		DAP, mmHg		MAP, mmHg		HR, beats/min	
	Control	After	Control	After	Control	After	Control	After
Saline	143.4 ± 5.4	143.1 ± 6.3	96.8 ± 5.8	98.0 ± 6.1	118.3 ± 5.4	119.2 ± 6.7	372.8 ± 13.4	363.9 ± 14.6
GLU 2µg	145.0 ± 8.1	146.5 ± 9.5	98.6 ± 8.9	100.4 ± 7.7	120.6 ± 6.7	122.3 ± 7.1	390.0 ± 25.9	396.5 ± 28.7
GABA 61ng	143.7 ± 3.9	141.8 ± 6.6	96.3 ± 1.3	95.7 ± 3.1	118.6 ± 1.8	117.2 ± 4.5	366.1 ± 43.6	354.54 ± 48.3
GABA 100 µg	143.1 ± 4.4	142.0 ± 6.5	96.5 ± 3.3	97.2 ± 2.8	118.4 ± 2.6	118.4 ± 3.6	386.7 ± 24.6	379.8 ± 23.6

Table 2. Effect of microinjections on baroreflex curve parameters in awake rats

Groups	Upper plateau, bpm	Lower plateau, bpm	HR range, bpm	MAP ₅₀ , mmHg	Maximum gain, bpm.min ⁻¹ .mmHg ⁻¹
Saline	483.5 ± 24.2	308.4 ± 24.2	175.1 ± 26.4	114.6 ± 7.0	-7.1 ± 2.2
GLU 2µg	465.6 ± 33.4	308.3 ± 47.8	157.3 ± 36.7	120.1 ± 9.4	-4.7 ± 1.7 *
GABA 61ng	442.5 ± 37.2 *†	295.8 ± 17.6	146.7 ± 24.1	115.9 ± 5.6	-4.0 ± 1.3 *
GABA 100 µg	494.6 ± 13.1	321.0 ± 33.8	173.5 ± 27.1	116.0 ± 4.16	-4.7 ± 1.1 *

Table 3. Effect of microinjections on chemoreflex parameters in awake rats

Groups	60 µg/kg		100 µg/kg		140 µg/kg		180 µg/kg	
	HR, beats/min	MAP, mHg	HR, beats/min	MAP, mmHg	HR, beats/min	MAP, mmHg	HR, beats/min	MAP, mmHg
Saline	-81.44 ± 61.78	50.94 ± 20.83	-204.18 ± 41.64	68.26 ± 23.86	-208.97 ± 29.41	70.69 ± 14.13	-227.22 ± 26.61	68.80 ± 14.70
GLU 2µg	-37.82 ± 21.53	41.67 ± 12.26	-176.86 ± 72.00	47.92 ± 7.53	-237.96 ± 59.75	56.07 ± 13.78	-243.50 ± 35.91	51.20 ± 8.67
GABA 61ng	-72.70 ± 35.79	46.01 ± 7.56	-185.99 ± 13.88	56.89 ± 11.21	-187.99 ± 13.05	64.83 ± 16.47	-229.58 ± 24.69	68.06 ± 20.83
GABA 100 µg	-102.91 ± 124.52	43.04 ± 6.35	-236.86 ± 15.70	55.84 ± 10.18	-253.92 ± 23.25	55.88 ± 8.68	-275.93 ± 18.16	56.11 ± 15.57

Table 4. Power spectral analysis of cardiovascular parameters in awake rats

Measurement	<i>Saline</i>	GLU 2 μ g	GABA 61 ng	GABA 100 μ g
HRV, ms ²	25.14 \pm 11.40	41.99 \pm 20.30	48.43 \pm 18.67*	24.58 \pm 9.40**
f _{LF, Hz}	0.69 \pm 0.09	0.52 \pm 0.18	0.45 \pm 0.15*	0.61 \pm 0.14
LF, ms ²	1.09 \pm 0.49	5.67 \pm 1.78	9.06 \pm 4.18*	1.34 \pm 0.07**
LF, NU	9.77 \pm 3.98	30.37 \pm 23.76	14.78 \pm 6.93	16.51 \pm 11.70
f _{HF, Hz}	2.17 \pm 0.60	2.05 \pm 0.72	1.96 \pm 0.76	2.18 \pm 0.45
HF, ms ²	16.02 \pm 11.61	21.86 \pm 12.68	53.94 \pm 33.96	13.61 \pm 7.97**
HF, NU	90.22 \pm 3.97	64.91 \pm 27.10	83.79 \pm 8.053	83.48 \pm 11.70
LF/HF	0.09 \pm 0.06	0.34 \pm 0.22*	0.20 \pm 0.12	0.16 \pm 0.15
APV, mmHg ²	12.43 \pm 4.76	21.60 \pm 14.04	18.62 \pm 11.03	14.83 \pm 9.20
VLF, mmHg ²	3.50 \pm 2.36	2.77 \pm 4.00	2.02 \pm 1.92	5.40 \pm 5.02
LF, mmHg ²	0.93 \pm 0.50	2.99 \pm 1.59*	2.55 \pm 1.22	1.76 \pm 1.04
HF, mmHg ²	0.51 \pm 0.23	0.56 \pm 0.53	1.89 \pm 2.70	0.33 \pm 0.23
Alpha index, ms/mmHg	0.51 \pm 0.28	0.55 \pm 0.28	0.48 \pm 0.22	0.47 \pm 0.28

Table 5. Symbolic analysis of non linear cardiovascular parameters in awake rats

Measurement	<i>Saline</i>	GLU 2 μ g	GABA 61ng	GABA 100 μ g
Entropy	3.76 \pm 0.43	3.38 \pm 0.42	4.10 \pm 0.21**	3.96 \pm 0.36
0V % pattern	15.29 \pm 6.86	24.61 \pm 3.39*	10.37 \pm 2.96**	13.92 \pm 5.03**
1V % pattern	39.04 \pm 6.57	42.38 \pm 0.92	35.89 \pm 4.40	38.57 \pm 4.41
2LV % pattern	8.20 \pm 3.80	3.16 \pm 0.75	13.44 \pm 4.83**	8.67 \pm 3.14
2UV % pattern	37.47 \pm 7.98	29.85 \pm 4.29	40.29 \pm 9.63	38.83 \pm 5.64

7 ESTUDO III

A ser submetido

Neuropeptides in the medial amygdala modulate central sympathetic/parasympathetic cardiovascular reflex responses

8 MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos com três meses de idade e pesando entre 250 a 300 g foram utilizados neste experimento. Os animais foram mantidos em condições padrão de biotério, com água e comida *ad libitum*, temperatura em torno de 22° C e ciclo claro/escuro de 12 h cada.

Como regra, procurou-se minimizar o número de animais estudados e seu sofrimento. Para isso, todos os animais foram estudados de acordo com as leis nacionais de cuidado e ética em experimentação científica (Lei nº 11.794, 8 de outubro de 2008). O projeto relacionado a esta tese foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre sob o número 256/07.

8.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Seis dias antes do registro da PA, os animais foram anestesiados com cetamina (Dopalen®, Vetbrands, Brasil; 80 mg/kg) e xilasina (Dorcipec®, Vallée, Brasil; 10 mg/kg) por via intramuscular e submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação unilateral (no lado direito, conforme ADAMEC *et al.*, 1994) de cânula na AMePD. As coordenadas para tal propósito foram adaptadas a partir dos dados apresentados no atlas do encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1998). Ou seja, para a AMePD, foram utilizados os seguintes parâmetros: 3,3 mm posterior à sutura bregmática; 3,6 mm lateral à sutura sagital; e, 6,3 mm abaixo da

dura-máter, respeitando-se o fato que a cânula-guia deveria ficar 2,0 mm acima do local desejado para que, posteriormente, a agulha de microinjeção fosse introduzida (até 2 mm abaixo da parte inferior da cânula implantada) na parte superior do núcleo “alvo”, sem lesá-lo mecanicamente.

8.3 CANULAÇÃO ARTERIAL E VENOSA

Sete dias após a cirurgia estereotáxica, o que corresponde também ao dia anterior ao registro da PA, os animais foram anestesiados novamente com cetamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) para colocação de cateteres de polietileno (PE-10, Austrália, com diâmetro interno de 0,28 mm e que foi conectado a outro PE-50, Austrália, com diâmetro interno de 0,5 mm) em dois acessos vasculares periféricos. As cânulas foram preenchidas com solução isotônica de NaCl e posicionadas no interior da artéria aorta abdominal e da veia cava inferior, através da artéria e veia femural esquerdas, respectivamente, ou seja, por meio de uma pequena incisão na pele da região inguinal esquerda, em direção ao feixe vâsculo-nervoso femural, foram introduzidas as cânulas com menor calibre (PE-10) na artéria e na veia femurais. As cânulas foram fixadas com fio de algodão em ambos os vasos, as extremidades mais calibrosas das cânulas foram passadas por via subcutânea e exteriorizadas no dorso da região cervical e fixadas com fio de algodão na pele. Isso serviu para registro da FC e da PA (por via arterial) e administração de fármacos (por via venosa), respectivamente. Após o término da cirurgia, os animais receberam uma única injeção intramuscular de gentamicina (Gentrin®, Brasil 20 mg/ml administrado 0,1 ml por rato).

Um dia após a colocação dos cateteres para registro da FC e da PA, conforme descrito, os animais tiveram suas cânulas testadas para comprovar que não estavam obstruídas. Em seguida, com os animais não anestesiados, uma agulha de menor diâmetro conectada em uma microseringa de Hamilton (Hamilton Company, EUA) foi introduzida pela cânula até atingir a

parte superior da AMePD. Os registros da atividade cardiovascular foram feitos na manhã de cada dia de experimento. A microinjeção estereotáxica durava 1 minuto e a agulha permanecia por outro minuto adicional após isso para diminuir a possibilidade de refluxo da substância a ser testada. Para se ter certeza do processo em si, observava-se o deslocamento de uma bolha de ar no interior da microseringa e testava-se a saída de líquido desta antes e após o procedimento no animal (conforme de CASTILHOS *et al.*, 2006; QUAGLIOTTO *et al.*, 2008).

Neste momento os ratos foram divididos em diferentes grupos experimentais: 1) animais microinjetados com salina (0,3 μ l; n = 8) para servir como controle, 2) OT nas doses de 10 ng/0,3 μ l (n = 7; Sigma Chemical Company, EUA) e de 25 pg/0,3 μ l (n = 6), 3) SST nas doses de 1 μ M/0,3 μ l (n = 8; Sigma Chemical Company, EUA) e de 15 fmol/0,3 μ l (n = 5) e 4) Ang II nas doses de 50 fmol/0,3 μ l (n = 7; Sigma Chemical Company, EUA) e de 50 pmol/0,3 μ l (n = 7).

Cada animal foi mantido em uma caixa individual (Plexiglas, 25x15x10 cm) durante o registro das variáveis cardiovasculares em período pré-microinjeção, controle, e pós-microinjeção, teste. A cânula arterial foi conectada a uma extensão de 40 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do registro. A extensão em uma das extremidades foi conectada com a cânula arterial e a outra, com um transdutor eletromagnético (P23 Db, Gould-Statham, EUA) que, por sua vez, estava conectado a um pré-amplificador (Hewlet-Packard 8805C, Puerto Rico, EUA). O sistema de transdução de sinal estava conectado a um microcomputador equipado com sistema de aquisição de dados (CODAS, 1Kz, DATAQ Instruments, Akron, EUA) permitindo análise dos pulsos de PA momento-a-momento, com uma frequência de amostragem de 1000 Hz por canal, para estudo dos valores de FC e PAS, PAD e PAM.

Sinais de FC e da PA foram gravados durante um período de 15 minutos de atividade cardiovascular basal, como registro controle basal, pré-microinjeção de substâncias na AMePD. A seguir era microinjetada uma primeira dose da substância em estudo salina, OT, SST e Ang II e, 5 minutos após, eram testadas as variáveis cardiovasculares de interesse por 15 minutos. Antes de avaliar a sensibilidade dos barorreceptores ou dos quimiorreceptores, fazia-se novamente a microinjeção da substância em estudo na AMePD, totalizando, assim, 3 microinjeções de salina, OT, SST e Ang II durante todo o experimento. As respostas mediadas pelos barorreceptores ou pelos quimiorreceptores foram testadas aleatoriamente entre os animais, iniciando-se com um ou outro reflexo a ser estudado, com doses de fenilefrina ou nitroprussiato de sódio e doses crescentes de KCN, conforme detalhados a seguir.

8.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS BARORRECEPTORES

Após 5 minutos da microinjeção de salina, de OT (10 ng e 25 pg), de SST (1 μ M e 15 fmol) e de Ang II (50 fmol e 50 pmol), a sensibilidade dos barorreceptores foi testada pela infusão endovenosa de fenilefrina (Sigma Chemical Company, EUA) na dose de 8 μ g/ml, e de nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, EUA) na dose de 100 μ g/ml (de acordo com CRUZ *et al.*, 2010; DALL' AGO *et al.*, 2007; JAENISCH *et al.*, 2011; QUAGLIOTTO *et al.*, 2008). Essas substâncias também foram infundidas aleatoriamente entre os animais e em cada grupo experimental. Fenilefrina serviu como um potente estimulador dos receptores α 1 adrenérgicos cuja ação predominante se dá nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição. Esta substância foi usada para provocar aumento da PA. Esse aumento da PA deveria ser seguido de uma bradicardia reflexa comandada pelos barorreceptores. Nitroprussiato de sódio serviu como um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de

veias e cuja ação ocorre por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'- guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos. Tal substância foi usada para provocar queda da PA, o que deveria ser seguida por uma resposta taquicárdica reflexa comandada pelos barorreceptores. Cada dose subsequente de fenilefrina e nitroprussiato de sódio foi administrada com intervalos de pelo menos 5 min entre as mesmas e somente após os parâmetros cardiovasculares terem retornado aos níveis basais, estando o animal em repouso.

Posteriormente, os valores de FC correspondentes aos valores de PAM no período basal, bem como durante aumentos ou quedas da PA, foram tomados para análise das respostas do reflexo mediado pelos barorreceptores. Essas respostas da FC foram avaliadas por um programa de computador específico para ajustes de curva sigmoidais (Sigma Plot, EUA), de acordo com o modelo matemático adaptado por Head e Mccarty (1987), conforme a fórmula:

$$FC = P_b + (P_t - P_b) / [1 + \exp (-4,56 \cdot G) / (P_t - P_b) \cdot (P_{A_{50}} - PAM)],$$

onde:

FC = frequência cardíaca;

P_b = platô de bradicardia que significa a resposta máxima da queda na FC (em bpm) induzido pelo aumento da PA (em mmHg);

P_t = platô de taquicardia, que significa a resposta máxima do aumento da FC (em bpm) induzido pelo decréscimo da PA (em mmHg);

$P_t - P_b$ = (em bpm) = corresponde à amplitude da faixa operacional do reflexo mediado pelos barorreceptores;

G = ganho (bpm/mmHg) médio ou sensibilidade média do barorreflexo;

PA_{50} = corresponde ao valor de PA (em mmHg) no ponto de maior inclinação (“slope”) da curva de PA. Ou seja, o nível de PA no qual o baroreflexo mostra o ganho máximo;

PAM = pressão arterial média, conforme descrito anteriormente.

8.5 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS QUIMIORRECEPTORES

Da mesma forma que para testar a sensibilidade dos barorreceptores, guardada a metodologia empregada de injeção aleatória dos fármacos para testar as respostas reflexas, 5 minutos após a microinjeção de salina, de OT (10 ng e 25 pg), de SST (1 μ M e 15 fmol) e de Ang II (50 fmol e 50 pmol), o reflexo comandado pelos quimiorreceptores foi testado pelo uso de injeções endovenosas de cianeto de potássio (KCN, Merck, EUA). KCN produz hipóxia histotóxica pela inibição da enzima citocromo oxidase e conseqüente diminuição da produção de ATP. Isso estimula os quimiorreceptores periféricos a desencadear uma resposta reflexa com componente parassimpático, representado por uma intensa bradicardia, e simpático com aumento da força de contração miocárdia seguida de aumento da PA. Nesta etapa experimental foram feitas injeções em doses crescentes de KCN (60, 100, 140 e 180 μ g/kg, de acordo com CRUZ *et al.*, 2010; DALL’AGO *et al.*, 1999; DALL’AGO *et al.*, 2007; JAENISCH *et al.*, 2011; QUAGLIOTTO *et al.*, 2008). O volume injetado em cada dose foi de 0,06 até 0,18 ml, variando conforme o peso do rato. A FC e a PA foram registradas por um período de 15 s antes da injeção da droga e por um período de 45 s após a injeção de cada dose acima mencionada. A bradicardia imediatamente antes do aumento da PA, bem como os valores máximos de PA, obtidos pela comparação entre os valores basais e os valores após a injeção do KCN foram usados para quantificar as respostas de FC e de PA desencadeadas pela ativação dos quimiorreceptores. Cada dose subseqüente de KCN foi administrada com

intervalos de pelo menos 5 min entre as mesmas e somente após os parâmetros cardiovasculares terem retornado aos níveis basais, estando o animal em repouso.

8.6 VARIABILIDADE NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA (ANÁLISE ESPECTRAL MODELAMENTO AUTO-REGRESSIVO)

Cada “batimento cardíaco” foi identificado através da utilização de algoritmo implementado no Windaq/DATAQ, que automaticamente realizou a detecção dos intervalos de pulso, do evento sistólico da onda do sinal de PA. Após esta leitura automática foi realizada uma verificação por inspeção visual, para identificar e/ou corrigir alguma marcação não correta. Em seguida foi gerada a série temporal de cada sinal a ser estudado, isto é, o intervalo de pulso cardíaco (tacograma) e da pressão arterial sistólica (sistograma). Quando necessário, utilizou-se a interpolação linear da série tacograma e sistograma, para retirar as distorções indesejáveis. Os dados foram armazenados em arquivos em formato texto e utilizados, posteriormente, em um programa de análise espectral autorregressiva linear, o qual detectou a frequência central, número e potência de cada componente. A faixa de frequência de interesse para análise espectral no rato encontra-se no intervalo que vai de 0 até 3Hz. A potência espectral foi integrada em duas faixas de frequência de interesse: altas frequências (HF), entre 0,75 e 3,0 Hz e, baixas frequências (LF), entre 0,20 e 0,75 Hz (MALPAS *et al.*, 1990; HAYANO *et al.*, 1991; PARATI, 1995; PAGANI *et al.*, 1996, PAGANI *et al.*, 1997; SPALLONE *et al.*, 1997; JULIEN *et al.*, 2001; MALPAS *et al.*, 2001; MALPAS, 2002; SALGADO *et al.*, 2006), os quais serviram para estudar a variabilidade nos dados obtidos.

8.7 PERFUSÃO CARDÍACA E ANÁLISE HISTOLÓGICA

Imediatamente após o término de cada experimento, os animais foram novamente anestesiados com cetamina (80 ml/kg) e xilasina (10 ml/kg) e submetidos a uma incisão abdominal transversa para, pelo diafragma, adentrar-se à caixa torácica. O ventrículo esquerdo era identificado, injetava-se heparina (5000 UI) e era feita a perfusão por via transcardíaca com 150 ml de formol a 8% (Reagen®, Brasil) como substância fixadora histológica. O encéfalo do rato foi retirado da caixa craniana e permaneceu em solução de perfusão com a mesma composição por no mínimo 5 dias.

A seguir, os encéfalos foram seccionados em vibrátomo (Leica, Alemanha) em secções coronais seqüenciais de 60 µm de espessura para identificação do trajeto da cânula implantada e, na maioria dos casos, do trajeto da agulha de microinjeção. Os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas, secos em estufa e foi feita a coloração dos cortes pelo emprego da corriqueira técnica histológica de hematoxilina-eosina. A seguir, foram imediatamente mergulhados em soluções com concentrações crescentes de álcool, em carboxilol para clareamento, e cobertos com bálsamo do Canadá e lamínula. Após secagem, os cortes foram analisados em estereomicroscópio (Olympus, Japão) para identificação precisa da localização das cânulas e do trajeto provável da agulha de microinjeção das substâncias estudadas na AMePD. Somente os animais onde as cânulas foram colocadas em local adequado foram considerados para posterior análise dos dados e comparações dentro de cada grupo e entre os grupos experimentais. Da mesma forma, todos os animais que apresentavam evidências histológicas de sangramento excessivo no parênquima nervoso ou lesão mecânica devido à microinjeção diretamente na AMePD ou na ST foram descartados do presente estudo. Via de regra, as microinjeções classificadas como válidas atingiram a parte lateral do TO ou superior da ST, de onde a difusão das substâncias injetadas deve ter atingida a AMePD sem, no entanto, lesioná-la diretamente

9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por terem preenchido os requisitos formais para a utilização de testes estatísticos paramétricos, os dados de FC, PAS, PAD e PAM e os dados provenientes dos testes da resposta reflexa quimiorreceptora (FC e PA após doses diferentes de KCN) foram analisados pelo teste da análise da variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, ou seja, nesses parâmetros, os valores pré-microinjeção, como registro controle e os dados após microinjeção na AMePD de salina, de Ang II (50 fmol e 50 pmol), de OT (10 ng e 15 fmol) ou de SST (1 μ M e 15 fmol) foram comparados dentro de cada grupo experimental respectivo e entre os grupos experimentais estudados. Com isso, pela estrutura do teste empregado, comparam-se os valores pré-microinjeção e pós-microinjeção entre os grupos experimentais, os dados dentro os grupos estudados e, igualmente, a interação entre esses fatores. Em todos os casos o teste *post hoc* de Newman-Keuls para comparações múltiplas foi empregado quando apropriado.

Para os demais dados obtidos nos grupos experimentais e que correspondem ao valor de maior inclinação da curva pressórica referente à resposta gerada pelos barorreceptores (PA₅₀), ao platô de bradicardia que significa a resposta máxima da queda na FC referente à resposta gerada pelos barorreceptores (Pb), ao platô de taquicardia, que significa a resposta máxima do aumento da FC (em bpm) induzido pelo decréscimo da PA (em mmHg) após estimulação dos barorreceptores (Pt), ganho (bpm/mmHg) médio ou sensibilidade média após estimulação dos barorreceptores (G) e ao que corresponde à amplitude da faixa operacional do reflexo (em bpm) mediado pelos barorreceptores (Pt – Pb) foram submetidos ao teste da

ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparações entre os grupos experimentais.

Por fim, os dados referentes à análise espectral dos componentes dos dados obtidos após microinjeção das substâncias testadas no AMePD e que dizem respeito à FC, PAS média, à variabilidade da PAS, ao componente de baixa frequência do tacograma (LF), a componente de alta frequência do tacograma (HF) e à relação entre esses dois componentes do tacograma foram comparados pelo teste da ANOVA de uma via e, a seguir, pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, entre os grupos experimentais testados. A análise simbólica dos mesmos dados foi submetida ao mesmo tratamento estatístico. Em todos os casos, o nível de significância estatístico foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

10 RESULTADOS

Os dados estão apresentados nas Figuras 4-12 e, quando apropriado, como média \pm desvio padrão (DP). Nos grupos experimentais estudados após microinjeção no AMePD de salina, de Ang II nas doses de 50 fmol e de 50 pmol, de OT nas doses de 10 ng e de 25 pg e de SST nas doses de 1 μ M e de 15 fmol. Os resultados obtidos foram os seguintes:

1-Valores hemodinâmicos basais

1.1 - Não houve diferenças estatisticamente significativas nos valores de FC entre os grupos estudados. Ou seja, os valores de FC na comparação dos valores pré-microinjeção e pós-microinjeção não são estatisticamente diferentes entre si [F (1,41) = 0,190; p = 0,66], não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais [F (6,41) = 0,3621; p = 0,89] nem quando testada a interação entre esses dois fatores [F (6,41) = 0,8530; p = 0,53; Figura 4(A)].

1.2 - Os valores de PAS não apresentaram diferença estatisticamente significante quando comparados os valores pré-microinjeção e pós-microinjeção [F (1,41) = 2,233; p = 0,14], nem entre os grupos experimentais [F (6,41) = 0,5886; p = 0,737] ou na interação entre esses fatores, momento dos registros *versus* grupos estudados [F (6,41) = 1,978; p < 0,09; Figura 4(B)].

1.3 - Para os valores de PAD não houve diferença estatisticamente significante entre as medidas pré-microinjeção e pós-microinjeção [F (1,41) = 0,247; p = 0,62], nem entre os

grupos estudados [$F(6,41) = 1,238$; $p = 0,30$] e nem na interação entre esses fatores [$F(6,41) = 0,901$; $p = 0,50$; Figura 4(C)].

1.4 - Os valores de PAM não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as medidas pré-microinjeção e pós-microinjeção [$F(1,41) = 1,032$; $p = 0,3157$], nem entre os grupos experimentais [$F(6,41) = 0,4182$; $p = 0,86$] e nem na interação entre esses dois fatores [$F(6,41) = 1,182$; $p = 0,332$; Figura 4(D)].

2 – Resultado do teste do quimiorreflexo

2.1 - Os valores de FC após injeção de diferentes doses de KCN empregadas na avaliação da resposta reflexa relacionada com os quimiorreceptores, apresentaram diferença estatisticamente significativa nos dados obtidos com doses crescentes de KCN no AMePD [$F(3,123) = 69,77$; $p = 0,01$] e entre os grupos experimentais [$F(6,123) = 2,82$; $p = 0,02$], mas não houve diferença estatisticamente significativa na interação entre esses dois fatores [$F(18,123) = 1,51$; $p = 0,09$; Figura 5]. Guardados os cuidados na interpretação dos resultados, pode-se dizer que ocorre alteração na FC por causa do KCN e há diferença entre os grupos experimentais, mas os efeitos dos neuropeptídeos não dependem da dose de KCN empregada para ocorrerem. Assim:

2.2 - No grupo de animais microinjetados com salina, Ang II, na dose de 50 fmol, OT nas doses de 10 ng e de 25 pg e SST na dose de 15 fmol, os valores mais próximos do basal foram obtidos com a menor dose de KCN (60 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e ocorreu, conforme o esperado, uma redução estatisticamente significativa maior na FC quando foram aumentadas as doses injetadas de KCN para 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (teste de Newman-Keuls, $p < 0,001$ em todos os casos, quando comparados com a menor dose injetada). Essas três maiores doses produziram respostas similares entre si (teste de Newman-Keuls, $p > 0,05$).

2.3 - No grupo de animais microinjetados com Ang II na dose de 50 fmol ocorreu uma maior redução na FC quando se comparou os resultados após a injeção de 60 µg/kg e de 140 µg/kg (teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$ em ambos casos) em relação à salina ($p < 0,05$).

2.4 - Os valores de PAM após injeção de diferentes doses de KCN apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos dados obtidos com doses crescentes de KCN [F (3,123) = 17,26; $p = 0,01$], entre os grupos experimentais [F (6,123) = 1,08; $p = 0,38$] e houve na interação entre esses dois fatores [F (18,123) = 2,22; $p = 0,005$; Figura 6].

2.5 - No grupo de animais microinjetados com OT na dose de 10 ng os valores mais próximos do basal foram obtidos com a menor dose de KCN (60 µg/kg) e ocorreu, conforme o esperado, uma aumento estatisticamente significativo maior na PAM quando foram aumentadas as doses injetadas de KCN para 180 µg/kg (teste de Newman-Keuls, $p < 0,001$ em todos os casos, quando comparados com a menor dose injetada).

2.6 - No grupo de animais microinjetados com Ang II na dose de 50 fmol ocorreu uma maior redução na PA quando se compararam os resultados após a injeção de 140 µg/kg de KCN em relação à salina (teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

3- Resultado do teste do barorreflexo

3.1- Com relação ao reflexo mediado pelos barorreceptores, os valores referentes ao ponto de maior inclinação da curva da PA denominado PA_{50} e que representa o nível de PA no qual o barorreflexo mostra ganho máximo, houve diferença estatisticamente significativa quando os grupos experimentais foram comparados entre si [F (6,47) = 3,37; $p = 0,008$] e o teste *post hoc* mostrou que o grupo microinjetado com OT na dose de 10 ng e SST na dose de 1µM apresentaram uma diminuição maior nesse parâmetro do que o grupo que recebeu salina ($p < 0,05$ em ambos os casos; Figura 7).

3.2 - Com relação à variação do ganho médio, ou sensibilidade média do barorreflexo, houve diferença estatisticamente significante entre os grupos experimentais estudados [$F(6,47) = 2,56$; $p = 0,03$] e o teste *post hoc* mostrou que o grupo microinjetado com Ang II na dose de 50 pmol apresentou uma maior diminuição nesse parâmetro do que no grupo que recebeu OT na dose de 25 pg (teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$ em ambos os casos; Figura 8).

3.3 - Os valores referentes à queda máxima da FC induzida pelo aumento da PA, dito platô de bradicardia após a estimulação da resposta reflexa mediada pelos barorreceptores, não apresentou diferença estatisticamente significante quando comparados os dados dos grupos experimentais entre si [$F(6,47) = 1,53$; $p = 0,19$; Figura 9]. O mesmo ocorreu para a comparação dos resultados da resposta máxima da FC induzida pelo decréscimo da PA, dito platô de taquicardia, após estimulação reflexa mediada pelos barorreceptores [$F(6,47) = 1,194$; $p = 0,09$; Figura 10]. Não houve diferença estatisticamente significante na variação da amplitude da FC, que corresponde à faixa operacional do reflexo barorreceptor [$F(6,47) = 1,297$; $p = 0,279$; Figura 11]; mas nos valores correspondentes à curva da modificação da PAM de acordo com a variação da FC houve diferença estatisticamente significante entre os grupos estudados [$F(6,47) = 3,37$; $p = 0,008$], sendo que a resposta da curva sigmoideal após a microinjeção de OT na dose de 10 ng e SST na dose de 1 μ M apresentaram uma maior diminuição comparativamente ao grupo controle, microinjetado com salina no AMePD (teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$ em ambos os casos; Figura 12).

4 - Análise espectral dos dados

Pela análise espectral da variabilidade da FC e da PA nos seis grupos experimentais após microinjeção no AMePD de salina, OT nas doses de 10 ng e 25 pg, SST nas doses de 1 μ M e 15 fmol e Ang II na dose de 50 pmol, foi possível identificar os seguintes resultados relevantes:

4.1 - Quanto à análise da variabilidade da FC do tacograma, esta não foi diferente entre os grupos estudados [$F(5,33) = 2,009$; $p = 0,10$; Tabela 1]. O mesmo ocorreu para os dados referentes à média da variabilidade da PAS do sistograma (APV, mm Hg²) que foi diferente entre os grupos estudados [$F(5,33) = 1,633$; $p = 0,178$; Tabela 1]. Da mesma forma, isso ocorreu para os dados referentes à média da variabilidade da PAS do sistograma (SAP/VLF, mm Hg²) onde não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados [$F(5,33) = 0,7218$; $p = 0,611$; Tabela 1]. Igualmente, o componente de baixa frequência (LF, mm Hg²) não foi diferente entre os grupos estudados [$F(5,33) = 1,875$; $p = 0,125$; Tabela 1], nem o componente de alta frequência (HF, mm Hg²) foi diferente entre os grupos experimentais [$F(5,33) = 1,419$; $p = 0,241$; Tabela 1].

4.2 - Houve diferença estatisticamente significativa na variabilidade da PAS do sistograma (SAP, mm Hg) entre os grupos experimentais [$F(5,33) = 4,648$; $p = 0,001$] sendo que, quando comparados com os animais que receberam microinjeções de salina no AMePD, as microinjeções de OT na dose de 25 pg, de SST nas doses de 1 μ M e 15 fmol e de Ang II na dose de 50 pmol geraram os maiores valores de variabilidade nesse parâmetro (teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$ e $p < 0,01$; respectivamente). De fato, também houve diferença estatisticamente significativa entre os dados dos animais dos grupos que receberam microinjeções de OT na dose de 10 ng (teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$) a qual gerou os maiores valores de variabilidade nestes parâmetros comparativamente com os obtidos após microinjeção de SST na dose de 15 fmol (teste de Newman-Keuls, $p > 0,05$; Tabela 1).

4.3 – Quanto aos dados referentes à média da variabilidade da FC do tacograma (HRV/m²), houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados [$F(5,33) = 4,502$; $p < 0,05$; Tabela 1] sendo que, quando comparados com os animais que receberam microinjeção de salina no AMePD, as microinjeções de OT na dose de 25 pg, de SST nas doses de 1 μ M e

15 fmol e de Ang II na dose de 50 pmol geraram os maiores valores de variabilidade nestes parâmetros (teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$ em todos os casos).

4.4 - Quanto à análise do componente de baixa frequência do tacograma (R-R/Lf abs, ms^2) houve diferença estatisticamente significativa neste parâmetro quando comparados os dados entre os grupos experimentais [$F(5,33) = 2,619$; $p < 0,05$; Tabela 1] sendo que, quando comparados com os animais que receberam microinjeção de salina no AMePD, a microinjeção de OT na dose de 25 pg gerou os maiores valores de variabilidade nesses parâmetros (teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.5 - Da mesma forma, houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os dados entre os grupos experimentais para a variação do intervalo R-R de baixa frequência do tacograma (RR/Lf; NU) [$F(5,33) = 2,388$; $p < 0,05$; Tabela 1] sendo que, quando comparados com os animais que receberam microinjeção de salina no AMePD, as microinjeções de SST nas doses de $1\mu M$ e 15 fmol geraram os maiores valores de variabilidade nestes parâmetros (teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$ em ambos os casos).

4.6 - Quanto à análise do componente de alta frequência do tacograma (R-R/HF, Hz), houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os dados entre os grupos experimentais [$F(5,33) = 2,612$; $p < 0,05$; Tabela 1] sendo que, quando comparados com os animais que receberam microinjeção de Ang II no AMePD, as microinjeções de OT na dose de 10 ng geraram os maiores valores de variabilidade nesses parâmetros (teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.7 - Em relação ao componente de alta frequência do tacograma (R-R/HF abs, ms^2), houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os dados entre os grupos experimentais [$F(5,33) = 2,653$; $p < 0,05$; Tabela 1] sendo que, quando comparados com os animais que receberam microinjeção de salina no AMePD, as microinjeções de OT na dose de

25 pg geraram os maiores valores de variabilidade nesses parâmetros (teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.8 - Quando foi estabelecido o índice entre os componentes de baixa frequência e de alta frequência do tacograma (ms/mm Hg), dito balanço simpático-vagal, houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os dados entre os grupos experimentais [$F(5,33) = 2,712$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls demonstrou que o valor obtido para o grupo microinjetado com OT na dose de 25 pg é maior do que o obtido nos animais que receberam salina no AMePD ($p < 0,05$; Tabela 1).

5 - Análise simbólica dos dados

Pela análise simbólica nos seis grupos experimentais após microinjeção no AMePD de salina, OT nas doses de 10 ng e 25 pg, SST nas doses de 1 μ M e 15 fmol e Ang II na dose de 50 pmol, foi possível identificar os seguintes resultados relevantes:

5.1 - Quanto à análise simbólica da média dos dados 0V, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos estudados [$F(5,33) = 0,7209$; $p = 0,61$; Tabela 2)]. O mesmo ocorreu para os dados referentes à média 1V [$F(5,33) = 1,425$; $p = 0,24$; Tabela 2) ou a 2LV entre os grupos estudados [$F(5,33) = 1,728$; $p = 0,15$; Tabela 2)].

5.2 – Por outro lado, há diferença estatisticamente significante na variável P2UV, quando comparados os dados entre os grupos experimentais [$F(5,34) = 2,282$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls demonstrou que o valor obtido para o grupo microinjetado com Ang II na dose de 50 pmol é menor do que o obtido nos animais que receberam salina no AMePD ($p < 0,05$; Tabela 2).

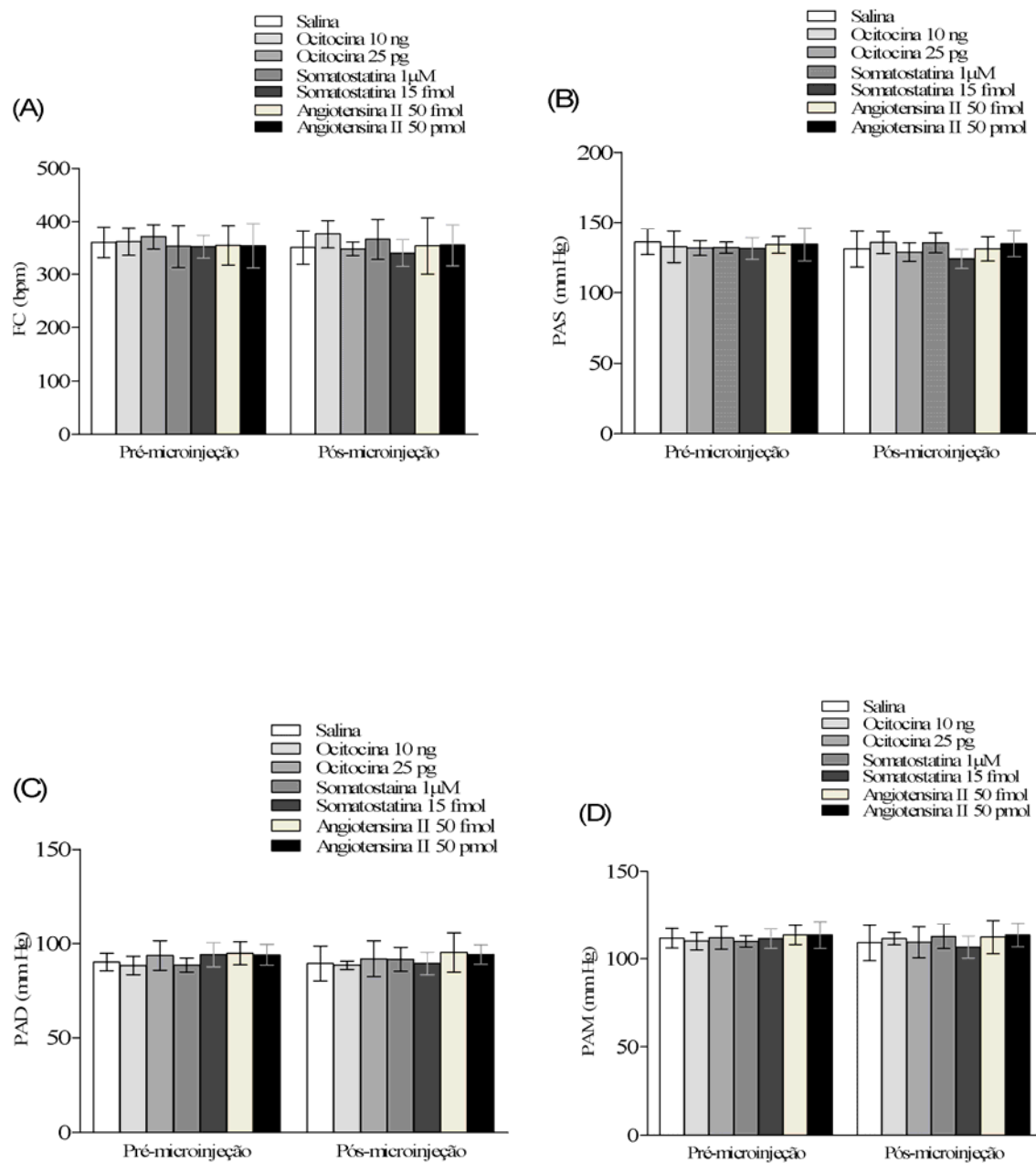


Figura 4 Médias (\pm DP) da variações da frequência cardíaca (em bpm, figura: A), da pressão arterial sistólica (PAS em mmHg, figura: B), da pressão arterial diastólica (PAD em mmHg, figura: C) e da pressão arterial média (PAM em mmHg, figura: D) nos grupos estudados em situação basal pré-microinjeção e após a microinjeção na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos com salina (0,3 μ l; n = 8), ocitocina nas doses de 10 ng/0,3 μ l (n = 7) e de 25 pg/0,3 μ l (n = 6), somatostatina nas doses de 1 μ M/0,3 μ l (n = 8) e de 15 fmol/0,3 μ l (n = 5) e angiotensina II nas doses de 50 fmol/0,3 μ l (n = 7) e de 50 pmol/0,3 μ l (n = 7). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores pré-microinjeção e pós-microinjeção ou entre cada grupo experimental estudado (p > 0,05 em todos os casos).

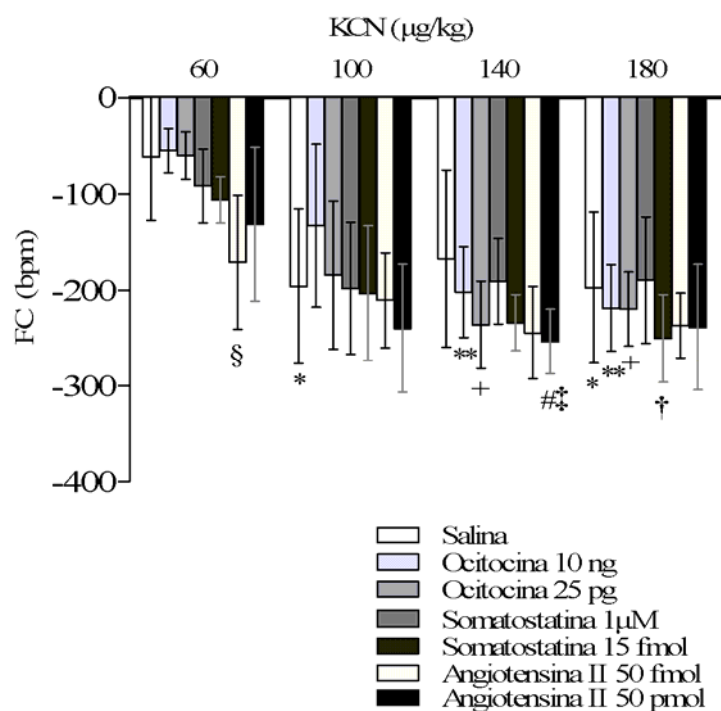


Figura 5 Médias (\pm DP) da variação da frequência cardíaca (em bpm) obtidas após injeção sistêmica de diferentes doses de KCN na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos microinjetados com salina (0,3 μ l; n = 8), ocitocina nas doses de 10 ng/0,3 μ l (n = 7) e de 25 pg/0,3 μ l (n = 6), somatostatina nas doses de 1 μ M/0,3 μ l (n = 8) e de 15 fmol/0,3 μ l (n = 5) e angiotensina II nas doses de 50 fmol/0,3 μ l (n = 7) e de 50 pmol/0,3 μ l (n = 7). As doses de KCN correspondem a 60, 100, 140 e 180 μ g/kg.

* p < 0,01 quando comparado com o valor obtido com a dose de 60 μ g/kg no grupo microinjetado com salina.

** p < 0,01 quando comparado com o valor obtido com a dose 60 μ g/kg no grupo microinjetado com ocitocina na dose de 10 ng.

+ p < 0,01 quando comparado com o valor obtido com a dose 60 μ g/kg no grupo microinjetado com ocitocina na dose de 25 pg.

† p < 0,01 quando comparado com o valor obtido com a dose 60 μ g/kg no grupo microinjetado com somatostatina na dose de 15 fmol.

‡ p < 0,05 quando comparado com o valor obtido com a dose de 60 μ g/kg no grupo microinjetado com angiotensina II na dose de 50 pmol.

§ p < 0,05 quando comparado com o valor obtido no grupo microinjetado com salina nesta mesma dose de KCN.

p < 0,05 quando comparado com o valor obtido no grupo microinjetado com salina nesta mesma dose de KCN.

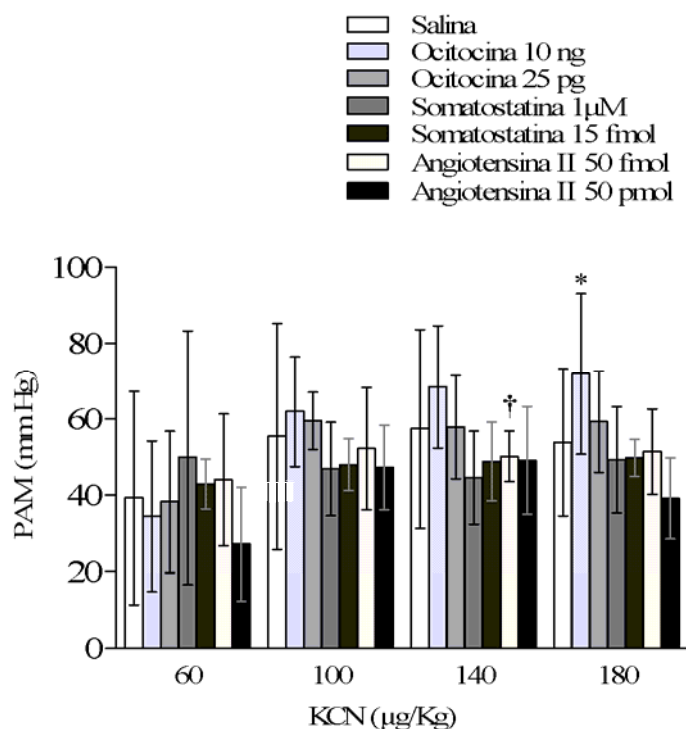


Figura 6 Médias (\pm DP) da variação da pressão arterial média (em mmHg) obtidas após injeção sistêmica de diferentes doses de KCN na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos microinjetados com salina (0,3 μ l; n = 8), ocitocina nas doses de 10 ng/0,3 μ l (n = 7) e de 25 pg/0,3 μ l (n = 6), somatostatina nas doses de 1 μ M/0,3 μ l (n = 8) e de 15 fmol/0,3 μ l (n = 5) e angiotensina II nas doses de 50 fmol/0,3 μ l (n = 7) e de 50 pmol/0,3 μ l (n = 7). As doses de KCN correspondem a 60, 100, 140 e 180 μ g/kg.

* p < 0,01 quando comparado com o valor obtido com a dose de 60 μ g/kg no grupo microinjetado com ocitocina na dose de 10 ng.

† p < 0,05 quando comparado com o valor obtido no grupo microinjetado com salina nesta mesma dose de KCN.

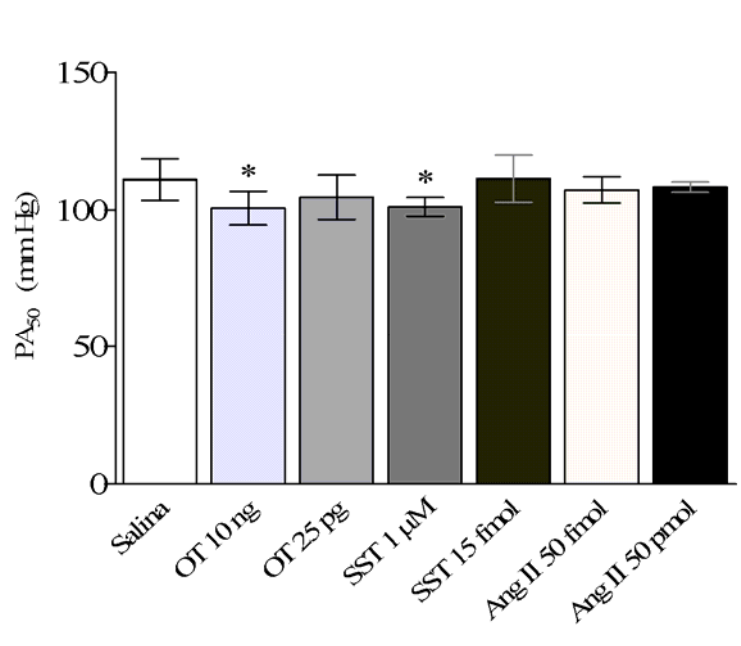


Figura 7 Médias (\pm DP) da variação do valor de pressão arterial (em mmHg) no ponto de maior inclinação da curva pressórica referente a resposta gerado pelos barorreceptores (PA_{50}) obtidas após microinjeção na amígdala medial pósterodorsal de ratos com salina (0,3 μ l; n = 8), ocitocina (OT) nas doses de 10 ng/0,3 μ l (n = 7) e de 25 pg/0,3 μ l (n = 6), somatostatina (SST) nas doses de 1 μ M/0,3 μ l (n = 8) e de 15 fmol/0,3 μ l (n = 5) e angiotensina II (Ang II) nas doses de 50 fmol/0,3 μ l (n = 7) e de 50 pmol/0,3 μ l (n = 7).

* $p < 0,05$ quando comparado com o valor obtido após microinjeção de salina.

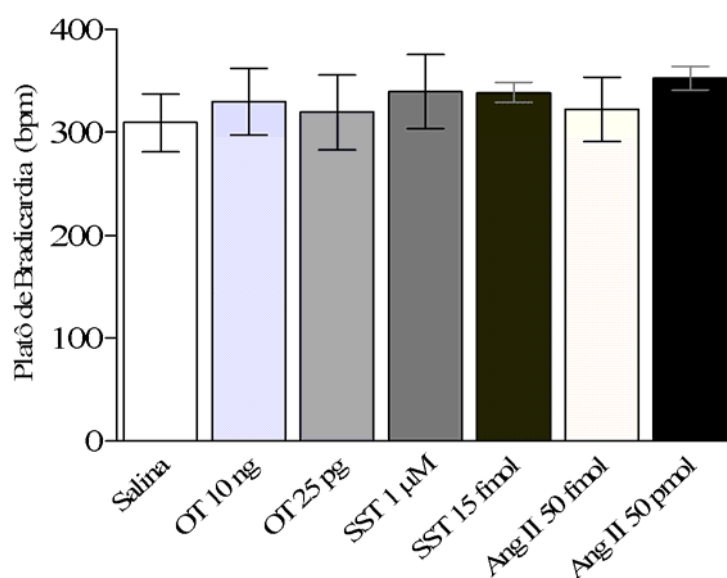


Figura 8 Médias (\pm DP) da variação da diferença da resposta máxima da queda na frequência cardíaca (em bpm) induzida pelo aumento da pressão arterial (em mmHg; platô de bradicardia, Pb) obtidas após microinjeção na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos com salina (0,3 μ l; n = 8), ocitocina (OT) nas doses de 10 ng/0,3 μ l (n = 7) e de 25 pg/0,3 μ l (n = 6), somatostatina (SST) nas doses de 1 μ M/0,3 μ l (n = 8) e de 15 fmol/0,3 μ l (n = 5) e angiotensina II (Ang II) nas doses de 50 fmol/0,3 μ l (n = 7) e de 50 pmol/0,3 μ l (n = 7). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

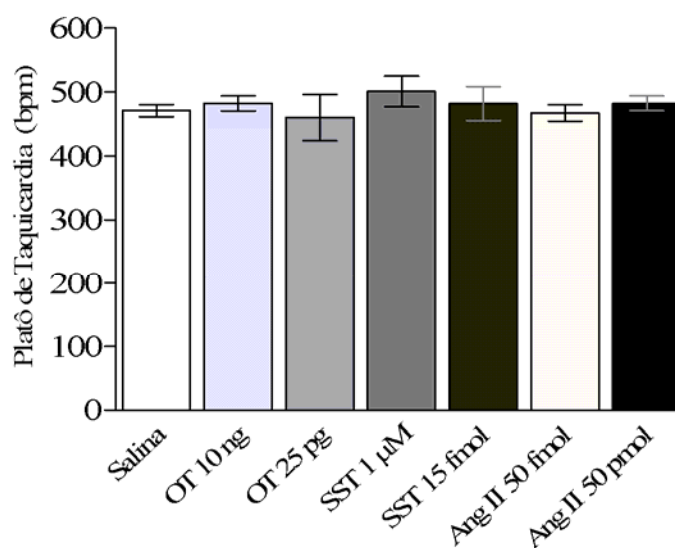


Figura 9 Médias (\pm DP) da variação da diferença do aumento da resposta máxima na frequência cardíaca (em bpm) induzida pelo decréscimo da pressão arterial (em mmHg; platô de taquicardia, Pt) obtidas após microinjeção na amígdala medial póstero-dorsal de ratos com salina (0,3 μ l; n = 8), ocitocina (OT) nas doses de 10 ng/0,3 μ l (n = 7) e de 25 pg/0,3 μ l (n = 6), somatostatina (SST) nas doses de 1 μ M/0,3 μ l (n = 8) e de 15 fmol/0,3 μ l (n = 5) e angiotensina II (Ang II) nas doses de 50 fmol/0,3 μ l (n = 7) e de 50 pmol/0,3 μ l (n = 7). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

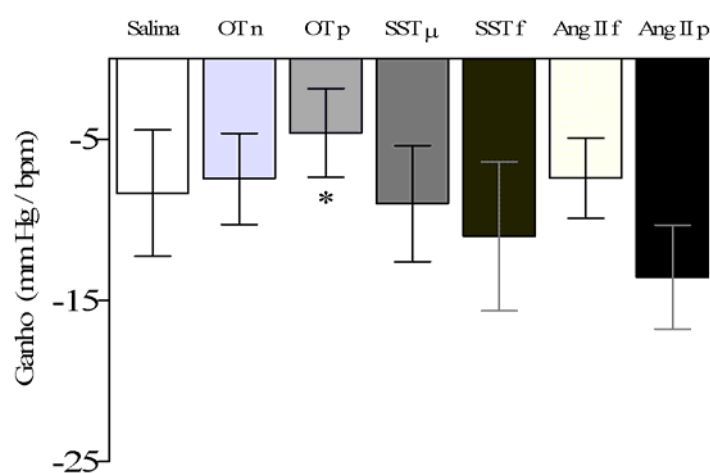


Figura 10 Médias (\pm DP) da variação da sensibilidade média do barorreflexo (Ganho bpm/mmHg) obtidas após microinjeção na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos com salina (0,3 μ l; n = 8), ocitocina (Ot n e p) nas doses de 10 ng/0,3 μ l (n = 7) e de 25 pg/0,3 μ l (n = 6), somatostatina (SST μ e f) nas doses de 1 μ M/0,3 μ l (n = 8) e de 15 fmol/0,3 μ l (n = 5) e angiotensina II (Ang II f e p) nas doses de 50 fmol/0,3 μ l (n = 7) e de 50 pmol/0,3 μ l (n = 7).

* p < 0,05 quando comparado com o valor obtido após microinjeção de angiotensina II na dose de 50 fmol.

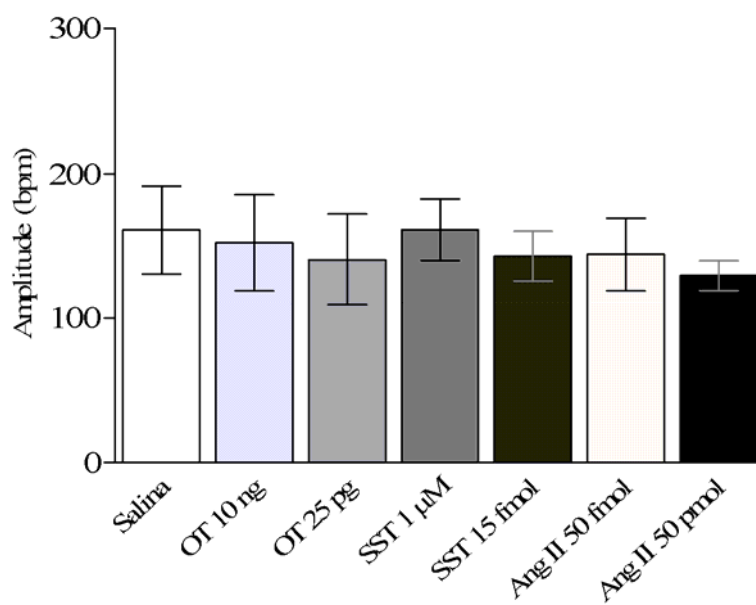


Figura 11 Médias (\pm DP) da variação da amplitude da frequência cardíaca (em bpm), durante o reflexo barorreceptor (Ganho) obtidas após microinjeção na amígdala medial pósterodorsal de ratos com salina (0,3 μ l; n = 8), ocitocina (OT) nas doses de 10 ng/0,3 μ l (n = 7) e de 25 pg/0,3 μ l (n = 6), somatostatina (SST) nas doses de 1 μ M/0,3 μ l (n = 8) e de 15 fmol/0,3 μ l (n = 5) e angiotensina II (Ang II) nas doses de 50 fmol/0,3 μ l (n = 7) e de 50 pmol/0,3 μ l (n = 7). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

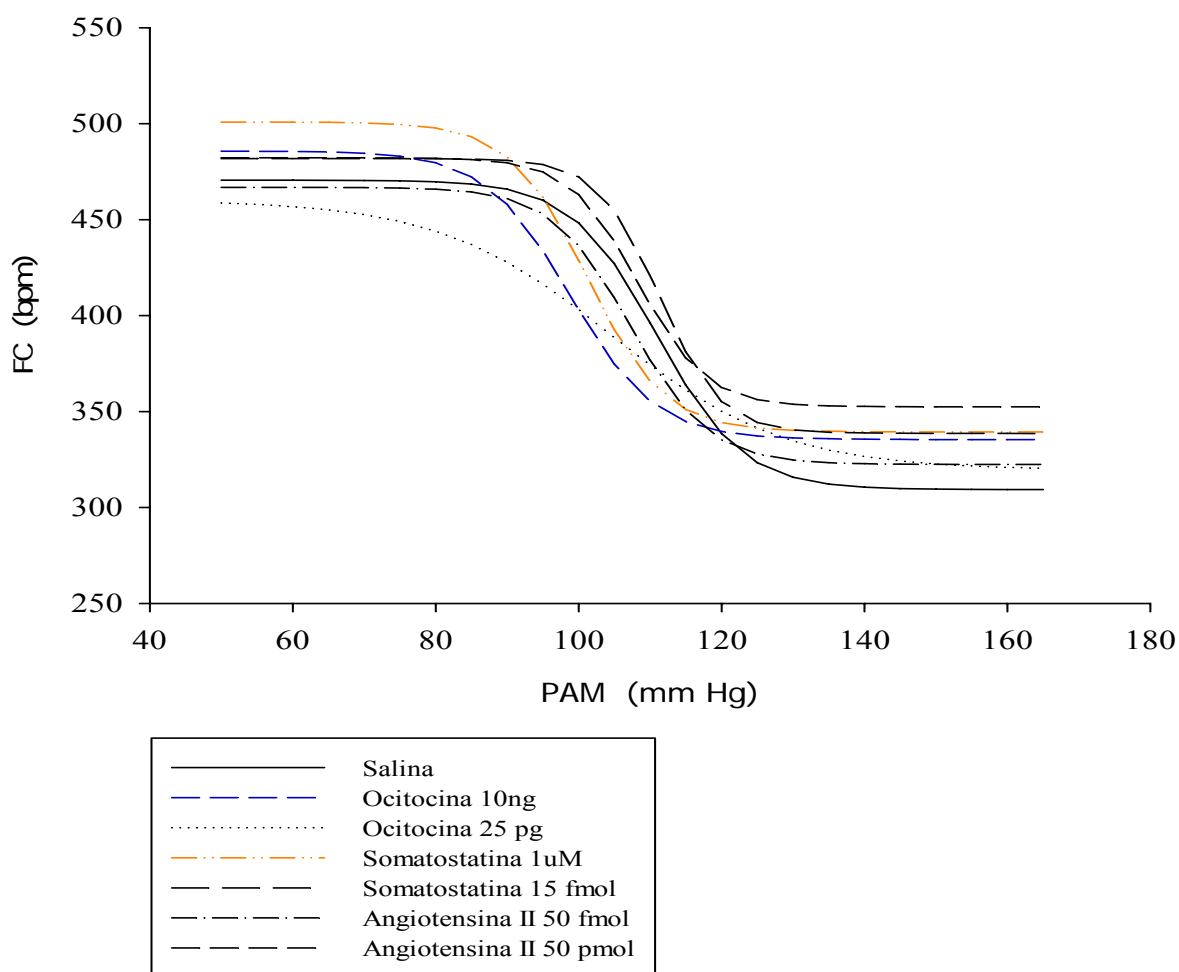


Figura 12 Curva da modificação da pressão arterial média (PAM em mmHg) de acordo com a variação da frequência cardíaca (FC em bpm) como teste da resposta reflexa mediada pelos barorreceptores após microinjeção na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos de salina (0,3 μ l; n = 8), ocitocina nas doses de 10 ng/0,3 μ l (n = 7; em azul) e de 25 pg/0,3 μ l (n = 6), somatostatina nas doses de 1 μ M/0,3 μ l (n = 8; em vermelho) e de 15 fmol/0,3 μ l (n = 5) e angiotensina II nas doses de 50 fmol/0,3 μ l (n = 7) e de 50 pmol/0,3 μ l (n = 7). Houve diferença estatisticamente significativa entre o aumento promovido pela ocitocina na dose de 10 ng e somatostatina na dose de 1 μ M em relação à salina, como controle ($p < 0,01$). Observe-se os deslocamentos para a direita na curvas relacionados aos resultados da ocitocina na dose de 10 ng e somatostatina na dose de 1 μ M que, para um mesmo valor de FC, geram mais resposta de PAM.

Medição	Salina (7)	OT 10 ng (6)	OT 25 pg (6)	SST 1 μ M (8)	SST 15 fmol (5)	Ang II 50 pmol (7)
HRV, ms ²	13.35 \pm 4.18	29.34 \pm 9.57	46.75 \pm 18.71*	49.80 \pm 16.90*	58.81 \pm 39.59*	50.78 \pm 22.23*
f _{LF} , Hz	0.54 \pm 0.10	0.50 \pm 0.10	0.51 \pm 0.12	0.45 \pm 0.10	0.42 \pm 0.07	0.56 \pm 0.10
LF, ms ²	0.49 \pm 0.26	1.51 \pm 0.89	6.48 \pm 6.21*	3.04 \pm 2.62	5.70 \pm 4.88	3.80 \pm 3.59
LF, NU	9.24 \pm 3.55	13.45 \pm 6.41	15.53 \pm 6.63	19.66 \pm 8.17*	22.38 \pm 11.86*	14.46 \pm 7.66
f _{HF} , Hz	1.84 \pm 1.37	1.87 \pm 10.95*	1.76 \pm 151	1.70 \pm 1.68	1.67 \pm 1.21	1.65 \pm 1.29
HF, ms ²	4.68 \pm 2.01	11.59 \pm 10.64*	30.16 \pm 25.36	12.22 \pm 5.81	17.02 \pm 5.69	24.98 \pm 22.46
HF, NU	87.38 \pm 5.12	80.76 \pm 12.09	84.39 \pm 6.67	80.31 \pm 8.16	77.62 \pm 11.86	84.11 \pm 8.02
LF/HF	0.11 \pm 0.04	0.18 \pm 0.11	0.19 \pm 0.09	0.26 \pm 0.13	0.32 \pm 0.25	0.18 \pm 0.11
APV, mmHg ²	8.84 \pm 3.48	20.16 \pm 10.70	10.54 \pm 5.89	15.80 \pm 8.82	12.32 \pm 5.98	17.46 \pm 12.55
VLF, mmHg ²	5.78 \pm 4.09	11.07 \pm 8.76	3.62 \pm 2.84	8.90 \pm 9.22	8.71 \pm 7.13	10.13 \pm 12.49
LF, mmHg ²	1.72 \pm 0.77	5.78 \pm 3.31	4.04 \pm 3.18	4.20 \pm 3.16	2.73 \pm 1.79	3.60 \pm 1.93
HF, mmHg ²	1.33 \pm 0.43	3.24 \pm 2.38	2.86 \pm 3.26	2.70 \pm 1.02	0.88 \pm 0.36	2.29 \pm 2.06
Alpha index, ms/mmHg	0.53 \pm 0.11	0.53 \pm 0.14	1.16 \pm 0.52	1.09 \pm 0.79	1.56 \pm 0.65*	1.29 \pm 0.93

Tabela 1 – Os valores são médias \pm D.P. Parâmetros da análise espectral foram calculados a partir de dados cardiovascular de ratos que compuseram seis grupos experimentais (os números entre parênteses correspondem ao "n" em cada um deles) que receberam diferente microinjeções na amígdala medial pósterio dorsal. Grupos: solução salina (0,3 μ l; n=7), ocitocina (OT) nas doses de 10 ng/0,3 μ l (n=6) e de 25 pg/0,3 μ l (n=6), somatostatina (SST) nas doses de 1 μ M/0,3 μ l (n=8) e de 15 fmol/0,3 μ l (n=5) e angiotensina II (AngII) na dose de 50 pmol (n=7), HRV, variabilidade frequência cardíaca; fLF, variabilidade do componente de baixa frequência; fHF, variabilidade do componente de alta frequência; VLF, variabilidade de baixa frequência; LF, componente de baixa frequência; HF, componente de alta frequência; SBPV, variabilidade da pressão arterial sistólica. * P<0,05 versus salina (ANOVA de uma via e o teste *post hoc* de Newman-Keuls).

Medição	Salina (7)	OT 10 ng (6)	OT 25 pg (6)	SST 1 μ M (8)	SST 15 fmol (5)	Ang II 50 fmol (7)
Entropia						
0V padrão	15.71 \pm 5.28	24.06 \pm 12.49	25.42 \pm 19.05	24.29 \pm 8.91	21.30 \pm 4.85	22.19 \pm 8.16
1V padrão	44.39 \pm 3.78	38.86 \pm 6.74	41.71 \pm 5.05	44.60 \pm 5.84	45.95 \pm 4.39	43.04 \pm 4.50
2LV padrão	7.92 \pm 4.45	4.96 \pm 3.47	6.67 \pm 7.97	5.13 \pm 2.49	7.24 \pm 3.26	11.23 \pm 4.45
2UV padrão	36.85 \pm 6.94	32.12 \pm 9.71	26.21 \pm 10.64	26.00 \pm 10.52	25.51 \pm 5.33	24.96 \pm 6.50*

Tabela 2 – Os valores são médias \pm D.P. Parâmetros de análise simbólica foram calculados a partir da amostra de dados cardiovasculares de ratos que receberam diferente microinjeções na amígdala medial pósterio dorsal. Grupos: solução salina (0,3 μ l; n=7), ocitocina (OT) nas doses de 10 ng/0,3 μ l (n=6) e de 25 pg/0,3 μ l (n=6), somatostatina (SST) nas doses de 1 μ M/0,3 μ l (n=8) e de 15 fmol/0,3 μ l (n=5) e angiotensina II (AngII) na dose de 50 pmol (n=7). * P<0,05 versus salina (ANOVA de uma via e o teste *post hoc* de Newman-Keuls).

11 DISCUSSÃO

É notável que a OT, a SST e a Ang II encontram-se presentes em áreas do SN sabidamente envolvidas com o controle direto dos sistemas simpático e parassimpático, pelo controle da inervação renal, ou com o controle neuroendócrino, via liberação de vasopressina, relacionado com a regulação da atividade cardiovascular. Um desses locais é, claramente, a ACe (STEELE *et al.*, 1983; STEELE *et al.*, 1985; REUBI *et al.*, 1985; UHL *et al.*, 1985; PHILLIPS, 1987; FRANCI *et al.*, 1990; WRIGHT & HARDING, 1992; KREMARIK *et al.*, 1993; CONDES-LARA *et al.*, 1994; SCHINDLER *et al.*, 1996; DORNELLES & FRANCI, 1998; DUMONT *et al.*, 1999; SCHINDLER *et al.*, 1999; GIMPL & FAHRENHOLZ *et al.*, 2001; BREIGEIRON *et al.*, 2002; MANTELLA *et al.*, 2003; PAN, 2004; DONADIO *et al.*, 2004; CONDES-LARA *et al.*, 2009; DONADIO *et al.*, 2009; CECCONELLO *et al.*, 2010), mas também chama muita a atenção que o MeA seja local onde ocorre mais síntese de OT, SST e Ang II no complexo amigdaliano (STEELE *et al.*, 1983; STEELE *et al.*, 1985; REUBI *et al.*, 1985; UHL *et al.*, 1985; PHILLIPS, 1987; FRANCI *et al.*, 1990; WRIGHT & HARDING, 1992; KREMARIK *et al.*, 1993; CONDES-LARA *et al.*, 1994; SCHINDLER *et al.*, 1996; DORNELLES & FRANCI, 1998; DUMONT *et al.*, 1999; SCHINDLER *et al.*, 1999; GIMPL & FAHRENHOLZ *et al.*, 2001; BREIGEIRON *et al.*, 2002; MANTELLA *et al.*, 2003; PAN, 2004; DONADIO *et al.*, 2004; CONDES-LARA *et al.*, 2009; DONADIO *et al.*, 2009; CECCONELLO *et al.*, 2010).

O presente estudo revelou que quando comparados os sete grupos experimentais aqui estudados após microinjeção de neuropeptídeos no AMePD, não houve diferença estatística entre os grupos nos valores de FC, PA sistólica, PA diastólica e PA média em situação basal

ou após as diferentes microinjeções. Para a modulação do quimiorreflexo nos grupos de animais microinjetados com salina, OT nas doses de 10 ng e 25 pg, SST nas doses de 1 μ M e 15 fmol e Ang II nas doses de 50 fmol e 50 pmol, os valores mais próximos do basal foram obtidos com a menor dose de KCN (60 μ g/kg) e ocorreu uma redução estatisticamente significativa maior na FC quando foram aumentadas as doses injetadas de KCN para 100 μ g/kg, 140 μ g/kg ou 180 μ g/kg quando comparadas com a menor dose injetada. Essas 3 maiores doses produziram respostas similares entre si. Ang II na dose de 50 pmol no AMePD gerou maior diminuição reflexa na FC quando comparado com o grupo controle após a estimulação dos quimiorreceptores com KCN nas doses de 60 e 140 μ g/kg ($p < 0,05$). Os valores referentes ao ponto de maior inclinação da curva pressórica referente à resposta gerados pelos barorreceptores, (PA_{50}), após injeções de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, foram menores nos ratos que receberam OT na dose de 10 ng e na SST na dose de 1 μ M quando comparado ao grupo controle. Os valores referentes à sensibilidade média do barorreflexo (ganho em bpm/mmHg), após injeções de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, foi maior no grupo que recebeu OT na dose de 10 ng quando comparado com a Ang II na dose de 50 pmol. Houve maior variabilidade na PA sistólica, na FC, no componente de baixa e de alta frequência do tacograma e no índice de atividade simpático-vagal nos grupos que receberam OT nas doses de 10 ng e 25 pg, SST nas doses de 1 μ M e 15 fmol e Ang II na dose de 50 pmol. Estes resultados indicam que o AMePD pode modular os reflexos dos barorreceptores e dos quimiorreceptores e ampliar suas escalas para ajustar as respostas homeostáticas para as necessidades dos animais, provavelmente durante a execução de um comportamento social pretendido (explicação adicional em RASIA-FILHO, 2006). Nisso o AMePD pode contribuir para a coordenação das respostas simpáticas e parassimpáticas durante o comportamento em curso, o que poderia auxiliar para que o animal tivesse um mecanismo dinâmico de controle cardiovascular adequado para a exibição de

comportamentos sociais, em que o AMePD é um componente relevante nos circuitos do encéfalo e de maneira integrada (NEWMAN, 1999; RASIA-FILHO *et al.*, 2008). Os presentes resultados sugerem um papel relevante para a OT, a SST e a Ang II no AMePD no controle neural da atividade cardiovascular em ratos. É muito importante e cabe ressaltar que a OT na dose de 25 pg, a SST na dose de 15 fmol e a Ang II na dose de 50 fmol estão dentro de uma faixa fisiológica encontrada no SN central de ratos (KOVACS *et al.*, 1979; HERMAN *et al.*, 1984; HARDING & FELIX, 1987; PHILLIPS, 1987; ISHIZUKA *et al.*, 1993; RADKE *et al.*, 1993; RAKOVSKA *et al.*, 2002; PAN, 2004; CONSIGLO *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2005), enquanto a OT na dose de 10 ng, SST na dose de 1 μ M e Ang II na dose de 50 pmol representam quantidades que, em princípio, somente podem ser obtidas farmacologicamente (KOVACS *et al.*, 1979; HERMAN *et al.*, 1984; HARDING & FELIX, 1987; PHILLIPS, 1987; ISHIZUKA *et al.*, 1993; RADKE *et al.*, 1993; RAKOVSKA *et al.*, 2002; PAN, 2004; CONSIGLO *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2005). Se esta concentração maior pode igualmente ser obtida em ratos em diferentes condições fisiológicas ou em local no SN central que tenham grande inervação ocitocinérgica, somatostatinérgica e angiotensinérgica ainda precisa ser determinado.

Os efeitos induzidos por diferentes microinjeções de neuropeptídeos no AMePD sugerem que este subnúcleo contribui mais para mudanças fásica dos reflexos cardiovasculares em vez de níveis basais de FC ou PA. Esses dados sugerem que os neurônios envolvidos nos reflexos cardiovasculares do AMePD são sensíveis a diferentes neuropeptídeos, provavelmente representando codificações distintas, entradas sinápticas específicas para a "sintonia fina" do sistema cardiovascular. Além disso, é importante considerar que ações dos neuropeptídeos no AMePD dependem da sua concentração no espaço extracelular e da rede neuroglial local, os quais podem ser dinamicamente afetados pela atividade sináptica. Liberação concomitante de neurotransmissores principais juntamente

com neuromoduladores depende do padrão de ativação e concentração de cálcio dentro dos terminais pré-sinápticos dos axônios, e ativação tônica ou fásica por entradas intra-amígdalianas ou extra-amígdala, como explicado inicialmente para a ACe (PARÉ *et al.*, 2003).

Já está bem descrito que diversas vias neurais aferentes e eferentes do encéfalo são capazes de modificar a atividade cardiovascular ao mesmo tempo em que compõem circuitos envolvidos com reflexos somáticos e viscerais e geram atividade integrada comportamental (como revisado em ALMEIDA *et al.*, 2004; DALL'AGO *et al.*, 2003; RASIA-FILHO *et al.*, 2004b; QUAGLIOTTO *et al.*, 2008). Experimentos em ratos acordados têm demonstrado que a estimulação elétrica de diferentes regiões do complexo amigdaliano resulta em um aumento na FC e na PA, enquanto em ratos anestesiados obtém-se uma diminuição da FC e da PA (REIS & OLIPHANT, 1964; GALENO & BRODY, 1983; FRISINGER *et al.*, 1984; GELSEMA *et al.*, 1987; IWATA *et al.*, 1987; CECHETTO & GELB, 2001). Vale ressaltar que, embora a duração e a concentração das drogas atingindo áreas encefálicas podem variar substancialmente em diferentes experimentos, os efeitos cardiovasculares presentes foram encontrados cinco minutos após cada microinjeção e ao longo do período de registro das variáveis de interesse, o que indica efeitos duradouros da OT, da SST e da Ang II como uma particularidade da AMePD. Em conjunto, esses novos achados indicam que a Ang II promove uma ativação simpática central e ajustes reflexos e que a OT e a SST modulam a atividade parassimpática central quando microinjetados no AMePD de rato. É relevante que nos núcleos amigdalianos a SST pode funcionar como um neurotransmissor inibitório já que microinjeções na dose de 1µM diretamente na amígdala de forma ampla preveniu a propagação de convulsões (HIGUCHI *et al.*, 1986). Os efeitos neuromoduladores da SST são na sua maioria pré-sináptica (LANNEAU *et al.*, 2000a; b; BARABAN & TALLENT, 2004; GRILLI *et al.*, 2004). Como por exemplo, a SST inibe a liberação pré-sináptica de GLU (LANNEAU *et al.*,

2000a; b; BARABAN & TALLENT, 2004; GRILLI *et al.*, 2004), ativando os canais de potássio (BARABAN & TALLENT, 2004) ou inibindo as correntes dos canais dependentes de voltagem de cálcio (BARABAN & TALLENT, 2004), via receptor sst1 (ZABORSZKY, 2002; MOMIYAMA & ZABORSZKY, 2006), sst2 (GRILLI *et al.*, 2004) ou sst5, dependendo da área estudada (BARABAN & TALLENT, 2004). No MeA, a SST exerce ação inibitória, atuando diretamente sobre seus receptores ou indiretamente envolvendo sinapses GABAérgicas via receptor GABA_A. Isso sugere um papel complexo para a SST no AMePD, podendo ser direto ou indireto o que necessita de estudos adicionais.

Os resultados obtidos no presente estudo não só acrescentam-se a informações prévias, mas também confirmam a necessidade de ser dada uma maior importância para a contribuição das atividades ocitocinérgicas, somatostatinérgicas e angiotensinérgica no AMePD no controle cardiovascular. Há, no entanto, a necessidade de se determinar se esses neuropeptídeos atuam como tal e/ou devido as suas interrelações funcionais com outros neurotransmissores e neuromoduladores no AMePD. Da mesma forma, é preciso estabelecer se no AMePD os receptores peptidérgicos também atuam como receptores pós-sinápticos com propriedades funcionais diferentes daquelas descritas até o momento nos núcleos hipotalâmicos e no complexo amigdaliano. Ou ainda, se tais receptores peptidérgicos podem modular a liberação de outras substâncias que afetam o controle neural da FC e da PA diretamente no AMePD. Embora fuja ao escopo inicial desta tese, são todos esses dados importantes que estão relacionados aos presentes achados e que abrem temas para investigações futuras.

Os quimiorreceptores arteriais respondem a variações da PaO₂, da PaCO₂ e/ou do pH desencadenando respostas homeostáticas dos sistemas cardiovascular e respiratório para corrigir essas variações. As respostas cardiovasculares caracterizam-se por aumento da resistência periférica em decorrência da ativação do sistema simpático e alterações na FC

caracterizadas por bradicardia, mas aumentando a resposta simpática e parassimpática de contração miocárdica. As respostas cardiovasculares ao quimiorreflexo ainda não tinham sido analisados em animais microinjetados com OT, SST ou Ang II no AMePD de ratos não anestesiados. No presente estudo, é preciso destacar que os valores de FC após injeção de diferentes doses de KCN (para testar a resposta reflexa cardiovascular relacionada com os quimiorreceptores) indicam que houve diferença estatisticamente significativa nos dados após microinjeção das substâncias estudadas no AMePD. Dados atuais reforçam que a AMePD modula informações fásica de respostas reflexas cardiovasculares (QUAGLIOTTO *et al.*, 2008). Esta área do encéfalo é relevante para a regulação central da sensibilidade do barorreflexo e pode promover respostas seletivas, ou seja, Ang II no AMePD evoca um aumento da modulação simpática central do sistema cardiovascular enquanto OT e SST levou a um aumento na variabilidade da FC associado ao controle central parassimpático em ratos acordados (RASIA-FILHO, 2006; QUAGLIOTTO *et al.*, 2008). Novos esforços podem adicionar à presente contribuição testando-se os receptores centrais e periféricos para o equilíbrio simpático-vagal envolvido com esses resultados.

Portanto, o AMePD não deve ser incluído apenas em redes subcorticais para a modulação de comportamentos emocionais e sociais, mas também nas respostas cardiovasculares em ratos acordados. Como hipotetizado anteriormente (QUAGLIOTTO *et al.*, 2008), o AMePD pode modular os reflexos dos barorreceptores e dos quimiorreceptores e ampliar suas escalas para ajustar as respostas homeostáticas para as necessidades dos animais durante a execução de um comportamento pretendido (explicação adicional em RASIA-FILHO, 2006). Daí o AMePD pode contribuir para a coordenação das respostas simpáticas e parassimpáticas durante o comportamento em curso. Ou seja, é muito plausível considerar que para a ocorrência adequada dos mais diversos comportamentos, além do que está sendo feito em repouso, as variáveis orgânicas mobilizadas possam apresentar-se com maior variabilidade

do que a encontrada em animais sedados. Com isso não haveria uma limitação para a execução de comportamentos relevantes para a sobrevivência do animal e da espécie, dada por uma limitação nas variáveis orgânicas mobilizadas conjuntamente antes de seus próprios limites. O limite máximo poderia passar agora a ser outro maior, mas ainda guardado o cuidado de evitar dano ao organismo (RASIA-FILHO, 2006). Assim, maior variabilidade nas respostas de FC e da PA, expandindo seus máximos e mínimos valores após atuação de barorreceptores e quimiorreceptores, podem ocorrer para permitir que comportamentos possam ser executados plenamente pelo animal. Isso foi descrito anteriormente para a histamina (QUAGLIOTTO *et al.*, 2008) e expande-se agora esse conhecimento analisando a interpretação dos resultados dos neuropeptídeos microinjetados no AMePD com as respostas geradas pelo GLU e GABA nessa mesma estrutura.

12 CONCLUSÃO

Os dados indicam que o AMePD é região encefálica relevante para o controle central cardiovascular, principalmente na modulação das respostas reflexas dos barorreceptores e dos quimiorreceptores em ratos.

Tais dados indicam que o AMePD se vale de sua atividade glutamatérgica, GABAérgica, angiotensinérgica, ocitocinérgica e somatostatinérgica para modificar variáveis cardiovasculares, não em condição basal, mas preferentemente ampliando os limites de atuação dos reflexos mediados por barorreceptores e quimiorreceptores, modulando a atividade central dos sistemas simpático e parassimpático em ratos não anestesiados.

Nas doses empregadas, a microinjeção local de GLU foi capaz de reduzir a sensibilidade média do barorreflexo promovendo uma ativação simpática cardíaca e vascular enquanto o GABA foi capaz de modular esse reflexo por ação parassimpática. Nisso, o GLU e o GABA promoveram um maior variabilidade nas resposta de FC e da PA mudando seus valores máximos e mínimos após ativação barorreflexa.

Já a modulação da atividade cardiovascular causada por neuropeptídeos microinjetados no AMePD indica que a Ang II gerou uma diminuição reflexa na FC após a estimulação do quimiorreflexo, com maior aumento na variabilidade da FC, da PAS, do componente LF/HF, e do índice simpato-vagal. A OT gerou uma diminuição reflexa na PAM após a estimulação do barorreflexo, com maior aumento na variabilidade da FC, da PAS, do componente LF/HF, e do índice simpato-vagal. E a SST promoveu aumento na variabilidade da FC, da PAS, do componente LF/HF, e do índice simpato-vagal. Os efeitos induzidos por

diferentes microinjeções de neurotransmissores / neuropeptídeos no AMePD sugerem que este subnúcleo contribui mais para mudanças fásica dos reflexos cardiovasculares em vez de níveis basais de FC ou PA. Estes dados sugerem que os neurônios envolvidos nos reflexos cardiovasculares do AMePD são sensíveis a diferentes neurotransmissores, provavelmente codificações distintas, entradas sinápticas específicas para a "sintonia fina" do sistema cardiovascular.

O presente trabalho reforça que o AMePD é relevante para a regulação central das respostas barorreflexas e quimiorreflexas cardiovasculares através da promoção de respostas seletivas de acordo com o neurotransmissor / neuromodulador atuando nesta área do encéfalo. Este é um importante campo de pesquisa aberto a novas contribuições. Esforço adicional é necessário para expandir os resultados apresentados pelo teste com outros receptores centrais, e suas interações, e a atividade simpático-vagal periférica. Além disso, é importante considerar que ações dos neurotransmissor / neuropeptídeo no AMePD dependem da sua concentração no espaço extracelular e da rede neuro-glial local, que pode ser dinamicamente afetados pela atividade sináptica integrada. Liberação concomitante de neurotransmissores principais juntamente com neuromoduladores depende do padrão de ativação e concentração de cálcio dentro dos terminais pré-sináptico dos axônios, e ativação tônica ou fásica por entradas intra-amígdala ou extra-amígdala.

13 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente estudo não só acrescentam-se a informações prévias, mas também confirmam a necessidade de ser dada uma maior importância para a contribuição das atividades ocitocinérgicas, somatostatinérgicas e angiotensinérgicas no AMePD no controle cardiovascular. Há, no entanto, a necessidade de se determinar se esses neuropeptídeos atuam como tal e/ou devido as suas interrelações funcionais com outros neurotransmissores e neuromoduladores no AMePD. Da mesma forma, é preciso estabelecer se no AMePD os receptores peptidérgicos também atuam como receptores pós-sinápticos com propriedades funcionais diferentes daquelas descritas até o momento nos núcleos hipotalâmicos e no complexo amigdalóide. Ou ainda, se tais receptores peptidérgicos podem modular a liberação de outras substâncias que afetam o controle neural da FC e da PA diretamente no AMePD. Embora fuja ao escopo inicial desta tese, são todos esses dados importantes que estão relacionados aos presentes achados e que abrem temas para investigações futuras.

Dando continuidade a este estudo, cabe salientar, que existem vários outros neuropeptídeos e neurotransmissores que podem serem microinjetados diretamente no AMePD e que podem modular de uma forma ou outra a atividade cardiovascular.

14 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R., *et al.* Role of NMDA receptors in the lateralized potentiation of amygdala afferent and efferent neural transmission produced by predator stress. **Physiol Behav**, v.86, n.1-2, p.75-91. Sep 15, 2005 a.

_____. Long lasting effects of predator stress on pCREB expression in brain regions involved in fearful and anxious behavior. **Behav Brain Res**, v.221, n.1, p.118-33. Aug 1, 2011 a.

_____. Dendritic morphology of amygdala and hippocampal neurons in more and less predator stress responsive rats and more and less spontaneously anxious handled controls. **Behav Brain Res**, v.226, n.1, p.133-146. Sep 12, 2011b.

_____. Anxiolytic and anxiogenic effects of kindling--role of baseline anxiety and anatomical location of the kindling electrode in response to kindling of the right and left basolateral amygdala. **Behav Brain Res**, v.159, n.1, p.73-88. Apr 15, 2005 b.

_____. The effect of kindling of different nuclei in the left and right amygdala on anxiety in the rat. **Physiol Behav**, v.55, n.1, p.1-12. Jan, 1994.

AGGLETON, J. P., *et al.* Effects of amygdaloid and amygdaloid-hippocampal lesions on object recognition and spatial working memory in rats. **Behav Neurosci**, v.103, n.5, p.962-74. Oct, 1989.

AHMED, T., *et al.* An N-methyl-D-aspartate-receptor dependent, late-phase long-term depression in middle-aged mice identifies no GluN2-subunit bias. **Neuroscience**, v.185, p.27-38. Jun 30, 2011.

ALHEID, G. F., *et al.* Amygdala and extended amygdala. **The Rat Nervous System**, v.San Diego: Academic Press, p.495-598, 1995.

ALLEN, J. P. & C. F. ALLEN. Role of the amygdaloid complexes in the stress-induced release of ACTH in the rat. **Neuroendocrinology**, v.15, n.3-4, p.220-30, 1974.

ALLEN MOUSE BRAIN ATLAS. ALLEN MOUSE BRAIN ATLAS [Internet]. Seattle (WA): **Allen Institute for Brain Science**. ©2009. Available from: <http://mouse.brain-map.org>.

ALMAGUER-MELIAN, W., *et al.* Basolateral amygdala stimulation does not recruit LTP at depotentiated synapses. **Physiol Behav**, v.101, n.4, p.549-53. Nov 2, 2010.

ALMEIDA, T. F., *et al.* Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v.1000, n.1-2, p.40-56. Mar 12, 2004.

AMBROZ, C., *et al.* The mas oncogene enhances angiotensin-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. **Biochim Biophys Acta**, v.1133, n.1, p.107-11. Dec 3, 1991.

AMICO, J. A., *et al.* Anxiety and stress responses in female oxytocin deficient mice. **J Neuroendocrinol**, v.16, n.4, p.319-24. Apr, 2004 a.

_____. Centrally administered oxytocin elicits exaggerated grooming in oxytocin null mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v.78, n.2, p.333-9. Jun, 2004 b.

_____. Oxytocin knockout mice: a model for studying stress-related and ingestive behaviours. **Prog Brain Res**, v.170, p.53-64, 2008 a.

_____. Corticosterone release in oxytocin gene deletion mice following exposure to psychogenic versus non-psychogenic stress. **Neurosci Lett**, v.442, n.3, p.262-6. Sep 19, 2008 b.

ANDRADE-FRANZE, G. M., *et al.* Lesions in the central amygdala impair sodium intake induced by the blockade of the lateral parabrachial nucleus. **Brain Res**, v.1332, p.57-64. May 21, 2010 a.

_____. Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake. **Neuroscience**, v.165, n.3, p.633-41. Feb 3, 2010 b.

ANDRUS, B. M., *et al.* Gene expression patterns in the hippocampus and amygdala of endogenous depression and chronic stress models. **Mol Psychiatry**. Nov 16, 2010.

ANTUNES-RODRIGUES, J., *et al.* Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev**, v.84, n.1, p.169-208. Jan, 2004.

_____. The neuroendocrine control of atrial natriuretic peptide release. **Mol Psychiatry**, v.2, n.5, p.359-67. Sep, 1997.

AOURZ, N., *et al.* Rat hippocampal somatostatin sst(3) and sst(4) receptors mediate anticonvulsive effects in vivo: Indications of functional interactions with sst(2) receptors. **Neuropharmacology**, v.61, n.8, p.1327-33. Dec, 2011.

ARANGUIZ-URROZ, P., *et al.* Differential participation of angiotensin II type 1 and 2 receptors in the regulation of cardiac cell death triggered by angiotensin II. **Am J Hypertens**, v.22, n.5, p.569-76. May, 2009.

ARNOLDA, L., *et al.* Amino acid neurotransmitters in hypertension. **Kidney Int Suppl**, v.37, p.S2-7. Jun, 1992.

AZMITIA, E. C. & M. SEGAL. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **J Comp Neurol**, v.179, n.3, p.641-67. Jun 1, 1978.

AVERILL, D. B. & D. I. DIZ. Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. **Brain Res Bull**, v.51, n.2, p.119-28. Jan 15, 2000.

BACCIOTTINI, L., *et al.* Endogenous histamine in the medial septum-diagonal band complex increases the release of acetylcholine from the hippocampus: a dual-probe microdialysis study in the freely moving rat. **Eur J Neurosci**, v.15, n.10, p.1669-80. May, 2002.

BADER, M. Molecular interactions of vasoactive systems in cardiovascular damage. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.38 Suppl 2, p.S7-9. Nov, 2001 a.

_____. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. **J Mol Med (Berl)**, v.79, n.2-3, p.76-102. Apr, 2001b.

BALES, K. L., *et al.* Are behavioral effects of early experience mediated by oxytocin? **Front Psychiatry**, v.2, p.24, 2011.

BANDLER, R., *et al.* Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Res Bull**, v.53, n.1, p.95-104. Sep 1, 2000.

BARABAN, S. C. & M. K. TALLENT. Interneuron Diversity series: Interneuronal neuropeptides--endogenous regulators of neuronal excitability. **Trends Neurosci**, v.27, n.3, p.135-42. Mar, 2004.

BEAULIEU, S., *et al.* Control of ACTH secretion by the central nucleus of the amygdala: implication of the serotonergic system and its relevance to the glucocorticoid delayed negative feedback mechanism. **Neuroendocrinology**, v.44, n.2, p.247-54, 1986.

_____. Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin secretion to immobilization stress: opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic systems. **Neuroendocrinology**, v.45, n.1, p.37-46. Jan, 1987.

BENABE, J. E. & M. MARTINEZ-MALDONADO. The impact of malnutrition on kidney function. **Miner Electrolyte Metab**, v.24, n.1, p.20-6, 1998.

BEN-ARI, Y., *et al.* Histamine synthesizing afferents within the amygdaloid complex and bed nucleus of the stria terminalis of the rat. **Brain Res**, v.138, n.2, p.285-94. Dec 16, 1977 a.

_____. Regional distribution of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase within the amygdaloid complex and stria terminalis system. **Brain Res**, v.120, n.3, p.435-44. Jan 28, 1977 b.

BENNETT, C., *et al.* Depletion of adrenal catecholamines alters the amnesic effect of amygdala stimulation. **Behav Brain Res**, v.15, n.2, p.83-91. Apr, 1985.

BENOIT, R., *et al.* Presence of somatostatin-28-(1-12) in hypothalamus and pancreas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.79, n.3, p.917-21. Feb, 1982 a.

_____. Seven peptides derived from pro-somatostatin in rat brain. **Biochem Biophys Res Commun**, v.107, n.3, p.944-50. Aug, 1982 b.

_____. Somatostatin-28(1-12)-like immunoreactivity in the rat. **Endocrinology**, v.111, n.6, p.2149-51. Dec, 1982 c.

BLAKE, C. B. & M. MEREDITH. Selective enhancement of main olfactory input to the medial amygdala by GnRH. **Brain Res**, v.1317, p.46-59. Mar 4, 2010.

_____. Change in number and activation of androgen receptor-immunoreactive cells in the medial amygdala in response to chemosensory input. **Neuroscience**, v.190, p.228-38. Sep 8, 2011.

BLANCHARD, D. C. & R. J. BLANCHARD. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **J Comp Physiol Psychol**, v.81, n.2, p.281-90. Nov, 1972.

BOLHUIS, J. J., *et al.* The corticomedial amygdala and learning in an agonistic situation in the rat. **Physiol Behav**, v.32, n.4, p.575-9. Apr, 1984.

BOSCH, O. J., *et al.* Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. **J Neurosci**, v.25, n.29, p.6807-15. Jul 20, 2005.

_____. Maternal nurturing is dependent on her innate anxiety: the behavioral roles of brain oxytocin and vasopressin. **Horm Behav**, v.59, n.2, p.202-12. Feb, 2011.

BORMANN, J. FEIGENSPAN, A. GABAC receptors. **Trends Neurosci**, v.18, p.515-519, 1995.

_____. The 'ABC' of GABA receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.21, p.16-19, 2000.

BOWERY, N. G. GABAB receptor pharmacology. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**, v.33, p.109-147. May, 1993.

BRAGA, D. C., *et al.* Central oxytocin modulates exercise-induced tachycardia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.278, n.6, p.R1474-82. Jun, 2000.

BRAZEAU, P., *et al.* Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. **Science**, v.179, n.68, p.77-9. Jan 5, 1973.

BREIGEIRON, M. K., *et al.* Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. **Horm Behav**, v.41, n.3, p.267-74. May, 2002.

BRESSLER, S. C. & M. J. BAUM. Sex comparison of neuronal Fos immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. **Neuroscience**, v.71, n.4, p.1063-72. Apr, 1996.

BRODAL, A. **Neurological Anatomy**. Oxford University Press, New York. 1053, 1981.

BUIJS, R. M., *et al.* Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. **Cell Tissue Res**, v.186, n.3, p.423-33. Jan 31, 1978 a.

_____. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. **Cell Tissue Res**, v.192, n.3, p.423-35. Sep 26, 1978 b.

_____. Vasopressin and oxytocin: distribution and putative functions in the brain. **Prog Brain Res**, v.60, p.115-22, 1983 a.

_____. Vasopressin and oxytocin--their role in neurotransmission. **Pharmacol Ther**, v.22, n.1, p.127-41, 1983 b.

_____. The integration of stress by the hypothalamus, amygdala and prefrontal cortex: balance between the autonomic nervous system and the neuroendocrine system. **Prog Brain Res**, v.126, p.117-32, 2000.

BUPESH M, LEGAZ I, ABELLÁN A, MEDINA L. Multiple telencephalic and extratelencephalic embryonic domains contribute neurons to the medial extended amygdala. **J Comp Neurol** v.519, 1505-1525, 2011.

BURNSTOCK, G. Noradrenaline and ATP: cotransmitters and neuromodulators. **J Physiol Pharmacol**, v.46, n.4, p.365-84. Dec, 1995.

BURT, D.R. Reduzing GABA Receptors. **Life Sci**, v.73, p.1747-1758, 2003.

BUSH, D. E., *et al.* Beta-adrenergic receptors in the lateral nucleus of the amygdala contribute to the acquisition but not the consolidation of auditory fear conditioning. **Front Behav Neurosci**, v.4, p.154, 2010.

CAMPBELL, D. J. Angiotensin peptides in the brain. **Adv Exp Med Biol**, v.377, p.349-55, 1995 a.

_____. Angiotensin peptides in spontaneously hypertensive and normotensive Donryu rats. **Hypertension**, v.25, n.5, p.928-34. May, 1995 b.

_____. Central vasopressin and oxytocin receptor distributions in two species of singing mice. **J Comp Neurol**, v.516, n.4, p.321-33. Oct 1, 2009.

CANTERAS, N. S., *et al.* Neuroanatomy of anxiety. **Curr Top Behav Neurosci**, v.2, p.77-96, 2010.

_____. Connections of the posterior nucleus of the amygdala. **J Comp Neurol**, v.324, n.2, p.143-79. Oct 8, 1992.

_____. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **J Comp Neurol**, v.360, n.2, p.213-45. Sep 18, 1995.

CARRILLO, B., *et al.* Morphometrical and neurochemical changes in the anteroventral subdivision of the rat medial amygdala during estrous cycle. **Brain Res**, v.1150, p.83-93. May 30, 2007.

CARTER, C. S. Neuroendocrine perspectives on social attachment and love. **Psychoneuroendocrinology**, v.23, n.8, p.779-818. Nov, 1998.

CARVALHO-NETTO, E. F., *et al.* Sex differences in synaptic plasticity in stress-responsive brain regions following chronic variable stress. **Physiol Behav**, v.104, n.2, p.242-7. Aug 3, 2011.

CSABA, Z. & P. DOURNAUD. Cellular biology of somatostatin receptors. **Neuropeptides**, v.35, n.1, p.1-23. Feb, 2001 a.

_____. In vivo internalization of the somatostatin sst2A receptor in rat brain: evidence for translocation of cell-surface receptors into the endosomal recycling pathway. **Mol Cell Neurosci**, v.17, n.4, p.646-61. Apr, 2001 b.

_____. Plasticity of somatostatin and somatostatin sst2A receptors in the rat dentate gyrus during kindling epileptogenesis. **Eur J Neurosci**, v.19, n.9, p.2531-8. May, 2004.

CAVALCANTE, J. C., *et al.* Distribution of urocortin 3 neurons innervating the ventral premammillary nucleus in the rat brain. **Brain Res**, v.1089, n.1, p.116-25. May 17, 2006.

CAVALLERI, M. T., *et al.* Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.301, n.4, p.R958-66. Oct, 2011.

CECCONELLO, A. L., *et al.* Effect of acute stress on sexual behavior in female rats: participation of the central angiotensinergic system. **Behav Brain Res**, v.207, n.2, p.429-33. Mar 5, 2010.

CECHETTO, D. & A. W. GELB. The amygdala and cardiovascular control. **J Neurosurg Anesthesiol**, v.13, n.4, p.285-7. Oct, 2001.

COLEMAN, M. J.; DAMPNEY, R. A. L. Sympathoinhibition evoked from the caudal midline medulla is mediated by GABA receptors in the rostral VLM. **Am J of Physiol**, v.274, p.318-323. Mar, 1998.

CONDES-LARA, M., *et al.* Hypothalamospinal oxytocinergic antinociception is mediated by GABAergic and opiate neurons that reduce A-delta and C fiber primary afferent excitation of spinal cord cells. **Brain Res**, v.1247, p.38-49. Jan 9, 2009 a.

_____. Paraventricular hypothalamic oxytocinergic cells responding to noxious stimulation and projecting to the spinal dorsal horn represent a homeostatic analgesic mechanism. **Eur J Neurosci**, v.30, n.6, p.1056-63. Sep, 2009 b.

_____. Correlation between oxytocin neuronal sensitivity and oxytocin-binding sites in the amygdala of the rat: electrophysiological and histoautoradiographic study. **Brain Res**, v.637, n.1-2, p.277-86. Feb 21, 1994.

CONSIGLIO, A. R., *et al.* Effects of oxytocin microinjected into the central amygdaloid nucleus and bed nucleus of stria terminalis on maternal aggressive behavior in rats. **Physiol Behav**, v.85, n.3, p.354-62. Jun 30, 2005.

COOKE, B. M. & C. S. WOOLLEY. Gonadal hormone modulation of dendrites in the mammalian CNS. **J Neurobiol**, v.64, n.1, p.34-46. Jul, 2005a.

_____. Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. **J Neurosci**, v.25, n.46, p.10759-67. Nov 16, 2005b.

COUVE, A., MOSS, S. J., PANGALOS, M. N. GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. **Mol Cell Neurosci**, v.16, p.296-312. Jul, 2000.

CHEN, X. & J. HERBERT. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. **Neuroscience**, v.64, n.3, p.675-85. Feb, 1995.

CHOI, J. S., *et al.* The role of amygdala nuclei in the expression of auditory signaled two-way active avoidance in rats. **Learn Mem**, v.17, n.3, p.139-47. Mar, 2010.

COOLEN, L. M., *et al.* Demonstration of ejaculation-induced neural activity in the male rat brain using 5-HT1A agonist 8-OH-DPAT. **Physiol Behav**, v.62, n.4, p.881-91. Oct, 1997a.

_____. Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. **Brain Res**, v.738, n.1, p.67-82. Oct 28, 1996.

_____. Distribution of Fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain. **Neuroscience**, v.77, n.4, p.1151-61. Apr, 1997b.

DALL'AGO, P., *et al.* Parasympathetic dysfunction is associated with baroreflex and chemoreflex impairment in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Auton Neurosci**, v.131, n.1-2, p.28-35. Jan 30, 2007.

_____. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Braz J Med Biol Res**, v.30, n.1, p.119-24. Jan, 1997.

_____. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Braz J Med Biol Res**, v.35, n.7, p.843-9. Jul, 2002.

DALL'OGGIO, A., *et al.* Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the "ventral" medial amygdala subnuclei of adult male and female rats. **Neurosci Lett**, v.439, n.3, p.287-92. Jul 18, 2008a.

_____. Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: further data based on the Golgi method. **Neurosci Lett**, v.430, n.2, p.151-6. Jan 10, 2008b.

DAMPNEY, R. A., *et al.* Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.29, n.4, p.261-8. Apr, 2002.

_____. Functional organisation of central cardiovascular pathways: studies using c-fos gene expression. **Progr Neurobiol**, v.71, p.359-384. Mar, 2003.

DAVERN, P. J. & G. A. HEAD. Role of the medial amygdala in mediating responses to aversive stimuli leading to hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.38, n.2, p.136-43. Feb, 2011.

_____. Cardiovascular reactivity and neuronal activation to stress in Schlager genetically hypertensive mice. **Neuroscience**, v.170, n.2, p.551-8. Oct 13, 2010.

DAVIS, M. The role of the amygdala in conditioned fear. In: Aggleton J.P. **The Amygdala**, v.New York: Wiley-Liss, p.255-306, 1992a.

_____. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. **Trends Pharmacol Sci**, v.13, n.1, p.35-41. Jan, 1992b.

_____. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annu Rev Neurosci**, v.15, p.353-75, 1992c.

_____. The role of the amygdala in conditioned fear In: Aggleton, J. P. **The Amygdala**, v.Wiley- Liss, New York, p.255-306, 2000.

DAVIS, M. & C. SHI. The amygdala. **Curr Biol**, v.10, n.4, p.R131. Feb 24, 2000.

_____. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v.35, n.1, p.105-35. Jan, 2010.

_____. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **TINS**, v.17, p.208-214. Feb, 1994.

DAVIS, M. & P. J. WHALEN. The amygdala: vigilance and emotion. **Mol Psychiatry**, v.6, n.1, p.13-34. Jan, 2001.

DAYAS, C. V., *et al.* Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. **Eur J Neurosci**, v.11, n.7, p.2312-22. Jul, 1999.

_____. Opposing roles for medial and central amygdala in the initiation of noradrenergic cell responses to a psychological stressor. **Eur J Neurosci**, v.15, n.10, p.1712-8. May, 2002.

DE BOLD, A. J., *et al.* A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sci**, v.28, n.1, p.89-94. Jan 5, 1981.

_____. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. **Cardiovasc Res**, v.31, n.1, p.7-18. Jan, 1996.

_____. The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. **Can J Physiol Pharmacol**, v.79, n.8, p.705-14. Aug, 2001.

DE BUNDEL, D., *et al.* Hippocampal sst(1) receptors are autoreceptors and do not affect seizures in rats. **Neuroreport**, v.21, n.4, p.254-8. Mar 10, 2010.

DE CASTILHOS, J., *et al.* Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: a Golgi study. **Brain Res**, v.1240, p.73-81. Nov 13, 2008.

_____. Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. **Brain Res Bull**, v.69, n.2, p.131-9. Mar 31, 2006.

DE PAULA, P. M. & B. H. MACHADO. Changes in regional vascular resistance in response to microinjection of L-glutamate into different antero-posterior coordinates of the RVLM in awake rats. **Auton Neurosci**, v.87, n.2-3, p.301-9. Mar 23, 2001.

DE OLMOS, J. S., *et al.* Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. In: Paxinos G. **The Rat Nervous System**, v.San Diego: Elsevier Academic Press, p.509-603, 2004.

_____. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. **Ann N Y Acad Sci**, v.877, p.1-32. Jun 29, 1999.

DE VRIES, G. J. & R. B. SIMERLY. Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. In: Pfaff, D.W., Arnold, A.P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R. **Hormones, Brain and Behavior**, v.San Diego: Academic Press, p.137-191, 2002.

DEBIEC, J., *et al.* The amygdala encodes specific sensory features of an aversive reinforcer. **Nat Neurosci**, v.13, n.5, p.536-7. May, 2010.

DELANEY, A. J., *et al.* Differential expression of glycine receptor subunits in the rat basolateral and central amygdala. **Neurosci Lett**, v.469, n.2, p.237-42. Jan 22, 2010.

DEVOS, N., *et al.* Differential expression of two somatostatin genes during zebrafish embryonic development. **Mech Dev**, v.115, n.1-2, p.133-7. Jul, 2002.

DEVOST, D., *et al.* Oxytocin receptor signalling. **Prog Brain Res**, v.170, p.167-76, 2008.

DHUNGEL, S., *et al.* Olfactory preference in the male rat depends on multiple chemosensory inputs converging on the preoptic area. **Horm Behav**, v.59, n.1, p.193-9. Jan, 2011.

DIAZ-MATAIX, L., *et al.* Sensory-specific associations stored in the lateral amygdala allow for selective alteration of fear memories. **J Neurosci**, v.31, n.26, p.9538-43. Jun 29, 2011.

DIELENBERG, R. A. & I. S. MCGREGOR. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. **Neurosci Biobehav Rev**, v.25, n.7-8, p.597-609. Dec, 2001.

DOMINGUEZ, J. M. & E. M. HULL. Stimulation of the medial amygdala enhances medial preoptic dopamine release: implications for male rat sexual behavior. **Brain Res**, v.917, n.2, p.225-9. Nov 2, 2001.

DONADIO, M. V., *et al.* Angiotensin II receptors in the arcuate nucleus mediate stress-induced reduction of prolactin secretion in steroid-primed ovariectomized and lactating rats. **Brain Res**, v.1006, n.1, p.59-65. Apr 23, 2004.

_____. Effects of acute stress on the day of proestrus on sexual behavior and ovulation in female rats: participation of the angiotensinergic system. **Physiol Behav**, v.92, n.4, p.591-600. Nov 23, 2007.

_____. Neonatal handling reduces renal function in adult rats. **Kidney Blood Press Res**, v.32, n.4, p.286-92, 2009.

DANALACHE, B. A., *et al.* Oxytocin-Gly-Lys-Arg: a novel cardiomyogenic peptide. **PLoS One**, v.5, n.10, p.e13643, 2010.

DADSETAN, S., *et al.* Inhibition of glutamine synthesis induces glutamate dehydrogenase-dependent ammonia fixation into alanine in co-cultures of astrocytes and neurons. **Neurochem Int**, v.59, n.4, p.482-8. Sep, 2011.

DONATO, J., JR., *et al.* Male and female odors induce Fos expression in chemically defined neuronal population. **Physiol Behav**, v.99, n.1, p.67-77. Jan 12, 2010.

DONG, H. W. & L. W. SWANSON. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. **J Comp Neurol**, v.494, n.1, p.142-78. Jan 1, 2006 a.

_____. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, dorsomedial nucleus: implications for cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and drinking responses. **J Comp Neurol**, v.494, n.1, p.75-107. Jan 1, 2006 b.

_____. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, magnocellular nucleus: implications for cerebral hemisphere regulation of micturition, defecation, and penile erection. **J Comp Neurol**, v.494, n.1, p.108-41. Jan 1, 2006 c.

_____. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. **Brain Res Brain Res Rev**, v.38, n.1-2, p.192-246. Dec, 2001.

DORNELLES, R. C. & C. R. FRANCI. Alpha- but not beta-adrenergic receptors mediate the effect of angiotensin II in the medial preoptic area on gonadotropin and prolactin secretion. **Eur J Endocrinol**, v.138, n.5, p.583-6. May, 1998 a.

_____. Action of AT1 subtype angiotensin II receptors of the medial preoptic area on gonadotropins and prolactin release. **Neuropeptides**, v.32, n.1, p.51-5. Feb, 1998 b.

DUMONT, E. C., *et al.* Involvement of central angiotensin receptors in stress adaptation. **Neuroscience**, v.93, n.3, p.877-84, 1999.

DUNCAN, G. E., *et al.* Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. **Brain Res**, v.713, n.1-2, p.79-91. Mar 25, 1996.

EBNER, K., *et al.* A single social defeat experience selectively stimulates the release of oxytocin, but not vasopressin, within the septal brain area of male rats. **Brain Res**, v.872, n.1-2, p.87-92. Jul 28, 2000.

_____. Release of oxytocin in the rat central amygdala modulates stress-coping behavior and the release of excitatory amino acids. **Neuropsychopharmacology**, v.30, n.2, p.223-30. Feb, 2005.

ENGELMANN, M., *et al.* Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats. **Exp Physiol**, v.85 Spec No, p.125S-130S. Mar, 2000.

EPELBAUM, J., *et al.* Modifications in the cortical regional distribution of choline acetyltransferase, somatostatin and somatostatin binding sites in the normal rat and following lesion of the nucleus basalis. **Brain Res**, v.371, n.2, p.376-9. Apr 23, 1986 a.

_____. Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. **Prog Neurobiol**, v.27, n.1, p.63-100, 1986 b.

_____. The anterior periventricular hypothalamus is the site of somatostatin inhibition of its own release: an in vitro and immunocytochemical study. **Neuroendocrinology**, v.44, n.2, p.255-9, 1986.

EVERITT, B. Limbic lobe and olfactory pathways. In: Berry, M. M., Bannister, L. H., Standring, S. M. **Gray's Anatomy**, v.London, Churchill Livingstone, p.115-1141, 1995.

GUZZETTI, S., *et al.* Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. **Circulation**, v.112, n.4, p.465-70. Jul 26, 2005.

FAZAN, R., JR., *et al.* Frequency-dependent baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variability in conscious mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.289, n.5, p.H1968-75. Nov, 2005.

FENG, D. D., *et al.* Ghrelin and obestatin modulate growth hormone-releasing hormone release and synaptic inputs onto growth hormone-releasing hormone neurons. **Eur J Neurosci**, v.34, n.5, p.732-44. Sep, 2011.

FERGUSON, A. V. & K. J. LATCHFORD. Local circuitry regulates the excitability of rat neurohypophysial neurones. **Exp Physiol**, v.85 Spec No, p.153S-161S. Mar, 2000.

_____. Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. **Exp Biol Med (Maywood)**, v.226, n.2, p.85-96. Feb, 2001.

FERRIS, C. F., *et al.* Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation. **BMC Neurosci**, v.9, p.111, 2008.

FISHER, L. A. & M. R. BROWN. Central regulation of stress responses: regulation of the autonomic nervous system and visceral function by corticotrophin releasing factor-41. **Baillieres Clin Endocrinol Metab**, v.5, n.1, p.35-50. Mar, 1991.

- FERREIRA, A. J., *et al.* Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. **Hypertension**, v.38, n.3 Pt 2, p.665-8. Sep, 2001.
- FERREIRA, P. M., *et al.* Hemodynamic effect produced by microinjection of angiotensins at the caudal ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. **Neuroscience**, v.151, n.4, p.1208-16. Feb 19, 2008.
- FLOOD, J. F., *et al.* Effect of histamine H2 and H3 receptor modulation in the septum on post-training memory processing. **Psychopharmacology (Berl)**, v.140, n.3, p.279-84. Dec, 1998.
- FLUGGE, G., *et al.* 5HT1A-receptor binding in the brain of cyclic and ovariectomized female rats. **J Neuroendocrinol**, v.11, n.4, p.243-9. Apr, 1999.
- FRANCI, C. R., *et al.* Angiotensin II antiserum decreases luteinizing hormone-releasing hormone in the median eminence and preoptic area of the rat. **Braz J Med Biol Res**, v.23, n.9, p.899-901, 1990.
- _____. Angiotensinergic neurons physiologically inhibit prolactin, growth hormone, and thyroid-stimulating hormone, but not adrenocorticotrophic hormone, release in ovariectomized rats. **Peptides**, v.18, n.7, p.971-6, 1997.
- FRANCHINI, K. G., *et al.* Focal adhesion kinase signaling in cardiac hypertrophy and failure. **Braz J Med Biol Res**, v.42, n.1, p.44-52. Jan, 2009.
- FRANCHINI, K. G. & E. M. KRIEGER. Neurogenic hypertension in the rat, experimental and genetic models of hypertension. In: Ganten, D., Jong, W. **Handbook of Hypertension**, v.16, n.Elsevier Science BV:Amsterdam, p.472-500, 1994.
- FRYSINGER, R. C., *et al.* Sleep states attenuate the pressor response to central amygdala stimulation. **Exp Neurol**, v.83, n.3, p.604-17. Mar, 1984.
- FU, L. W. & J. C. LONGHURST. Regulation of cardiac afferent excitability in ischemia. **Handb Exp Pharmacol**, n.194, p.185-225, 2009.
- FUKUMORI, R., *et al.* Contribution of the medial amygdaloid nucleus to the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Neurosci Lett**, v.365, n.2, p.128-31. Jul 22, 2004.
- GALENO, T. M. & M. J. BRODY. Hemodynamic responses to amygdaloid stimulation in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol**, v.245, n.2, p.R281-6. Aug, 1983.
- GANONG, W. F. Cardiovascular regulatory mechanisms. In: Ganong, W. F. **Review of Medical Physiology**, v.New York: McGraw-Hill Co., p.599-613, 2003.
- GARCIA-LOPEZ, M., *et al.* Histogenetic compartments of the mouse centromedial and extended amygdala based on gene expression patterns during development. **J Comp Neurol**, v.506, n.1, p.46-74. Jan 1, 2008.

GEHLERT, D. R., *et al.* Angiotensin II receptor subtypes in rat brain: dithiothreitol inhibits ligand binding to AII-1 and enhances binding to AII-2. **Brain Res**, v.546, n.1, p.161-5. Apr 12, 1991.

GELSEMA, A. J., *et al.* Cardiovascular responses to chemical and electrical stimulation of amygdala in rats. **Am J Physiol**, v.253, n.5 Pt 2, p.R712-8. Nov, 1987.

GENUTH, S. M. & C. L. HOPPEL. Acute hormonal effects on carnitine metabolism in thin and obese subjects: responses to somatostatin, glucagon, and insulin. **Metabolism**, v.30, n.4, p.393-401. Apr, 1981.

GIBBS, D. M. High concentrations of oxytocin in hypophysial portal plasma. **Endocrinology**, v.114, n.4, p.1216-8. Apr, 1984 a.

_____. Oxytocin potentiates the ACTH-releasing activity of CRF(41) but not vasopressin. **Life Sci**, v.34, n.23, p.2245-9. Jun 4, 1984 b.

_____. Stress-specific modulation of ACTH secretion by oxytocin. **Neuroendocrinology**, v.42, n.6, p.456-8, 1986 a.

_____. Vasopressin and oxytocin: hypothalamic modulators of the stress response: a review. **Psychoneuroendocrinology**, v.11, n.2, p.131-9, 1986 b.

GIMPL, G. & F. FAHRENHOLZ. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. **Physiol Rev**, v.81, n.2, p.629-83. Apr, 2001.

GLOOR, P. **The Temporal Lobe and Limbic System**, v. New York: Oxford University Press, 1997.

GOREN, M. Z., *et al.* Cardiovascular responses to NMDA injected into nuclei of hypothalamus or amygdala in conscious rats. **Pharmacology**, v.61, n.4, p.257-62. Nov, 2000.

_____. The influence of dorsomedial hypothalamic nucleus on contralateral paraventricular nucleus in NMDA-mediated cardiovascular responses. **Brain Res**, v.968, n.2, p.219-26. Apr 11, 2003.

_____. The role of amygdala and hypothalamus in GABAA antagonist bicuculline-induced cardiovascular responses in conscious rats. **Brain Res**, v.722, n.1-2, p.118-24. May 25, 1996.

GRIFFIOEN, K. J. S., VENKATESAN, P., HUANG, Z. G., WANG, X. Fentanyl inhibits GABAergic neurotransmission to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. **Brain Res**, v.1007, p.109-115. Oct, 2004.

GRILLI, M., *et al.* Somatostatin inhibits glutamate release from mouse cerebrocortical nerve endings through presynaptic sst2 receptors linked to the adenylyl cyclase-protein kinase A pathway. **Neuropharmacology**, v.46, n.3, p.388-96. Mar, 2004.

GROVE, E. A. Efferent connections of the substantia innominata in the rat. **J Comp Neurol**, v.277, n.3, p.347-64. Nov 15, 1988.

GUGGER, M., *et al.* Immunohistochemical localization of somatostatin receptor sst2A in human gut and lung tissue: possible implications for physiology and carcinogenesis. **Ann N Y Acad Sci**, v.1014, p.132-6. Apr, 2004.

GUILLAMON, A. & S. SEGOVIA. Sex differences in the vomeronasal system. **Brain Res Bull**, v.44, n.4, p.377-82, 1997.

GUIMARAES, P. B., *et al.* Angiotensin II binding to angiotensin I-converting enzyme triggers calcium signaling. **Hypertension**, v.57, n.5, p.965-72. May, 2011.

GUO, Z. L., *et al.* Nitric oxide in rostral ventrolateral medulla regulates cardiac-sympathetic reflexes: role of synthase isoforms. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.297, n.4, p.H1478-86. Oct, 2009.

GUYENET, P. G., STORNETTA, R. L., WESTON, M. C., McQUISTON, T., SIMMONS, J. R. Detection of amino acid and peptide transmitter in physiologically identified brainstem cardiorespiratory neurons. **Aut Neurosci Basic Clinical**, v.114, p.1-10. Oct, 2004.

GUTKOWSKA, J., *et al.* Oxytocin is a cardiovascular hormone. **Braz J Med Biol Res**, v.33, n.6, p.625-33. Jun, 2000.

_____. Atrial natriuretic peptide in brain and pituitary gland. **Physiol Rev**, v.77, n.2, p.465-515. Apr, 1997.

HAGIWARA, Y. & T. KUBO. Anterior hypothalamic neurons respond to blood pressure changes via gamma-aminobutyric acid and angiotensins in rats. **Neurosci Lett**, v.384, n.3, p.250-3. Aug 26, 2005 a.

_____. Central injection of hypertonic saline activates angiotensin II-sensitive neurons in the anterior hypothalamic area of rats. **Brain Res**, v.1046, n.1-2, p.165-71. Jun 7, 2005 b.

_____. Cholinergic systems in the posterior hypothalamic nucleus are involved in blood pressure decrease-induced excitation of anterior hypothalamic area neurons in rats. **Neurosci Lett**, v.390, n.2, p.61-5. Dec 23, 2005 c.

_____. Cholinergic stimulation in the lateral septal area activates anterior hypothalamic area neurons via excitatory amino acid receptors in rats. **Brain Res**, v.1049, n.2, p.203-9. Jul 12, 2005 d.

_____. gamma-Aminobutyric acid in the lateral septal area is involved in mediation of the inhibition of hypothalamic angiotensin II-sensitive neurons induced by blood pressure increases in rats. **Neurosci Lett**, v.419, n.3, p.242-6. Jun 4, 2007.

_____. The medial amygdaloid area is involved in activation of angiotensin II-sensitive neurons in the anterior hypothalamic area. **Brain Res**, v.1033, n.2, p.128-34. Feb 8, 2005e.

HALL, J. E. Integration and regulation of cardiovascular function. **Am J Physiol**, v.277, n.6 Pt 2, p.S174-86. Dec, 1999.

HARDING, J. W. & D. FELIX. Angiotensin-sensitive neurons in the rat paraventricular nucleus: relative potencies of angiotensin II and angiotensin III. **Brain Res**, v.410, n.1, p.130-4. Apr 28, 1987.

_____. Release of angiotensins in paraventricular nucleus of rat in response to physiological and chemical stimuli. **Am J Physiol**, v.262, n.1 Pt 2, p.F17-23. Jan, 1992.

HARRIS, V. S. & B. D. SACHS. Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. **Brain Res**, v.86, n.3, p.514-8. Mar 28, 1975.

HARTMANN, K., STIEF, F., DRAGUHN, A., FRAHM, C. Ionotropic GABA receptors with mixed pharmacological properties of GABAA and GABAC receptors. **Eur J Pharmacol**, v.497, p.139-146. Mar, 2004.

HARVEY, S., *et al.* Stress and adrenal function. **J Exp Zool**, v.232, n.3, p.633-45. Dec, 1984.

HASHIGUCHI, H., *et al.* Single and repeated environmental stress: effect on plasma oxytocin, corticosterone, catecholamines, and behavior. **Physiol Behav**, v.61, n.5, p.731-6. May, 1997.

HASSEL, B., DINGLEDINE, R. GLUTAMATE. In: SIEGEL GJ, ALBERS RW, BRADY ST, PRICE DL Basic Neurochemistry: **Molecular and Medical Aspects**, 7th ed. Elsevier Academic Press, New York 23:267-290, 2006.

HATFIELD, T. & J. L. MCGAUGH. Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. **Neurobiol Learn Mem**, v.71, n.2, p.232-9. Mar, 1999.

HAYANO, J., *et al.* Severity of coronary atherosclerosis correlates with the respiratory component of heart rate variability. **Am Heart J**, v.121, n.4 Pt 1, p.1070-9. Apr, 1991.

HAYWARD, N. M., *et al.* Elevated cerebral blood flow and vascular density in the amygdala after status epilepticus in rats. **Neurosci Lett**, v.484, n.1, p.39-42. Oct 22, 2010.

HEAD, G. A. Role of AT1 receptors in the central control of sympathetic vasomotor function. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.23 Suppl 3, p.S93-8. Sep, 1996.

HERBERT, C., *et al.* Amygdala activation during reading of emotional adjectives--an advantage for pleasant content. **Soc Cogn Affect Neurosci**, v.4, n.1, p.35-49. Mar, 2009.

_____. Emotional self-reference: brain structures involved in the processing of words describing one's own emotions. **Neuropsychologia**, v.49, n.10, p.2947-56. Aug, 2011.

_____. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J Comp Neurol**, v.293, n.4, p.540-80. Mar 22, 1990.

HERMAN, J. P., *et al.* Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.29, n.8, p.1201-13. Dec, 2005.

_____. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. **Crit Rev Neurobiol**, v.10, n.3-4, p.371-94, 1996.

_____. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends Neurosci**, v.20, n.2, p.78-84. Feb, 1997.

_____. Repeated stress increases locomotor response to amphetamine. **Psychopharmacology (Berl)**, v.84, n.3, p.431-5, 1984.

HEINRICHS, M., *et al.* Oxytocin, vasopressin, and human social behavior. **Front Neuroendocrinol**, v.30, n.4, p.548-57. Oct, 2009.

HIGA-TANIGUCHI, K. T., *et al.* Brainstem oxytocinergic modulation of heart rate control in rats: effects of hypertension and exercise training. **Exp Physiol**, v.94, n.11, p.1103-13. Nov, 2009.

HIGUCHI, T., *et al.* Effects of carbamazepine and valproic acid on brain immunoreactive somatostatin and gamma-aminobutyric acid in amygdaloid-kindled rats. **Eur J Pharmacol**, v.125, n.2, p.169-75. Jun 17, 1986.

ICHIKAWA, M. Plasticity of intra-amygdaloid connections following the denervation of fibers from accessory olfactory bulb to medial amygdaloid nucleus in adult rat: immunohistochemical study of anterogradely transported lectin (*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin). **Brain Res**, v.451, n.1-2, p.248-54. Jun 7, 1988.

ICHIKI, T., *et al.* Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. **Nature**, v.377, n.6551, p.748-50. Oct 26, 1995.

INSEL, T. R., *et al.* Oxytocin: who needs it? **Prog Brain Res**, v.133, p.59-66, 2001 a.

_____. The neurobiology of attachment. **Nat Rev Neurosci**, v.2, n.2, p.129-36. Feb, 2001 b.

ISHIZUKA, T., *et al.* Cardiovascular effects of microinjections of thyrotropin-releasing hormone, oxytocin and other neuropeptides into the rostral ventrolateral medulla of the rat. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v.322, p.35-44. Mar-Apr, 1993.

ITOH, Y., *et al.* Characterization of histamine release from the rat hypothalamus as measured by in vivo microdialysis. **J Neurochem**, v.56, n.3, p.769-74. Mar, 1991.

IWATA, J., *et al.* Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses. **Brain Res**, v.418, n.1, p.183-8. Aug 18, 1987.

JACKSON, B., *et al.* Changes in the renin-angiotensin system, exchangeable body sodium, and plasma and atrial content of atrial natriuretic factor during evolution of chronic renal failure in the rat. **Am J Hypertens**, v.1, n.3 Pt 1, p.298-300. Jul, 1988.

JAENISCH, R. B., *et al.* Respiratory muscle training improves hemodynamics, autonomic function, baroreceptor sensitivity, and respiratory mechanics in rats with heart failure. **J Appl Physiol**, v.111, n.6, p.1664-70. Dec, 2011.

JANKOWSKI, M., *et al.* Cardiac oxytocin receptor blockade stimulates adverse cardiac remodeling in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.299, n.2, p.H265-74. Aug, 2010.

_____. Rat heart: a site of oxytocin production and action. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.24, p.14558-63. Nov 24, 1998.

JIANG, X., *et al.* Histaminergic modulation of excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala. **Neuroscience**, v.131, n.3, p.691-703, 2005.

JOHNSON, L. R., *et al.* Regulation of the Fear Network by Mediators of Stress: Norepinephrine Alters the Balance between Cortical and Subcortical Afferent Excitation of the Lateral Amygdala. **Front Behav Neurosci**, v.5, p.23, 2011.

_____. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol**, v.18, n.3, p.292-353. Jul, 1997.

JOLKKONEN, E., *et al.* Projections from the amygdalo-piriform transition area to the amygdaloid complex: a PHA-I study in rat. **J Comp Neurol**, v.432, n.4, p.440-65. Apr 16, 2001.

JONES, B. E. & R. Y. MOORE. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. **Brain Res**, v.127, n.1, p.25-53. May 20, 1977.

_____. Basolateral amygdala modulates terminal dopamine release in the nucleus accumbens and conditioned responding. **Biol Psychiatry**, v.67, n.8, p.737-44. Apr 15, 2010.

_____. Type I and II metabotropic glutamate receptors mediate depressor and bradycardic actions in the nucleus of the solitary tract of anaesthetized rats. **Eur J Pharmacol**, v.380, n.2-3, p.129-35. Sep 10, 1999.

JULIEN, C., *et al.* Sympathetic modulation of blood pressure variability. **J Hypertens**, v.19, n.10, p.1707-12. Oct, 2001.

KADEKARO, M., *et al.* Cerebral metabolic and vasopressin and oxytocin responses during osmotic stimulation in conscious rats. **J Neuroendocrinol**, v.4, n.2, p.217-22. Apr, 1992 a.

_____. Cerebral metabolic responses and vasopressin and oxytocin secretions during progressive water deprivation in rats. **Am J Physiol**, v.262, n.2 Pt 2, p.R310-7. Feb, 1992 b.

KAMAL, A. M. & T. TOMBOL. Golgi studies on the amygdaloid nuclei of the cat. **J Hirnforsch**, v.16, n.3, p.175-201, 1975.

KAKINOKI, H., *et al.* The effects of histamine H3-receptor antagonists on amygdaloid kindled seizures in rats. **Brain Res Bull**, v.46, n.5, p.461-5. Jul 15, 1998.

KAPLAN, N. M. Systemic hypertension: mechanisms and diagnosis. In: Braunwald, E., Libby, P., Zipes, D. P. **Heart disease** v.28, n.Philadelphia: W. B. Saunders Company, p.941-957, 2001.

KANG, Y. S. & J. H. PARK. Brain uptake and the analgesic effect of oxytocin--its usefulness as an analgesic agent. **Arch Pharm Res**, v.23, n.4, p.391-5. Aug, 2000.

KARSON, A. B., *et al.* Cardiovascular effects of intracerebroventricular bicuculline in rats with absence seizures. **Epilepsy Res**, v.34, n.2-3, p.231-9. Apr, 1999.

KASPAROV, S. & J. F. PATON. Differential effects of angiotensin II in the nucleus tractus solitarius of the rat--plausible neuronal mechanism. **J Physiol**, v.521 Pt 1, p.227-38. Nov 15, 1999.

KENDRICK, K. M., *et al.* Cerebrospinal fluid levels of acetylcholinesterase, monoamines and oxytocin during labour, parturition, vaginocervical stimulation, lamb separation and suckling in sheep. **Neuroendocrinology**, v.44, n.2, p.149-56, 1986.

KIM, M. J., *et al.* Anxiety dissociates dorsal and ventral medial prefrontal cortex functional connectivity with the amygdala at rest. **Cereb Cortex**, v.21, n.7, p.1667-73. Jul, 2011.

KLING, A. S. & L. A. BROTHERS. The amygdala and social behavior. In: Aggleton, J. P. **The amygdala**, v.New York. Wiley-Liss, p.353-377, 1992.

KLUVER, H. & P. C. BUCY. Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. 1939. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v.9, n.4, p.606-20. Fall, 1997.

KNAPSKA, E., *et al.* Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. **Physiol Rev**, v.87, n.4, p.1113-73. Oct, 2007.

KNUEPFER, M. M., *et al.* Responses of single neurons in amygdala to interoceptive and exteroceptive stimuli in conscious cats. **Am J Physiol**, v.268, n.3 Pt 2, p.R666-75. Mar, 1995.

KONDO, Y., *et al.* Importance of the medial amygdala in rat penile erection evoked by remote stimuli from estrous females. **Behav Brain Res**, v.91, n.1-2, p.215-22. Mar, 1998.

_____. The medial amygdala controls the coital access of female rats: a possible involvement of emotional responsiveness. **Jpn J Physiol**, v.55, n.6, p.345-53. Dec, 2005.

KOVACS, G. L., *et al.* Effect of oxytocin and vasopressin on memory consolidation: sites of action and catecholaminergic correlates after local microinjection into limbic-midbrain structures. **Brain Res**, v.175, n.2, p.303-14. Oct 19, 1979.

KRANTIC, S., *et al.* Novel modalities of somatostatin actions. **Eur J Endocrinol**, v.151, n.6, p.643-55. Dec, 2004.

KREMARIK, P., *et al.* Histoautoradiographic detection of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the telencephalon of the rat. **J Comp Neurol**, v.333, n.3, p.343-59. Jul 15, 1993.

KRISTENSEN, A. S., *et al.* Mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulation of AMPA receptor gating. **Nat Neurosci**, v.14, n.6, p.727-35. Jun, 2011.

KRUKOFF, T. L. Central regulation of autonomic function: no brakes? **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.25, n.6, p.474-8. Jun, 1998.

KUBO, T., *et al.* Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats. **Neurosci Lett**, v.354, n.1, p.84-6. Jan 2, 2004.

LANNEAU, C., *et al.* Involvement of the Sst1 somatostatin receptor subtype in the intrahypothalamic neuronal network regulating growth hormone secretion: an in vitro and in vivo antisense study. **Endocrinology**, v.141, n.3, p.967-79. Mar, 2000 a.

_____. Somatostatin modulation of excitatory synaptic transmission between periventricular and arcuate hypothalamic nuclei in vitro. **J Neurophysiol**, v.84, n.3, p.1464-74. Sep, 2000 b.

LAMBERTS, S. W., *et al.* Somatostatin analogs: future directions. **Metabolism**, v.45, n.8 Suppl 1, p.104-6. Aug, 1996.

_____. Somatostatin receptor imaging in vivo localization of tumors with a radiolabeled somatostatin analog. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.37, n.6, p.1079-82. Dec 20, 1990.

LANCA, A. J. & D. VAN DER KOOY. A serotonin-containing pathway from the area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. **Neuroscience**, v.14, n.4, p.1117-26. Apr, 1985.

LAWRENCE, A. J. Neurotransmitter mechanisms of rat vagal afferent neurons. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.22, n.11, p.869-73. Nov, 1995.

LEDOUX, J. E. Brain mechanisms of emotion and emotional learning. **Curr Opin Neurobiol**, v.2, n.2, p.191-7. Apr, 1992 a.

_____. Emotion and amygdala. In: Aggleton, J. P. **The Amygdala**, v. Wiley-Liss, New York, p.255-306, 1992 b.

_____. Emotion, memory and the brain. **Sci Am**, v.270, n.6, p.50-7. Jun, 1994.

LEE, P. R., *et al.* Social interaction deficits caused by chronic phencyclidine administration are reversed by oxytocin. **Neuropsychopharmacology**, v.30, n.10, p.1883-94. Oct, 2005.

LEHMAN, M. N. & S. S. WINANS. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: autoradiographic and behavioral analyses. **Brain Res**, v.240, n.1, p.27-41. May 20, 1982.

_____. Glutamatergic stimulation of the medial amygdala induces steroid dependent c-fos expression within forebrain nuclei responsive to mating stimulation. **Neuroscience**, v.136, n.1, p.55-64, 2005.

LENGYEL, A. M. & G. S. TANNENBAUM. Mechanisms of calcitonin-induced growth hormone (GH) suppression: roles of somatostatin and GH-releasing factor. **Endocrinology**, v.120, n.4, p.1377-83. Apr, 1987.

- LONGHURST, J. C. Neural regulation of the cardiovascular system. In: Squire, L. R., Blom, F. E., McConell, S. K., Roberts, J. L., Spitzer, N. C., Zigmond, M. J. **Fundamental Neuroscience**, Burlington: Academic Press, p.829-853, 2008.
- LU, Y. F., *et al.* Inhibition of neurons in the rat medial amygdaloid nucleus in vitro by somatostatin. **Can J Physiol Pharmacol**, v.73, n.5, p.670-4. May, 1995.
- LUZ, C. P., *et al.* The central amygdala regulates sodium intake in sodium-depleted rats: role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors. **Brain Res**, v.1139, p.178-94. Mar 30, 2007.
- MACHADO, B. H. & L. G. BONAGAMBA. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. **Brain Res**, v.576, n.1, p.131-8. Mar 27, 1992.
- MAGRI, V., *et al.* Increased cardiovascular responsiveness to GABAergic stimulation in DOCA-salt hypertensive rats. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, v.45, n.1, p.107-18. Jul, 1984.
- MALLIANI, A., *et al.* Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, v.84, n.2, p.482-92. Aug, 1991.
- MALPAS, S. C. & T. J. MALING. Heart-rate variability and cardiac autonomic function in diabetes. **Diabetes**, v.39, n.10, p.1177-81. Oct, 1990.
- _____. Neural influences on cardiovascular variability: possibilities and pitfalls. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.282, n.1, p.H6-20. Jan, 2002.
- _____. The sympathetic nervous system's role in regulating blood pressure variability. **IEEE Eng Med Biol Mag**, v.20, n.2, p.17-24. Mar-Apr, 2001.
- MALSBURY, C. W. & K. MCKAY. Neurotrophic effects of testosterone on the medial nucleus of the amygdala in adult male rats. **J Neuroendocrinol**, v.6, n.1, p.57-69. Feb, 1994.
- MANTELLA, R. C., *et al.* Female oxytocin-deficient mice display enhanced anxiety-related behavior. **Endocrinology**, v.144, n.6, p.2291-6. Jun, 2003.
- MARCUZZO, S., *et al.* Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. **Neurosci Lett**, v.424, n.1, p.16-21. Aug 31, 2007.
- MAREN, S. Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. An emerging physiology of fear conditioning circuits. **Mol Neurobiol**, v.13, n.1, p.1-22. Aug, 1996.
- MARTINA, M., *et al.* Physiological properties of central medial and central lateral amygdala neurons. **J Neurophysiol**, v.82, n.4, p.1843-54. Oct, 1999.
- MARTINEZ, F. G., *et al.* Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats. **Brain Res**, v.1108, n.1, p.117-26. Sep 7, 2006.

_____. Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. **Neuroscience**, v.172, p.314-28. Jan 13, 2011.

MASCO, D. H. & H. F. CARRER. Sexual receptivity in female rats after lesion or stimulation in different amygdaloid nuclei. **Physiol Behav**, v.24, n.6, p.1073-80. Jun, 1980.

_____. Pathways conducting amygdaloid influence on feminine sexual behavior in the rat. **Behav Brain Res**, v.11, n.3, p.205-12. Mar, 1984.

MASSI, M., *et al.* Inhibition of salt appetite in the rat following injection of tachykinins into the medial amygdala. **Brain Res**, v.513, n.1, p.1-7. Apr 9, 1990.

MATSUMURA, K., *et al.* Subtypes of metabotropic glutamate receptors in the nucleus of the solitary tract of rats. **Brain Res**, v.842, n.2, p.461-8. Sep 25, 1999.

MCDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Prog Neurobiol**, v.55, n.3, p.257-332. Jun, 1998.

_____. Cortical afferents to the extended amygdala. **Ann N Y Acad Sci**, v.877, p.309-38. Jun 29, 1999.

_____. Immunohistochemical characterization of somatostatin containing interneurons in the rat basolateral amygdala. **Brain Res**, v.943, n.2, p.237-44. Jul 12, 2002.

_____. MASCAGNI, F., MULLER, J. F. Immunocytochemical localization of GABA_BR1 receptor subunits in the basolateral amygdala. **Brain Res Bull**, v.1018, p.147-158. Mar, 2004.

_____. GABAA receptor channels. **Ann Rev Neurosci**, v.17, p.569-602. Sep, 1994.

_____. Postsynaptic targets of GABAergic basal forebrain projections to the basolateral amygdala. **Neuroscience**, v.183, p.144-59. Jun 2, 2011.

MCCARTHY, M. M., *et al.* An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse. **Physiol Behav**, v.60, n.5, p.1209-15. Nov, 1996.

MCGAUGH, J. L. Involvement of the amygdala in neuromodulatory influences on memory storage. In: Aggleton, J. P. **The Amygdala**, v.New York: Wiley-Liss, p.431-451, 1992.

_____. Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.24, p.13508-14. Nov 26, 1996.

MCKINLEY, P. S., *et al.* Deriving heart period variability from blood pressure waveforms. **J Appl Physiol**, v.95, n.4, p.1431-8. Oct, 2003.

MCREYNOLDS, J. R., *et al.* Memory-enhancing corticosterone treatment increases amygdala norepinephrine and Arc protein expression in hippocampal synaptic fractions. **Neurobiol Learn Mem**, v.93, n.3, p.312-21. Mar, 2010.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a Neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutrition**, v.130, p.1007S-1015S, 2000.

MEREDITH, M. & J. M. WESTBERRY. Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. **J Neurosci**, v.24, n.25, p.5719-25. Jun 23, 2004.

MICEVYCH, P. E., *et al.* Concentrations of cholecystokinin, substance P, and bombesin in discrete regions of male and female rat brain: sex differences and estrogen effects. **Exp Neurol**, v.100, n.2, p.416-25. May, 1988.

MICHELINI, L. C. & M. MORRIS. Endogenous vasopressin modulates the cardiovascular responses to exercise. **Ann N Y Acad Sci**, v.897, p.198-211, 1999 a.

_____. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. **Exp Physiol**, v.94, n.9, p.947-60. Sep, 2009.

_____. Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: studies in oxytocin-deficient mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.284, n.6, p.H2269-76. Jun, 2003.

_____. Regulação da pressão arterial: mecanismos neuro-humorais. In: Aires, M.M. **Fisiologia**, v.Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.473-488, 1999 b.

_____. Vasopressin in the nucleus tractus solitarius: a modulator of baroreceptor reflex control of heart rate. **Braz J Med Biol Res**, v.27, n.4, p.1017-32. Apr, 1994.

MIFFLIN, S. W., *et al.* Baroreceptor inputs to the nucleus tractus solitarius in the cat: modulation by the hypothalamus. **J Physiol**, v.399, p.369-87. May, 1988.

MIYATA, S., *et al.* Temporal changes of c-fos expression in oxytocinergic magnocellular neuroendocrine cells of the rat hypothalamus with restraint stress. **Brain Res Bull**, v.37, n.4, p.391-5, 1995.

MIYAWAKI, T., *et al.* Evidence for a tonic GABA-ergic inhibition of excitatory respiratory-related afferents to presympathetic neurons in the rostral ventrolateral medulla. **Brain Res**, v.924, n.1, p.56-62. Jan 4, 2002.

MOLLER, L. N., *et al.* Somatostatin receptors. **Biochim Biophys Acta**, v.1616, n.1, p.1-84. Sep 22, 2003.

MONTANO, N., *et al.* Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. **Circulation**, v.90, n.4, p.1826-31. Oct, 1994.

MOMIYAMA, T. & L. ZABORSZKY. Somatostatin presynaptically inhibits both GABA and glutamate release onto rat basal forebrain cholinergic neurons. **J Neurophysiol**, v.96, n.2, p.686-94. Aug, 2006.

MORISHITA, R., *et al.* Effect of an antihypertensive drug on brain angiotensin II levels in renal and spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.22, n.9, p.665-9. Sep, 1995.

MURATANI, H., *et al.* Brain angiotensin and circulatory control. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.23, n.6-7, p.458-64. Jun-Jul, 1996.

NAKAMURA, B. N., *et al.* Lack of maternal glutamate cysteine ligase modifier subunit (Gclm) decreases oocyte glutathione concentrations and disrupts preimplantation development in mice. **Endocrinology**, v.152, n.7, p.2806-15. Jul, 2011.

NEUMANN, I. D., *et al.* Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. **Neuroscience**, v.95, n.2, p.567-75, 2000 a.

_____. Brain oxytocin inhibits basal and stress-induced activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male and female rats: partial action within the paraventricular nucleus. **J Neuroendocrinol**, v.12, n.3, p.235-43. Mar, 2000.

_____. Involvement of the brain oxytocin system in stress coping: interactions with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Prog Brain Res**, v.139, p.147-62, 2002.

_____. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. **Ann N Y Acad Sci**, v.877, p.242-57. Jun 29, 1999.

NISHIOKA, T., *et al.* Stress increases oxytocin release within the hypothalamic paraventricular nucleus. **Brain Res**, v.781, n.1-2, p.56-60. Jan 19, 1998.

NISHIZUKA, M. & Y. ARAI. Regional difference in sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. **Exp Brain Res**, v.49, n.3, p.462-5, 1983.

NGUYEN DINH CAT, A. & R. M. TOUYZ. Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: novel mechanisms. **Curr Hypertens Rep**, v.13, n.2, p.122-8. Apr, 2011.

NOLLO, G., *et al.* Causal linear parametric model for baroreflex gain assessment in patients with recent myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.280, n.4, p.H1830-9. Apr, 2001.

OBERTO, A., *et al.* GABAergic and NPY-Y(1) network in the medial amygdala: a neuroanatomical basis for their functional interaction. **Neuropharmacology**, v.41, n.5, p.639-42. Oct, 2001.

OHTAKE, T. & H. YAMADA. Efferent connections of the nucleus reuniens and the rhomboid nucleus in the rat: an anterograde PHA-L tracing study. **Neurosci Res**, v.6, n.6, p.556-68. Aug, 1989.

OLIAS, G., *et al.* Regulation and function of somatostatin receptors. **J Neurochem**, v.89, n.5, p.1057-91. Jun, 2004.

OLSEN, R.W., BETZ, H. GABA and glycine. In: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL Basic Neurochemistry: **Molecular, Cellular and Medical Aspects**, 7 th ed. Elsevier Academic Press, New York 291-301, 2006.

ONAT, F., *et al.* Effect of muscimol on cholinomimetic-induced cardiovascular responses in rats. **Eur J Pharmacol**, v.362, n.2-3, p.173-81. Dec 4, 1998.

ONDREJCAKOVA, M., *et al.* Neuroendocrine and cardiovascular parameters during simulation of stress-induced rise in circulating oxytocin in the rat. **Stress**, v.13, n.4, p.314-22. Jul, 2010.

OSADCHII, O. E. & V. M. POKROVSKII. [Effect of somatostatin on the chronotropic effect caused by vagal nerve stimulation by a single stimulus]. **Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova**, v.84, n.1-2, p.54-63. Jan-Feb, 1998 a.

_____. [Somatostatin as a regulator of cardiovascular system functions]. **Usp Fiziol Nauk**, v.29, n.4, p.24-41. Oct-Dec, 1998 b.

ORO, A. E., *et al.* Estrous cycle variations in levels of cholecystokinin immunoreactivity within cells of three interconnected sexually dimorphic forebrain nuclei. Evidence for a regulatory role for estrogen. **Neuroendocrinology**, v.47, n.3, p.225-35. Mar, 1988.

OSTERLUND, M., *et al.* Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. **Brain Res Mol Brain Res**, v.54, n.1, p.175-80. Feb, 1998.

OSTROFF, L. E., *et al.* Stability of presynaptic vesicle pools and changes in synapse morphology in the amygdala following fear learning in adult rats. **J Comp Neurol**. Jun 14, 2011.

OTTERSEN, O. P. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat: II. Afferents from the hypothalamus and the basal telencephalon. **J Comp Neurol**, v.194, n.1, p.267-89. Nov 1, 1980.

_____. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. III. Afferents from the lower brain stem. **J Comp Neurol**, v.202, n.3, p.335-56. Nov 1, 1981.

_____. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat. I. Projections from the thalamus. **J Comp Neurol**, v.187, n.2, p.401-24. Sep 15, 1979.

OZAWA, S., KAMIYA, H., TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol**, v.54, p.581-618. Sep, 1998.

PAGANI, M., *et al.* Low and high frequency components of blood pressure variability. **Ann N Y Acad Sci**, v.783, p.10-23. Aug 15, 1996.

_____. Relationship between spectral components of cardiovascular variabilities and direct measures of muscle sympathetic nerve activity in humans. **Circulation**, v.95, n.6, p.1441-8. Mar 18, 1997.

PAN, H. L. Brain angiotensin II and synaptic transmission. **Neuroscientist**, v.10, n.5, p.422-31. Oct, 2004.

- PANETTA, R., *et al.* Molecular cloning, functional characterization, and chromosomal localization of a human somatostatin receptor (somatostatin receptor type 5) with preferential affinity for somatostatin-28. **Mol Pharmacol**, v.45, n.3, p.417-27. Mar, 1994.
- PANTAZOPOULOS, H., *et al.* A fear-inducing odor alters PER2 and c-Fos expression in brain regions involved in fear memory. **PLoS One**, v.6, n.5, p.e20658, 2011.
- PARATI, G., *et al.* Blood pressure variability, cardiovascular risk and antihypertensive treatment. **J Hypertens Suppl**, v.13, n.4, p.S27-34. Dec, 1995.
- PARÉ, D., *et al.* Contextual inhibitory gating of impulse traffic in the intra-amygdaloid network. **Ann N Y Acad Sci**, v.985, p.78-91. Apr, 2003.
- PAREDES, J., *et al.* Afferents to the central nucleus of the amygdala and functional subdivisions of the periaqueductal gray: neuroanatomical substrates for affective behavior. **Brain Res**, v.887, n.1, p.157-73. Dec 22, 2000.
- PEDERSEN, C. A. & A. J. PRANGE, JR. Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.76, n.12, p.6661-5. Dec, 1979.
- PERENO, G. L., *et al.* Effect of sex differences and gonadal hormones on kainic acid-induced neurodegeneration in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. **Exp Toxicol Pathol**. Sep 27, 2010.
- PETERSSON, M., *et al.* Oxytocin increases nociceptive thresholds in a long-term perspective in female and male rats. **Neurosci Lett**, v.212, n.2, p.87-90. Jul 12, 1996.
- PETROVICH, G. D., *et al.* Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. **Brain Res Brain Res Rev**, v.38, n.1-2, p.247-89. Dec, 2001.
- _____. Amygdalar and prefrontal pathways to the lateral hypothalamus are activated by a learned cue that stimulates eating. **J Neurosci**, v.25, n.36, p.8295-302. Sep 7, 2005.
- _____. Sex differences in fear-induced feeding cessation: Prolonged effect in female rats. **Physiol Behav**, v.104, n.5, p.996-1001. Oct 24, 2011.
- PFAUS, J. G. & M. M. HEEB. Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. **Brain Res Bull**, v.44, n.4, p.397-407, 1997.
- PHILLIPS, M. I. Functions of angiotensin in the central nervous system. **Annu Rev Physiol**, v.49, p.413-35, 1987.
- _____. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. **Regul Pept**, v.43, n.1-2, p.1-20. Jan 22, 1993.
- _____. Lowering of hypertension by central saralasin in the absence of plasma renin. **Nature**, v.270, n.5636, p.445-7. Dec 1, 1977.

PITKANEN, A. [Amygdala]. **Duodecim**, v.114, n.23, p.2451-9, 1998.

_____. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: Aggleton, J. P. **The Amygdala: A Functional Analysis**, Oxford University Press; Oxford, p.31-115, 2000.

_____. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. **Trends Neurosci**, v.20, n.11, p.517-23. Nov, 1997.

PLESS, J. The history of somatostatin analogs. **J Endocrinol Invest**, v.28, n.11 Suppl International, p.1-4, 2005.

POLEPALLI, J. S., *et al.* A specific class of interneuron mediates inhibitory plasticity in the lateral amygdala. **J Neurosci**, v.30, n.44, p.14619-29. Nov 3, 2010.

POLSTON, E. K., *et al.* NMDA-mediated activation of the medial amygdala initiates a downstream neuroendocrine memory responsible for pseudopregnancy in the female rat. **J Neurosci**, v.21, n.11, p.4104-10. Jun 1, 2001.

PONOMAREV, I., *et al.* Amygdala transcriptome and cellular mechanisms underlying stress-enhanced fear learning in a rat model of posttraumatic stress disorder. **Neuropsychopharmacology**, v.35, n.6, p.1402-11. May, 2010.

PRADAYROL, L., *et al.* N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. **FEBS Lett**, v.109, n.1, p.55-8. Jan 1, 1980.

PREWITT, C. M. & J. P. HERMAN. Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Regulation Following Lesions of the Central Nucleus of the Amygdala. **Stress**, v.1, n.4, p.263-280. Aug, 1997.

_____. Anatomical interactions between the central amygdaloid nucleus and the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat: a dual tract-tracing analysis. **J Chem Neuroanat**, v.15, n.3, p.173-85. Sep, 1998.

QUAGLIOTTO, E. Efeito da microinjeção de histamina e metil-histamina no núcleo pósterodorsal da amígdala medial sobre o controle da pressão arterial em ratos. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

QUAGLIOTTO, E., *et al.* Histamine in the posterodorsal medial amygdala modulates cardiovascular reflex responses in awake rats. **Neuroscience**, v.157, n.4, p.709-19. Dec 10, 2008.

QUIRK, G. J., *et al.* Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. **Neuron**, v.15, n.5, p.1029-39. Nov, 1995.

RADKE, J. M., *et al.* Neuronal release of somatostatin in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. **Neuroscience**, v.54, n.2, p.493-8. May, 1993.

RADLEY, J. J. & J. H. MORRISON. Repeated stress and structural plasticity in the brain. **Ageing Res Rev**, v.4, n.2, p.271-87. May, 2005.

RAKOVSKA, A., *et al.* Somatostatin stimulates striatal acetylcholine release by glutamatergic receptors: an in vivo microdialysis study. **Neurochem Int**, v.40, n.3, p.269-75. Mar, 2002.

RANDALL, W. C. **Nervous control of cardiovascular function**, v. New York. Oxford. University Press, 1984.

RASIA-FILHO, A. A. Is there anything "autonomous" in the nervous system? **Adv Physiol Educ**, v.30, n.1, p.9-12. Mar, 2006.

_____. Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. **Neuroscience**, v.126, n.4, p.839-47, 2004a.

_____. Drugs and aggression. **Recent Pat CNS Drug Discov**, v.3, n.1, p.40-9. Jan, 2008.

_____. Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. **Brain Res Bull**, v.48, n.2, p.173-83. Jan 15, 1999.

_____. Effect of estradiol implanted in the corticomедial amygdala on the sexual behavior of castrated male rats. **Braz J Med Biol Res**, v.24, n.10, p.1041-9, 1991.

_____. Functional activities of the amygdala: an overview. **J Psychiatry Neurosci**, v.25, n.1, p.14-23. Jan, 2000.

_____. Morphological and functional features of the sex steroid-responsive posterodorsal medial amygdala of adult rats. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry** (in press), 2011.

_____. Spine plasticity in the rat medial amygdala. In: Baylog, L.R. editor. **Dendritic Spines: Biochemistry, Modeling and Properties**. Hauppauge: Nova Science Publishers 23, 67-90, 2009.

_____. Mecanismos neurais centrais e periféricos de gênese e controle a curto prazo da pressão arterial: da fisiologia à fisiopatologia. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v.03, 2004b.

RAU, H. & T. ELBERT. Psychophysiology of arterial baroreceptors and the etiology of hypertension. **Biol Psychol**, v.57, n.1-3, p.179-201. Jul-Aug, 2001.

RAY, B., *et al.* Restraint stress and repeated corticotrophin-releasing factor receptor activation in the amygdala both increase amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta peptide but have divergent effects on brain-derived neurotrophic factor and pre-synaptic proteins in the prefrontal cortex of rats. **Neuroscience**, v.184, p.139-50. Jun 16, 2011.

REICHLIN, S. Somatostatin. **N Engl J Med**, v.309, n.24, p.1495-501. Dec 15, 1983 a.

_____. Somatostatin (second of two parts). **N Engl J Med**, v.309, n.25, p.1556-63. Dec 22, 1983 b.

REIS, D. J. & M. C. OLIPHANT. Bradycardia and Tachycardia Following Electrical Stimulation of the Amygdaloid Region in Monkey. **J Neurophysiol**, v.27, p.893-912. Sep, 1964.

_____. Central nitrenergic system regulation of neuroendocrine secretion, fluid intake and blood pressure induced by angiotensin-II. **Behav Brain Funct**, v.6, p.64, 2010.

REUBI, J. C. & R. MAURER. Autoradiographic mapping of somatostatin receptors in the rat central nervous system and pituitary. **Neuroscience**, v.15, n.4, p.1183-93. Aug, 1985.

RETTIG, R., *et al.* Central effects of somatostatin: pressor response, AVP release, and sympathoinhibition. **Am J Physiol**, v.257, n.3 Pt 2, p.R588-94. Sep, 1989.

RETTINGER, J. Characteristics of Na⁺/K⁺-ATPase mediated proton current in Na⁺- and K⁺-free extracellular solutions. Indications for kinetic similarities between H⁺/K⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase. **Biochim Biophys Acta**, v.1282, n.2, p.207-15. Jul 25, 1996.

RICHARDS, A. M. & M. G. NICHOLLS. Aldosterone antagonism in heart failure. **Lancet**, v.354, n.9181, p.789-90. Sep 4, 1999.

ROBBINS, T. W. & B. J. EVERITT. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. **Curr Opin Neurobiol**, v.6, n.2, p.228-36. Apr, 1996.

RODAROS, D., *et al.* Corticotropin-releasing factor projections from limbic forebrain and paraventricular nucleus of the hypothalamus to the region of the ventral tegmental area. **Neuroscience**, v.150, n.1, p.8-13. Nov 30, 2007.

RODRIGUES, M. C., *et al.* Evidence for a role of AT₂ receptors at the CVLM in the cardiovascular changes induced by low-intensity physical activity in renovascular hypertensive rats. **Peptides**, v.28, n.7, p.1375-82. Jul, 2007.

ROOZENDAAL, B., *et al.* Stress, memory and the amygdala. **Nat Rev Neurosci**, v.10, n.6, p.423-33. Jun, 2009 a.

_____. Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. **Neurobiol Learn Mem**, v.65, n.1, p.1-8. Jan, 1996.

_____. Glucocorticoid effects on memory consolidation depend on functional interactions between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala. **J Neurosci**, v.29, n.45, p.14299-308. Nov 11, 2009 b.

SAAD, W. A., *et al.* Interaction between supraoptic nucleus and septal area in the control of water, sodium intake and arterial blood pressure induced by injection of angiotensin II. **Pharmacol Biochem Behav**, v.77, n.4, p.667-74. Apr, 2004.

SAH, P., *et al.* The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiol Rev**, v.83, n.3, p.803-34. Jul, 2003.

SAH, P. & R. F. WESTBROOK. Behavioural neuroscience: The circuit of fear. **Nature**, v.454, n.7204, p.589-90. Jul 31, 2008.

SAHA, S., *et al.* A GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the nucleus of the solitary tract: a combined anterograde tracing and electron microscopic immunohistochemical study. **Neuroscience**, v.99, n.4, p.613-26, 2000.

_____. Central nucleus of amygdala projections to rostral ventrolateral medulla neurones activated by decreased blood pressure. **Eur J Neurosci**, v.21, n.7, p.1921-30. Apr, 2005a.

_____. Role of the central nucleus of the amygdala in the control of blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.32, n.5-6, p.450-6. May-Jun, 2005b.

_____. Somatostatin immunoreactivity in axon terminals in rat nucleus tractus solitarii arising from central nucleus of amygdala: coexistence with GABA and postsynaptic expression of sst2A receptor. **J Chem Neuroanat**, v.24, n.1, p.1-13. Jun, 2002.

SALGADO, H. C., *et al.* Baroreflex responses to electrical stimulation of aortic depressor nerve in conscious SHR. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.292, n.1, p.H593-600. Jan, 2007.

SANTOS, R. A., *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.14, p.8258-63. Jul 8, 2003.

SANVITTO, G. L., *et al.* Water deprivation upregulates ANG II AT1 binding and mRNA in rat subfornical organ and anterior pituitary. **Am J Physiol**, v.273, n.1 Pt 1, p.E156-63. Jul, 1997.

SHAPIRO, B. A., *et al.* Angiotensin II-activated protein kinase D mediates acute aldosterone secretion. **Mol Cell Endocrinol**, v.317, n.1-2, p.99-105. Apr 12, 2010.

SHAPIRO, M. S., *et al.* Angiotensin II inhibits calcium and M current channels in rat sympathetic neurons via G proteins. **Neuron**, v.12, n.6, p.1319-29. Jun, 1994.

SHUGHRUE, P. J., *et al.* Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. **J Comp Neurol**, v.388, n.4, p.507-25. Dec 1, 1997.

SAJDYK, T. J. & A. SHEKHAR. Excitatory amino acid receptors in the basolateral amygdala regulate anxiety responses in the social interaction test. **Brain Res**, v.764, n.1-2, p.262-4. Aug 1, 1997.

SALEH, T. M. & B. J. CONNELL. Central nuclei mediating estrogen-induced changes in autonomic tone and baroreceptor reflex in male rats. **Brain Res**, v.961, n.2, p.190-200. Jan 31, 2003.

SATO, K., *et al.* Severe bradycardia during epilepsy surgery. **J Neurosurg Anesthesiol**, v.13, n.4, p.329-32. Oct, 2001.

SAVOIA, C., *et al.* Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. **Expert Rev Mol Med**, v.13, p.e11, 2011a.

_____. Angiotensin type 2 receptor in hypertensive cardiovascular disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.20, n.2, p.125-32. Mar, 2011b.

_____. Angiotensin receptor modulation and cardiovascular remodeling. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.12, n.3, p.381-4. Sep, 2011.

SAVONENKO, A., *et al.* Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. **Neuroscience**, v.94, n.3, p.723-33, 1999.

SAWCHENKO, P. E., *et al.* The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. **Prog Brain Res**, v.107, p.201-22, 1996.

SCHAFFAR, N., *et al.* Immunohistochemical detection of glutamate in rat vagal sensory neurons. **Brain Res**, v.778, n.2, p.302-8. Dec 19, 1997.

SCHINDLER, M., *et al.* Immunohistochemical localization of the somatostatin sst2(b) receptor splice variant in the rat central nervous system. **Neuroscience**, v.90, n.3, p.859-74. Mar, 1999.

_____. Somatostatin receptors in the central nervous system. **Prog Neurobiol**, v.50, n.1, p.9-47. Sep, 1996.

SCHUMANN, C. M., *et al.* Abnormal structure or function of the amygdala is a common component of neurodevelopmental disorders. **Neuropsychologia**, v.49, n.4, p.745-59. Mar, 2011.

SHARMA, N. B. & A. J. GELSEMA. Central nucleus of the amygdala and the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol**, v.268, n.5 Pt 2, p.R1171-7. May, 1995.

SHEEHAN, T., *et al.* Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. **Neuroscience**, v.106, n.2, p.341-56, 2001.

SHIRASU, M., *et al.* Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the mesencephalic trigeminal nucleus in rats. **Brain Res**, v.1400, p.19-30. Jul 11, 2011.

SHIN, J. W., *et al.* Inputs to the ventrolateral bed nucleus of the stria terminalis. **J Comp Neurol**, v.511, n.5, p.628-57. Dec 10, 2008.

SIEHLER, S., *et al.* Pharmacological profile of somatostatin and cortistatin receptors. **Mol Cell Endocrinol**, v.286, n.1-2, p.26-34. May 14, 2008.

SIERRA-MERCADO, D., *et al.* Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology**, v.36, n.2, p.529-38. Jan, 2011.

SILVERMAN, A. J., *et al.* The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). **Brain Res Bull**, v.6, n.1, p.47-61. Jan, 1981.

SIMERLY, R. B. Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: Paxinos, G. **The Rat Nervous System**, v. San Diego: Academic Press, 03, n.14, p.335-368, 2004.

SIMMONS, D. A. & P. YAHR. Distribution of catecholaminergic and peptidergic cells in the gerbil medial amygdala, caudal preoptic area and caudal bed nuclei of the stria terminalis with a focus on areas activated at ejaculation. **J Chem Neuroanat**, v.41, n.1, p.13-9. Jan, 2011.

_____. GABA and glutamate in mating-activated cells in the preoptic area and medial amygdala of male gerbils. **J Comp Neurol**, v.459, n.3, p.290-300. May 5, 2003.

SINGEWALD, N., *et al.* Modulation of basal and stress-induced amygdaloid substance P release by the potent and selective NK1 receptor antagonist L-822429. **J Neurochem**, v.106, n.6, p.2476-88. Sep, 2008.

_____. Release of glutamate and GABA in the amygdala of conscious rats by acute stress and baroreceptor activation: differences between SHR and WKY rats. **Brain Res**, v.864, n.1, p.138-41. May 2, 2000.

SMITH, B. N. & F. E. DUDEK. Amino acid-mediated regulation of spontaneous synaptic activity patterns in the rat basolateral amygdala. **J Neurophysiol**, v.76, n.3, p.1958-67. Sep, 1996.

SMOCK, T., *et al.* A peptidergic basis for sexual behavior in mammals. **Prog Brain Res**, v.119, p.467-81, 1998.

SOLOMON, M. B., *et al.* The medial amygdala modulates body weight but not neuroendocrine responses to chronic stress. **J Neuroendocrinol**, v.22, n.1, p.13-23. Jan, 2010.

SPALLONE, V. & G. MENZINGER. Diagnosis of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes. **Diabetes**, v.46 Suppl 2, p.S67-76. Sep, 1997.

SPAMPANATO, J., *et al.* Interneurons in the basolateral amygdala. **Neuropharmacology**, v.60, n.5, p.765-73. Apr, 2011.

SPYER, K. M. Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. **J Physiol**, v.474, n.1, p.1-19. Jan 1, 1994.

_____. Vagal preganglionic neurons innervating the heart. In: Page, E., Fozzard, H. A., Solaro, R. J. **Handbook of Physiology. The Cardiovascular System**, v. New York: Oxford University Press, p.213-239, 2002.

_____. Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.364, n.1529, p.2603-10. Sep 12, 2009.

STECKELINGS, U. M., *et al.* Non-peptide AT₂-receptor agonists. **Curr Opin Pharmacol**, v.11, n.2, p.187-92. Apr, 2011.

STEELE, M. K., *et al.* A possible role for the brain renin-angiotensin system in the regulation of LH secretion. **Am J Physiol**, v.245, n.6, p.R805-10. Dec, 1983.

_____. Effects of angiotensin II on LHRH release, as measured by in vivo microdialysis of the anterior pituitary gland of conscious female rats. **Neuroendocrinology**, v.55, n.3, p.276-81. Mar, 1992.

_____. Stimulatory or inhibitory effects of angiotensin II upon LH secretion in ovariectomized rats: a function of gonadal steroids. **Neuroendocrinology**, v.40, n.3, p.210-6. Mar, 1985.

_____. The role of brain angiotensin II in the regulation of Luteinizing Hormone and Prolactin secretion. **Trends Endocrinol Metab**, v.3, n.8, p.295-301. Oct, 1992.

STRAGIER, B., *et al.* In vivo characterization of the angiotensin-(1-7)-induced dopamine and gamma-aminobutyric acid release in the striatum of the rat. **Eur J Neurosci**, v.22, n.3, p.658-64. Aug, 2005.

_____. Involvement of insulin-regulated aminopeptidase in the effects of the renin-angiotensin fragment angiotensin IV: a review. **Heart Fail Rev**, v.13, n.3, p.321-37. Sep, 2008.

_____. Involvement of the somatostatin-2 receptor in the anti-convulsant effect of angiotensin IV against pilocarpine-induced limbic seizures in rats. **J Neurochem**, v.98, n.4, p.1100-13. Aug, 2006.

_____. Interaction of osmotic and volume stimuli in regulation of neurohypophyseal secretion in rats. **Am J Physiol**, v.250, n.2 Pt 2, p.R267-75. Feb, 1986.

_____. Inhibition of salt appetite in rats by central oxytocin. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.287, n.2, p.R487; author reply R487-8. Aug, 2004.

STUBER, G. D., *et al.* Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. **J Neurosci**, v.30, n.24, p.8229-33. Jun 16, 2010.

SUMMY-LONG, J. Y., *et al.* Signals indicative of metabolic change in circumventricular organs. **Prog Brain Res**, v.91, p.235-46, 1992.

SWANSON, L. W. Quest for the basic plan of nervous system circuitry. **Brain Res Rev**, v.55, n.2, p.356-72. Oct, 2007.

_____. The connections of the septal region in the rat. **J Comp Neurol**, v.186, n.4, p.621-55. Aug 15, 1979.

_____. What is the amygdala? **Trends Neurosci**, v.21, n.8, p.323-31. Aug, 1998.

- TAKENAKA, K., *et al.* GABAB-ergic stimulation in hypothalamic pressor area induces larger sympathetic and cardiovascular depression in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens**, v.9, n.10 Pt 1, p.964-72. Oct, 1996.
- TANAKA, K. Function of glutamate transporters in the brain. **Neurosci Res**, v.37, p.15-19. May, 2000.
- TAPIERO, H., MATHÉ, G., COUVREUR, P., TEW, K. D. Glutamine and glutamate. **Bio Pharmacother**, v.56, p.446-457. Aug, 2002.
- TASAN, R. O., *et al.* The central and basolateral amygdala are critical sites of neuropeptide Y/Y2 receptor-mediated regulation of anxiety and depression. **J Neurosci**, v.30, n.18, p.6282-90. May 5, 2010.
- THAMES, M. D., *et al.* Mechanism of arterial baroreflex control. In: Levy, M. N., Schwartz, P. J. Vagal control of the heart: experimental basis and clinical implications. **Futura Publishing Company, Inc**, v.369-380, 1994.
- TIMMERS, H. J., *et al.* Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans. **J Physiol**, v.553, n.Pt 1, p.3-11. Nov 15, 2003.
- TIMO-IARIA, C. Organização Geral do Sistema Nervoso. In: Canelas, H.M., Assis, J.L., Scaff, M. **Fisiopatologia do Sistema Nervoso**, São Paulo: Sarvier, p.453-470, 1983.
- _____. Comportamentos. In: Aires, M. M. **Fisiologia Básica**, v.Guanabara; Rio de Janeiro, p.163-300, 1988.
- _____. Sistemas neurovegetativos. In: Aires, M. **Fisiologia**, v.Rio de Janeiro, Brazil: Guanabara Koogan, p.289-314, 1999.
- TERUYA, H., *et al.* Brain angiotensin II contributes to the development of hypertension in Dahl-Iwai salt-sensitive rats. **J Hypertens**, v.13, n.8, p.883-90. Aug, 1995.
- TOBIN, V. A., *et al.* Increased sensitivity of monoamine release in the supraoptic nucleus in late pregnancy: region- and stimulus-dependent responses. **J Neuroendocrinol**, v.22, n.5, p.430-7. May, 2010.
- TOUYZ, R. M. & E. L. SCHIFFRIN. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **Pharmacol Rev**, v.52, n.4, p.639-72. Dec, 2000.
- TOYODA, H., *et al.* Interplay of amygdala and cingulate plasticity in emotional fear. **Neural Plast**, v.2011, p.813749, 2011.
- TSUCHIHASHI, T., *et al.* Cardiovascular responses to glutamate and angiotensin II in ventrolateral medulla of hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide. **Hypertens Res**, v.23, n.4, p.359-64. Jul, 2000.

- TUUNANEN, J., *et al.* Decrease in somatostatin-immunoreactive neurons in the rat amygdaloid complex in a kindling model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**, v.26, n.2, p.315-27. Jan, 1997.
- TURNER, S. A., *et al.* Cardiovascular regulation. In: Lightman, S.L., Everitt, B.J. **Neuroendocrinology**, Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.331-359, 1986.
- TRAYNELIS, S. F., *et al.* Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacol Rev**, v.62, n.3, p.405-96. Sep, 2010.
- TRIBOLLET, E. & J. J. DREIFUSS. Localization of neurones projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus area of the rat: a horseradish peroxidase study. **Neuroscience**, v.6, n.7, p.1315-28, 1981.
- TRIBOLLET, E., *et al.* Autoradiographic localization of vasopressin and oxytocin binding sites in rat kidney. **Kidney Int**, v.33, n.5, p.959-65. May, 1988.
- UHL, G. R., *et al.* Somatostatin receptors: distribution in rat central nervous system and human frontal cortex. **J Comp Neurol**, v.240, n.3, p.288-304. Oct 15, 1985.
- USCHAKOV, A., *et al.* Functional correlates of activity in neurons projecting from the lamina terminalis to the ventrolateral periaqueductal gray. **Eur J Neurosci**, v.30, n.12, p.2347-55. Dec, 2009.
- UVNAS-MOBERG, K., *et al.* Oxytocin increases and a specific oxytocin antagonist decreases pain threshold in male rats. **Acta Physiol Scand**, v.144, n.4, p.487-8. Apr, 1992 a.
- _____. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. **Psychoneuroendocrinology**, v.23, n.8, p.819-35. Nov, 1998.
- _____. Oxytocin reduces exploratory motor behaviour and shifts the activity towards the centre of the arena in male rats. **Acta Physiol Scand**, v.145, n.4, p.429-30. Aug, 1992 b.
- VARDHAN, A., *et al.* Excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarius mediate the responses to the stimulation of cardio-pulmonary vagal afferent C fiber endings. **Brain Res**, v.618, n.1, p.23-31. Jul 30, 1993.
- VEINANTE, P. & M. J. FREUND-MERCIER. Distribution of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the rat extended amygdala: a histoautoradiographic study. **J Comp Neurol**, v.383, n.3, p.305-25. Jul 7, 1997.
- VERBALIS, J. G., *et al.* In vitro release of vasopressin and oxytocin from rat median eminence tissue. **Neuroendocrinology**, v.42, n.6, p.481-8, 1986 a.
- _____. Osmotic regulation of plasma vasopressin and oxytocin after sustained hyponatremia. **Am J Physiol**, v.250, n.3 Pt 2, p.R444-51. Mar, 1986 b.
- _____. Oxytocin secretion in response to cholecystokinin and food: differentiation of nausea from satiety. **Science**, v.232, n.4756, p.1417-9. Jun 13, 1986 c.

_____. Oxytocin and vasopressin secretion in response to stimuli producing learned taste aversions in rats. **Behav Neurosci**, v.100, n.4, p.466-75. Aug, 1986 d.

VEZZANI, A. & D. HOYER. Brain somatostatin: a candidate inhibitory role in seizures and epileptogenesis. **Eur J Neurosci**, v.11, n.11, p.3767-76. Nov, 1999.

VIARD, E. & H. N. SAPRU. Cardiovascular responses to activation of metabotropic glutamate receptors in the nTS of the rat. **Brain Res**, v.952, n.2, p.308-21. Oct 18, 2002.

VIERO, C., *et al.* Molecular Analysis of the Differentiation Potential of Murine Mesenchymal Stem Cells from Tissues of Endodermal or Mesodermal Origin. **Stem Cells Dev**. Oct 4, 2011.

_____. REVIEW: Oxytocin: Crossing the bridge between basic science and pharmacotherapy. **CNS Neurosci Ther**, v.16, n.5, p.e138-56. Oct, 2010.

VINADER-CAEROLS, C., *et al.* Sex differences in the posteromedial cortical nucleus of the amygdala in the rat. **Neuroreport**, v.9, n.11, p.2653-6. Aug 3, 1998.

VIOLLET, B. & F. ANDREELLI. AMP-activated protein kinase and metabolic control. **Handb Exp Pharmacol**, n.203, p.303-30, 2011.

_____. Somatostatinergic systems in brain: networks and functions. **Mol Cell Endocrinol**, v.286, n.1-2, p.75-87. May 14, 2008.

VOCHTELOO, J. D. & J. M. KOOLHAAS. Medial amygdala lesions in male rats reduce aggressive behavior: interference with experience. **Physiol Behav**, v.41, n.2, p.99-102, 1987.

VON BOHLEN UND HALBACH, O. & D. ALBRECHT. The CNS renin-angiotensin system. **Cell Tissue Res**, v.326, n.2, p.599-616. Nov, 2006.

_____. Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala. **J Neurophysiol**, v.83, n.4, p.2012-21. Apr, 2000.

WALDHERR, M., *et al.* Attenuation of the neuronal stress responsiveness and corticotrophin releasing hormone synthesis after sexual activity in male rats. **Horm Behav**, v.57, n.2, p.222-9. Feb, 2010.

WANG, B. R., *et al.* Angiotensin II does not directly affect Abeta secretion or beta-/gamma-secretase activity via activation of angiotensin II type 1 receptor. **Neurosci Lett**, v.500, n.2, p.103-7. Aug 15, 2011.

_____. Synaptic and neurotransmitter activation of cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. **Ann N Y Acad Sci**, v.940, p.237-46. Jun, 2001.

_____. Arginine vasopressin enhances GABAergic inhibition of cardiac parasympathetic neurons in the nucleus ambiguus. **Neuroscience**, v.111, n.3, p.699-705, 2002.

WATANABE, M. A., *et al.* Angiotensin II and CRF receptors in the central nucleus of the amygdala mediate hemodynamic response variability to cocaine in conscious rats. **Brain Res**, v.1309, p.53-65. Jan 14, 2010.

WIGGER, A. & I. D. NEUMANN. Endogenous opioid regulation of stress-induced oxytocin release within the hypothalamic paraventricular nucleus is reversed in late pregnancy: a microdialysis study. **Neuroscience**, v.112, n.1, p.121-9, 2002.

WINDLE, R. J., *et al.* Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. **Endocrinology**, v.138, n.7, p.2829-34. Jul, 1997.

_____. Oxytocin attenuates stress-induced c-fos mRNA expression in specific forebrain regions associated with modulation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity. **J Neurosci**, v.24, n.12, p.2974-82. Mar 24, 2004.

WOOD, R. I. & S. W. NEWMAN. The medial amygdaloid nucleus and medial preoptic area mediate steroidal control of sexual behavior in the male Syrian hamster. **Horm Behav**, v.29, n.3, p.338-53. Sep, 1995.

WOTJAK, C. T., *et al.* Forced swimming stimulates the expression of vasopressin and oxytocin in magnocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. **Eur J Neurosci**, v.13, n.12, p.2273-81. Jun, 2001.

_____. Dissociated central and peripheral release of vasopressin, but not oxytocin, in response to repeated swim stress: new insights into the secretory capacities of peptidergic neurons. **Neuroscience**, v.85, n.4, p.1209-22. Aug, 1998.

WRIGHT, J. W. & J. W. HARDING. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. **Brain Res Brain Res Rev**, v.17, n.3, p.227-62. Sep-Dec, 1992.

WSOL, A., *et al.* Central oxytocin modulation of acute stress-induced cardiovascular responses after myocardial infarction in the rat. **Stress**, v.12, n.6, p.517-25. Nov, 2009.

YILMAZER-HANKE, D. M., *et al.* Anxiety-related behavior and densities of glutamate, GABAA, acetylcholine and serotonin receptors in the amygdala of seven inbred mouse strains. **Behav Brain Res**, v.145, n.1-2, p.145-59. Oct 17, 2003.

YOUNG, B. J. & R. N. LEATON. Amygdala central nucleus lesions attenuate acoustic startle stimulus-evoked heart rate changes in rats. **Behav Neurosci**, v.110, n.2, p.228-37. Apr, 1996.

_____. Oxytocin and vasopressin as candidate genes for psychiatric disorders: lessons from animal models. **Am J Med Genet**, v.105, n.1, p.53-4. Jan 8, 2001.

XUE, B., *et al.* Central interactions of aldosterone and angiotensin II in aldosterone- and angiotensin II-induced hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.300, n.2, p.H555-64. Feb, 2011.

ZABORSZKY, L. The modular organization of brain systems. Basal forebrain: the last frontier. **Prog Brain Res**, v.136, p.359-72, 2002.

ZHENG, H., *et al.* Somatostatin receptor subtype 2 knockout mice are refractory to growth hormone-negative feedback on arcuate neurons. **Mol Endocrinol**, v.11, n.11, p.1709-17. Oct, 1997.

ZINGG, H. H. & S. A. LAPORTE. The oxytocin receptor. **Trends Endocrinol Metab**, v.14, n.5, p.222-7. Jul, 2003.

ZIMMERMAN, B. G. Adrenergic facilitation by angiotensin: does it serve a physiological function? **Clin Sci (Lond)**, v.60, n.4, p.343-8. Apr, 1981

_____. Interaction between sympathetic and renin-angiotensin system. **J Hypertens**, v.2, n.6, p.581-7. Dec, 1984.

_____. The bed nucleus of the stria terminalis is required for the expression of contextual but not auditory freezing in rats with basolateral amygdala lesions. **Neurobiol Learn Mem**, v.95, n.2, p.199-205. Feb, 2011.

ZUCKER, I. H. & M. C. ZIMMERMAN. The renin-angiotensin system in 2011: new avenues for translational research. **Curr Opin Pharmacol**, v.11, n.2, p.101-4. Apr, 2011.

15 ANEXOS

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Efeito da microinjeção de angiotensina II, L-Arginina, Ocitocina, Somatostatina e Vasopressina no núcleo póstero-dorsal da amígdala medial sobre o controle da pressão arterial de ratos

Pesquisador Responsável Alberto Antônio Rasia Filho

Parecer 432/07/07

Data da Versão 04/06/2007

Cadastro 256-07

Data do Parecer 14/06/2007

Grupo e Área Temática Classificação utilizada pela CONEP

Objetivos do Projeto

- Estudar a atividade cardiovascular basal quanto aos parâmetros de FC e PA em animais não anestesiados após a microinjeção diretamente na AMePD de salina, angiotensina II, L-arginina, ocitocina, somatostatina ou vasopressina.
 - Avaliar a resposta cardiovascular reflexa de FC e PA desencadeada pela estimulação dos barorreceptores (pela utilização de fenilefrina e nitroprussiato de sódio) e quimiorreceptores (pelo emprego de cianeto de potássio) em animais não anestesiados após microinjeção diretamente na AMePD de salina, angiotensina II, L-arginina, ocitocina, somatostatina ou vasopressina. - Determinar a variabilidade nas respostas cardiovasculares de FC e PA desencadeadas pela microinjeção diretamente na AMePD de salina, angiotensino II, L-arginina, ocitocina, somatostatina ou vasopressina valendo-se de análise espectral dos dados obtidos nos mesmos animais estudados nas condições acima mencionadas

Sumário do Projeto

A proposta do projeto é avaliar o efeito da microinjeção de angiotensina II, L-arginina, ocitocina, somatostatina e vasopressina no núcleo medial póstero-dorsal (AMePD) de ratos não anestesiados sobre controle cardiovascular em situação basal e após modificação desencadeada pela estimulação dos barorreceptores e quimiorreceptores. Ratos machos Wistar (3 meses de idade) serão mantidos em condições padrão de biotério e cuidados éticos. Os animais serão anestesiados e submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula na AMePD direita. No quinto dia pós-cirúrgico, os animais serão novamente anestesiados e submetidos à colocação de cateter de polietileno no interior da artéria aorta abdominal e da veia cava inferior. Um dia após a canulação dos vasos, os animais serão microinjetados na AMePD com solução salina, angiotensina II, L-arginina ocitocina, somatostatina ou vasopressina, conforme cada grupo experimental a ser estudado. Dados de frequência cardíaca (FC) e de pressão arterial (PA) serão gravados por 3 minutos em período basal controle e, a seguir, serão microinjetadas as substâncias mencionadas e testadas as variáveis de interesse. Os reflexos pressores serão testados pela injeção endovenosa de fenilfrina (doses crescentes desde 0,25 até 32mcg/kg) e nitroprussiato de sódio (doses crescentes desde 2,5 até 100mcg/kg) e os quimiorreceptores, pelo cianeto de potássio (doses crescentes desde 60 até 180 mcg/kg). O modelo autoregressivo de análise espectral será utilizado para avaliar a variabilidade da FC e da PA e as atividades simpática e vagal. Os dados serão comparados pelo teste de análise da variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas e pelo teste post hoc de Newman-Keuls ou pela ANOVA de uma via e pelo teste de Tukey, conforme apropriado. O nível de significância será estabelecido em $p < 0,05$.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 72 Local
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Crítérios de inclusão e exclusão	Ausentes
Relação risco- benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	06/2007
Data de término prevista	12/2011
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Ratificar o número total de animais igual a 720 apresentado no formulário padrão do Comitê de Ética em Pesquisa da FFFCMPA para encaminhamento de projeto de pesquisa em experimentação animal no tópico Quanto à solicitação de animais para 72 e também acrescentar no projeto o valor total da amostra e não somente o número de animais por grupo.