



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

**EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE GLUTAMATO E GABA NO  
NÚCLEO PÓSTERO-DORSAL DA AMÍGDALA MEDIAL SOBRE O  
CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS**

**HELINTON NECKEL**

**PORTO ALEGRE  
2007**



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

**EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE GLUTAMATO E GABA NO  
NÚCLEO PÓSTERO-DORSAL DA AMÍGDALA MEDIAL SOBRE O  
CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS**

**Helinton Neckel**

**Orientador: Prof. Dr. Alberto Antônio Rasia Filho  
Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro Dall'Ago**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

**PORTO ALEGRE  
2007**

“Não se pode ensinar tudo a alguém,  
pode-se apenas ajudá-lo a encontrar por si  
mesmo”.

**Galileu Galilei**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Alberto Rasia Filho e Prof. Dr. Pedro Dall'Ago, minha total gratidão pelo incentivo, oportunidade, paciência, confiança e orientação.

Aos meus colegas do laboratório de Fisiologia da FFFCMPA, em especial Aline Dal'Oglio, Carolina Böettge, Diego F. Mendes Riveiro, Edson Quagliotto, Luciana Rizzieri, Ramiro Barcos e Simone Marcuzzo pelas sugestões, colaboração e, principalmente, a amizade.

À Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen pela gentileza da colaboração técnica indispensável para a realização deste estudo.

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 .

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

Às técnicas do laboratório de Fisiologia e Bioquímica Carmen Rocha e Rosângela Bjerck no preparo de alguns dos materiais empregados.

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

À minha família pela total dedicação e compreensão tanto nas horas boas quanto nas difíceis, principalmente pelo apoio recebido.

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

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

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

## SUMÁRIO

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 AMÍGDALA .....	14
1.2 CONTROLE NEURAL DO SISTEMA CARDIOVASCULAR .....	24
1.3 GLUTAMATO E GABA .....	30
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
2.1 GERAIS.....	34
2.2 ESPECÍFICOS .....	35
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
3.1 ANIMAIS.....	36
3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA .....	36
3.3 CANULAÇÃO ARTERIAL E VENOSA .....	38
3.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS BARORRECEPTORES .....	40
3.5 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS QUIMIORRECEPTORES .....	41
3.6 PERFUSÃO CARDÍACA E ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	42
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>66</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>
<b>9 ANEXO I .....</b>	<b>83</b>

## **ABREVIATURAS**

AA	Amígdala anterior
AAP	Área amigdalar piriforme
ABL	Amígdala basolateral
ABLa	Amígdala basolateral anterior
ABLI	Amígdala basolateral lateral
ABLp	Amígdala basolateral posterior
ABMa	Amígdala basomedial anterior
ABMp	Amígdala basomedial posterior
ACe	Amígdala central
ACOa	Amígdala cortical anterior
ACOm	Amígdala cortical medial
ACOl	Amígdala cortical lateral
ACOp	Amígdala cortical posterior
ACOpm	Amígdala cortical póster-medial
ACOpl	Amígdala cortical póstero-lateral
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AL	Amígdala lateral
AMe	Amígdala medial

AMeAD	Amígdala medial ântero-dorsal
AMeAV	Amígdala medial ântero-ventral
AMePD	Amígdala medial póstero-dorsal
AMePDI	Amígdala medial póstero-dorsal lateral
AMePDi	Amígdala medial póstero-dorsal intermediária
AMePDM	Amígdala medial póstero-dorsal medial
AMePV	Amígdala medial póstero-ventral
AOB	Bulbo olfativo acessório
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 póstero-intermediária do núcleo próprio da estria terminal
BSTpm	Porção póstero-medial do núcleo próprio da estria terminal
BVL	Bulbo ventrolateral
BVLc	Bulbo ventrolateral caudal
BVml	Bulbo ventromedial lateral
BVLr	Bulbo ventrolateral rostral
DMV	Núcleo motor dorsal do vago
DP	Desvio padrão
FC	Frequência cardíaca
G	Ganho médio ou sensibilidade média do barorreflexo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Glu	Glutamato
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
iGluRs	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos



mGluRs	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
NA	Núcleo ambíguo
NPB	Núcleo parabraquial
NTS	Núcleo do trato solitário
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
Pb	Platô de bradicardia
Pa	Núcleo paraventricular
PA <sub>50</sub>	Valor de PA no ponto de maior inclinação da curva de PA.
Pe	Núcleo periventricular
PM	Núcleo pré-mamilar
PMV	Núcleo pré-mamilar ventral
Pt	Platô de taquicardia
RPT	Resistência periférica total
SN	Sistema nervoso
ST	Estria terminal
TO	Trato óptico
VMH	Núcleo ventromedial

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Classificação dos núcleos que compõe a amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais..... 17
- FIGURA 2** Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar os quatros subnúcleos da amígdala medial ..... 19
- 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..... 21
- FIGURA 4** Fotomicrografia de corte coronal do encéfalo do rato para identificação do trajeto da cânula implantada para microinjeções na porção superior da amígdala medial pósterodorsal ..... 37
- FIGURA 5** Média ( $\pm$  DP) da variação da frequência cardíaca nos grupos estudados em situação basal, pré-microinjeção, e após a microinjeção de salina, glutamato na dose de 45 nM e de gaba nas doses de 2 nM ou 3  $\mu$ M na amígdala medial pósterodorsal de ratos ..... 47
- FIGURA 6** Média ( $\pm$  DP) da variação da pressão arterial sistólica nos grupos estudados em situação basal, pré-microinjeção, e após a microinjeção de salina, glutamato na dose de 45 nM e de GABA nas doses de 2 nM ou 3  $\mu$ M na amígdala medial pósterodorsal de ratos ..... 48
- FIGURA 7** Média ( $\pm$  DP) da variação da pressão arterial diastólica nos grupos estudados em situação basal, pré-microinjeção, e após a microinjeção de salina, glutamato na dose de 45 nM e de GABA nas doses de 2 nM ou 3  $\mu$ M na amígdala medial pósterodorsal de ratos. .... 49
- FIGURA 8** Média ( $\pm$  DP) da variação da pressão arterial média nos grupos estudados em situação basal, pré-microinjeção, e após a microinjeção de salina, glutamato na dose de 45 nM e de GABA nas doses de 2 nM ou 3  $\mu$ M na amígdala medial pósterodorsal de ratos ..... 50
- FIGURA 9** Média ( $\pm$  DP) da variação da diferença do valor de pressão arterial no ponto de maior inclinação da curva ( $PA_{50}$ ) obtida após microinjeção de salina, glutamato na dose

de 45 nM e de GABA nas doses de 2 nM ou 3  $\mu$ M na amígdala medial pósterodorsal de ratos ..... 51

**FIGURA 10** Média ( $\pm$  DP) da variação da diferença entre a resposta de queda máxima da frequência cardíaca (em bpm) induzido pelo aumento da pressão arterial (em mmHg; platô de bradicardia) obtida após a microinjeção de salina, glutamato na dose de 45 nM e de GABA nas doses de 2 nM ou 3  $\mu$ M na amígdala medial pósterodorsal de ratos ..... 52

**FIGURA 11** Média ( $\pm$  DP) da variação da diferença entre a resposta de aumento máximo da frequência cardíaca (em bpm) induzido pelo decréscimo da pressão arterial (em mmHg; platô de taquicardia) obtida após a microinjeção de salina, glutamato na dose de 45 nM e de GABA nas doses de 2 nM ou 3  $\mu$ M na amígdala medial pósterodorsal de ratos ..... 53

**FIGURA 12** Média ( $\pm$  DP) da variação da diferença da sensibilidade média do barorreflexo (“Ganho”, bpm/mmHg) obtida após microinjeção de salina, glutamato na dose de 45 nM e de GABA nas doses de 2 nM ou 3  $\mu$ M na amígdala medial pósterodorsal de ratos..... 54

**FIGURA 13** Média ( $\pm$  DP) da variação da diferença da amplitude da frequência cardíaca (em bpm) obtida após microinjeção de salina, glutamato na dose de 45 nM e de GABA nas doses de 2 nM ou 3  $\mu$ M na amígdala medial pósterodorsal de ratos..... 55

**FIGURA 14** Análise da curva da modificação da pressão arterial média de acordo com a variação da frequência cardíaca, como teste da resposta reflexa mediada pelos pressorreceptores, após microinjeção de salina, glutamato na dose de 45 nM e de GABA nas doses de 2 nM ou 3  $\mu$ M na amígdala medial pósterodorsal de ratos ..... 56

**FIGURA 15** Média ( $\pm$  DP) da variação da frequência cardíaca obtidos após injeção sistêmica de diferentes doses de KCN nos animais microinjetados com salina, glutamato na dose de 45 nM e de GABA nas doses de 2 nM ou 3  $\mu$ M na amígdala medial pósterodorsal de ratos ..... 57

**FIGURA 16** Média ( $\pm$  DP) da variação da pressão arterial média obtidos após injeção sistêmica de diferentes doses de KCN nos animais microinjetados com salina, glutamato na dose de 45 nM e de GABA nas doses de 2 nM ou 3  $\mu$ M na amígdala medial pósterodorsal de ratos ..... 58

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A amígdala medial (AMe) modula comportamentos sociais e respostas a estímulos estressantes. Para tanto são necessários ajustes homeostáticos concomitantes, inclusive da função cardiovascular. Dada sua notável presença na AMe, glutamato (Glu) e GABA poderiam estar envolvidos na regulação da atividade cardíaca e da pressão arterial (PA). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da microinjeção de Glu e GABA no núcleo medial pósterodorsal (AMePD) de ratos não anestesiados sobre o controle cardiovascular em situação basal e após estimulação dos barorreceptores e quimiorreceptores.

**MÉTODOS:** 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 de cânula na AMePD direita. No quinto dia pós-cirúrgico, os animais foram 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 ( $n = 7$  em cada grupo respectivo) foram microinjetados na AMePD com solução salina (0,3  $\mu$ l), glutamato na dose de 45 nM/0,3  $\mu$ l e GABA nas doses de 2 nM/0,3  $\mu$ l ou 3  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l. Dados de frequência cardíaca (FC) e de PA foram obtidos por 3 minutos em período basal (controle) e, a seguir, foram microinjetadas as substâncias mencionadas e testadas as variáveis de interesse. Os reflexos pressores foram testados pela injeção de fenilefrina (8  $\mu$ g/ml) e nitroprussiato de sódio (100  $\mu$ g/ml) e os quimiorreceptores pela injeção de cianeto de potássio (KCN, doses crescentes desde 60 até 180  $\mu$ g/kg). Os dados foram 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 estatística foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

**RESULTADOS:** Não houve diferença entre os grupos estudados nos valores de FC, PA

sistólica, PA diastólica e PA média em situação basal ou em decorrência das diferentes microinjeções nos grupos estudados ( $p > 0,05$ ). Glutamato e GABA microinjetados na AMePD também não geraram nenhuma diferença significativa na FC ou na PA ou após a estimulação dos quimiorreceptores com KCN nas diferentes doses empregadas ( $p > 0,05$ ). Porém, na comparação dos valores referentes ao platô de taquicardia, ou seja, a resposta máxima de FC induzida pelo decréscimo da PA mediada pelos barorreceptores após estimulação da atividade reflexa com nitroprussiato de sódio, houve diferenças significativas quando comparados os valores obtidos entre o grupo que foi microinjetado com GABA na dose de 2 nM em relação ao grupo controle (salina) ou ao que recebeu GABA na dose de 3  $\mu$ M ( $p < 0,05$  em ambos os casos). Da mesma forma, na avaliação do ganho médio ou sensibilidade média do barorreflexo, após estimulação reflexa mediada pelos barorreceptores, houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os dados do grupo que recebeu salina e os demais grupos experimentais que receberam glutamato 45nM ou GABA em ambas as doses (menores após microinjeções de glutamato ou GABA,  $p < 0,01$  em todos os casos). **DISCUSSÃO:** A AMePD, por ação de glutamato e GABA, modula respostas pressóricas reflexas e participa do controle central da PA. Tais dados, ainda inéditos, podem indicar que a AMePD se vale também de sua atividade glutamatérgica e GABAérgica local por circuitaria própria ou devido a aferências neurais para modificar variáveis cardiovasculares, provavelmente de forma concomitante à organização de comportamentos. O papel, no entanto, desses neurotransmissores químicos em condição fisiológica e/ ou patológica depende de trabalhos futuros.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 AMÍGDALA

O termo amígdala, ou complexo amigdaliano<sup>1</sup>, adveio de estudos anatômicos em primatas nos quais vários núcleos localizados 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; SWANSON; PETROVICH, 1998; NEWMAN, 2002, PITKÄNEN *et al.*, 2000).

No encéfalo de ratos a amígdala constitui-se de núcleos subcorticais interconectados que se situam no lobo temporal, lateral ao hipotálamo e ventral ao estriado (ALHEID *et al.*, 1999; EVERITT *et al.*, 1995; SWANSON; PETROVICH, 1998; OLMOS *et al.*, 2004). Estudos em ratos demonstram que ela se situa 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). A amígdala é composta por núcleos e subnúcleos que formam uma complexa rede estrutural inter-relacionada e multifuncional, anatomicamente e funcionalmente heterogênea, uma vez que está envolvida na modulação de diversos

<sup>1</sup> Embora a terminologia anatômica nomeie esta estrutura como “corpo amígdaloide” na parte basilar do telencéfalo, por definição encontrada em dicionário da língua portuguesa, “amigdaliano” é algo relativo ou pertencente à amígdala, enquanto “amígdaloide” é semelhante à amígdala. Por isso, seguir-se-á a utilização de amigdaliano, por adequado à intenção do que se quer comentar (RASIA-FILHO; HILBIG, 2005).

comportamentos e ajustes de variáveis orgânicas (ALHEID *et al.*, 1995; EVERITT, 1995; PAXINOS; WATSON, 1998; SWANSON; PETROVICH, 1998; PETROVICH *et al.*, 2001; RASIA FILHO *et al.*, 2000, 2004a). Logo, a amígdala *per se* não é nem uma unidade anatômica, nem funcional (SWANSON; PETROVICH, 1998).

Ao longo do tempo, diversas formas de divisão para a amígdala foram propostas. Existe, no entanto, considerável debate sobre sua subdivisão em núcleos em várias espécies animais (SWANSON; PETROVICH, 1998; NEWMAN, 2002, PITKÄNEN *et al.*, 2000; RASIA-FILHO *et al.*, 2000, 2004a). Outro motivo de discussão refere-se aos limites anatômicos extremos da amígdala que permanecem ainda controversos (SWANSON; PETROVICH, 1998; de OLMOS *et al.*, 1999; NEWMAN, 2002; de OLMOS *et al.*, 2004). 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 fariam parte os subnúcleos lateral (ABLl), basal, e basal acessório e que estariam amplamente interconectados com o neocórtex; porção cortical medial (ACOM), que corresponderia aos subnúcleos cortical, a amígdala medial (AMe), o córtex periamigdalóide e o núcleo do trato olfatório<sup>2</sup> lateral, relacionados com o sistema olfativo principal e acessório; e, por último, núcleo central (ACe) e área amigdalóide anterior (AA), que estariam envolvidos com atividades “vegetativas” que, neste texto, serão tratadas como simpáticas e parassimpáticas (para comentário sobre o termo “vegetativo”, veja-se RASIA-FILHO, 2006).

Swanson e Petrovich (1998) sugeriram que a amígdala pudesse agrupar um número de núcleos que parecem ser partes diferenciadas do córtex cerebral, do claustró e do estriado e pertencendo a quatro sistemas funcionais: 1) do simpático e parassimpático, composto pela ACe; 2) cortical fronto-temporal, composto pelos núcleos ABL e ABL anterior (ABLa) e ABLl; 3) do bulbo olfatório acessório (AOB), formado pela AMe, tema desta dissertação e para a qual dar-se-á maior atenção a seguir; e, 4) olfatório principal, relacionado com os demais núcleos. Em outras palavras, estruturalmente, a amígdala poderia se consistir de uma divisão estriatal, constituída pela AA e pela AMe e a ACe, e de uma divisão cortical que corresponderia à ABLa e posterior (ABLp), aos núcleos basomedial anterior (ABMa) e

<sup>2</sup> “Olfatório” segundo a Terminologia Anatômica e “olfativo” de acordo com dicionário da língua portuguesa de Houaiss.

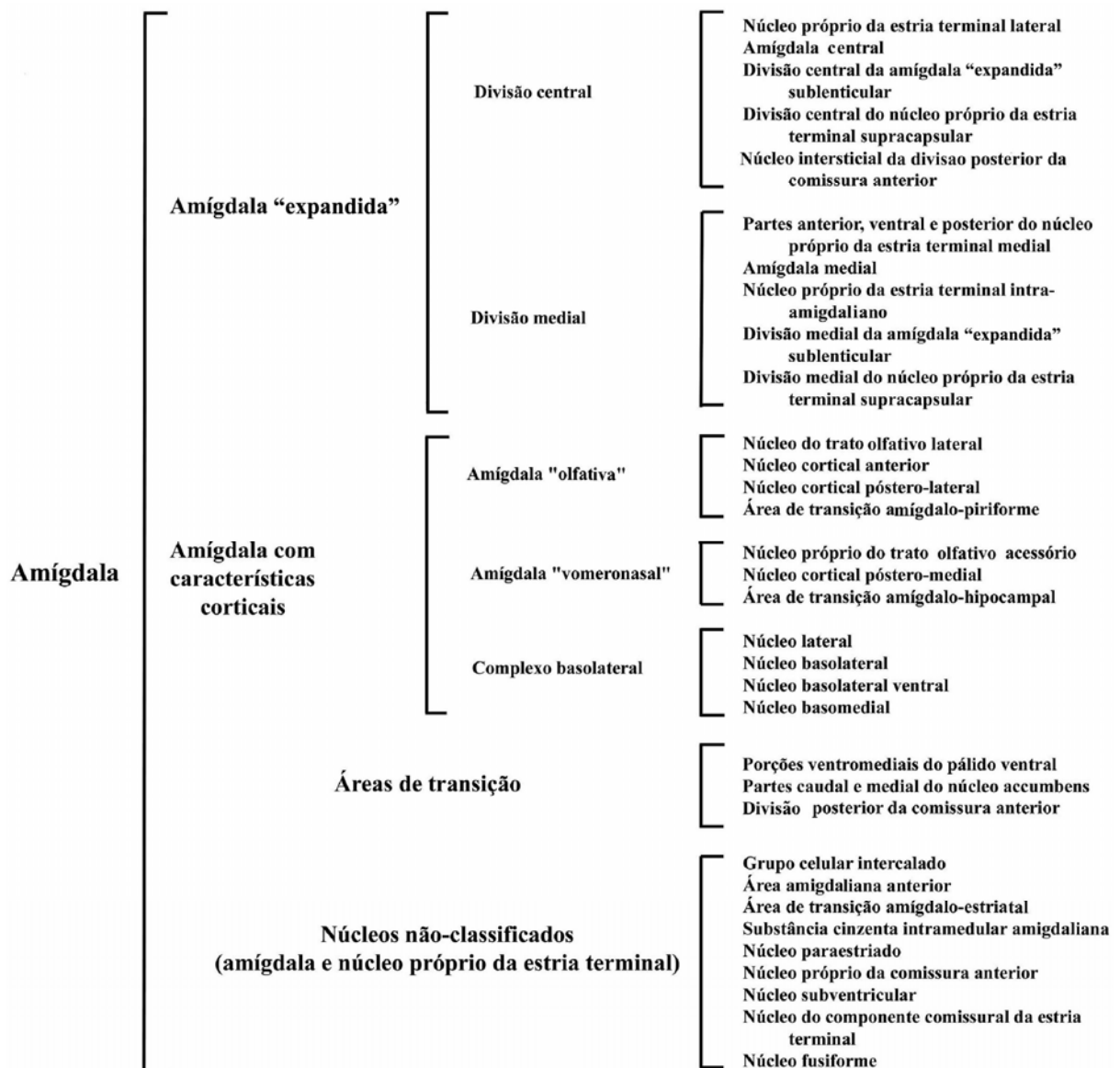
posterior (ABMp), cortical póstero-medial (ACOp<sub>m</sub>) e póstero-lateral (ACOp<sub>l</sub>), cortical anterior (ACO<sub>a</sub>), lateral (ACO<sub>l</sub>) e posterior (ACO<sub>p</sub>), área amigdalóide piriforme (AAP) e área piriforme de transição (SWANSON; PETROVICH, 1998; PETROVICH *et al.*, 2001).

Segundo sua disposição citoarquitetônica e hodológica, recentemente foi proposto para a amígdala uma classificação em quatro regiões: 1) amígdala “expandida”, assim denominada por se estender além de seus limites anatômicos e subdividindo-se nos núcleos da ACe e da AMe; 2) amígdala cortical, subdividida em complexo basolateral (BL) e em porções que se ligam às vias olfatórias 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 inominada e porções do núcleo da estria terminal (BST; ALHEID *et al.*, 1995; de OLMOS *et al.*, 2004; Figura 1). De acordo com esta classificação, note-se que a AMe é considerada parte da amígdala que se continua com partes do BST, restando várias controvérsias se a mesma é uma continuação ventral do estriado ou não (CANTERAS *et al.*, 1995; SWANSON; PETROVICH, 1998; de OLMOS *et al.*, 1999; NEWMAN, 2002).

Funcionalmente, com base na sua anatomia e hodologia, a amígdala parece fazer parte de três grandes sistemas: um relacionado com respostas hipotalâmicas e do tronco encefálico e mediada por eferências da ACe; o frontotemporal, que compreende a amígdala lateral (AL) e o ABL; e, o sistema relacionado com as vias olfatórias principal e acessória, onde estão envolvidos os demais núcleos amigdalóides e onde está a AMe (SWANSON *et al.*, 1998; PETROVICH *et al.*, 2001). Considerando isso, algumas funções foram descritas para o complexo amigdaliano de ratos. Por exemplo, alguns desses núcleos, principalmente a AL e o ABL, 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, 1992; DAVIS *et al.*, 2001). Para tanto, tais núcleos da amígdala recebem aferências de diferentes modalidades sensoriais: olfatória, gustativa, auditiva, visual, somatosensorial e visceral (SAH *et al.*, 2003). 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 inicial (KNUEPEFER *et al.*, 1995; QUIRK *et al.*, 1995). Isso parece dar condição aos núcleos da amígdala para modular diversos comportamentos e ajustes homeostáticos ou



alostáticos (GUILLAMÓN *et al.*, 1988; NEWMAN, 2002; SAHA, 2005). De fato, Baseado em suas conexões intrínsecas e extrínsecas, Gallagher e Chiba (1996) sugeriram que a amígdala “é não somente importante para a regulação dos estados emocionais internos que motivam o comportamento daqueles estados, mas pode também ser importante para a avaliação cognitiva do índice emocional de sinais perceptivos complexos”.

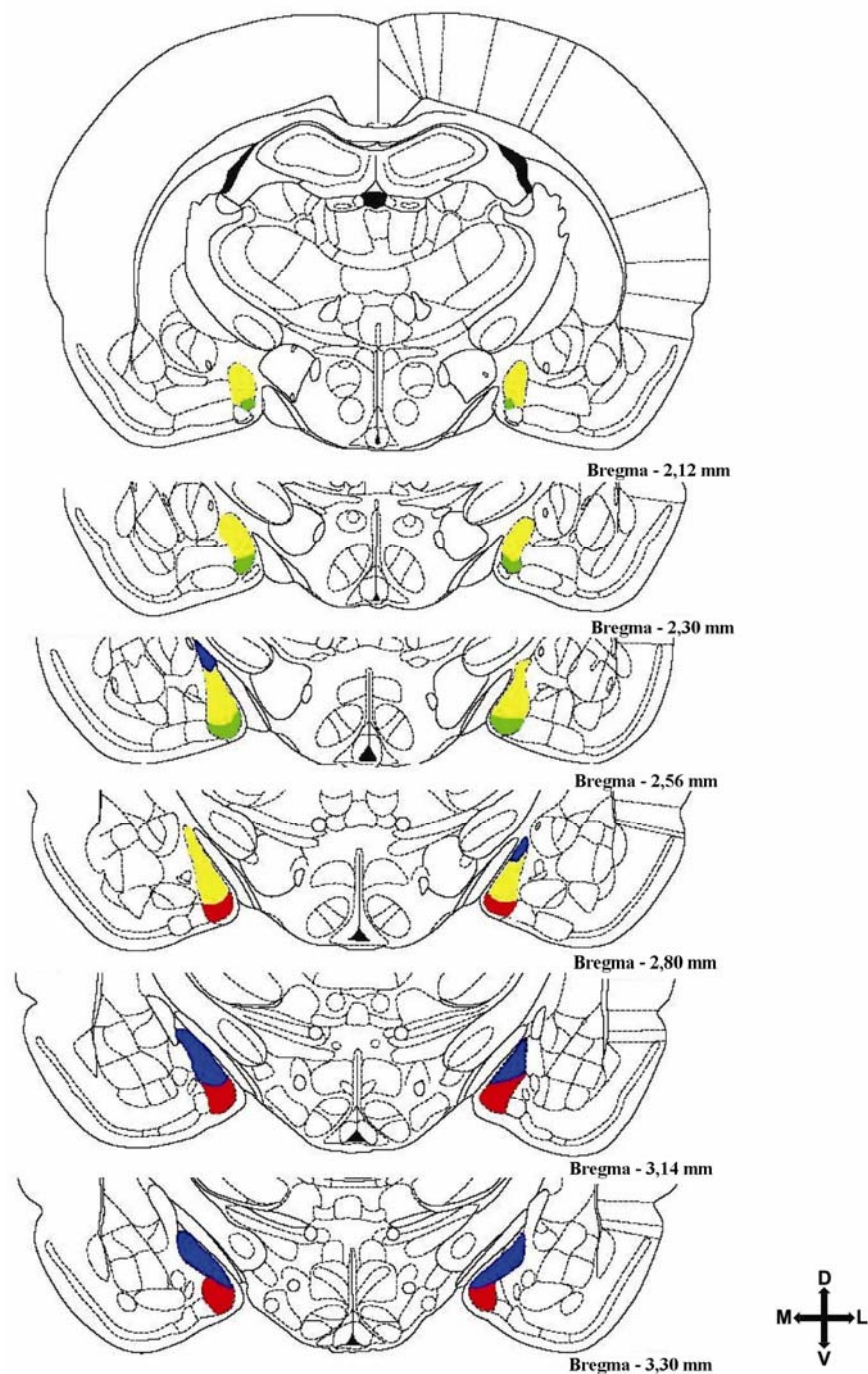


**Figura 1** Classificação dos núcleos que compõe a amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais, conforme descrito por Alheid e colaboradores (1995) e modificado por Rasia-Filho e colaboradores (2000).

Por exemplo, frente a um estímulo aversivo visual ou auditivo, impulsos nervosos provenientes do tálamo e do córtex cerebral chegam às regiões amigdalianas da AL e da 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 pressão arterial (PA), possa defecar e urinar ou, ainda aumentar a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH; AGGLETON *et al.*, 1989; DAVIS, 1992; BENNETT, 1985; BEAULIEU, 1986; ADAMEC *et al.*, 1994; AGUILERA, 1998).

Em ratos, a AMe é uma estrutura heterogênea e é um dos núcleos superficiais do complexo amigdaliano que, ao longo de sua extensão, está em contato direto com a região lateral do TO e ventral à estria terminal (ST) em sua parte mais posterior. A AMe encontra-se em posição medial e posterior ao núcleo do trato olfatório e, como limite posterior, está aproximadamente onde surgem os ventrículos cerebrais (de OLMOS *et al.*, 2004; Figura 2). Dorsalmente ela é separada da porção medial da 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 a AMe da ABL. Também caudalmente, e em posição dorsal, grupos de fibras que ascendem dentro da ST são interpostos entre a AMe e outros núcleos da amígdala (ALHEID *et al.*, 1995; PETROVICH *et al.*, 2000; PITKÄNEN, 2000; de OLMOS *et al.*, 2004).

A AMe apresenta subnúcleos com citoarquitetura, conexões e características neuroquímicas e funcionais diferentes, classificados em quatro partes, a saber: 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.*, 2000; de OLMOS *et al.*, 2004; RASIA-FILHO *et al.*, 2004). De acordo com suas conexões, Canteras *et al.* (1995) sugeriram que a AMe poderia também estar organizada em uma região anterior ou rostral, da qual fazem parte a AMeAD, a AMeAV e a AMePV, e em uma região posterior ou caudal, da qual faz parte a AMePD, embora grandemente interconectada com os demais subnúcleos. A AMePD, adjacente ao TO e ventralmente à ST na parte do telencéfalo ventral (Figura 3), em cortes histológicos coronais corados pela técnica de Nissl, aparece com

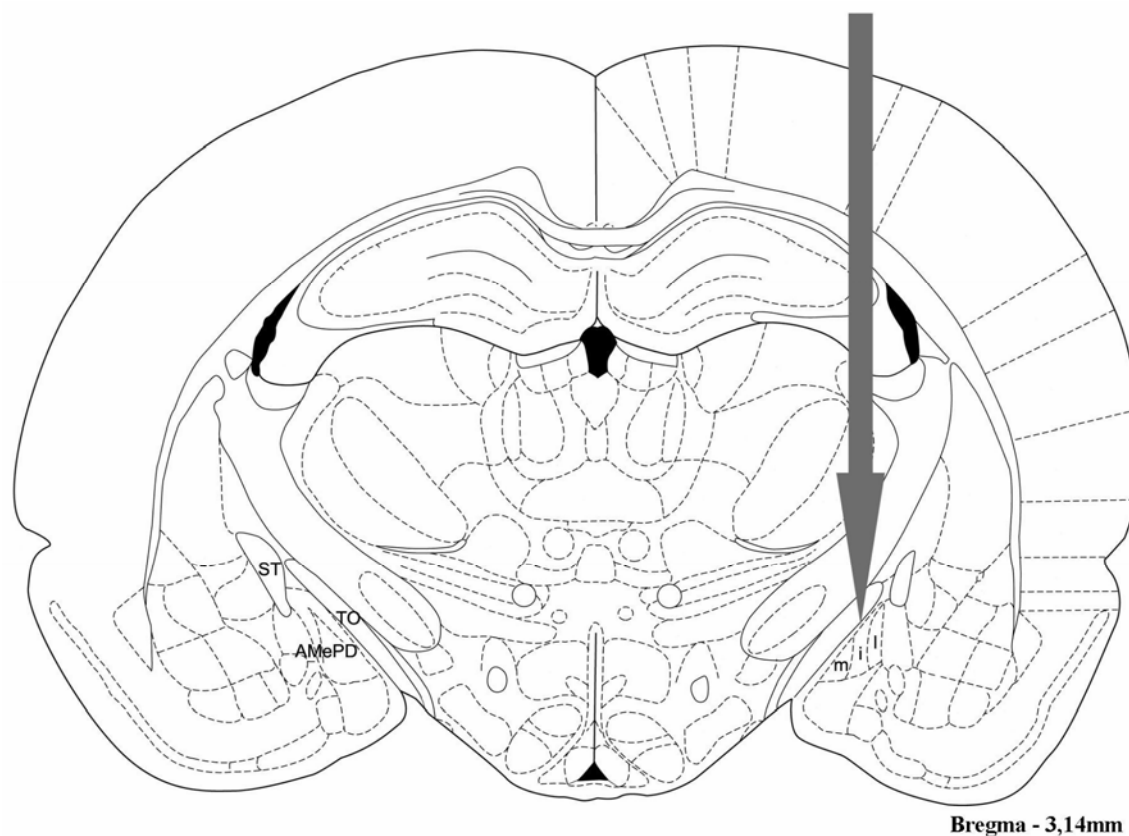


**Figura 2** Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar os quatro subnúcleos da amígdala medial, a saber: ântero-dorsal (AMEAD, em amarelo), ântero-ventral (AMEAV, em verde), pósterodorsal (AMEPD, em azul) e póstero-ventral (AMEPV, em vermelho). Os valores 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 adaptadas do atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998) e reproduzidas, com permissão, de Quagliotto (2006).

a forma de um triângulo alongado, com uma base ventral que se estende no terço caudal da AMe (ALHEID *et al.*, 1995; de OLMOS *et al.*, 2004). A 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 da AMePD é rodeada, no seu contorno medial, por uma “camada molecular” constituída de poucas células e que se estreita dorsalmente e rostralmente até desaparecer por completo na AMeAD (de OLMOS *et al.*, 2004), o que corresponde ao feixe de axônios que forma a via eferente do núcleo próprio da via olfatória acessória (de OLMOS *et al.*, 2004).

A maioria das aferências neuronais que chegam às porções da AMe são provenientes diretamente do AOB, que envolve estímulos dos ferômonios que atuam no órgão vomeronasal (OTTERSEN *et al.*, 1980; PITKÄNEN, 2000; WESTBERRY, 2003). Há ainda, aferências mais modestas de regiões do telencéfalo basal, as quais possuem conexões recíprocas com a AMe, e de núcleos do tálamo, da região dorsal da ponte relacionada com informações somáticas e viscerais, de grupos celulares da rafe mesencefálica e do locus *cerúleu* (JONES *et al.*, 1977, 1999; AZMITIA *et al.*, 1978; OTTERSEN *et al.*, 1979, 1980, 1981; GROOVE, 1988; OHTAKE *et al.*, 1989; HERBERT *et al.*, 1990). Basicamente, 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 (McDONALD, 1998). Grande parte dos axônios de projeção extra-amigdalianos deixa a AMe via ST ou pela “ansa peduncularis” (via amígdalo-fugal) indo, a seguir, em direção a regiões telecefálicas ou diencefálicas. A AMeAD e a AMePV utilizam como via principal a “ansa peduncularis”, enquanto a AMePD utiliza-se da ST como via eferente proponderante (SWANSON *et al.*, 1979; de OLMOS *et al.*, 2004; SIMERLY, 2004). Para suas funções, os subnúcleos da AMe se relacionam intimamente com outros núcleos intra-amigdalianos, como AA, a ACe, o ABL, os núcleos corticais, a AL, o núcleo posterior, a AAP e o trato olfatório acessório, e com uma grande quantidade de estruturas encefálicas como o AOB, núcleo olfatório anterior, córtex pré-frontal, córtex piriforme, núcleo endopiriforme, a faixa diagonal de Broca, o estriado e o claustró, o núcleo *acumbens*, a área septal, área entorrinal e o subículo, a substância *inominada*, o BST e seus componentes, vários núcleos hipotalâmicos (pré-óptico, anterior, ventro-medial, dorso-medial, lateral, arqueado, periventricular, posterior e pré-mamilar ventral), vários núcleos talâmicos, a área

tegmental ventral e os núcleos da rafe (CANTERAS *et al.*, 1995; McDONALD, 1998; PETROVICH *et al.*, 2001).



**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 pósterio-dorsal (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) e reproduzida, com permissão, de Quagliotto (2006).

Com isso e outros dados imunocitoquímicos, Wood e Newman (1995) propuseram que a região anterior da AMe 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 todas as regiões da AMe (LEHMAN *et al.*, 1982; ÖSTERLUND *et al.*, 1998;

NEWMAN, 2002; SIMERLY, 2004). Mesmo assim, poder-se-ia sugerir que as regiões anterior e posterior da AMe 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 da AMe possam ser encontradas (LEHMAN *et al.*, 1982; NEWMAN, 2002; MAREN, 1996; ÖSTERLUND *et al.*, 1998; RASIA-FILHO *et al.*, 1999, 2002, 2004a; SIMERLY, 2004).

Sob o ponto de vista funcional, a lesão da parte anterior da AMe e da ACO diminuiu a ocorrência de comportamento sexual em ratas; a estimulação dessas mesmas regiões promoveu o efeito oposto (MASCÓ *et al.*, 1980). Em machos, a lesão da AMe prejudicou a ocorrência de ejaculação (HARRIS *et al.*, 1975; VCHTELLO *et al.*, 1987). Já a estimulação levou a comportamento e atividade eletroencefalográfica praticamente indistinguíveis do período de inatividade motora observada em período pós-ejaculatório (KONDO *et al.*, 1998; SMOCK *et al.*, 1992). Recentemente relatou-se, mais especificamente, que a AMePD apresenta grande papel na modulação do comportamento sexual em ratos (de CASTILHOS *et al.*, 2006).

Os subnúcleos da AMe podem modular respostas a estímulos estressantes que são seguidas por respostas neuroendócrinas de ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A presença de catecolaminas liberadas pela adrenal na circulação sangüínea em uma situação de estresse é percebida por terminações vagais que atingem o núcleo do trato solitário (NTS) e, deste, chegam ao complexo amigdaliano (McGAUGH *et al.*, 1996). Isto modifica a ação da AMe e da ABL na consolidação de memórias condicionadas conjugando, em paralelo, atividades inatas e aprendidas (ALLEN *et al.*, 1974; BENNETT *et al.*, 1985; BEALIEU *et al.*, 1987; AGLETON *et al.*, 1989; McGAUGH, 1992). Isto foi notavelmente observado em situações emocionais como a exposição do animal ao seu predador natural (HARVEY *et al.*, 1984; KLING *et al.*, 1992; KNUEPFER *et al.*, 1995; McGAUGH, 1992). Neste mesmo sentido, é interessante que a lesão da ACE, da AMe e do ACO em ratos aumentou a investigação social em seus próprios predadores (BLANCHARD *et al.*, 1972) e gerou uma perda total da retenção da informação necessária para a adaptação comportamental relacionada com a dominação social (BOLHUIS *et al.*, 1984). Outros estudos verificaram que lesões excitotóxicas na AMe de ratos suprimem respostas do eixo HPA quando os animais são expostos a um evento estressor (isolamento social do animal estudado), bloqueando também a liberação de ocitocina nos núcleos supra-óptico e paraventricular do hipotálamo (MIYATA,

1995; DAYAS *et al.*, 1999). Os achados deste último estudo mostram, de forma muito importante, que a AMe é o primeiro local dentro da amígdala responsável pelo controle do HPA e pelas respostas secretórias ocitocinérgicas frente a um evento estressor emocional incondicionado (DAYAS *et al.*, 1999).

A AMePD, além de ter conexão sináptica com a AL, a ABL e a ACe, estabelece conexões sinápticas recíprocas com o córtex entorrinal, o qual envia conexões para os componentes do sistema olfatório, inclusive a ABL (CANTERAS *et al.*, 1995; SMITH *et al.*, 1996; VINADER-CAEROLS *et al.*, 1998; PETROVICH *et al.*, 2001). Isso poderia colocar a AMePD em condição direta para modular o circuito que emite projeções entre o hipocampo, outros núcleos amigdalianos e a formação de memória declarativa de longa-duração (CANTERAS *et al.*, 1995; PETROVICH *et al.*, 2001). Ainda, a AMePD é influenciada por informações vomeronasal provenientes do AOB que chega na AMeAD (BRESSLER, 1996; GUILLAMÓN *et al.*, 1997; McDONALD, 1998; MEREDITH *et al.*, 2004). Esta, por sua vez, reconhece a relevância social do estímulo olfativo e, vias núcleos intercalados da amígdala, determinam se a AMePD será estimulada ou não (MEREDITH; WESTBERRY, 2004). A AMePD, portanto, processa informações olfatórias oriundas do órgão vomeronasal e do bulbo olfatório, as quais são enviadas para áreas motoras e neuroendócrinas do hipotálamo e, a seguir, também para o tronco encefálico (LEHMAN *et al.*, 1982; CANTERAS *et al.*, 1995; KONDO *et al.*, 1995; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2001; PETROVICH *et al.*, 2001).

Assim, a existência de uma circuitaria neural que estaria envolvida com a percepção de estímulos aversivos à geração de comportamentos defensivos e a elaboração de estados emocionais poderia envolver os subnúcleos AMe e outros núcleos amigdalianos, o hipotálamo medial, a substância cinzenta periqueadotal dorsal, o colículo inferior e algumas camadas do colículo superior (HATIFIELD, 1999). Este circuito processaria principalmente estímulos incondicionados, produzindo um aumento da atividade dirigida para o ataque ou a fuga, além de estímulos condicionados que produziriam comportamentos de esquiva ou de “freezing” (HATIFIELD, 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 PA (GESELMA *et al.*, 1987; CHEN; HERBERT, 1995). 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).

Das relações dos subnúcleos da AMe e de outros núcleos amigdalianos, diferentes projeções eferentes parecem mediar diferentes 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 periqueadutal são críticas para comportamentos de “freezing”, à “fuga ou luta” e à antinocicepção (LeDOUX, 1994). Ademais, as áreas do SN central envolvidas nessas atividades relacionam-se com aferências espinais somáticas, como as que trafegam em conjunto com o simpático à medula espinhal ou com as regiões que integram informação visceral aferente por via vagal e glossofaríngea (DAVIS *et al.*, 1992; LeDOUX, 1994; LAWRENCE, 1994; SCHAFFAR *et al.*, 1997). É neste contexto, então, que se inclui a possível participação da AMePD na regulação da FC e da PA em ratos.

Na AMePD pode-se encontrar vários neurotransmissores e neuromoduladores como glutamato, GABA, histamina (HA), colecistoquinina, encefalinas, somatostatina, substância P e angiotensina II, por exemplo (KAKINOKI, 1998; FLODD, 1998; HERBERT *et al.*, 1990; JONES *et al.*, 1999; MATSUMURA *et al.*, 1999; AVERILL *et al.*, 2000; DAMPNEY *et al.*, 2002; YILMAZER *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2005). Por causa de sua hodologia e função descrita até o momento, esta dissertação buscou esclarecer se a AMePD participa do controle neural basal e/ou reflexa da FC e da PA valendo-se de glutamato e de GABA para tanto, principais neurotransmissores excitatório e inibitório no SN de mamíferos. Em estudo prévio desenvolvido em nosso laboratório, verificamos que a AMePD, por ação da HA e de agonista dos receptores H<sub>3</sub>, modula respostas pressóricas reflexas e participa do controle central da PA (QUAGLIOTTO, 2006).

## **1.2 CONTROLE NEURAL DO SISTEMA CARDIOVASCULAR**

O fluxo sanguíneo em todos os tecidos do organismo depende da pressão de perfusão (determinada inicialmente pela PA e pelo trabalho cardíaco) e da resistência vascular em cada região. Ademais, está bem estabelecido que o controle da PA envolve mecanismos neurais e endócrinos que, a curto e longo prazos, modulam não só a atividade simpática e parassimpática para o coração e para os vasos como também o volume sanguíneo e a secreção de vários hormônios (por exemplo, renina, vasopressina, peptídeo natriurético atrial;



AVERILL; DIZ, 2000; DAMPNEY *et al.*, 2002). Isso permite que a PA para os diversos órgãos possa ser ajustada, a partir de um valor basal, de acordo com necessidades variáveis e em níveis adequados para perfusão tecidual. 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; LONGHURST, 2003; RASIA-FILHO, 2006).

Historicamente, 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 mais relacionada 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 para a gênese e os ajustes de controle neural da atividade cardiovascular (TURNER *et al.*, 1986; DALL’ AGO *et al.*, 2003; RASIA-FILHO *et al.*, 2004b).

A concepção sobre o mecanismo de controle neural de tal atividade modificou-se nas últimas décadas. Atualmente aceita-se 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 (LOEWY; SPYER, 1990; SPYER, 1994; IRIGOYEN *et al.*, 2001). Ademais, as áreas do SN central envolvidas nessas atividades relacionam-se com aferências espinais somáticas, como as que trafegam conjuntamente com o simpático à medula espinhal, ou em regiões que integram informação visceral aferente vagal e glossofaríngea (RANDALL, 1984; LONGHURST, 2003).

Existem na periferia, dispostos em locais estratégicos, diferentes sensores que garantem momento-a-momento a regulação da PA dentro de limites estreitos. Estes sensores são os barorreceptores, quimiorreceptores periféricos e receptores cardiopulmonares (IRIGOYEN *et al.*, 2001). Os primeiros estão dispostos principalmente no seio carotídeo e

arco aórtico (MICHELINI, 1999). Os barorreceptores são o mais importante mecanismo de controle reflexo da PA. 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.*, 1999; MICHELINI, 1999; DAMPNEY *et al.*, 2002). 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 (SPYER, 2002; LONGHURST, 2003).

Aumentos na PA resultam em aumentos na frequência de potenciais de ação ao longo dessas vias e reduções na PA geram o efeito oposto. Desta forma, os barorreceptores arteriais geram um efeito inibitório tônico sobre o tônus simpático, controlando assim a resistência periférica total (RPT) relacionada com os vasos sanguíneos e o débito cardíaco (TIMM *et al.*, 2003). Além disso, 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, mas diferentes efeitos sobre os diversos leitos vasculares (DALL'AGO *et al.*, 2003).

Os quimiorreceptores periféricos localizados no corpo carotídeo e no arco aórtico são importantes para ajustes ventilatórios em resposta à  $PCO_2$ , à  $PO_2$  e ao pH plasmático (MICHELINI, 1999). Além disso, essas respostas são mediadas pela interação entre os quimiorreceptores periféricos e centrais. Hipercapnia e quadros de acidose também aumentam a atividade dos quimiorreceptores periféricos e essas condições potencializam o efeito da hipóxia (IRIGOYEN *et al.*, 2001). 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, 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, 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). A ativação dos quimiorreceptores carotídeos é inibida pela ativação dos barorreceptores aórticos em situações

de aumento da PA e a desativação dos barorreceptores potencializa a resposta ventilatória e vasoconstritora dos quimiorreceptores (como revisado em DALL'AGO *et al.*, 1999).

Três grupos de receptores são ativados por mudanças na pressão nas câmaras cardíacas: (1) receptores no endocárdio nas junções das veias cava superior e inferior com o átrio direito e de veias pulmonares com o átrio esquerdo; e, que estão conectados ao SN central por fibras vagais mielinizadas; (2) receptores difusamente distribuídos em todas as câmaras do coração e na artéria pulmonar e que estão conectados ao SN central por fibras vagais não-mielinizadas; e, (3) receptores também difusamente distribuídos por todas as câmaras cardíacas conectados à medula espinhal por fibras mielinizadas e não-mielinizadas trafegando com os nervos simpáticos (MICHELINI, 1999). O primeiro grupo de receptores localizados nas junções veno-atriais são ativados pelo enchimento e pela contração atriais. A distensão mecânica das junções veno-atriais provoca um aumento na FC devido à elevação da atividade simpática para o nodo sino-atrial. O aumento reflexo da FC ajuda a manter o volume cardíaco relativamente constante durante aumentos no retorno venoso. A distensão mecânica do átrio causa um aumento na excreção urinária de água. A diurese é secundária à inibição da secreção do hormônio antidiurético e à redução da atividade simpática renal (IRIGOYEN *et al.*, 2001). O segundo grupo de receptores cardiopulmonares comporta-se, quando ativados, como os mecanorreceptores carotídeos e aórticos, reduzindo a atividade simpática e aumentando a atividade do nervo vago para o coração. A modulação na atividade simpática varia em cada território vascular, mas é especialmente importante na regulação da resistência vascular renal (SHEPPERD; VANHOUTTE, 1979; IRIGOYEN *et al.*, 2001). O terceiro grupo, que trafega junto aos aferentes cardíacos simpáticos até a medula espinhal, é ativado por estímulos mecânicos ou por substâncias químicas aplicadas diretamente no epicárdio. Sua importância funcional não está clara, mas parece ser ativado por estímulos químicos provenientes de áreas isquêmicas do miocárdio, quando também ocorre sensação dolorosa (MICHELINI, 1999; IRIGOYEN *et al.*, 2001).

É no NTS que chegam fibras mielinizadas e não mielinizadas provenientes dos barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares e que parecem utilizar principalmente o glutamato como neurotransmissor (MICHELINI, 1999). O NTS recebe informações convergentes, para serem integradas no tempo e no espaço, sobre a atividade cardíaca, os pulmões e o trato gastrointestinal (TIMO-IARIA, 1988; MATSUMURA *et al.*, 1999; MIYAWAKI *et al.*, 2002; DALL'AGO *et al.*, 2003; RASIA-FILHO *et al.*, 2004b). Daí partem neurônios de segunda-ordem para múltiplas regiões do SN central, a saber: um grupo

neuronal localizado na região bulbar ventrolateral 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 parabraqiual na ponte, o campo tegmental lateral, a área postrema e os núcleos vestibulares (LONGHURST, 2003). O NTS estimula diretamente o BVLc (por ação do glutamato e da angiotensina 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 espinhal (é a principal origem dos axônios da via simpática retículo-espinhal e que se termina principalmente na coluna intermédio-lateral da medula espinhal) que, em conjunto, são tônicas na atividade simpática responsável pela manutenção da PA e críticas para a ocorrência dos reflexos cardiovasculares (VASQUEZ *et al.*, 1997; MICHELINI, 1999; LONGHURST, 2003; DALL'AGO *et al.*, 2003; RASIA-FILHO *et al.*, 2004b).

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 (DAMPNEY, 1994; SUN, 1995). 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 igualmente para modular a atividade tônica simpática (DAMPNEY, 1994; LONGHURST, 2003). 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 (SUN, 1995; LONGHURST, 2003).

Por outro lado, em situações de aumento súbito da PA, e por aumento reflexo da atividade dos barorreceptores, o NTS é excitado e estimula o núcleo dorsal do vago (DMV) e o núcleo ambíguo os quais, por sua vez, geram aumento do tônus parassimpático (HIGGINS *et al.*, 1978; LÖFFELHOLZ; PAPPANO, 1985, MICHELINI. 1999) Alguns neurônios desses núcleos têm atividade sincronizada com o ciclo cardíaco; estão sob ação do GABA, da galanina, da serotonina, de opióides endógenos e do peptídeo relacionado com o gene da calcitonina; e, recebem aferências dos barorreceptores, quimiorreceptores periféricos, receptores cardíacos e do nervo trigêmio (HIGGINS *et al.*, 1978; LÖFFELHOLZ; PAPPANO, 1985, MICHELINI. 1999; LONGHURST, 2003). É interessante notar que a estimulação elétrica do núcleo ambíguo no lado direito encefálico é capaz de diminuir a

atividade sinusal enquanto no lado esquerdo inibe a condução pelo nodo átrio-ventricular (VIARD *et al.*, 2002; LONGHURST, 2003).

O NTS também estabelece conexão com os núcleos da rafe, a 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 cerúleu* (GIERSBERGEN *et al.*, 1992). Essas estruturas estão interligadas entre si, formando um circuito neural que deve organizar os ajustes simpáticos/ parassimpáticos e a emissão de comportamentos relevantes para adequação do animal em seu meio. Como exemplo, a administração intra-amigdaliana de fenilefrina, substância simpático-mimética, causa aumento da PA e é capaz de gerar respostas simpáticas sistêmicas em ratos (SINGEWALD *et al.*, 2000). Da mesma forma, estudos anteriores com estimulação elétrica da amígdala em gatos e macacos geraram frequentemente diminuição na PA, embora aumentos na PA ocorressem quando as frequências dos estímulos passavam a ser mais altas (CECHETTO, 2001). Ademais, em gatos anestesiados, estímulo de baixa intensidade produzia aumento na PA quando os eletrodos estavam localizados na região dorso-medial, enquanto resposta hipotensora era evocada na região lateral da amígdala (GALENO, 1983; FRISINGER, 1984; SHARMA *et al.*, 1995). Não é à toa, então, que também a ACe, que está envolvida com o controle de emoções, conforme descrito, afeta a atividade de estruturas hipotalâmicas e bulbo-pontinas para aumentar a FC e a PA no contexto de “fuga ou luta” em ratos (DAVIS, 1992; LeDOUX, 1992; RASIA-FILHO *et al.*, 2000). Conjuntamente com a AMe, dela recebendo aferências, a ACe projeta-se extensivamente para o núcleo dorsal medial do tálamo, o qual se conecta com o córtex infralímbico e insular, formando um completo circuito responsável pela integração ou mesmo iniciação de respostas homeostáticas ou adaptativas em muitas variáveis orgânicas (REIS, 1964; GALENO, 1983; DAVIS, 1992; CECHETTO, 2001). De fato, a ACe envia projeções para vários núcleos hipotalâmicos e núcleos bulbares envolvidos nas funções cardiovasculares como, por exemplo, a região do bulbo ventrolateral (SAHA *et al.*, 2000; SAHA, 2005a, 2005b). Experimentos em ratos acordados têm demonstrado que a estimulação elétrica da ACe resulta em um aumento na FC e na PA, enquanto em ratos anestesiados obtêm-se uma diminuição de ambos os parâmetros (REIS, 1964; GALENO, 1983; FRISINGER, 1984; GESELMA, 1987; CECHETTO, 2001). A dependência de estado do animal para o tipo de resposta cardiovascular evocada é adicionalmente demonstrada pelo achado de que a resposta pressora

promovida pela estimulação ampla da amígdala é extremamente atenuada durante o sono nesses animais (FRISINGER, 1984; CECHETTO, 2001).

A AMe, como também mencionado anteriormente, apresenta conexões com a ACe (PITKÄNEN, 2000) e, ademais, desponta como importante área no controle das respostas emocionais (DAYAS *et al.*, 1999). De fato, vários estudos têm demonstrado que a estimulação elétrica e química da AMe desencadeia mudanças na FC e PA em animais normotensos e hipertensos (GALENO *et al.*, 1983; GESELMA *et al.*, 1987; IWATA *et al.*, 1987; SHARMA *et al.*, 1995). A AMe, em conjunto com a área septal lateral, a área pré-óptica medial (MPOA), núcleos ventromedial (VMH) e ventrolateral hipotalâmicos, a substância cinzenta periqueadotal e o tegmento adjacente formam um circuito integrado que influencia uma variedade de atividades que dependem de ajustes cardiovasculares amplos para sua ocorrência (SWANSON *et al.*, 1979; MARAGOS *et al.*, 1989; CANTERAS *et al.*, 1995; SWANSON, 1998; COLEEN *et al.*, 1998; SIMERLY, 2004). Além das projeções da AMe, direta ou indiretamente para núcleos do hipotálamo relacionados com o controle cardiovascular, há conexões com o NPB, o NTS e o DMV, estruturas que promovem o controle da atividade do coração, vasos sanguíneos e rins (SILVERMAN *et al.*, 1981; TRIBOLLETT *et al.*, 1981; DAVIS, 1992; MACHADO *et al.*, 1992; KARSON *et al.*, 1999; CECHETTO, 2001; SAHA *et al.*, 2000; SAHA, 2005a, 2005b).

### 1.3 GLUTAMATO E GABA

Claro está que todas as modificações da FC e da PA por seu controle neural envolvem sinapses e seus neurotransmissores (AVERILL; DIZ, 2000; DAMPNEY *et al.*, 2002). O glutamato (Glu) e o ácido gama-aminobutírico (GABA), por serem os principais neurotransmissores excitatório e inibitório do SN central, são bastante investigados quanto ao 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; JARROTT, 1994) e quimiorreflexo cardiovascular (VARDHAN *et al.*, 1993).

O glutamato é sintetizado nos terminais pré-sinápticos principalmente a partir da glutamina e pela ação da glutaminase e estocado em vesículas onde sua concentração pode chegar a 100 mM (MELDRUM, 2000). 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  $\alpha$ -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 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). 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).

Evidências fisiológicas e bioquímicas sugerem que o GABA também modula respostas cardiovasculares no SN central (SPYER, 1994; COLEMAN; DAMPNEY, 1998). GABA é sintetizado a partir do Glu pela enzima ácido glutâmico descarboxilase e, tradicionalmente, exerce seus efeitos via receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> e/ou metabotrópicos GABA<sub>B</sub> (BURT, 2003). Outros estudos indicaram a existência de uma terceira classe de receptores GABA, os quais se distinguem farmacologicamente e estruturalmente dos receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub> (BORMANN; FEIGENSPAN, 1995; BORMANN, 2000; HARTMANN, 2004). Esses receptores, intitulados GABA<sub>C</sub>, têm sido melhor identificado 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<sub>A</sub> na maior parte das vezes é capaz de gerar hiperpolarização por possuir um canal de Cl<sup>-</sup> 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). Receptores do tipo GABA<sub>B</sub>, por sua vez, estão acoplado à proteína G e a sistemas de segundos-mensageiros, que podem produzir uma variedade de efeitos incluindo a inibição de adenilato ciclase, inibição da síntese de inositol trifosfato, aumento do efluxo de K<sup>+</sup> ou diminuição do influxo de Ca<sup>2+</sup> para a célula (BOWERY, 1993; BORMANN, 2000; COUVE *et al.*, 2000). Os receptores GABA<sub>B</sub> podem hiperpolarizar neurônios pós-sinápticos (BOWERY, 1993; MCDONALD *et al.*, 2004). As ações inibitórias de GABA sobre a atividade cardiovascular pode ser observada 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 baclofen, um agonista dos receptores GABA<sub>B</sub>, é microinjetado nas regiões ventromedial e posterior do hipotálamo (TAKENAKA, 1996).

Muitos dos neurônios de segunda-ordem que partem do NTS (por exemplo para regiões rostral e caudal do bulbo ventromedialateral, 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). A ACe, por sua vez, emite projeções GABAérgicas diretas ao NTS (SAHA *et al.*, 2000) e a AMe 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 da AMe sobre o controle cardiovascular basal e das respostas reflexas até o momento. Recentemente, em um estudo com ratos anestesiados, foi evidenciado que Glu e GABA microinjetados na AMe não foram capaz 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). E isto passa a ser um dado relevante dado a presença marcada de Glu e GABA nos subnúcleos da AMe, da modulação de



comportamentos que necessitam de ajustes de FC e PA concomitantes para sua ocorrência e para o que os subnúcleos da AMe têm supostamente ações diferenciadas de acordo com o circuito neural onde se encontram. Os objetivos desta dissertação foram os de estudar, de forma inédita, o papel da AMePD e o efeito glutamatérgico e GABAérgico na atividade cardiovascular e nas resposta reflexas mediadas por barorreceptores e quimiorreceptores periféricos em ratos acordados. Os presentes dados podem contribuir para o estudo da neurofisiologia envolvida com o controle neural central da PA e, teoricamente, serem aplicáveis também à fisiopatologia de diversos distúrbios cardiovasculares, como no caso da hipertensão arterial sistêmica.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAIS**

Baseados em dados experimentais que demonstraram que a AMePD é região encefálica relacionada com a modulação de diversos comportamentos e que igualmente pode estar envolvida no controle da atividade cardiovascular por intermédio de conexões intra-amigdalianas e com núcleos hipotalâmicos e do tronco encefálico necessários para as respostas endócrinas, simpáticas e parassimpáticas, a hipótese inicial deste trabalho é de que a presença de Glu e GABA na AMePD possa estar relacionada com a gênese e/ou modulação do controle central da atividade cardiovascular, bem como das respostas reflexas geradas pelos barorreceptores e pelos quimiorreceptores. O Glu supostamente serviria para aumentar os valores de FC e PA e potencializar as respostas reflexas barorreceptora e quimiorreceptora, enquanto o GABA haveria de promover respostas opostas.

Em sentido amplo, busca-se estudar qual a participação de uma área específica do SN central, a AMePD, no controle da FC e da PA e seus ajustes homeostáticos relacionando-os com a atividade glutamatérgica e GABAérgica local. Os resultados advindos do presente estudo podem contribuir para avançar o conhecimento sobre a base neural de controle de tais parâmetros. 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 de Glu e GABA na AMePD no controle da atividade cardiovascular basal e na faixa de atuação reflexa mediada por estimulação barorreceptora e quimiorreceptora.

## **2.2 ESPECÍFICOS**

1- Estudar a atividade cardiovascular quanto aos parâmetros de FC e PA em animais não anestesiados após microinjeção diretamente na AMePD de salina, Glu e de GABA.

2 - Avaliar a resposta cardiovascular reflexa de FC e PA desencadeada pela estimulação dos barorreceptores e quimiorreceptores em animais não anestesiados após microinjeção diretamente na AMePD de salina, Glu e de GABA.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS**

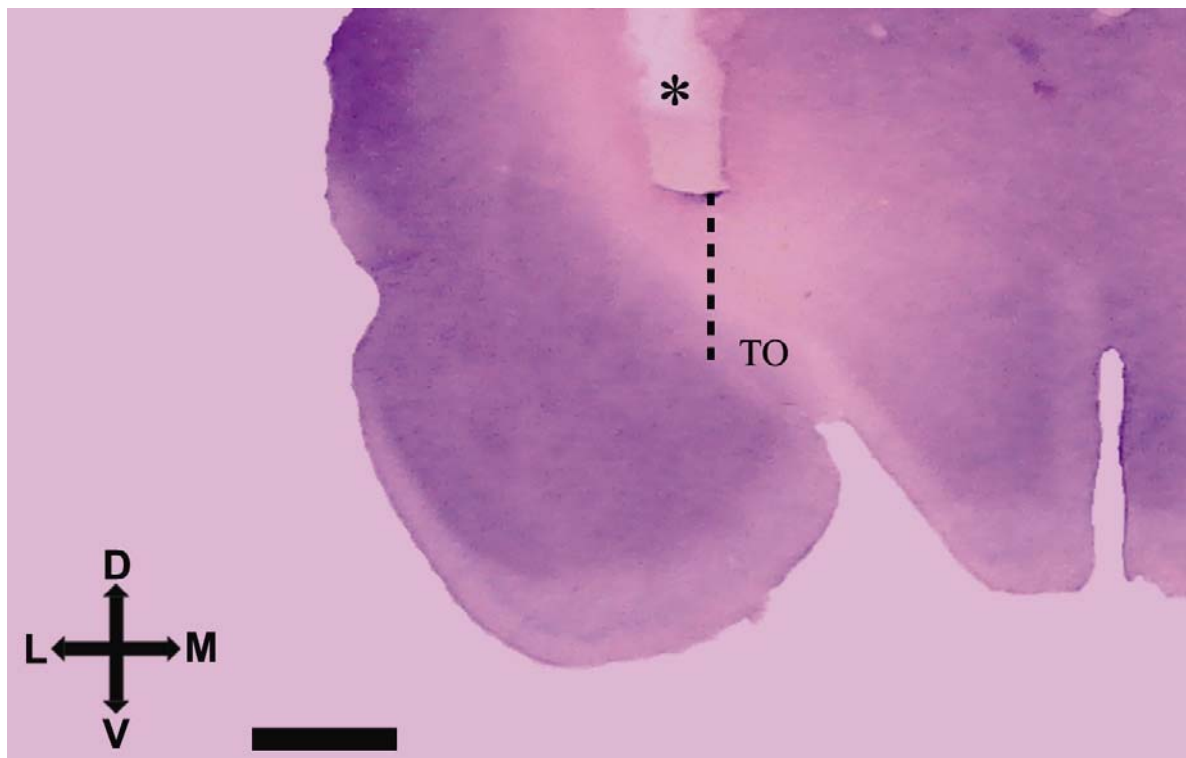
Ratos Wistar machos com três meses de idade e pesando entre 250 a 300 g foram utilizados neste experimento. Os animais foram mantidos em condições padrão de biotério, com água e comida *ad libitum*, temperatura em torno de 22° C e ciclo claro/escuro de 12 h cada.

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 internacionais de cuidado e ética em experimentação científica (Diretrizes do Conselho Europeu de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC) e as normas brasileiras vigentes de ética para experimentação animal. O projeto relacionado a esta dissertação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre sob o número 071/05.

#### **3.2 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: 3,0 mm posterior à sutura bregmática; 3,6 mm lateral à sutura sagital; e, 5,7 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 (Figura 4).



**Figura 4** Fotomicrografia de corte coronal da parte médio-ventral do encéfalo de rato para identificação do trajeto da cânula implantada (\*). Em pontilhado, o trajeto provável, muito mais discreto, da agulha de microinjeção até a parte superior da amígdala medial póstero-dorsal direita. Técnica histológica de hematoxilina-eosina. Para comparações com figuras esquemáticas de atlas, vejam-se as Figuras 2 e 3. A escala equivale a 1,5 mm e as coordenadas espaciais estão colocados na parte inferior esquerda da figura. Reproduzida, com permissão, de Quagliotto (2006).

### 3.3 CANULAÇÃO ARTERIAL E VENOSA

Cinco 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, com diâmetro interno de 0,28 mm e que foi conectado a outro PE-50, 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 na 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 para teste da atividade reflexa cardiovascular (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).

Neste momento os ratos foram divididos em diferentes grupos experimentais: 1) animais microinjetados com salina (0,3  $\mu$ l) para servir como controle, 2) animais microinjetados com glutamato (Sigma Chemical Company, EUA) na dose de 45 nM dissolvido em 0,3  $\mu$ l de salina, 3) animais microinjetados com GABA (Sigma Chemical Company, EUA) na dose de 2 nM dissolvido em 0,3  $\mu$ l de salina e, 4) animais microinjetados com GABA (Sigma Chemical Company, EUA) na dose de 3  $\mu$ M dissolvidos em 0,3  $\mu$ l de

salina. Essas doses foram adaptadas dos dados apresentados em Kaura *et al.* (1995) e estão também de acordo com resultados prévios obtidos por outros autores, os quais permitem inferir que as quantidades de Glu e GABA na menor dose estão próximos de valores fisiológicos e a maior dose de GABA a valor farmacológico (FILLENZ, 1995; TIMERMAN; WESTERINK, 1997; HAGIWARA *et al.*, 2005; KUBO *et al.*, 2005). Da mesma forma, o volume utilizado em cada microinjeção das diferentes substâncias testadas também foi estabelecido com base em trabalhos prévios (Castilhos *et al.*, 2006; Quagliotto, 2006) que sugerem ser aquele valor adequado para estimular a AMePD de forma mais específica, embora não se tenha avaliado diretamente o grau de difusão das substâncias microinjetadas.

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, 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 PA sistólica (PAS), PA diastólica (PAD) e PA média (PAM).

Sinais de FC e de PA foram gravados durante um período de 3 minutos de atividade cardiovascular basal, pré-microinjeção de substâncias na AMePD. A seguir era microinjetada uma primeira dose da substância em estudo (salina, glutamato 45 nM, GABA 2 nM ou GABA 3  $\mu$ M) e, 5 minutos após, eram testadas as variáveis cardiovasculares de interesse por 20 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, glutamato 45 nM ou GABA 2 nM ou de GABA 3  $\mu$ M durante todo o experimento. Conforme os dados apresentados por Kaura *et al.* (1995) e Collins (1972; 1973), os tempos utilizados entre uma microinjeção e outra estão de acordo com a duração dos efeitos de Glu e GABA. 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 crescentes de KCN, fenilefrina ou nitroprussiato de sódio conforme detalhados a seguir.

### 3.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS BARORRECEPTORES

Após 5 minutos da microinjeção de salina, de glutamato ou de GABA (2 nM e 3 μM), a sensibilidade dos barorreceptores foi testada pela infusão endovenosa de fenilefrina (Sigma Chemical Company, EUA) na dose de 8 μg/ml, e de nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, EUA) na dose de 100 μg/ml (de acordo com FRANCHINI *et al.*, 1996). Essas substâncias também foram infundidas aleatoriamente entre os animais e em cada grupo experimental. Fenilefrina serviu como um potente estimulador dos receptores α1 adrenérgicos cuja ação predominante ocorre nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição e aumento da RPT. Esta substância foi usada para provocar aumento da PA, o que deveria ser seguida uma bradicardia reflexa comandada pelos barorreceptores. Nitroprussiato de sódio serviu como um potente vasodilatador, tanto de arteríolas como de veias, cuja ação ocorre por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'- guanosina monofosfato cíclico na musculatura lisa de vasos sanguíneos 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. Uma ou outra substância somente foi injetada após os parâmetros cardiovasculares estarem em níveis basais e estando o rato 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) e conforme a fórmula:

$$FC = Pb + (Pt - Pb) / [1 + \exp(-4,56 \cdot G) / (Pt - Pb) \cdot (PA_{50} - PAM)],$$

onde:

FC = frequência cardíaca;

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



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

Pt – Pb = em bpm e que corresponde à amplitude da faixa operacional do reflexo mediado pelos barorreceptores;

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

PA<sub>50</sub> = 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 seu ganho máximo;

PAM = pressão arterial média, conforme descrito anteriormente.

### 3.5 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, glutamato ou GABA nas duas doses, 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, conseqüentemente, 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 µg/kg, de acordo com DALL’AGO *et al.*, 1999). 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 e 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 subsequente 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.

### **3.6 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 (Reagen, Brasil) a 8% 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 (Figura 4). Os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas, secos em estufa e foi feita a coloração dos cortes pelo emprego da clássica 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 a 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 (Figura 4).

### **3.7 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 com medidas repetidas. Ou seja, nesses parâmetros, os valores pré-microinjeção, como registro controle, e os dados após microinjeção na AMePD de salina, glutamato na dose de 45 nM e de GABA nas doses de 2 nM ou de 3  $\mu$ M foram comparados dentro de cada grupo experimental respectivo e entre os grupos experimentais estudados. Com isso, pela estrutura do teste empregado, compararam-se os valores pré-microinjeção e pós-microinjeção entre os grupos experimentais, os dados entre 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 quatro grupos experimentais microinjetados na AMePD e que corresponde ao valor de  $PA_{50}$  após estimulação dos barorreceptores, o Pb após estimulação dos barorreceptores, o Pt após estimulação dos barorreceptores, o G após estimulação dos barorreceptores e a amplitude da faixa operacional do reflexo barorreceptor (Pt – Pb) foram submetidos ao teste da ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparações entre os grupos experimentais. Em todas as situações, o nível de significância estatística estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

Os dados estão apresentados nas Figuras 5-16 e via de regra, quando aplicável, como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Nos grupos experimentais estudados após microinjeção na AMePD de salina, glutamato ou de GABA nas duas doses empregadas, os resultados obtidos foram os seguintes:

1 - Não houve diferenças estatisticamente significantes nos valores de FC entre os grupos estudados. Ou seja, pela estrutura do teste estatístico empregado, os valores de FC na comparação dos valores pré-microinjeção e pós-microinjeção não são diferentes entre si [F (1,24) = 2,959; p = 0,09], nem entre os grupos [F (3,24) = 2,061; p = 0,13], e nem na interação entre período de estudo *versus* grupos experimentais [F (3,24) = 1,734; p = 0,18; Figura 5].

2 - Os valores de PAS não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores pré-microinjeção e pós-microinjeção [F (1,24) = 0,297; p = 0,59], os grupos experimentais [F (3,24) = 0,398; p = 0,75], ou a interação entre esses fatores (momento dos registros *versus* grupos estudados) [F (3,24) = 0,862; p = 0,47; Figura 6].

3 - Para os valores de PAD, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado os valores pré-microinjeção e pós-microinjeção [F (1,24) = 1,595; p = 0,21], entre os grupos estudados [F (3,24) = 0,592; p = 0,62] nem na interação entre os fatores (momento dos registros *versus* grupos estudados) [F (3,24) = 0,730; p = 0,54; Figura 7].

4 - Com base nos resultados anteriores, os valores de PAM igualmente não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as medidas pré-microinjeção e pós-microinjeção

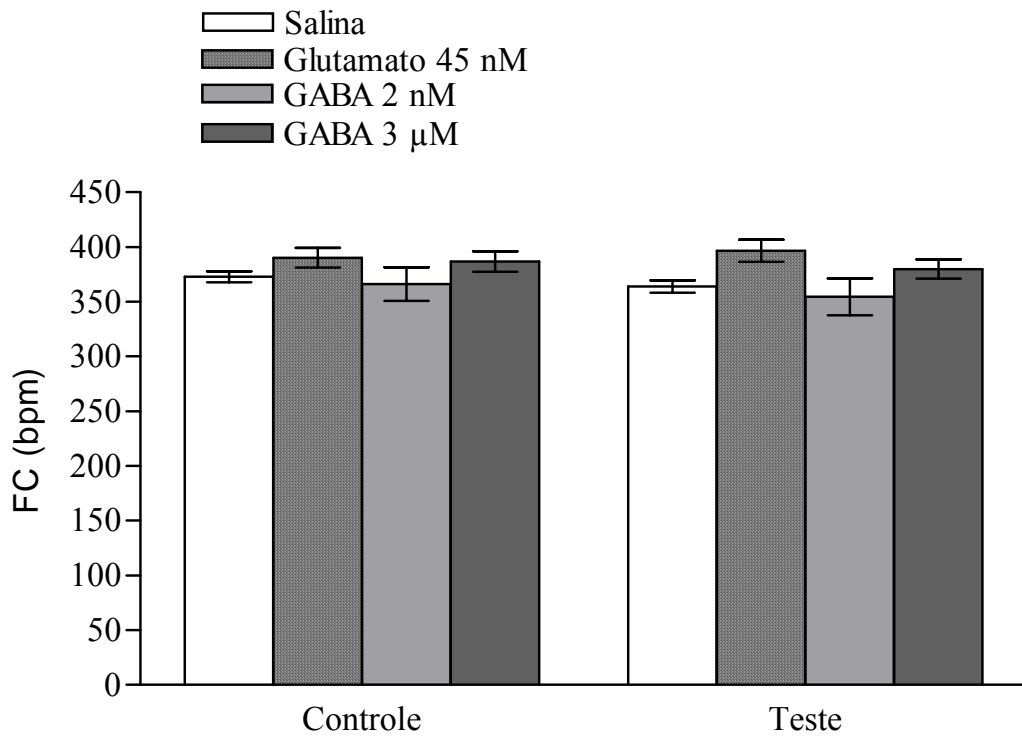
[F (1,24) = 0,203; p = 0,65], entre os grupos experimentais [F (3,24) = 0,808; p = 0,50] e nem na interação entre esses fatores [F (3,24) = 1,126; p = 0,35; Figura 8].

5 – Com relação ao reflexo mediado pelos barorreceptores, os valores referentes ao ponto de maior inclinação da curva da PA ( $PA_{50}$ ), que representa o nível de PA no qual o barorreflexo mostra ganho máximo, após injeções de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio, não foram estatisticamente diferentes quando os dados dos grupos foram comparados entre si [F (3,24) = 0,861; p = 0,47; Figura 9].

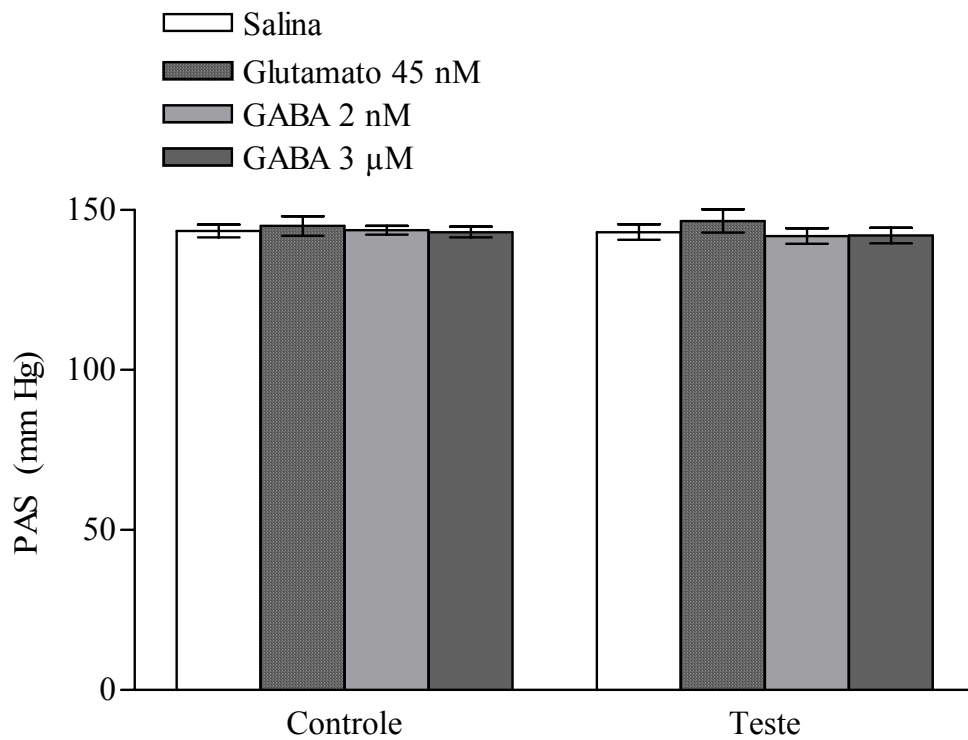
6 - Os valores referentes à queda máxima da FC induzida pelo aumento da PA, platô de bradicardia após a estimulação da resposta reflexa mediada pelos barorreceptores, não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados os dados dos quatro grupos experimentais entre si [F (3,24) = 0,684; p = 0,57; Figura 10]. Já na comparação dos resultados da resposta máxima da FC induzida pelo decréscimo da PA, platô de taquicardia após estimulação reflexa mediada pelos barorreceptores, houve diferença estatisticamente significativa quando os dados dos grupos foram comparados entre si [F (3,24) = 4,440; p = 0,01] e o teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo que recebeu salina ou a menor dose de GABA (2 nM; p < 0,05) e na comparação entre os grupos que receberam GABA ou na dose de 2 nM ou na de 3  $\mu$ M (p < 0,05; Figura 11). Da mesma forma, para a variação do ganho médio ou sensibilidade média do barorreflexo após estimulação reflexa mediada pelos barorreceptores, houve diferença estatisticamente significativa quando os dados dos grupos foram comparados entre si [F (3,24) = 6,817; p < 0,002] e o teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que houve diferença estatisticamente significativas na comparação entre os dados do grupo que recebeu salina e os demais grupos que receberam GABA (em ambas as doses) ou Glu 45nM (teste de Newman-Keuls, p < 0,01 em todos os casos; Figura 12). Já para a amplitude da FC, que corresponde à faixa operacional do reflexo barorreceptor, não houve diferenças significativas [F (3,24) = 1,543; p = 0,22; Figura 13]. Por fim, valores correspondentes à curva da modificação de PAM de acordo com a variação da FC foram estatisticamente diferentes entre os grupos estudados, como descritos anteriormente, sendo que a curva após a microinjeção de GABA 2 nM na AMePD foi diferente dos grupos que receberam salina ou GABA na maior dose (3  $\mu$ M; 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; Figura 14).

7 - Os valores de FC após injeção de diferentes doses de KCN, na avaliação da resposta reflexa relacionada com os quimiorreceptores, apresentaram diferença estatisticamente significativa nos dados pré-microinjeção e pós-microinjeção para as substâncias testadas na AMePD [ $F(3,72) = 83,18$ ;  $p < 0,001$ ] e entre os grupos experimentais [ $F(3,72) = 4,172$ ;  $p = 0,01$ ], mas não na interação entre esses dois fatores comparando-se momento dos registros *versus* grupos estudados [ $F(9,72) = 1,044$ ;  $p = 0,41$ ]. Isto indica que a interpretação dos primeiros resultados é problemática e, portanto, considera-se como não estatisticamente diferentes entre si os valores obtidos para a FC mediado pelo quimioreflexo (Figura 15).

8 – As comparações entre os valores de PAM após injeção de diferentes doses de KCN para testar a resposta reflexa cardiovascular medida pelos quimiorreceptores apontam que houve diferença estatisticamente significativa nos valores pré-microinjeção e pós-microinjeção nos valores das quatro substâncias testadas na AMePD [ $F(3,72) = 12,54$ ;  $p < 0,001$ ], assim como nas comparações entre os grupos experimentais [ $F(3,72) = 3,077$ ;  $p = 0,04$ ]. Na interação desses dois fatores, no entanto, não houve diferença significativa [ $F(9,72) = 0,527$ ;  $p = 0,84$ ; Figura 16].

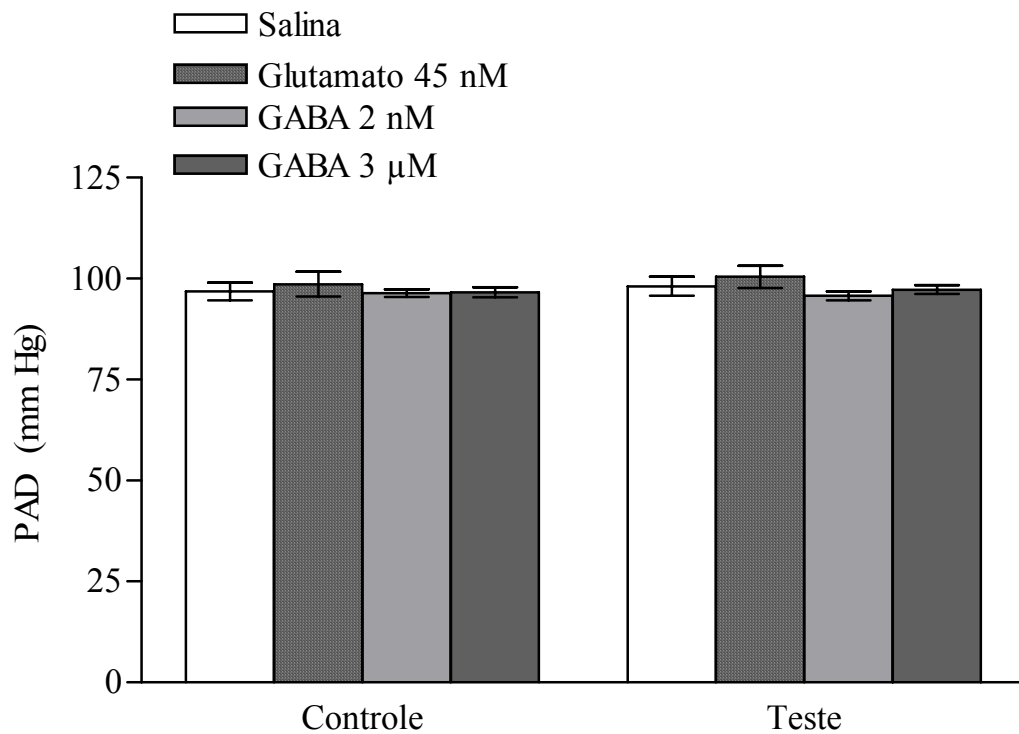


**Figura 5** Média ( $\pm$  DP) da variação da frequência cardíaca (FC em bpm) nos grupos estudados em situação basal antes da microinjeção (Controle) e após a microinjeção (Teste) de salina (0,3  $\mu$ l; n = 7), glutamato na dose de 45 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7), GABA na dose de 2 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7) ou de GABA na dose de 3  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l (n=7) na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos. Não houve diferença estatisticamente significante quando comparados os valores pré-microinjeção e pós-microinjeção ou entre cada grupo experimental estudado ( $p > 0,05$  em todos os casos).

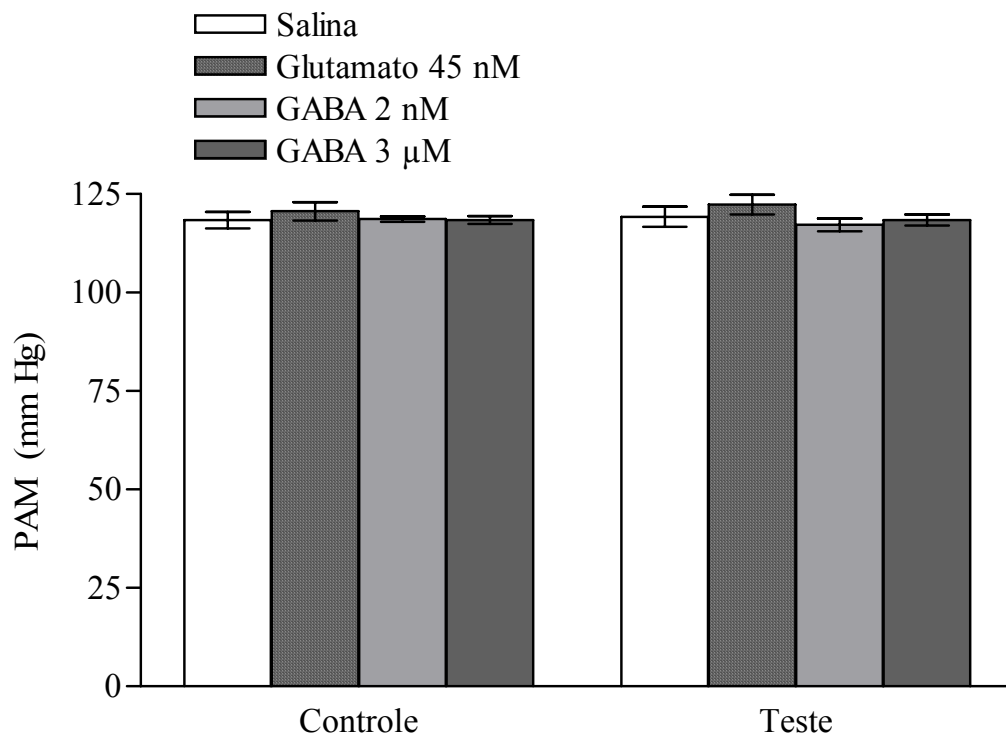


**Figura 6** Média ( $\pm$  DP) da variação da pressão arterial sistólica (PAS em mmHg) nos grupos estudados em situação basal antes da microinjeção (Controle) e após a microinjeção (Teste) de salina (0,3  $\mu$ l; n = 7), glutamato na dose de 45 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7), GABA na dose de 2 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7) ou de GABA na dose de 3  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l (n = 7) na amígdala medial pósterodorsal de ratos. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores pré-microinjeção e pós-microinjeção ou entre cada grupo experimental estudado ( $p > 0,05$ ).

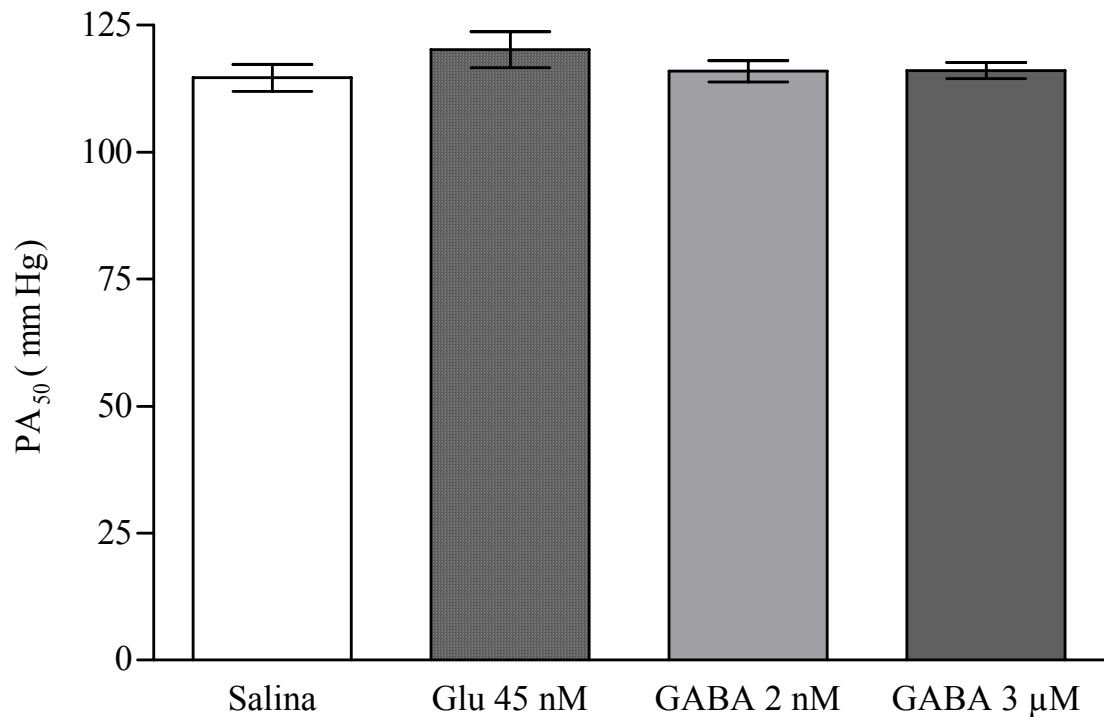




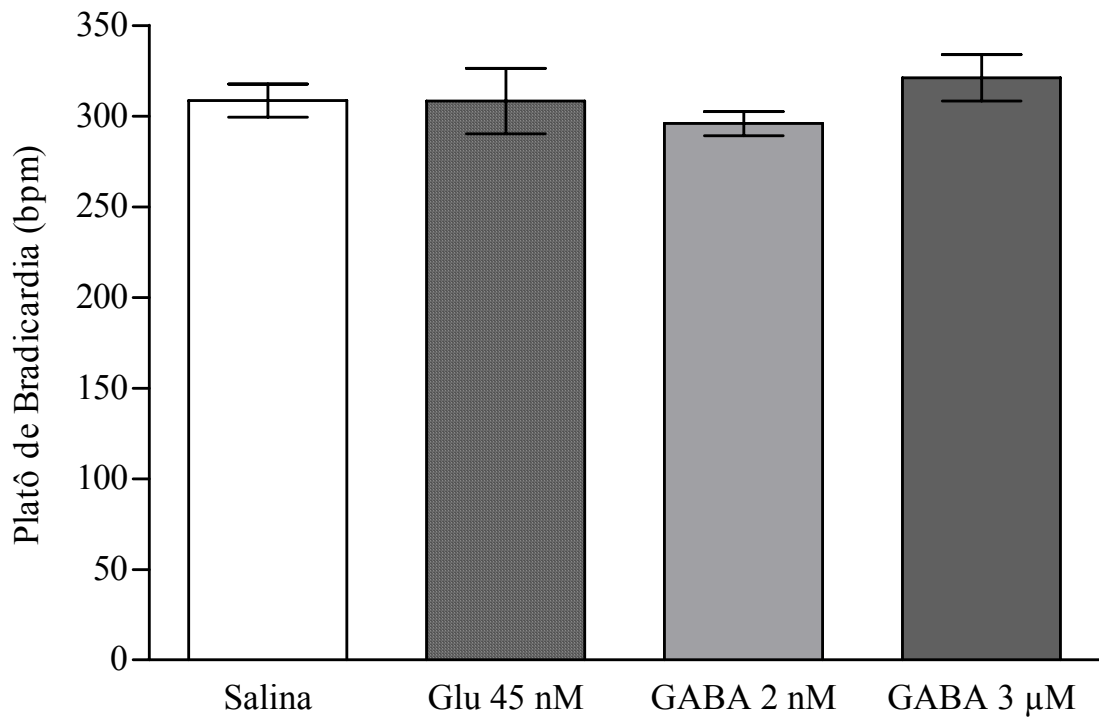
**Figura 7** Média ( $\pm$  DP) da variação da pressão arterial diastólica (PAD em mmHg) nos grupos estudados em situação basal antes da microinjeção (Controle) e após a microinjeção (Teste) de salina (0,3  $\mu$ l; n = 7), glutamato na dose de 45 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7), GABA na dose de 2 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7) ou de GABA na dose de 3  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l (n = 7) na amígdala medial pósterodorsal de ratos. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores pré-microinjeção e pós-microinjeção ou entre cada grupo experimental estudado ( $p > 0,05$ ).



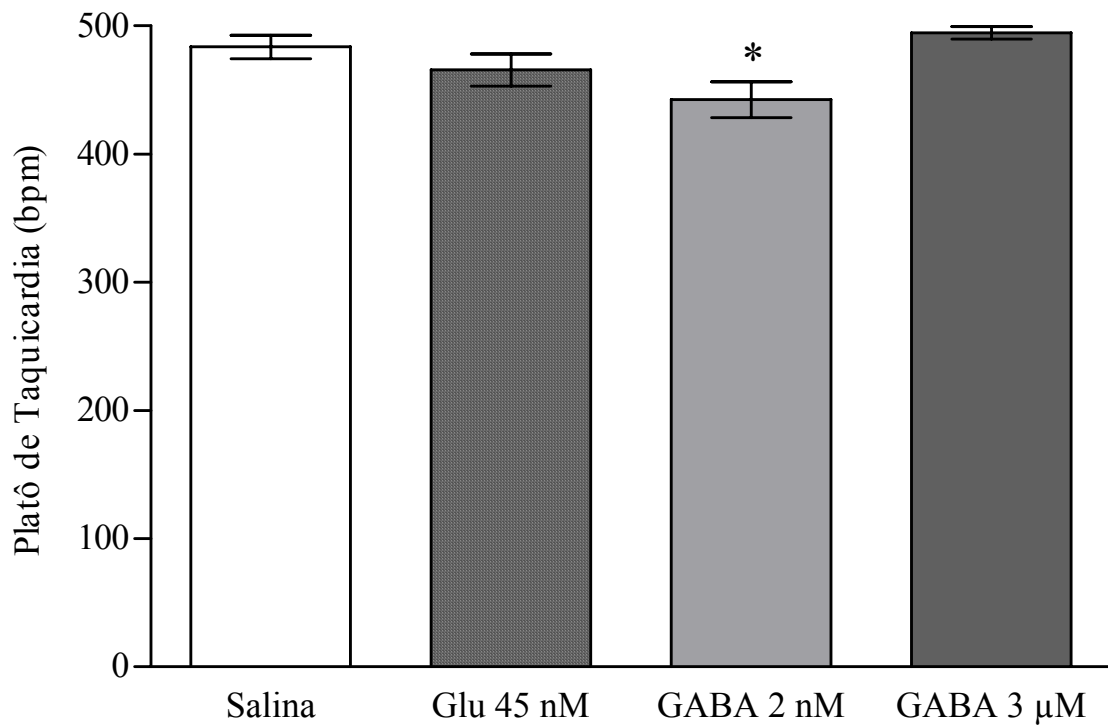
**Figura 8** Média ( $\pm$  DP) da variação da pressão arterial média (PAM em mmHg) nos grupos estudados em situação basal antes da microinjeção (Controle) e após a microinjeção (Teste) de salina (0,3  $\mu$ l; n = 7), glutamato na dose de 45 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7), GABA na dose de 2 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7) ou de GABA na dose de 3  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l (n = 7) na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores pré-microinjeção e pós-microinjeção ou entre cada grupo experimental estudado ( $p > 0,05$ ).



**Figura 9** Média ( $\pm$  DP) da variação do valor de PA (em mmHg) no ponto de maior inclinação da curva (PA<sub>50</sub>) obtida após microinjeção de salina (0,3  $\mu$ l; n = 7), glutamato (Glu) na dose de 45 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7), GABA na dose de 2 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7) ou de GABA na dose de 3  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l (n = 7) na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ).

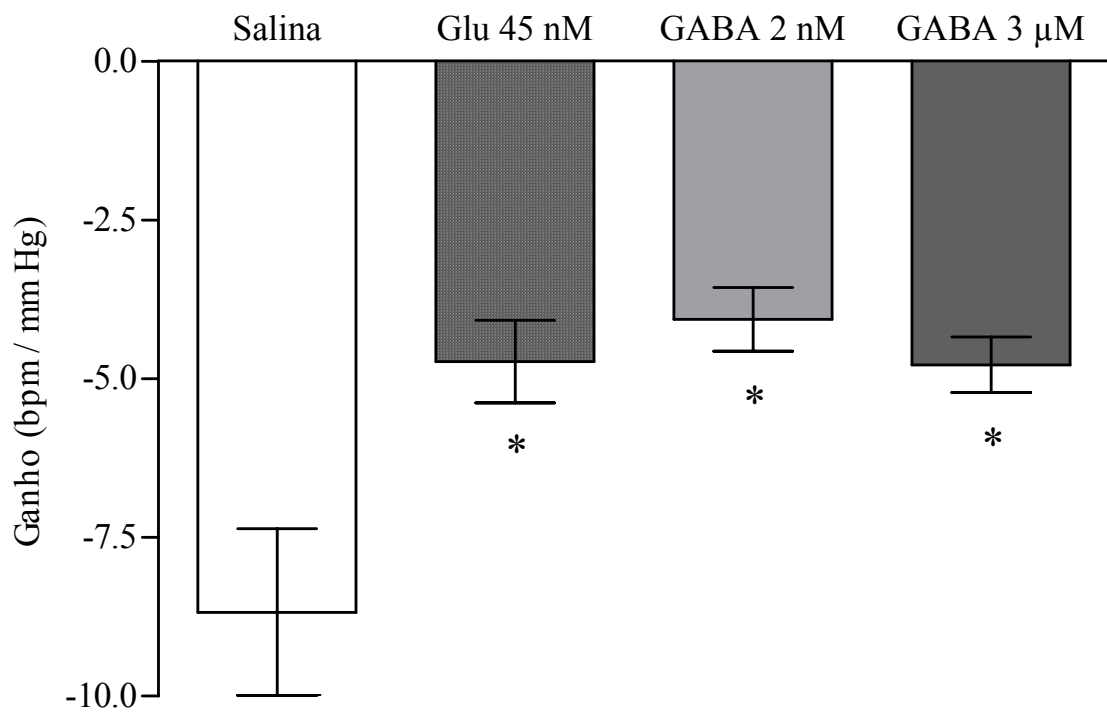


**Figura 10** Média ( $\pm$  DP) da variação da diferença da resposta máxima da queda na FC (em bpm) induzida pelo aumento da PA (em mmHg; platô de bradicardia) obtida após a microinjeção de salina (0,3  $\mu$ l; n = 7), glutamato (Glu) na dose de 45 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7), GABA na dose de 2 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7) ou de GABA na dose de 3  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l (n = 7) na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos. Não houve diferença estatisticamente significante quando comparados os valores entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ).



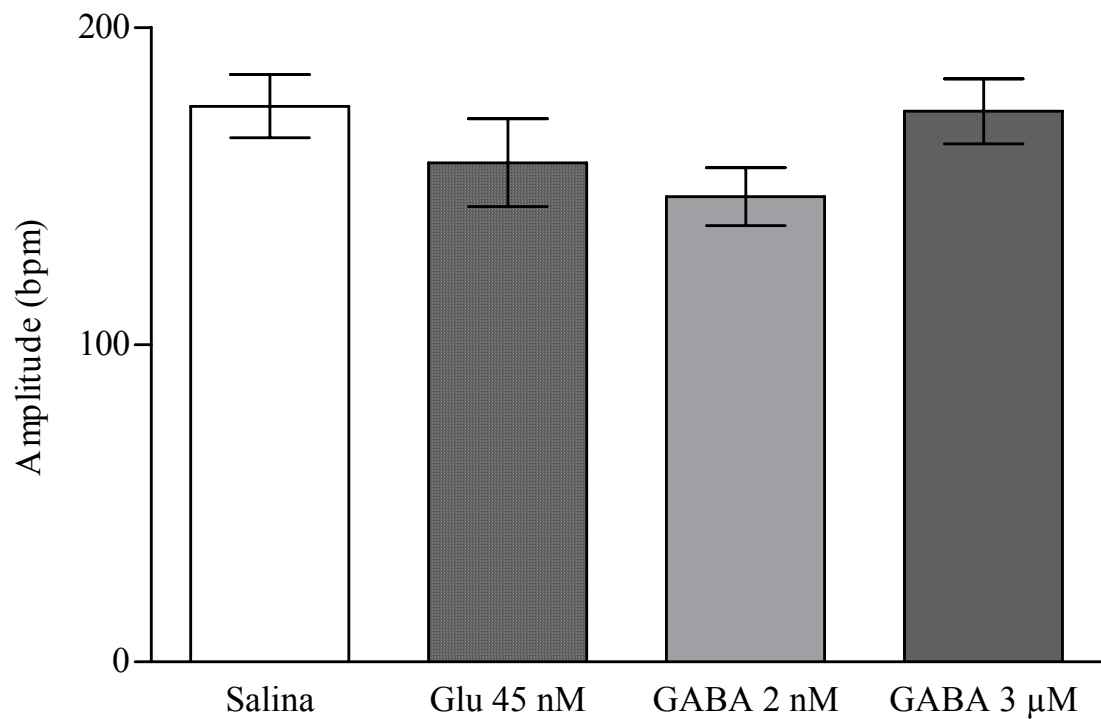
**Figura 11** Média ( $\pm$  DP) da variação da diferença do aumento da resposta máxima na FC (em bpm) induzida pelo decréscimo da PA (em mmHg; platô de taquicardia) obtida após a microinjeção de salina (0,3  $\mu$ l; n = 7), glutamato (Glu) na dose de 45 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7), GABA na dose de 2 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7) ou de GABA na dose de 3  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l (n = 7) na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos.

\*  $p < 0,05$  quando comparado com o valor obtido após microinjeção de salina e de GABA na maior dose (3 $\mu$ M).

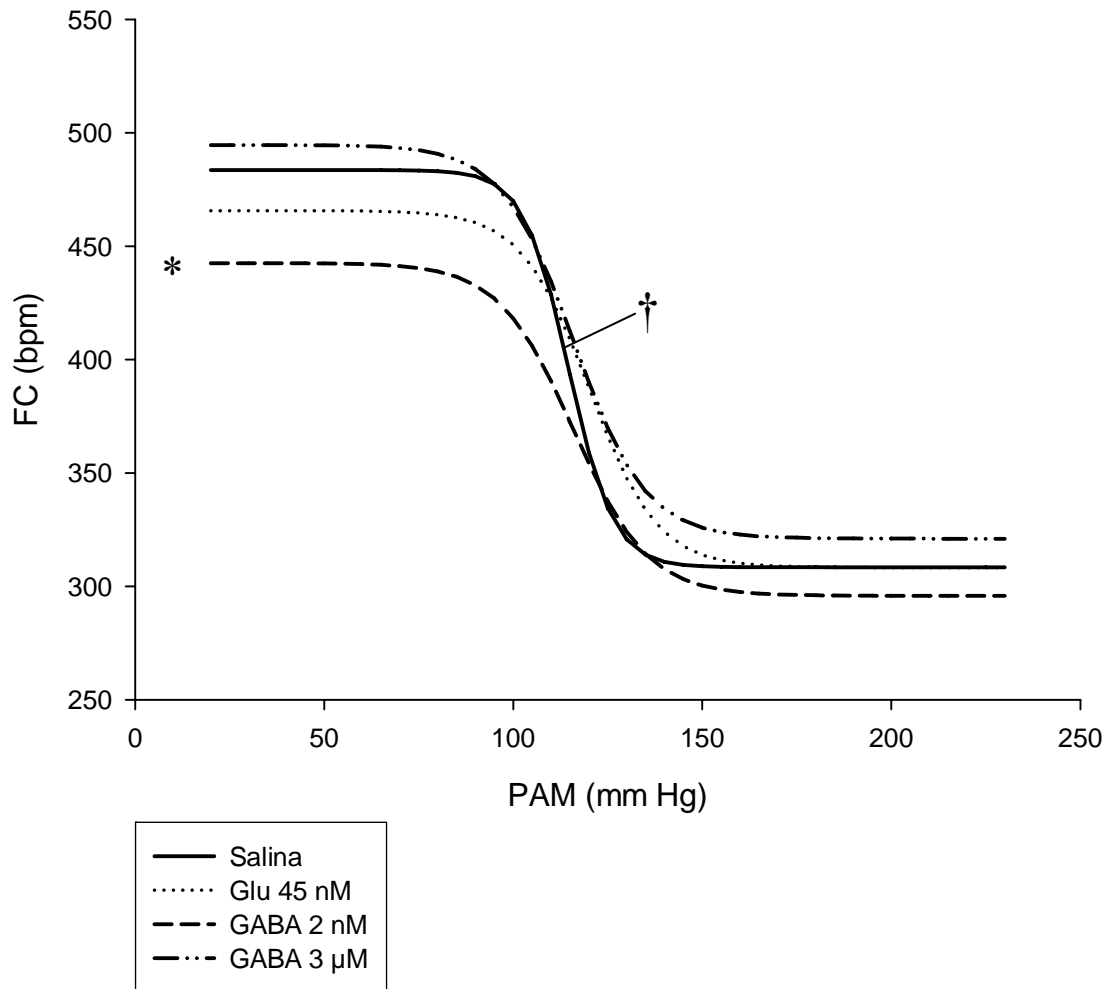


**Figura 12** Média ( $\pm$  DP) da variação da sensibilidade média do barorreflexo (Ganho, em bpm/mmHg) obtida após microinjeção de salina (0,3  $\mu$ l; n = 7), glutamato (Glu) na dose de 45 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7), GABA na dose de 2 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7) ou de GABA na dose de 3  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l (n = 7) na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos.

\* p < 0,01 quando comparado com o valor obtido no grupo que recebeu salina.

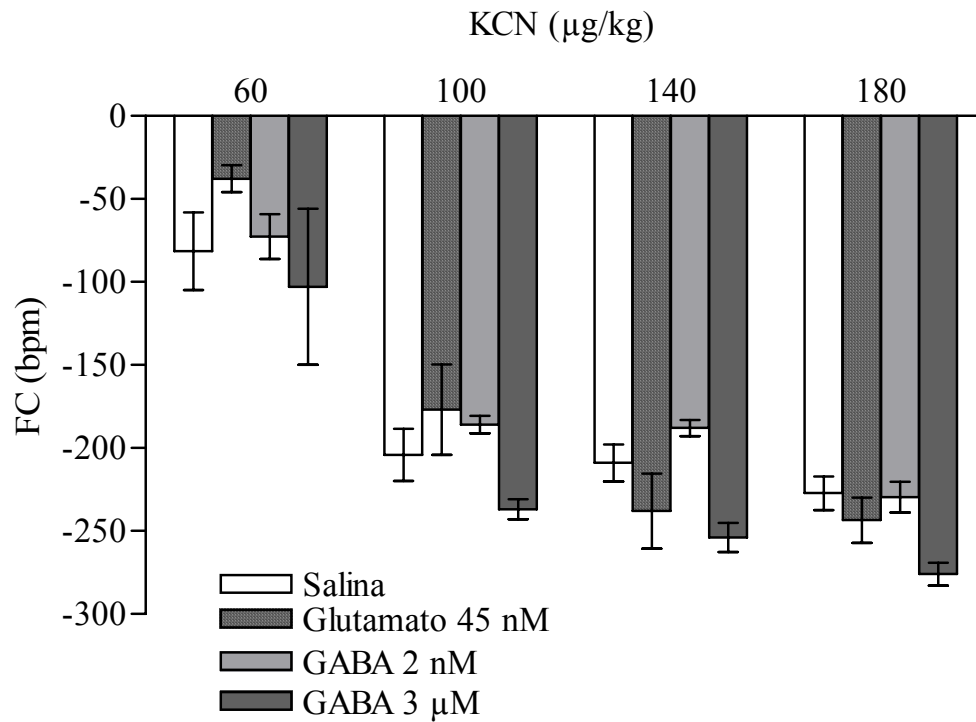


**Figura 13** Média ( $\pm$  DP) da variação da amplitude da FC (em bpm), durante o reflexo barorreceptor, obtida após microinjeção de salina (0,3  $\mu$ l; n = 7), glutamato (Glu) na dose de 45 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7), GABA na dose de 2 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7) ou de GABA na dose de 3  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l (n = 7) na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ).

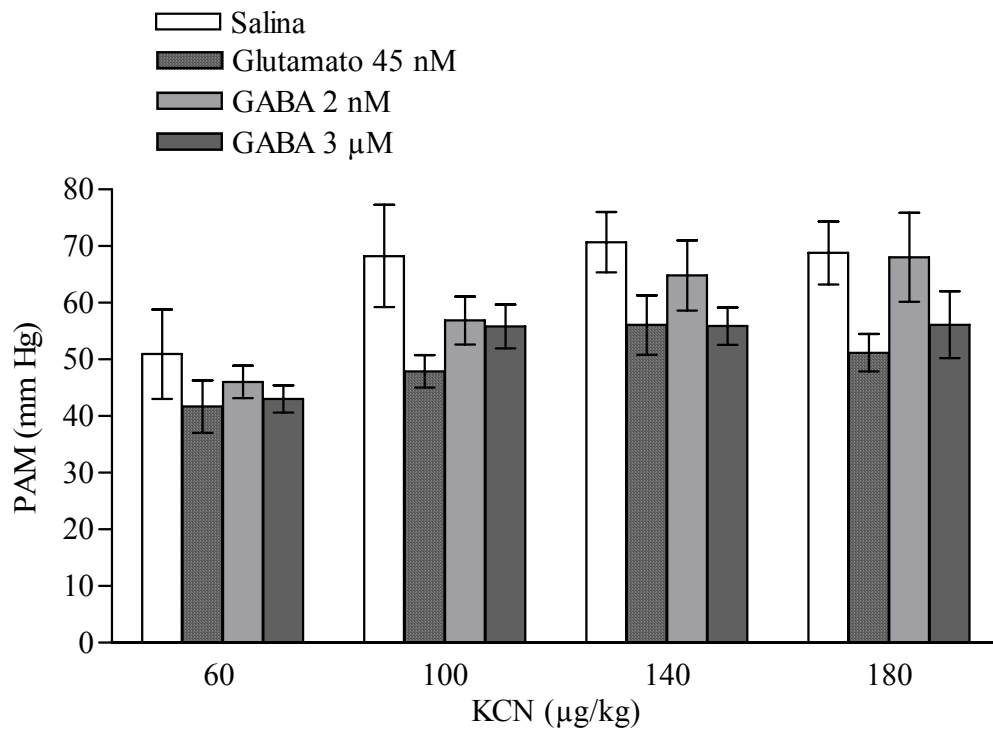


**Figura 14** Análise da curva da modificação da pressão arterial média (PAM em mmHg) de acordo com a variação da frequência cardíaca (FC em bpm) na resposta reflexa mediada pelos barorreceptores e após microinjeção de salina (0,3 µl; n = 7), glutamato (Glu) na dose de 45 nM/0,3 µl (n = 7), GABA na dose de 2 nM/0,3 µl (n = 7) ou de GABA na dose de 3 µM/0,3 µl (n = 7) na amígdala medial pósterodorsal de ratos. Os valores correspondentes à curva da modificação de PAM de acordo com a variação da FC foram estatisticamente diferentes entre os grupos estudados sendo que, no platô de taquicardia (\*), a curva após a microinjeção de GABA 2 nM na AMePD é diferente dos grupos que receberam salina ou GABA na maior dose (3 µM;  $p < 0,05$  em ambos os casos). Os grupos que receberam Glu ou GABA em ambas as doses apresentaram uma curva com inclinação (†) diferente do que o grupo que recebeu salina ( $p < 0,01$ ).





**Figura 15** Média ( $\pm$  DP) da variação da frequência cardíaca (FC em bpm) obtidas após injeção sistêmica de diferentes doses de KCN nos animais microinjetados com salina (0,3  $\mu$ l; n = 7), glutamato na dose de 45 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7), GABA na dose de 2 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7) ou de GABA na dose de 3  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l (n = 7) na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos. As doses de KCN correspondem a 60, 100, 140 e 180  $\mu$ g/kg. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ).



**Figura 16** Média ( $\pm$  DP) da variação da pressão arterial média (PAM em mmHg) obtidas após injeção sistêmica de diferentes doses de KCN nos animais microinjetados com salina (0,3  $\mu$ l; n = 7), glutamato na dose de 45 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7), GABA na dose de 2 nM/0,3  $\mu$ l (n = 7) ou de GABA na dose de 3  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l (n = 7) na amígdala medial pósterodorsal de ratos. As doses do KCN correspondem a 60, 100, 140 e 180  $\mu$ g/kg. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo revelou que, quando comparados os quatro grupos experimentais estudados após microinjeção na AMePD, não houve diferença estatisticamente significativa na FC, na PAS, na PAD, e na PAM nos valores pré-microinjeção e pós-microinjeção de Glu 45 nM ou das duas doses de GABA empregadas em relação ao grupo controle. De forma concordante, o agonista dos receptores GABA<sub>A</sub>, muscimol, microinjetado na AMe não foi capaz de alterar a PAM basal de ratos acordados (KUBO *et al.*, 2004). Kubo *et al.* (2005) também verificaram que Glu e GABA microinjetados em doses similares às utilizadas em nosso trabalho não afetaram a PAM de ratos anestesiados.

Por outro lado, ficou evidenciado que a resposta máxima de FC induzida pelo decréscimo de PA causado pela injeção de nitroprussiato de sódio é significativamente diminuída nos animais microinjetados com GABA na dose de 2 nM, comparado com os animais que receberam salina. Isso indica que a ação de GABA nesta dose na AMePD é capaz de diminuir a atividade barorreflexa, indicando uma papel inibitório para este neurotransmissor também nesta função e nesta área encefálica. Os animais do grupo microinjetado com GABA na dose de 3 µM apresentaram uma resposta máxima de FC maior quando comparados com o grupo microinjetado com GABA na menor dose (2 nM). É muito importante e cabe ressaltar que GABA na dose de 2 nM, assim como glutamato na dose de 45 nM, está dentro de uma faixa fisiológica encontrada na amígdala de ratos, enquanto GABA na dose de 3 µM representa quantidade que, a princípio, somente pode ser obtida farmacologicamente (KAURA *et al.*, 1995). Se esta concentração maior pode igualmente ser obtida em ratos em diferentes condições fisiológicas ou em local no SN que tenha grande inervação GABAérgica ainda precisa ser determinado. Fica evidente aqui, contudo, que a

dose em nível fisiológico de 2 nM e a dose farmacológica de 3  $\mu$ M de GABA tiveram, portanto, resultados opostos nesta variável biológica (vide curva da modificação de PAM de acordo com a variação da FC em situação reflexa, Figura 16), indicando que este neurotransmissor pode ter efeitos variados conforme sua concentração no espaço extracelular nervoso. Ademais, como se trata de uma substância que, dependendo do volume injetado e de sua concentração, pode modular outros transmissores locais é cabível postular que GABA pode estar alterando a ação de diferentes tipos de respostas neuroquímicas e, assim, acarretar uma variação ampla de efeitos (BURT, 2003). Por exemplo, contrariamente aos dados de Kubo *et al.* (2004 e 2005), Yoshida *et al.* (2002) verificaram que bicuculina microinjetada na AMe de ratos anestesiados é capaz de gerar aumento dose-dependente na FC e na PA e que esta resposta pode ser inibida pela microinjeção de muscimol. Esses resultados indicam que a AMe participa na regulação hemodinâmica, provavelmente através da inibição da resposta simpática via receptor GABA<sub>A</sub>. Respostas variáveis ao GABA foram também possíveis de perceber em experimentos de análise do comportamento sexual masculino realizados em nosso laboratório, no qual microinjeções de uma mesma dose farmacológica de GABA na AMePD provocaram efeitos discrepantes em ratos (OLIVEIRA, A.; dados não publicados). Resta determinar também quais receptores e quais mecanismos de transdução de sinal podem estar envolvidos nessas respostas.

Da mesma forma, para a variação da sensibilidade média do barorreflexo, após sua estimulação, houve diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os dados do grupo que recebeu salina e os demais grupos que receberam Glu 45nM ou GABA (em ambas as doses). Mais especificamente, os animais microinjetados com Glu ou GABA apresentaram diferente variação na FC para uma mesma alteração na PA, comparativamente com os animais controle. É interessante que Glu, juntamente com o GABA, igualmente modificou a sensibilidade média do barorreflexo. Chama a atenção, no entanto, que tanto Glu como GABA em ambas as doses podem promover respostas no mesmo sentido (Fig. 12); e embora na observação da curva da PAM pela variação da FC (Fig. 14) possa se identificar Glu e GABA (2 nM) em lados opostos da curva controle, não apresentaram diferença estatisticamente significante entre si. Não há explicação clara ou direta para isto até o momento. Mas, analisando-se a curva da modificação de PAM de acordo com a variação da FC, percebe-se que a ação do GABA na AMePD promoveu variações dose-dependentes sobre a atividade reflexa. Ou seja, GABA microinjetado na dose de 2 nM na AMePD provocou uma menor inclinação na curva de PA quando os barorreceptores foram estimulados com

nitroprussiato de sódio e, portanto, diminuindo o aumento reflexo da FC. Já a microinjeção de GABA na dose maior de 3  $\mu$ M não promoveu o mesmo efeito.

Adicionalmente, a atividade dos barorreceptores exerce um papel fundamental no controle homeostático do sistema cardiovascular embora possa ser modulado de forma não uniforme por neurotransmissores e áreas encefálicas distintas. Por exemplo, os resultados aqui obtidos mostram que os valores referentes ao platô de bradicardia após a estimulação da resposta reflexa mediada pelos barorreceptores não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados os dados dos quatro grupos experimentais entre si. O mesmo ocorreu para o ponto de maior inclinação da curva de PA (*set point*) e à variação da amplitude do reflexo barorreceptor, após estímulo de sua resposta reflexa pelas injeções de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Como isso pode se relacionar com o papel da AMePD na modulação de comportamentos que também requerem ajustes cardiovasculares para sua ocorrência ainda não está desvendado. É relevante notar, no entanto, que esta região modula a resposta reflexa cardiovascular da FC e PA mediada pelos barorreceptores, mas não a atividade basal dessas variáveis nem a resposta reflexa em que quimiorreceptores estejam envolvidos. Neste contexto, Glu e GABA em doses fisiológica e farmacológica afetam o ponto médio de sensibilidade do reflexo barorreceptor e GABA (na dose de 2 nM) ainda é capaz de influenciar o platô de taquicardia, diminuindo-o significativamente. Isto poderia sugerir que as atividades glutamatérgicas e GABAérgicas na AMePD passam a funcionar de forma fásica, e não tônica, quando da elaboração de uma atividade na qual este subnúcleo tenha envolvimento. Estudos eletrofisiológicos e neuroquímicos concomitantes poderiam auxiliar no avanço ou na refutação desta hipótese, estando o animal acordado, executando diferentes comportamentos e tendo suas variáveis cardiovasculares acompanhadas momento-a-momento. Tais experimentos são, no entanto, tecnicamente difíceis de serem realizados e propensos a erros, ainda mais pelo pequeno tamanho da AMePD em ratos.

Maior variabilidade nas respostas de FC e da PA, alterando seus valores máximos e mínimos após atuação de barorreceptores e quimiorreceptores, poderia ocorrer para permitir que comportamentos possam ser executados plenamente pelo animal (QUAGLIOTTO, 2006). Com isso não haveria limitação antes de valores mais extremos para a execução de comportamentos relevantes para a sobrevivência do animal e de sua espécie (TIMO-IARIA, 1983; RASIA-FILHO, 2006). Se forem tomadas em consideração as diferentes atividades que a AMePD pode executar, como é o caso da modulação do comportamento reprodutivo masculino (NEWMAN, 2002; de CASTILHOS *et al.*, 2006) e resposta ao estresse (DAYAS

*et al.*, 1999), poder-se-ia especular que ajustes simpáticos e parassimpáticos cardiovasculares pudessem ser programados concomitantemente às alterações motoras e neuroendócrinas necessárias para a emissão adequada dessas atividades. A ativação e desativação reflexas de tais sistemas em condições fisiológicas determinam ajustes do débito cardíaco e da RPT, contribuindo para a estabilização e manutenção da PA sistêmica em diferentes situações, ampliando a capacidade de adaptação e sobrevivência do organismo (TIMO-IARIA, 1988; DALL'AGO *et al.*, 2004; RASIA-FILHO, 2006). Neste sentido, já está bem descrito que diversas vias neurais aferentes e eferentes do encéfalo são capazes de modificar a atividade cardiovascular, ao mesmo tempo que compõe circuitos envolvidos com reflexos somáticos e viscerais e modulam, de forma integrada, os comportamentos no indivíduo (como revisado em ALMEIDA *et al.*, 2004; DALL'AGO *et al.*, 2003; RASIA-FILHO *et al.*, 2004b). 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 *et al.*, 1964; GALENO *et al.*, 1983; FRISINGER *et al.*, 1984; GESELMA *et al.*, 1987; ÖZKUTLU *et al.*, 1994; CECHETTO *et al.*, 2001). Novamente, embora haja muitos exemplos, o quanto isto está correto para a AMePD ainda precisa ser testado experimentalmente. É preciso considerar que a PA para os diversos órgãos deve ser ajustada, a partir de um valor basal, de acordo com necessidades variáveis e que, em níveis fisiológicos, adequa-se à perfusão tecidual sistêmica (HALL, 1999). Com isso, os ajustes cardiovasculares poderiam ocorrer por respostas reflexas e/ou por mudanças que precedem ou são simultâneas à ocorrência dos mais diversos comportamentos onde a AMePD apresenta participação (DALL'AGO *et al.*, 2003; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; 2006). Esta hipótese bastante plausível é sugerida por nós para futuras investigações. Os resultados obtidos no presente estudo não só acrescentam a informações prévias, mas também confirmam a necessidade de ser dada uma maior importância para a contribuição da atividade glutamatérgica e GABAérgica na AMePD no controle cardiovascular reflexo. Há, no entanto, a necessidade de se determinar se Glu e GABA atuam como tais e/ou devido as suas interrelações funcionais com outros neurotransmissores e neuromoduladores na AMePD. Em estudo recente, a atividade histaminérgica na AMePD foi capaz de modificar o *set point* da PA, após estimulação dos barorreceptores, aumentando a resposta reflexa ao desviar à direita a curva de relação entre FC e PA (QUAGLIOTTO, 2006). Embora fuja ao escopo inicial desta dissertação, são todos esses dados importantes que estão relacionados aos presentes achados e que abrem temas para novas pesquisas. O conhecimento

mais detalhado da neuroquímica da AMePD e as interrelações funcionais que nela se encontram deve auxiliar a aquilatar os presentes resultados em animais não anestesiados.

Os quimiorreceptores arteriais respondem a aumentos ou quedas da  $PO_2$ , da  $PCO_2$  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 aumento da força de contração miocárdica. No presente estudo, é preciso destacar que os valores de FC e PA após injeção de diferentes doses de KCN indicam que não houve diferença estatisticamente significativa nos dados após microinjeção das substâncias estudadas na AMePD. O fato de animais microinjetados com salina não apresentarem variações estatisticamente significativas pode dizer respeito à estrutura da análise estatística em si. E, notavelmente, os dados gerados nos grupos que receberam Glu e ambas as doses de GABA são idênticos também. Contrariamente a isto, a microinjeção de histamina e de metil-histamina, agonista dos receptores  $H_3$ , na AMePD foi capaz de gerar uma diminuição reflexa maior na FC após estimulação dos quimiorreceptores com KCN (QUAGLIOTTO, 2006). Isto indica que a histamina na AMePD pode ampliar o reflexo quimiorreceptor, mas o mesmo não se obtém com Glu ou com ambas as doses de GABA aqui utilizadas. Isto sugere que diferentes neurotransmissores modulam a resposta reflexa à ativação dos quimiorreceptores via AMePD.

De fato, distintas formas de controle estão envolvidas não só na manutenção como na variação a cada instante da PA, regulando o calibre e a reatividade vascular, a distribuição de líquidos dentro e fora dos vasos e o débito cardíaco (DALL'AGO *et al.*, 2003). O estudo dos mecanismos de controle da PA tem indicado grande número de substâncias e sistemas fisiológicos que interagem de maneira complexa e, por vezes, com redundância para garantir a PA em níveis adequados nas mais diversas situações (MICHELINI, *et al.*, 1994; IRIGOYEN *et al.*, 2001). Com o presente trabalho buscou-se igualmente demonstrar que outra região no SN central de ratos, a AMePD, é coadjuvante no processo de controle da FC e da PA. Este sistema de controle complexo determina o grau de atividade dos sistemas simpático e parassimpático, modulando a rápida resposta cardiovascular necessária momento-a-momento no animal em vigília. A amígdala já vem sendo implicada no controle de diversas variáveis orgânicas, incluindo-se aquelas fisiológicas do sistema cardiovascular ou, ainda, na resposta pressora homeostática ou alostática (BOLHUIS *et al.*, 1984; RANDALL, 1984; BEAULIEU *et al.*, 1986; DAVIS *et al.*, 2000; KUBO *et al.*, 2004; QUAGLIOTTO, 2006). Neste sentido,

estão bem demonstrados os efeitos do estresse na estimulação do sistema cardiovascular e subsequente ocorrência de hipertensão arterial sistêmica, o que se manifesta concomitantemente com o aumento da expressão da proteína *fos*, como marcador de atividade neuronal, em diversos núcleos da amígdala, incluindo a AMe (ÖZKUTLU *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1995; KUBO, 2004; FUKUMORI, 2004). Diversos experimentos realizados em ratos apontaram a AMe como uma das regiões envolvidas na percepção e nos processamentos neurais de estímulo estressante envolvendo, a partir dela, os sistemas simpático e parassimpático (AGUILERA, 1998; SAPOLSKY, 1999; RADLEY *et al.*, 2005). Eferências partem da AMe em direção ao núcleo paraventricular hipotalâmico onde se localizam as células que contêm o hormônio liberador de corticotrofina (SILVERMAN *et al.*, 1981; TRIBOLLET *et al.*, 1981; SWANSON *et al.*, 1998). Além de ativar o eixo HPA em ratos, a AMe parece reger respostas de liberação de ocitocina desencadeado pela exposição do animal a estresse emocional (McGAUGH *et al.*, 1992; DAYAS *et al.*, 1999). Isto sugere que, pelo menos para eventos estressores incondicionados, a AMe representa uma região crítica para a geração das respostas simpáticas, parassimpáticas e neuroendócrinas de ratos (DAYAS *et al.*, 1999). E, embora todos esses estudos não tenham dividido a AMe em subregiões, os presentes achados sugerem que a AMePD bem pode ter participação nessas respostas. De fato, recentemente descobriu-se que estresse de contenção de 1h em ratos é capaz de modificar a morfologia de neurônios da AMePD, diminuindo a densidade de espinhos dendríticos nesses animais e, supostamente, parte da transmissão sináptica local (MARCUSOZZO, 2006). Por via neural ou hormonal, pode-se influenciar a atividade de regiões como o NTS, o órgão subfornical ou demais regiões do sistema límbico que atuam nas alterações da FC e da PA (SWANSON *et al.*, 1979; CANTERAS *et al.*, 1992; SIMERLY, 2004).

O papel integrado da AMePD precisa ser melhor elucidado, mas dados como os presentes indicam que a modulação da FC e da PA envolvem esta subregião igualmente e, muito claramente, de forma integrada em circuitos. Futuros experimentos devem auxiliar a desvendar quais vias liberam Glu ou GABA e em quais circunstâncias, sob quais demandas de ambiente ou internas do animal, para promover mudanças nas respostas reflexas cardiovasculares como observadas aqui. Igualmente, o quanto a AMePD pode estar envolvida na fisiopatologia de doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial sistêmica e/ou como fármacos podem atuar nela para modificar seu funcionamento neuroquímico são linhas de pesquisa que se abrem para novas investigações.



## 6 CONCLUSÃO

- Na AMePD, microinjeção de Glu (45 nM) ou GABA (2nM e 3  $\mu$ M) não modifica os valores basais de FC e PA nem a resposta reflexa cardiovascular mediada por quimiorreceptores.

- A microinjeção de GABA na dose de 2 nM causa a diminuição da resposta máxima de FC induzida pelo decréscimo de PA quando da injeção de nitroprussiato de sódio. Isso indica que a ação de GABA nesta dose na MePD é capaz de diminuir a atividade barorreflexa.

- As microinjeções de Glu (45 nM) ou de GABA (2 nM e 3  $\mu$ M) foram capaz de reduzir a sensibilidade média do barorreflexo, o que pode estar relacionado com a integração funcional desta estrutura na modulação de comportamentos que também requeiram ajustes cardiovasculares para sua ocorrência.

## **7 PERSPECTIVAS**

Pesquisas futuras deverão estudar se a AMePD consegue modular a PA e a FC provocadas reflexamente por atuação direta em estruturas hipotalâmicas ou bulbo-pontinas relacionadas com a inervação simpática cardiovascular ou se sua ação se dá de forma indireta por excitação da ACe. Se esta última realmente estiver ocorrendo, então ficará mais clara a concepção recente de que é a AMe quem preferentemente modula respostas neuroendócrinas, simpáticas e parassimpáticas executadas, em última instância, pela ACe, para modular atividades reflexas cardiovasculares.

Da mesma forma, é importante responder se Glu ou GABA estão atuando por si ou alterando a atividade de outros transmissores presentes na AMePD. Tendo em vista que a histamina, assim como Glu e o GABA, é capaz de modular a atividade cardiovascular e que outros estudos têm reforçado a idéia da influência mútua entre estes neurotransmissores, tanto em condições fisiológicas como patológicas, também seria possível especular se esses neurotransmissores estão interagindo na AMePD para causar seus efeitos. Ainda neste sentido, resta determinar também quais receptores e quais mecanismos de transdução de sinal podem estar envolvidos nessas respostas.

A análise espectral permite a identificação dos componentes de ondas complexas, sua variabilidade, frequência de ocorrência e distribuições no tempo e no espaço. De forma complementar e relevante, esta análise será utilizada, dentre outras aplicações, para avaliar a variabilidade da FC e da PA e as atividades simpática e vagal. Este é, portanto, um campo profícuo que se encontra aberto para novas contribuições.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R. E.; MORGAN, H. D. The effect of kindling of different nuclei in the left and right amygdala on anxiety in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 55, p. 1-12, 1994.

AGGLETON, J. P.; BLINDT, M. S. Effects of the amygdaloid and amygdaloid-hipocampal lesions on object recognition and spatial working memory in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, p. 962-974, 1989.

AGUILERA, G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and stress response. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 9, n. 8, p.329-336, 1998.

ALLEN, J. P.; ALLEN, C. F. Role of the amygdaloid complex in the estress-induced release of ACTH in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 15, p. 220-230, 1974.

ALHEID, G. F.; HEIMER, L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: The striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal componemts of substantia innominata. **Neuroscience**, v.27, p. 1-39, 1988.

ALHEID, G. F.; DE OLMOS, J. S.; BELTRAMINO, C. A. Amygdala and extended amygdala. In: PAXINOS, G. **The Rat Nervous System**. San Diego: Academic Press, p. 495-598, 1995.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. **Brain Research Review**. v. 12, p. 40-56, 2004.

ANGELIS, K.; DALL'AGO, P.; GANDONSKI, G.; PEIXOTO, L. A.; FERNANDES, T. G.; IRIGOYEN, M. C. Exercise training improves cardiovascular and metabolic status in diabetic rats. **Hypertension**, v. 4, n. 33, p.1073-1073, 1999.

ANGELIS, K.; OLIVEIRA, A. R.; DALL'AGO, P.; PEIXOTO, L. R. A.; GANDONSKI, G. LACHINNI, S.; .FERNANDES, T. G.; IRIGOYEN, M. C. Effects of exercise training on autonomic and miocardial disfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p.635-64, 2000.

ANGELIS, K.; DALL'AGO, P.; SCHAAN, B.; MAEDA, C. Y.; WICHI, R. B.; IRIGOYEN, M. C. Cardiovascular control in experimental diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 9, n.5, p. 1091-1100, 2002.

ARNOLDA, L.; MINSON, J.; KAPOOR, V.; PILOWSKY, P.; LLEWELLYN-SMITH, I.; CHALMERS, J. Amino acid neurotransmitters in hypertension. **American Journal of Cardiology**, v.37, p.2-7, 1992.

AVERILL, D. B.; DIZ, D. I. Angiotensin peptides and baroreflex control of the sympathetic outflow: Pathways and mechanism in the medulla oblongata. **Brain Research Bulletin**, v.51, p.119-128, 2000.

AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v.179, p.641-668, 1978.

BANDLER, R.; KEAY, K. A.; FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Research Bulletin**, v.53, p. 95-104, 2000.

BAYER, S. A. Quantitative 3H-thymidine radiographic analyses of neurogenesis in the rat amygdala. **The Journal of Comparative Neurology**, v.194, p.845-875, 1979.

BEAULIEU, S.; DI PAOLO, T.; COTE, J.; BARDEN, N. 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, p.247-254, 1986.

BEAULIEU, S.; DI PAOLO, T.; COTE, J.; BARDEN, N. Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin secretion to immobilization stress: opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic system. **Neuroendocrinology**, v.45, p.7-46, 1987.

BEN-ARI, Y.; L E.; GAL LA SALLE, G.; BARBIN, G.; SCHWARTZ, J.C.; GARBARG, M. Histamine synthesizing afferents within the amygdaloid complex and bed nucleus of the stria terminalis of the rat. **Brain Research Bulletin**, v.138, p.285-294, 1977.

BENNETT, C.; LIANG, K. C.; McGAUGH, J. L. Depletion of adrenal catecholamines alters the amnesic effect of amygdala stimulation. **Behavioral Brain Research**, v.15, p.83-91, 1985.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Inate and conditioned reactions to tread in rats with amygdaloid lesions. **The Journal of Comparative Neurology**, v.81, p.281-290, 1972.

BOLHUIS, J. J.; FITZGERALD, R. E.; DIJK, D. J. KOOLHAAS, J. M. The corticomedial amygdala and learning in an agonistic situation in the rat. **Physiology and Behavior**, v.32, p.575-579, 1984.

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

BORMANN, J. The 'ABC' of GABA receptors. **Trends Pharmacology. Sci.**, v.21, p.16-19, 2000.

BOWERY, N. G. GABAB receptor pharmacology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.33, p.109-147, 1993.

BRESSLER, S. C.; BAUM, M. J. Sex comparison of neuronal *Fos* immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. **Neuroscience**, v.71, p.1063-1072, 1996.

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

CANTERAS, N. S.; SIMERLY, R. B. SWANSON, L. W. Organization of projection from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. **Journal of Neuroscience**, v.360, p.213-245, 1995.

CARNEY, R. M.; SAUNDERS, R. D.; FREEDLANDE, K. E.; STEIM, P.; RICH, M. W.; JAFFE, A. S. Association of depression with reduced heart rate variability in coronary artery disease. **American Journal of Cardiology**, v.76, p.562-564, 1995.

CECHETTO, D.; GELB, A. The amygdala and cardiovascular control. **The Journal of Neurosurgery and Anesthesiology**, v.13, p.285-287, 2001.

CHEN, X.; HERBERT, J. 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, 1995.

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

COLLINS, G. G. S. GABA-2-oxoblutarate transaminase, glutamate decarboxylase and half-life of GABA in different areas of rat brain. **Biochemical Pharmacology**, v.21, p.2849-2858, 1972.

COLLINS, G. G. S. Effect of amonooxyacetic acid, thiosemicarbazide and haloerido on the metabolism an half-lives of glutamate and GABA in the rat brain. **Biochemical Pharmacology**, v.22, p.101-111, 1973.

COUVE, A.; MOSS, S. J.; PANGALOS, M. N. GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v.16, p.296-312, 2000.

DALL'AGO, P.; MAEDA, C. Y.; FERNANDES, T. R. G.; SCHAAN, B.; IRIGOYEN, M. C. Disfunção autonômica precoce no diabetes experimental de curta duração. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.1, n.65, p.84-84, 1995.

DALL'AGO, P.; MAEDA, C. Y.; FERNANDES, T. R. G.; IRIGOYEN, M. C. Chemoreflex dysfunction in short term diabetes induced by streptozotocin (STZ) in rats. **Journal of Hypertension**, v.1, n.14, p.189-189, 1996.

DALL'AGO, P.; FERNANDES, T. R. G.; IRIGOYEN, M. C. Impairment of baroreflex and chemoreflex sensitivity in streptozotocin diabetic rats. **Hypertension**, v.3, n.29, p.859-859, 1997.

DALL'AGO, P.; FERNANDES, T. G.; MACHADO, U. F.; BELLÓ, A. A.; IRIGOYEN, M. C. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.119-124, 1997.

DALL'AGO, P.; D'AVILA, K. A.; GADONSKI, G.; FERNANDES, T. G.; PEIXOTO, L. A. Exercise training improving cardiac function in diabetic rats. **Circulation**, v.17,n.98, p.129-129, 1998.

DALL'AGO, P.; OLIVEIRA, L. O. A.; ANGELIS, K.; SENNA, M. T.; FERNANDES, T. R. G.; BELLÓ, A. A.; BITTENCOURT, P. I. H.; IRIGOYEN, M. C. Contribution of depressed  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase activity for the hemodynamic changes in experimental diabetes. **Hypertension**, v.33, n.4, p.1073-1073, 1999.

DALL'AGO, P.; MAEDA, C. Y.; ANGELIS, K.; SCHANN, B. D.; IRIGOYEN, M. C. Controle reflexo da pressão arterial no diabetes experimental. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.3, p.255-266, 1999.

DALL'AGO, P.; RIGATTO, K. V.; GADONSKI, G.; FANG, J.; ALBURQUERQ, V. L. PEIXOTO, L. A.; FERNANDES, T. G.; IRIGOYEN, M. C. Exercise reverses periferic insulin resistance in trained L-Name hypertensive rats. **Hypertension**, v.4, n.33, p.1089-1089, 1999.

DALL'AGO P.; MASCARENHAS, M.; CLAUSSEL, N. Aspectos genéticos da insuficiência cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v.3, p.38-43, 2000.

DALL'AGO, P.; SILVA, V. O. K.; WERNER, J.; FERNANDES, T. G.; IRIGOYEN, M. C. Low blood pressure in diabetic rats: Changes in glomerular filtration rate. **Hypertension**, v.1, n.1, p.13-13, 2001.

DALL'AGO, P.; SILVA, V. O. K.; ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C.; FAZAN JUNIOR, R.; SALGADO, H. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.07, n.35, p.843-849, 2002.

DALL'AGO, P.; RASIA-FILHO, F.; RASIA-FILHO, A. A. Bases fisiológicas da função cardiovascular. In: MICHELIN-FILHO, F. et al. **Doenças do coração**. São Paulo: Robe, v.3, p.77-98, 2003.

D' AVILA, K. A. L.; GADONSKI, G.; FANG, J.; ALBURQUERQ, V. L.; DALL'AGO, P.; PEIXOTO, L. R. A.; FERNANDES, T. G.; IRIGOYEN, M. C. Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained L-Name hypertensive rats. **Hypertension**, n.2, v.34, p.768-772, 1999.

DAMPNEY, R. A. L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, v.74, n°2, p.323-364, 1994.

DAMPNEY, R. A. L.; COLEMAN, M. J.; FONTES, M. A. P.; HIROOKA, Y.; HORIUCHI, Y- W.; POLSON, J. W. POTTS, P. D.; TAGAWA, T. Central mechanism underlying, short-

and long-term regulation of the cardiovascular system. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.29, p.261- 268, 2002.

DAMPNEY, R. A. L.; HORIUCHI, J. Functional organisation of central cardiovascular pathways: studies using c-fos gene expression. **Progress in Neurobiology**, v.71, p.359-384, 2003.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annual Reviews Neuroscience**, v. 15, p.353-375, 1992.

DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **TINS**, v.17, p.208-214, 1994.

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

DAVIS, M.; WHALEN, P. J. The amygdala: vigilance and emotion. **Molecular and Cellular Psychiatry**. v.6, p.13– 34, 2001.

DAYAS, C. V.; BULLER, K. M.; DAY, T. A. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. **European Journal of Neuroscience**, v.11, p.2312-2322, 1999.

de CASTILHOS, J.; MARCUZZO, S.; FORTI, C. D.; FREY, R. M.; STEIN, D.; ACHAVAL, M.; RASIA-FILHO, A. A. Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: Dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. **Brain Research Bulletin**, v.69, n.2, p.131-139, 2006.

de PAULA, P.M.; MACHADO, B.H. Changes in regional vascular resistance in response to microinjection of L-glutamate into different antero-posterior coordinates of the RVLM in awake rats. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v.87, p.301-309, 2001.

de OLMOS, J. S. ALHEID, G. F.; BELTRAMINO, C. A. Amygdala. IN: PAXINOS, G. **The Rat Nervous System**, Sydney: Academic Press, p.223-234, 1985.

de OLMOS, J. S. DE; HEIMER, R. L. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. **Annals of the New York Academy Sciences**, v.877, p.1-32, 1999.

de OLMOS, J. S.; BELTRAMINO, A.; ALHEID, G. Amygdala and extended amygdala of the rat: A cytoarchitectonical, fibroarchitectonical survey. **The rat Nervous System**, v.3, n.19, 509-603, 2004.

DOMINGUEZ, J. M.; HULL, E. M. Stimulation of the medial amygdala enhances medial preoptic dopamine release: implications for male rat sexual behavior. **Brain Research Bulletin**, v.917, p. 225-229, 2001.

EVERITT, B. Limbic lobe and olfactory pathways. In: BERRY, M. M.; BANNISTER, L. H.; STANDRING, S. M. **Gray's Anatomy**. London, Churchill Livingstone, p.115-1141, 1995.

FILLENZ, M. Physiological release of excitatory amino acids. **Behavioural Brain Research**, v.71, p.51-67, 1995.

FOLKOW, B.; HALLBÄCK-NORDBORG, M.; MARTNER, J.; NORDBORG, C. Influence of amygdala lesions on cardiovascular responses to alerting stimuli, on behaviour and on blood pressure development in spontaneously hypertensive rats. **The American Journal of Physiology**, v.116, p.133-139, 1982.

FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, E. M. Carotid Chemoreceptors Influence Arterial Pressure in Intact e Aortic Denervated Rats, **The American Journal of Physiology**, v.32, p.677-683, 1992.

FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, E. M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **Journal of the Automatic Nervous System**, v. 42, p.63-70, 1993.

FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, E. M. Neurogenic hypertension in the rat. In: **Handbook of Hypertension**, Experimental and genetic models of hypertension. GANTEN, D.; JONG, W. Elsevier Science BV, Amsterdam: v.16, p. 472-500, 1994.

FRANCHINI, K. G.; MOREIRA, E. D.; IDA, F.; KRIEGER, E. .M. Alterations in the cardiovascular control by chemoreflex and the baroreflex in old rats. **American Journal of Physiology**, v.270, p.310-313, 1996.

FRYSINGER, R. C.; MARKS, J. D.; TRELEASE, R. B.; SCHCHTMAN, V. L.; HARPER, R. M. Sleep states attenuate the pressor responses to central amygdala stimulation. **Experimental Neurology**, v.83, p.604-617, 1984.

GALENO, T. .M.; VAN HOESEN, G. W.; MAIXNER, W.; JONSON, A. K.; BROODY, M. J. Contribution of the amygdala to the development of spontaneous hypertension. **Brain Research Bulletin**, v.246, p.1-6, 1982.

GALENO, T. M.; BROODY, M. J. Hemodynamic responses to amygdaloid stimulation in spontaneously hipertensive rats. **The American Journal of Physiology**, v.245, p.281-286, 1983.

GALLAGHER, M.; CHIBA, A. A. The Amygdala and emotion. **Brain Research Bulletin**, v.6, p.221-227, 1996.

GANONG, W. F. Cardiovascular regulatory mechanisms. In: GANONG, W. F. **Review of Medical Physiology**. New York: McGraw-Hill Co., p.599-613, 2003.

GAVA, A.; PEOTTA, V.A.; CABRAL, A. M. Decreased baroreflex sensitivity in isoproterenol – reated mice with cardiac hypertrophy. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical.**, v.114, p.47-54, 2004.

GESELMA, A. J.; MCKITRICK, D. J.; CALARESU, F. R. Cardiovascular responses to chemical and eletrical stimulation of the amygdala in rats. **The American Journal of Physiology**, v.253, p.712-718, 1987.

GIERBERGEN, P. L. M. V.; PALKOVITS, M.; DE JONG, W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. **Physiological Reviews**, v.72, n°3, p.789-824, 1992.



GRASSI, G.; CATTANEO, B. M.; SERAVALLE, G.; LANFRANCHI, A. L.; MANCIA, G. Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. **Hypertension**, v.31, p.68-72, 1998.

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

GROOVE, E.A. Efferent connections of the substantia innominata in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v.277, p.347-382, 1988.

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. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v.114, p.1-10, 2004.

GUILLAMÓN, A.; SEGOVIA, S. M.; KATER, S. B. Sex differences in the vomeronasal system. **Brain Research Bulletin**, v.277, p.377-382, 1988.

HAGIWARA, Y.; NISHIGORI, Y.; FUKUMORI, R.; KUBO, T. The medial amygdaloid area is involved in activation of angiotensin II-sensitive neurons in the anterior hypothalamic area. **Brain Research Bulletin**, v.1033, p.128-134, 2005.

HALL, J. E. Integration of regulation of cardiovascular function. **Advances in Physiology Education**, v.277, p.174-186, 1999.

HARRIS, K. M.; KATER, S. B. Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. **Brain Research Bulletin**, v. 17, p.341-371, 1975.

HARTMANN, K.; STIEF, F.; DRAGUHN, A.; FRAHM, C. Ionotropic GABA receptors with mixed pharmacological properties of GABAA and GABAC receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 497, p.139-146, 2004.

HARVEY, S.; PHILIPS, J. G.; REES, A.; HALL, T. R. Stress and adrenal function. **Journal Experimental Zoology**, v.32, p.633-645, 1984.

HAYANO, J.; YAMADA, A.; MUKAY, S.; SAKAKIBARA, Y.; YAMADA, M.; OHTE, N.; HASHIMOTO, T.; FUJINAMI, T.; TAKATA, K. Severity of coronary atherosclerosis correlates with the respiratory component of heart rate variability. **American heart journal** v.121, p.1070-1079, 1991.

HEAD, G. A.; McCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. **Autonomic Nervous System**, v.21, p. 203-213, 1987.

HERBERT, H.; SAPER, C. B. Cholecystokinin-galanin, and corticotropin-releasing factor-like immunoreactive projections from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nucleus in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v.293, p.581-598, 1990.

HIGGINS, C. B.; VATNER, S. F.; BRAUNWALD, E. Parasympathetic control of the heart. **Pharmacological Reviews**, v.25, p.119-155, 1978.

- IWATA, J.; CHIDA, K.; LEDOUX, J. E. Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anaesthetized rats resemble conditioned emotional responses, **Brain Research Bulletin**, v.418, p.183-188, 1987.
- JIANG, X.; CHEN, A.; LI, H. Histaminergic modulation of excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala. **Neuroscience**, v.131, p.691-703, 2005.
- JONES, B. J.; MOORE, R. Y. Ascending projections of the locus ceruleus in the rat II. Autoradiographic study. **Brain Research Bulletin**, v.127, p.23-53, 1977.
- JONES, N. M.; BEART, P. M.; MONN, J. A.; WIDDOP, R. E. Type I and II metabotropic glutamate receptors mediate depressor and bradycardic actions in the nucleus of the solitary tract of anaesthetized. **European Journal of Pharmacology**, v.380, p.129-135, 1999.
- JULIEN, C.; MALPAS, S. C.; STAUSS, H. M. Sympathetic modulation of blood pressure variability. **Journal of Hypertension**, v.10, p. 1707-1712, 2001.
- KAMAL, A. M.; TÖMBOL, T. Golgi studies on the amygdaloid nuclei of the cat. **Journal of Hirnforschung**, v.16, p.175-201, 1975.
- KARSON, A. B.; AKER, R.; ATES, N.; ONAT, F. Cardiovascular effects of intracerebroventricular bicuculline in rats with absence seizures. **Epilepsy Research**, v.34, p.231-239, 1999.
- KAURA, S.; BRADFORD, H. F.; YOUNG, A. M. J.; CROUCHER, M. J.; HUGHES, P. D. Effect of amygdaloid kindling on the content and release of amino acids from the amygdaloid complex: in vivo and in vitro studies. **Journal of Neurochemistry**, v.65, n°3, p.1240-1249, 1995.
- KLING, A. S.; BROTHERS, L. A. The amygdala and social behavior. In: AGGLETON, J. P. **The amygdala**. New York. Wiley-Liss, p.353-377, 1992.
- KLÜVER, H.; BUCY, P. C. Preliminary analysis of the temporal lobes in monkeys. **Archive Neurology Psychiatry**, v.42, p. 979-1000, 1939.
- KNUEPFER, M. M.; EISMANN, A.; SCHÜTZE, I.; STUMPF, H.; STOCK, G. Responses of single neurons in amygdala to exteroceptive stimuli in conscious cats. **Annual Journal Physiology**, v.268, p.666-675, 1995.
- KONDO, Y.; SACHS, B. D.; SAKUMA, Y. Importance of the medial amygdala in rat penile erection evoked by remote stimuli from estrous female. **Behavioral Brain Research**. v.91, p. 215-222, 1998.
- KRIEGER, E. M. Neurogenic hypertension in the rat. **Circulation Research**, v.15, p.511-521, 1964.
- KRIEGER, E. M. Time course of baroreceptor resetting in acute hypertension. **American Journal of Physiology**, v.218, p. 486-490, 1970.
- KUBO, T.; OKATANI, H.; NISHIGORI, Y.; HAGIWARA, Y.; FUKUMORI, R.; GOSHIMA, Y. Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats. **Neuroscience Letters**, v.354, p.84-86, 2004.

KUBO, T.; HAGIWARA, Y.; NISHIGORI, Y.; FUKUMORI, R.; The medial amygdaloid area is involved in activation of angiotensin II-sensitive neurons in the anterior hypothalamic area. **Brain Research Bulletin**, v.1033, p.128-134, 2005.

LAWRENCE, A.J.; JARROT, B. L-glutamate as a neurotransmitter at baroreceptor afferents: evidence from in vivo microdialysis. **Neuroscience**, v.58, p.585-591, 1994.

LAWRENCE, A. J. Neurotransmitter mechanisms of rat vagal afferent neurons. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.22, p.869-873, 1995.

LeDOUX, J. E. Emotion and amygdala. In: AGGLETON, J. P. **The Amygdala** Wiley-Liss, New York, p.255-306, 1992.

LEHMAN, M. N.; WINANS, S. S. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior. Autoradiography and behavioral analyses. **Brain Research Bulletin**, v.240, p.27-41, 1982.

LOEWY A. D.; SPYER K. W. Central regulation of autonomic function. New York. Oxford. **University Press**, 1990.

LÖFFELHOLZ, K.; PAPPANO, A. The parasympathetic neuroeffector junction of the heart. **Pharmacological Reviews**, v.37, p.1-24, 1985.

LONGHURST, J. C. Neural regulation of the cardiovascular system. In: SQUIRE, L. R.; BLOM, F. E.; McCONNELL, S. K.; ROBERTS, J. L.; SPITZER, N. C.; ZIGMOND, M. J. **Fundamental Neuroscience**. San Diego, Academic Press, p.935-966, 2003.

MACHADO, B. H.; BONAGAMBA, L. G. H. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarius increases arterial pressure in conscious rats. **Brain Research Bulletin**, v.576, p.131-138, 1992.

MALPAS, S. C.; MALING, T. J. Heart-rate variability and cardiac autonomic function in diabetes. **Diabetes**, v.10, p.1177-1181, 1990.

MALPAS, S. C.; Neural influences on cardiovascular variability: possibilities and pitfalls. **American Journal of Physiology**, v. 1. p. 6-20, 2002.

MANCIA, G.; ZANCHETTI, A. White-coat hypertension: misnomers, misconceptions and misunderstandings. What should we do next? **Journal of Hypertension**, v.9, p.1049-1052, 1986.

MARAGOS, W. R.; NEWMAN, S. W.; LEHMAN, M. N.; POWER, J. B. Neurons of origin fiber trajectory of amygdalofugal projections to the medial preoptic area in Syrian hamster. **The Journal Comparative of Neurology**, v.280, p.59-71, 1989.

MARCUZZO, S. Estudo sobre a densidade de espinhos dendríticos de neurônios da amígdala medial pósterio-dorsal de ratos em diferentes condições experimentais. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

MAREN, S. Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. **Molecular Neurobiology**, v.13, p.1-22, 1996.

MARSHALL, J. M. Chemoreceptors and cardiovascular control in acute and chronic systemic hypoxia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p. 863-888, 1998.

MARSHALL, J. M. Pheripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. **Physiological Reviews**, v.74, p. 543-594, 1994.

MASCÓ, D. H.; CARRER, H. F. Sexual receptivity in female rats after lesions or stimulation in different amygdaloid nuclei. **Physiology behavioural**, v.24, p.1073-1080, 1990.

MATSUMURA, K.; TSUCHIHASHI, T.; KAGIYAMA, S.; ABE, I.; FUJISHIMA, M. Subtypes of metabotropic glutamate receptors in the nucleus of the solitaty tract of rats. **Brain Research Bulletin**, v.842, p.461-468, 1999.

McDONALD, R.L.; OLSEN, R.W. GABAA receptor channels. **Annual Review of the Neurosciense**, v.17, p.569-602, 1994.

McDONALD, A. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Neurobiology**, v.55, p. 257-332, 1998.

McDONALD, A. J.; SHAMAMAH-LAGNADO, S. J.; SHI, C.; DAVIS, M. Cortical afferents to the extended amygdala. **Annals of the New York Academy of Science**, v.877, p. 309-338, 1999.

McDONALD, A. J.; MASCAGNI, F.; MULLER, J. F. Immunocytochemical localization of GABA<sub>B</sub>R1 receptor subunits in the basolateral amygdala. **Brain Research Bulletin**, v.1018, p.147-158, 2004.

McGAUGH, J. L. Involvement of the amygdala in neuromodulatory influences on memory storage. In: AGGLETON, J. P. **The Amygdala**. New York: Wiley-Liss, p. 431-451, 1992.

McGAUGH, J. L. Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. **Academic Science**, v.93, p.13508-13514, 1996.

MCKINLEY, P.; SHAPIRO, P.; BAGIELLA, E.; MYERS, M. M.; DE MESERSMAN, R. E.; GRANT, I.; SLOAN, R. Deriving heart period variability from blood pressure waveforms. **Journal Applicattion Physiology**, v. 95, p.1431-1438, 2003.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a Neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **Journal of Nutrition**, v.130, p.1007S-1015S, 2000.

MEREDITH, M.; WESTBERRY, J. M. Distictive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. **Journal of Neuroscience**, v.24, p.5719-5725, 2004.

MICHELINI, L. C. Vasopressin in the nucleus tractus solitarius: a modulator of barorreceptor reflex control of heart rate. **Brazilian Journal of Medical and Biologic Research**, v.27 p.1017- 1032, 1994.

MICHELINI, L. S. Regulação da pressão arterial: mecanismos neuro-humorais. In: AIRES, M.M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 473-488, 1999.

MIFFLIN, S. T. What does the brain know about blood pressure? **News in Physiological Sciences**, v.16, p. 266-271, 2001.

MIYATA, S.; ITOL, T.; ISHIYAMA, M.; NAKASHIMA, T.; KIYOHARA, T. Temporal changes of the *c-fos* expression in oxitocineric magnocellular neuroendocrine cells of the rat hypothalamus with restrain stress. **Brain Research Bulletin**, v.4, p.391-395, 1995.

MIYAWAKI, T.; GOODCHILD, A. K.; PILOWSKY, P. M. Evidence for a tonic GABAergic inhibition of excitatory respiratory-related afferents to presympathetic neurons in the rostral ventrolateral medulla. **Brain Research Bulletin**, v.924, p.56-62, 2002.

NEWMAN, S. Pheromonal signals access the medial extended amygdala: One node in a proposed social behavior network. **Hormones Brain and Behavior**. v.2, n.17, p.17-32, 2002.

OBERTO, A.; PANZICA, G. C.; ALTRUDA, F.; EVA, C. GABAergic an NPY-Y<sub>1</sub> network in the medial amygdala: A neuroanatomical basis for their functional interaction. **Neuropharmacology**, v.41, p.639-642, 2001.

OHTAKE, T.; YAMANDA, H. Efferent conections of the nucleus reunions and the rhomboid nucleus in the rat: An anterograde PHA-L tracing study. **Neuroscience Research**, v.6 p.556-568, 1989.

ONAT, F.; TELLIOĞLU, T.; AKER, R.; GÖREM, Z.; İSKENDER, E.; OKTAY, Ş. Effect of muscimol in cholinomimetic-induced cardiovascular responses in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.362, p.173-181, 1998.

ÖSTERLUND, M.; KUIPER, G. G.; GUSTAFSSON, J. A.; HURD, Y. L. Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. **Molecular Brain Research**, v.54, p.175-180, 1998.

OTTERSEN, O. P.; BEN-ARI, Y. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat: Projections from the thalamus. **The Journal of Comparative Neurology**, v.187, p. 401-424, 1979.

OTTERSEN, O. P. Afferent conections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. II. Afferent from the hypothalamus and the basal telencephalon. **The Journal of Comparative Neurology**, v.194, p.267-289, 1980.

OTTERSEN, O. P. Afferent conections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. III. Afferent from the lower brainstem. **The Journal of Comparative Neurology**, v.202, p.335-356, 1981.

OTTERSEN, O. P.; STORM-MATHISEN, J. Excitatory amino acid pathways in the brain. In SCHWARTZ, R.; BEN-ARI, Y. **Excitatory Amino Acids and Epilepsy**. New York/London: Plenum Press, p.263-284, 1986.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v.54, p.581-618, 1998.

ÖZKUTLU, U.; COSKUN, T.; ONAT, F.; YEGEN, B.; OKTAY, S. Cardiovascular effects of centrally active cholinomimetics in conscious and anesthetized rats: The role amygdala. **Brain Research Bulletin**, v.37, p-569-573, 1994.

PAGANI, M.; LUCINI, D.; RIMOLDI, O.; FURLAN, R. PIAZZA, S.; PORTA, A.; MALLIANI, A. Low and high frequency components of blood pressure variability. **Annals of the New York Academy of Sciences** v.15, p. 10-23, 1996.

PAGANI, M.; MONTANO, N.; PORTA, A.; MALLIANI, A.; ABOUD, F. M.; BIRKETT, C.; SOMERS, V. K. Relationship between spectral components of cardiovascular variabilities and direct measures of muscle sympathetic nerve activity in humans. **Circulation**, v.18, p.1441-1448, 1997.

PARATI, G.; DI RIENZO, M.; OMBONI, S.; ULIAN, L.; MANCIA, G. Blood pressure variability over 24 hours: its different components and its relationship to the arterial baroreflex. **Journal of Sleep Research**, v.4, p.21-29, 1995.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**, Academic Press; San Diego, 1998.

PETROVICH, G. D.; CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. **Brain Research Reviews**, v.38, p.247-289, 2001.

PITKÄNEN, A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: AGGLETON, J. P. **The Amygdala: A Functional Analysis**. Oxford University Press; Oxford: p.31-115, 2000.

PREWITT, C. M.; HERMAN, J. P. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical regulation following lesions of the central nucleus of the amygdala. **Stress**, v.1, p.263-280, 1997.

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.

QUIRK, G. J.; REPA, C.; LeDOUX, J. E. Fear conditioning enhances short latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. **Neuron**, v.15, p.1029-1039, 1995.

RADLEY, J. J.; MORRISON, J. H. Repeated stress and structural plasticity in the brain. **Ageing Research Reviews**, v. 4, p.271-287, 2005.

RANDALL W. C. **Nervous control of cardiovascular function**. New York. Oxford. University Press, 1984.

RASIA-FILHO, A. A. Is there anything “autonomus” in the nervous system? **Advances in Physiology Education**, v.30, p.9-12, 2006.

RASIA-FILHO, A. A. LONDERO, R. G.; ACHAVAL, M. Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. **Brain Research Bulletin**, v.48, p.173-183, 1999.

RASIA-FILHO, A. A.; LONDERO, R.; ACHAVAL, M. Functional activities of the amygdala: an overview. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v.25, p.14-23, 2000.

RASIA-FILHO, A. A.; FIN, C. A.; ALVES, M.; POSSA, M.; ROEHRIG, C.; FEOLI, A.; SILVA, L.; PERRY, M. L. Glucose and lactate utilization by the amygdala of male and female rats. **Neurochemical Research**, v.27, p.1575-1580, 2002.

RASIA-FILHO, A. A.; XAVIER, L. L.; SANTOS, P.; GEHLEN, G.; ACHAVAL, M. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and in the posterior medial amygdala of male and female rats. **Brain Research Bulletin**, v.58, p. 67-75, 2002.

RASIA-FILHO, A. A.; FABIAN, C.; RIGOTTI, K. M.; ACHAVAL, M. Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the medial amygdala revealed by the Golgi method. **Neuroscience**, v.126, p.839-847, 2004a.

RASIA-FILHO, A. A.; RIGATTO, K. V.; DAL'AGO, P. 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.

RASIA-FILHO, A. A.; HILBIG, A. Papel da amígdala e do hipocampo no transtorno do estresse pós-traumático. In: CAMINHA, R. **Transtornos do Estresse Pós-traumático**, São Paulo: Casa do Psicólogo, p.37-53, 2005.

REIS, D. J.; OLIPANTI, M. C. Bradycardia and tachycardia following electrical stimulation of the amygdaloid region in monkey. **Journal of Neurophysiology**, v.27, p.893-912, 1964.

ROBBINS, T. W.; EVERITT, B. J. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. **Current Opinion in Neurobiology**, v.6, p.228-236, 1996.

SAHA, S.; BATTEN, T. F. C.; HENDERSON, Z. 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, p.613-626, 2000.

SAH, P.; FABER, E.; ARMENTIA, L. M.; POWER, J. The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. **Physiology Reviews**, v.83, p.803-834, 2003.

SAHA, S. Role of the central nucleus of the amygdala in the control of the blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.32, p.450-456, 2005a.

SAHA, S. Central nucleus of amygdala projections to rostral ventrolateral medulla neurons activated by decreased blood pressure. **European Journal of Neuroscience**. v.21, p.1921-1930, 2005b.

SAJDYK, T. J.; SHEKAR, A. Excitatory aminoacid receptor antagonists block the cardiovascular and anxiety responses elicited by gamma-aminobutyric acid a receptor blockade in the basolateral amygdala of rats. **Journal of Experimental Pharmacology**, v.283, p.969-977, 1997.

SALGADO, H. C.; BARALE, H. R.; CASTANIA, J. A.; MACHADO, B. H.; CHAPLEAU, N. W.; FAZAN, J. Baroreflex responses to electrical stimulation of aortic depressor nerve in conscious SHR. **American Journal of physiology**, v. 1, p. 100-181, 2006.

SCHAFFAR, N.; RAO, H.; KESSLER, J-P.; JEAN, A. Immunohistochemical detection of glutamate in rat vagal sensory neurons. **Brain Research Bulletin**, v.778, p.302-308, 1997.

SHARMA, N. B.; GESELMA, A. J. Central nucleus of the amygdala and the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **The American Journal of Physiology**, v.268, p.1171-1177, 1995.

SHEPPERD, J. T.; VANHOUTTE, P. M. The human cardiovascular system. Facts and concepts. New York, **Raven Press**, 1979.

SILVERMAN, A. J.; HOFFMAN, D. L.; ZIMMERMAN, E. A. The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN). **Brain Research Bulletin**, v.6, p.47-61, 1981.

SIMERLY, R. Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: Paxinos G. **The Rat Nervous System**, New York: Elsevier, p.335-368, 2004.

SINGEWALD, N.; KOUVELAS, D.; MOSTAFA, A.; SINNER, C.; PHILIPPU, A. Release of glutamate and GABA in the amygdala of conscious rats by acute stress and baroreceptor activation: differences between SHR and WKY rats. **Brain Research Bulletin**, v.864, p.138-141, 2000.

SMITH, B. N.; DUDEK, F. E. Aminoacid-mediated regulation of spontaneous synaptic activity patterns in the rat basolateral amygdala. **Journal of Neurophysiology**, v.76, p.1958-1967, 1996.

SMOCK, T.; ARNOLD, S.; ALBECK, D.; EMERSON, P.; GARRITANO, J.; BURROWS, K.; DERBER, W.; SANON, C.; MARRS, K.; WEARTHEARLY, H.; KRUSE, K. A peptidergic circuit for reproductive behavior. **Brain Research Bulletin**, v.598, p.138-142, 1992.

SUN, M. Central neural organization and control of sympathetic nervous system in mammals. **Progress in Neurobiology**, v.47, p.157-233, 1995.

SPALLONE, V.; MENZINGER, G. Diagnosis of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes. **Diabetes**, v.2, p.67-76, 1997.

SPYER, K. M. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. **Journal of the Physiology**, v.474, p.1-17, 1994.

SPYER, K. M. Vagal preganglionic neurons innervating the heart. In: PAGE, E.; FOZZARD, H. A.; SOLARO, R. J. **Handbook of Physiology**. The Cardiovascular System. New York: Oxford University Press, p.213-239, 2002.

SWANSON, L.W.; COWAN, W. M. The connections of the septal region in the rat. **The Journal Comparative of Neurology**, v.186, p.621-656, 1979.

SWANSON, D. W.; PETROVICH, G. D. What is the amygdala? **Trends Neuroscience**, v.21, p.323-331, 1998.

TAKENAKA, K.; SASAKI, S.; UCHIDA, A.; FUJITA, H.; NAKAMURA, K.; ICHIDA, T.; ITOH, H.; NAKATA, T.; TAKEDA, K.; NAKAGAWA, M. GABA-ergic Stimulation in



hypothalamic pressor area induces larger sympathetic and cardiovascular depression in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, v.9, p.964-972, 1996.

TANAKA, K. Function of glutamate transporters in the brain. **Neuroscience Research**, v.37, p.15-19, 2000.

TAPIERO, H.; MATHÉ, G.; COUVREUR, P.; TEW, K. D. Glutamine and glutamate. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.56, p.446-457, 2002.

THAMES, M. D.; DIBNER-DUNLAP, M. L.; SMITH, M. L. 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, p. 369-380, 1994.

TIMM, H. J. L. M.; WIELING, W.; KAREMAKER, J. M.; LENDERS, J. W. M. Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans. **Journal of Physiology**. v. 553, p. 3-11, 2003.

TIMMERMAN, W.; WESTERINK, B. H. C. Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? **Synapse**, v.27, p.242-261, 1997.

TIMO-IARIA, C. Comportamentos. In: AIRES, M. M. **Fisiologia Básica**, Guanabara; Rio de Janeiro, p.163-300, 1988.

TIMO-IARIA C. Sistemas neurovegetativos. In: AIRES, M. **Fisiologia**, Rio de Janeiro, Brazil: Guanabara Koogan, p. 289-314, 1999.

TURNER, S. A.; GANTEN, D. Cardiovascular regulation. In: LIGHTMAN, S. L.; EVERITT, B. J. **Neuroendocrinology**. London: Blackwell Scientific Publications, p.331-359, 1986.

TRIBOLLET, E.; DREIFUSS, J. J. Localization of neurones projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus area of the rat: a horseradish peroxidase study. **Neuroscience**, v.6, p.1315-1328, 1981.

TSUCHIHASHI, T.; LIU, Y.; KAGIYAMA, S.; MATSUMURA, K.; ABE, I.; FUJISHIMA, M. Metabotropic glutamate receptor subtypes involved in cardiovascular regulation in the rostral ventrolateral medulla of rats. **Brain Research Bulletin**, v.52, p.279-283, 2000.

VALVEDERE, F. The Golgi method: A tool for comparative structural analyses. In: NAUTA, W. J. H.; EBBSSON, S. O. E. **Contemporary Research Methods in Neuroanatomy**. Berlim, Springer-Verlag, p.12-31, 1970.

VARDHAN, A.; KACHROO, A.; SAPRU, H. N. Excitatory aminoacid receptors in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptor responses. **American Journal of Physiology**, v.264, p.41-50, 1993.

VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: Interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. **Brazilian Journal of medical and Biological Research**, v.30, p.521-532, 1997.

VCHTELLO, J. D.; KOOLHAAS, J. M. Medial amygdala lesions in males rats reduce aggressive behavior: Interference with experience. **Physiology and Behavior**, v.41, p.99-102, 1987.

VIARD, E.; SAPRU, H. N. Cardiovascular responses to activation of metabotropic glutamate receptors in the NTS of the rat. **Brain Research Bulletin**, v.952, p.308-321, 2002.

VINADER-CAEROLS, C.; COLLADO, P.; SEGOVIA, S.; GUILAMÓN, A. Sex differences in posteromedial cortical nucleus of the amygdala in the rat. **Neuroreported**, v.383, p.305-325, 1998.

WANG, J.; IRNATEN, M.; VENKATESAN, P.; EVANS, C.; MENDELOWITZ, D.; Arginine vasopressin enhances GABAergic inhibition of cardiac parasympathetic neurons in the nucleus ambiguus. **Neuroscience**, v.111, p.699-705, 2002.

WESTBERRY, J.M. Categorization of pheromonal chemosignals by medial amygdala. Tese (Doctor in Philosophy). Department of Biological Science of the Florida State University College of Arts and Sciences, 2003.

WOOD, R.I.; NEWMAN, S.W. Hormonal influence on neurons of the mating behavior pathway in male hamsters. In MICEVYCH, P.E.; HAMMER JR., R.P. Neurobiological effects of sex steroid hormones. New York: **Cambridge**, p.3-39, 1995.

YILMAZER-HANKE, D. M.; ROSKODEN, T.; ZILLES, K.; SCHWEGLER, H. Anxiety-related behavior and densities of glutamate, GABA<sub>A</sub>, acetylcholine and serotonin receptors in the amygdala of seven inbred mouse strains. **Behavioural Brain Research**, v.145, p.145-159, 2003.

YOSHIDA, S.; MATSUBARA, T.; UEMURA, A.; IGUCHI, A.; HOTTA, N. Role of medial amygdala in controlling hemodynamics via GABA<sub>A</sub> receptor in anesthetized rats. **Circulation Journal**, v.66, p.197-203, 2002.

YOUNG, B. J.; LEATON, R. N. Amygdala central nucleus lesions attenuate acoustic startle stimulus-evoked heart rate changes in rats. **Behavioral Neuroscience**, v.110, p.228-237, 1996.

## 9 ANEXO I

Este trabalho contou com verba do CNPq e da FAPERGS, com bolsas de produtividade em pesquisa e de iniciação científica (programa BIC / FFFCMPA para o Dr. Diego Fontoura Riveiro nos anos de 2005 e 2006), e da FFFCMPA, permitindo a utilização dos laboratórios do Departamento de Ciências Fisiológicas e subsidiando a compra de materiais.

Parte deste trabalho foi apresentado na forma de tema-livre, tendo resumos publicados nos seguintes anais de congressos:

NECKEL, H.; QUAGLIOTTO, E.; RIZZIERI, L.; FONTOURA, D.; DALL'AGO, P.; RASIA FILHO, A. A. Efeito da microinjeção de glutamato e GABA no núcleo medial pósterodorsal da amígdala sobre o controle da pressão arterial em ratos. In: IV Semana de Iniciação Científica da FFFCMPA, 2005. **Revista Pesquisa Médica**, Porto Alegre: FFFCMPA, v.40, 2007.

NECKEL, H.; QUAGLIOTTO, E.; RIZZIERI, L.; FONTOURA, D.; DALL'AGO, P.; RASIA FILHO, A. A. Efeito da microinjeção de glutamato e GABA no núcleo pósterodorsal da amígdala medial sobre o controle da pressão arterial em ratos. In: I Semana Científica da FFFCMPA, XXII Semana Acadêmica e V Semana de Iniciação Científica da FFFCMPA, 2006. **Revista Pesquisa Médica**, Porto Alegre: FFFCMPA, v.40, 2007.

Considerado destaque como melhor trabalho científico apresentado em seu dia durante a I Semana Científica da FFFCMPA, XXII Semana Acadêmica e V Semana de Iniciação Científica da FFFCMPA, em 2006.