

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR

Investigação da influência da amígdala basomedial no controle das respostas cardiovasculares
a estímulos emocionais

AUTORA: Laura Gomes Batista Tavares Santos

Ouro Preto
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR

Investigação da influência da amígdala basomedial no controle das respostas cardiovasculares
a estímulos emocionais

AUTORA: Laura Gomes Batista Tavares Santos
ORIENTADOR: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em
Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro
Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de
concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Ouro Preto
2014

S237i

Santos, Laura Gomes Batista Tavares.

Investigação da influência da amígdala basomedial no controle das respostas cardiovasculares a estímulos emocionais [manuscrito] / Laura Gomes Batista Tavares Santos. - 2014.

65f.: il.: color; grafs; tabs; fotos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Amígdalas . 2. Stress (Fisiologia). 3. Hipotálamo. I. Cunha Alvim de Menezes, Rodrigo. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 577.12

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada

“Investigação da influência da amígdala basomedial no controle das respostas cardiovasculares a estímulos emocionais”

Aos quatro dias do mês de abril de 2014, às 9:00, no Auditório do Centro de Educação a Distância (CEAD) da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Laura Gomes Batista Tavares Santos**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes
Presidente (UFOP)

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior
Examinador (FMRP/USP)

Prof.ª Dr.ª Lisandra Brandino de Oliveira
Examinadora (UFOP)

DATA DA DEFESA: 04/04/2014



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto

Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil

Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular** do **Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas** da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio da CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFOP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido irmão, Mariano, por instigar em mim a importância do trabalho científico e por me fazer querer ser uma pessoa melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que, por sua luz, força e espírito, sempre me guia, abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina.

À minha mãe, Maria Lúcia, que sempre me apoiou tão carinhosamente nos estudos e nas horas difíceis de estresse e angústia. Emociona-se a simples lembrança do apoio por ela concedido.

Ao meu pai, José Mariano, por simplesmente acreditar em mim. Seu incentivo em todas as minhas escolhas foi e sempre será crucial para que nelas eu possa dar continuidade. Obrigada por, mesmo de longe, ser tão presente em minha vida.

Ao meu irmão, Mariano, por ser muito mais que um irmão para mim. Faltam-me palavras para descrever o amor e admiração que sinto. Nossa relação vem, com certeza, de outras vidas.

Ao meu grande amor, Gabriel, pelo amor, companheirismo, paciência e compreensão por minhas faltas em razão dos estudos. Muito obrigada pela generosidade em me ajudar nos momentos de dúvida, inquietação e desânimo.

Ao meu orientador, Rodrigo Menezes, por me acolher ao final da graduação. Muito obrigada pela paciência, dedicação, incentivo e sabedoria durante todos estes anos de convivência científica e pessoal. Nosso convívio é, para mim, fonte de inspiração profissional e científica.

À minha amiga, Alessandra, parceira de trabalho e de vida. Obrigada por dividir comigo todos os momentos, bons e ruins, durante estes anos. Para mim, a parceria sempre estará acima de qualquer concorrência.

Às Alines, Arlindo e Rezende, a minha eterna gratidão. É muito com ter em meu convívio duas pessoas tão dispostas a ajudar e serem ajudada, sem o mínimo de vaidade. A contribuição de vocês foi muito importante para concretização deste trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, por fazerem parte dos melhores momentos desta jornada. Luís Henrique, Fernanda, Glenda, Sylvana, Thayane Reis, Ana Cláudia, Felipe, Amanda, Rafaela, Thayane Cotta, Talita, Sophia, Victor, Yohanna e Lucas, muito obrigada pela convivência e experiências compartilhadas. Nosso grupo de pesquisa vai longe.

À Natália Pimenta pelo convívio e paciência de escutar nossos assuntos em todas as confraternizações.

Aos professores da banca examinadora, Prof. Dr. Hélio Zangrossi e Prof^a. Dr. Lisandra Brandino, pela disponibilidade de contribuir para a conclusão deste trabalho.

Aos Laboratórios do NUPEB e seus professores responsáveis, principalmente ao LIMP (Professora Cláudia Carneiro), pelos equipamentos cedidos durante execução deste trabalho.

Aos professores e colegas de pós-graduação pela convivência e conhecimento compartilhado durante todos estes anos.

Ao Centro de Ciência Animal da UFOP pelo fornecimento dos animais. Em especial a Érika e Lílian pelo profissionalismo.

Aos funcionários Milton de Paula e Marly Lessa pela convivência, estando sempre dispostos a ajudar, pelo carinho com os animais e principalmente pelos sorrisos e bom humor constantes.

Enfim, muito obrigada a todos!

*“A persistência é o menor caminho do êxito”
Charles Chaplin*

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	3
1.1 – Amígdala: caracterização	3
1.2 – Amígdala: função	5
1.3 – Hipotálamo dorsomedial	7
1.4 - Estresse	9
2 – OBJETIVOS	12
2.1 – Objetivo Geral	12
2.2 – Objetivos Específicos	12
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 – Modelo Animal	13
3.2 – Preparo de drogas e soluções utilizadas	13
3.3 – Confecção dos materiais utilizados	15
3.4 – Cirurgias	16
3.4.1 – Implante de cânulas-guia dirigidas a Amígdala Basomedial e ao Hipotálamo Dorsomedial	16
3.4.2 – Implante de cânula na artéria femoral	16
3.4.3 – Cuidados pós-operatórios	17
3.5 – Registro da pressão arterial média e frequência cardíaca	18
3.6 – Procedimentos de microinjeção	18
3.7 – Procedimentos experimentais	19
3.7.1 – Participação da inibição química da BMA no controle cardiovascular	19
3.7.2 - Participação da inibição química de regiões próximas a BMA no controle cardiovascular	20
3.7.3 – Participação da ativação química da BMA no controle cardiovascular de animais expostos a estresse agudo	20
3.7.4 –Influência da inibição química do DMH sobre as respostas causadas pela inibição química da BMA	22
3.8 – Procedimentos histológicos	23
3.9 – Análises dos dados	24
3.10 – Análises estatísticas	24
4 – RESULTADOS	25
4.1 – Caracterização dos parâmetros fisiológicos	25
4.2 – Efeitos da inibição química da BMA	25
4.3 – Efeitos da inibição química de regiões próximas à BMA	28
4.4 – Efeitos da ativação química da BMA no controle cardiovascular de animais expostos a estresse social	31

4.5 – Influência da inibição química do DMH sobre a resposta cardiovascular produzida pela inibição da BMA	35
5 – DISCUSSÃO	39
6 – CONCLUSÃO	44
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Divisões e subdivisões do complexo amigdalóide de ratos. O complexo foi dividido em três grupos: o centromedial (laranja), o basolateral (verde) e o cortical (marrom). Em cinza escuro são indicados os núcleos intercalados (In). CEC: núcleo central, subdivisão capsular; CEI: núcleo central, subdivisão lateral; CEM: núcleo central, subdivisão medial; COa: núcleo cortical, subdivisão anterior; COP: núcleo cortical, subdivisão posterior; BOT: núcleo do sono do trato olfatório; Bi: núcleo basal, subdivisão interediária; Bpc: núcleo basal, subdivisão parvocelular; BMmc: núcleo basomedial, subdivisão magnocelular; BMpc: núcleo basomedial, subdivisão parvocelular; Ld: núcleo lateral, subdivisão dorsal; Lvm: núcleo lateral, subdivisão ventromedial; Lvl: núcleo lateral, subdivisão ventrolateral; Md: núcleo medial, subdivisão dorsal; Mv: núcleo medial, subdivisão ventral; In: núcleo intercalado; Pir: córtex piriforme (Knapska e colaboradores, 2007).4
- Figura 2: Classificação da divisão do complexo amigdalóide com suas subdivisões anatômicas e seus componentes, conforme descrito por Alheid e colaboradores (1995) e adaptado por Rasia-Filho e colaboradores (2000). 5
- Figura 3:** Representação da localização do hipotálamo dorsomedial. **(A)** Diagrama de corte sagital de cérebro humano com os principais núcleos hipotalâmicos. **(B)** Localização do DMH em cérebro de rato. III: terceiro ventrículo; DMN: núcleo hipotalâmico dorsomedial; DMC: porção compacta do núcleo hipotalâmico dorsomedial; DMD: porção difusa do núcleo hipotalâmico dorsomedial; PH: área hipotalâmica posterior; VMH: núcleo hipotalâmico ventromedial; f: fórnix; MT: trato mamilotalâmico; LH: hipotálamo lateral; DA: área hipotalâmica dorsal; ARC: núcleo hipotalâmico arqueado (Fontes e cols., 2006; Fontes e cols., 2001). 8
- Figura 4: Desenho esquemático da canulação da artéria femoral. A: identificação e separação da artéria femoral do trígono femoral; B: pequena incisão realizada na região de inserção do cateter de polietileno; C: procedimento de inserção do cateter na artéria femoral. 17
- Figura 5: Desenho esquemático do registro dos parâmetros cardiovasculares. A parte externa da cânula inserida na artéria femoral é conectada a um transdutor, ligado a um sistema de aquisição de dados, permitindo aferição da PAM e FC. 18
- Figura 6: Delineamento experimental. Procedimentos cirúrgicos e experimentais. 19
- Figura 7: Escala temporal do protocolo experimental para avaliação da inibição química da BMA por microinjeção de muscimol sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC). Os animais foram submetidos à microinjeção de veículo (100nL) ou muscimol (100pmol/100nL). 19
- Figura 8: Escala temporal do protocolo experimental para avaliação da inibição química da NBMA por microinjeção de muscimol sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC). Os

animais foram submetidos à microinjeção de veículo (100nL) ou muscimol (100pmol/100nL).
.....20

Figura 9: Escala temporal do protocolo experimental para avaliação da ativação química da BMA por microinjeção de BMI sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC). Os animais foram submetidos à microinjeção de veículo (100nL) ou BMI (10pmol/100nL).....21

Figura 10: Desenho esquemático do procedimento de estresse social por “rato intruso”. O animal analisado em questão é colocado em uma caixa na qual está alojado outro animal, mas sem contato direto, já que o segundo se encontra dentro de uma gaiola.22

Figura 11: Escala temporal do protocolo experimental para avaliação da inibição química do DMH anteriormente a inibição química da BMA sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC). Os animais foram submetidos à microinjeção de veículo (100nL) ou muscimol (100pmol/100nL) no DMH e à microinjeção de muscimol (100pmol/100nL) na BMA.23

Figura 12: Efeito, na pressão arterial média (PAM), da microinjeção de muscimol na amígdala basomedial (BMA). (A) Valores de PAM, antes e após a microinjeção (seta) de muscimol - Musc (100pmol/100nL) ou veículo - Veic (100nL) na BMA em dias consecutivos. (B) Delta de um minuto da resposta pressora (a partir de três minutos após a microinjeção) em relação aos cinco minutos pré-microinjeção. *Diferença estatística entre o tratamento intra-grupo, teste t de Student pareado ($p < 0.05$). As barras representam média \pm erro padrão.26

Figura 13: Efeito, na frequência cardíaca (FC), da microinjeção de muscimol na amígdala basomedial (BMA). Média dos valores de FC sobre o tempo (min) antes a após a microinjeção (seta) de muscimol - Musc (100pmol/100nL) ou veículo - Veic (100nL) na BMA. *Diferença estatística entre o tratamento intra-grupo na BMA por two way ANOVA para droga $F(1, 276) = 8.59, p < 0.05$, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0.05$).27

Figura 14: Microinjeções de muscimol e veículo na amígdala basomedial (BMA). (A) Registro da variação da resposta cardiovascular após três minutos à microinjeção (linha pontilhada) de muscimol (100pmol/100nL) na BMA. (B) Registro da resposta cardiovascular não alterada a partir da microinjeção (linha pontilhada) de veículo (100nL) na BMA. (C) Representação esquemática de corte coronal da BMA ilustrando os locais de microinjeção de veículo e muscimol nos animais (círculos pretos, $n=7$). Figura adaptada do mapa de Paxinos e Watson, 2008. FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média, PAP: pressão arterial pulsátil.28

Figura 15: Efeito, na pressão arterial média (PAM), da microinjeção de muscimol em regiões próximas a amígdala basomedial (BMA), mas fora dela (NBMA). (A) Valores de PAM, antes e após a microinjeção (seta) de muscimol - Musc (100pmol/100nL) ou veículo - Veic (100nL) na NBMA em dias consecutivos. (B) Delta de um minuto da resposta pressora (a partir de três minutos após a microinjeção) em relação aos cinco minutos pré-microinjeção. *Diferença

estatística entre do tratamento intra-grupo, teste t de Student pareado ($p < 0.05$). As barras representam média \pm erro padrão. 29

Figura 16: Efeito na frequência cardíaca (FC) da microinjeção de muscimol em regiões próximas a amígdala basomedial (BMA), mas fora dela (NBMA). (A) Valores de FC, antes e após a microinjeção (seta) de muscimol - Musc (100pmol/100nL) ou veículo - Veic (100nL) na NBMA em dias consecutivos. (B) Delta de um minuto da resposta (a partir de três minutos após a microinjeção) em relação aos cinco minutos pré-microinjeção. *Diferença estatística entre do tratamento intra-grupo, teste t de Student pareado ($p < 0.05$). As barras representam média \pm erro padrão. 30

Figura 17: Microinjeções de muscimol e veículo em regiões próximas amígdala basomedial (BMA), mas fora dela (NBMA). (A) Registro das respostas cardiovasculares não alteradas a partir da microinjeção (linha pontilhada) de muscimol (100pmol/100nL) na NBMA, assim com à microinjeção de veículo (B). (C) Representação esquemática de corte coronal da NBMA ilustrando os locais de microinjeção de veículo e muscimol nos animais (círculos pretos, $n=5$). Figura adaptada do mapa de Paxinos e Watson, 2008. FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média, PAP: pressão arterial pulsátil. 31

Figura 18: Efeito, na pressão arterial média (PAM), da microinjeção bilateral de *bicuculine metiodide* (BMI) amígdala basomedial (BMA). (A) Valores de PAM, antes, durante (entre as linhas tracejadas) e após o estresse (15 minutos) em animais pré-tratados com a microinjeção de BMI (10pmol/100nL) ou veículo (100nL) na BMA em dias consecutivos. (B) Delta do pico (três minutos) da resposta pressora em relação aos três minutos pré-microinjeção. *Diferença estatística entre do tratamento intra-grupo, teste t de Student pareado ($p < 0.05$). As barras representam média \pm erro padrão. 32

Figura 19: Efeito, na frequência cardíaca (FC), da microinjeção bilateral de *bicuculine metiodide* (BMI) amígdala basomedial (BMA). Média dos valores de FC sobre o tempo (min) antes, durante (entre as linhas tracejadas) e após o estresse (15 minutos) em animais pré-tratados com a microinjeção de BMI (10pmol/100nL) ou veículo (100nL) na BMA em dias consecutivos. *Diferença estatística entre o tratamento intra-grupo na BMA por two way ANOVA para droga $F(1, 72) = 12.02, p < 0.05$; com pós-teste de Bonferroni ($p < 0.05$). 33

Figura 20: Microinjeções de *bicuculine metiodide* (BMI) e veículo bilateralmente na amígdala basomedial (BMA). (A) Registro da variação da resposta cardiovascular observada após a microinjeção de veículo (100nL) na BMA anteriormente ao estresse, durante o estresse e após o estresse. (B) Registro da variação da resposta cardiovascular observada após a microinjeção de BMI (10pmol/100nL) na BMA anteriormente ao estresse, durante o estresse e após o estresse. (C) Representação esquemática de corte coronal da BMA ilustrando os locais de microinjeção de veículo e BMI bilateralmente nos animais (círculos pretos, $n=7$). Figura adaptada do mapa de Paxinos e Watson, 2008. FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média, PAP: pressão arterial pulsátil. 34

Figura 21: Efeito, na pressão arterial média (PAM), da microinjeção bilateral de muscimol no hipotálamo dorsomedial (DMH) anteriormente a inibição da amígdala basomedial (BMA). Média dos valores de PAM sobre o tempo (min) antes a após a microinjeção (seta) de muscimol - Musc (100pmol/100nL) na BMA, esta realizada cinco minutos após a microinjeção de muscimol - Musc (100pmol/100nL) ou veículo - Veic (100nL) no DMH. *Diferença estatística entre o tratamento intra-grupo no DMH por two way ANOVA para droga $F(1, 230) = 9.94, p < 0.05$; com pós-teste de Bonferroni ($p < 0.05$). 35

Figura 22: Efeito, na frequência cardíaca (FC), da microinjeção bilateral de muscimol no hipotálamo dorsomedial (DMH) anteriormente a inibição da amígdala basomedial (BMA). Média dos valores de FC sobre o tempo (min) antes a após a microinjeção (seta) de muscimol (100pmol/100nL) na BMA, esta realizada cinco minutos após a microinjeção de muscimol - Musc (100pmol/100nL) ou Veículo - Veic (100nL) no DMH. *Diferença estatística entre o tratamento intra-grupo no DMH por two way ANOVA para droga $F(1, 230) = 8.49, p < 0.05$; com pós-teste de Bonferroni ($p < 0.05$). 36

Figura 23: Microinjeção de muscimol ou salina no hipotálamo dorsomedial (DMH) anteriormente a microinjeção de muscimol na amígdala basomedial (BMA). (A) Registro das respostas cardiovasculares não alteradas a partir da microinjeção (linha pontilhada) de muscimol (100pmol/100nL) na BMA cinco minutos após a microinjeção da muscimol (100pmol/100nL) no DMH. (B) Registro da variação cardiovascular três minutos após a microinjeção de muscimol (100pmol/100nL) na BMA cinco minutos após a microinjeção de veículo (100pmol/100nL) no DMH. (C) Representação esquemática de corte coronal do DMH ilustrando os locais de microinjeção bilateral de salina e muscimol nos animais (círculos pretos, $n=7$). (D) Representação esquemática de corte coronal da BMA ilustrando os locais de microinjeção de salina e muscimol nos animais (triângulos pretos, $n=7$). Figura adaptada do mapa de Paxinos e Watson, 2008. FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média, PAP: pressão arterial pulsátil. 37

Figura 24: Fotomicrografia representativa dos locais de microinjeção na amígdala basomedial unilateral, hipotálamo dorsomedial bilateral e amígdala basomedial bilateral. A: sítio de microinjeção na BMA unilateral; B: sítio de microinjeção no DMH bilateral; C: sítio de microinjeção na BMA bilateral. 38

Figura 25: Diagrama esquemático indicando as possíveis vias existentes entre a amígdala basomedial e o hipotálamo dorsomedial. As setas contínuas representam projeções excitatórias glutamatérgicas e as setas tracajadas representam projeções inibitórias gabaérgicas. LA: amígdala lateral; BMA: amígdala basomedial; BST: núcleo do leito da estria terminal; CeA: amígdala central; DMH: hipotálamo dorsomedial. 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média dos parâmetros fisiológicos basais de FC e PA referente a todos os grupos experimentais.....	25
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ARC	Núcleo hipotalâmico arqueado
Bi	Núcleo basal da amígdala, subdivisão intermediária
BLA	Amígdala basolateral
BMA	Amígdala basomedial
BMAa	Amígdala basomedial anterior
BMAp	Amígdala basomedial posterior
BMmc	Núcleo basomedial da amígdala, subdivisão magnocelular
BMpc	Núcleo basomedial da amígdala, subdivisão parvocelular
BMI	Bicuculline Methiodide
BOT	Núcleo do sono do trato solitário
Bpc	Núcleo basal, subdivisão parvocelular
BST	Núcleo do leite da estria terminal
CeA	Amígdala central
CEc	Núcleo central da amígdala, subdivisão caspular
CEL	Núcleo central da amígdala, subdivisão lateral
Cem	Núcleo central da amígdala, subdivisão medial
COa	Núcleo cortical da amígdala, subdivisão anterior
DA	Área hipotalâmica dorsal
DMN	Núcleo hipotalâmico dorsomedial
DMC	Porção compacta do núcleo hipotalâmico dorsomedial
DMD	Porção difusa do núcleo hipotalâmico dorsomedial
DMH	Hipotálamo dorsomedial
Cop	Núcleo cortical da amígdala, subdivisão posterior
FC	Frequência cardíaca
f	Fórnix
GABA _A	Ácido Gama Aminobutírico A
HDM	Hipotálamo Dorsomedial
In	Núcleo intercalado
LA	Amígdala lateral
Ld	Núcleo lateral da amígdala, subdivisão dorsal

LH	Hipotálamo lateral
Lvm	Núcleo lateral da amígdala, subdivisão ventromedial
l/dlPAG	Coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal
Lvl	Núcleo lateral da amígdala, subdivisão ventrolateral
Md	Núcleo medial da amígdala, subdivisão dorsal
MeA	Amígdala medial
MT	Trato mamilotalâmico
Mv	Núcleo medial da amígdala, subdivisão dorsal
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PH	Área hipotalâmica posterior
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Pir	Córtex piriforme
PVN	Hipotálamo paraventricular
Tco	Temperatura corporal
TO	Trato óptico
SNC	Sistema nervoso central
VMH	Hipotálamo ventromedial
III	Terceiro ventrículo

RESUMO

A amígdala tem sido associada a uma grande variedade de funções ligadas a respostas fisiológicas, comportamentais e endócrinas, relacionadas a estímulos emocionais. Esta região encefálica é composta por vários sub-núcleos, que embora pertencentes à mesma estrutura, podem se envolver em funções diferentes, o que torna o estudo de cada sub-núcleo de grande importância. Nesse sentido, alguns deles vêm sendo ao longo dos anos bem estudados e caracterizados, mas o enfoque a um dos sub-núcleos, o basomedial (BMA), é ainda muito pequeno. O hipotálamo é uma importante região que também vem sendo relacionada ao comportamento emocional. Um grande número de evidências indica uma importante participação do hipotálamo dorsomedial (DMH) na integração das respostas fisiológicas oriundas do estresse emocional. Foi constatado que os estressores de origem psicológica e social são os mais comuns no ser humano. Neste sentido, alguns estudos em animais demonstraram que a perda temporária do controle social é uma importante condição que pode levar a alterações psicopatológicas. Diante disso, o nosso objetivo é avaliar a influência da amígdala basomedial no controle cardiovascular durante estresse social e sua possível interação com o hipotálamo dorsomedial. Para isso, ratos Wistar (300 ± 20 g) foram anestesiados (cetamina-xilazina) e cânulas guia foram implantadas na BMA unilateralmente ou bilateralmente, em regiões próximas a BMA (NBMA) e no DMH bilateralmente. Após seis dias, os animais foram re-anestesiados (2% do isoflurano em 3l de O₂) e um cateter inserido na artéria femoral para aferição de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Demos início aos procedimentos experimentais 48 horas após o último procedimento cirúrgico. Nossos resultados mostraram que a inibição química da BMA pela microinjeção do agonista GABA_A, muscimol (100pmol/100nL) promove aumento da PAM e FC, enquanto a inibição química da NBMA não alterou tais parâmetros cardiovasculares. Observamos, também, que ao ativar quimicamente esta região, pela microinjeção bilateral do antagonista GABA_A, *bicuculline methiodide* (10pmol/100nL), os aumentos de PAM e FC provocados pelo estresse social por rato intruso foram bloqueados. Adicionalmente, a resposta de inibição da BMA foi abolida pela inibição química do DMH através da microinjeção de muscimol. Sabendo-se que o DMH é tonicamente inibido, estes resultados sugerem que a BMA está constantemente ativada, participando integralmente do controle cardiovascular durante situações de estresse, exercendo influência na inibição tônica recebida pelo DMH nestas condições.

ABSTRACT

The amygdala has been associated with a variety of functions linked to physiological, behavioral and endocrine responses related to emotional situations. This brain region is comprised of multiple sub-nuclei, which although belonging to the same structure may be involved in different functions, which makes the study of each sub-nuclei of great importance. In this sense, some of them have been well studied and characterized over the years, but the approach to one of the sub-nuclei, the basomedial (BMA), is still very small. The hypothalamus is an important region which also has been related to emotional behavior. It was found that psychological and social origin stressors are the most common in humans. In this sense, some studies in animals have shown that the temporary loss of social control is an important condition that can lead to psychopathology. Therefore, our aim is to evaluate the influence of basomedial amygdala in cardiovascular control during social stress and its possible interaction with the dorsomedial hypothalamus. For this, male Wistar (300 ± 20 g) were anesthetized (ketamine-xylazine) and guide cannulae were implanted bilaterally or unilaterally in the BMA, in nearby regions the BMA (NBMA) and bilaterally in the DMH. Six days later, the animals were anesthetized (2% isoflurane in O₂ 3l) and a catheter was inserted into the femoral artery for recording of mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR). We began the experimental procedures 48 hours after the last surgical procedure. Our results showed that chemical inhibition of BMA by microinjection of the GABA_A agonist, muscimol (100pmol/100nL), promotes increased in MAP and HR, whereas chemical inhibition of NBMA did not alter such cardiovascular parameters. We also noted that when this region is chemically activated by bilateral microinjection of the GABA_A antagonist, bicuculline methiodide (10pmol/100nL), the increases in MAP and HR caused by a intruder rat social stress were blocked. Additionally, the response of BMA inhibition was abolished by chemical inhibition of the DMH by microinjection of muscimol. Knowing that the DMH is tonically inhibited, these results suggest that the BMA is constantly active, participating fully in the cardiovascular control during stress situations, influencing the tonic inhibition received by the DMH in these conditions.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Amígdala: caracterização

A amígdala é uma estrutura do sistema nervoso central identificada pela primeira vez por Karl Friedrich Burdach no início do século XIX, e foi assim nomeada por ser uma estrutura esferóide e alongada, assemelhando-se a uma amêndoa (Sah e cols., 2003). Esta região foi primeiramente descrita como uma massa de matéria cinzenta no fundo do lobo temporal medial do cérebro humano que corresponde ao que é agora comumente referido como o complexo basolateral da amígdala (Swanson & Petrovich, 1998; Swanson, 2003). Subsequentemente, um grande número de estruturas foi identificado em várias espécies, constituindo o que é agora denominado de complexo amigdalóide. Tal complexo, em ratos, fica situado na parte ventral do telencéfalo, próximo a porção terminal do corno inferior do ventrículo lateral, adjacente ao hipocampo e lateralmente ao trato óptico (TO) (Knapska e cols., 2007). A amígdala consiste de vários sub-núcleos, cada um dos quais podendo fazer conexões internuclear e intranuclear em várias situações (LeDoux, 2000). Embora pertencentes à mesma estrutura, cada sub-núcleo pode se envolver em funções diferentes, fazendo com que a amígdala não constitua uma única unidade anatômica ou funcional (Schiller, 2011). O estudo de cada sub-núcleo, detalhadamente, torna-se de grande importância, já que formam circuitos específicos na modulação de respostas envolvidas com comportamento e ajustes diversos.

Diferentes autores ao longo dos anos propuseram diversas maneiras de divisão do complexo amigdalóide e de seu limite anatômico, existindo controversas até o momento sobre tal divisão em várias espécies animais (Rasia-Filho e cols., 2000; Newman, 1999; Swanson & Petrovich, 1998). Uma das primeiras descrições anatômicas foi proposta em 1923, por Johnston, com base em uma análise comparativa de materiais vertebrados, na qual a amígdala seria um sistema de duas partes: 1) grupo corticomédial (mais antigo filogeneticamente), composto dos núcleos central, medial, cortical e núcleo do trato olfatório lateral; e 2) grupo basolateral (mais novo filogeneticamente) composto pelos núcleos lateral, basal e basomedial (Knapska e cols., 2007). Levando em consideração os dados citoarquitetônicos, quimioarquitetônicos e de conexões de fibras disponíveis na época, um estudo em 1998 dividiu a amígdala em três partes: 1) grupo profundo ou basolateral, que é constituído pelos

núcleos lateral, basal e basomedial; 2) grupo centromedial, composto pelos núcleos central e medial, bem como a parte do núcleo do sono da estria terminal; e 3) o grupo superficial ou cortical, que é constituído pelo núcleo cortical anterior e posterior, núcleo do trato olfatório e o córtex periamigdalóide (McDonald, 1998). A partir deste modelo, diversas subdivisões foram também distinguidas, como é ilustrado na figura 1.

Já alguns estudos propuseram a classificação da amígdala em quatro regiões (Figura 2), de acordo com sua disposição citoarquitetônica e hodológica, como: 1) amígdala “expandida”, assim denominada por se estender além de seus limites anatômicos e subdividindo-se nos núcleos da divisão central e divisão medial; 2) amígdala cortical, subdividida em complexo basolateral e em porções que se ligam às vias olfativas e vomeronasal; 3) áreas de transição, localizadas entre as porções ventral dos núcleos da base e a amígdala “expandida”; e 4) núcleos ainda não classificados, constituídos por um grande número de células dispersas na substância branca, substância *inominata* e porções do núcleo próprio da estria terminal (BST; Alheid e cols., 1995; Raissa-Filho e cols., 2000).

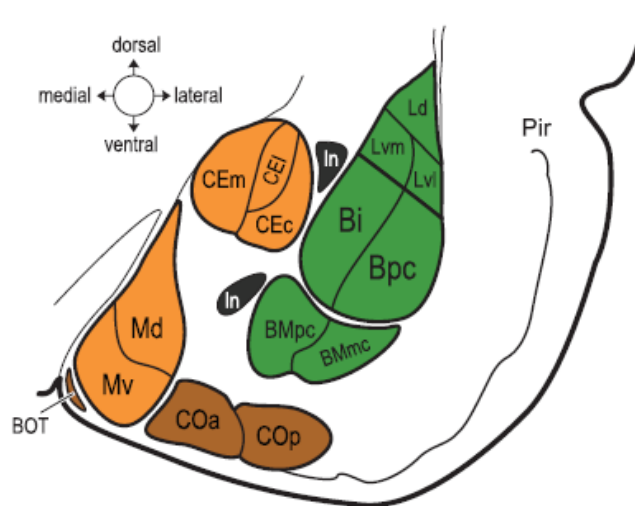


Figura 1: Divisões e subdivisões do complexo amigdalóide de ratos. O complexo foi dividido em três grupos: o centromedial (laranja), o basolateral (verde) e o cortical (marrom). Em cinza escuro são indicados os núcleos intercalados (In). CEc: núcleo central, subdivisão capsular; CEI: núcleo central, subdivisão lateral; CEm: núcleo central, subdivisão medial; COa: núcleo cortical, subdivisão anterior; COp: núcleo cortical, subdivisão posterior; BOT: núcleo do sono do trato olfatório; Bi: núcleo basal, subdivisão interediária; Bpc: núcleo basal, subdivisão parvocelular; BMmc: núcleo basomedial, subdivisão magnocelular; BMpc: núcleo basomedial, subdivisão parvocelular; Ld: núcleo lateral, subdivisão dorsal; Lvm: núcleo lateral, subdivisão ventromedial; Lvl: núcleo lateral, subdivisão ventrolateral; Md: núcleo medial, subdivisão dorsal; Mv: núcleo medial, subdivisão ventral; In: núcleo intercalado; Pir: córtex piriforme (Knapska e colaboradores, 2007).

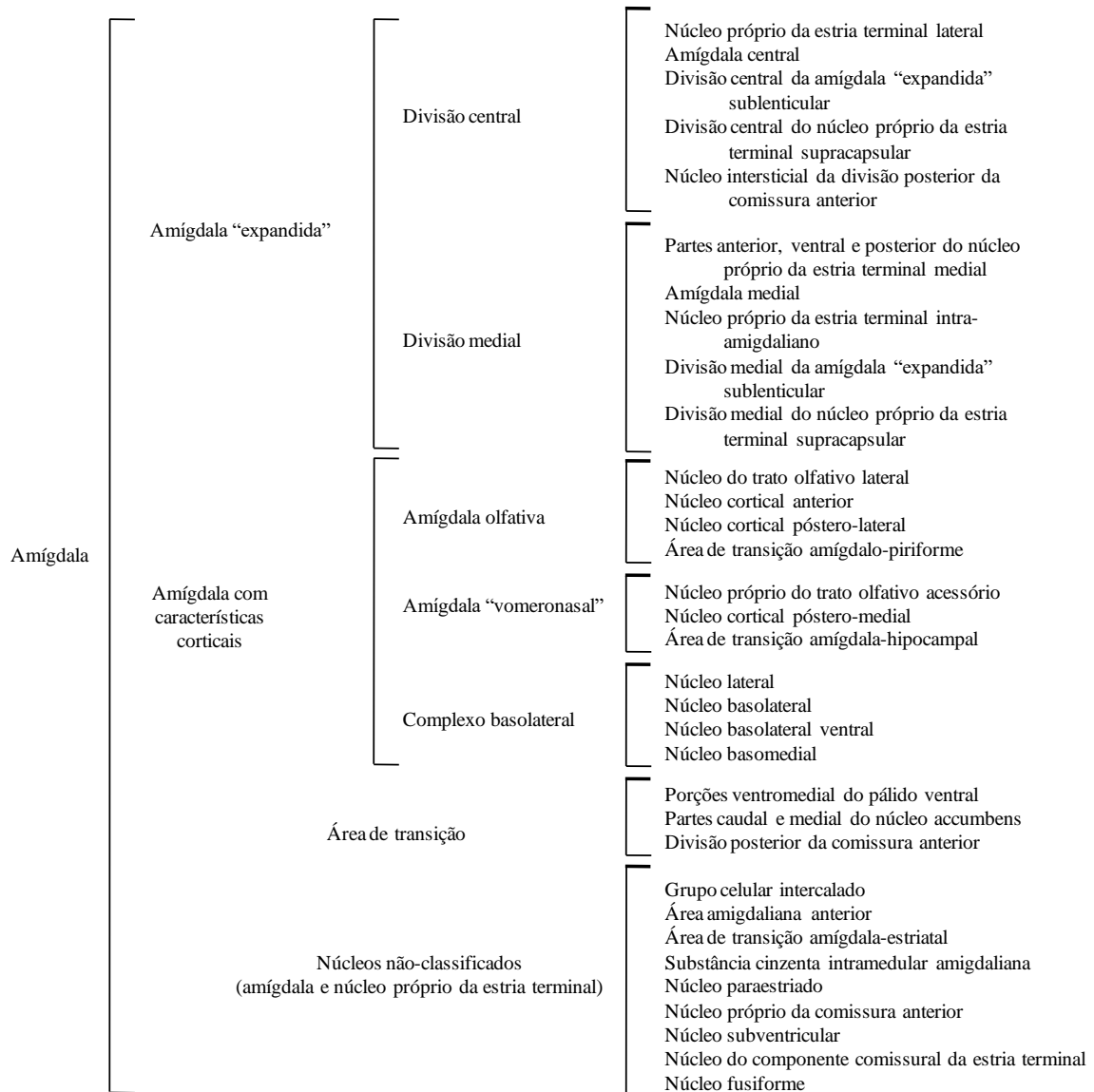


Figura 2: Classificação da divisão do complexo amigdalóide com suas subdivisões anatômicas e seus componentes, conforme descrito por Alheid e colaboradores (1995) e adaptado por Rasia-Filho e colaboradores (2000).

1.2 – Amígdala: função

A amígdala como um todo tem sido associada a uma grande variedade de funções ligadas a respostas fisiológicas, comportamentais (sexuais e sociais) e endócrinas, as quais estão relacionadas a estímulos emocionais (Petrovich e cols., 1996). Como tais respostas são acompanhadas por diferentes reações cardiovasculares, diz-se que esta região é componente importante nos mecanismos do controle cardiovascular. O controle central da função

cardiovascular é seletivo e específico, envolvendo, além da amígdala, uma gama de núcleos centrais capazes de responder de forma diferenciada dependendo do estímulo que esteja provocando alterações na homeostasia (Chiou e cols., 2009).

Alterações na pressão arterial e frequência cardíaca ocorrem frente a diferentes condições enfrentadas pelos animais, tais como medo, recompensa, estresse, ansiedade, estímulo aversivo e interação presa-predador. Para realização de tais alterações, o complexo amigdalóide, recebe variados tipos de informações interoceptivas e exteroceptivas, modificando sua própria atividade ao analisar a informação recebida e estimulando outras regiões do sistema nervoso central (SNC) para que se inicie a resposta ao estímulo inicial (Rasia-Filho e cols., 2000; Knuepfer e cols., 1995). A amígdala é a região responsável por processar, categorizar e estocar as sensações e emoções geradas pelas experiências cotidianas. Um dos primeiros indícios do envolvimento da amígdala na modulação do comportamento emocional foi obtido com a ablação bilateral do terço anterior do lobo temporal de macacos, ocorrendo, a partir disso, perda da agressividade e as manifestações comportamentais relacionadas ao medo, alteração da percepção de estímulos aversivos e comportamento sexual inapropriado (Kluver & Bucy, 1997). Em humanos a estimulação da região amigdalóide provocou respostas emocionais similares as que ocorrem naturalmente na ansiedade e lesões nessa região suavizaram tais respostas (Shekhar e cols., 2003).

As sensações de estresse, medo, ansiedade e a consolidação de memórias aversivas ativam de maneira seletiva diferentes sub-núcleos amigdalóides (Sah e cols., 2003). Nesse sentido, alguns desses sub-núcleos vem sendo, ao longo dos anos, bem estudados e caracterizados, a fim de demonstrar sua participação nas respostas a diversos estímulos. Sanders e colaboradores, em 1991, demonstraram que microinjeções de *bicuculline methiodide* (BMI), um antagonista de receptores GABA_A, na subdivisão basolateral da amígdala (BLA) produzem aumento dose-dependente de pressão arterial e frequência cardíaca, bem como aumento na atividade locomotora (Sanders & Shekhar, 1991). Em relação à subdivisão medial da amígdala (MeA), Kubo e colaboradores, em 2004, demonstraram que a microinjeção de muscimol, um agonista de receptores GABA_A, induz uma diminuição da pressão arterial durante exposição a estresse agudo por restrição (Kubo e cols., 2004). Um grupo de pesquisadores, em 2012, manipulou a atividade do núcleo lateral da amígdala (LA) através da microinjeção de muscimol, uma vez por semana, anteriormente a sessão de treinamento de estímulo condicionado (choque na pata seguido de incidência de luz). Após

seis semanas, a infusão de muscimol reduziu a reposta de medo ao estímulo condicionado a níveis pré-condicionamento (Erlich e cols., 2012). Já em 2013, estudos demonstraram que a lesão exocítica do núcleo central da amígdala (CeA) por ácido ibotênico, diminuiu repostas de ansiedade em animais expostos a estresse crônico (Ventura-Silva e cols., 2013).

Em relação ao núcleo basomedial da amígdala (BMA), objeto de estudo deste trabalho, existem poucos estudos na literatura a cerca de sua função e caracterização. Em ratos, a BMA foi dividida em dois grupos citoarquitetônicos: anterior (BMAa), que ocupa a metade rostral da BMA, e posterior (BMAp), ocupando a metade caudal da BMA. Sabe-se, através de estudos com traçador anterógrado, que a BMA possui conexões com diferentes núcleos encefálicos. Dentre esses, foi demonstrado que a BMAp envia projeções para os núcleos CeA, LA, VMH (hipotálamo ventromedial) e BST (núcleo do leito da estria terminal), e que a BMAa além dos núcleos CeA, VMH e BST, também envia projeções para MeA, mpoA e esparsas fibras para o DMH (hipotálamo dorsomedial) (Petrovich e cols., 1996). Aglada-Figueroa e Quirk, em 2005, demonstraram que lesões na BMA anteriormente ao estímulo de medo condicionado (pré-condicionamento) não alteram as respostas a ele, mas que lesões na BMA combinadas a lesões na BLA, pós-condicionamento, diminuíram as respostas ao medo condicionado, indicando que a BMA pode participar da via neural de controle do medo (Aglada-Figueroa & Quirk, 2005). Estudos recentes mostraram que em ratos submetidos a testes de esquiva inibitória, relacionados à ansiedade no labirinto em T elevado, observou-se aumento na expressão da proteína c-fos, um indicativo de aumento da atividade neuronal, em vários núcleos encefálicos, incluindo a BMA (de Andrade e cols., 2012; Silveira e cols., 2001).

1.3 – Hipotálamo dorsomedial

Estudos indicam que o hipotálamo é uma importante região que vem sendo relacionada a funções autonômicas e endócrinas, estando essas funções associadas ao comportamento emocional (Bernardis & Bellinger, 1998). Esta região encefálica situa-se na base ventral do diencéfalo, constituindo a parte inferior das paredes laterais e a base do terceiro ventrículo. Como o seu nome sugere, o hipotálamo localiza-se ventralmente ao tálamo, do qual se separa pelo sulco hipotalâmico. É ainda limitado caudalmente pelos processos mamilares. Ventralmente, o hipotálamo é constituído pelo tubo cinéreo, cuja parte

central consiste na eminência média e que se continua pelo infundíbulo, que o liga à hipófise. A posição estratégica do hipotálamo permite ainda numerosas conexões com diferentes áreas cerebrais, o que faculta a intensa comunicação funcional existente, facilitando a recepção e expressão dos numerosos e distintos impulsos nervosos (Getty, 1986; Ojede e cols., 2000).

Assim com a amígdala, o hipotálamo é dividido em diversos sub-núcleos, apresentando cada um deles funções e relações muitas vezes distintas. Alguns desses sub-núcleos têm sido apontados como mediadores da resposta fisiológica ao estresse, dentre eles o hipotálamo dorsomedial (DMH). O DMH se encontra adjacente ao terceiro ventrículo, caudalmente ao núcleo hipotalâmico paraventricular (PVN), dorsalmente ao núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) e ventralmente ao trato mamilotalâmico. Lateralmente é delimitado pelo fórnix e área hipotalâmica lateral (figura 3) (Fontes e cols., 2011).

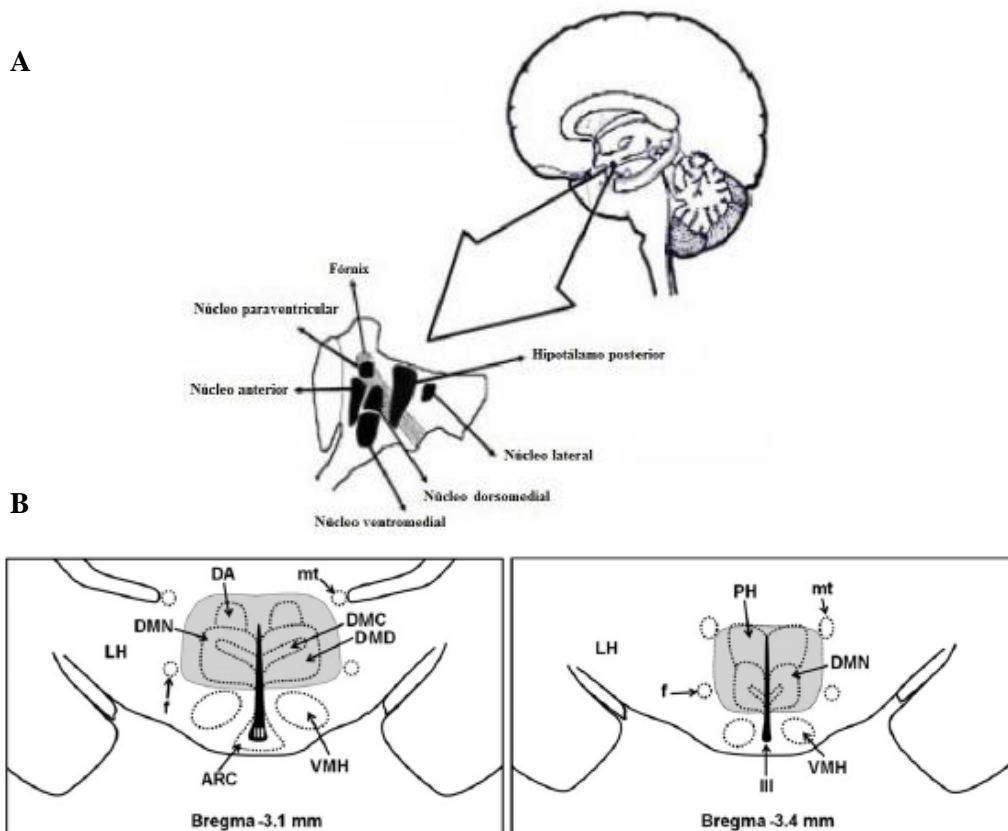


Figura 3: Representação da localização do hipotálamo dorsomedial. (A) Diagrama de corte sagital de cérebro humano com os principais núcleos hipotalâmicos. (B) Localização do DMH em cérebro de rato. III: terceiro ventrículo; DMN: núcleo hipotalâmico dorsomedial; DMC: porção compacta do núcleo hipotalâmico dorsomedial; DMD: porção difusa do núcleo hipotalâmico dorsomedial; PH: área hipotalâmica posterior; VMH: núcleo hipotalâmico ventromedial; f: fórnix; MT: trato mamilotalâmico; LH: hipotálamo lateral; DA: área hipotalâmica dorsal; ARC: núcleo hipotalâmico arqueado (Fontes e cols., 2006; Fontes e cols., 2001).

Existe um grande número de evidências que indicam uma importante participação do DMH na integração das respostas fisiológicas cardiovasculares, neuroendócrinas e comportamentais oriundas do estresse emocional em ratos (Bailey & DiMicco, 2001; DiMicco e cols., 2002a; Stotz-Potter e cols., 1996). Estudos apontam a possibilidade de que neurônios do DMH têm papel crucial na ativação de neurônios do PVN, responsáveis pelo recrutamento do eixo HPA em algumas situações de estresse. Utilizando-se de traçadores anterógrados PHA-L (*Phaseolus vulgaris*), Thompson, em 1996, mostrou que o PVN representa um alvo primário de eferências a partir do DMH (Dimicco e cols., 2002). Estudos demonstraram que a microinjeção bilateral de muscimol, agonista de receptores GABA_A, no DMH suprimiu o aumento da PA e FC em 68 e 85%, respectivamente, durante estresse de jato de ar (Stotz-Potter e cols., 1996). Já a ativação de neurônios do DMH através da microinjeção de *bicuculline methiodide* (BMI) ou de aminoácidos excitatórios resulta em um padrão de mudanças neuroendócrinas, autonômicas e comportamentais vistas em situações de estresse experimental (de Menezes e cols., 2006; Soltis & DiMicco, 1991b; Soltis & DiMicco, 1991a). Em relação à participação do DMH nas possíveis vias de controle das respostas ao estresse, estudos demonstraram que a microinjeção de ácido cianurênico, um antagonista não-seletivo de receptores de aminoácidos excitatórios, no DMH bloqueou ou reverteu o aumento na PA e FC resultantes da microinjeção de BMI na BLA (Soltis e cols., 1998). Também neste sentido, sabe-se que as respostas de aumento de PA e FC evocadas pela estimulação do DMH foram reduzidas após a microinjeção de um agonista GABA_A, ou um antagonista de receptores glutamatérgicos nas colunas lateral e dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal (l/dIPAG) (de Menezes e cols., 2009).

1.4 - Estresse

O termo estresse foi introduzido e popularizado por Hans Selye (Selye, 1936), e para ele estresse seria uma reação inespecífica do organismo, a denominada “síndrome geral de adaptação”, a uma demanda intensa, tanto interna quanto externa, que colocaria em risco o equilíbrio do meio interno. Tal equilíbrio, homeostase, é resultante de processos fisiológicos coordenados, o qual é constantemente desafiado por forças adversas. Sendo assim, foi determinado que o agente causador (o estímulo) é denominado de agente estressor, e estresse é a condição provocada pelo desafio (Selye, 1973).

O estresse é uma questão crucial nas sociedades modernas, já que a vida em sociedade propicia situações de estresse e ansiedade cotidianamente, exigindo constante ativação de vias neuronais e de sistema compensatórios de adaptação. Disfunções em tais vias e sistemas, seja por exposição excessiva aos estressores, por predisposições genéticas ou por alteração/disfunção nos núcleos encefálicos envolvidos nessas respostas, constituem uma ameaça a integridade fisiológica e psicológica do indivíduo (Chrousos, 2009; Szczepanska-Sadowska, 2008). Assim, a resposta normal ao estresse é essencial para garantir a sobrevivência do organismo.

Segundo Mayorov, dois tipos principais de estresse são considerados: (1) estresse físico (aquele que apresenta uma ameaça direta ao organismo, como a hipóxia), e (2) estresse psicoemocional (aquele que necessita de interpretação por várias estruturas cerebrais) (Mayorov, 2011). De acordo com a hipótese da reatividade, respostas fisiológicas persistentes e exageradas, às situações de estresse emocional podem ser marcadores de indivíduos ou subgrupos com risco aumentado para doenças (Fontes e cols., 2011; Lovallo & Gerin, 2003). Em relação ao sistema cardiovascular, situações de estresse crônico podem resultar em vários estados patológicos, como a hipertensão arterial sistêmica, arritmias cardíacas e infarto do miocárdio (Amiragova, 1985; DiMicco e cols., 2002b). Estudos em ratos corroboram a estas observações, demonstrando, por exemplo, que a ativação repetida do sistema cardiovascular devido ao estresse produz hipertensão arterial sistêmica sustentada (Folkow, 1982).

Sabe-se que em resposta ao estresse emocional (ou ambiental), o sistema nervoso central de mamíferos produz respostas de defesa caracterizadas por uma rede complexa de alterações endócrinas, autonômicas e comportamentais (Dimicco e cols., 2002). Tais alterações envolvem aumento da concentração plasmática do hormônio adrenocorticotrófico, da pressão arterial (PA), da frequência cardíaca (FC), da temperatura do tecido adiposo marrom e da temperatura corporal (Tco) (de Menezes e cols., 2008; Ootsuka e cols., 2008). Essas alterações são acompanhadas por comportamentos defensivos que incluem fuga, congelamento, ataque defensivo e avaliação de risco (Blanchard & Blanchard, 1989).

O impacto dos eventos estressantes no desenvolvimento de psicopatologias tem sido constantemente estudado em modelos animais. Foi constatado que os estressores de origem psicológica e social são os mais comuns no ser humano (Bjorkqvist, 2001). Neste sentido, alguns estudos em animais demonstraram que a perda temporária do controle social (derrota social) é uma importante condição que pode levar a tais alterações psicopatológicas (Fuchs &

Flugge, 2002). A relação entre co-específicos para sobrevivência e reprodução dos organismos, possui, em mamíferos, papel importante no contato sexual e definição de território, principalmente entre machos. Esta definição de território pode se manifestar através da agressividade, definindo um dominante-vencedor e um perdedor-excluído (Krebs e cols., 1996). Visto a importância da derrota social em um contexto da fisiologia do estresse e das vias neurais envolvidas em comportamentos de defesa, existem algumas formas de estudá-la em animais. Em uma delas mimetiza-se o ambiente natural, sendo o mesmo formado por machos e fêmeas, onde rapidamente a hierarquia é estabelecida por um macho dominante, sendo os subordinados submetidos então a uma situação de estresse crônico (Martinez e cols., 1998). Em outro modelo conhecido, denominado interação residente-intruso, um macho adulto (intruso) é introduzido na caixa de um animal não-familiar e agressivo (residente). Esta situação é suficiente para desencadear comportamentos agressivos no residente e comportamentos defensivos, como congelamento, no intruso, tornando-se uma situação de estresse agudo (Koolhaas e cols., 1997; Motta e cols., 2009).

Diversos núcleos encefálicos estão envolvidos na integração das respostas produzidas por diferentes tipos de estresse em ratos (Pacak & Palkovits, 2001). Entre esses, encontram-se a amígdala e o hipotálamo, os quais são núcleos cruciais na integração das respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais ao estresse emocional (Bernardis & Bellinger, 1998; Fontes e cols., 2011; Salome e cols., 2007). Sabe-se, por exemplo, que o DMH parece estar envolvido na mediação das mudanças cardiovasculares resultantes a partir da ativação da BLA (Soltis e cols., 1998). Entretanto, apesar do extenso volume de trabalhos existentes, o circuito neural envolvido com as respostas ao estresse ainda não está totalmente esclarecido.

Sabendo que há um aumento da ativação neuronal na BMA em situações de ansiedade e que esta região pode estar envolvida nas respostas de medo condicionado, torna-se importante o estudo do papel da mesma no controle cardiovascular sob situações de estresse. Além disso, devido ao grande número de evidências da participação do DMH nas respostas ao estresse, uma possível integração entre essa região com a BMA deve ser analisada com o intuito de correlacioná-la dentro do circuito neural envolvido com o estresse emocional. Entender como tal circuito gera e modula as respostas ao estresse pode melhorar o entendimento das disfunções decorrentes da exposição a ele.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral:

Avaliar a influência da amígdala basomedial no controle cardiovascular durante estresse e sua possível interação com o hipotálamo dorsomedial.

2.2 – Objetivos Específicos:

- Avaliar os efeitos cardiovasculares produzidos pela inibição química da BMA, por meio da microinjeção unilateral de muscimol, agonista GABA_A;
- Avaliar os efeitos cardiovasculares produzidos pela inibição química de regiões próximas à BMA, por meio da microinjeção unilateral de muscimol;
- Avaliar a influência da inibição química do HDM nas respostas produzidas por meio da inibição química da BMA sob PAM e FC;
- Avaliar os efeitos cardiovasculares produzidos pela ativação química da BMA, através da microinjeção bilateral de BMI, em animais expostos a estresse social por rato intruso.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Modelo Animal

Para a execução deste trabalho utilizamos ratos Wistar pesando entre 300 e 320g, os quais foram cedidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto – CCA UFOP. Tais animais foram levados para o Biotério de Experimentação do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, sendo alojados coletivamente em gaiolas com dimensões de 41x34x17cm (três animais por caixa), mantidos a uma temperatura média de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, em um ciclo claro/escuro de doze horas e recebendo comida (ração comercial Nuvilab®) e água *ad libitum*. Após a realização do primeiro procedimento cirúrgico (descrito adiante), os animais passaram a ser alojados individualmente em gaiolas com dimensões iguais a 30x19x13cm.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a aprovação prévia do Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto no protocolo número 2012/51. Os experimentos foram sempre realizados de acordo com a Lei Auroca (Lei 11.794) e o Guia de Uso e Cuidados de Animais de Laboratório do *National Research Council*, EUA.

3.2 – Preparo de drogas e soluções utilizadas

PBS (Salina tamponada com fosfato; pH 7,2): solução preparada a partir da diluição de 8,18g de NaCl P.A. (SIGMA-ALDRICH, USA), 1,98g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ P.A. (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH, Brasil) e 0,26g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ P.A. (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH, Brasil) em água ultra-purificada (Milli – Q®) q.s.p. 1000mL. O pH (Sensoglass, Sensores Analíticos – Modelo SC02) da solução foi ajustado para 7,2 com soluções de HCl e NaOH, conforme necessidade. A solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C e $1,0 \text{ Kg/cm}^2$ durante 15 minutos, conforme protocolo em vigor no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular.

Salina Heparinizada: a Heparina Sódica 5000UI (Parinex, Heparina sódica uso intravenoso – Hipolabor) foi diluída em PBS para a preparação de uma solução final com 125UI em 25mL.

Anestésico (Solução de Cetamina + Xilazina): preparado por meio de adição de 3mL de Xilazina (Dopaser - Solução Injetável; Laboratórios Caller AS, Barcelona/Espanha) 3% (p/v) a 10mL de Cetamina (Cloridrato de Cetamina 10%; Syntec do Brasil Ltda, Fabricante: Rhobifarma Industria Farmacêutica Ltda, Hortolândia/São Paulo) 10% (p/v). Utilizada da seguinte forma: dose (Cetamina: 80mg/kg; Xilazina: 7mg/kg) e volume (0,1mL/100g de animal; *i.m.*).

Anestésico Inalatório: Isoflurano 100% (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira/São Paulo). Administrado via aérea na dose de 2–2,5% em 2L de oxigênio (O₂) por minuto.

Anestésico Local – Cloridrato de Lidocaína 2%: no momento da utilização, diluímos 0,1mL do Cloridrato de Lidocaína 2% (Rhobifarma Indústria Farmacêutica LTDA, Hortolândia/São Paulo) em 0,2mL de PBS.

Antibiótico (Pentabiótico Veterinário): (Fortecilin Pequeno Porte, Penicilinas + Estreptomicina – Laboratório Bio-Vet S/A) utilizado na prevenção de infecções no pós-operatório, na dose equivalente a 48.000UI de penicilina, 20mg de estreptomicina e 20mg de diidroestreptomicina/kg. Volume injetado: 0,1 mL/100g de animal; *i.m.*

Antiinflamatório [Ketoflex 1% p/v (Cetoprofeno)]:(Ketoflex 1%, Antiinflamatório à base de Cetoprofeno - Mundo Animal Veterinário Ltda.) utilizado com o objetivo de reduzir inflamação e dor decorrente dos procedimentos cirúrgicos. Utilizado na seguinte forma: dose (4mg/Kg) e volume (0,1 mL/100g de animal; *i.m.*).

Muscimol (agonista dos receptores GABA_A): (SIGMA-ALDRICH, USA) diluído em PBS até a concentração utilizada (100pmol/100nL), separado em alíquotas de 10 µL e mantido congelado a -20°C (de Menezes e cols., 2009).

Bicuculina methiodide – BMI (antagonista dos receptores GABA_A): (SIGMA-ALDRICH, USA) diluído em PBS até a concentração utilizada (10pmol/100nL), separado em alíquotas de 10µL e mantido congelado a -20°C (DiMicco e cols., 2006).

Solução paraformaldeído 0,1M a 4%: solução preparada a partir do aquecimento, sob agitação, de 40g de paraformaldeído em pó (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH, Brasil), duas ou três gotas de NaOH 1M, 500 mL de PB 0,1M e água destilada até que fosse

atingido o volume final de 1000mL. Verificou-se se o pH (Sensoglass, Sensores Analíticos – Modelo SC02) da solução estava entre 7,0 e 8,0.

Solução de gelatina: preparada a partir da diluição de 5g de gelatina de pele bovina tipo B (SIGMA – ALDRICH, Brasil) em 500mL de água destilada sob aquecimento. Após completa dissolução a mesma foi mantida na geladeira a 4°C para gelatinização das lâminas histológicas.

3.3 – Confeção dos materiais utilizados

Confeção de cânulas arteriais

As cânulas arteriais foram confeccionadas a partir da junção, por aquecimento, de um tubo de polietileno de 50mm (PE 50 - Clay Adams, Parsipanny, NJ, EUA) a outro de 10mm (PE 10 - Clay Adams, Parsipanny, NJ, EUA) de circunferência. As medidas utilizadas foram: 14cm de PE 50 e 4cm de PE10.

Confeção de cânulas-guia (CG)

As CG foram confeccionadas utilizando-se agulha 23G ajustadas, mediante electrocorrosão, até o comprimento de 15mm. A CG foi encaixada a um suporte preso ao aparelho estereotáxico (StoeltingCo., Illinois, EUA).

Confeção de cânulas injetoras

As cânulas injetoras foram confeccionadas a partir de agulha gengival 30G e ajustadas a 17,5mm para microinjeção na BMA e 16mm para microinjeção no DMH, ambas por electrocorrosão. Assim, no momento da microinjeção, a extremidade da cânula injetora permaneceria abaixo da CG, correspondendo à exata localização da BMA e/ou DMH, de acordo com as coordenadas utilizadas (ver item 3.4.1).

3.4 – Cirurgias

3.4.1 – Implante de cânulas-guia dirigidas a Amígdala Basomedial e ao Hipotálamo Dorsomedial

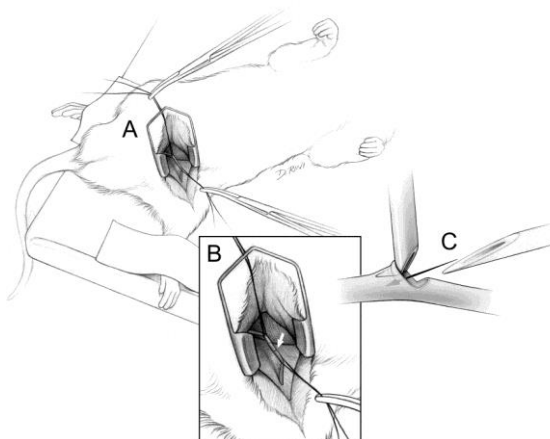
Com o auxílio de um aparelho estereotáxico, as CG de 15mm foram implantadas em direção a BMA e/ou ao DMH. Para tal, os animais foram anestesiados com a solução de Ketamina e Xilazina (*i.m.*), acomodados e fixados ao estereotáxico com a barra incisiva a 3.3mm abaixo da linha interaural e tricotomizados na região entre os pavilhões auditivos e os olhos. A região tricotomizada foi submetida à assepsia com PVPI degermante e à injeção subcutânea de cloridrato de lidocaína 2% associado à epinefrina, com a finalidade de provocar vasoconstrição local. A partir de uma incisão mediana, a região superior do crânio foi exposta, na qual foram feitos dois orifícios para fixação de parafusos de aço inoxidável, pontos de ancoragem das CG. A torre do estereotáxico foi angulada em zero e as CG posicionadas de acordo com as coordenadas estereotáxicas estabelecidas segundo o Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2008), utilizando o bregma como referência. Para a BMA: 2.3 mm posterior, 4.1 mm lateral e 7.3 ventral; e para o DMH: 3.3mm posterior, 0.6mm lateral e 7.6mm ventral. Em sequência, os orifícios para o implante das CG foram feitos e, após a introdução, a abertura cirúrgica foi fechada com resina odontológica (acrílico dental polimerizável). Com o intuito de evitar a obstrução das CG por resíduos de sangue ou sujeira, foi introduzido um oclisor de aço inoxidável (15mm). Ao final da cirurgia os animais foram submetidos a cuidados pós-operatórios (ver item 3.4.3) e passaram por um período de recuperação entre seis a oito dias.

3.4.2 – Implante de cânula na artéria femoral

Passado o período de recuperação, os animais foram re-anestesiados, no entanto utilizando-se de anestésico inalatório (Isoflurano 2-2.5% - 2L/min de O₂), para realização do implante de cânulas femorais. Fez-se a tricotomia da região inguinal e do dorso dos animais, seguida de assepsia destas regiões com PVPI degermante. Através de uma pequena incisão na região inguinal, o trígono femoral foi exposto, os vasos femorais identificados e cuidadosamente separados do nervo femoral (figura 4). Um cateter de polietileno (PE 10) (soldado por aquecimento ao PE 50, como descrito no item 3.3) foi introduzido na artéria femoral, até alcançar a aorta abdominal. A fim de impedir a oclusão (formação de trombo) do

cateter, o mesmo foi previamente preenchido com solução de salina heparinizada (125UI/mL) e sua ponta exposta obstruída com um pino de aço inoxidável. Após inserção, o PE 50 foi passado pelo tecido subcutâneo do animal, com auxílio de um pequeno tubo de metal (trocáter), até sua exteriorização na região interescapular. Terminado o procedimento cirúrgico, os locais de incisão foram suturados.

Os animais foram submetidos a um período de recuperação de 48 horas antes do início dos procedimentos experimentais. No momento do experimento a extremidade exteriorizada do cateter foi conectada ao sistema de aquisição de dados para obtenção dos sinais de PA e FC.



(Fuentes, 2004)

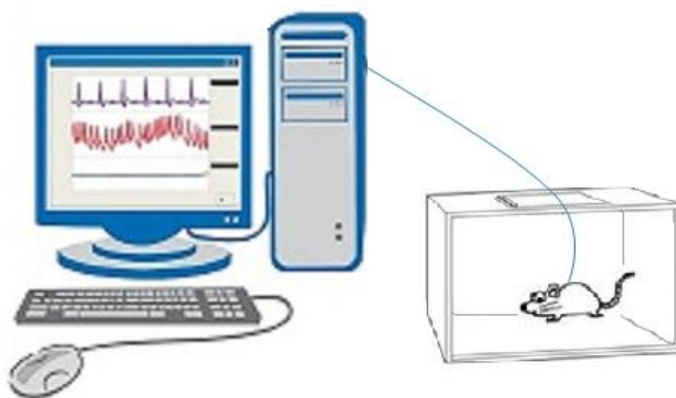
Figura 4: Desenho esquemático da canulação da artéria femoral. A: identificação e separação da artéria femoral do trígono femoral; B: pequena incisão realizada na região de inserção do cateter de polietileno; C: procedimento de inserção do cateter na artéria femoral.

3.4.3 – Cuidados pós-operatórios

Após o término dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam injeção *i.m.* de cetoprofeno (Ketoflex®) e uma dose de antibiótico (Pentabiótico veterinário), para prevenção de inflamação e infecção. Ao final da primeira cirurgia (implante de CG), os ratos foram alojados em gaiolas individuais e mantidos sob manta térmica, a fim de se evitar hipotermia, até o final do efeito anestésico. Posteriormente, os animais foram mantidos na sala de experimentos sob condições controladas de temperatura, luminosidade e níveis de ruído, com comida e água *ad libitum*.

3.5 – Registro da pressão arterial média e frequência cardíaca

Para obtenção do registro dos parâmetros cardiovasculares, a cânula inserida na artéria femoral foi conectada a um transdutor que, uma vez ligado a um sistema de aquisição de dados Power Lab 4/20 (ADInstrument) permite a aferição da pressão arterial pulsátil (PAP). As oscilações de pressão captadas foram amplificadas e convertidas em sinais enviados a uma placa de aquisição de dados, por meio de uma placa de conversão analógico/digital. O software de leitura *Chart 7 for Windows* realizou uma coleta contínua da PAP, calculando a partir dela, os valores de FC e PAM (Figura 5).



(Adaptado de Telemetry Research, 2011)

Figura 5: Desenho esquemático do registro dos parâmetros cardiovasculares. A parte externa da cânula inserida na artéria femoral é conectada a um transdutor, ligado a um sistema de aquisição de dados, permitindo aferição da PAM e FC.

3.6 – Procedimentos de microinjeção

Para microinjeção de veículo (PBS), muscimol ou BMI as cânulas injetoras foram conectadas a um pequeno tubo de polietileno (Norton, 0.010) e a uma seringa Hamilton de 10 μ L preenchida com água deionizada. O tubo foi preenchido com a substância (veículo, muscimol ou BMI) a ser microinjetada, e entre tal substância e a água deionizada formou-se uma pequena bolha de ar. Durante a administração, cujo conteúdo total era equivalente a 100nL, o movimento descendente da bolha de ar indicou o sucesso da microinjeção. Finalmente, após a retirada da cânula injetora a mesma foi testada para testar possíveis obstruções.

3.7 – Procedimentos experimentais

Todos os animais foram submetidos ao mesmo delineamento experimental. Conforme demonstrado na figura 6 realizou-se o implante das CG (estereotaxia) e a canulação da artéria femoral anteriormente aos procedimentos experimentais.

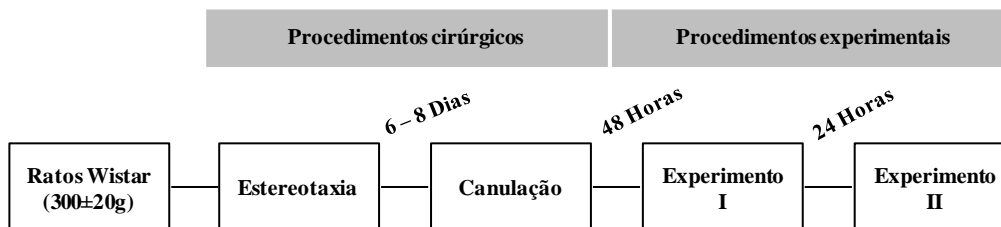


Figura 6: Delineamento experimental. Procedimentos cirúrgicos e experimentais.

3.7.1 – Participação da inibição química da BMA no controle cardiovascular

Com o propósito de verificar qual a influência da inibição química da BMA nos parâmetros cardiovasculares, realizou-se o seguinte protocolo experimental (figura 7):

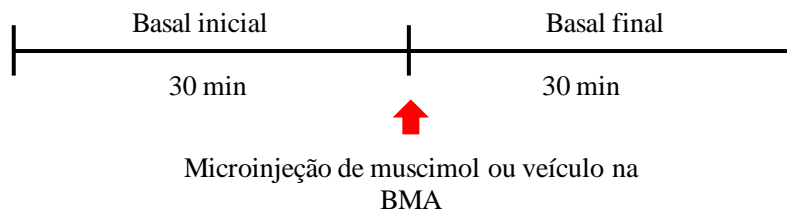


Figura 7: Escala temporal do protocolo experimental para avaliação da inibição química da BMA por microinjeção de muscimol sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC). Os animais foram submetidos à microinjeção de veículo (100nL) ou muscimol (100pmol/100nL).

Após conectar os animais ao sistema, realizamos o registro dos valores basais (basal inicial) de PAM e FC durante aproximadamente 30 minutos para adaptação do animal e estabilização dos parâmetros mensurados. Em seguida, fizemos a microinjeção de muscimol ou veículo (Experimento I) na BMA, de forma randômica. O animal que recebeu a microinjeção de muscimol no Experimento I (1º dia) recebeu a microinjeção de veículo no Experimento II (2º dia), e vice-versa, pois os ratos foram utilizados como controle deles mesmos, possibilitando assim a redução no número de animais utilizados. O registro se

estendeu por mais 30 minutos (basal final) para captação do efeito da substância administrada e posterior recuperação dos parâmetros mensurados.

3.7.2 - Participação da inibição química de regiões próximas a BMA no controle cardiovascular

Já para verificar qual a influência da inibição química de regiões próximas, mas fora da BMA (NBMA) nos parâmetros cardiovasculares, realizamos o seguinte protocolo experimental (figura 8):

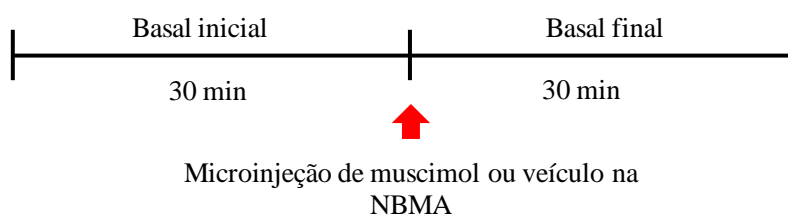


Figura 8: Escala temporal do protocolo experimental para avaliação da inibição química da NBMA por microinjeção de muscimol sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC). Os animais foram submetidos à microinjeção de veículo (100nL) ou muscimol (100pmol/100nL).

Os animais foram expostos ao mesmo procedimento detalhado no item anterior (3.7.1), porém a microinjeção das substâncias foi realizada em regiões próximas a BMA, a fim de testar a especificidade das respostas cardiovasculares oriundas da inibição química da mesma.

3.7.3 – Participação da ativação química da BMA no controle cardiovascular de animais expostos a estresse agudo

Com o propósito de verificar qual a influência da ativação química da BMA nos parâmetros cardiovasculares, realizamos o seguinte protocolo experimental (figura 9):

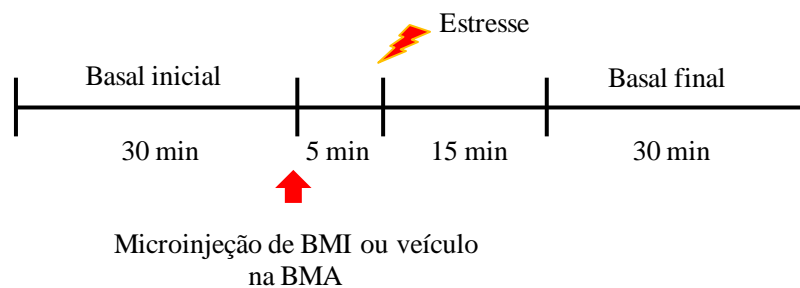
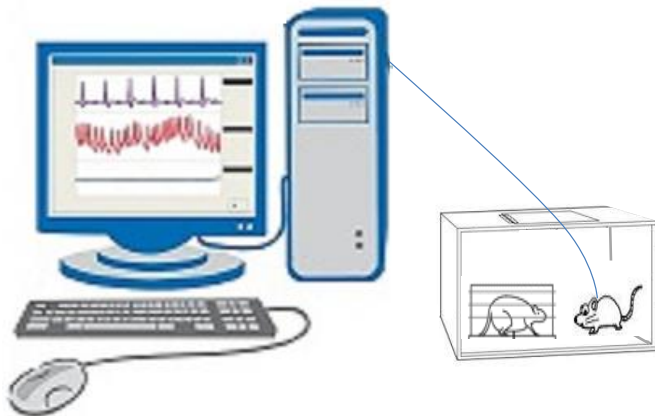


Figura 9: Escala temporal do protocolo experimental para avaliação da ativação química da BMA por microinjeção de BMI sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC). Os animais foram submetidos à microinjeção de veículo (100nL) ou BMI (10pmol/100nL).

Após o período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares (basal inicial), os animais receberam microinjeção bilateral de BMI ou veículo na BMA, de forma randômica. Seguidos 3 minutos, os ratos foram submetidos ao procedimento de estresse social através da sua inserção em uma caixa de outro animal não familiar, tornando-se um “rato intruso” em tal situação, por 15 minutos.

Esse procedimento foi adaptado a partir de dois modelos. No primeiro modelo, denominado *social defeat*, um animal é treinado a se tornar agressivo a outros animais antes do início dos experimentos. O rato analisado (intruso) é então introduzido na gaiola de tal animal (residente) até que ocorra a primeira reação agressiva do residente em direção ao intruso. Eles são então separados por uma divisória de aço perfurada, permitindo aos animais se ver, ouvir e sentir o cheiro um do outro (Kenney et al., 2006). No segundo modelo, o animal analisado é o residente e um rato intruso, confinado a uma pequena gaiola, é introduzido em sua caixa durante 30 minutos. Como o contato entre os animais é apenas pelas frestas da gaiola o estímulo é mais psicológico e social do que físico (Mohammed e cols., 2014).

No nosso modelo, o animal analisado é introduzido em uma caixa na qual está alojado um animal não familiar, o qual não teve nenhum tipo de treinamento agressivo. Esses ratos não têm contato direto entre si, já que o residente se encontra dentro de uma gaiola, como mostrado na figura 10:



(Adaptado de Telemetry Research, 2011)

Figura 10: Desenho esquemático do procedimento de estresse social por “rato intruso”. O animal analisado em questão é colocado em uma caixa na qual está alojado outro animal, mas sem contato direto, já que o segundo se encontra dentro de uma gaiola.

Tal procedimento se torna estressante ao animal, uma vez que, os ratos são territoriais e nessa situação poderiam ver, ouvir e sentir o cheiro do outro. Ao final do estresse, o animal seguiu por mais 30 minutos de registro para recuperação dos parâmetros cardiovasculares (basal final). Similarmente aos outros protocolos, os animais que receberam microinjeção de BMI no Experimento I (1º dia) receberam microinjeção de veículo no Experimento II (2º dia) e vice-versa.

3.7.4 –Influência da inibição química do DMH sobre as respostas causadas pela inibição química da BMA

Com o propósito de verificar se há uma influência do DMH nas respostas cardiovasculares geradas a partir da BMA, realizamos o seguinte protocolo experimental (figura 11):

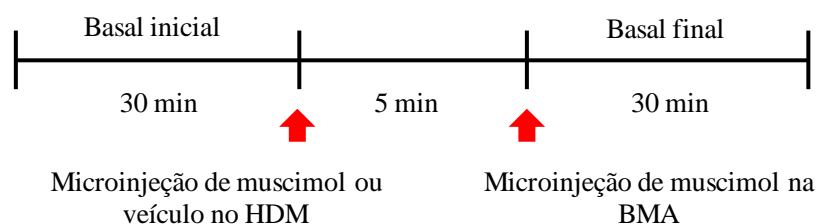


Figura 11: Escala temporal do protocolo experimental para avaliação da inibição química do DMH anteriormente a inibição química da BMA sobre os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC). Os animais foram submetidos à microinjeção de veículo (100nL) ou muscimol (100pmol/100nL) no DMH e à microinjeção de muscimol (100pmol/100nL) na BMA.

De maneira semelhante aos protocolos anteriores, no início do registro acompanhamos a estabilização dos valores basais (basal inicial) de PAM e FC dos animais durante aproximadamente 30 minutos. Em seguida, realizamos a microinjeção de muscimol ou veículo (Experimento I) no DMH, randomicamente. Após cinco minutos, microinjetamos muscimol na BMA e o registro se estendeu por mais 30 minutos (basal final). O animal que recebeu a microinjeção de muscimol no DMH durante o Experimento I (1º dia) recebeu a microinjeção de veículo no DMH durante o Experimento II (2º dia), e vice-versa, mas todos os animais receberam microinjeção de muscimol na BMA nos dois experimentos.

3.8 – Procedimentos histológicos

Para confirmação histológica dos locais de microinjeção, ao final dos procedimentos experimentais, injetou-se 100nL de corante *Comassie blue* (2%) nos sítios de injeção (BMA e/ou DMH). Anestesiaram-se os animais com o dobro da dose utilizada da solução ketamina + xilazina descrita anteriormente (item 3.2). Realizou-se então a toracotomia para exposição do coração e, mediante punção cardíaca, fez-se a perfusão com solução salina (0.9%) seguida da solução de paraformaldeído (4%). Após a retirada do cérebro, o mesmo foi fixado em solução de paraformaldeído (4%) por 48 horas, sendo posteriormente transferidos para uma solução de sacarose (20%), na qual permaneceu por 24 horas. Cortes coronais nas regiões de análise foram feitos com 50µm de espessura com o auxílio de um aparelho Criostato (Leica CM 1850, Alemanha). Tais cortes foram montados em lâminas histológicas previamente gelatinizadas, posteriormente corados com vermelho neutro (1%) e examinados sob microscopia óptica.

3.9 – Análises dos dados

Para a realização das análises de FC e PAM basais, calculamos as médias dos menores valores obtidos durante 5 minutos de cada período basal registrado de todos os animais que foram submetidos aos experimentos.

Nos protocolos de inibição química da BMA e NBMA (microinjeção de muscimol) realizamos as análises de FC e PAM a cada 30 segundos considerando os três minutos anteriores a microinjeção e os cinco minutos pós-microinjeção. Calculamos o delta de um minuto das respostas, a partir de três minutos após a microinjeção, em relação aos cinco minutos pré-microinjeção.

No protocolo de ativação química da BMA (microinjeção de BMI) seguido do estresse realizamos as análises de FC e PAM a cada três minutos considerando os três minutos anteriores ao estresse, os 15 minutos de estresse e os nove minutos pós-estresse. Foram utilizados três minutos (pico da resposta) em relação aos três minutos pré-estresse para os cálculos dos deltas.

Já no protocolo de inibição química do DMH seguida da inibição química da BMA (microinjeção de muscimol), também realizamos as análises de FC e PAM a cada 30 segundos considerando os três minutos anteriores a microinjeção na BMA e os cinco minutos pós-microinjeção. Calculamos o delta de um minuto das respostas, a partir de três minutos após a microinjeção na BMA, em relação aos cinco minutos pré-microinjeção.

3.10 – Análises estatísticas

Realizamos as análises estatísticas com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.00 (Graphpad Inc.). Utilizamos teste t de Student – pareado para análise intra-grupo das variáveis dependentes e análises de variância two way ANOVA (tempo como fator repetido) para o tratamento intra-grupo seguidas de pós-teste de Bonferroni. Estabelecemos o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos em Média \pm Erro Padrão da Média (Média \pm EPM).

4 – RESULTADOS

4.1 – Caracterização dos parâmetros fisiológicos

A média dos valores basais, de todos os grupos de animais, para PAM e FC não foram diferentes significativamente entre o veículo (PBS) e o tratamento (droga), de acordo com a tabela 1.

Tabela 1: Média dos parâmetros fisiológicos basais de FC e PA referente a todos os grupos experimentais

	Veículo BMA N=7	Muscimol BMA N=7	Veículo NBMA N=5	Muscimol NBMA N=5	Veículo BMA Bilat. N=6	BMI BMA Bilat. N=6	Veic DMH/ Mus BMA n=7	Musc DMH/ Mus BMA N=7
PAM (mmHg)	110±4	112±5	115±3	117±2	105±3	107±3	111±2	111±3
FC (bpm)	363±9	346±14	355±9	359±14	342±13	355±14	371±14	359±10
P valor	P valor (PAM) = 0,2706 P valor (FC) = 0,1249		P valor (PAM) = 0,3283 P valor (FC) = 0,7190		P valor (PAM) = 0,0691 P valor (FC) = 0,2247		P valor (PAM) = 0,8488 P valor (FC) = 0,1551	

Valores expressos em média ± EPM; *n*, número de animais por grupo, PAM (pressão arterial média) e FC (frequência cardíaca). Os dados estatísticos foram expressos como média ± erro padrão; N= número de ratos.

4.2 – Efeitos da inibição química da BMA

De maneira ilustrativa, a figura 12A representa os diferentes valores de PAM antes e após a microinjeção de muscimol ou veículo na BMA. Após aproximadamente três minutos da realização da microinjeção, observamos um aumento na resposta pressora após a injeção de muscimol quando comparado à injeção de veículo, sendo que sua amplitude máxima foi de 9,9±1,8 vs -1,7±0,7mmHg (p=0,0037; teste t de Student pareado) (figura 12B).

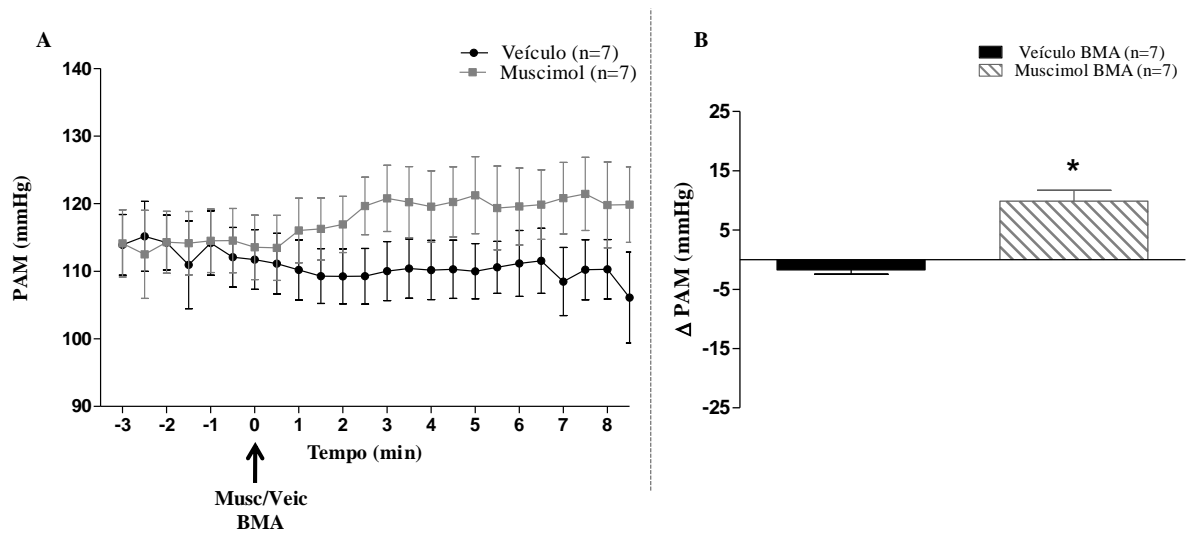


Figura 12: Efeito, na pressão arterial média (PAM), da microinjeção de muscimol na amígdala basomedial (BMA). (A) Valores de PAM, antes e após a microinjeção (seta) de muscimol - Musc (100pmol/100nL) ou veículo - Veic (100nL) na BMA em dias consecutivos. (B) Delta de um minuto da resposta pressora (a partir de três minutos após a microinjeção) em relação aos cinco minutos pré-microinjeção. *Diferença estatística entre o tratamento intra-grupo, teste t de Student pareado ($p < 0.05$). As barras representam média \pm erro padrão.

De maneira semelhante, a figura 13 representa os diferentes valores de FC antes e após a microinjeção de muscimol e veículo na BMA. Observamos que após três minutos da microinjeção de muscimol houve uma variação taquicárdica quando comparado a microinjeção de veículo, sendo que o aumento máximo foi de $83,9 \pm 10$ vs $-4,6 \pm 4,8$ mmHg; ($p = 0,0003$; teste t de Student pareado).

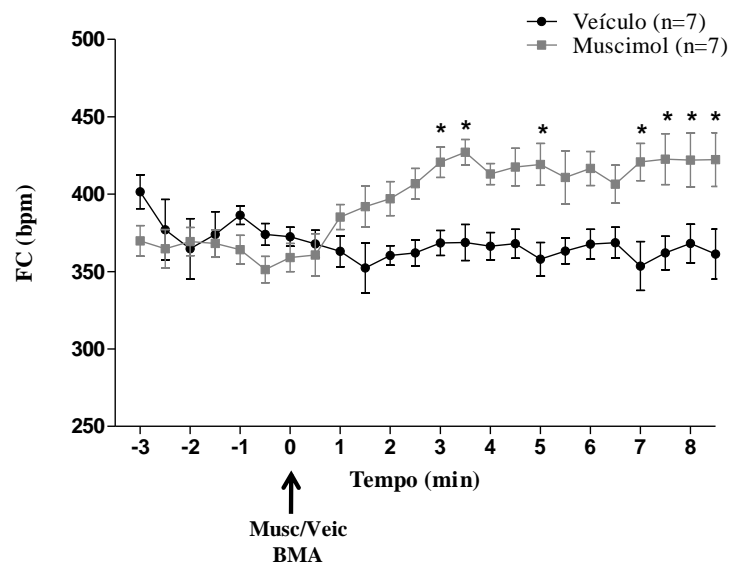


Figura 13: Efeito, na frequência cardíaca (FC), da microinjeção de muscimol na amígdala basomedial (BMA). Média dos valores de FC sobre o tempo (min) antes a após a microinjeção (seta) de muscimol - Musc (100pmol/100nL) ou veículo - Veic (100nL) na BMA. *Diferença estatística entre o tratamento intra-grupo na BMA por two way ANOVA para droga $F(1, 276) = 8.59, p < 0.05$, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0.05$).

A figura 14A e B exemplifica os resultados acima citados, ilustrando o registro original de um dos animais a partir das microinjeções de muscimol e veículo na BMA. Já os locais aproximados de injeção são representados na figura 14C, indicando que as microinjeções foram realizadas corretamente na região pré-estabelecida, a BMA.

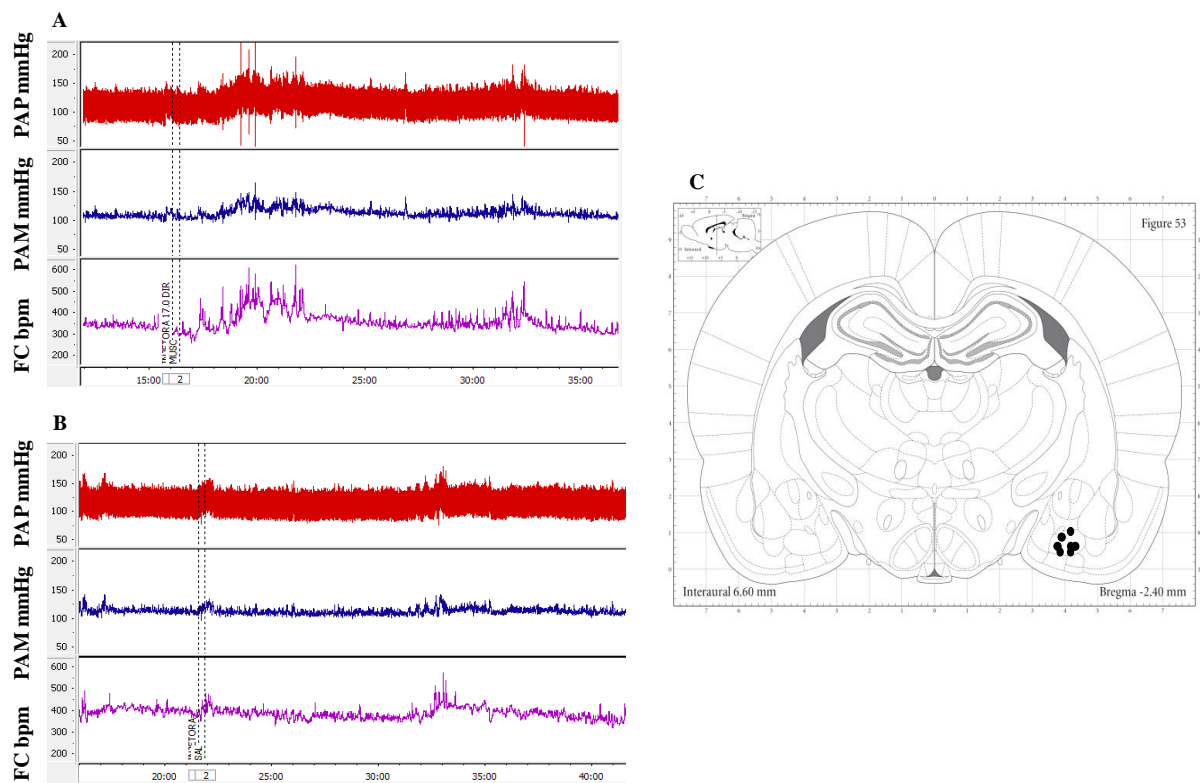


Figura 14: Microinjeções de muscimol e veículo na amígdala basomedial (BMA). (A) Registro da variação da resposta cardiovascular após três minutos à microinjeção (linha pontilhada) de muscimol (100pmol/100nL) na BMA. (B) Registro da resposta cardiovascular não alterada a partir da microinjeção (linha pontilhada) de veículo (100nL) na BMA. (C) Representação esquemática de corte coronal da BMA ilustrando os locais de microinjeção de veículo e muscimol nos animais (círculos pretos, n=7). Figura adaptada do mapa de Paxinos e Watson, 2008. FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média, PAP: pressão arterial pulsátil.

4.3 – Efeitos da inibição química de regiões próximas à BMA

Os diferentes valores de PAM antes a após a microinjeção de muscimol ou veículo em regiões próximas à BMA (NBMA), mas fora dela, são representados na figura 15A. Não observamos variações na PAM após a microinjeção de muscimol, resposta esta semelhante a da microinjeção de veículo, sendo os valores correspondentes ao tempo de variação máxima na PAM, tendo como referência o tempo de resposta do grupo de inibição da BMA (três minutos após a microinjeção), de $-1,1 \pm 1,7$ vs $-1,4 \pm 0,9$ mmHg; $p=0,8884$ (teste t de Student pareado) (figura 15B).

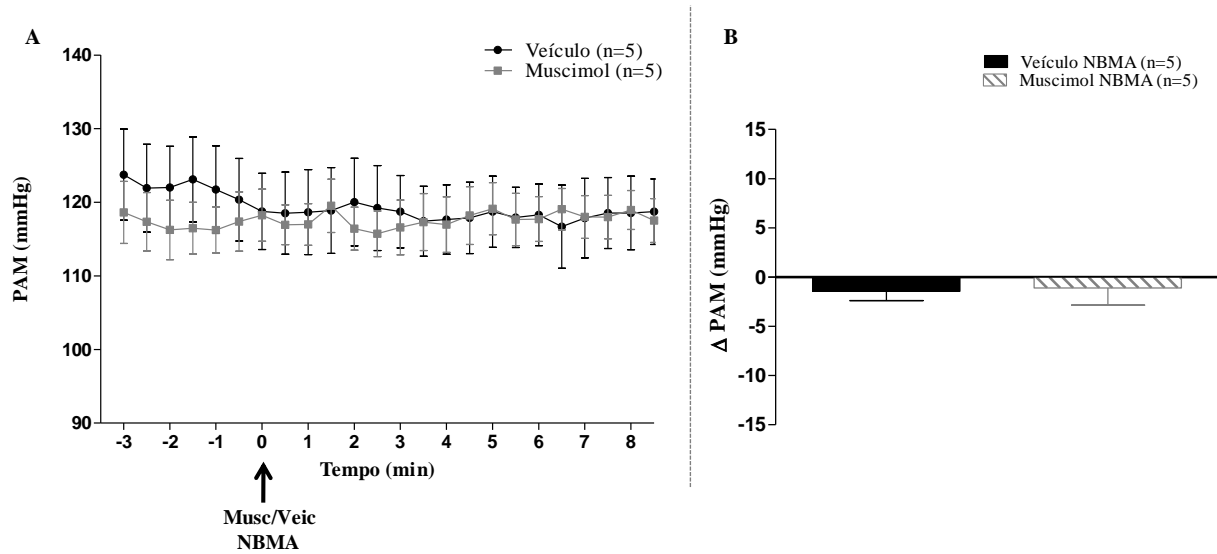


Figura 15: Efeito, na pressão arterial média (PAM), da microinjeção de muscimol em regiões próximas a amígdala basomedial (BMA), mas fora dela (NBMA). (A) Valores de PAM, antes e após a microinjeção (seta) de muscimol - Musc (100pmol/100nL) ou veículo - Veic (100nL) na NBMA em dias consecutivos. (B) Delta de um minuto da resposta pressora (a partir de três minutos após a microinjeção) em relação aos cinco minutos pré-microinjeção. *Diferença estatística entre do tratamento intra-grupo, teste t de Student pareado ($p < 0.05$). As barras representam média \pm erro padrão.

Da mesma forma, a figura 16A ilustra os perfis de FC antes e após a microinjeção de muscimol ou veículo em regiões próximas à BMA (NBMA), ou seja fora dela. Semelhante ao observado na PAM, não houve alterações na FC à microinjeção de muscimol, resposta esta semelhante à microinjeção de veículo, sendo os valores correspondentes ao tempo de variação máxima na FC tendo, também, como referência o tempo de resposta do grupo de inibição da BMA (três minutos após a microinjeção) de $-0,8 \pm 1,7$ vs $-5,3 \pm 4,4$ mmHg ($p = 0,4930$; teste t de Student pareado) (figura 16B).

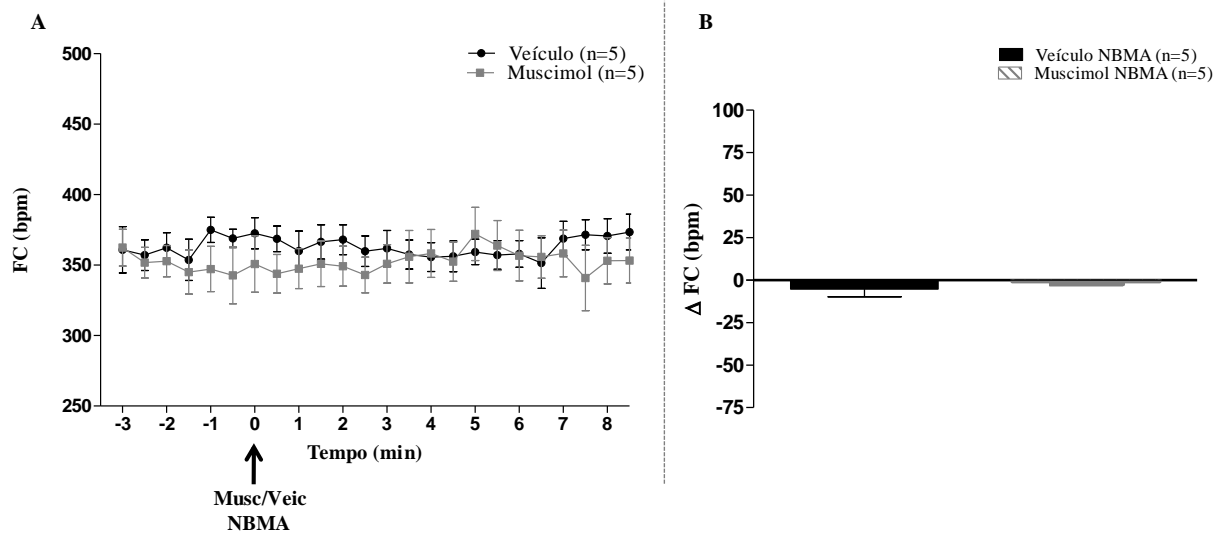


Figura 16: Efeito na frequência cardíaca (FC) da microinjeção de muscimol em regiões próximas a amígdala basomedial (BMA), mas fora dela (NBMA). (A) Valores de FC, antes e após a microinjeção (seta) de muscimol - Musc (100pmol/100nL) ou veículo - Veic (100nL) na NBMA em dias consecutivos. (B) Delta de um minuto da resposta (a partir de três minutos após a microinjeção) em relação aos cinco minutos pré-microinjeção. *Diferença estatística entre do tratamento intra-grupo, teste t de Student pareado ($p < 0.05$). As barras representam média \pm erro padrão.

Os resultados acima são ilustrados na figura 17A e B, exemplificando o registro original de um dos animais a partir das microinjeções de muscimol e veículo na NBMA. Já os locais aproximados de injeção são representados na figura 17C, indicando que as microinjeções foram próximas e fora da BMA.

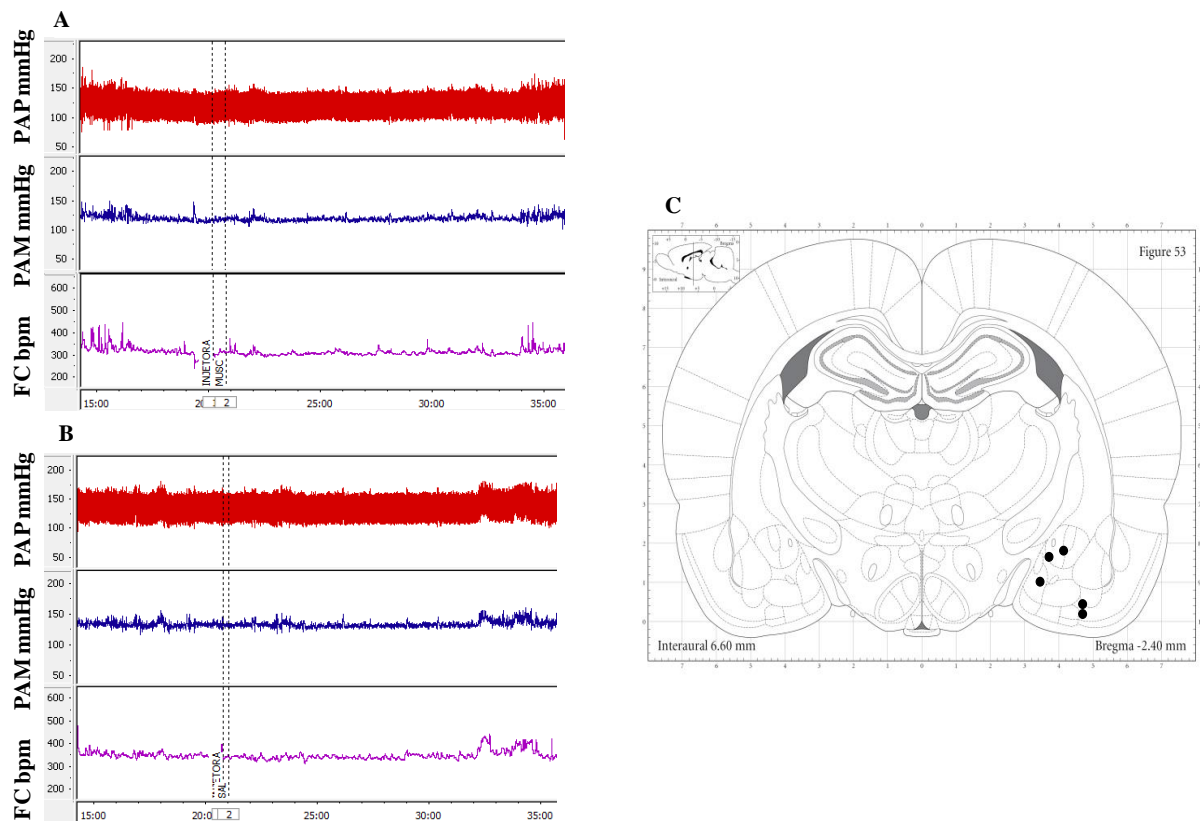


Figura 17: Microinjeções de muscimol e veículo em regiões próximas amígdala basomedial (BMA), mas fora dela (NBMA). (A) Registro das respostas cardiovasculares não alteradas a partir da microinjeção (linha pontilhada) de muscimol (100pmol/100nL) na NBMA, assim com à microinjeção de veículo (B). (C) Representação esquemática de corte coronal da NBMA ilustrando os locais de microinjeção de veículo e muscimol nos animais (círculos pretos, n=5). Figura adaptada do mapa de Paxinos e Watson, 2008. FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média, PAP: pressão arterial pulsátil.

4.4 – Efeitos da ativação química da BMA no controle cardiovascular de animais expostos a estresse social

De maneira ilustrativa, a figura 18A representa os diferentes valores de PAM antes, durante e após a exposição ao estresse social por rato intruso, nos animais pré-tratados com BMI ou veículo na BMA bilateralmente. Observamos que a microinjeção de BMI reduziu significativamente os aumentos de PAM, provocados pelo estresse social por rato intruso, em relação à microinjeção de veículo, sendo o valor máximo de cada resposta de $4,3 \pm 0,8$ vs $18,5 \pm 4$ mmHg ($p=0,0211$; teste t de Student pareado) (figura 18B).

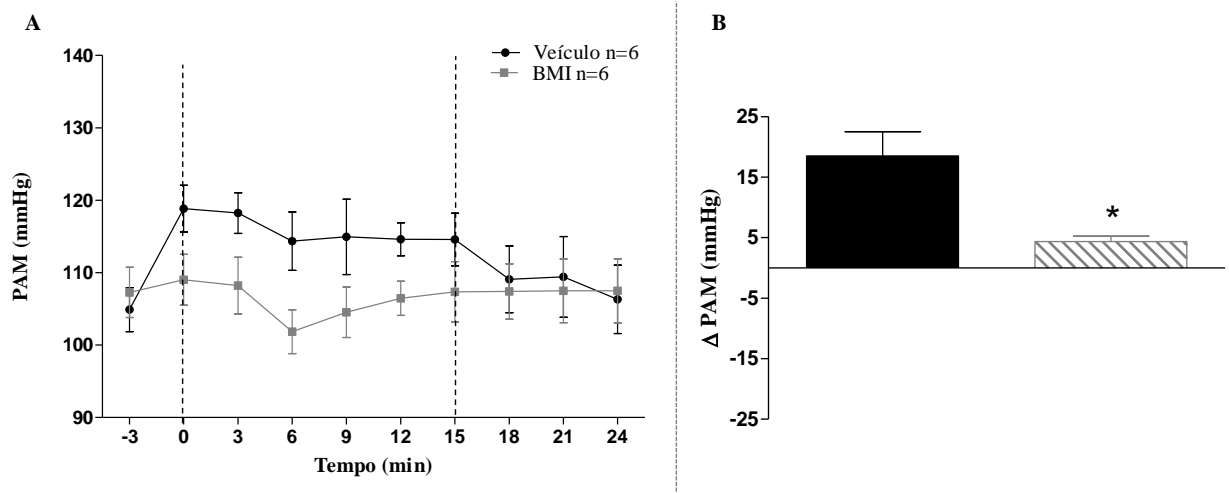


Figura 18: Efeito, na pressão arterial média (PAM), da microinjeção bilateral de *bicuculine metiodide* (BMI) amígdala basomedial (BMA). (A) Valores de PAM, antes, durante (entre as linhas tracejadas) e após o estresse (15 minutos) em animais pré-tratados com a microinjeção de BMI (10pmol/100nL) ou veículo (100nL) na BMA em dias consecutivos. (B) Delta do pico (três minutos) da resposta pressora em relação aos três minutos pré-microinjeção. *Diferença estatística entre do tratamento intra-grupo, teste t de Student pareado ($p < 0.05$). As barras representam média \pm erro padrão.

De maneira semelhante, a figura 19 representa os diferentes valores de FC antes, durante e após a exposição ao estresse social por rato intruso, nos animais pré-tratados com BMI ou veículo na BMA bilateralmente. Observamos que a microinjeção de BMI reduziu significativamente os aumentos de FC provocados pelo estresse agudo, em relação à microinjeção de veículo, sendo o valor máximo de cada resposta de $22,4 \pm 14$ vs $116,4 \pm 10$ bpm ($p = 0,0117$; teste t de Student pareado).

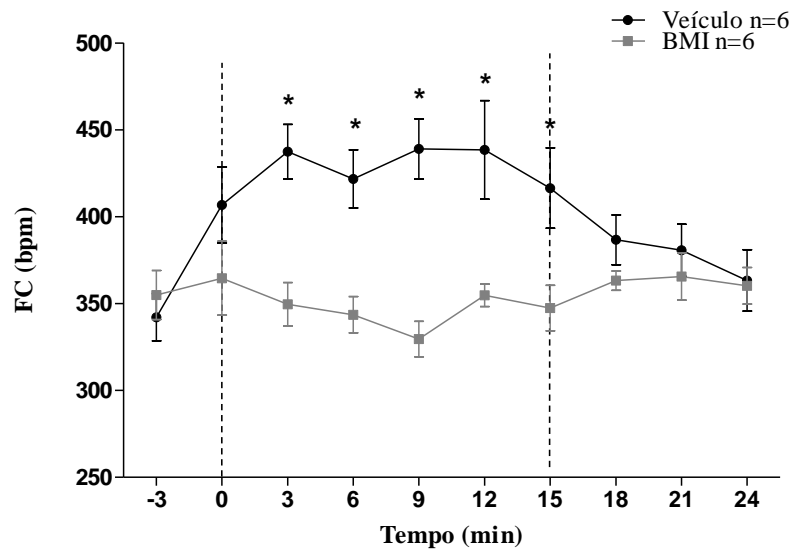


Figura 19: Efeito, na frequência cardíaca (FC), da microinjeção bilateral de *bicuculine metiodide* (BMI) amígdala basomedial (BMA). Média dos valores de FC sobre o tempo (min) antes, durante (entre as linhas tracejadas) e após o estresse (15 minutos) em animais pré-tratados com a microinjeção de BMI (10pmol/100nL) ou veículo (100nL) na BMA em dias consecutivos. *Diferença estatística entre o tratamento intra-grupo na BMA por two way ANOVA para droga $F(1, 72) = 12.02$, $p < 0.05$; com pós-teste de Bonferroni ($p < 0.05$).

Os resultados acima são ilustrados na figura 20A e B, exemplificando o registro original de um dos animais a partir das microinjeções de BMI e veículo na BMA bilateralmente anteriormente a exposição dos animais ao estresse social por rato intruso. Já os locais aproximados de injeção são representados na figura 20C, indicando que as microinjeções foram realizadas corretamente na BMA.

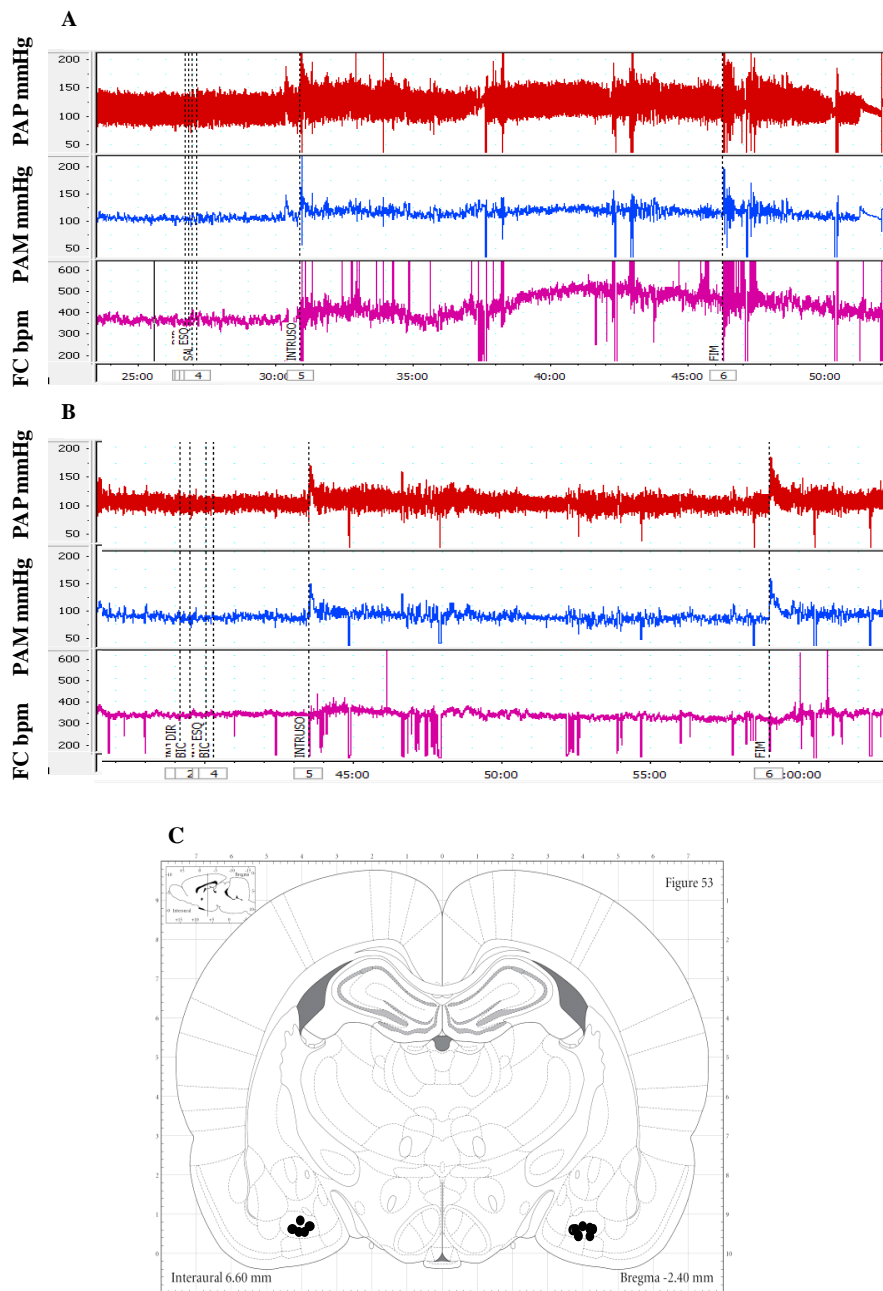


Figura 20: Microinjeções de *bicuculine metiodide* (BMI) e veículo bilateralmente na amígdala basomedial (BMA). (A) Registro da variação da resposta cardiovascular observada após a microinjeção de veículo (100nL) na BMA anteriormente ao estresse, durante o estresse e após o estresse. (B) Registro da variação da resposta cardiovascular observada após a microinjeção de BMI (10pmol/100nL) na BMA anteriormente ao estresse, durante o estresse e após o estresse. (C) Representação esquemática de corte coronal da BMA ilustrando os locais de microinjeção de veículo e BMI bilateralmente nos animais (círculos pretos, n=7). Figura adaptada do mapa de Paxinos e Watson, 2008. FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média, PAP: pressão arterial pulsátil.

4.5 – Influência da inibição química do DMH sobre a resposta cardiovascular produzida pela inibição da BMA

Do mesmo modo, representamos os diferentes valores de PAM (figura 21) provocados pela microinjeção de muscimol na BMA, sendo essa realizada cinco minutos após a microinjeção bilateral de muscimol ou veículo no DMH. Ao inibirmos o DMH anteriormente a microinjeção de muscimol na BMA, a resposta pressora evocada a partir da inibição da BMA foi suprimida, o que não foi observado na microinjeção de veículo no DMH. Os valores correspondentes ao tempo de variação máxima na PAM tendo, mais uma vez, como referência o tempo de resposta do grupo de inibição da BMA (três minutos após a microinjeção) foram de $-4,5 \pm 0,6$ vs $5,3 \pm 1,0$ mmHg ($p=0,0006$; teste t de Student pareado).

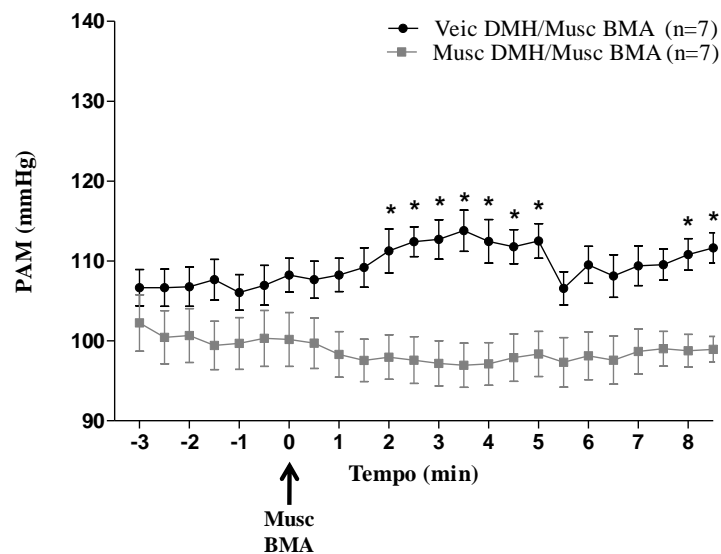


Figura 21: Efeito, na pressão arterial média (PAM), da microinjeção bilateral de muscimol no hipotálamo dorsomedial (DMH) anteriormente a inibição da amígdala basomedial (BMA). Média dos valores de PAM sobre o tempo (min) antes a após a microinjeção (seta) de muscimol - Musc (100pmol/100nL) na BMA, esta realizada cinco minutos após a microinjeção de muscimol - Musc (100pmol/100nL) ou veículo - Veic (100nL) no DMH. *Diferença estatística entre o tratamento intra-grupo no DMH por two way ANOVA para droga $F(1, 230) = 9.94$, $p < 0.05$; com pós-teste de Bonferroni ($p < 0.05$).

Os diferentes valores de FC evocados a partir da microinjeção de muscimol na BMA, sendo essa realizada cinco minutos após a microinjeção bilateral de muscimol ou veículo no DMH, são ilustrados na figura 22. Semelhante a resposta pressora, ao inibir o DMH anteriormente a microinjeção de muscimol na BMA, a resposta taquicárdica provocada pela inibição da BMA foi suprimida, o que não foi observado na microinjeção de veículo no DMH também anteriormente a inibição da BMA. Os valores correspondentes ao tempo de variação máxima na FC tendo, novamente, como referência o tempo de resposta do grupo de inibição da BMA (três minutos após a microinjeção) foram de $13,2 \pm 6,4$ vs $49,2 \pm 7,2$ mmHg; ($p=0,0005$; teste t de Student pareado).

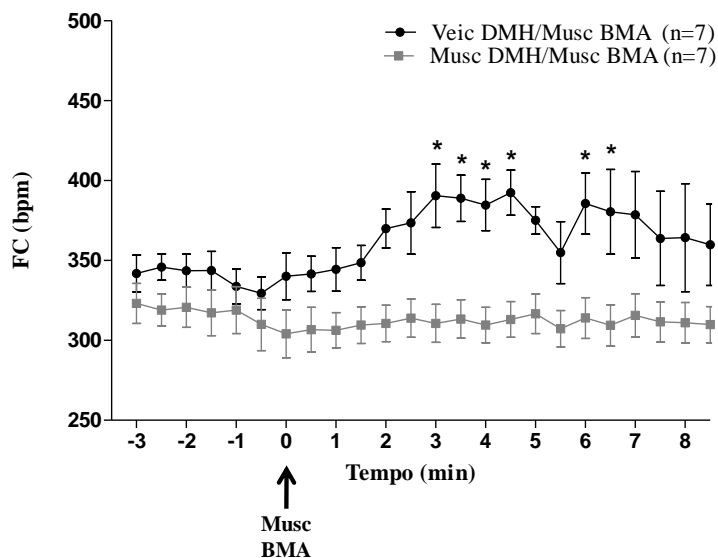


Figura 22: Efeito, na frequência cardíaca (FC), da microinjeção bilateral de muscimol no hipotálamo dorsomedial (DMH) anteriormente a inibição da amígdala basomedial (BMA). Média dos valores de FC sobre o tempo (min) antes a após a microinjeção (seta) de muscimol (100pmol/100nL) na BMA, esta realizada cinco minutos após a microinjeção de muscimol - Musc (100pmol/100nL) ou Veículo - Veic (100nL) no DMH. *Diferença estatística entre o tratamento intra-grupo no DMH por two way ANOVA para droga $F(1, 230) = 8.49$, $p < 0.05$; com pós-teste de Bonferroni ($p < 0.05$).

A figura 23A e B exemplifica os resultados acima citados, ilustrando o registro original de um dos animais a partir das microinjeções bilaterais de muscimol ou veículo no DMH seguidas da microinjeção de muscimol na BMA. Já os locais aproximados de injeção

são representados na figura 23C e D, indicando que as microinjeções foram realizadas corretamente nas regiões pré-estabelecidas, a BMA e o DMH bilateral.

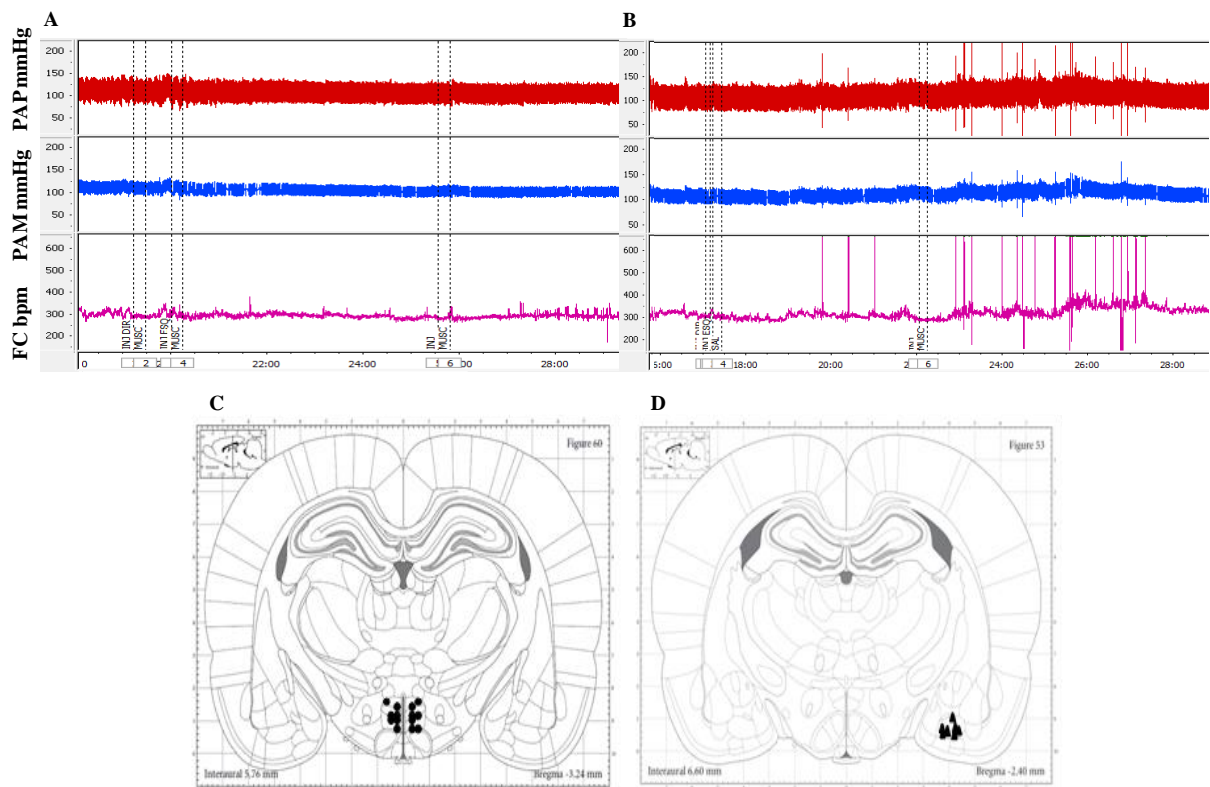


Figura 23: Microinjeção de muscimol ou salina no hipotálamo dorsomedial (DMH) anteriormente a microinjeção de muscimol na amígdala basomedial (BMA). (A) Registro das respostas cardiovasculares não alteradas a partir da microinjeção (linha pontilhada) de muscimol (100pmol/100nL) na BMA cinco minutos após a microinjeção da muscimol (100pmol/100nL) no DMH. (B) Registro da variação cardiovascular três minutos após a microinjeção de muscimol (100pmol/100nL) na BMA cinco minutos após a microinjeção de veículo (100pmol/100nL) no DMH. (C) Representação esquemática de corte coronal do DMH ilustrando os locais de microinjeção bilateral de salina e muscimol nos animais (círculos pretos, n=7). (D) Representação esquemática de corte coronal da BMA ilustrando os locais de microinjeção de salina e muscimol nos animais (triângulos pretos, n=7). Figura adaptada do mapa de Paxinos e Watson, 2008. FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média, PAP: pressão arterial pulsátil.

Após a realização perfusão e secções coronais dos cérebros foi possível confirmar os locais de microinjeção nas regiões de estudo. A figura abaixo ilustra exemplos dos locais típicos de microinjeção na BMA, DMH bilateral e BMA bilateral respectivamente (figura 24).

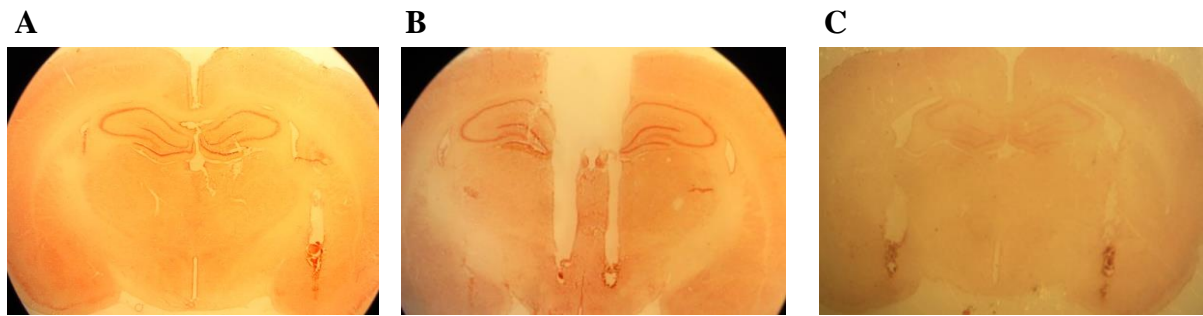


Figura 24: Fotomicrografia representativa dos locais de microinjeção na amígdala basomedial unilateral, hipotálamo dorsomedial bilateral e amígdala basomedial bilateral. A: sítio de microinjeção na BMA unilateral; B: sítio de microinjeção no DMH bilateral; C: sítio de microinjeção na BMA bilateral.

5 – DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstramos que a inibição química da BMA pela microinjeção do agonista GABAA, muscimol, altera os parâmetros cardiovasculares, aumentando PA e FC. Observamos também que ao ativarmos quimicamente esta região, pela microinjeção bilateral do antagonista GABAA, *bicuculline methiodide*, os aumentos de PA e FC provocados pelo estresse social por rato intruso foram bloqueados. A partir disso podemos sugerir que a BMA está sob constante ativação. A resposta produzida pela inibição de tal região pode ser abolida pela inibição química do DMH. Sabendo-se que o DMH é tonicamente inibido (Dimicco e cols., 2002), este resultado nos permite inferir que a atividade neuronal do DMH está sobre o controle da BMA. Portanto, nossos dados sugerem que a BMA está constantemente ativada, participando integralmente do controle cardiovascular durante situações de estresse, exercendo, direta ou indiretamente, influência na inibição tônica GABAérgica do DMH nestas condições.

Após inibirmos os neurônios na região da BMA, observamos que tal inibição induziu um aumento expressivo na PA e FC. Estudos relacionados a outros sub-núcleos amigdalóides mostraram que tal resposta foi observada não pela inibição, mas sim pela ativação, química ou elétrica, destas regiões. Por exemplo, a ativação química da BLA, realizada pela microinjeção de *bicuculline methiodide* e a estimulação elétrica dos neurônios do núcleo CeA, resultam em aumento de PA e FC, respostas essas também obtidas em situações de estresse agudo, como por exemplo, o estresse por jato de ar (Soltis e cols., 1998; Sanders e cols., 1994; de Menezes e cols., 2006). Tais estudos corroboram aos nossos resultados de que ao inibir os neurônios de regiões próximas a BMA a resposta pressora e taquicárdica obtida pela inibição da BMA não é observada, demonstrando que tal resposta é sítio específica. Além disso, um estudo, utilizando o traçador anterógrado *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin*, indicou que a BMA recebe projeções glutamatérgicas oriundas da LA (Pitkanen e cols., 1997). Esse estudo aliado aos nossos resultados, da ocorrência de aumento na PA e FC após inibição da BMA, reforça nossa hipótese que tal região, em condições normais, está ativada, podendo participar da inibição tônica de outro núcleo encefálico envolvido no controle cardiovascular.

Em nosso entendimento, este é o primeiro estudo descrevendo os efeitos da ativação de receptores GABAA em neurônios da BMA em ratos conscientes. No entanto, é de

conhecimento que, em ratos anestesiados, *bicuculline methiodide* microinjetada nessa região provocou um aumento dose-dependente na PA e FC e que a microinjeção de muscimol inibiu tais respostas pressora e taquicárdica (Yoshida e cols., 2002). Esta falta de parcimônia existente entre alguns estudos na literatura pode ser devido a diferenças nas espécies animais utilizadas, parâmetros ou locais de estimulação e o estado dos animais, principalmente se eles estão ou não conscientes. Sem dúvida, o uso de anestésicos é extremamente importante em experimentos voltados para a tentativa de elucidar os mecanismos centrais envolvidos na regulação cardiovascular. Por outro lado, é necessário vir a enfrentar o fato de que as funções cardiovasculares e autonômicas são significativamente alteradas por anestésicos (Menezes & Fontes, 2007). Chiou e colaboradores demonstraram que a resposta cardiovascular produzida pela estimulação de alguns sítios da amígdala foi alterada por vários anestésicos (Chiou e cols., 2009). De forma semelhante, estudos demonstraram que a ativação dos receptores GABA_A na RVLM, pela microinjeção de muscimol, em ratos anestesiados resultou em uma grande queda na PA e FC (Fontes e cols., 2001; Schreihofe e cols., 2005). Já a microinjeção bilateral de muscimol na RVLM em ratos conscientes produziu uma queda na PA acompanhada por um aumento significativo na FC (Menezes & Fontes, 2007). Portanto, os resultados obtidos em animais anestesiados devem ser, sempre que viáveis, reavaliados em animais conscientes.

Tendo em vista que a inibição dos neurônios da BMA provoca aumento nos parâmetros cardiovasculares, e que tal região é ativada em situações de ansiedade (de Andrade e cols., 2012; Silveira e cols., 2001, nós hipotetizamos que a BMA poderia influir nas respostas fisiológicas observadas durante situações de estresse emocional. Para verificar tal hipótese, nós testamos os efeitos da ativação da BMA sob as alterações cardiovasculares observadas durante o estresse social. Observamos que tal ativação foi capaz de inibir as mudanças cardiovasculares de aumento de PA e FC evocadas pelo estresse social por rato intruso. De maneira oposta, a inibição e não a ativação dos neurônios da CeA, por lesão eletrolítica, atenuaram significativamente a resposta pressora ao estresse agudo (choque nas patas) em ratos espontaneamente hipertensos (Sanders e cols., 1994). De maneira semelhante, Kubbo e colaboradores, em 2004, demonstraram que a inibição, por um agonista de receptores GABA_A, na MeA induziu uma diminuição da pressão arterial durante exposição a estresse agudo por restrição. Mais uma vez nossos resultados sugerem que a BMA está sob constante ativação, participando efetivamente do controle cardiovascular, podendo fazer parte

do tônus inibitório de outra região encefálica que atuaria conjuntamente no controle do estresse. Tal controle modula reações exacerbadas a situações adversas, evitando, por exemplo, respostas de pânico.

O nosso modelo de estresse emocional é tecnicamente simples e econômico, mas os aumentos cardiovasculares induzidos por tal procedimento são substanciais e confiáveis. Considerando-se a vida moderna, foi constatado que, dentre os estressores mais comuns no ser humano, estão aqueles de origem psicológica ou social o que demonstra uma “vantagem” na escolha do uso de conflito social entre membros da mesma espécie como gerador de estresse sobre aqueles modelos que utilizam estímulos físicos aversivos, como choque nas patas, contenção, privação hídrica ou exposição ao frio (Bjorkqvist, 2001). Numerosos estudos têm mostrado que a perda temporária do controle social (derrota social) é um importante fator que pode levar as alterações psicopatológicas (Fuchs & Flugge, 2002).

Com o intuito de verificar a hipótese de que a BMA, enquanto ativa, enviaria projeções inibitórias para outra região encefálica de papel importante na integração das respostas a estímulos emocionais, testamos uma possível via entre a BMA e o DMH. Observamos que o aumento da resposta pressora e taquicárdica obtido pela inibição da BMA foi bloqueado quando tal inibição foi precedida da inibição do DMH. Há um grande número de evidências da participação de neurônios da região do DMH na integração das respostas fisiológicas cardiovasculares (Stotz-Potter, Willis *et al.*, 1996), neuroendócrinas (Bailey e Dimicco, 2001) e comportamentais presentes durante o estresse emocional em ratos (Dimicco, Samuels *et al.*, 2002). Sabe-se que tal região está sob inibição tônica GABAérgica, isso porque estudos mostraram que a estimulação do DMH através de microinjeção de antagonista do receptor GABAA, como a *bicuculine metiodide*, resulta em alterações cardiovasculares e comportamentais similares as observadas durante o estresse: aumento significativo da FC, aumento da atividade simpática do nervo renal e cardíaco e elevação da PA (Shekhar e Dimicco, 1987; Shekhar, Hingtgen *et al.*, 1987; De Menezes, Zaretsky *et al.*, 2006). Já a microinjeção do inibidor muscimol (agonista do receptor GABAA) nesta região reduz as respostas cardiovasculares (taquicardia e hipertensão) produzidas durante o estresse (Soltis e Dimicco, 1992; Stotz-Potter, Morin *et al.*, 1996; Dimicco, Samuels *et al.*, 2002; Abreu e cols., 2014). Aliados aos nossos resultados, tais informações nos levam a inferir que a BMA, em condições normais, está sob ativação tônica, enviando projeções inibitórias, direta ou indiretamente, ao DMH. A relação entre as duas regiões seria crucial para o controle

cardiovascular, uma vez que já se sabe de conexões existentes entre mais de uma região encefálica no controle das respostas a situações de estresse, estando o DMH envolvido na maioria delas.

Partindo do princípio que nosso enfoque são as regiões envolvidas no controle cardiovascular, sabe-se que, a microinjeção de um antagonista glutamatérgico na l/dPAG reduz o aumento na PA e FC provocados pelo bloqueio GABAérgico do DMH em ratos conscientes, sendo possível considerar uma dependência excitatória da PAG nos efeitos cardiovasculares evocados a partir do DMH (de Menezes e cols., 2009). Além disso, um estudo combinando traçador retrógrado e imunohistoquímica/hibridização *in situ*, identificou que o DMH recebe projeções inibitórias GABAérgicas a partir da área preóptica medial (mPOA), núcleo do leito da estria terminal (BST), CeA e MeA (Myers e cols., 2013). Apesar de serem escassos na literatura os estudos em relação à BMA, Myers e colaboradores, em 2013, identificaram que o BST recebe projeções excitatórias a partir da BMA. Adicionalmente, foi identificado que a BMA recebe projeções da LA e envia projeções para a CeA, ambas do tipo excitatórias (Pitkanen e cols., 1997).

Sendo assim, considerando-se que o DMH recebe projeções inibitórias do BST e da CeA, que a BMA envia projeções excitatórias para a CeA e BST, e recebe projeções excitatórias da LA, sugerimos a existência de duas vias. Ambas as situações aconteceriam em condições normais, ou seja, a BMA ativada participaria indiretamente da manutenção do tônus inibitório no DMH contribuindo para o controle da PA e FC, o que é crucial para o controle de respostas exacerbadas a situações do tipo estresse e ansiedade, evitando, por exemplo, respostas de pânico. Na primeira delas, a BMA estaria sob influência excitatória da LA, enviando projeções glutamatérgicas para o BST, que por sua vez enviaria projeções inibitórias ao DMH. Na segunda, a BMA também estaria sob influência excitatória da LA, enviando projeções glutamatérgicas para a CeA, que então enviaria projeções inibitórias ao DMH (figura 24A e B).

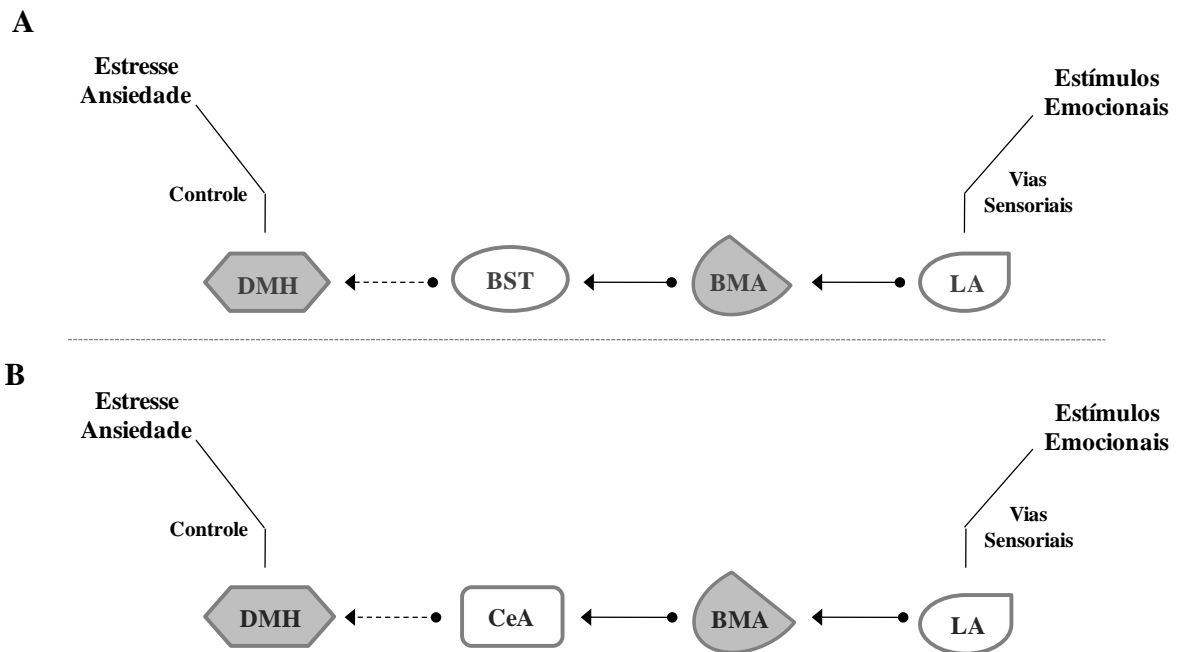


Figura 25: Diagrama esquemático indicando as possíveis vias existentes entre a amígdala basomedial e o hipotálamo dorsomedial. As setas contínuas representam projeções excitatórias glutamatérgicas e as setas tracajadas representam projeções inibitórias gabaérgicas. LA: amígdala lateral; BMA: amígdala basomedial; BST: núcleo do leito da estria terminal; CeA: amígdala central; DMH: hipotálamo dorsomedial.

6 – CONCLUSÃO

Estes resultados indicam que a inibição química da BMA provoca alterações cardiovasculares, aumentando PAM e FC, e que sua ativação química é capaz de bloquear as respostas de aumento de PAM e FC provocados por estresse social por rato intruso. Adicionalmente, a resposta de inibição da BMA é abolida pela anterior inibição química do DMH. Tais dados sugerem que a BMA está constantemente ativa, exercendo influência na inibição tônica do DMH, participando efetivamente do controle cardiovascular durante situações de estresse.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHEID G.F., DE OLMOS J.S., BELTRAMINO C.A. (1995) Amygdala and extended amygdala. In: PAXINOS G. The Rat Nervous System. San Diego: Academic Press, 495-498.
- AMIRAGOVA M.G. (1985) Neurophysiological analysis of the development of endocrine and hypertensive reactions in prolonged emotional stress. *Brain Res.* **344**, 303-315.
- ANGLADA-FIGUEROA D. & QUIRK G.J. (2005) Lesions of the basal amygdala block expression of conditioned fear but not extinction. *J.Neurosci.* **25**, 9680-9685.
- BAILEY T.W. & DIMICCO J.A. (2001) Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **280**, R8-15.
- BERNARDIS L.L. & BELLINGER L.L. (1998) The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **218**, 284-306.
- BJORKQVIST K. (2001) Social defeat as a stressor in humans. *Physiol Behav.* **73**, 435-442.
- BLANCHARD R.J. & BLANCHARD D.C. (1989) Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* **13 Suppl**, S3-14.
- CHIOU R.J., KUO C.C., LIANG K.C. & YEN C.T. (2009) State-dependent amygdala stimulation-induced cardiovascular effects in rats. *Chin J.Physiol* **52**, 432-440.
- CHROUSOS G.P. (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nat.Rev.Endocrinol.* **5**, 374-381.
- DE ANDRADE J.S., ABRAO R.O., CESPEDES I.C., GARCIA M.C., NASCIMENTO J.O., SPADARI-BRATFISCH R.C., MELO L.L., DA SILVA R.C. & VIANA M.B. (2012) Acute restraint differently alters defensive responses and fos immunoreactivity in the rat brain. *Behav.Brain Res.* **232**, 20-29.
- DE MENEZES R.C., ZARETSKY D.V., FONTES M.A. & DIMICCO J.A. (2006) Microinjection of muscimol into caudal periaqueductal gray lowers body temperature and attenuates increases in temperature and activity evoked from the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res.* **1092**, 129-137.
- DE MENEZES R.C., ZARETSKY D.V., FONTES M.A. & DIMICCO J.A. (2009) Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. *J.Physiol* **587**, 1201-1215.
- DE MENEZES R.C., ZARETSKY D.V., SARKAR S., FONTES M.A. & DIMICCO J.A. (2008) Microinjection of muscimol into the periaqueductal gray suppresses

- cardiovascular and neuroendocrine response to air jet stress in conscious rats. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **295**, R881-R890
- de OLMOS J., BELTRAMINO C.A., ALHEID G.F. (2004) Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. In: PAXINOS G. *The Rat Nervous System*, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 509-603
- DIMICCO J.A., SAMUELS B.C., ZARETSKAIA M.V. & ZARETSKY D.V. (2002a) The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **71**, 469-480.
- DIMICCO J.A., SAMUELS B.C., ZARETSKAIA M.V. & ZARETSKY D.V. (2002b) The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **71**, 469-480.
- DIMICCO J.A., SARKAR S., ZARETSKAIA M.V. & ZARETSKY D.V. (2006) Stress-induced cardiac stimulation and fever: common hypothalamic origins and brainstem mechanisms. *Auton.Neurosci.* **126-127**, 106-119.
- ERLICH J.C., BUSH D.E. & LEDOUX J.E. (2012) The role of the lateral amygdala in the retrieval and maintenance of fear-memories formed by repeated probabilistic reinforcement. *Front Behav.Neurosci.* **6**, 16.
- FRANCI C.R. (2005) Estresse: processos adaptativos e não adaptativos. In *Neuroendocrinologia básica e aplicada*. Antunes - Rodrigues J, Moreira AC, Elias LLK, Castro M. *Editora Guanabara Kooggan*, RJ. 210-225.
- FOLKOW B. (1982) Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev.* **62**, 347-504.
- FONTES M.A., TAGAWA T., POLSON J.W., CAVANAGH S.J. & DAMPNEY R.A. (2001) Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **280**, H2891-H2901.
- FONTES M.A.P., MENEZES R.C.A., VILLELA D.C. & SILVA JR L.G. (2006) O hipotálamo dorsomedial e a organização da resposta cardiovascular ao estresse emocional: Uma perspectiva funcional. *Medicina Ribeirão Preto* **39**, 13-20.
- FONTES M.A., XAVIER C.H., DE MENEZES R.C. & DIMICCO J.A. (2011) The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience* **184**, 64-74.
- GETTY R.G. (1986) Sisson/Grossman *Anatomia dos animais domésticos* (5ª edição). WB Saunders RJ: Editora Guanabara Kooggan.
- FUCHS E. & FLUGGE G. (2002) Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **73**, 247-258.

- KLUPER H. & BUCY P.C. (1997) Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. 1939. *J.Neuropsychiatry Clin.Neurosci.* **9**, 606-620.
- KNAPSKA E., RADWANSKA K., WERKA T. & KACZMAREK L. (2007) Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiol Rev.* **87**, 1113-1173.
- KNUEPFER M.M., EISMANN A., SCHUTZE I., STUMPF H., STOCK G. (1995) Responses of single neurons in amygdala to exteroceptive stimuli in conscious cats. *Annual Journal Physiology.* 286, 666-676
- KOOLHAAS J.M., DE BOER S.F., DE RUTTER A.J., MEERLO P. & SGOIFO A. (1997) Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand.Suppl* **640**, 69-72.
- KREBS J.R., DAVIES N.B. (1996) Introdução à ecologia comportamental. São Paulo: Atheneu.
- KUBO T., OKATANI H., NISHIGORI Y., HAGIWARA Y., FUKUMORI R. & GOSHIMA Y. (2004) Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats. *Neurosci.Lett.* **354**, 84-86.
- LEDOUX J.E. (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu.Rev.Neurosci.* **23**, 155-184.
- LOVALLO W.R. & GERIN W. (2003) Psychophysiological reactivity: mechanisms and pathways to cardiovascular disease. *Psychosom.Med.* **65**, 36-45.
- MARTINEZ M., PHILLIPS P.J. & HERBERT J. (1998) Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. *Eur.J.Neurosci.* **10**, 20-33.
- MAYOROV D.N. (2011) Brain angiotensin AT1 receptors as specific regulators of cardiovascular reactivity to acute psychoemotional stress. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **38**, 126-135.
- MCDONALD A.J. (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog.Neurobiol.* **55**, 257-332.
- MENEZES R.C. & FONTES M.A. (2007) Cardiovascular effects produced by activation of GABA receptors in the rostral ventrolateral medulla of conscious rats. *Neuroscience* **144**, 336-343.
- MOHAMMED M., OOTSUKA Y. & BLESSING W.W. (2014) Brown adipose tissue thermogenesis contributes to emotional hyperthermia in a resident rat suddenly confronted with an intruder rat. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*
- MOTTA S.C., GOTO M., GOUVEIA F.V., BALDO M.V., CANTERAS N.S. & SWANSON L.W. (2009) Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**, 4870-4875.

- MYERS B., MARK D.C., KASCKOW J., CULLINAN W.E. & HERMAN J.P. (2013) Central stress-integrative circuits: forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Struct.Funct.*
- NEWMAN S.W. (1999) The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **877**, 242-257.
- OJEDE S.R., MAC CONN S.M. (2000) The anterior pituitary and hypothalamus. In: J.E. Griffin & S.R. Ojede, *Textbook of endocrine physiology* (4th edition), 128-142. NY Oxford University press Inc.
- OOTSUKA Y., BLESSING W.W. & NALIVAICO E. (2008) Selective blockade of 5-HT_{2A} receptors attenuates the increased temperature response in brown adipose tissue to restraint stress in rats. *Stress.* **11**, 125-133.
- PACAK K. & PALKOVITS M. (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr.Rev.* **22**, 502-548.
- PAXINOS G. & WATSON G. (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Amsterdam: Academic Press
- PETROVICH G.D., RISOLD P.Y. & SWANSON L.W. (1996) Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J.Comp Neurol.* **374**, 387-420.
- PITKANEN A., SAVANDER V. & LEDOUX J.E. (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.* **20**, 517-523.
- RASIA-FILHO A.A., LONDERO R.G. & ACHAVAL M. (2000) Functional activities of the amygdala: an overview. *J.Psychiatry Neurosci.* **25**, 14-23.
- SAH P., FABER E.S., LOPEZ DE A.M. & POWER J. (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev.* **83**, 803-834.
- SALOME N., NGAMPAMUAN S. & NALIVAICO E. (2007) Intra-amygdala injection of GABA_A agonist, muscimol, reduces tachycardia and modifies cardiac sympatho-vagal balance during restraint stress in rats. *Neuroscience* **148**, 335-341.
- SANDERS S.K. & SHEKHAR A. (1991) Blockade of GABA_A receptors in the region of the anterior basolateral amygdala of rats elicits increases in heart rate and blood pressure. *Brain Res.* **567**, 101-110.
- SEYLE H. (1936) A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature.* **138**, 32.
- SEYLE H. (1973) Homeostasis and heterostasis. *Perspectives in Biology and Medicine*, **16**, 1-5.

- SCHILLER D. (2011) Affective neuroscience: tracing the trace of fear. *Curr.Biol.* **21**, R695-R696
- SCHREIHOFFER A.M., ITO S. & SVED A.F. (2005) Brain stem control of arterial pressure in chronic arterial baroreceptor-denervated rats. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **289**, R1746-R1755
- SHEKHAR A., SAJDYK T.J., GEHLERT D.R. & RAINNIE D.G. (2003) The amygdala, panic disorder, and cardiovascular responses. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **985**, 308-325.
- SILVEIRA M.C., ZANGROSSI H., DE B., V, SILVEIRA R. & GRAEFF F.G. (2001) Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. *Behav.Brain Res.* **126**, 13-21.
- SOLTIS R.P., COOK J.C., GREGG A.E., STRATTON J.M. & FLICKINGER K.A. (1998) EAA receptors in the dorsomedial hypothalamic area mediate the cardiovascular response to activation of the amygdala. *Am.J.Physiol* **275**, R624-R631
- SOLTIS R.P. & DIMICCO J.A. (1991a) GABAA and excitatory amino acid receptors in dorsomedial hypothalamus and heart rate in rats. *Am.J.Physiol* **260**, R13-R20
- SOLTIS R.P. & DIMICCO J.A. (1991b) Interaction of hypothalamic GABAA and excitatory amino acid receptors controlling heart rate in rats. *Am.J.Physiol* **261**, R427-R433
- STOTZ-POTTER E.H., WILLIS L.R. & DIMICCO J.A. (1996) Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. *J.Neurosci.* **16**, 1173-1179.
- SWANSON L.W. (2003) The amygdala and its place in the cerebral hemisphere. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **985**, 174-184.
- SWANSON L.W. & PETROVICH G.D. (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci.* **21**, 323-331.
- SZCZEPANSKA-SADOWSKA E. (2008) Role of neuropeptides in central control of cardiovascular responses to stress. *J.Physiol Pharmacol.* **59 Suppl 8**, 61-89.
- VENTURA-SILVA A.P., MELO A., FERREIRA A.C., CARVALHO M.M., CAMPOS F.L., SOUSA N. & PEGO J.M. (2013) Excitotoxic lesions in the central nucleus of the amygdala attenuate stress-induced anxiety behavior. *Front Behav.Neurosci.* **7**, 32
- YOSHIDA S., MATSUBARA T., UEMURA A., IGUCHI A. & HOTTA N. (2002) Role of medial amygdala in controlling hemodynamics via GABA(A) receptor in anesthetized rats. *Circ.J.* **66**, 197-203.