

**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

**ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO MEDIAL DA AMÍGDALA NAS  
RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À RESTRIÇÃO  
AGUDA EM RATOS**

**Eduardo Albino Trindade Fortaleza**

**-Ribeirão Preto-**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

**ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO MEDIAL DA AMÍGDALA NAS  
RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À RESTRIÇÃO  
AGUDA EM RATOS**

**Eduardo Albino Trindade Fortaleza**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de  
São Paulo para obtenção do grau de Mestre,  
pelo Programa de Pós-graduação em Ciências.  
Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar  
Corrêa

-Ribeirão Preto-  
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de  
Ribeirão Preto/USP

Fortaleza, Eduardo Albino Trindade.

Envolvimento do núcleo medial da amígdala nas respostas cardiovasculares à restrição aguda em ratos. Ribeirão Preto, 2009.

95p. il. 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Corrêa, Fernando Morgan de Aguiar

1. Estresse por restrição. 2. Pressão Arterial.  
3. Freqüência Cardíaca. 4. Núcleo medial da Amígdala.

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

### **ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO MEDIAL DA AMÍGDALA NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À RESTRIÇÃO AGUDA EM RATOS**

Eduardo Albino Trindade Fortaleza

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para  
obtenção do grau de Mestre, pelo programa de Pós-  
graduação em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_.

#### **Banca Examinadora:**

**Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa**

**Instituição: FMRP-USP**

**Assinatura: \_\_\_\_\_**

**Prof. Dr. Benedito Honório Machado**

**Instituição: FMRP-USP**

**Assinatura: \_\_\_\_\_**

**Prof. Dr. Laurival Antônio de Luca Junior**

**Instituição: UNESP**

**Assinatura: \_\_\_\_\_**

*“O judoca é o que possui inteligência para compreender aquilo que lhe ensinam, paciência para ensinar o que aprendeu aos seus semelhantes e fé para acreditar naquilo que não compreende”.*

*Jigoro Kano.*

**Dedico,**

Aos meus pais José Albino Fortaleza e Luzia Trindade Fortaleza, que nunca mediram esforços para minha formação profissional e individual, por me ensinarem a ser um cidadão de caráter, lutador e acima de tudo a ser honesto. Os responsáveis são vocês por eu estar aqui, muito obrigado por tudo, amo muito vocês.

Ao meu padrinho Osmar que sempre me apoiou em tudo o que fiz nesta vida, uma pessoa maravilhosa que sempre acreditou em mim, amo muito você obrigado por tudo.

A minha irmã Edneide Trindade Fortaleza uma pessoa muito especial muito preocupada comigo e com a minha felicidade que cuida e acredita muito em mim, te amo muito, obrigado.

A minha noiva Patricia Cardoso Martins muito dedicada e amorosa em todos os nossos momentos, inclusive os de estresses e acima de tudo por me aguentar nestes anos de convivência e que me ajudou a enfrentar as situações mais difíceis durante este trabalho. Te amo muito, obrigado.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa, por conceder-me a oportunidade de estudar em seu laboratório. Agradeço por toda a orientação, compreensão e paciência em me ensinar e suprir minhas dificuldades. E além de tudo agradeço pela confiança no meu trabalho e no meu esforço, obrigado.

Aos membros da banca examinadora, por se disporem a participar e pela avaliação e contribuição com sugestões para o engrandecimento deste trabalho.

A Prof. Dra. Ana Maria de Oliveira por me ensinar farmacologia com muita atenção, dedicação, carinho e disponibilidade. É uma pessoa a quem sou muito agradecido obrigado.

Ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães pela contribuição e assessoria na realização deste trabalho.

A Maria Inês que acreditou na minha vontade de fazer pós-graduação e me ajudou com o primeiro passo ao ingresso no departamento de farmacologia e por cuidar dos animais com atenção e respeito.

A Ivanilda A.C. que me apresentou ao professor Morgan e pelo cuidado com a preparação dos cortes histológicos, pela amizade, carinho e por várias indicações médicas.

A Idália I.B. Aguiar, “olho junto” desse departamento que pegou na minha mão e supervisionou todas as minhas cirurgias, pela amizade, carinho e por toda a assistência e brincadeiras.

A Simone S. Guilhaume, pela atenção, simpatia e por várias dicas de culinárias e restaurantes.

A Eliana pela alegria, simpatia e elogios a minha pessoa e por cuidar dos animais com muita atenção, respeito e dedicação.



A Diva, pelo bom humor sempre estampado no rosto, amizade e cuidado com o nosso material.

Aos funcionários José Waldik Ramon, Sônia Andrade e Fátima Petean, por toda competência, disponibilidade e atenção com que atendem a burocracia do departamento.

Aos meus amigos do laboratório:

Rodrigo F. Tavares, que me ajudou praticamente em tudo o que sei durante a pós-graduação, meu amigão mesmo, uma pessoa fora do sério. Obrigado, agradeço muito a você “Rodrigão”, pela paciência e dedicação em nosso laboratório.

Prof. Dr. Leonardo Resstel, meu primeiro amigo docente. Que maravilha! Salvou várias vezes a minha vida, por me ensinar e ajudar nas horas mais difíceis obrigado.

A América Scopinho outra pessoa maravilhosa, minha amiga de todas as horas e “momentos” nesta nossa vida de pós-graduação, te agradeço muito por várias vezes me fazer acreditar no impossível e em mim mesmo. Obrigado.

A Gislaíne Pelosi, Cristiane Busnardo, Carlos Crestani, Milena Deolindo, Daniel Reis, Fernando Alves e Silvana Lopes, pela amizade e companheirismo. De alguma forma, todos contribuíram com muita ajuda, atenção e dedicação para minha formação. Obrigado.

Aos amigos que fiz na pós-graduação Sâmia Joca boa sorte com sua gravidez e felicidades, Lílian, Evandro, Marcelo, Sabrina.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES e a FAEPA, pelo auxílio financeiro durante realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

## RESUMO

## ABSTRACT

## INTRODUÇÃO ..... 1

## MATERIAIS E MÉTODOS ..... 9

- 1) ANIMAIS..... 10
- 2) TÉCNICA DE IMPLANTE DE CÂNULA-GUIA NO NMA. .... 10
- 3) CANULAÇÃO DA ARTÉRIA FEMORAL. .... 11
- 4) REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA. .... 11
- 5) TÉCNICA PARA MICROINJEÇÃO DE DROGAS NO NMA. .... 12
- 6) ESTRESSE POR RESTRIÇÃO. .... 12
- 7) DROGAS UTILIZADAS..... 12
- 8) DETERMINAÇÃO ANATÔMICA DO SÍTIO DE INJEÇÃO..... 13
- 9) ANÁLISE ESTATÍSTICA. .... 14

## PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS..... 16

- 1) RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À ER..... 17
- 2) EFEITO DO BLOQUEIO DA NEUROTRANSMISSÃO NO NMA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER. .... 17
- 3) EFEITO DE UM ANTAGONISTA MUSCARÍNICO NÃO SELETIVO NA NMA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER. .... 17
- 4) EFEITO DE UM ANTAGONISTA MUSCARÍNICO M1 NA NMA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER. .... 18
- 5) EFEITO DE UM ANTAGONISTA MUSCARÍNICO M3 NO NMA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER. .... 18
- 6) EFEITO DE UM INIBIDOR DA CAPTAÇÃO DA COLINA NO NMA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER. .... 18
- 7) EFEITO DE UM ANTICOLINESTERÁSICO NO NMA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER. .... 19

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
1- CARACTERIZAÇÃO DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER.....	21
2- EFEITO DA MICROINJEÇÃO COM LCA NO NMA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER. ....	21
3- EFEITO DO BLOQUEIO SINÁPTICO POR MICROINJEÇÃO DE COBALTO BILATERALMENTE NO NMA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER. ....	26
4- EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE UM ANTAGONISTA MUSCARÍNICO NÃO SELETIVO NO NMA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER. ....	31
5- EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE UM ANTAGONISTA MUSCARÍNICO M1 NO NMA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER. ....	35
6- EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE UM ANTAGONISTA MUSCARÍNICO M2 NA NMA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER. ....	39
7- EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE UM INIBIDOR DA CAPTAÇÃO DA COLINA NO NMA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER.....	43
8- EFEITO DE UM ANTICOLINESTERÁSICO NA NMA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ER. ....	47
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>TRABALHO PUBLICADO .....</b>	<b>74</b>

## RESUMO

O núcleo medial da amígdala (NMA) está envolvido no controle de uma variedade de processos fisiológicos e comportamentais, bem como na regulação do sistema nervoso autônomo. Dados da literatura indicam que o NMA modula respostas cardiovasculares e comportamentais associadas a estímulos estressantes. O estresse por restrição (ER) evoca alterações cardiovasculares caracterizadas por aumento da pressão arterial (PA) e um intenso aumento na frequência cardíaca (FC).

No presente estudo, avaliamos o efeito da manipulação farmacológica no NMA nas respostas da PA e FC causadas pelo ER. A microinjeção bilateral de cloreto de cobalto (1mM/1 $\mu$ L) inibidor sináptico não seletivo no NMA aumenta a resposta taquicárdica durante o estresse agudo, sem efeito significativo na resposta pressora. Este resultado sugere que sinapses no NMA têm um mecanismo inibitório no componente cardíaco durante o ER. A microinjeção local de atropina (3nmol/1 $\mu$ L) antagonista muscarínico não seletivo, hemicolínio (2nmol/1 $\mu$ L) inibidor da captação de colina e pirenzepina (6nmol/1 $\mu$ L) e o antagonista muscarínico seletivo M1 causaram efeito similar ao cobalto, sugerindo que a neurotransmissão colinérgica local é mediada por receptores muscarínicos do subtipo M1, que exercem papel inibitório sobre o componente cardíaco da resposta cardiovascular ao ER. O pré-tratamento com 4-DAMP (2nmol/1 $\mu$ L) antagonista muscarínico seletivo M3 não afetou as alterações cardiovasculares durante ER, reforçando a idéia que o papel inibitório no MNA é mediado por receptores M1. Além disso, o pré-tratamento com neostigmina (1nmol/1 $\mu$ L) um inibidor da colinesterase não alterou a resposta cardiovascular ao ER. Portanto, estes resultados sugerem que o NMA tem um papel inibitório no aumento da FC causado pelo ER.

## ABSTRACT

The medial amygdaloid nucleus (MeA), is involved in controlling a variety of physiological and behavioral processes, as well as regulating the autonomic nervous system. There is evidence indicating that MeA modulates cardiovascular correlates of behavioral responses to stressful stimuli. Acute restraint cause cardiovascular changes, characterized by elevated blood pressure (BP) and intense heart rate (HR) increase. We presently report effects of MeA pharmacological manipulations on BP and HR responses evoked by acute restraint in rats. Bilateral microinjection of 100 nl of the unspecific synaptic blocker  $\text{CoCl}_2$  (1mM) in the MeA increased HR response to acute restraint, without significant effect on the blood pressure response. This result indicates that MeA synaptic mechanisms have an inhibitory influence on restraint-evoked HR changes. Injections of the non-selective muscarinic receptor antagonist atropine (3nmol/0.1 $\mu\text{L}$ ), inhibitor of choline uptake hemicholinium (2nmol/0.1 $\mu\text{L}$ ), or the selective M1 receptor antagonist pirenzepine (6nmol/0.1 $\mu\text{L}$ ) caused effects similar to cobalt, suggesting that local cholinergic neurotransmission and M1 receptors mediate the MeA inhibitory influence on restraint-related HR responses. Pretreatment with the M2 receptor antagonist 4-DAMP (2nmol/0.1 $\mu\text{L}$ ) did not affect restraint-related cardiovascular responses, reinforcing the idea that M1 receptors mediate MeA-related inhibitory influence. Moreover the pretreatment with cholinesterase inhibitor neostigmine (1nmol/0.1 $\mu\text{L}$ ) did not change the cardiovascular response evoked to acute restraint. Together, these results suggest a MeA inhibitory influence on restraint-evoked HR increase.

## **INTRODUÇÃO**

O sistema cardiovascular é importante para manutenção da homeostase, provendo fluxo sanguíneo adequado e permitindo o acesso de nutrientes necessários para as funções vitais das células de todos os órgãos e tecidos.

O controle do sistema cardiovascular envolve a participação do sistema nervoso central (SNC), de mecanismos humorais e de mecanismos regulatórios locais presentes no coração, nos rins e nos vasos sanguíneos. O SNC é o principal controlador do sistema circulatório. As regiões responsáveis por essa regulação situam-se ao longo de todo o eixo neural, envolvendo tanto estruturas bulbares quanto suprabulbares.

Os centros bulbares, tais como o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo ambíguo, núcleo dorsal do vago e os núcleos rostroventrolateral (RVLM) e caudoventrolateral (CVLM) são responsáveis pela manutenção do tônus pressório geral e pelo controle instantâneo da pressão arterial e frequência cardíaca (CHALMERS e PILOWSKY, 1991; GOLDSTEIN, 1991). Os neurônios do RVLM determinam a frequência de despolarização dos neurônios pré-ganglionares simpáticos envolvidos na manutenção do tônus vascular (GUYENET *et al.*, 1990; VERBERNE e OWENS, 1998) e medeiam os componentes simpáticos dos reflexos cardiovasculares (GUYENET *et al.*, 1990). Por outro lado, a atividade eferente parassimpática tem origem no núcleo dorsal do vago e no núcleo ambíguo, sendo o componente parassimpático dos reflexos cardiovasculares gerado principalmente no núcleo ambíguo. Tais reflexos, os quais incluem o barorreflexo arterial, o quimiorreflexo e o reflexo cardiopulmonar permitem ajustes instantâneos da pressão arterial em respostas a alterações posturais, respiratórias e de volume sanguíneo (GOLDSTEIN, 1991).

Estruturas suprabulbares também participam do controle do sistema cardiovascular (HILTON, 1966), atuando principalmente em situações comportamentais. Dentre estas se destacam estruturas ventrais e dorsais da ponte, incluindo o complexo núcleo braquial, o núcleo de Kolliker-Fuse, o grupo de células A5, a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e o núcleo cuneiforme, bem como estruturas prosencefálicas incluindo o hipotálamo, regiões específicas do córtex cerebral a área septal e a amígdala (LOEWY e MCKELLAR, 1980; LOEWY, 1991; DAMPNEY, 1994).

A amígdala é uma estrutura límbica subcortical situada no lobo temporal, na posição medial do cérebro, entre a cápsula externa e o hipotálamo, sendo subdividida em vários subnúcleos com diferenciações funcionais (PITKANEN *et al.*, 1997; SAH *et al.*, 2003). A amígdala é dividida em três grupos de núcleos: 1) O grupo profundo ou basolateral, que inclui os núcleos lateral, basal e acessório basal; 2) O grupo superficial ou cortical, que inclui o núcleo cortical e o do trato olfatório lateral; e 3) O grupo centro-medial composto pelos núcleos central e medial (PRICE *et al.*, 1987; MCDONALD, 1998).

A amígdala é uma estrutura chave na regulação de respostas autonômicas associadas à ansiedade e medo. No modelo de medo condicionado, em que se associam choque nas patas a um estímulo sonoro ou luminoso, ocorrem alterações comportamentais, tais como: congelamento (“freezing”), limpeza (“grooming”), defecação, urinação, aumento na frequência respiratória, úlceras estomacais, diminuição da salivação e aumento da frequência cardíaca (DAVIS, 1992; LEDOUX, 1998). Estimulação elétrica ou lesão da amígdala podem modular estas alterações comportamentais (DAVIS, 1992). A amígdala está envolvida na modulação de funções neuroendócrinas, bem como de mecanismos efetores viscerais e



comportamentais, dentre eles: aprendizagem e memória, agressividade e defesa, sensação dolorosa, reprodução e ingestão (ELEFTHERIOU, 1973; BEN-ARI, 1981; AGGLETON *et al.*, 1992; AGGLETON, 2000). Além disso, disfunções da amígdala estão associadas a doenças neurológicas e psiquiátricas. (SIMS e WILLIAMS, 1990; PITKANEN e AMARAL, 1991; BRADY *et al.*, 1992; UNGER e LANGE, 1992; MCDONALD *et al.*, 1993; LEONTOVICH *et al.*, 2004; ASHWELL *et al.*, 2005; OLMOS *et al.*, 2005; MENENDEZ *et al.*, 2006).

A amígdala conecta-se ao hipotálamo e áreas do tronco encefálico, conhecidas por desempenharem papel importante no controle cardiovascular (OHTA *et al.*, 1991; DAMPNEY, 1994). Em experimentos em que se realizou ablação da amígdala foi observado um retardo no desenvolvimento de hipertensão espontânea (GALENO *et al.*, 1982). Mogenson e Calaresu 1973 relataram que a estimulação elétrica do NMA causa respostas pressoras em ratos anestesiados com uretana, enquanto que em ratos anestesiados com alfa cloralose causa respostas depressoras (MOGENSEN e CALARESU, 1973). Além disso, vários estudos mostraram alterações na pressão arterial e frequência cardíaca após a estimulação elétrica da amígdala em diferentes espécies animais, envolvendo a ocorrência tanto de efeitos pressores quanto depressores, dependendo do subnúcleo estimulado e do uso de anestésicos (GELSEMA *et al.*, 1987). A estimulação elétrica da amígdala, além de causar alterações cardiovasculares, também causa reações de defesa (HILTON e ZBROZYNA, 1963; FAIERS *et al.*, 1975; STOCK *et al.*, 1978; GALENO *et al.*, 1982).

A ativação de receptores muscarínicos em núcleos do sistema nervoso central resulta tanto em respostas pressoras quanto depressoras associadas com taquicardia ou bradicardia, dependendo da espécie estudada e da utilização ou não

de anestésicos (BUCCAFUSCO e BREZENOFF, 1979; BREZENOFF e GIULIANO, 1982; HARA *et al.*, 1992; HARUTA *et al.*, 1992; ALLY *et al.*, 1993). Porém em ratos, a ativação de receptores muscarínicos no SNC causa preferencialmente respostas pressoras (BUCCAFUSCO, 1996). Há evidências indicando o envolvimento da neurotransmissão colinérgica da amígdala na modulação da pressão arterial. A resposta pressora evocada pela microinjeção i.c.v. de carbacol foi atenuada pela lesão eletrolítica do núcleo central da amígdala tanto em ratos anestesiados quanto em não anestesiados (OZKUTLU *et al.*, 1995), sugerindo ser esta área o sítio de atuação do carbacol. Além disso, respostas pressoras foram observadas após a estimulação do complexo amigdalóide com carbacol (OHTA *et al.*, 1991). Estes dados sugerem que a neurotransmissão colinérgica do complexo amigdalóide, por meio da ativação de receptores muscarínicos, module a atividade cardiovascular em ratos.

Estímulos estressantes causam alterações na pressão arterial (LAM *et al.*, 1995; KAEHLER *et al.*, 2000; KNUEPFER *et al.*, 2001; MULLER *et al.*, 2001; VAN DEN BUUSE *et al.*, 2001; KAPUSTA *et al.*, 2002; KUBO *et al.*, 2002). A lesão da amígdala atenuou as respostas pressora e taquicárdica evocadas por choques intermitentes nas patas de ratos (SANDERS *et al.*, 1994), bem como respostas pressoras causadas por estímulo sonoro de alta intensidade (GALENO *et al.*, 1984).

Dados da literatura indicam que o estresse por restrição (ER) aumenta a expressão da proteína c-fos no núcleo medial da amígdala (KUBO *et al.*, 2004). Além disso, esses autores relataram que a inibição do NMA por microinjeção bilateral de muscimol atenuou a resposta pressora desencadeada pelo ER, sugerindo o envolvimento do NMA na mediação dessa resposta.

As respostas cardiovasculares se inserem no componente fisiológico da resposta comportamental a um estímulo estressante. Uma vez que o NMA conecta-se com outras estruturas do sistema límbico e também com estruturas envolvidas no controle neurovegetativo, foi importante avaliar o papel dessa área como integradora comportamental e cardiovascular.

Nossa hipótese é que a neurotransmissão colinérgica no NMA participa de um circuito neuronal envolvido na modulação de respostas cardiovascular correlatas às respostas comportamentais desencadeadas por estímulos provenientes do meio ambiente. Para tanto, nossa proposta foi a estudar o envolvimento dessa área na expressão das respostas cardiovasculares observados a exposição de ratos ao ER.

## **OBJETIVOS**

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1)** Avaliar a participação do NMA na resposta cardiovascular induzida por ER, por meio de sua inibição farmacológica por microinjeção local de cloreto de cobalto (inibidor sináptico).
  
- 2)** Avaliar o envolvimento da neurotransmissão colinérgica do NMA na resposta cardiovascular induzida pelo ER, por meio da microinjeção local de atropina (antagonista muscarínico não seletivo), pirenzepina (antagonista seletivo M1) ou de 4-DAMP (antagonista seletivo M3), bem como de neostigmina (anticolinesterásico) ou hemicolíneo (inibidor da captação de colina).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **1) Animais.**

Os experimentos foram feitos em ratos machos Wistar com peso variando entre 220-280 g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da USP de Ribeirão Preto sendo mantidos em caixas individuais, com alimentação de ração e água. Os animais foram submetidos à alternância de luz (12 h claro / 12 h escuro). O protocolo para uso de animais em experimentação foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal (CETAE) e está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA), nº 149/2007.

## **2) Técnica de implante de cânula-guia no NMA.**

O anestésico usado neste procedimento cirúrgico foi o tribromo-cloro-etanol (Aldrich Chemical Co. Inc.) na dose de 250 mg/Kg na via intraperitoneal. A cabeça do animal foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, USA) e após tricotomia foi feita assepsia do local com álcool a 70%. A seguir, foi injetado 0,3mL de lidocaína com vasoconstritor subcutaneamente para anestesia local do escalpo. A calota craniana foi exposta pela incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se todo o periósteo. A assepsia local foi feita com salina e água oxigenada a 10%. A sutura sargital foi utilizada como ponto de referência para a coordenada lateral. As coordenadas utilizadas foram determinadas a partir do Atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 1997).

Núcleo medial da amígdala:

Antero-posterior: + 6,2 mm em relação à linha interaural

Lateral: + 3,4 mm em relação à sutura sagital

Vertical: - 8,0 mm em relação à estrutura óssea da calota craniana

Incisivo: - 3,2mm

Com o auxílio de broca odontológica, foi feita a trepanação do crânio e cânulas guia foram introduzidas bilateralmente no NMA. As cânulas foram manufaturadas e se constituíam de segmentos de agulha hipodérmica com 15 mm de comprimento e 0,55 mm de diâmetro externo, 24G. Elas foram fixadas ao crânio com resina acrílica autopolimerizável e um pequeno parafuso previamente rosqueado na calota craniana. Mandris com 0,2 mm de diâmetro externo e 15 mm de comprimento foram introduzidos nas cânulas, com o objetivo de se evitar sua obstrução durante o período de recuperação pós-cirurgia. Ao final da cirurgia os animais receberam 0,2 mL de Pentabiótico veterinário (White, Brasil) por via intramuscular e 2,5 mg/Kg do analgésico e antiinflamatório flunixinina meglumina (Banamine, Schering-Plough, Brasil) por via subcutânea.

### **3) Canulação da artéria femoral.**

Após 48 h da cirurgia para implante da cânula-guia no crânio, os animais foram novamente anestesiados com tribromo-cloro-etanol e uma cânula de polietileno foi implantada na artéria femoral, sendo introduzida até a aorta abdominal inferior. A cânula foi constituída por segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) fundido a segmento de polietileno PE-50 (12-13 cm), sendo preenchida com salina (NaCl a 0,9%) contendo anticoagulante (5U/mL de heparina) e obstruída com um pino de metal. O registro da pressão arterial foi realizado através da cânula femoral, 24h após a cirurgia para os animais acordados.

### **4) Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.**

A cânula implantada na artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão arterial (Hewlett Packard, USA) por meio de um segmento de polietileno PE-



50. A pressão arterial e a frequência cardíaca foram registradas por meio de um pré-amplificador de um polígrafo HP7754-A (Hewlett Packard, USA) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (MP-100, Biopac, USA).

### **5) Técnica para microinjeção de drogas no NMA.**

As drogas foram dissolvidas em líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) com a seguinte composição: 100mM NaCl; 2mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5mM KCl; 1,0mM MgCl<sub>2</sub>; 27mM NaHCO<sub>3</sub> e 2,5mM CaCl<sub>2</sub>; pH=7,4) e administradas diretamente no NMA. Para as microinjeções foi usada uma seringa de 1 µL, modelo KH-7001 (Hamilton, USA) conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha microinjetora de metal (33 G). A agulha microinjetora foi 1,0 mm mais longa do que a cânula guia. Todas as microinjeções foram realizadas no volume de 100nL.

### **6) Estresse por Restrição.**

O tubo de restrição é constituído por um tubo cilíndrico de plástico, medindo 15cm de comprimento e 6,5cm de diâmetro. O rato permaneceu no tubo por 1 h, sendo a pressão arterial registrada continuamente durante a sua permanência no tubo.

### **7) Drogas utilizadas.**

- Cloreto de cobalto (Merck), bloqueador não seletivo de sinapses (Kretz, 1984). A dose de cloreto de cobalto (1mM) foi escolhida a partir de trabalhos indicando ser esta dose eficaz em interferir com a transmissão sináptica (RESSTEL *et al.*, 2004; TAVARES e CORREA, 2006).

- Atropina (Merck), antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos. A dose de atropina (3nmol) foi escolhida com base em experimentos prévios realizados em nosso laboratório (ALVES *et al.*, 2007).

- Pirenzepina (RBI), antagonista seletivo dos receptores muscarínicos M1. A dose (6nmol) foi escolhida com base em experimentos prévios realizados em nosso laboratório (ALVES *et al.*, 2007).

- 4-DAMP (RBI), antagonista seletivo dos receptores muscarínicos M3. A dose (2nmol) foi escolhida com base em experimentos prévios realizados em nosso laboratório (ALVES *et al.*, 2007).

- Hemicolínio (RBI), um inibidor da captação da colina. A dose (2nmol) foi escolhida com base em experimentos prévios realizados em nosso laboratório (FERNANDES *et al.*, 2005).

- Neostigmina (RBI), um anticolinesterásico. A dose (1nmol) foi escolhida com base em experimentos piloto realizados em nosso laboratório.

- Uretana (Sigma).

- Tribromo-cloro-etanol (Aldrich Chemical )

## **8) Determinação anatômica do sítio de injeção.**

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2g/kg i.p.). Foi injetado o corante azul de Evans a 1% no local da microinjeção da droga, para determinação do sítio de injeção. Em seguida, os ratos foram submetidos à perfusão cerebral. Para isso, foi feita abertura da caixa torácica para exposição do coração, e em seguida a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática. Uma agulha para perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo, e uma incisão foi feita na aurícula direita para o escoamento do sangue e

do perfusado. A perfusão foi realizada inicialmente com 20mL de solução fisiológica de NaCl 0,9%, seguida por 20mL de solução tamponada de formalina a 10%.

Posteriormente, os cérebros foram retirados da caixa craniana e foram pós-fixados em solução de perfusão. Os cérebros foram seccionados com o auxílio de um criostato. Foram feitas várias secções da área do NMA, coradas com cresil violeta a 0,5% e analisadas utilizando-se o atlas (PAXINOS e WATSON, 1997) como referência.

### **9) Análise estatística.**

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa Prism (GraphPad, USA). O teste t de Student pareado foi usado para comparar os valores basais de PA e FC antes e após os tratamentos farmacológicos.

A análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) foi utilizada para analisar as variáveis os fatores do tratamento (controle ou droga) e o tempo como medida repetida.

Os valores de PA e FC foram continuamente registrados por 10 min antes (basal) e 60 min durante a restrição. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) das variações de PAM ou das variações da FC da linha basal ( $\Delta$ PA e  $\Delta$ FC), de onde foi coletado com uma amostragem de 0,857 pontos por minuto. Para propósito estatístico, as curvas de 60 pontos foram re-amostradas para seis pontos, correspondentes ao número de animais por grupo: o 1º ponto foi obtido fazendo-se uma média aritmética de pontos entre 0 a 5 min, o 2º ponto entre 6 a 10 min, o 3º ponto foi obtido no minuto 11, o 4º ponto entre 12 a 26 min, o 5º ponto entre 27 a 41 min e o 6º ponto entre 42 a 70 min. Os dois primeiros correspondem ao período basal que antecede o início da restrição, enquanto os quatros últimos

correspondem ao período de restrição. As figuras ilustrativas mostradas nos resultados foram feitas com 60 pontos para melhor visualização da curva temporal. Foram considerados como significativos os resultados que apresentaram  $p < 0,05$ .

# **PROCOLOS EXPERIMENTAIS**

Em todos os protocolos os animais foram levados, em suas respectivas caixas, à sala de experimentação. Cada animal foi conectado ao sistema de registro da pressão arterial, em sua respectiva caixa, para registro da pressão arterial basal por 10 min. Em seguida, ainda conectado ao sistema de registro da pressão arterial, o rato foi transferido para o tubo de restrição, onde permaneceu por 1 h. A pressão arterial foi registrada durante todo o período de restrição. Foi feita apenas uma microinjeção de droga ou LCA por animal, aplicada antes da restrição.

### **1) Respostas cardiovasculares à ER.**

Este protocolo teve por objetivo determinar alterações na pressão arterial e frequência cardíaca em resposta ao ER. Para isso, os animais foram canulados na artéria femoral e após 24 h foram submetidos ao ER.

### **2) Efeito do bloqueio da neurotransmissão no NMA sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

Este protocolo teve por objetivo determinar se sinapses do NMA estão envolvidas na modulação da resposta cardiovascular ao ER. Os animais foram divididos em dois grupos. Em um grupo foi microinjetado 100nL de LCA, enquanto que no outro foi injetado  $\text{CoCl}_2$ , um inibidor não seletivo de sinapses, na concentração de 1mM. Todos os animais receberam microinjeção bilateral das drogas.

### **3) Efeito de um antagonista muscarínico não seletivo na NMA sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

Este protocolo visou determinar se as alterações cardiovasculares ao ER envolvem a ativação de receptores muscarínicos no NMA. Os animais foram

divididos em dois grupos. Em um grupo foi microinjetado 100nL de LCA, enquanto que no outro foi injetada atropina na dose de 3nmol. Todos os animais receberam microinjeção bilateral das drogas.

#### **4) Efeito de um antagonista muscarínico M1 na NMA sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

Este protocolo visou determinar se as alterações cardiovasculares ao ER envolvem receptores muscarínicos do subtipo M1 no NMA. Os animais foram divididos em dois grupos. Em um grupo foi microinjetado 100nL de LCA, enquanto que no outro foi injetada pirenzepina na dose de 6nmol. Todos os animais receberam microinjeção bilateral das drogas.

#### **5) Efeito de um antagonista muscarínico M3 no NMA sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

Este protocolo visou determinar se as alterações cardiovasculares ao ER envolvem receptores muscarínicos do subtipo M3 no NMA. Os animais foram divididos em dois grupos. Em um grupo foi microinjetado 100nL de LCA, enquanto que no outro foi injetado 4-DAMP na dose de 2nmol. Todos os animais receberam microinjeção bilateral das drogas.

#### **6) Efeito de um inibidor da captação da colina no NMA sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

Este protocolo teve por objetivo determinar se a resposta cardiovascular ao ER seria alterada pela inibição da síntese de acetilcolina no NMA. Os animais foram divididos em dois grupos. Em um grupo foi microinjetado 100nL de LCA, enquanto

que no outro foi injetado hemicolínio na dose de 2nmol. Todos os animais receberam microinjeção bilateral das drogas.

#### **7) Efeito de um anticolinesterásico no NMA sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

Este protocolo teve por objetivo determinar se a resposta cardiovascular ao ER seria alterada pela inibição da degradação de acetilcolina. Os animais foram divididos em dois grupos. Em um grupo foi microinjetado 100nL de LCA, enquanto que no outro foi injetada neostigmina na dose de 1nmol. Todos os animais receberam microinjeção bilateral das drogas.



## **RESULTADOS**

## 1- Caracterização das respostas cardiovasculares ao ER.

Os valores basais da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) dos animais não tratados (sem cânulas no NMA) foram: pressão arterial média (PAM) 10 minutos antes do ER=  $95 \pm 4$ mmHg e imediatamente antes do início do ER=  $101 \pm 5$ mmHg,  $t=1.517$ ,  $P=0,1800$ ,  $n = 7$ , e FC 10 min antes do ER=  $368 \pm 10$ bpm e imediatamente ante do ER=  $359 \pm 10$ bpm,  $t=2.029$ ,  $P=0,0888$ ,  $n=7$ . O ER por 60 min em ratos não tratados causou uma resposta caracterizada por um pico inicial de aumento da PAM, seguido por um longo período de hipertensão menos intensa (Interação:  $F_{5,72}= 8,177$ ,  $P<0,0001$ ; Tratamento:  $F_{1,72}= 41,25$ ,  $P<0,0001$ ; Tempo:  $F_{5,72}= 8,177$ ,  $P<0,0001$ , análise de variância de 2 fatores). A resposta pressora foi acompanhada por aumento significativo na FC ao longo de todo o período de restrição (Interação:  $F_{5,72}= 2,437$ ,  $P<0,0001$ ; Tratamento:  $F_{1,72}= 23,26$   $P<0,0001$ ; Tempo:  $F_{5,72}= 2,437$ ,  $P<0,0001$ , ANOVA de 2 fatores), Figura 1.

## 2- Efeito da microinjeção com LCA no NMA sobre as respostas cardiovasculares ao ER.

A microinjeção 100nL de LCA bilateralmente no NMA não alterou os valores basais de PA. A PAM 10 min antes de LCA =  $92 \pm 2$ mmHg e imediatamente antes do ER=  $92 \pm 3$ mmHg,  $t=0.5120$ ,  $P=0,6244$ ,  $n=7$  ou da FC, 10 min antes de LCA =  $374 \pm 7$ bpm e imediatamente antes do ER=  $370 \pm 7$ bpm,  $t=0.4868$ ,  $P=0,6413$ ,  $n=7$ .

O ER causou aumento tanto na PA quanto na FC dos animais tratados com LCA. Essas respostas foram semelhantes às observadas no grupo de ratos sem cânulas no NMA ( $\Delta$ PAM: Interação:  $F_{5,72}=0,1243$ ,  $P=0,9865$ ; Tratamento:  $F_{1,72}=1,824$ ,  $P=0,1810$ ; Tempo:  $F_{5,72}=32,09$ ,  $P<0,0001$ .  $\Delta$ FC: Interação:  $F_{5,72}=0,6853$ ,

$P=0,6361$ ; Tratamento:  $F_{1,72}=1,874$ ,  $P=0,1752$ ; Tempo:  $F_{5,72}=14,88$ ,  $P<0,0001$ , ANOVA de 2 fatores), Figura 1.

Registros representativos de rato do grupo controle sem cânulas no NMA e de rato tratado com a microinjeção bilateral de LCA, mostrando alterações cardiovasculares decorrentes do ER, estão apresentados na Figura 2.

Apesar do implante das cânulas-guia causam lesões nas áreas dorsais ao NMA, não foram observadas diferenças nas respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse por restrição, entre os animais com e sem cânulas-guia implantadas.

Os animais tratados com LCA foram utilizados como controle para os experimentos envolvendo manipulação farmacológica do NMA. Uma fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de um rato mostrando sítios bilaterais de microinjeção no NMA está apresentada na Figura 3.

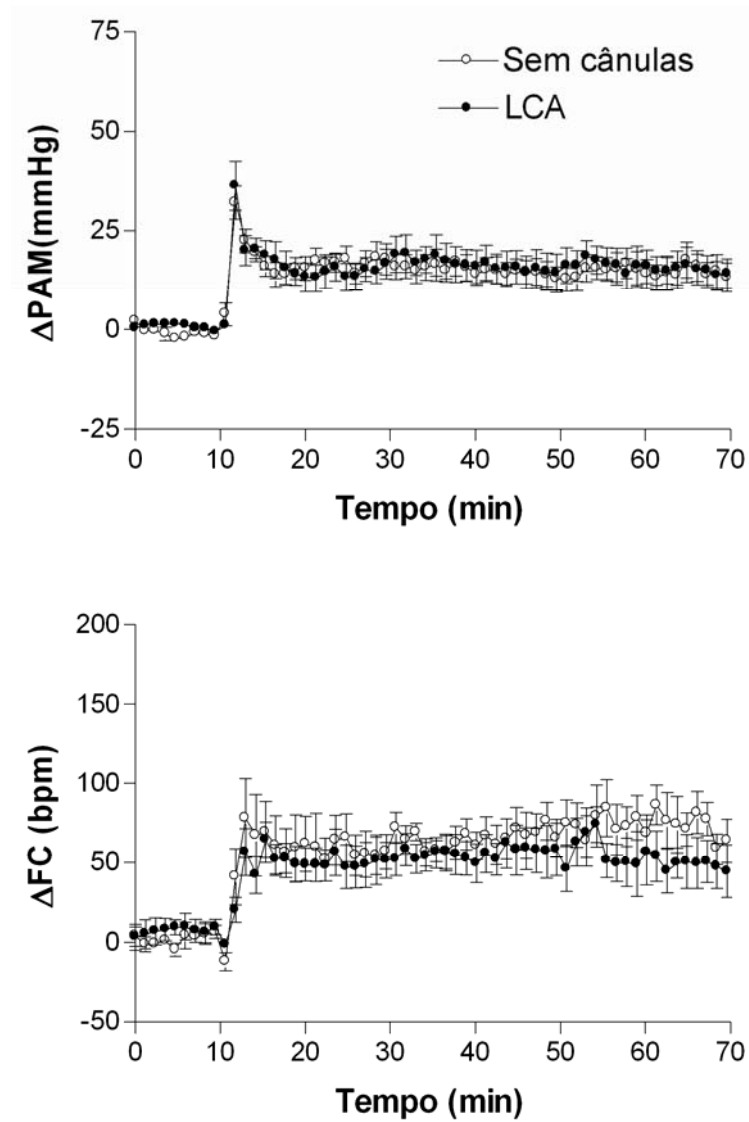


Figura 1- Curvas temporais mostrando as alterações na PAM e FC observadas durante o ER em animais controle sem cânulas (n= 7) ou tratados com LCA (100nL bilateral no NMA (n= 7).

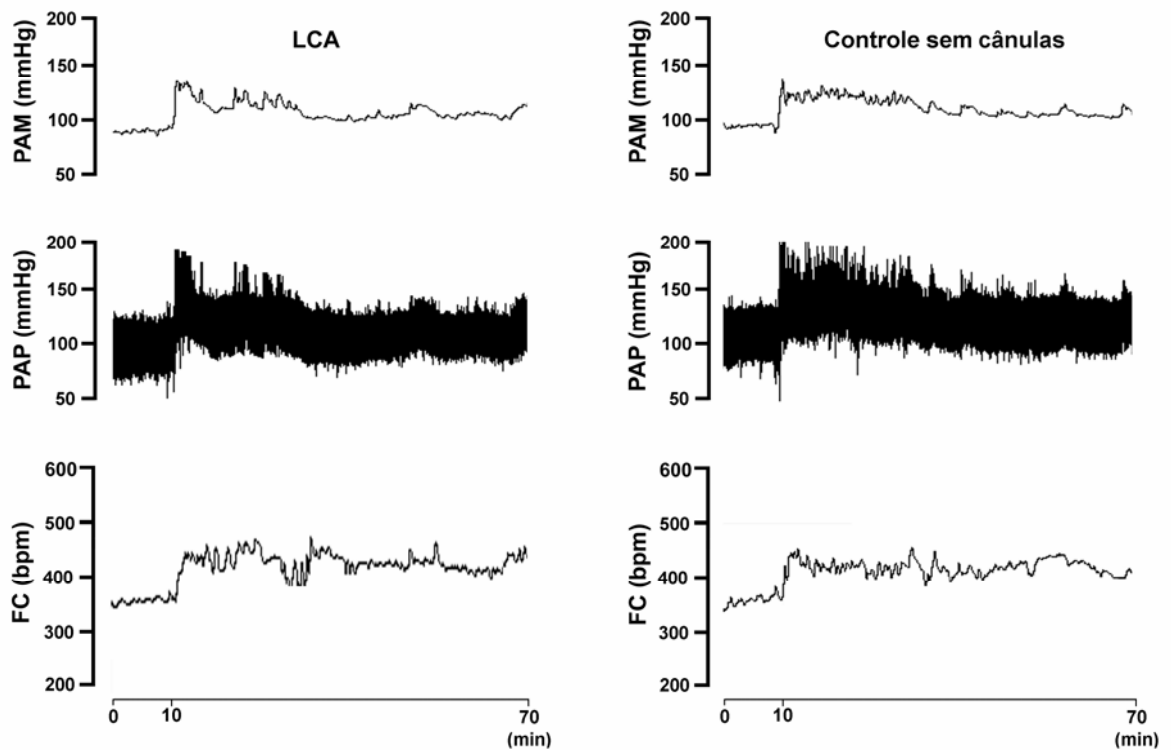


Figura 2- Registros representativos de rato do grupo sem cânulas no NMA e de rato tratado com a microinjeção bilateral de LCA submetidos ao ER, mostrando alterações na pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) observadas durante o período de 60 min de restrição. O início da restrição ocorreu em t=10 min.

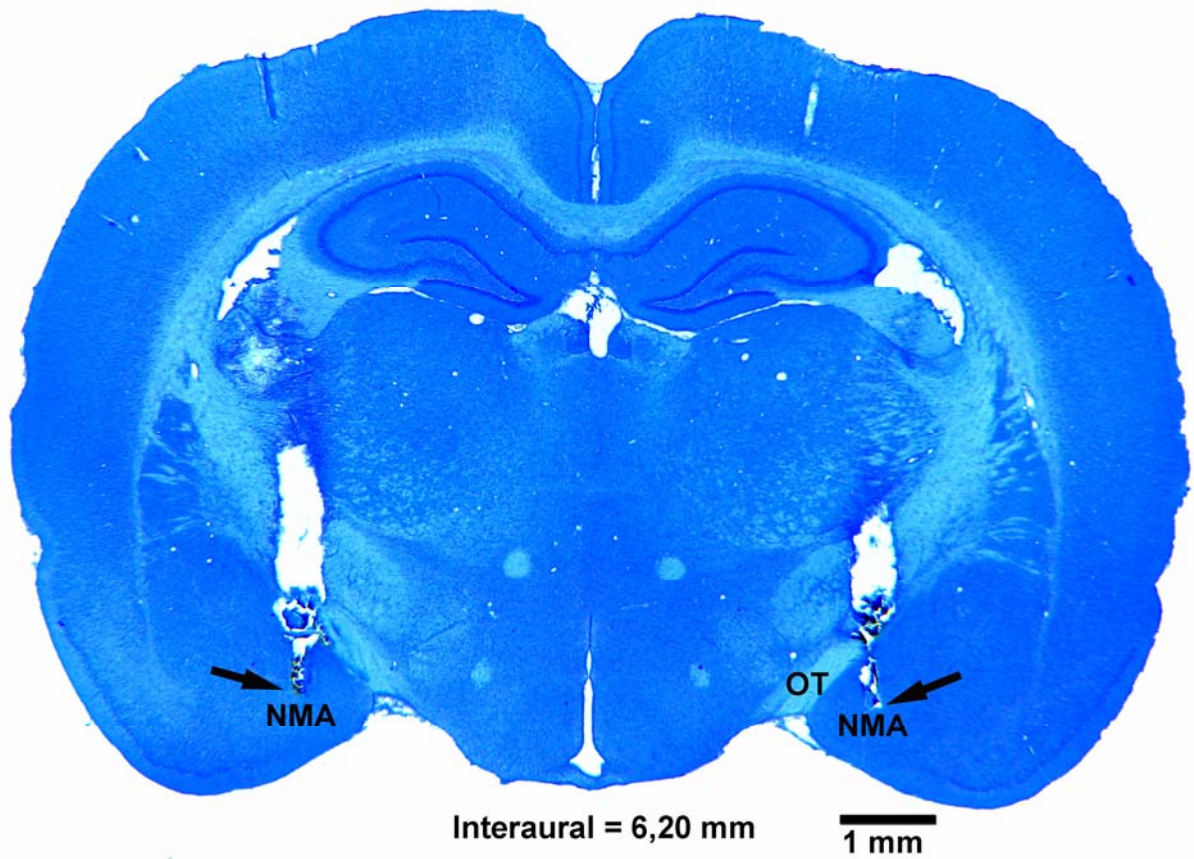


Figura 3- Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de rato mostrando sítios de microinjeção bilateral no núcleo medial da amígdala. NMA – núcleo medial da amígdala; OT - trato óptico.

### **3- Efeito do bloqueio sináptico por microinjeção de cobalto bilateralmente no NMA sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

A microinjeção de cobalto bilateralmente no NMA não alterou os valores basais de PA. A PAM antes de  $\text{CoCl}_2 = 91 \pm 3\text{mmHg}$  e 10 min após, imediatamente antes do ER=  $96 \pm 5\text{mmHg}$ ,  $t=1.228$ ,  $P=0,2654$ ,  $n=7$ , ou da FC, antes do  $\text{CoCl}_2 = 353 \pm 18\text{ bpm}$  e imediatamente antes do ER=  $349 \pm 7\text{bpm}$ ,  $t=0.2142$ ,  $P=0,8375$ ,  $n=7$ .

O ER causou aumento tanto da PA quanto FC nos animais do grupo controle (100nL LCA, bilateral) ou tratados com o inibidor sináptico cobalto (1mM, bilateral) no NMA. O ER causou resposta taquicárdica significativamente maior nos ratos tratados com cobalto no NMA, quando comparado aos animais controle com LCA (Interação:  $F_{5,78}=3,594$ ,  $P=0,0056$ ; Tratamento:  $F_{1,78}=32,68$ ,  $P<0,0001$ ; Tempo:  $F_{5,78}=17,58$ ,  $P<0,0001$ , ANOVA de 2 fatores). Não houve diferença significativa nas respostas pressoras ao ER entre os grupos cobalto e LCA (Interação:  $F_{5,78}=0,4125$ ,  $P=0,8388$ ; Tratamento:  $F_{1,78}=1,021$ ,  $P=0,3154$ ; Tempo:  $F_{5,78}=35,34$ ,  $P<0,0001$ , ANOVA de 2 fatores), Figura 5.

Registros representativos de rato do grupo controle e de rato tratado com a microinjeção bilateral de cobalto, mostrando o efeito do bloqueio de sinapses do NMA por cobalto sobre as alterações cardiovasculares decorrentes do ER estão apresentados na Figura 6.

Também avaliamos a participação de áreas adjacentes ao NMA na resposta cardiovascular ao ER. A microinjeção de cobalto bilateralmente em áreas adjacentes ao NMA não alterou os valores basais de PA. A PAM antes de  $\text{CoCl}_2 = 96 \pm 3,1\text{mmHg}$  e 10 min após, imediatamente antes do ER=  $98 \pm 4\text{mmHg}$ ,  $t=1.343$ ,

P=0,2503, n=5, ou da FC, antes do  $\text{CoCl}_2 = 373,2 \pm 7,6$  bpm e imediatamente antes do ER=  $359 \pm 9$  bpm, t=1,418, P=0,2292, n=5.

O ER causou aumento tanto da PA quanto da FC nos animais do grupo controle (100nL LCA bilateral no NMA) ou nos animais microinjetados em áreas adjacentes ao NMA (1mM, bilateral). Não houve diferença significativa no padrão das respostas cardiovasculares ( $\Delta\text{PAM}$ : Interação:  $F_{5,78}=0,09355$ ,  $P=0,9930$ ; Tratamento:  $F_{1,78}=0,7245$ ,  $P=0,3977$ ; Tempo:  $F_{5,78}=21,16$ ,  $P<0,0001$ .  $\Delta\text{FC}$ : Interação:  $F_{5,78}=0,09229$ ,  $P=0,9932$ ; Tratamento:  $F_{1,78}=0,00002359$ ,  $P=0,9961$ ; Tempo:  $F_{5,78}=13,21$ ,  $P<0,0001$ , ANOVA de 2 fatores).

Diagramas modificados do atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 1997), indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de cobalto ou LCA nos cérebros dos ratos utilizados estão apresentados na Figura 4.



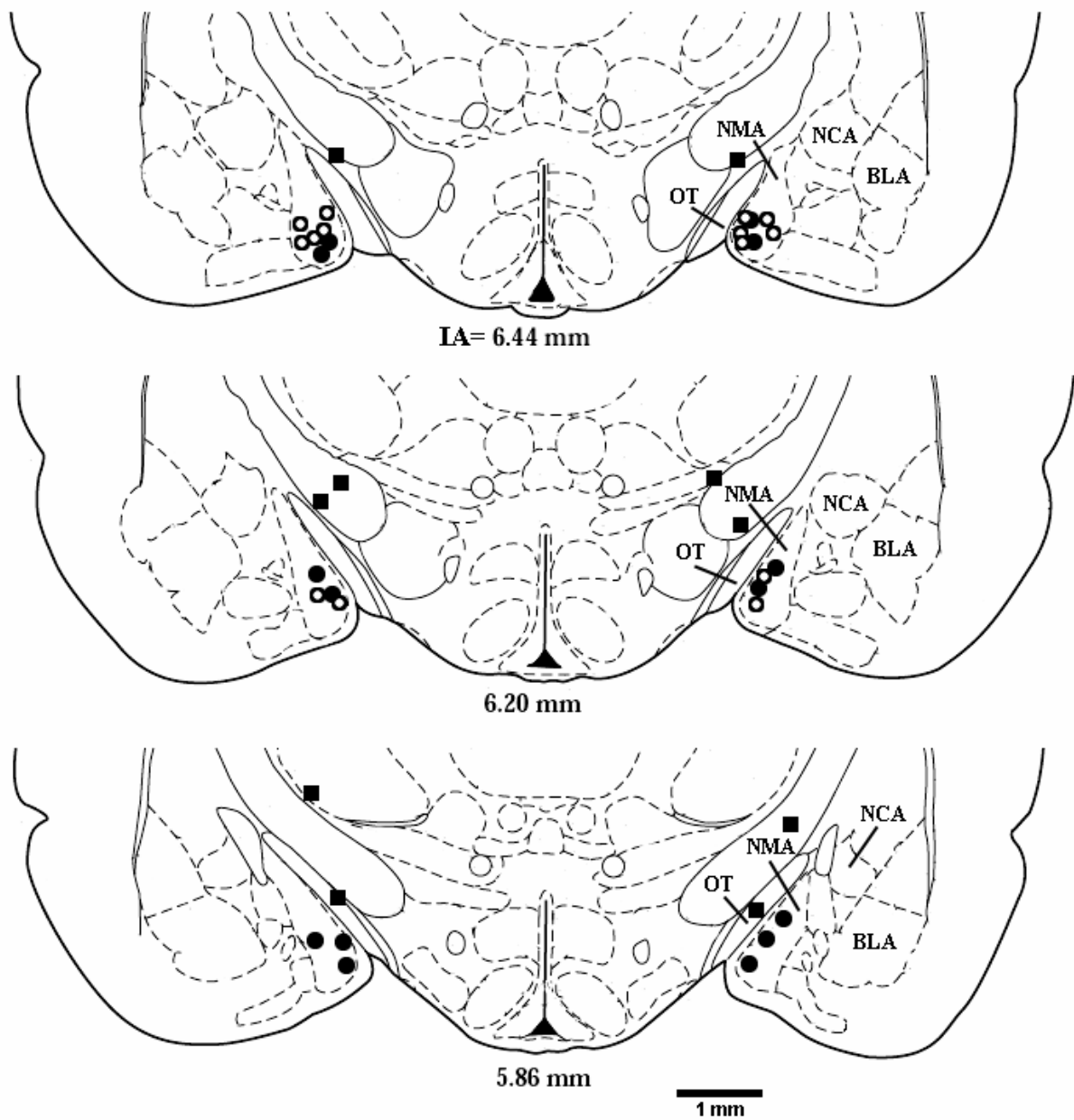


Figura 4- Diagramas modificados do atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 1997), indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de cobalto (●) e LCA (○) no núcleo medial da amígdala (NMA), ou microinjeção de cobalto em áreas adjacentes ao NMA (■) . IA - interaural; NCA - núcleo central da amígdala. BLA - núcleo basolateral da amígdala. OT - trato óptico.

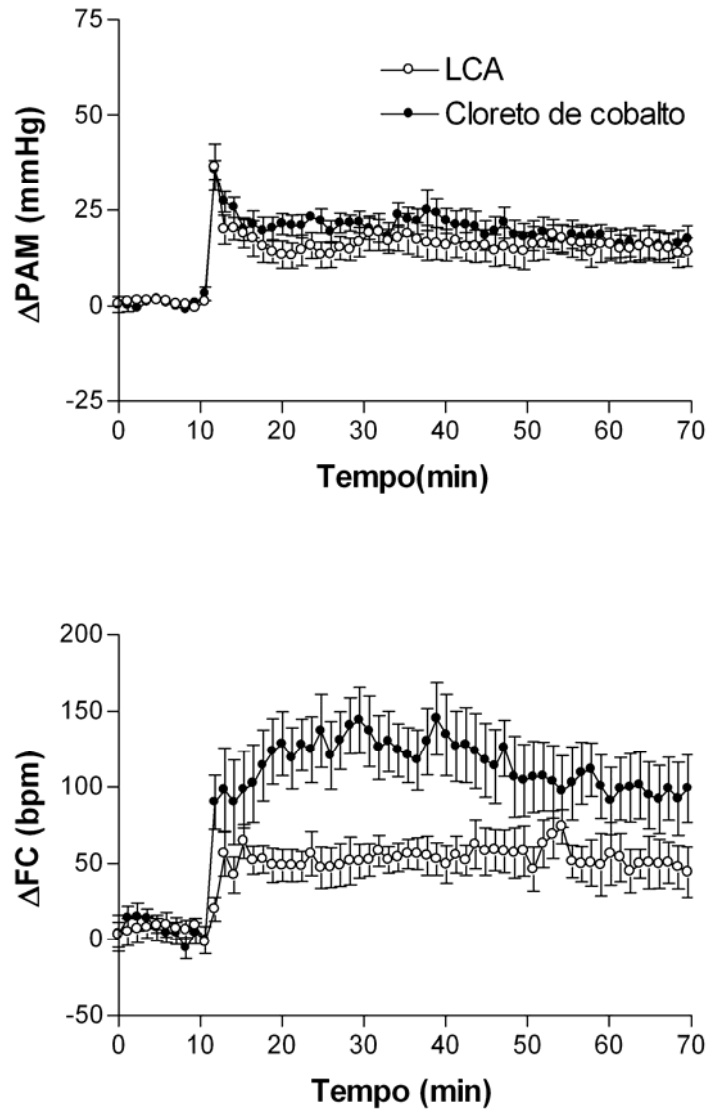


Figura 5- Curvas temporais mostrando as alterações na PAM e FC observadas durante o ER em tratados com 100nL LCA bilateral (n=7) ou cobalto (1mM) bilateral (n=7).

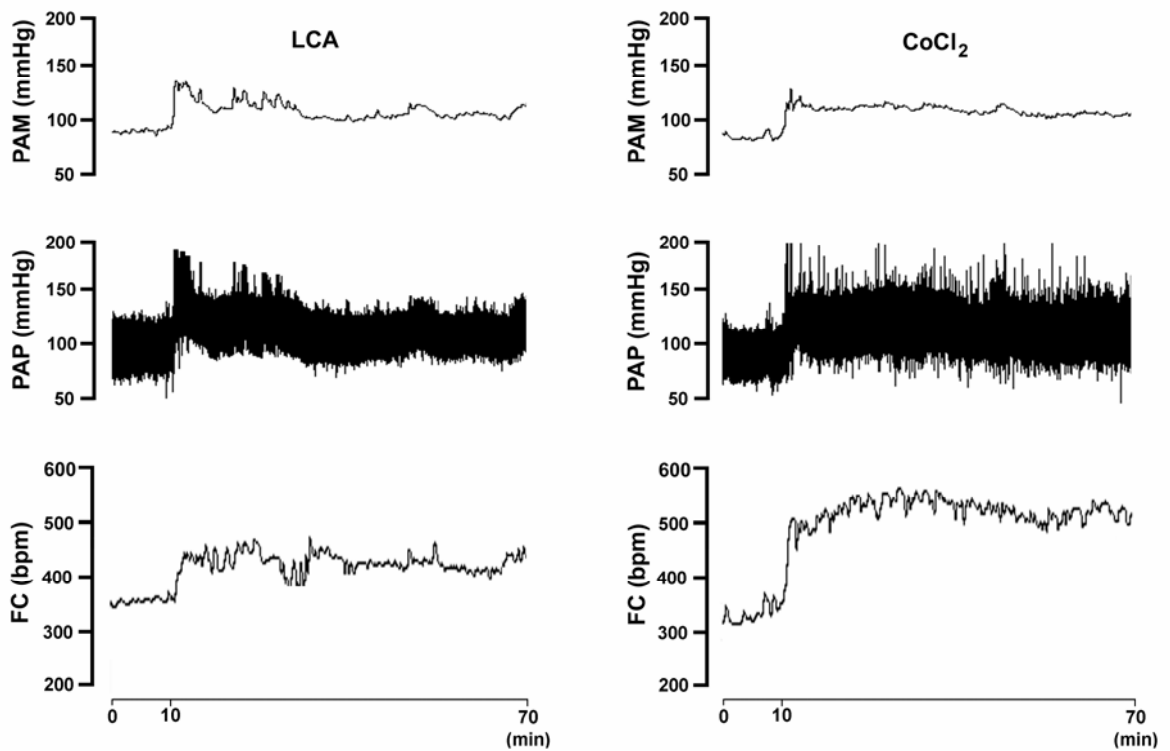


Figura 6- Registros representativos de rato do grupo controle tratado com microinjeção bilateral de LCA e de rato tratado com cobalto, submetidos ao ER, mostrando as alterações na pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) observadas durante o período de 60 min de restrição. O início da restrição ocorreu em t=10 min.

#### **4- Efeito da microinjeção de um antagonista muscarínico não seletivo no NMA sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

A microinjeção de atropina no NMA não alterou os valores basais de PA. A PAM antes de atropina=  $90 \pm 2$ mmHg e 10 min após atropina=  $91 \pm 3$ mmHg,  $t=0.9773$ ,  $P=0,3661$ ,  $n=7$  ou da FC, antes de atropina=  $332 \pm 9$ bpm e após atropina =  $336 \pm 8$ bpm,  $t=0.5121$ ,  $P=0,6269$ ,  $n=7$ .

Diagramas modificados do atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 1997), indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de atropina ou LCA nos cérebros dos ratos usados estão apresentados na Figura 7.

O estresse agudo por restrição causou aumento tanto da PA quanto da FC nos animais do grupo controle (100nL LCA bilateral) ou tratados com atropina (3nmol bilateral) no NMA. O ER causou resposta taquicárdica significativamente maior nos ratos tratados com atropina quando comparado aos animais controles (Interação:  $F_{5,78}=2,197$ ,  $P=0,0629$ ; Tratamento:  $F_{1,78}=17,87$ ,  $P<0.0001$ ; Tempo:  $F_{5,78}=18,06$ ,  $P<0,0001$ , ANOVA de 2 fatores). Não houve diferença significativa nas respostas pressoras ao ER entre os grupos atropina e controle (Interação:  $F_{5,78}=0,6074$ ,  $P=0,6944$ ; Tratamento:  $F_{1,78}=0,1022$ ,  $P=0,7501$ ; Tempo:  $F_{5,78}=21,25$ ,  $P<0,0001$ , ANOVA de 2 fatores), Figura 8.

Registros representativos de rato do grupo controle e de rato tratado com microinjeção bilateral de atropina, mostrando os efeitos do tratamento com atropina sobre as alterações cardiovasculares decorrentes ao ER estão apresentados na Figura 9.

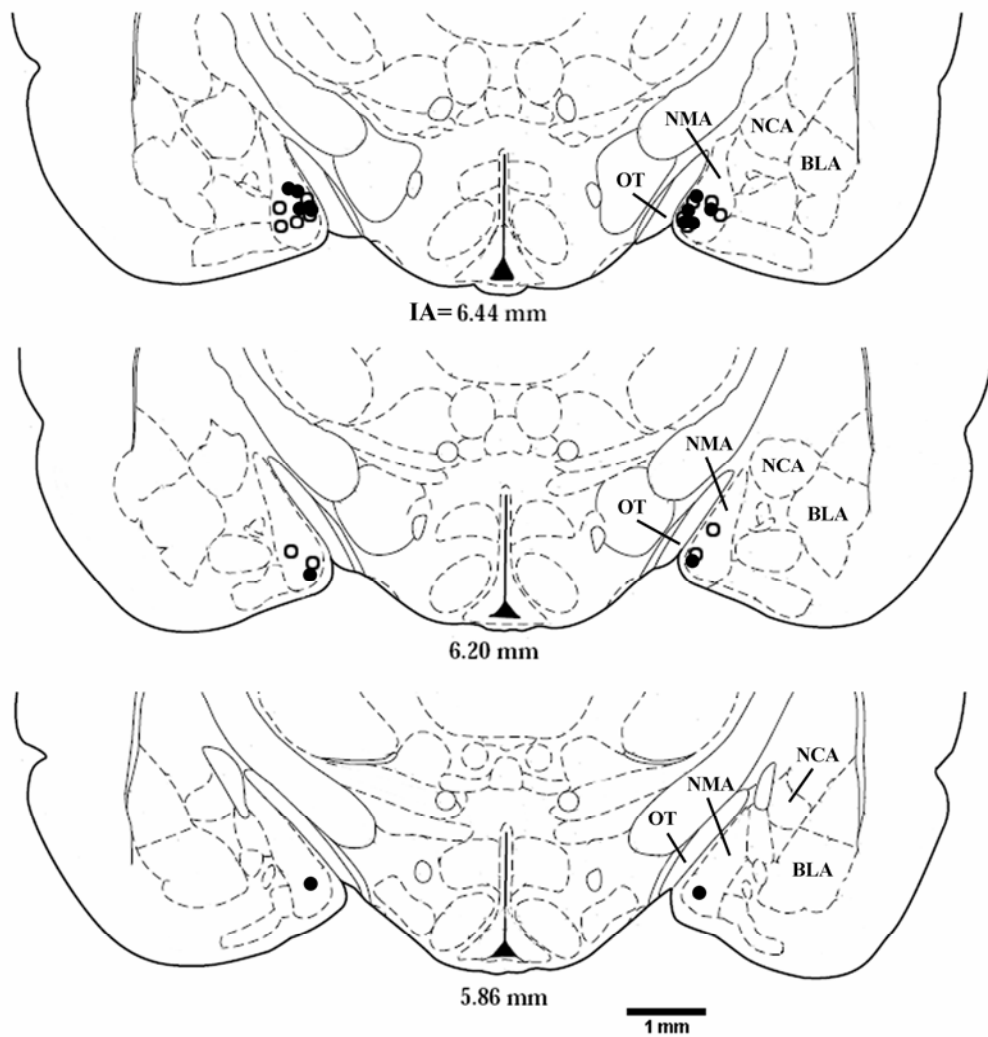


Figura 7- Diagramas modificados do atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 1997), indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de atropina (●) e LCA (○) no núcleo medial da amígdala (NMA). IA – interaural. NCA - núcleo central da amígdala. BLA - núcleo basolateral da amígdala. OT - trato óptico.

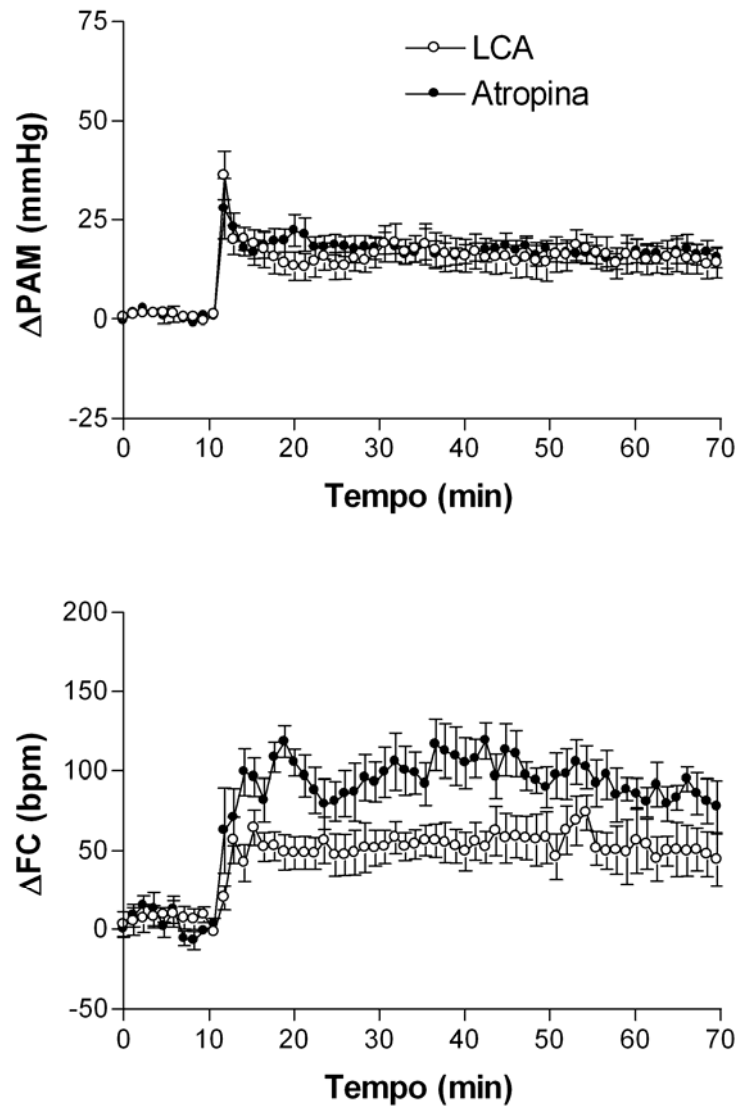


Figura 8- Curvas temporais mostrando as alterações na PAM e FC observadas durante o ER em tratados com 100nL LCA bilateral (n =7) ou atropina (3nmol) bilateral (n=7).

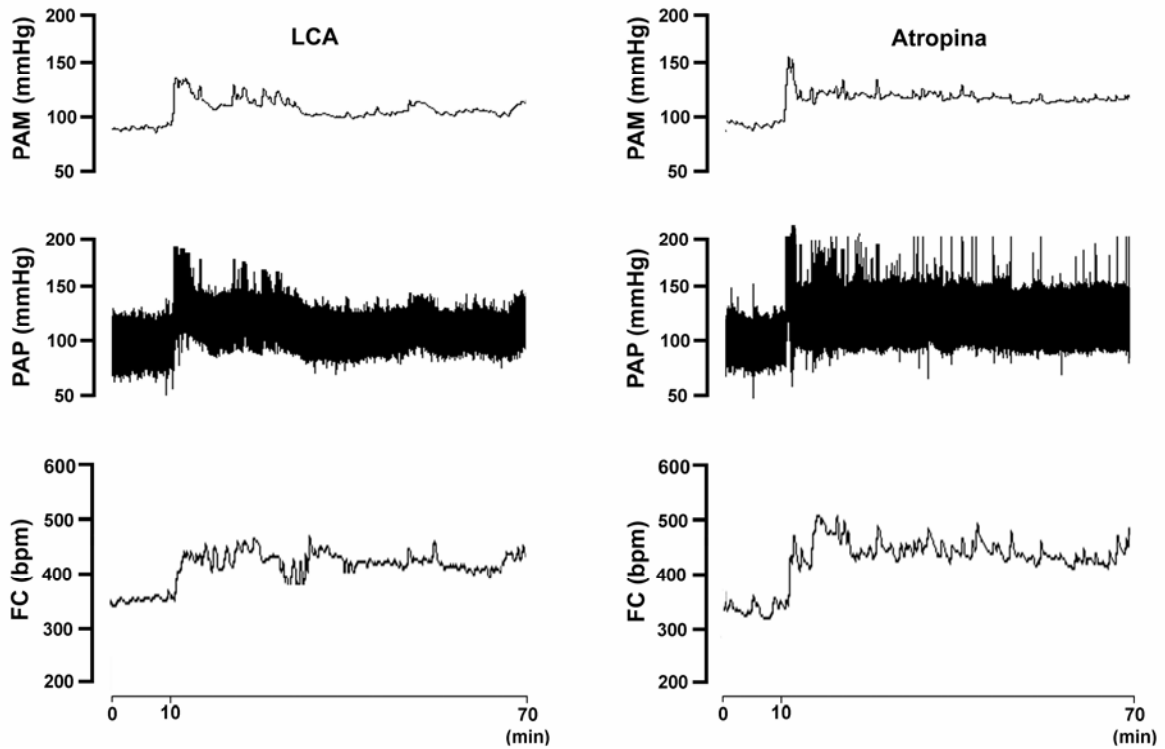


Figura 9- Registros representativos de rato do grupo controle tratado com microinjeção bilateral de LCA e de rato tratado com atropina, submetidos ao ER, mostrando as alterações na pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) observadas durante o período de 60 min de restrição. O início da restrição ocorreu em  $t=10$  min.

## **5- Efeito da microinjeção de um antagonista muscarínico M1 no NMA sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

A microinjeção de pirenzepina no NMA não alterou os valores basais de PA. A PAM antes de pirenzepina=  $93 \pm 5$ mmHg e 10 min após pirenzepina=  $95 \pm 5$ mmHg,  $t=0.8639$ ,  $P=0,4208$ ,  $n=7$  ou da FC, antes de pirenzepina=  $369 \pm 11$ bpm e 10 min após pirenzepina=  $372 \pm 14$ bpm,  $t=0.3929$ ,  $P=0,7080$ ,  $n=7$ .

Diagramas modificados do atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 1997), indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de pirenzepina e LCA nos cérebros dos ratos utilizados estão apresentados na Figura 10.

O ER causou aumento tanto da PA quanto da FC nos animais do grupo controle (100nL LCA bilateral) ou tratados com pirenzepina (6nmol) bilateralmente no NMA. O ER causou resposta taquicárdica significativamente maior nos ratos tratados com pirenzepina quando comparado aos animais controle (Interação:  $F_{5,78}=3,366$ ,  $P=0,0083$ ; Tratamento:  $F_{1,78}=20,70$ ,  $P<0,0001$ ; Tempo:  $F_{5,78}=20,93$ ,  $P<0,0001$ , ANOVA de 2 fatores). Não houve diferença significativa nas respostas pressoras ao ER entre os grupos pirenzepina e controle (Interação:  $F_{5,78}=0,2552$ ,  $P=0,9360$ ; Tratamento:  $F_{1,78}=0,2719$ ,  $P=0,6036$ ; Tempo:  $F_{5,78}=31,25$ ,  $P<0,0001$ , ANOVA de 2 fatores), Figura 11.

Registros representativos de rato do grupo controle e de rato tratado com a microinjeção bilateral de pirenzepina, mostrando os efeitos do tratamento com pirenzepina sobre as alterações cardiovasculares decorrentes ao ER estão apresentados na Figura 12.



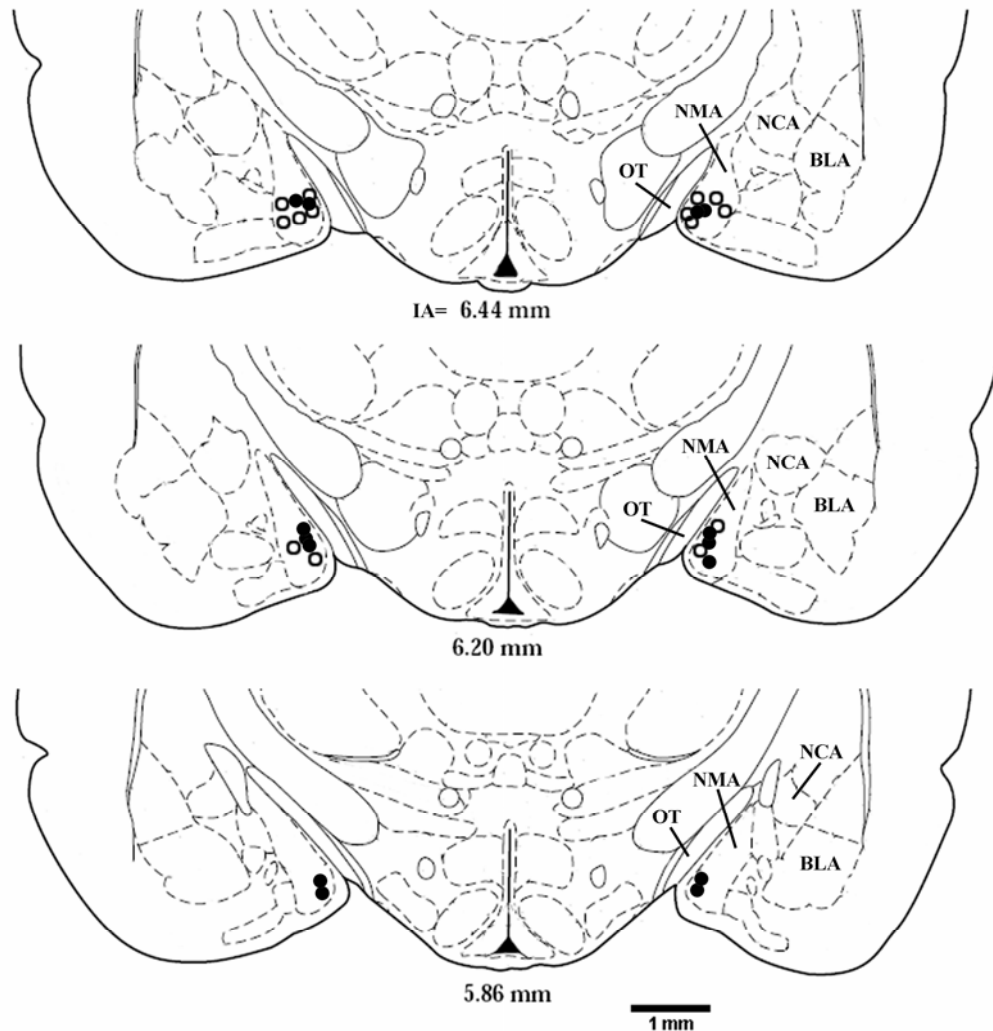


Figura 10- Diagramas modificados do atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 1997) indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de pirenzepina (●) e LCA (○) no núcleo medial da amígdala (NMA). IA – interaural. NCA - núcleo central da amígdala. BLA - núcleo basolateral da amígdala. OT - trato óptico.

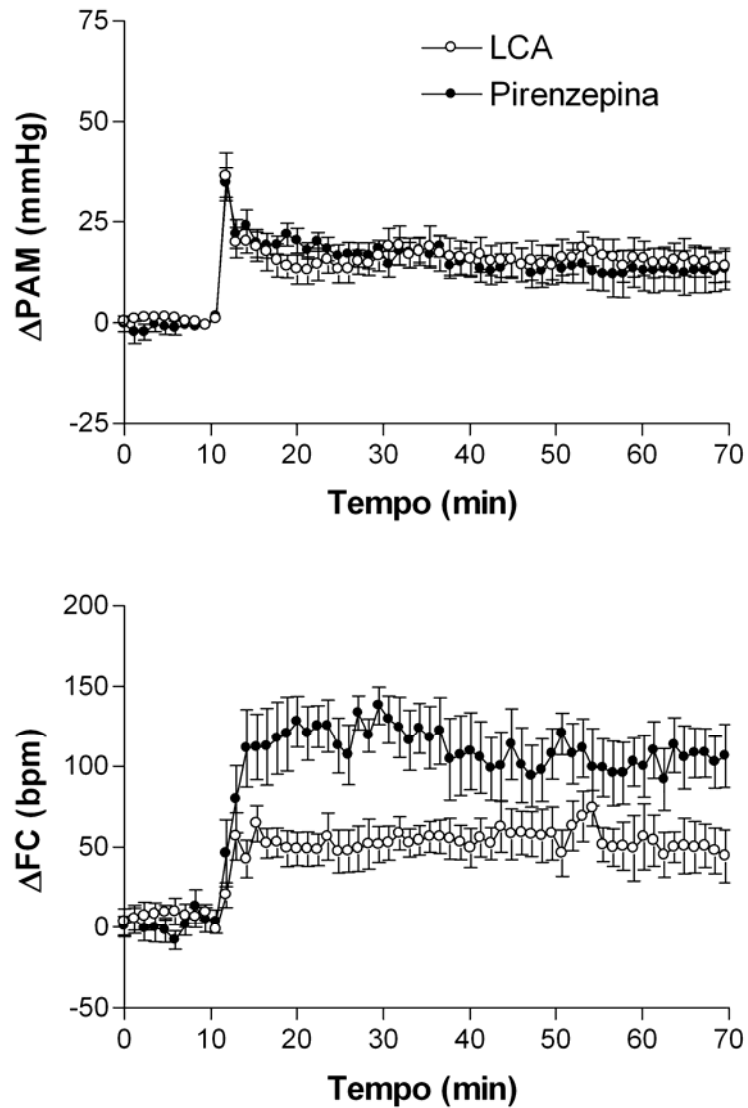


Figura 11- Curvas temporais mostrando as alterações na PAM e FC observadas durante o ER em tratados com 100nL LCA bilateral (n =7) ou pirenzepina (6nmol) bilateral (n=7).

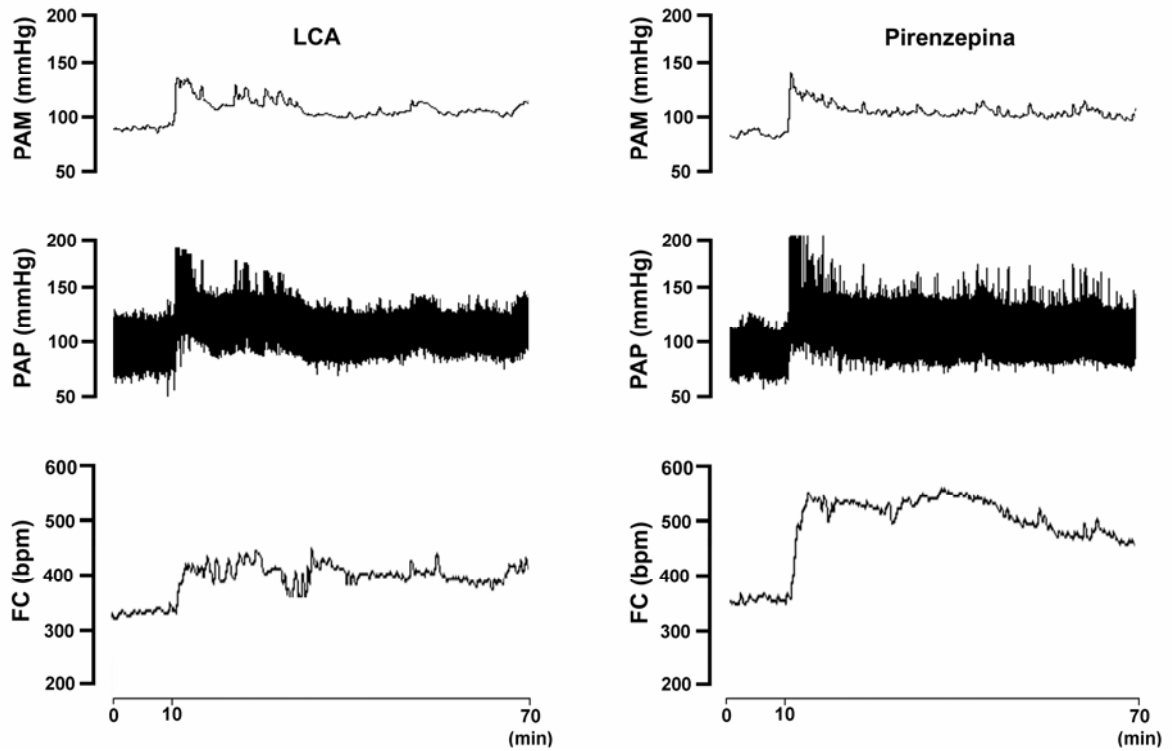


Figura 12- Registros representativos de rato do grupo controle tratado com microinjeção bilateral de LCA e de rato tratado com pirenzepina, submetidos ao ER, mostrando as alterações na pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) observadas durante o período de 60 min de restrição. O início da restrição ocorreu em  $t=10$  min.

## **6- Efeito da microinjeção de um antagonista muscarínico M2 na NMA sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

A microinjeção de 4-DAMP no NMA não alterou os valores basais de PA. A PAM antes de 4-DAMP=  $99 \pm 2$ mmHg e 10 min após 4-DAMP=  $100 \pm 3$ mmHg,  $t=0.3329$ ,  $P=0,7477$ ,  $n=9$  ou da FC, antes de 4-DAMP=  $345 \pm 14$ bpm e 10 min após 4-DAMP=  $367 \pm 16$ bpm,  $t=1.227$ ,  $P=0,2545$ ,  $n=9$ .

Diagramas modificados do atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 1997), indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de 4-DAMP e LCA nos cérebros dos ratos usados estão apresentados na Figura 13.

O estresse agudo por restrição causou aumento tanto da PA quanto da FC nos animais do grupo controle (LCA 100nL bilateral) ou tratados com 4-DAMP (2nmol, bilateral) no NMA. Não houve diferença significativa no padrão das respostas cardiovasculares ( $\Delta$ PAM: Interação:  $F_{5,90}=0,8292$ ,  $P=0,5322$ ; Tratamento:  $F_{1,90}=1,160$ ,  $P=0,2843$ ; Tempo:  $F_{5,90}=28,35$ ,  $P<0,0001$ .  $\Delta$ FC: Interação:  $F_{5,90}=0,7688$ ,  $P=0,5747$ ; Tratamento:  $F_{1,90}=0,2962$ ,  $P=0,5876$ ; Tempo:  $F_{5,90}=10,61$ ,  $P<0,0001$ , análise de variância de 2 fatores), Figura 14.

Registros representativos de rato do grupo controle e de rato tratado com microinjeção bilateral de 4-DAMP, mostrando os efeitos o tratamento com 4-DAMP sobre alterações cardiovasculares decorrentes ao ER estão apresentados na Figura 15.

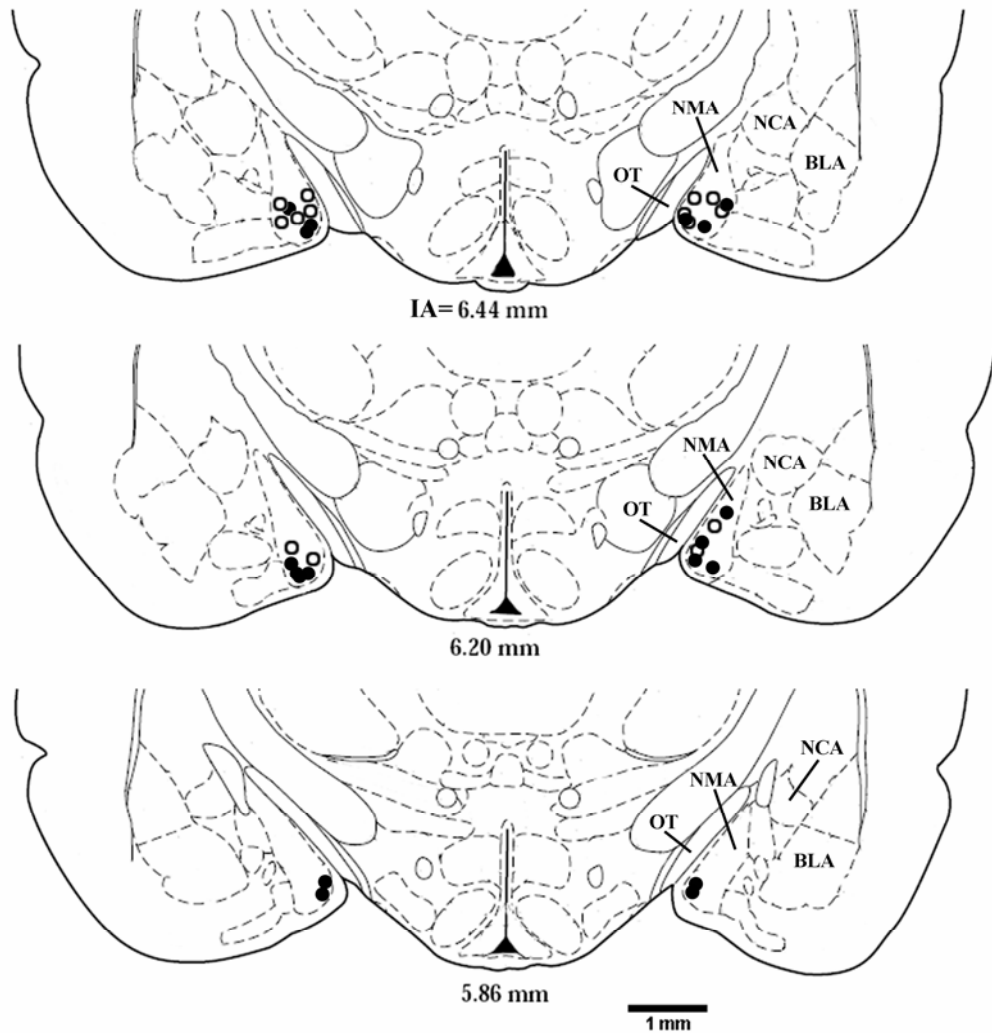


Figura 13- Diagramas modificados do atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 1997) indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de 4-DAMP (●) e LCA (○) no núcleo medial da amígdala (NMA). IA – interaural. NCA - núcleo central da amígdala. BLA - núcleo basolateral da amígdala. OT - trato óptico.

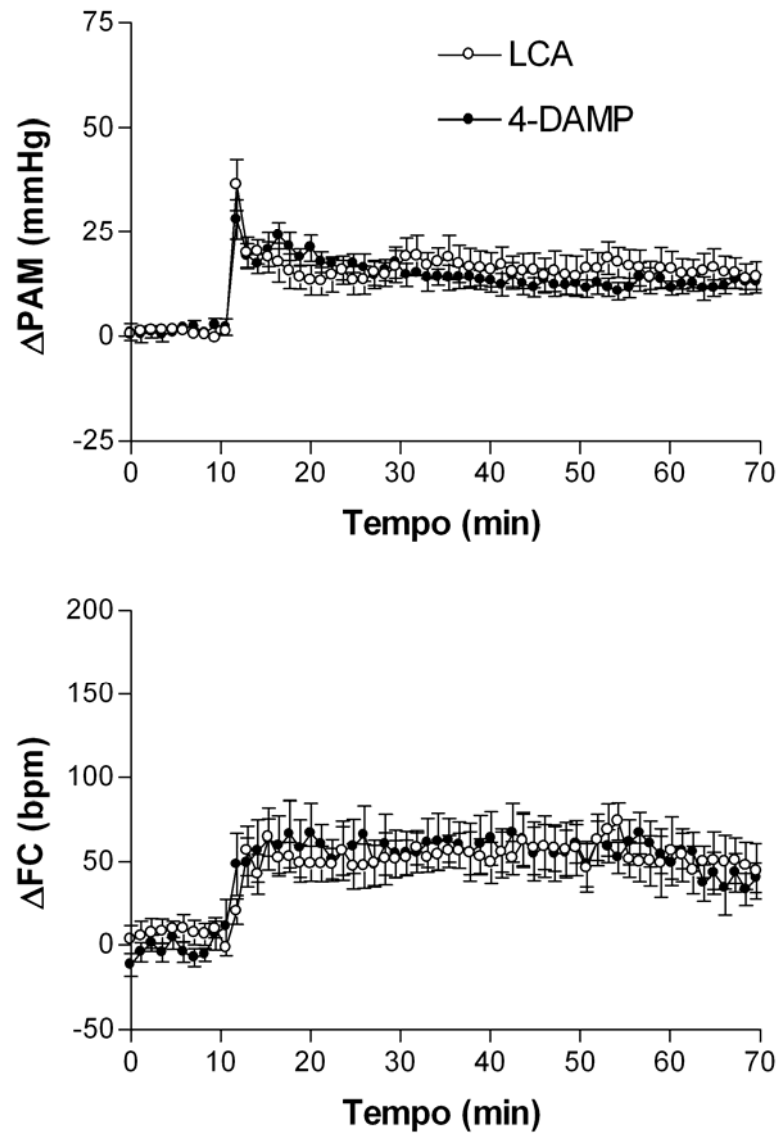


Figura 14- Curvas temporais mostrando as alterações na PAM e FC observadas durante o ER em tratados com 100nL LCA bilateral (n =7) ou 4-DAMP (2nmol) bilateral (n=9).

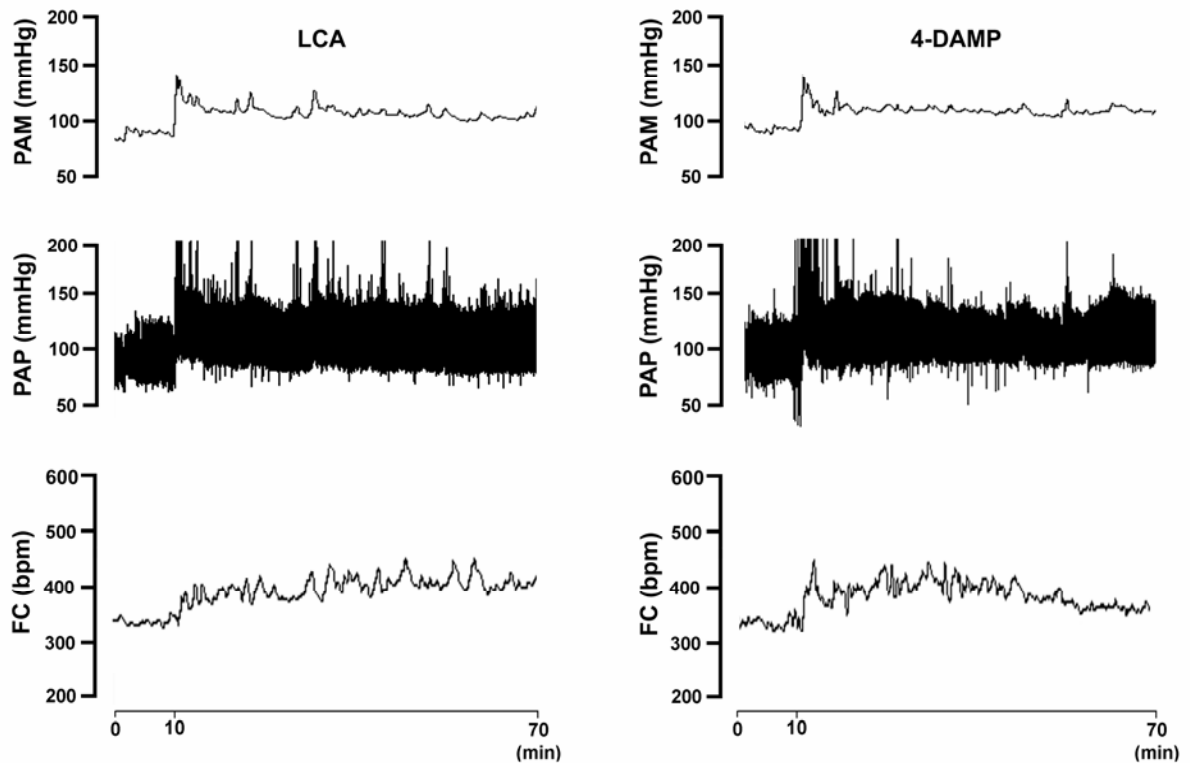


Figura 15- Registros representativos de rato do grupo controle tratado com microinjeção bilateral de LCA e de rato tratado com 4-DAMP, submetidos ao ER, mostrando as alterações na pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) observadas durante o período de 60 min de restrição. O início da restrição ocorreu em  $t=10$  min.

## **7- Efeito da microinjeção de um inibidor da captação da colina no NMA sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

A microinjeção de hemicolínio no NMA não alterou os valores basais de PA. A PAM antes de hemicolínio=  $93 \pm 3$ mmHg e 10 min após hemicolínio=  $115 \pm 11$ mmHg,  $t=2.080$ ,  $P=0,1060$ ,  $n=5$  ou da FC, antes de hemicolínio=  $340 \pm 12$ bpm e 10 min após hemicolínio=  $367 \pm 14$ bpm,  $t=1.186$ ,  $P=0,3011$ ,  $n=5$ .

Diagramas modificados do atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 1997), indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de hemicolínio (●) e LCA (○) nos cérebros dos ratos utilizados estão apresentados na Figura 16.

O ER causou aumento tanto da PA quanto da FC tanto nos animais do grupo controle (100nL LCA bilateral) quanto nos tratados com hemicolínio (2nmol, bilateral) no NMA. O ER causou resposta taquicárdica significativamente maior nos ratos tratados com hemicolínio quando comparados a animais controles (Interação:  $F_{5,66}=5,662$ ,  $P=0,0002$ ; Tratamento:  $F_{1,66}=38,42$ ,  $P<0,0001$ ; Tempo:  $F_{5,66}=25,69$ ,  $P<0,0001$ , ANOVA de 2 fatores). Não houve diferença significativa nas respostas pressoras ao ER entre os grupos hemicolínio e controle (Interação:  $F_{5,66}=0,3029$ ,  $P=0,9095$ ; Tratamento:  $F_{1,66}=0,3207$ ,  $P=0,5731$ ; Tempo:  $F_{5,66}=24,90$ ,  $P<0,0001$ , ANOVA de 2 fatores), Figura 17.

Registros representativos de rato do grupo controle e de rato tratado com microinjeção bilateral de hemicolínio, mostrando os efeitos do tratamento com hemicolínio sobre as alterações cardiovasculares decorrentes ao ER estão apresentados na Figura 18.



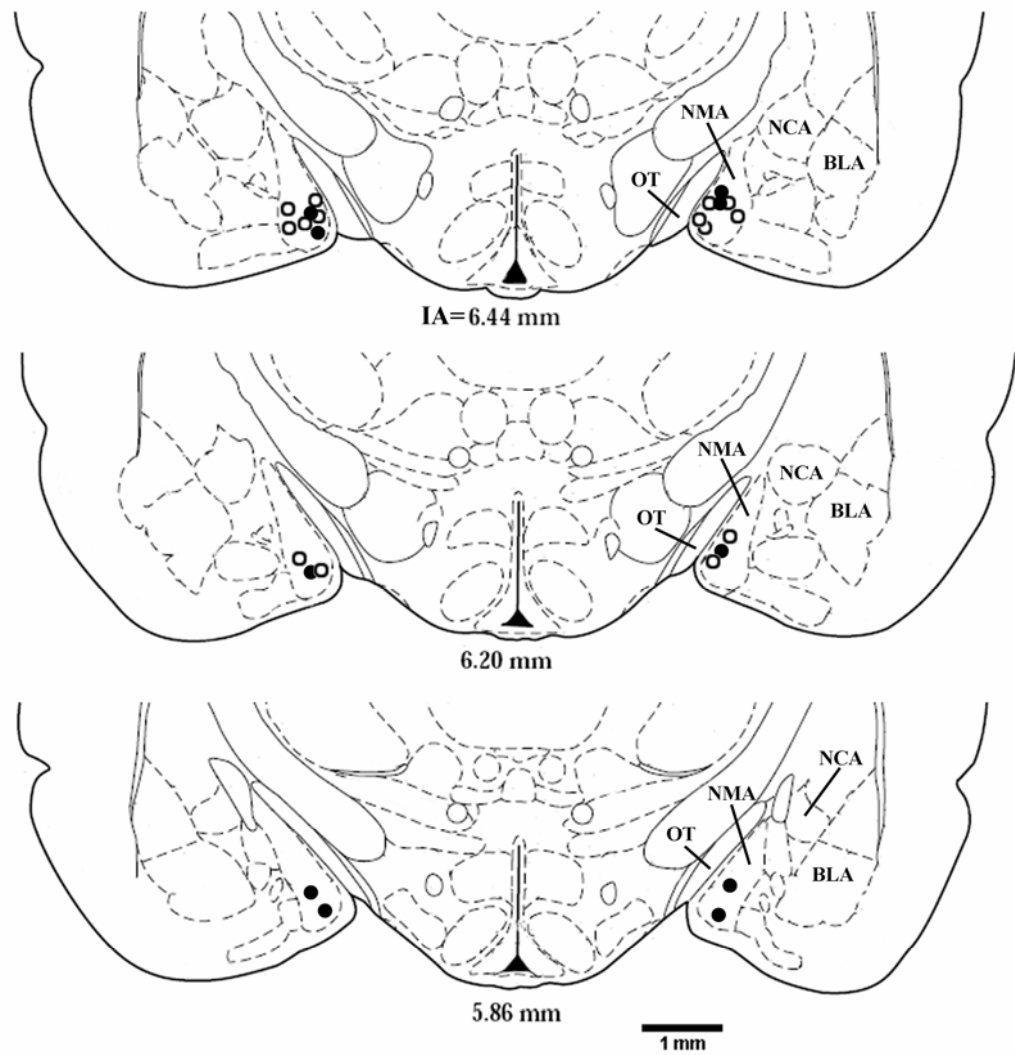


Figura 16- Diagramas modificados do atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 1997) indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de hemicolínio (●) e LCA (○) no núcleo medial da amígdala (NMA). IA – interaural. NCA - núcleo central da amígdala. BLA - núcleo basolateral da amígdala. OT - trato óptico.

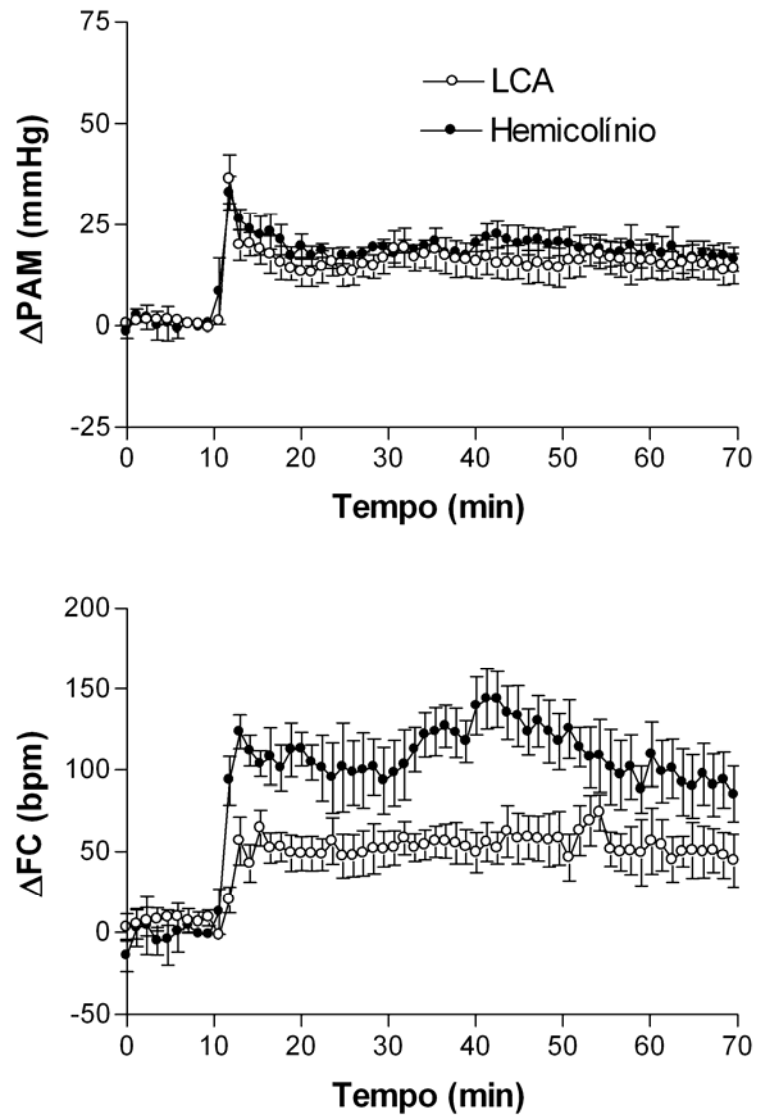


Figura 17- Curvas temporais mostrando as alterações na PAM e FC observadas durante o ER em tratados com 100nL LCA bilateral (n= 7) ou hemicolinio (2nmol) bilateral (n= 5).

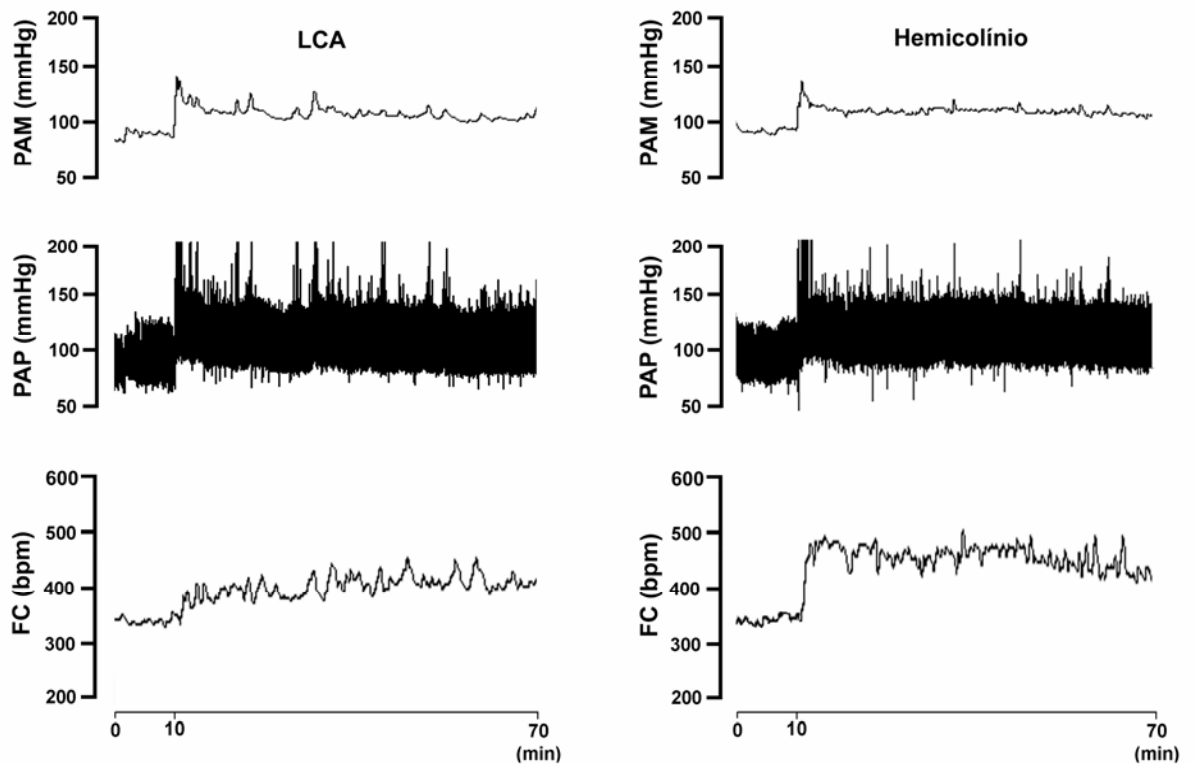


Figura 18- Registros representativos de rato do grupo controle tratado com microinjeção bilateral de LCA e de rato tratado com hemicolinio, submetidos ao ER, mostrando as alterações na pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) observadas durante o período de 60 min de restrição. O início da restrição ocorreu em  $t=10$  min.

## **8- Efeito de um anticolinesterásico na NMA sobre as respostas cardiovasculares ao ER.**

A microinjeção de neostigmina no NMA não alterou os valores basais de PA. A PAM antes de neostigmina=  $94 \pm 2$ mmHg e 10 min após neostigmina=  $100 \pm 4$ mmHg,  $t=1.242$ ,  $P=0,2541$ ,  $n=8$  ou da FC, antes de neostigmina =  $348 \pm 10$ bpm e 10m in após neostigmina =  $349 \pm 7$ bpm,  $t=0.2161$ ,  $P=0,8351$ ,  $n=8$ .

Diagramas modificados do atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 1997), indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de neostigmina e LCA nos cérebros dos ratos usados estão apresentados na Figura 19.

O ER causou aumento tanto da PA quanto da FC nos animais do grupo controle (100nL LCA bilateral) ou tratados com neostigmina (1nmol, bilateral) no NMA. Não houve diferença significativa no padrão das respostas cardiovasculares ( $\Delta$ PAM: Interação:  $F_{5,78}=0,4324$ ,  $P=0,8247$ ; Tratamento:  $F_{1,78}=0,6914$ ,  $P=0,4082$ ; Tempo:  $F_{5,78}=21,85$ ,  $P<0,0001$ .  $\Delta$ FC: Interação:  $F_{5,78}=0,8190$ ,  $P=0,5398$ ; Tratamento:  $F_{1,78}=0,1722$ ,  $P=0,6793$ ; Tempo:  $F_{5,78}=10,04$ ,  $P<0,0001$ , ANOVA de 2 fatores), Figura 20.

Registros representativos de rato do grupo controle e de rato tratado com a microinjeção bilateral de neostigmina, mostrando os efeitos do tratamento com neostigmina sobre as alterações cardiovasculares decorrentes ao ER estão apresentados na Figura 21.

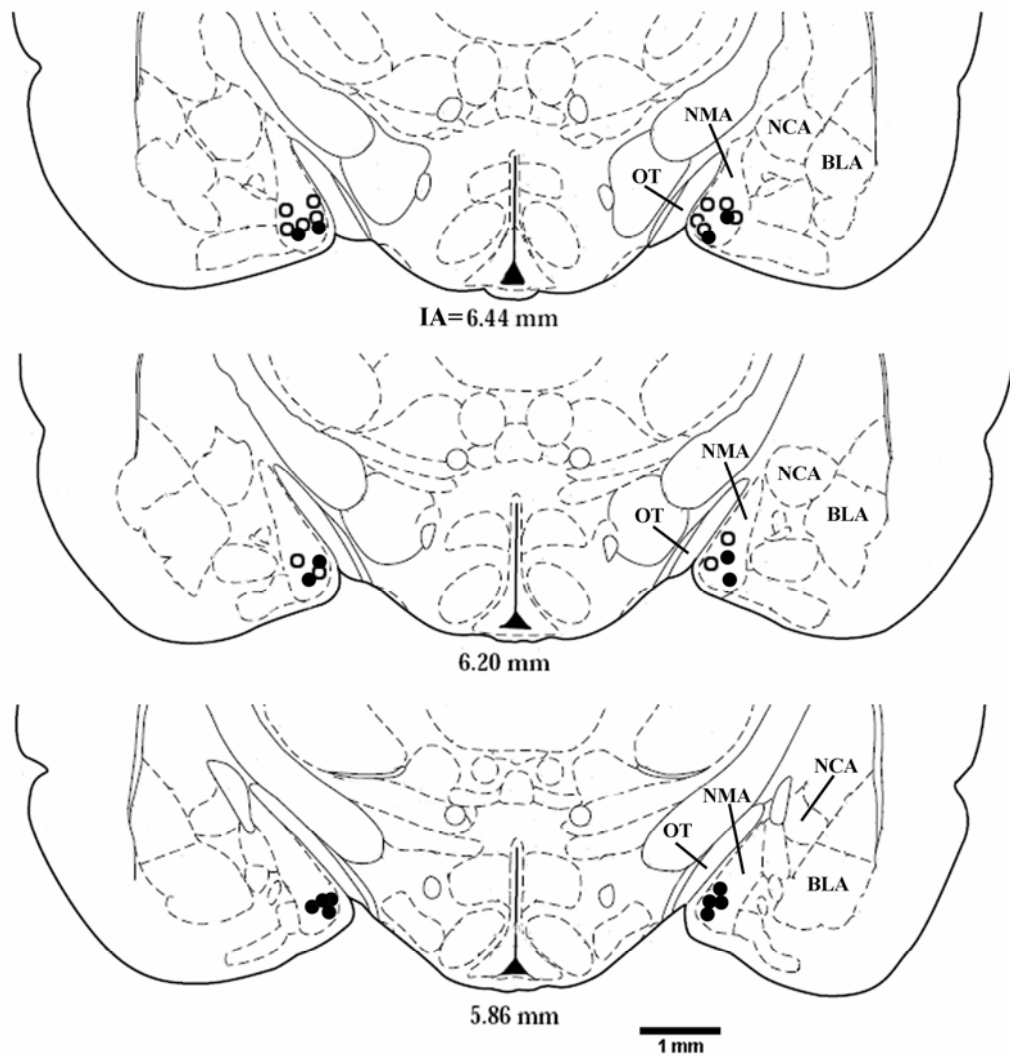


Figura 19- Diagramas modificados do atlas do cérebro de rato (PAXINOS e WATSON, 1997) indicando a dispersão dos sítios de microinjeção de neostigmina (●) e LCA (○) no núcleo medial da amígdala (NMA). IA – interaural. NCA - núcleo central da amígdala.

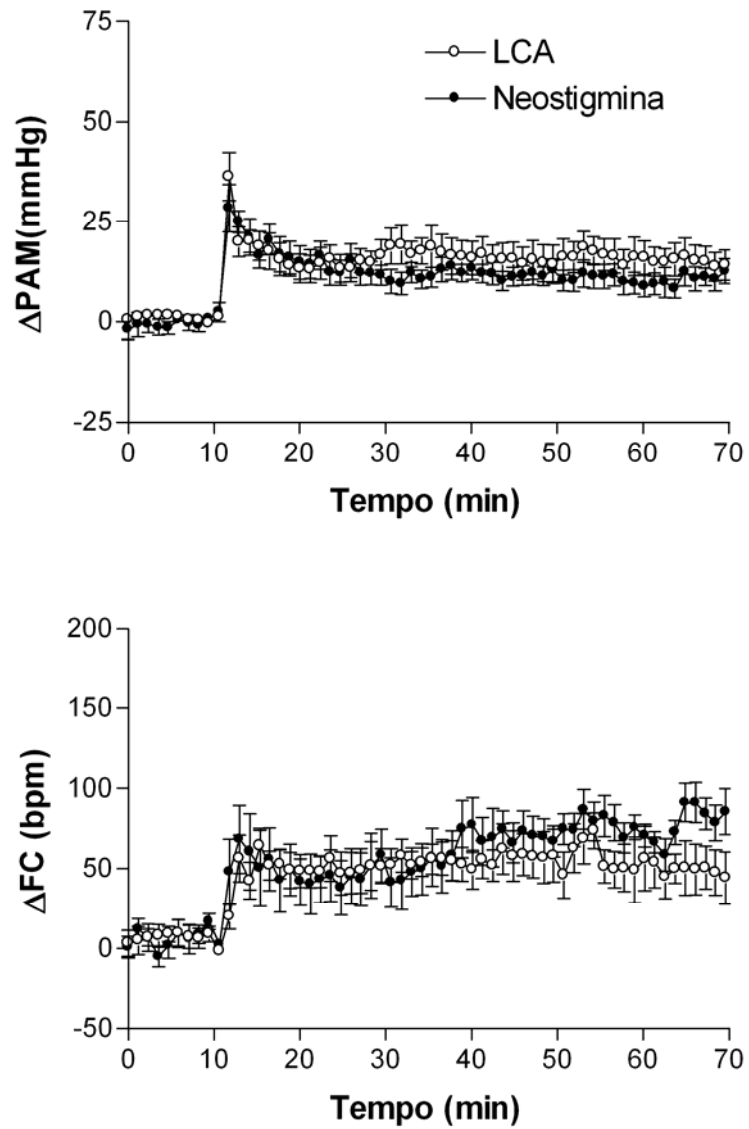


Figura 20- Curvas temporais mostrando as alterações na PAM e FC observadas durante o ER em tratados com 100nL LCA bilateral (n= 7) ou neostigmina (1nmol) bilateral (n= 8).

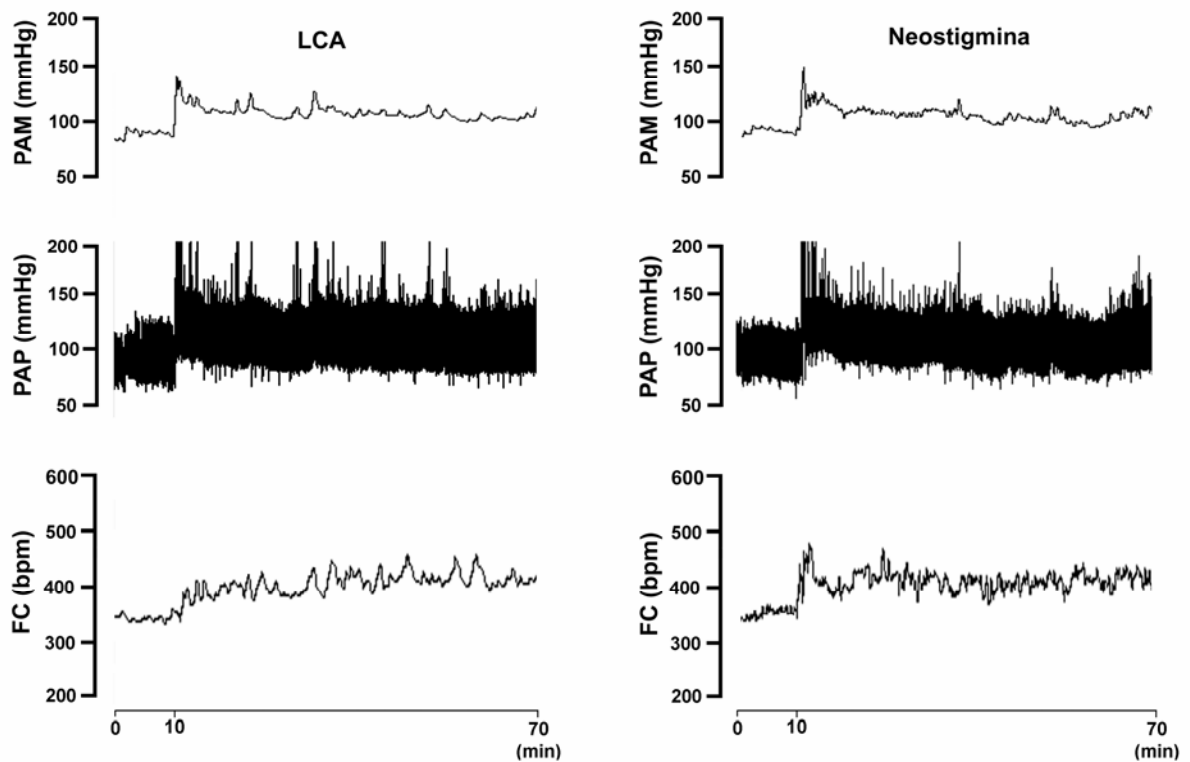


Figura 21- Registros representativos de rato do grupo controle tratado com microinjeção bilateral de LCA e de rato tratado com neostigmina, submetidos ao ER, mostrando as alterações na pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) observadas durante o período de 60 min de restrição. O início da restrição ocorreu em  $t=10$  min.

**DISCUSSÃO**



No presente trabalho mostramos o papel inibitório do NMA sobre a resposta taquicárdica associada ao ER em ratos. A microinjeção bilateral de inibidor sináptico; antagonistas muscarínicos seletivos e não-seletivos ou de inibidor da captação de colina, aumentou a resposta taquicárdica sem alterar a resposta pressora associada ao ER. A microinjeção bilateral de um anticolinesterásico não alterou de forma significativa o padrão das respostas cardiovasculares ao ER.

A estimulação elétrica da amígdala, além de causar alterações cardiovasculares, como aumento da pressão arterial, taquicardia e vasodilatação na musculatura esquelética também causou aumento nas reações de defesa, que foram caracterizadas por aumento no período de alerta e atenção em ratos (HILTON e ZBROZYNA, 1963; STOCK *et al.*, 1978; GALENO *et al.*, 1982). Além disso, a estimulação elétrica em diferentes núcleos do complexo amigdalóide causou efeitos cardiovasculares tanto pressores quanto depressores, dependendo do núcleo estimulado e do uso de anestésicos, porém a estimulação química com ácido homocistêmico (agonista glutamatérgico) nesses núcleos não causou alterações cardiovasculares em ratos não anestesiados (GELSEMA *et al.*, 1987). Em contraste, a microinjeção de L-glutamato no núcleo central amígdala causou respostas pressoras e taquicárdica em ratos não anestesiados (IWATA *et al.*, 1987). Portanto, é provável que os efeitos cardiovasculares da estimulação elétrica dessa área sejam decorrentes da ativação de corpos celulares, e não fibras de passagem.

O ER é um estímulo aversivo inescapável que causa alteração cardiovascular, caracterizada por aumento na pressão arterial e frequência cardíaca (BARRON e VAN LOON, 1989; CHEN e HERBERT, 1995; KUBO *et al.*, 2004; MCDOUGALL *et al.*, 2005; TAVARES e CORREA, 2006; SALOME *et al.*, 2007). Além disso, diferentes mecanismos podem ser evocados durante o ER, tais como aumento nos

níveis sanguíneos do fator de liberação de corticotropina (CRF), que desempenha um papel importante na secreção adrenocorticotropina (ACTH) e corticosteroides (HARBUZ *et al.*, 1992).

O aumento na PA e FC, induzidos por esse estresse psicológico é predominantemente mediado por aumento na atividade do sistema nervoso simpático cardíaco (BARRON e VAN LOON, 1989).

O ER aumenta a atividade do eixo HPA e a liberação de ocitocina, mas não de vasopressina, (LANG *et al.*, 1983; GIBBS, 1984; CARTER e LIGHTMAN, 1987; CALLAHAN *et al.*, 1992; DAYAS *et al.*, 1999). A idéia do envolvimento do NMA na mediação de respostas causadas por estresse é reforçada por dados na literatura que evidenciaram que a estimulação elétrica deste núcleo, em ratos anestesiados, causa ativação do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA), (DUNN e WHITENER, 1986).

A microinjeção de cobalto em núcleos do sistema nervoso central é uma ferramenta farmacológica amplamente utilizada para causar bloqueio da transmissão sináptica, atuando na condutância dos canais de cálcio (KRETZ, 1984). No presente estudo, nós observamos que a ablação farmacológica do NMA pela microinjeção bilateral de cobalto não afetou o aumento da pressão arterial evocada pelo ER, mas causou aumento significativo na resposta taquicárdica observada durante a restrição. Este resultado sugere que a neurotransmissão no NMA modula de forma inibitória o componente cardíaco da resposta cardiovascular ao ER.

Estruturas tais como a área septal lateral (KUBO *et al.*, 2002; KANAYA *et al.*, 2003), o hipotálamo lateral (KUBO *et al.*, 2001; KROUT *et al.*, 2005), o córtex pré-frontal medial (TAVARES e CORREA, 2006), o núcleo leito da estria terminal (CRESTANI *et al.*, 2008) e os núcleos central e medial da amígdala (KUBO *et al.*,

2004; SALOME *et al.*, 2007) fazem parte do circuito de áreas que modulam a resposta cardiovascular ao ER. Estudos da literatura indicam uma maior participação do NMA em situações de estresse e dentre os outros núcleos da amígdala, foi observado uma maior expressão de proteína c-fos no NMA após exposição a situações aversivas (CANTERAS *et al.*, 1995; CHEN e HERBERT, 1995; CULLINAN *et al.*, 1995; DAYAS *et al.*, 2001a; DAYAS *et al.*, 2001b; KUBO *et al.*, 2004; CRANE *et al.*, 2005; TRNECKOVA *et al.*, 2006).

Kubo *et al.* (2004) relataram o envolvimento do NMA na mediação das respostas pressoras induzidas pelo ER. A inibição desta área pela ativação de receptores gabaérgicos por meio da microinjeção bilateral de muscimol atenuou a resposta pressora desencadeada pelo ER. A ocorrência de taquicardia, em ratos, durante exposição a situações estressantes está bem documentada na literatura (BARRON e VAN LOON, 1989; CHEN e HERBERT, 1995; MCDUGALL *et al.*, 2005; TAVARES e CORREA, 2006; SALOME *et al.*, 2007). No entanto, Kubo *et al.* (2004) não registraram as respostas de FC durante seu experimento e utilizaram muscimol (agonista gabaérgico) para inibir a atividade do NMA. Diferentemente, usamos o cobalto que, por competir com o  $Ca^{2+}$ , inibe todos os tipos de neurotransmissão na área em estudo e observamos aumento da resposta taquicárdica ao ER.

Salomé e cols. relataram que a inibição farmacológica do núcleo central da amígdala (NCA) por estimulação de receptores gabaérgicos através da microinjeção de muscimol atenuou a resposta taquicárdica desencadeada pelo ER (SALOME *et al.*, 2007). Além disso, esses autores sugeriram que a taquicardia provocada pelo ER envolve dois componentes: inicialmente um componente independente da amígdala, visto que o bloqueio do NCA não afetou a magnitude do início da resposta

taquicárdica, e um segundo, dependente da amígdala, uma vez que a manutenção da taquicardia foi totalmente abolida após o bloqueio. Portanto, estes resultados juntamente com os nossos, que mostraram que ablação farmacológica do NMA com cobalto aumentou a resposta taquicárdica durante o ER, sugerem que os núcleos central e medial da amígdala modulem respostas cardiovasculares a situações aversivas, de forma opostas. Todavia Salome et al., (2007) não mostraram os efeitos da inibição do NCA na resposta pressora durante o ER.

Estudos da literatura indicam a presença de acetilcolina, colina acetiltransferase, acetilcolinesterase e de receptores muscarínicos no NMA (HOOVER *et al.*, 1978; ROTTER *et al.*, 1979), caracterizando a existência de neurotransmissão colinérgica neste núcleo.

Em outro estudo, após a administração de carbacol (agonista muscarínico não seletivo), de serotonina ou de noradrenalina no NMA, apenas o carbacol causou respostas pressora e taquicárdica. Além disso, as respostas ao carbacol foram mediadas por receptores muscarínicos (OHTA *et al.*, 1991), mostrando que a neurotransmissão colinérgica no NMA, via receptores muscarínicos, é capaz de modular a atividade cardiovascular em ratos.

Para verificar o papel da neurotransmissão colinérgica do NMA na resposta cardiovascular associada ao ER, animais foram pré-tratados bilateralmente com atropina (antagonista muscarínico não seletivo). O bloqueio dos receptores muscarínicos do NMA causou aumento da taquicardia, semelhante ao observado após a inibição farmacológica dessa área com cobalto, sugerindo que neurotransmissão colinérgica local module de forma inibitória as respostas cardiovasculares causadas pelo ER.

Uma vez que nós observamos que a neurotransmissão colinérgica existente no NMA poderia modular a resposta cardiovascular ao ER, tornou-se relevante avaliar qual subtipo de receptor muscarínico estaria envolvido nesta resposta. Para determinar qual o subtipo de receptor muscarínico mediará o aumento na resposta taquicárdica ao ER, os animais foram pré-tratados bilateralmente com pirenzepina (antagonista muscarínico do subtipo M1) e 4-DAMP (antagonista muscarínico do subtipo M3). O bloqueio dos receptores muscarínicos do subtipo M1 no NMA aumentou a resposta taquicárdica, sugerindo o envolvimento destes receptores na modulação da resposta cardiovascular causada pelo ER, enquanto que o bloqueio dos receptores muscarínicos do subtipo M3 não afetou a resposta taquicárdica ao ER. Dados da literatura indicam que a pirenzepina (seletividade relativa  $M1 \gg M2 = M3$ ) e 4-DAMP (seletividade relativa  $M1 = M3 > M2$ ) são equipotentes para M1, enquanto que o 4-DAMP é 10-100 vezes mais potente que a pirenzepina em receptores M2 ou M3 (HULME *et al.*, 1990). Experimentos utilizando técnica de auto-radiografia, indicaram a presença predominante de receptores muscarínicos do subtipo M1 no NMA (SPENCER *et al.*, 1986).

Os resultados do nosso estudo indicam que sinapses no NMA exercem papel inibitório sobre o componente cardíaco da resposta cardiovascular ao ER observados em ratos. Além disso, também mostram que este papel inibitório é mediado por receptores colinérgicos do subtipo M1. Ainda, a microinjeção unilateral de carbacol ou a estimulação elétrica do NCA causou aumento da pressão arterial, mediado por receptores muscarínicos do subtipo M1 (ASLAN *et al.*, 1997). Estas observações sugerem que, ao nível do complexo amigdalóide, a neurotransmissão colinérgica envolve a participação de receptores muscarínicos do subtipo M1.

Para confirmar o envolvimento da neurotransmissão colinérgica local do NMA na modulação das respostas cardíacas evocadas pelo ER, nós pré-tratamos o NMA com o inibidor do carreador de colina hemicolínio, o qual bloqueia a síntese de acetilcolina. O tratamento com hemicolínio aumentou a resposta taquicárdica ao ER, de forma semelhante ao observado após o tratamento com cobalto, atropina ou pirenzepina. Este resultado sugere fortemente o envolvimento de neurotransmissão colinérgica do NMA, exercendo papel inibitório sobre o componente cardíaco da resposta cardiovascular ao ER, observada em ratos.

Resultados prévios mostraram que áreas do sistema límbico, como o córtex pré-frontal medial (CPFM) e o núcleo leito da estria terminal (NLET), exercem influência excitatória sobre o componente cardíaco parassimpático nas repostas cardiovasculares induzidas pelo ER (TAVARES e CORREA, 2006; CRESTANI *et al.*, 2008). Esses dados sugerem que a atividade parassimpática está envolvida com a modulação da atividade cardíaca, taquicardia, durante o ER. No mesmo sentido, nossos dados mostraram que o NMA também parece ter uma função modulatória sobre o componente cardíaco durante o estresse, provavelmente por aumentar a atividade parassimpática. Assim, uma vez que o NMA apresenta conexões com CPFM e NLET, o mesmo poderia participar dessa via de modulação cardiovascular durante essa situação aversiva (CANTERAS *et al.*, 1995; VERTES, 2004). Entretanto, nossos dados não descartam a possível influência do NMA sobre o componente simpático cardíaco, uma vez que o aumento da atividade simpática também levaria a aumentos da taquicardia associada ao ER.

Estruturas prosencefálicas constituem a maior fonte de inervação colinérgica para a formação hipocampal, amígdala, bulbo olfatório e diferentes áreas corticais. Neurônios colinérgico no septo medial e porção vertical da banda diagonal projetam-se predominantemente para o hipocampo, enquanto que neurônios do núcleo magnocelular basal e substância inominata inervam o córtex cerebral e a amígdala. (AMARAL e WITTER, 1995). Além disso, essa complexa rede neuronal colinérgica foi mostrada estar envolvida em respostas autonômicas ao estresse (GILAD *et al.*, 1985; GILAD *et al.*, 1986) ou em reações de defesa (HILTON *et al.*, 1983; HILTON e SMITH, 1984).

Os resultados do nosso estudo indicam que sinapses colinérgicas e receptores muscarínicos do subtipo M1 presentes no NMA exerçam papel inibitório importante sobre o componente cardíaco das respostas cardiovasculares ao ER, em ratos. Assim, o NMA participaria do circuito neuronal envolvido na modulação de respostas cardiovascular correlatas a respostas comportamentais observadas durante exposição a situações aversivas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



AGGLETON, J. P. The amygdala, a functional analysis. Oxford: Oxford University Press. 2000

AGGLETON, J. P., R. W. KENTRIDGE, *et al.* Lesions of the fornix but not the amygdala impair the acquisition of concurrent discriminations by rats. *Behav Brain Res*, v.48, n.2, Jun 8, p.103-12. 1992.

ALLY, A., Y. HARA, *et al.* Cardiovascular effects of central administration of cholinomimetics in anesthetized cats. *Neuropharmacology*, v.32, n.2, Feb, p.185-93. 1993.

ALVES, F. H., C. C. CRESTANI, *et al.* Cardiovascular effects of carbachol microinjected into the bed nucleus of the stria terminalis of the rat brain. *Brain Res*, v.1143, Apr 27, p.161-8. 2007.

AMARAL, G. D. e M. P. WITTER. Hippocampal formation. In Paxinos, G.,(ed), *The Rat Nervous System*. Academic Press, San Diego p.443-493. 1995.

ASHWELL, K. W., C. D. HARDMAN, *et al.* Cyto- and chemoarchitecture of the amygdala of a monotreme, *Tachyglossus aculeatus* (the short-beaked echidna). *J Chem Neuroanat*, v.30, n.2-3, Oct, p.82-104. 2005.

ASLAN, N., Z. GOREN, *et al.* Modulation of the pressor response elicited by carbachol and electrical stimulation of the amygdala by muscarinic antagonists in conscious rats. *Br J Pharmacol*, v.121, n.1, May, p.35-40. 1997.

BARRON, B. A. e G. R. VAN LOON. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. *J Auton Nerv Syst*, v.28, n.2, Nov, p.179-87. 1989.

BEN-ARI, Y. The amygdaloid complex. Amsterdam: Elsevier. 1981

BRADY, D. R., R. G. CAREY, *et al.* Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) profiles in the amygdala of human and New World monkey (*Saimiri sciureus*). *Brain Res*, v.577, n.2, Apr 17, p.236-48. 1992.

BREZENOFF, H. E. e R. GIULIANO. Cardiovascular control by cholinergic mechanisms in the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.22, p.341-81. 1982.

BUCCAFUSCO, J. J. The role of central cholinergic neurons in the regulation of blood pressure and in experimental hypertension. *Pharmacol Rev*, v.48, n.2, Jun, p.179-211. 1996.

BUCCAFUSCO, J. J. e H. E. BREZENOFF. Pharmacological study of a cholinergic mechanism within the rat posterior hypothalamic nucleus which mediates a hypertensive response. *Brain Res*, v.165, n.2, Apr 13, p.295-310. 1979.

CALLAHAN, M. F., M. J. DA ROCHA, *et al.* Sinoaortic denervation does not increase cardiovascular/endocrine responses to stress. *Neuroendocrinology*, v.56, n.5, Nov, p.735-44. 1992.

CANTERAS, N. S., R. B. SIMERLY, *et al.* Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol*, v.360, n.2, Sep 18, p.213-45. 1995.

CARTER, D. A. e S. L. LIGHTMAN. Oxytocin stress responses are dependent upon emotionality. *Psychoneuroendocrinology*, v.12, n.3, p.219-23. 1987.

CHALMERS, J. e P. PILOWSKY. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. *J Hypertens*, v.9, n.8, Aug, p.675-94. 1991.

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

CRANE, J. W., K. R. FRENCH, *et al.* Patterns of neuronal activation in the rat brain and spinal cord in response to increasing durations of restraint stress. *Stress*, v.8, n.3, Sep, p.199-211. 2005.

CRESTANI, C. C., F. H. F. ALVES, *et al.* Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress*, v.in press. 2008.

CULLINAN, W. E., J. P. HERMAN, *et al.* Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*, v.64, n.2, Jan, p.477-505. 1995.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev*, v.74, n.2, Apr, p.323-64. 1994.

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

DAYAS, C. V., K. M. BULLER, *et al.* Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci*, v.14, n.7, Oct, p.1143-52. 2001a.

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

DAYAS, C. V., K. M. BULLER, *et al.* Medullary neurones regulate hypothalamic corticotropin-releasing factor cell responses to an emotional stressor. *Neuroscience*, v.105, n.3, p.707-19. 2001b.

DUNN, J. D. e J. WHITENER. Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the amygdaloid complex: cytoarchitectural specificity. *Neuroendocrinology*, v.42, n.3, p.211-7. 1986.

ELEFATHERIOU, B. E. The neurobiology of the amygdala. New York: Plenum Press. 1973

FAIERS, A. A., F. R. CALARESU, *et al.* Pathway mediating hypotension elicited by stimulation of the amygdala in the rat. *Am J Physiol*, v.228, n.5, May, p.1358-66. 1975.

FERNANDES, K. B., R. F. TAVARES, *et al.* The lateral septal area is involved in the pressor pathway activated by microinjection of norepinephrine into the rat brain cingulate cortex. *Neuropharmacology*, v.49, n.4, Sep, p.564-71. 2005.

GALENO, T. M., G. W. VAN HOESEN, *et al.* Central amygdaloid nucleus lesion attenuates exaggerated hemodynamic responses to noise stress in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res*, v.291, n.2, Jan 23, p.249-59. 1984.

GALENO, T. M., G. W. VAN HOESEN, *et al.* Contribution of the amygdala to the development of spontaneous hypertension. *Brain Res*, v.246, n.1, Aug 19, p.1-6. 1982.

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

GIBBS, D. M. Dissociation of oxytocin, vasopressin and corticotropin secretion during different types of stress. *Life Sci*, v.35, n.5, Jul 30, p.487-91. 1984.

GILAD, G. M., V. H. GILAD, *et al.* Dopaminergic modulation of the septo-hippocampal cholinergic system activity under stress. *Life Sci*, v.39, n.25, Dec 22, p.2387-93. 1986.

GILAD, G. M., B. D. MAHON, *et al.* Stress-induced activation of the hippocampal cholinergic system and the pituitary-adrenocortical axis. *Brain Res*, v.347, n.2, Nov 18, p.404-8. 1985.

GOLDSTEIN, D. S. Central catecholamines and the control of sympathetic tone. In 2, *Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation*, v.v.02. Eds. Kunos G., Cirello J., Boston. 1991.

GUYENET, P. G., R. A. DARNALL, *et al.* Rostral ventrolateral medulla and sympathorespiratory integration in rats. *Am J Physiol*, v.259, n.5 Pt 2, Nov, p.R1063-74. 1990.

HARA, Y., A. ALLY, *et al.* Central cardiovascular effects of physostigmine in anesthetized cats. *Neuropharmacology*, v.31, n.9, Sep, p.923-8. 1992.

HARBUZ, M. S., R. G. REES, *et al.* Paradoxical responses of hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) messenger ribonucleic acid (mRNA) and CRF-41 peptide and adenohipophysial proopiomelanocortin mRNA during chronic inflammatory stress. *Endocrinology*, v.130, n.3, Mar, p.1394-400. 1992.

HARUTA, K., A. IGUCHI, *et al.* Stimulation of muscarinic cholinergic neurons in the hippocampus evokes a pressor response with bradycardia. *Life Sci*, v.50, n.6, p.427-33. 1992.

HILTON, S. M. Hypothalamic regulation of the cardiovascular system. *Br Med Bull*, v.22, n.3, Sep, p.243-8. 1966.

HILTON, S. M., J. M. MARSHALL, *et al.* Ventral medullary relay neurones in the pathway from the defence areas of the cat and their effect on blood pressure. *J Physiol*, v.345, Dec, p.149-66. 1983.

HILTON, S. M. e P. R. SMITH. Ventral medullary neurones excited from the hypothalamic and mid-brain defence areas. *J Auton Nerv Syst*, v.11, n.1, Jul, p.35-42. 1984.

HILTON, S. M. e A. W. ZBROZYNA. Amygdaloid region for defence reactions and its efferent pathway to the brain stem. *J Physiol*, v.165, Jan, p.160-73. 1963.

HOOVER, D. B., E. A. MUTH, *et al.* A mapping of the distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in discrete areas of rat brain. *Brain Res*, v.153, n.2, Sep 22, p.295-306. 1978.

HULME, E. C., N. J. BIRDSALL, *et al.* Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.30, p.633-73. 1990.

IWATA, J., K. CHIDA, *et al.* Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses. *Brain Res*, v.418, n.1, Aug 18, p.183-8. 1987.

KAEHLER, S. T., C. SINNER, *et al.* Release of catecholamines in the locus coeruleus of freely moving and anaesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats: effects of cardiovascular changes and tail pinch. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v.361, n.4, Apr, p.433-9. 2000.

KANAYA, T., H. OKATANI, *et al.* Projections from the caudal part to the rostral part of the lateral septal area mediate blood pressure increase. *Brain Res Bull*, v.61, n.5, Sep 30, p.505-10. 2003.

KAPUSTA, D. R., L. A. DAYAN, *et al.* Nociceptin/orphanin FQ modulates the cardiovascular, but not renal, responses to stress in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v.29, n.3, Mar, p.254-9. 2002.

KNUEPFER, M. M., R. M. PURCELL, *et al.* Hemodynamic response patterns to acute behavioral stressors resemble those to cocaine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v.281, n.6, Dec, p.R1778-86. 2001.

KRETZ, R. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. *J Neurosci Methods*, v.11, n.2, Jun, p.129-35. 1984.

KROUT, K. E., T. C. METTENLEITER, *et al.* CNS neurons with links to both mood-related cortex and sympathetic nervous system. *Brain Res*, v.1050, n.1-2, Jul 19, p.199-202. 2005.



KUBO, T., T. KANAYA, *et al.* The lateral septal area is involved in mediation of immobilization stress-induced blood pressure increase in rats. *Neurosci Lett*, v.318, n.1, Jan 18, p.25-8. 2002.

KUBO, T., H. NUMAKURA, *et al.* Angiotensin receptor blockade in the anterior hypothalamic area inhibits stress-induced pressor responses in rats. *Brain Res Bull*, v.56, n.6, Dec, p.569-74. 2001.

KUBO, T., H. OKATANI, *et al.* Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats. *Neurosci Lett*, v.354, n.1, Jan 2, p.84-6. 2004.

LAM, W., W. J. LOUIS, *et al.* Effect of dorsal periaqueductal grey lesion on baroreflex and cardiovascular response to air-jet stress. *J Auton Nerv Syst*, v.53, n.1, May 17, p.35-42. 1995.

LANG, R. E., J. W. HEIL, *et al.* Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. *Neuroendocrinology*, v.37, n.4, Oct, p.314-6. 1983.

LEDOUX, J. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol Psychiatry*, v.44, n.12, Dec 15, p.1229-38. 1998.

LEONTOVICH, T. A., Y. K. MUKHINA, *et al.* Neurons of the basal ganglia of the human brain (striatum and basolateral amygdala) expressing the enzyme NADPH-d. *Neurosci Behav Physiol*, v.34, n.3, Mar, p.277-86. 2004.

LOEWY, A. D. Forebrain nuclei involved in autonomic control. *Prog Brain Res*, v.87, p.253-68. 1991.

LOEWY, A. D. e S. MCKELLAR. The neuroanatomical basis of central cardiovascular control. *Fed Proc*, v.39, n.8, Jun, p.2495-503. 1980.

MCDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol*, v.55, n.3, Jun, p.257-332. 1998.

MCDONALD, A. J., D. R. PAYNE, *et al.* Identification of putative nitric oxide producing neurons in the rat amygdala using NADPH-diaphorase histochemistry. *Neuroscience*, v.52, n.1, Jan, p.97-106. 1993.

MCDUGALL, S. J., A. J. LAWRENCE, *et al.* Differential cardiovascular responses to stressors in hypertensive and normotensive rats. *Exp Physiol*, v.90, n.1, Jan, p.141-50. 2005.

MENENDEZ, L., D. INSUA, *et al.* The immunohistochemical localization of neuronal nitric oxide synthase in the basal forebrain of the dog. *J Chem Neuroanat*, v.31, n.3, Apr, p.200-9. 2006.

MOGENSEN, G. J. e F. R. CALARESU. Cardiovascular responses to electrical stimulation of the amygdala in the rat. *Exp Neurol*, v.39, n.1, Apr, p.166-80. 1973.

MULLER, J. R., K. M. LE, *et al.* Hemodynamic response pattern predicts susceptibility to stress-induced elevation in arterial pressure in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v.281, n.1, Jul, p.R31-7. 2001.

OHTA, H., S. WATANABE, *et al.* Cardiovascular changes induced by chemical stimulation of the amygdala in rats. *Brain Res Bull*, v.26, n.4, Apr, p.575-81. 1991.

OLMOS, J. L., M. A. REAL, *et al.* Distribution of nitric oxide-producing neurons in the developing and adult mouse amygdalar basolateral complex. *Brain Res Bull*, v.66, n.4-6, Sep 15, p.465-9. 2005.

OZKUTLU, U., T. COSKUN, *et al.* Cardiovascular effects of centrally active cholinomimetics in conscious and anesthetized rats: the role of amygdala. *Brain Res Bull*, v.37, n.6, p.569-73. 1995.

PAXINOS, G. e C. WATSON. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Sydney: Academic Press. 1997

PITKANEN, A. e D. G. AMARAL. Distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) cells and fibers in the monkey amygdaloid complex. *J Comp Neurol*, v.313, n.2, Nov 8, p.326-48. 1991.

PITKANEN, A., V. SAVANDER, *et al.* Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci*, v.20, n.11, Nov, p.517-23. 1997.

PRICE, J. L., F. T. RUSSCHEN, *et al.* The Limbic Region. II: The Amygdaloid Complex. New York: Elsevier Science. 1987

RESSTEL, L. B., K. B. FERNANDES, *et al.* Medial prefrontal cortex modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. *Brain Res*, v.1015, n.1-2, Jul 23, p.136-44. 2004.

ROTTER, A., N. J. BIRDSALL, *et al.* Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. I. Technique for autoradiographic localization of the binding of [3H]propylbenzilylcholine mustard and its distribution in the forebrain. *Brain Res*, v.180, n.2, p.141-65. 1979.

SAH, P., E. S. FABER, *et al.* The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev*, v.83, n.3, Jul, p.803-34. 2003.

SALOME, N., S. NGAMPAMUAN, *et al.* Intra-amygdala injection of GABAA agonist, muscimol, reduces tachycardia and modifies cardiac sympatho-vagal balance during restraint stress in rats. *Neuroscience*, v.148, n.2, Aug 24, p.335-41. 2007.

SANDERS, B. J., C. WIRTZ-NOLE, *et al.* Central amygdaloid lesions attenuate cardiovascular responses to acute stress in rats with borderline hypertension. *Physiol Behav*, v.56, n.4, Oct, p.709-13. 1994.

SIMS, K. S. e R. S. WILLIAMS. The human amygdaloid complex: a cytologic and histochemical atlas using Nissl, myelin, acetylcholinesterase and nicotinamide

adenine dinucleotide phosphate diaphorase staining. *Neuroscience*, v.36, n.2, p.449-72. 1990.

SPENCER, D. G., JR., E. HORVATH, *et al.* Direct autoradiographic determination of M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor distribution in the rat brain: relation to cholinergic nuclei and projections. *Brain Res*, v.380, n.1, Aug 13, p.59-68. 1986.

STOCK, G., K. H. SCHLOR, *et al.* Psychomotor behaviour and cardiovascular patterns during stimulation of the amygdala. *Pflugers Arch*, v.376, n.2, Sep 6, p.177-84. 1978.

TAVARES, R. F. e F. M. CORREA. Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. *Neuroscience*, v.143, n.1, Nov 17, p.231-40. 2006.

TRNECKOVA, L., A. ARMARIO, *et al.* Differences in the brain expression of c-fos mRNA after restraint stress in Lewis compared to Sprague-Dawley rats. *Brain Res*, v.1077, n.1, Mar 10, p.7-15. 2006.

UNGER, J. W. e W. LANGE. NADPH-diaphorase-positive cell populations in the human amygdala and temporal cortex: neuroanatomy, peptidergic characteristics and aspects of aging and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*, v.83, n.6, p.636-46. 1992.

VAN DEN BUUSE, M., S. A. VAN ACKER, *et al.* Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological "novelty" stress in freely moving rats. *Psychophysiology*, v.38, n.3, May, p.490-9. 2001.

VERBERNE, A. J. e N. C. OWENS. Cortical modulation of the cardiovascular system. *Prog Neurobiol*, v.54, n.2, Feb, p.149-68. 1998.

VERTES, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, v.51, n.1, Jan, p.32-58. 2004.

**TRABALHO PUBLICADO**

# THE MEDIAL AMYGDALOID NUCLEUS MODULATES CARDIOVASCULAR RESPONSES TO ACUTE RESTRAINT IN RATS

E. A. T. FORTALEZA, R. F. TAVARES  
AND F. M. A. CORRÊA\*

*Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, USP, Ave. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil*

**Abstract**—The medial amygdaloid nucleus (MeA) modulates several physiological and behavioral processes and among them, the cardiovascular correlates of behavioral responses to stressful stimuli. Acute restraint evokes cardiovascular responses, which are characterized by both elevated blood pressure (BP) and intense heart rate (HR) increase. We presently report effects of MeA pharmacological manipulations on BP and HR responses evoked by acute restraint in rats. Bilateral microinjection of 100 nL of the unspecific synaptic blocker CoCl<sub>2</sub> (1 mM) into the MeA increased HR response to acute restraint, without significant effect on the BP response. This result indicates an inhibitory influence of MeA on restraint-evoked HR changes. Injections of the non-selective muscarinic receptor antagonist atropine (3 nmol); the inhibitor of choline uptake hemicholinium (2 nmol) or the selective M<sub>1</sub>-receptor antagonist pirenzepine (6 nmol) caused effects that were similar to those caused by cobalt. These results suggest that local cholinergic neurotransmission and M<sub>1</sub>-receptors mediate the MeA inhibitory influence on restraint-related HR responses. Pretreatment with the M3 receptor antagonist 4-DAMP (2 nmol) did not affect restraint-related cardiovascular responses, reinforcing the idea that M<sub>1</sub>-receptors mediate MeA-related inhibitory influence on restraint-evoked HR increase. © 2009 Published by Elsevier Ltd on behalf of IBRO.

**Key words:** CNS, medial amygdaloid nucleus, cholinergic receptors, cardiovascular system, restraint stress, autonomic nervous system.

The amygdaloid complex is a subcortical limbic structure, which is located in the temporal lobe between the external capsule and hypothalamus. It was divided into subnuclei based on cytoarchitecture, chemoarchitecture and connections (Price et al., 1987). The complex is involved in functions such as memory, attention, emotional significance of sensory stimuli, perception of emotional expression and generation of emotional aspects of dreams (Davis, 1992; Scott et al., 1997; Rosen and Donley, 2006). The complex is divided into three groups (Pitkanen et al., 1997; Sah et al., 2003): 1) the deep or basolateral group,

which includes the lateral, the basal, and accessory basal nuclei; 2) the superficial or cortical-like group, which includes the cortical nuclei and nucleus of the lateral olfactory tract; and 3) the centromedial group composed of the medial and central nuclei.

The complex is connected with hypothalamic and brainstem areas that are involved with cardiovascular regulation (Ohta et al., 1991; Dampney, 1994). Its stimulation evoked either pressor or depressor responses depending on stimulation sites and anesthesia (Gelsema et al., 1987). Electrical stimulation of central and basal amygdaloid nuclei elicited depressor responses and moderated bradycardia, while stimulation of medial nucleus and pyriform cortex evoked pressor responses and tachycardia (Faiers et al., 1975).

Among several neuronal groups involved in cardiovascular control, the amygdala contains cholinergic neurons and muscarinic receptors (Rotter et al., 1979). Pressor responses were reported after carbachol microinjection into the amygdala (Ohta et al., 1991) and the pressor response evoked by the carbachol i.c.v. was suppressed by electrolytic lesions of the central nucleus of the amygdala (Ozkutlu et al., 1995), suggesting its action in that nucleus. Stress stimuli are known to evoke cardiovascular changes such as blood pressure (BP) increase and tachycardia (Muller et al., 2001; Tavares and Correa, 2006). Pressor responses evoked by foot-shock in spontaneously hypertensive rats (Sanders et al., 1994) or by exposure of borderline hypertensive rats to acute noise stress (Galeno et al., 1984) were reduced after electrolytic lesion of amygdala. Also, Crane et al. (2005) and Kubo et al. (2004) reported increased c-fos expression in the medial amygdaloid nucleus (MeA) (Kubo et al., 2004; Crane et al., 2005) of normotensive rats after restraint. MeA inhibition with muscimol was reported to attenuate the restraint-evoked pressor response (Kubo et al., 2004). Although the later report strongly suggests that MeA modulates stress-evoked pressor responses, heart rate (HR) was not recorded. Considering the important cardiac component of stress responses, it would be relevant to evaluate the role of MeA in HR control. Also, there is no evidence on neurotransmitters involved in the mediation of MeA influence on stress-evoked cardiovascular responses.

In the present study, we examined the effect of synaptic blockade by CoCl<sub>2</sub> microinjection bilaterally into the MeA on BP and HR responses to restraint stress. Microinjection of cobalt into brain nuclei is a useful tool to cause pharmacological blockade of synaptic transmission, by acting on calcium channels conductance (Kretz, 1984). We also tested the hypothesis that a cholinergic neurotrans-

\*Corresponding author. Tel: +55-16-3602-3206; fax: +55-16-3633-2301. E-mail address: fmdacorr@fmrp.usp.br (F. M. A. Corrêa).

**Abbreviations:** aCSF, artificial cerebrospinal fluid; ANOVA, analysis of variance; BP, blood pressure; CeA, central amygdala; HPA, hypothalamic-pituitary-adrenal; HR, heart rate; MAP, mean arterial pressure; MeA, medial amygdaloid nucleus; PAP, pulsatile arterial pressure.



mission within the MeA mediates the nucleus's influence on stress-evoked cardiovascular responses. For that purpose, we pretreated the MeA with the cholinergic antagonists atropine, pirenzepine and 4-DAMP, as well as with the choline's carrier inhibitor hemicholinium.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Subjects

Experimental procedures were carried out following protocols approved by the Ethical Review Committee of the School of Medicine of Ribeirão Preto. Male Wistar rats weighing 250–280 g were used in the present experiment. Animals were housed individually in plastic cages in a temperature-controlled room (25 °C) at the Animal Care Unit of the Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto. Animals were kept under a 12-h light/dark cycles (lights on at 06:00 h). Animals had free access to water and standard laboratory food, except during the experimental period. Rats were transported to the experiment room and remained in their own cages until experimental restraint procedure. Experiments were performed during the morning period to minimize possible circadian rhythm interferences.

### Surgical preparation

Animals were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg i.p.) and their heads were fixed to a stereotaxic apparatus (Stoelting, USA). The skull was surgically exposed and trepanned with a dental drill at a point located 3.4 mm from midline and 6.2 mm anterior to the interaural line, according to the rat brain atlas of (Paxinos and Watson, 1997). Bilateral stainless steel guide cannulas (24G, 15 mm-long) were lowered 8.0 mm from the skull. Guide cannulas were positioned 1 mm above intended injection sites and fixed to the skull by a metal screw and dental cement. Animals were allowed to recover for 48 h before a polyethylene catheter was implanted into the femoral artery under anesthesia, for chronic recording of arterial BP and HR. The catheter was exposed on the dorsum of the animals and attached to the skin, allowing arterial pressure recording of unanesthetized rats 24 h after surgery.

### Drug microinjection into the MeA

Drugs were dissolved in artificial cerebrospinal fluid (aCSF composition: NaCl 100 mM; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM; KCl 2.5 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; NaHCO<sub>3</sub> 27 mM; CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM; pH=7.4). For microinjections, we used a 1 μL syringe (KH7001, Hamilton, USA) connected to a 33G injection needle (Small Parts Inc., FL, USA) by PE-10 polyethylene tubing. The needle was inserted into the guide cannula that was 1.0 mm shorter than the needle. All injections were performed in a volume of 100 nL.

Pulsatile arterial pressure (PAP) was recorded using an amplifier (model 7754A, Hewlett Packard, USA) coupled to a computerized acquisition system (MP100, Biopac, USA). Mean arterial pressure (MAP) and HR were derived from PAP data using the AcqKnowledge III software (Biopac). MAP was calculated according to the equation: diastolic pressure + (systolic – diastolic)/3. HR (beats/min; bpm) was calculated from PAP peak intervals integrated each 6 s.

### Experimental procedure: acute restraint

Animals were transported to the experimental room in their home cages. They were allowed a 1 h period to adapt to the conditions of the experimental room, such as sound and illumination, before start BP and HR recording. The experimental room was acoustically isolated and had constant background noise generated by an

air exhauster. At least another 20 min period was allowed for baseline recording before experiments were initiated. After recording baseline values, bilateral microinjections of drugs or vehicle were made into the MeA, each animal receiving only one microinjection per brain side. Care was taken to start injection whenever stable BP and especially HR was observed. The injection needle was slowly introduced into the guide cannula without touching or restraining the animals. Ten minutes later, the animals were submitted to restraint, which was initiated by putting animals in a small plastic cylindrical restraining tube (diameter=6.5 cm and length=15 cm). Restraint lasted 60 min, after which the animals were returned to their cages. Each animal was submitted to one session of restraint in order to prevent habituation.

Animals were divided into eight experimental groups: (1) untreated group, without guide cannula in the brain; (2) aCSF group, vehicle microinjected into the MeA; (3) cobalt group, synaptic inhibitor microinjected into the MeA; (4) atropine group, non-selective cholinergic muscarinic antagonist atropine microinjected into the MeA; (5) pirenzepine group, M1 receptors selective muscarinic antagonist pirenzepine into the MeA; (6) 4-DAMP group, M3 receptors selective muscarinic antagonist 4-DAMP into the MeA; (7) hemicholinium group, inhibitor of choline carrier into the MeA.

### BP recording

PAP of freely moving animals was recorded using an HP-7754A preamplifier (Hewlett Packard) and an acquisition board (MP100A, Biopac Systems Inc.) connected to a computer. MAP and HR values were derived from the PAP recordings and processed online.

### Histological determination of the microinjection sites

At the end of experiments, animals were anesthetized with urethane (1.25 g/kg i.p.) and 100 nL of 1% Evan's Blue dye was injected into the brain as a marker of injection site. Animals were submitted to intracardiac perfusion with 0.9% NaCl followed by 10% formalin. Brains were removed and postfixed for 48 h at 4 °C and serial 40 μm-thick sections were cut with a cryostat (CM1900, Leica, Germany). Sections were stained with 1% Neutral Red for optical microscopy analysis. The actual placement of the microinjection needles was determined analyzing serial sections according to the rat brain atlas of (Paxinos and Watson, 1997).

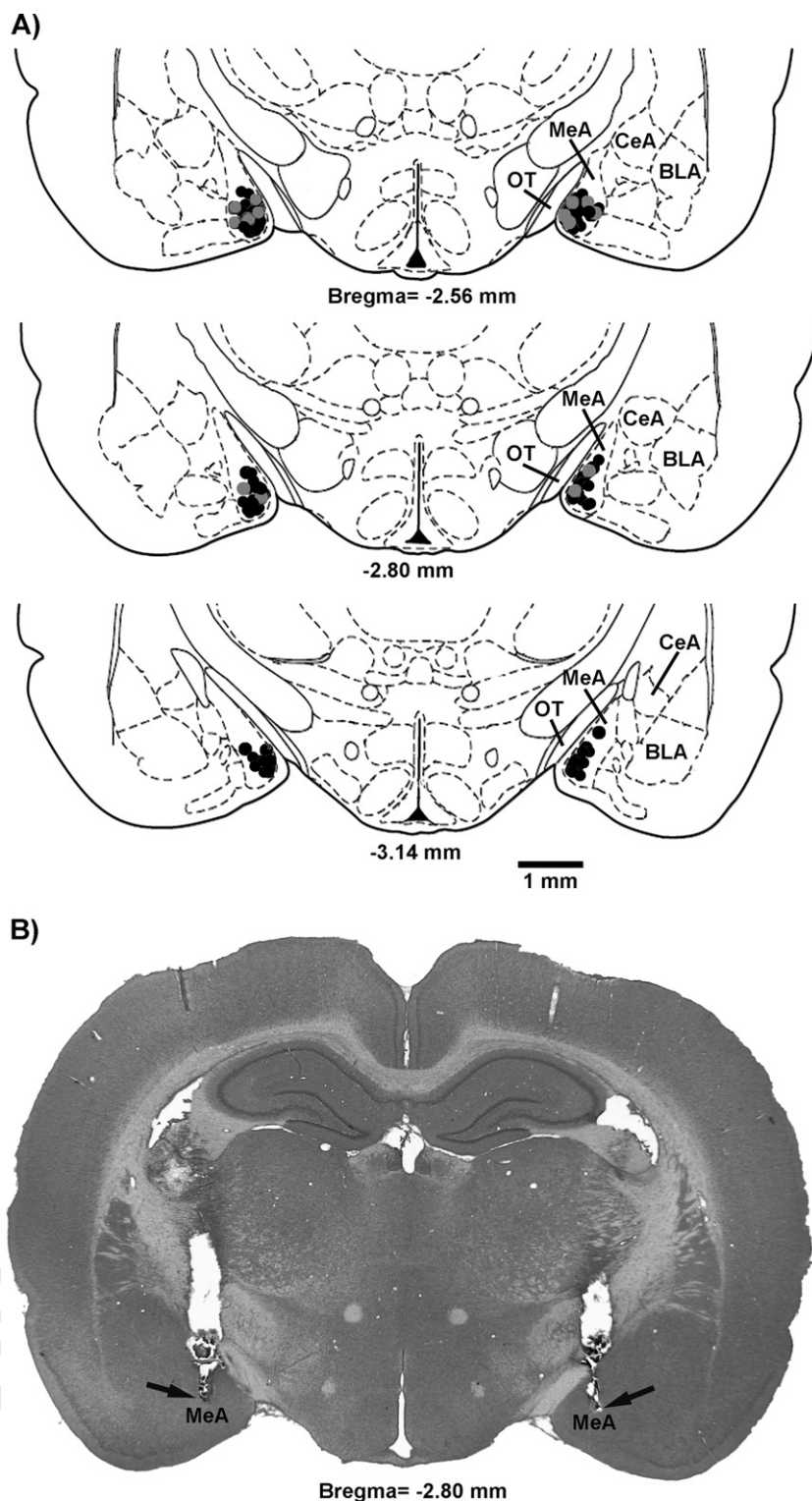
### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Prism software (GraphPad, USA). The Student's *t*-test was used to compare basal MAP and HR values before and after aCSF or drug treatment. Two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was used to compare time curves of MAP (ΔMAP) and HR (ΔHR) after aCSF and drug treatments. Although PAP was recorded throughout the experimental procedure, curves for statistical analysis or illustrative figures were generated with points obtained with different data sampling. For statistical purposes, curves were generated with sampling at 0.07/min to generate five points (experiments with five subjects), or 0.08/min to generate six points (experiments with six subjects). Illustrative curves (Figs. 4–8) were generated with sampling at 0.64/min for more accurate representation. The significance was set at *P*<0.05. Data are presented as mean ± S.E.M.

## RESULTS

### Determination of the microinjection sites

A diagrammatic representation showing microinjection sites in the MeA area of the animals used in the study is



**Fig. 1.** (A) Diagrammatic representation modified from the rat brain atlas of (Paxinos and Watson, 1997) indicating microinjection sites in brain of the rats used in the present experiment. Black dots indicate microinjection sites of drugs and gray dots sites of aCSF (vehicle of drugs) microinjection in the MeA. (B) Photomicrograph of a coronal section of a rat brain depicting the site of bilateral microinjection into the MeA. The centers of microinjections are indicated by arrows. IA, interaural, BLA, basolateral nucleus of the amygdala; OT, optic tract.

F1 presented in Fig. 1A. A representative photomicrograph of a coronal brain section depicting bilateral microinjection

sites in the MeA of one representative animal is presented in Fig. 1B.

Please cite this article in press as: Fortaleza EAT, et al., The medial amygdaloid nucleus modulates cardiovascular responses to acute restraint in rats, *Neuroscience* (2009), doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.01.003

### Characterization of the cardiovascular effects of restraint

Basal MAP and HR of MeA-untreated animals were  $95 \pm 4$  mm Hg and  $368 \pm 10$  bpm, respectively,  $n=7$ . Acute 60 min restraint of untreated rats caused significant BP response characterized by an initial peak increase in MAP, which was followed by a long lasting moderate hypertensive response (Interaction:  $F_{5,72}=8.177$ ,  $P<0.0001$ ; Treatment:  $F_{1,72}=41.25$ ,  $P<0.0001$ ; Time:  $F_{5,72}=8.177$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA). BP responses were accompanied by significant HR increase that lasted throughout the restraint period (Interaction:  $F_{5,72}=2.437$ ,  $P<0.0001$ ; Treatment:  $F_{1,72}=23.26$ ,  $P<0.0001$ ; Time:  $F_{5,72}=2.437$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA).

### Effect of the pretreatment with aCSF in the MeA on restraint-related cardiovascular changes

To confirm that aCSF (vehicle of the drugs used) had no pharmacological effect, we microinject the vehicle into the MeA before submitting animals to restraint stress.

Basal MAP and HR before microinjection of 100 nl of aCSF were  $92 \pm 2$  mm Hg and  $374 \pm 7$  bpm,  $n=7$ . Microinjection of aCSF did not affect MAP ( $P=0.5$ ) or HR ( $P=0.8$ ). MAP and d HR 10 min after aCSF were  $92 \pm 3$  mm Hg and  $370 \pm 7$  bpm, respectively.

Acute restraint caused BP and HR increases in aCSF-treated animals, which were similar to those observed in MeA-untreated control animals. There were no significant differences between the two groups in restraint-evoked MAP ( $\Delta$ MAP: Interaction:  $F_{5,72}=0.1243$ ,  $P=0.9865$ ; Treatment:  $F_{1,72}=1.824$ ,  $P=0.1810$ ; Time:  $F_{5,72}=32.09$ ,  $P<0.0001$ , two-way ANOVA) and HR increases ( $\Delta$ HR: Interaction:  $F_{5,72}=0.6853$ ,  $P=0.6361$ ; Treatment:  $F_{1,72}=1.874$ ,  $P=0.1752$ ; Time:  $F_{5,72}=14.88$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA) increases.

Although guide cannula placement did lesion dorsal areas, no differences were observed in restraint-evoked cardiovascular responses between animals with and without implanted guide cannula.

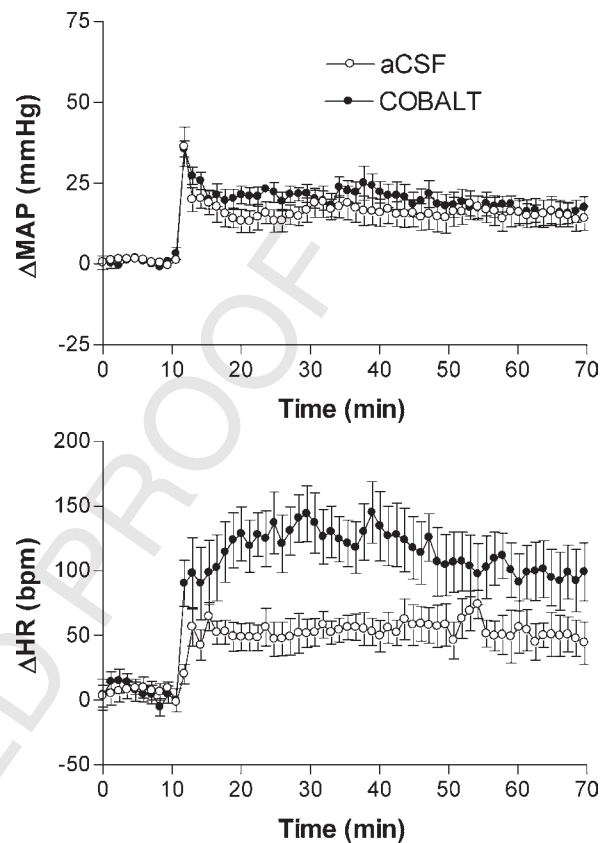
aCSF-treated animals were used as control for the experiments with MeA pharmacological manipulation.

### Effect of MeA pretreatment with the unspecific synaptic blocker on restraint-related cardiovascular changes

To test if the MeA was involved in the modulation of cardiovascular changes associated with restraint stress, we microinject the synaptic inhibitor cobalt into the MeA before submitting the animals to restraint.

Basal MAP and HR before microinjection of cobalt (100 nl of 1 mM  $\text{CoCl}_2$ ; Sigma, USA) were  $91 \pm 3$  mm Hg and  $353 \pm 18$  bpm, respectively, ( $n=7$ ). Microinjection of cobalt in the MeA caused no changes in MAP ( $P=0.2$ ) or HR ( $P=0.8$ ), which were  $96 \pm 5$  mm Hg and  $349 \pm 7$  bpm,  $n=7$ .

Acute restraint caused BP and HR increases in cobalt-treated animals. Cobalt treatment significantly enhanced restraint-evoked HR increase without significant effect on



**Fig. 2.** Changes in MAP ( $\Delta$ MAP) and HR ( $\Delta$ HR) of animals treated in the MeA with aCSF (aCSF-treated, 100 nl,  $n=7$ ) or cobalt ( $\text{CoCl}_2$  1 mM/100 nl,  $n=7$ ) observed during the restraint period. No significant difference was observed between cobalt-treated and control animals (aCSF-treated) concerning the  $\Delta$ MAP response (Interaction:  $F_{5,78}=0.4125$ ,  $P=0.8388$ ; Treatment:  $F_{1,78}=1.021$ ,  $P=0.3154$ ; Time:  $F_{5,78}=35.34$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA). A significant difference was observed between these two groups in  $\Delta$ HR response caused by restraint (Interaction:  $F_{5,78}=3.594$ ,  $P=0.0056$ ; Treatment:  $F_{1,78}=32.68$ ,  $P<0.0001$ ; Time:  $F_{5,78}=17.58$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA).

the BP response, when compared with aCSF-treated animals ( $\Delta$ MAP Interaction:  $F_{5,78}=0.4125$ ,  $P=0.8388$ ; Treatment:  $F_{1,78}=1.021$ ,  $P=0.3154$ ; Time:  $F_{5,78}=35.34$ ,  $P<0.0001$ , and  $\Delta$ HR, Interaction:  $F_{5,78}=3.594$ ,  $P=0.0056$ ; Treatment:  $F_{1,78}=32.68$ ,  $P<0.0001$ ; Time:  $F_{5,78}=17.58$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA) (Figs. 2 and 3).

### Effect of MeA pretreatment with a non-selective muscarinic receptor antagonist atropine on restraint-related cardiovascular changes

To evaluate if the cholinergic neurotransmission in the MeA was involved in the modulation of cardiovascular changes associated with restraint stress, we microinjected the nonselective muscarinic receptor antagonist atropine into the MeA before submitting the animals to restraint.

Basal MAP and HR before microinjection of atropine were  $90 \pm 2$  mm Hg and  $332 \pm 9$  bpm,  $n=7$ . Microinjection of atropine (of 3 nmol/100 nl; Merck, USA) in the MeA caused no changes in MAP ( $P=0.3$ ) or HR ( $P=0.6$ ), which were  $91 \pm 3$  mm Hg and  $336 \pm 8$  bpm,  $n=7$ .

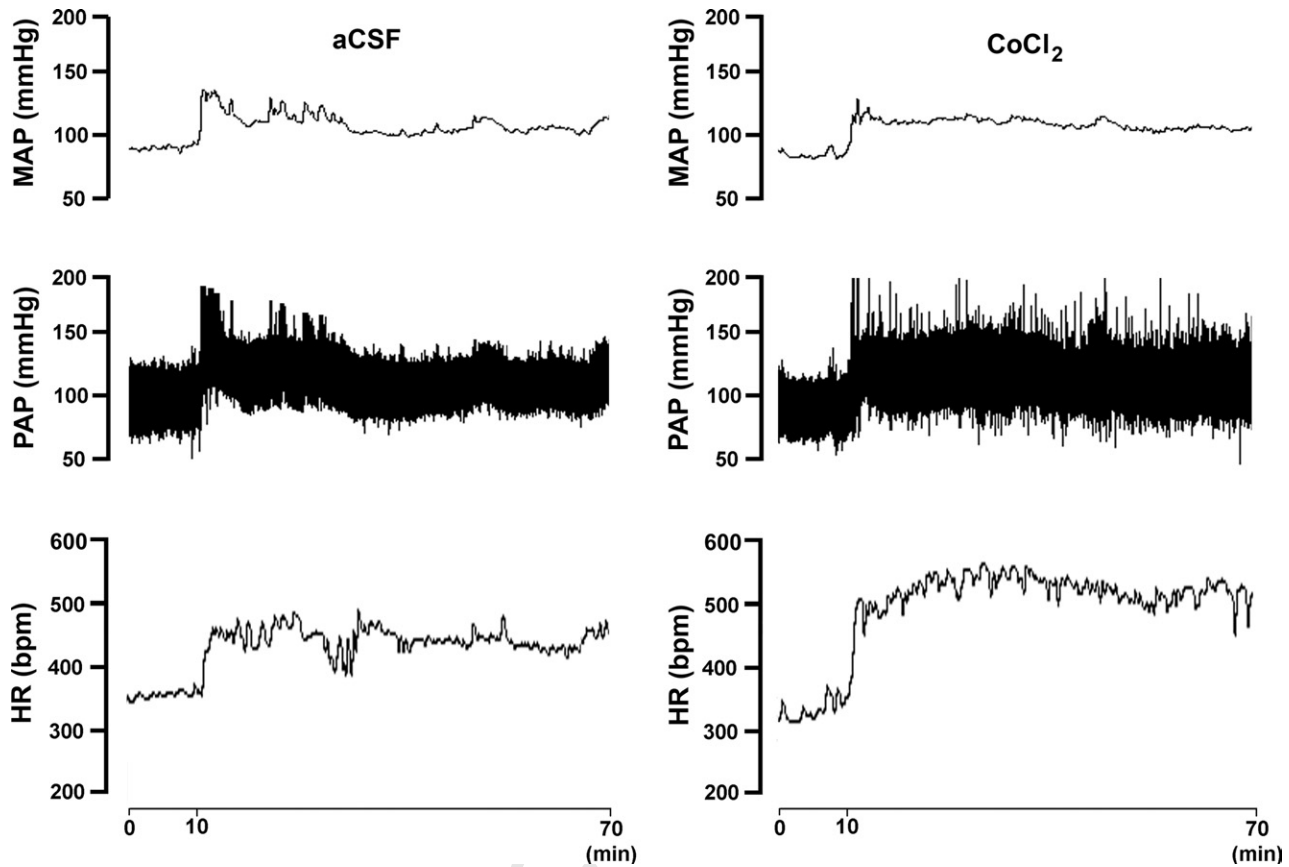


Fig. 3. Recordings of MAP, PAP and HR showing the cardiovascular changes observed before and during a restraint period of 60 min in a control rat and in a rat whose MeA was treated with cobalt before restraint. The onset of restraint was at  $t=10$  min.

Acute restraint caused BP and HR increases in atropine-treated animals. Atropine treatment significantly enhanced restraint-evoked HR increase without significant effect on the BP response, when compared with aCSF-treated animals ( $\Delta$ MAP, Interaction:  $F_{5,78}=0.6074$ ,  $P=0.6944$ ; Treatment:  $F_{1,78}=0.1022$ ,  $P=0.7501$ ; Time:  $F_{5,78}=21,25$ ,  $P<0.0001$ , and  $\Delta$ HR, Interaction:  $F_{5,78}=2,197$ ,  $P=0.0629$ ; Treatment:  $F_{1,78}=17,87$ ,  $P<0.0001$ ; Time:  $F_{5,78}=18,06$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA), Fig. 4.

#### Effect of MeA pretreatment with a selective M1 receptor antagonist on restraint-related cardiovascular changes

In order to determine if cholinergic muscarinic M1 receptors in the MeA were involved in the cardiovascular changes to restraint stress, we microinjected the selective M1 muscarinic receptor antagonist pirenzepine into the MeA before submitting the animals to restraint.

Basal MAP and HR before microinjection of pirenzepine (6 nmol/100 nl; RBI, USA) were  $93\pm 5$  mm Hg and  $369\pm 11$  bpm,  $n=7$ . Microinjection of pirenzepine into the MeA caused no changes in MAP ( $P=0.4$ ) or HR ( $P=0.7$ ), which were  $95\pm 5$  mm Hg and  $372\pm 14$  bpm,  $n=7$ .

Acute restraint caused BP and HR increases in pirenzepine-treated animals. Pirenzepine treatment significantly enhanced restraint-evoked HR increase with-

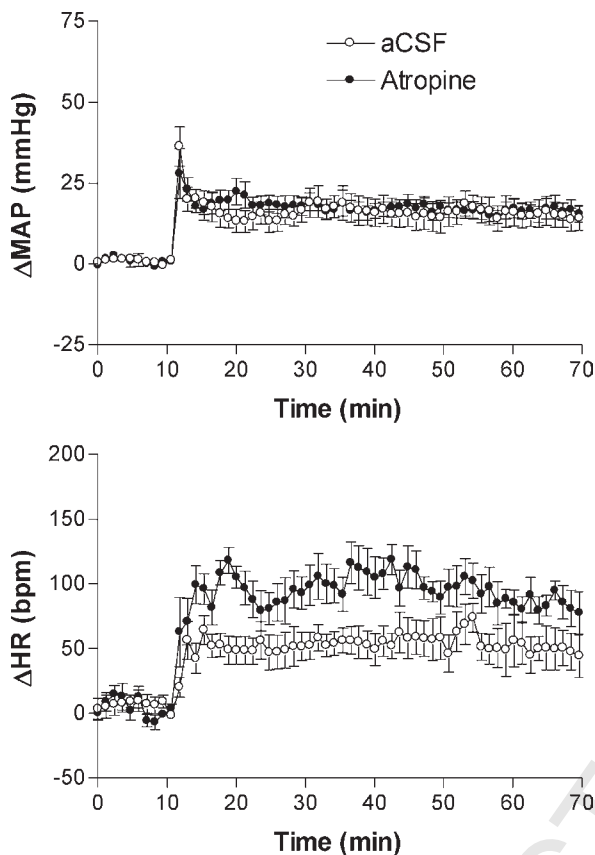
out significant effect on the BP response, when compared with aCSF-treated animals ( $\Delta$ MAP, Interaction:  $F_{5,78}=0.2552$ ,  $P=0.9360$ ; Treatment:  $F_{1,78}=0,2719$ ,  $P=0.6036$ ; Time:  $F_{5,78}=31,25$ ,  $P<0.0001$ , and  $\Delta$ HR, Interaction:  $F_{5,78}=3,366$ ,  $P=0.0083$ ; Treatment:  $F_{1,78}=20,70$ ,  $P<0.0001$ ; Time:  $F_{5,78}=20,93$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA), Fig. 5.

#### Effect of MeA pretreatment with a selective M3 receptor antagonist on restraint-related cardiovascular changes

To test if cholinergic muscarinic M3 receptors in the MeA were involved in the cardiovascular changes to restraint stress, we microinjected the M3 muscarinic receptor antagonist 4-DAMP into the MeA before submitting the animals to restraint.

Basal MAP and HR before microinjection of 4-DAMP (2 nmol/100 nl; RBI, USA) were  $99\pm 2$  mm Hg and  $345\pm 14$  bpm,  $n=9$ . Microinjection of 4-DAMP in the MeA caused no changes in MAP ( $P=0.7$ ) or HR ( $P=0.2$ ), which were  $100\pm 3$  mm Hg and  $367\pm 16$  bpm,  $n=9$ .

Acute restraint caused BP and HR increases in 4-DAMP-treated animals. There were no significant differences in the restraint-related MAP or HR increases when compared with aCSF-treated animals ( $\Delta$ MAP: Interaction:  $F_{5,90}=0.8292$ ,  $P=0.5322$ ; Treatment:  $F_{1,90}=1,160$ ,



**Fig. 4.** Changes in MAP ( $\Delta$ MAP) and HR ( $\Delta$ HR) of animals treated in the MeA with aCSF (aCSF-treated, 100 nl,  $n=7$ ) or atropine (3 nmol/100 nl,  $n=7$ ). No significant difference was observed between atropine-treated and control animals (aCSF-treated) in the restraint-related  $\Delta$ MAP response (Interaction:  $F_{5,78}=0.6074$ ,  $P=0.6944$ ; Treatment:  $F_{1,78}=0.1022$ ,  $P=0.7501$ ; Time:  $F_{5,78}=21,25$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA). A significant difference was observed between these two groups in the restraint-related  $\Delta$ HR response (Interaction:  $F_{5,78}=2,197$ ,  $P=0.0629$ ; Treatment:  $F_{1,78}=17,87$ ,  $P<0.0001$ ; Time:  $F_{5,78}=18,06$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA).

$P=0.2843$ ; Time:  $F_{5,90}=28,35$ ,  $P<0.0001$ ;  $\Delta$ HR, Interaction:  $F_{5,90}=0.7688$ ,  $P=0.5747$ ; Treatment:  $F_{1,90}=0.2962$ ,  $P=0.5876$ ; Time:  $F_{5,90}=10,61$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA), Fig. 6.

#### Effect of MeA pretreatment with an inhibitor of choline carrier on restraint-related cardiovascular changes

To confirm that MeA cholinergic neurotransmission modulates cardiovascular changes to restraint stress, we microinjected choline carrier inhibitor hemicholinium into the MeA before submitting the animals to restraint.

Basal MAP and HR before microinjection of hemicholinium (2 nmol/100 nl; RBI, USA) were  $93\pm 3$  mm Hg and  $340\pm 12$  bpm,  $n=5$ . Microinjection of hemicholinium into the MeA caused no changes in MAP ( $P=0.1$ ) or HR ( $P=0.3$ ), which were  $115\pm 11$  mm Hg and  $367\pm 14$  bpm,  $n=5$ .

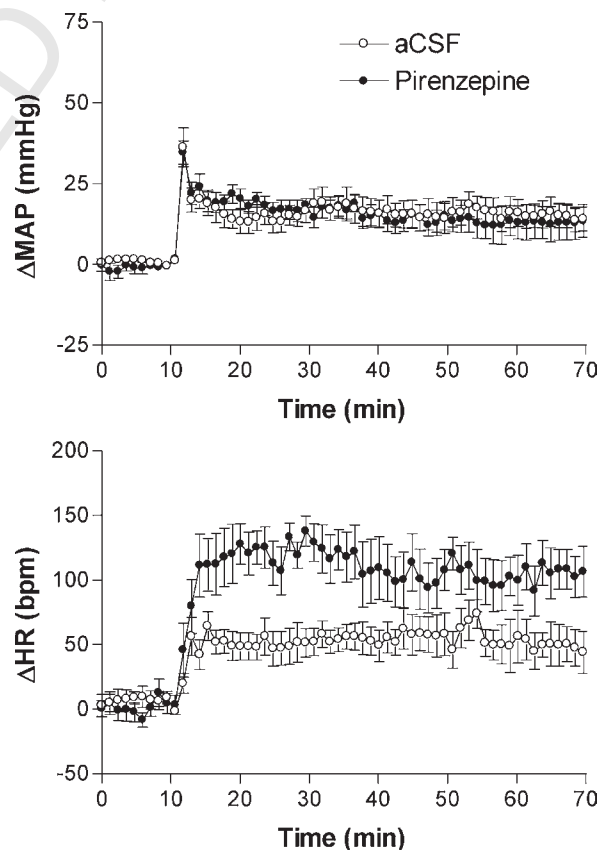
Acute restraint caused BP and HR increases in hemicholinium-treated animals. Hemicholinium treatment sig-

nificantly enhanced restraint-evoked HR increase without significant effect on the BP response, when compared with aCSF-treated animals ( $\Delta$ MAP, Interaction:  $F_{5,66}=0.3029$ ,  $P=0.9095$ ; Treatment:  $F_{1,66}=0.3207$ ,  $P=0.5731$ ; Time:  $F_{5,66}=24,90$ ,  $P<0.0001$ , and  $\Delta$ HR, Interaction:  $F_{5,66}=5,662$ ,  $P=0.0002$ ; Treatment:  $F_{1,66}=38,42$ ,  $P<0.0001$ ; Time:  $F_{5,66}=25,69$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA), Fig. 7.

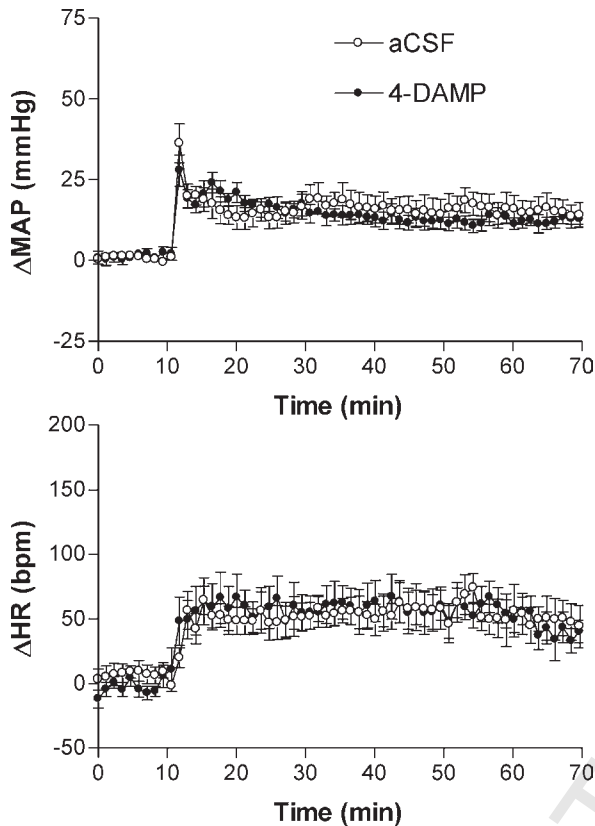
## DISCUSSION

The bilateral microinjection of a synaptic inhibitor, muscarinic antagonists non-selective and M1 selective or an inhibitor of choline carrier, but not of a preferential M<sub>3</sub> muscarinic antagonist, significantly enhanced restraint-evoked HR increase, without significant effect on the BP response of rats submitted to restraint stress. The drugs used did not affect baseline BP and HR, indicating that the MeA does not contribute to cardiovascular control at rest.

Restraint is an inescapable stressful stimulus that causes intense cardiovascular changes which are characterized by both BP and HR increase (Barron and Van



**Fig. 5.** Changes in MAP ( $\Delta$ MAP) and HR ( $\Delta$ HR) of animals treated in the MeA with aCSF (aCSF-treated, 100 nl,  $n=7$ ) or pirenzepine (6 nmol/100 nl,  $n=7$ ). No significant difference was observed between pirenzepine-treated and control animals (aCSF-treated) in the restraint-related  $\Delta$ MAP response (Interaction:  $F_{5,78}=0.2552$ ,  $P=0.9360$ ; Treatment:  $F_{1,78}=0.2719$ ,  $P=0.6036$ ; Time:  $F_{5,78}=31,25$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA). A significant difference was observed between these two groups in the restraint-related  $\Delta$ HR response (Interaction:  $F_{5,78}=3,366$ ,  $P=0.0083$ ; Treatment:  $F_{1,78}=20,70$ ,  $P<0.0001$ ; Time:  $F_{5,78}=20,93$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA).



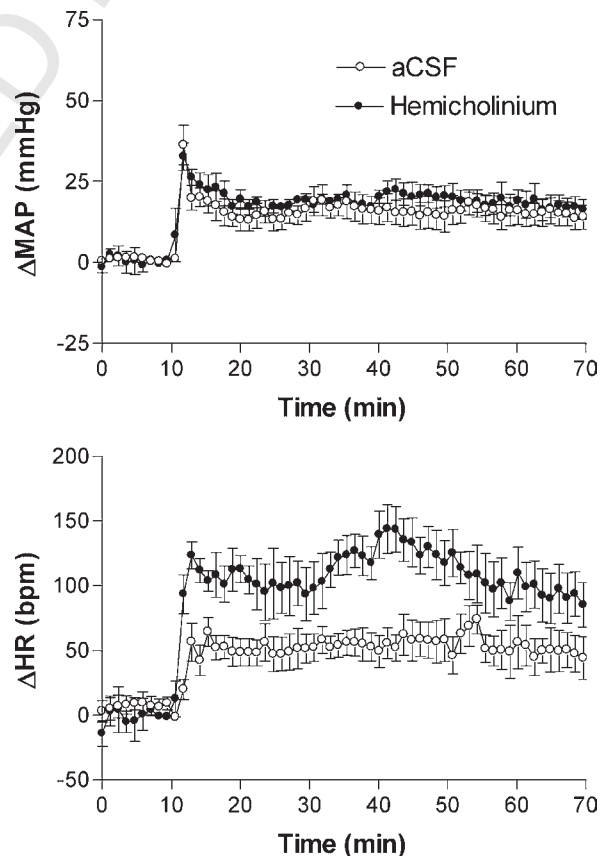
**Fig. 6.** Changes in MAP ( $\Delta$ MAP) and HR ( $\Delta$ HR) of animals treated in the MeA with aCSF (aCSF-treated, 100 nl,  $n=7$ ) or 4-DAMP (2 nmol/100 nl,  $n=6$ ). No significant difference was observed between 4-DAMP-treated and control animals (aCSF-treated) in the restraint-related  $\Delta$ MAP response (Interaction:  $F_{5,90}=0.8292$ ,  $P=0.5322$ ; Treatment:  $F_{1,90}=1,160$ ,  $P=0.2843$ ; Time:  $F_{5,90}=28,35$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA) or in the restraint-related  $\Delta$ HR response (Interaction:  $F_{5,90}=0.7688$ ,  $P=0.5747$ ; Treatment:  $F_{1,90}=0.2962$ ,  $P=0.5876$ ; Time:  $F_{5,90}=10,61$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA).

Loon, 1989; Chen and Herbert, 1995; Kubo et al., 2004; McDougall et al., 2005; Tavares and Correa, 2006; Salome et al., 2007). In addition, stress-evoked responses are characterized by increased circulating content of corticotropin-releasing hormone (CRH) which plays an important role in adrenocorticotropin (ACTH) and corticosteroid secretion (Harbuz et al., 1992).

In the present study, we observed that inhibition of MeA synapses by bilateral microinjection of the unspecific synapses inhibitor  $\text{CoCl}_2$  did not affect restraint-evoked BP increase but significantly enhanced restraint-related tachycardiac response. This result indicates an inhibitory role of the MeA on the HR response to stress. Restraint stress has been reported to activate hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and cause oxytocin release, but not of vasopressin (Lang et al., 1983; Gibbs, 1984; Carter and Lightman, 1987; Callahan et al., 1992; Dayas et al., 1999). The idea of a MeA involvement in the mediation of stress-evoked responses is reinforced by data from literature showing that its electrical stimulation activates the HPA axis in anesthetized rats (Dunn and Whitener, 1986).

Structures such as the septal lateral area (Kubo et al., 2002; Kanaya et al., 2003); lateral hypothalamus (Kubo et al., 2001; Krout et al., 2005); medial prefrontal cortex (Tavares and Correa, 2006); bed nucleus of stria terminalis (Crestani et al., 2008) and both the MeA (Kubo et al., 2004) and central amygdala (CeA) (Kubo et al., 2004; Salome et al., 2007) were proposed to be part of the circuitry that modulates restraint-evoked cardiovascular responses. Data from the literature also indicate a larger activation of MeA, among other amygdaloid nuclei, during stressful situations as indicated by the large expression of c-fos protein in that area after exposure to aversive situations (Canteras et al., 1995; Chen and Herbert, 1995; Cullinan et al., 1995; Dayas et al., 1999, 2001a,b; Kubo et al., 2004; Crane et al., 2005; Trneckova et al., 2006).

Inhibition of MeA by bilateral microinjection of the GABA-ergic agonist muscimol was reported to attenuate the initial component of restraint-evoked pressor responses in rats (Kubo et al., 2004). However, these authors did not record HR in that experiment. Tachycardia is



**Fig. 7.** Changes in MAP ( $\Delta$ MAP) and HR ( $\Delta$ HR) of animals treated in the MeA with aCSF (aCSF-treated, 100 nl,  $n=7$ ) or hemicholinium (2 nmol/100 nl,  $n=5$ ). No significant difference was observed between hemicholinium-treated and control animals (aCSF-treated) in the restraint-related  $\Delta$ MAP response (Interaction:  $F_{5,66}=0.3029$ ,  $P=0.9095$ ; Treatment:  $F_{1,66}=0.3207$ ,  $P=0.5731$ ; Time:  $F_{5,66}=24,90$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA). A significant difference was observed between these two groups in the restraint-related  $\Delta$ HR response (Interaction:  $F_{5,66}=5,662$ ,  $P=0.0002$ ; Treatment:  $F_{1,66}=38,42$ ,  $P<0.0001$ ; Time:  $F_{5,66}=25,69$ ,  $P<0.0001$ ; two-way ANOVA).

a well documented response which is observed during exposure to stressful situations (Barron and Van Loon, 1989; Chen and Herbert, 1995; McDougall et al., 2005; Tavares and Correa, 2006; Salome et al., 2007). Muscimol is commonly used to inhibit brain nuclei and acts on GABA<sub>A</sub> receptors mimicking the activation of inhibitory GABA-ergic synapses. Unlike, CoCl<sub>2</sub> has a broader spectrum because it competes with Ca<sup>2+</sup>, thus inhibiting all kinds of synaptic neurotransmission in the area. Under the later circumstance, inhibition of MeA did not affect restraint-evoked BP responses. This result indicates a lack of tonic modulator influence of MeA on the BP component of the restraint-evoked cardiovascular response.

In another experiment, in which the effects of muscimol microinjection into the CeA were studied, GABA-ergic-evoked inhibition attenuated the tachycardiac response associated with restraint (Salome et al., 2007). These authors suggested that restraint-evoked tachycardiac response consisted of two components: one initial that was amygdala-independent because muscimol-induced CeA inhibition did not affect its magnitude and a later sustained response component which was CeA-dependent because it was attenuated by inhibition of CeA. These results were the inverse of those presently reported after MeA inhibition with cobalt. Together, they suggest that subnuclei within the amygdaloid complex may modulate stress-evoked cardiovascular responses in an opposed manner. However, Salome et al. (2007) did not study the effects of CeA inhibition on restraint-evoked BP responses. Anyhow, the differences between results from inhibition with CoCl<sub>2</sub> or muscimol need further investigation to be clarified.

Studies using binding and immunohistochemistry detected the presence of acetylcholine, choline acetyltransferase, acetylcholinesterase and muscarinic receptors in the MeA (Hoover et al., 1978; Rotter et al., 1979), indicating the existence of a cholinergic neurotransmission in that nucleus. Also, microinjection of carbachol, but not of 5-HT or norepinephrine into the amygdaloid complex, was reported to evoke cardiovascular responses which were mediated by muscarinic receptors (Ohta et al., 1991). Together, these results suggest that cholinergic neurotransmission in the MeA could modulate cardiovascular responses in rats.

To test if cholinergic neurotransmission in the MeA was involved in modulation of restraint-induced cardiovascular responses, animals were pre-treated bilaterally with the nonselective muscarinic antagonist atropine. Blockade of muscarinic receptors in MeA caused increased restraint-evoked tachycardiac response in a similar manner to pharmacological ablation of the area with cobalt. This observation suggests that local cholinergic neurotransmission modulates the inhibitory influence of MeA on restraint-evoked tachycardiac responses in rats.

Once the involvement of cholinergic neurotransmission was established, it would be important to determine which subtype of muscarinic receptor was involved in this mediation. To evidence the subtype of the muscarinic receptor mediating the increase in the tachycardiac response, animals were bilaterally treated with either the preferential

M<sub>1</sub>-muscarinic receptor antagonist pirenzepine or the preferential M<sub>3</sub>-muscarinic receptor antagonist 4-DAMP. Blockade of M<sub>1</sub>-muscarinic receptors in the MeA increased restraint-evoked tachycardiac response, thus suggesting their involvement in the MeA inhibitory influence on the HR response to restraint. Blockade of M<sub>3</sub>-muscarinic did not affect restraint-evoked tachycardiac responses. There is evidence that at the M<sub>1</sub> site pirenzepine (relative selectivity M<sub>1</sub> >> M<sub>2</sub>=M<sub>3</sub>) and 4-DAMP (relative selectivity M<sub>1</sub>=M<sub>3</sub> > M<sub>2</sub>) are equipotent, whereas at the M<sub>2</sub> or M<sub>3</sub> receptors sites 4-DAMP is 10–100 times more potent than pirenzepine (Hulme et al., 1990). Considering this and the fact that the M<sub>1</sub> muscarinic receptor are predominant in the MeA (Spencer et al., 1986), our results suggest that local M<sub>1</sub> receptors in the MeA may be preferentially involved in the cardiovascular response to restraint stress in rats. Also, carbachol microinjection into the CeA has been reported to increase BP through activation of M<sub>1</sub>-muscarinic receptors (Aslan et al., 1997).

To confirm the involvement of local MeA cholinergic neurotransmission in the modulation of restraint-evoked cardiac responses, we treated the MeA with the inhibitor of the choline carrier hemicholinium which has been shown to impair acetylcholine synthesis. Treatment with hemicholinium increased restraint-evoked tachycardiac responses in a similar manner to treatment with either atropine or pirenzepine. Together, these results strongly suggest the involvement of a local cholinergic neurotransmission in the mediation of MeA inhibitory influence on restraint-evoked cardiac response in rats.

GABA-ergic neurons in the MeA, including interneurons and neurons projecting to prosencephalic areas, are target for cholinergic fibers to the amygdaloid complex (Nitecka and Frotscher, 1989; Pare and Smith, 1994). In this way, we may postulate that restraint stress activates cholinergic neurons that modulate MeA GABA-ergic inhibitory projections to areas involved in cardiovascular regulation.

The results indicate that cholinergic synapses and M<sub>1</sub>-muscarinic receptors in the MeA play an inhibitory role on the cardiac component of restraint-evoked cardiovascular responses in rats, as part of the brain circuitry involved in the modulation of cardiovascular responses associated with behavioral responses observed during exposure to aversive stimuli.

*Acknowledgments*—We acknowledge Ms. I. A. C. Fortunato, I. I. B. Aguiar and S. S. Guilhaume for technical assistance. Eduardo Albino Trindade Fortaleza is a graduate student enrolled in the Program of Pharmacology of the Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto—USP and recipient of a CAPES/PROEX fellowship. Rodrigo F. Tavares is a postdoctoral fellow in the Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto—USP and recipient of a CNPq fellowship (Proc. 151388/2007-5). CNPq grants Proc. AT-501656/2008-1 and PQ-304961/2006-0.

## REFERENCES

Aslan N, Goren Z, Ozkutlu U, Onat F, Oktay S (1997) Modulation of the pressor response elicited by carbachol and electrical stimulation of

- the amygdala by muscarinic antagonists in conscious rats. *Br J Pharmacol* 121:35–40.
- Barron BA, Van Loon GR (1989) Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. *J Auton Nerv Syst* 28:179–187.
- Callahan MF, da Rocha MJ, Morris M (1992) Sinoaortic denervation does not increase cardiovascular/endocrine responses to stress. *Neuroendocrinology* 56:735–744.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1995) Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 360:213–245.
- Carter DA, Lightman SL (1987) Oxytocin stress responses are dependent upon emotionality. *Psychoneuroendocrinology* 12:219–223.
- Chen X, Herbert J (1995) Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. *Neuroscience* 64:675–685.
- Crane JW, French KR, Buller KM (2005) Patterns of neuronal activation in the rat brain and spinal cord in response to increasing durations of restraint stress. *Stress* 8:199–211.
- Crestani CC, Alves FHF, Tavares RF, Correa FMA (2008) Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress, in press*.
- AG: 7 Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64:477–505.
- Dampney RA (1994) Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev* 74:323–364.
- Davis M (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 15:353–375.
- Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA (2001a) Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci* 14:1143–1152.
- Dayas CV, Buller KM, Day TA (2001b) Medullary neurones regulate hypothalamic corticotropin-releasing factor cell responses to an emotional stressor. *Neuroscience* 105:707–719.
- Dayas CV, Buller KM, Day TA (1999) Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur J Neurosci* 11:2312–2322.
- Dunn JD, Whitener J (1986) Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the amygdaloid complex: cytoarchitectural specificity. *Neuroendocrinology* 42:211–217.
- Faiers AA, Calaresu FR, Mogenson GJ (1975) Pathway mediating hypotension elicited by stimulation of the amygdala in the rat. *Am J Physiol* 228:1358–1366.
- Galeno TM, Van Hoesen GW, Brody MJ (1984) Central amygdaloid nucleus lesion attenuates exaggerated hemodynamic responses to noise stress in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res* 291:249–259.
- Gelsema AJ, McKittrick DJ, Calaresu FR (1987) Cardiovascular responses to chemical and electrical stimulation of amygdala in rats. *Am J Physiol* 253:R712–R718.
- Gibbs DM (1984) Dissociation of oxytocin, vasopressin and corticotropin secretion during different types of stress. *Life Sci* 35:487–491.
- Hoover DB, Muth EA, Jacobowitz DM (1978) A mapping of the distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in discrete areas of rat brain. *Brain Res* 153:295–306.
- Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:633–673.
- Kanaya T, Okatani H, Hagiwara Y, Fukumori R, Goshima Y, Kubo T (2003) Projections from the caudal part to the rostral part of the lateral septal area mediate blood pressure increase. *Brain Res Bull* 61:505–510.
- Kretz R (1984) Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. *J Neurosci Methods* 11:129–135.
- Krout KE, Mettenleiter TC, Karpitskiy V, Nguyen XV, Loewy AD (2005) CNS neurons with links to both mood-related cortex and sympathetic nervous system. *Brain Res* 1050:199–202.
- Kubo T, Kanaya T, Numakura H, Okajima H, Hagiwara Y, Fukumori R (2002) The lateral septal area is involved in mediation of immobilization stress-induced blood pressure increase in rats. *Neurosci Lett* 318:25–28.
- Kubo T, Numakura H, Endo S, Hagiwara Y, Fukumori R (2001) Angiotensin receptor blockade in the anterior hypothalamic area inhibits stress-induced pressor responses in rats. *Brain Res Bull* 56:569–574.
- 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.
- Lang RE, Heil JW, Ganten D, Hermann K, Unger T, Rascher W (1983) Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 37:314–316.
- McDougall SJ, Lawrence AJ, Widdop RE (2005) Differential cardiovascular responses to stressors in hypertensive and normotensive rats. *Exp Physiol* 90:141–150.
- Muller JR, Le KM, Haines WR, Gan Q, Knuepfer MM (2001) Hemodynamic response pattern predicts susceptibility to stress-induced elevation in arterial pressure in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R31–R37.
- Nitecka L, Frotscher M (1989) Organization and synaptic interconnections of GABAergic and cholinergic elements in the rat amygdaloid nuclei: single- and double-immunolabeling studies. *J Comp Neurol* 279:470–488.
- Ohta H, Watanabe S, Ueki S (1991) Cardiovascular changes induced by chemical stimulation of the amygdala in rats. *Brain Res Bull* 26:575–581.
- Ozkutlu U, Coskun T, Onat F, Yegen BC, Oktay S (1995) Cardiovascular effects of centrally active cholinomimetics in conscious and anesthetized rats: the role of amygdala. *Brain Res Bull* 37:569–573.
- Pare D, Smith Y (1994) GABAergic projection from the intercalated cell masses of the amygdala to the basal forebrain in cats. *J Comp Neurol* 344:33–49.
- Paxinos G, Watson C (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press.
- Pitkanen A, Savander V, LeDoux JE (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* 20:517–523.
- Price JL, Russchen FT, Amaral DG (1987) *The limbic region. II: The amygdaloid complex*. New York: Elsevier Science.
- Rosen JB, Donley MP (2006) Animal studies of amygdala function in fear and uncertainty: relevance to human research. *Biol Psychol* 73:49–60.
- Rotter A, Birdsall NJ, Burgen AS, Field PM, Hulme EC, Raisman G (1979) Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. I. Technique for autoradiographic localization of the binding of [3H]propylbenzilylcholine mustard and its distribution in the forebrain. *Brain Res* 180:141–165.
- Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83:803–834.
- Salome N, Ngampramuan S, Nalivaiko E (2007) Intra-amygdala injection of GABAA agonist, muscimol, reduces tachycardia and modifies cardiac sympatho-vagal balance during restraint stress in rats. *Neuroscience* 148:335–341.
- Sanders BJ, Wirtz-Nole C, DeFord SM, Erling BF (1994) Central amygdaloid lesions attenuate cardiovascular responses to acute stress in rats with borderline hypertension. *Physiol Behav* 56:709–713.



Scott SK, Young AW, Calder AJ, Hellawell DJ, Aggleton JP, Johnson M (1997) Impaired auditory recognition of fear and anger following bilateral amygdala lesions. *Nature* 385:254–257.

Spencer DG Jr, Horvath E, Traber J (1986) Direct autoradiographic determination of M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor distribution in the rat brain: relation to cholinergic nuclei and projections. *Brain Res* 380:59–68.

Tavares RF, Correa FM (2006) Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. *Neuroscience* 143:231–240.

Trneckova L, Armario A, Hynie S, Sida P, Klenerova V (2006) Differences in the brain expression of c-fos mRNA after restraint stress in Lewis compared to Sprague-Dawley rats. *Brain Res* 1077:7–15.

(Accepted 4 January 2009)

UNCORRECTED PROOF

528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586

528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)