

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Fernando Aparecido de Oliveira Filho

Papel da amígdala medial pósterodorsal no controle central da atividade cardiovascular de ratos: modulação neuroquímica e resposta à restrição hídrica

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2018

Fernando Aparecido de Oliveira Filho

Papel da amígdala medial pósterodorsal no controle central da atividade cardiovascular de ratos: modulação neuroquímica e resposta à restrição hídrica

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Dr. Alberto Antonio Rasia Filho
Coorientador: Dr. José Antunes Rodrigues

Porto Alegre

2018

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho às pessoas que me inspiram.

À minha filha Maria Fernanda, a maior fonte da minha força de vontade.
Te amo, minha pequena.

À minha esposa Carmella, minha grande incentivadora. Quem dividiu comigo o dia-a-dia desse longo período de trabalho. Ninguém sabe melhor do que nós dois a grandeza e o esforço nessa caminhada. Estar contigo me dá paz.

Aos meus pais, por fazerem de tudo por mim. Hoje eu sei o valor do que é fazer de tudo para ver o bem de um filho - no mais valioso sentido da palavra "bem". À minha mãe Adriana e ao meu pai Fernando, o meu eterno amor e honra.

AGRADECIMENTOS

Com a maior fraternidade, agradeço ao meu orientador Professor Rasia, por acreditar em mim. Gratidão pela forma paterna com que planejou e pela paciência com que me acompanhou nesse processo. Obrigado pelo legado de que: “não há meio, um quarto ou um dezesseis avos de ciência ou cientista”. Aprendi muito sobre responsabilidade, ética, cordialidade e senso crítico em nosso convívio.

Ao ilustríssimo Professor Antunes, meu coorientador. Pelo acolhimento no Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP/USP) e por todos os ensinamentos.

Ao grande amigo e colega de Laboratório Edson Quagliotto, por ser uma das pessoas mais importantes para a realização desse trabalho, por todas as técnicas que me ensinou.

Ao querido Professor Wagner, agradeço pela excelente recepção no seu laboratório e pelo auxílio nos diversos momentos solicitados.

À equipe de cuidados veterinários da UFCSPA, especialmente à Joana Fisch, veterinária do biotério da UFCSPA, por ensinar o amor aos animais.

Às técnicas do Laboratório de Fisiologia da UFCSPA, Carmem e Alexandra pelo bom ambiente de trabalho e por todo o apoio concedido.

À querida Sra. Terezinha, técnica do Laboratório de Patologia, pelo sorriso no rosto e todo o trabalho e auxílio no preparo das lâminas histológicas.

Aos colegas de laboratório que entraram na minha vida com muito carinho. De forma toda especial, Camila Martins, Lucas Capalonga e Gisele Lovatel.

À caríssima Professora Eliane Dallegrove, pela enorme contribuição nas coletas. Muito obrigado pela prontidão em me ensinar e auxiliar.

Aos queridos Líbio e Carol, pelo amor e cuidado comigo e com a minha família.

À Grande família, Oliveiras e Buiões por todo incentivo.

Ao grande amigo Fernando Buzzatti pela grande parceria, ótima companhia, garagem e viagens semanais na freeway.

À toda equipe de funcionários do biotério da UFCSPA, em especial e com muito carinho Ignez e Val, um grande beijo.

Ao meu Pai do céu, obrigado pela vida, força e cuidado de hoje e sempre.

“Quero, um dia, dizer às pessoas que nada foi em vão...
Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas...
Que a vida é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim...
E que valeu a pena.”

Mário Quintana

RESUMO

O subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial (MePD) é parte relevante da circuitaria que integra comportamentos emocionais e sociais e controle central cardiovascular. Aqui, estudamos a atividade hemodinâmica basal e as respostas cardiovasculares reflexas após microinjeções de salina (0,3 µL, n=7), vasopressina (VP, 1pg ou 100pg/0,3 µL, n= 5-7), substância P (SP, 10ng ou 100ng /0,3 µL, n= 4-6); colecistoquinina (ou colecistocinina, CCK, 10nM ou 100 nM/0,3 µL, n= 4/grupo), e L-Arginina (L-Arg, 2,87 nM ou 100 nM/0,3 µL, n= 4-5) no MePD de ratos machos, adultos e não anestesiados. As respostas barorreflexas e quimiorreflexas foram testadas. Análise espectral e simbólica dos dados foram realizadas para avaliar a atividade central nos componentes simpáticos e parassimpáticos na variabilidade da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial (PA). A seguir, testamos o quanto o glutamato (2 µg/0,3 µl), quando microinjetado na MePD, é capaz de modular a resposta central à privação de água, com alterações no volume sanguíneo e osmolaridade e, conseqüentemente, na PA e FC. Os resultados mostraram que a VP aumentou consistentemente os parâmetros da análise espectral, o que indica uma maior resposta simpática, SP induziu um efeito dose-dependente e aumentou tanto a sensibilidade do barorreflexo e a FC provocada pelo quimiorreflexo e parâmetros de análise espectral e simbólica com significados fisiológicos mistos, L-Arg aumentou a FC provocada pelo quimiorreflexo e reduziu a atividade parassimpática central. Em relação ao equilíbrio hidromineral, ratos microinjetados com glutamato apresentaram maior consumo de água, mas não maior consumo de água e NaCl quando comparados aos ratos não submetidos à restrição hídrica. Esses dados contribuem para o avanço dos conhecimentos sobre a modulação neuroquímica e o balanço simpático/parassimpático que modula o sistema cardiovascular após estimulação periférica. O MePD também participa do controle central do apetite de sal, reduzindo-o, mas mantendo a sede e o volume de água ingerido após a desidratação. Esses achados indicam que o MePD atua para controlar a homeostase dos ajustes cardiovasculares reflexos, volume sanguíneo e PA sem induzir alto consumo de sal em ratos.

Palavras-chave: Reflexo barorreceptor, pressão arterial, controle central cardiovascular, reflexo quimiorreceptor, amígdala estendida, homeostase hidromineral.

ABSTRACT

The posterodorsal medial amygdala (MePD) is a relevant component of the central network for the elaboration of emotional/social behaviors and corresponding supramedullary control of the cardiovascular system. Here, we studied both the basal hemodynamic state and reflex-mediated cardiovascular responses after microinjections of saline (0.3 μ L, n=7), vasopressin (VP, 1pg or 100pg/0.3 μ L, n= 5-7), substance P (SP, 10ng or 100ng /0.3 μ L, n= 4-6); cholecystokin (CCK, 10nM or 100 nM/0.3 μ L, n= 4/group), and L-Arginine (L-Arg, 2.87 nM or 100 nM/0.3 μ L, n= 4-5) in the MePD of awake adult male rats. Baroreflex and chemoreflex responses were tested. Power spectral and symbolic analyses were performed to evaluate the central involvement of sympathetic and parasympathetic components in the variability of the heart rate (HR) and arterial blood pressure (AP). In addition, we tested whether glutamate microinjected in the MePD is able to modulate the central response to water deprivation, likely changes in the blood volume and osmolarity and, consequently, AP and HR. Results showed that VP consistently enhanced the power spectral parameters indicative of higher central sympathetic responses, SP induced a dose-dependent effect and increased both the sensibility of the baroreflex and the HR evoked by the chemoreflex as well as a sympathetic activation, CCK increased HR evoked by the chemoreflex and parameters of power spectral and symbolic analyses with mixed physiological meanings, and L-Arg increased HR evoked by the chemoreflex and reduced the central parasympathetic activity. Regarding the hydromineral balance, rats that were microinjected with glutamate had a higher consumption of water, but not a higher intake of water and NaCl compared to glutamate microinjected in rats with free access to water. These data add to the fine-tuned neurochemical modulation of the MePD function on the central sympathetic/parasympathetic functional organization that modulate the cardiovascular system following peripheral reflex stimulation. The MePD also participates in the central control of salt appetite, reducing it, but maintaining thirst and the volume of water intake after dehydration. These findings indicate that the MePD acts to homeostatically control reflex-mediated cardiovascular adjustments, blood volume and AP without inducing high salt intake in rats.

Keywords: Baroreceptor reflex, blood pressure, central cardiovascular control, chemoreceptor reflex, extended amygdala, hydromineral homeostasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da localização do complexo amigdaliano	14
Figura 2. Classificação dos núcleos que compõem a amígdala do rato.....	15
Figura 3. Representação esquemática da localização dos subnúcleos da amígdala medial	17
Figura 4. Representação esquemática da localização da amígdala medial pósterodorsal	18

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS (REFERENTE AO ARTIGO EM
INGLÊS ANEXO)**

Figure 1. (A) Schematic representation of a matched coronal section of the rat brain to demonstrate the location of the posterodorsal medial amygdala (MePD) **(B)** Photomicrography of a representative rat brain coronal section to show the location of the cannula implanted above the MePD. **55**

Figure 2. Baroreflex. Plots of the average values for the mean arterial blood pressure..... **56**

Figure 3. Chemoreflex. **(A)** Changes in heart rate in response to increasing doses of potassium cyanide (KCN). **(B)** Changes in mean arterial pressure in response to increasing doses of potassium cyanide (KCN) **57**

Figure 4. Water deprivation. Values (median and interquartile ranges) of the volume (in mL) for the consumption of **(A)** water, **(B)** water and NaCl (0.3M), and **(C)** urinary excretion in adult male rats..... **58**

Table 1. Values are means \pm standard deviation (SD). Basal hemodynamic data obtained before (“control” data) and “after” (test data) microinjections in the rat posterodorsal medial amygdala..... **59**

Table 2. Plots of the average values for the relationship between mean arterial blood pressure (MAP in mm Hg) and heart rate (HR) using the logistic sigmoidal baroreceptor curve analysis..... **60**

Table 3. Cardiovascular parameters (values are means \pm S.D.) of power spectral analysis calculated from sampled data of rats that received microinjections in the posterodorsal medial amygdala..... **61**

Table 4. Cardiovascular parameters (values are means \pm S.D.) of symbolic analysis calculated from sampled data of rats that received microinjections in the posterodorsal medial amygdala..... **62**

LISTA DE ABREVIATURAS

ABL	Núcleo baso-lateral da amígdala
ACe	Núcleo central da amígdala
BNST	Núcleo próprio da estria terminal
CCK	Colecistoquinina
FC	Frequência cardíaca
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
L-Arg	L-arginina
MeA	Núcleo medial da amígdala
MeAD	Subnúcleo ântero-dorsal da amígdala medial
MeAV	Subnúcleo ântero-ventral da amígdala medial
MePD	Subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial
MePV	Subnúcleo póstero-ventral da amígdala medial
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NTS	Núcleo do trato solitário
OT	Ocitocina
PA	Pressão arterial
RVLM	Bulbo ventro-lateral rostral
CVLM	Bulbo ventro-lateral caudal
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
ST	Estria Terminal
TO	Trato óptico
VP	Vasopressina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Amígdala	14
1.2 Amígdala medial	16
1.3 Amígdala medial pósterio-dorsal	18
1.4 Controle central cardiovascular e amígdala medial ...	19
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. ARTIGO CIENTÍFICO	28
4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÕES	68
6. PERSPECTIVAS	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8. ANEXOS	85
8.1 Anexo 1. Pareceres de aceitação do CEUA	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 Amígdala

A amígdala, ou complexo amigdaliano, constitui-se de núcleos subcorticais situados no lobo temporal, lateral ao hipotálamo e ventral ao estriado, no encéfalo de mamíferos. Em primatas, caracteriza-se como uma massa ovóide de substância cinzenta, que está situada na porção terminal e rostral da formação hipocampal, tendo como limite anterior o corno temporal do ventrículo lateral (Alheid et al., 1999; Everitt et al., 1995; Rasia-Filho et al., 2000; de Olmos et al., 2004; Rasia-Filho et al., 2004). Em ratos, é constituída por núcleos e subnúcleos que formam uma complexa rede estrutural inter-relacionada e multifuncional, sendo, dessa forma, importante para sobrevivência e adaptação do animal em seu ambiente, pois participa de atividades comportamentais, endócrinas, simpáticas e parassimpáticas, inatas e aprendidas (Rasia-Filho et al., 2000).

O termo amígdala adveio de estudos anatómicos que observaram diversos núcleos localizados na região rostral à cauda do núcleo caudado, ao hipocampo e ao corno temporal do ventrículo lateral pareciam, conjuntamente, ter uma forma esferoide e alongada, semelhante à forma de uma amêndoa (denominação de origem grega, apesar desse aspecto não ser comum para todos os animais estudados até o momento).

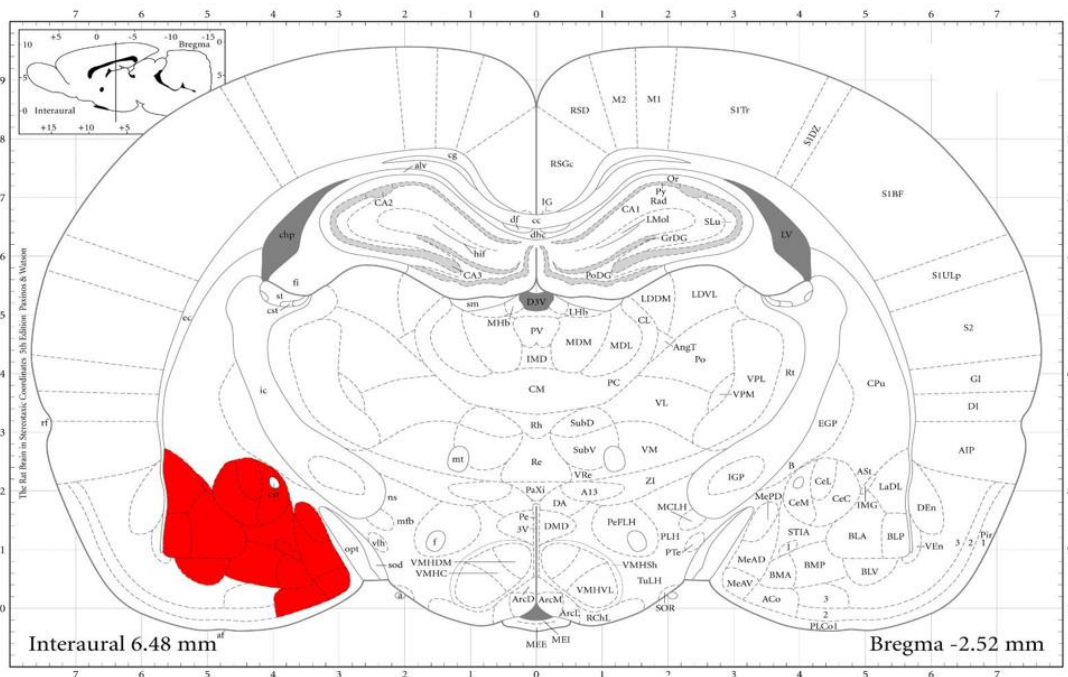


Figura 1. Representação esquemática de corte coronal do encéfalo de rato, onde se pode observar na área hachurada em vermelho a localização do complexo amigdaliano. Figura adaptada do atlas do

encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1998), abreviaturas conforme o atlas, rerepresentado de Quagliotto (2006).

Nesses animais, os limites anatômicos não são considerados precisos, e a classificação de suas subdivisões continua controversa (Canteras et al., 1995; Swanson e Petrovich, 1998; de Olmos et al., 2004; Quagliotto et al., 2006; Dall'Oglio et al., 2008), entretanto, é aceitável que a amígdala seja dividida em quatro regiões (como mostra a figura a seguir):

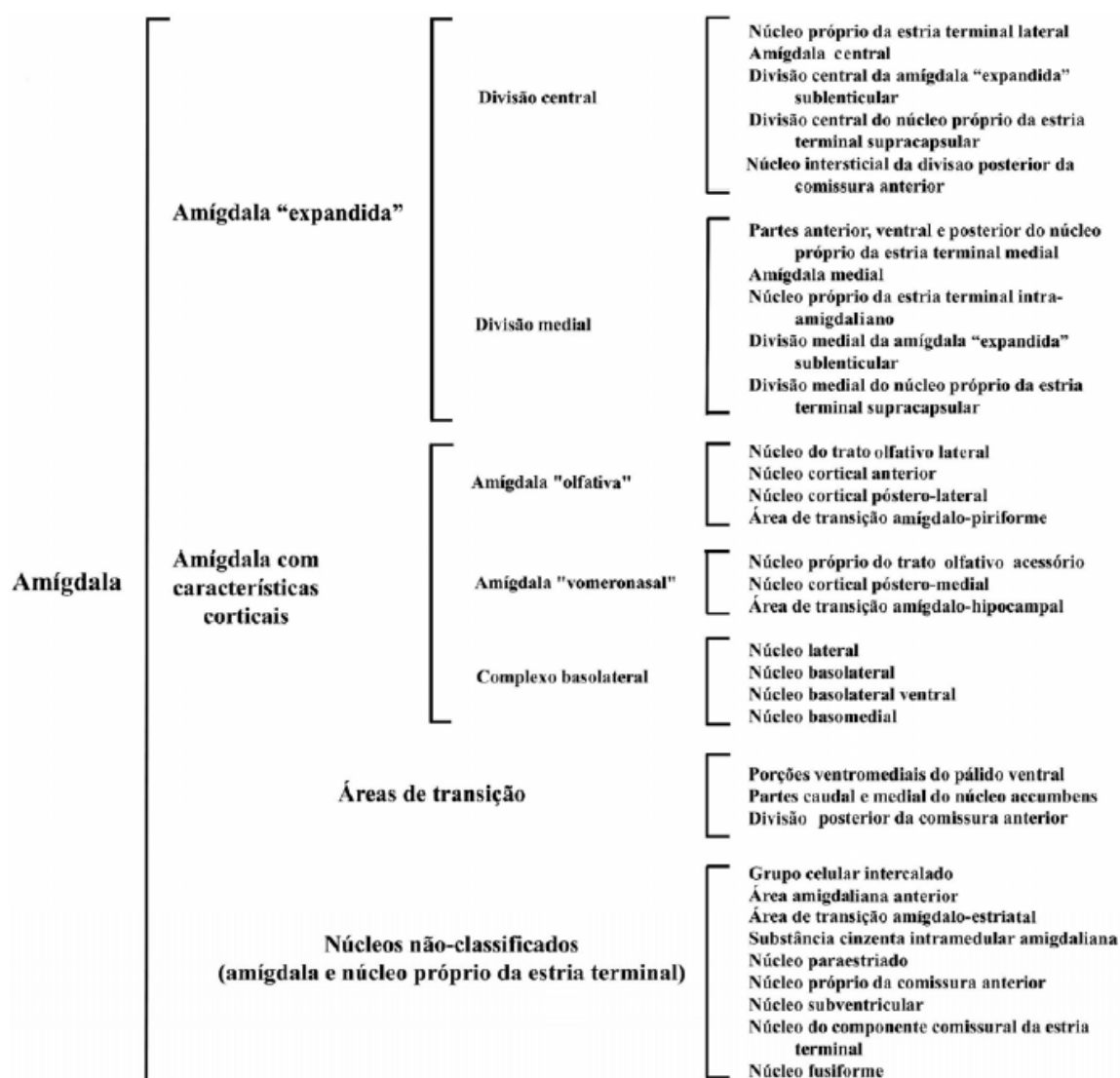


Figura 2. Classificação dos núcleos que compõem a amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais, conforme descrito por Alheid e colaboradores (1995) e modificado por Rasia-Filho e colaboradores (2000).

1) amígdala “expandida”, assim chamada, pois estende-se além de seus limites anatômicos e é formada pelos núcleos medial (MeA) e central (ACe) da amígdala; 2) amígdala com características corticais, subdividida em porção basilar lateral e em porções que se ligam às vias olfatórias e vomeronasal; 3) áreas de transição, dispostas entre a porção ventral dos núcleos da base e a amígdala “expandida”; e 4) núcleos ainda não classificados, constituídos por um grande grupo de células dispersas na substância branca e no interior do núcleo próprio da estria terminal (BNST; de Olmos et al., 2004; Swanson e Petrovich, 1998).

1.2 Amígdala medial

O MeA é um dos núcleos superficiais do complexo amigdaliano que, ao longo de sua extensão, está em contato direto com a região lateral do trato óptico (TO), ventral à estria terminal (ST) em sua parte mais posterior, em posição medial e posterior ao núcleo do trato olfatório e, tendo como limite posterior, aproximadamente onde surgem os ventrículos cerebrais (de Olmos et al., 2004). Dorsalmente, o MeA é separado da porção medial do ACe por uma região caracterizada por uma menor densidade celular, a qual é substituída em seus limites mais ventralmente e caudalmente pelo BNST (Alheid et al., 1995). Caudalmente, o grupo de núcleos intercalados da amígdala separa a AMe do núcleo baso-lateral da amígdala (ABL). Ainda em sentido caudal, e em posição dorsal, grupos de fibras que ascendem dentro da ST são interpostos entre a AMe e outros núcleos da amígdala. (Alheid et al., 1995; Petrovich et al., 2000; Pitkanen, 2000; de Olmos et al., 2004). Baseado em critérios citoarquitetônicos, hodológicos e funcionais, o MeA tem sido dividido em quatro subnúcleos: ântero-dorsal (MeAD), ântero-ventral (MeAV), pósterodorsal (MePD) e póstero-ventral (MePV), como observa-se na Figura 3. (Canteras et al., 1995; de Olmos et al., 2004; de Castilhos et al., 2006; Dall’Oglio et al., 2008; Arpini et al., 2010; Brusco et al., 2010).

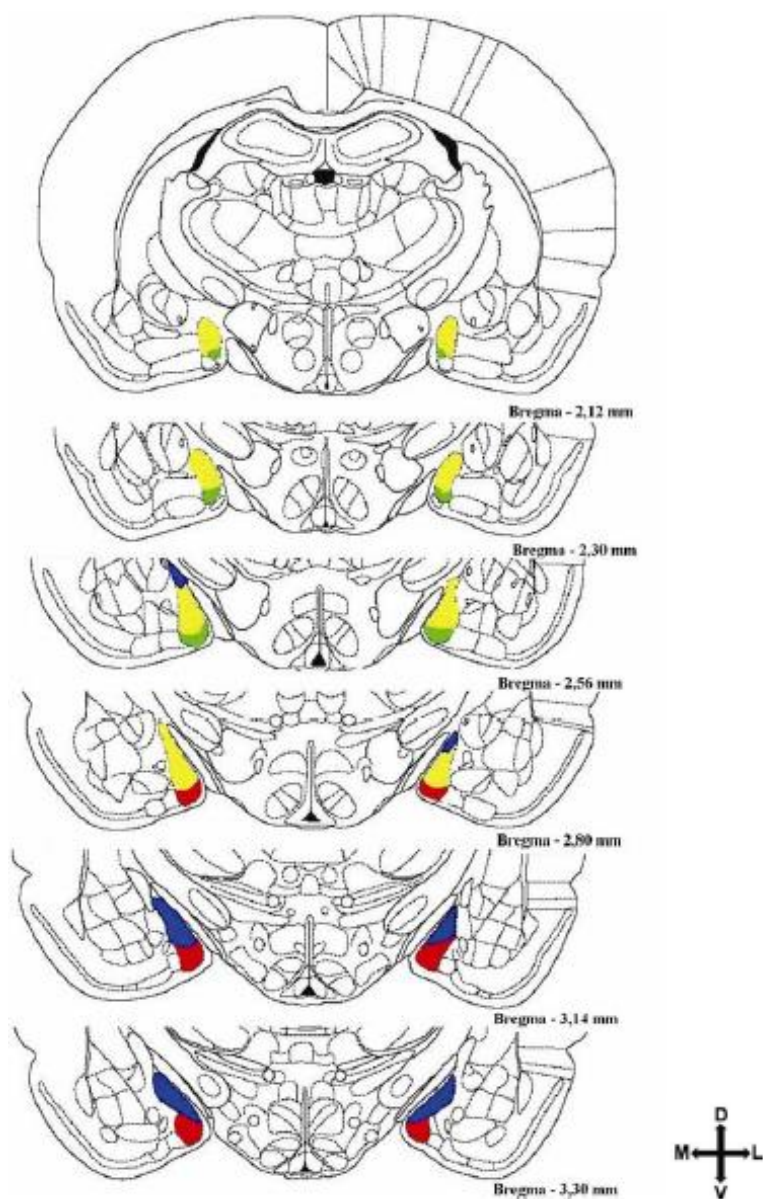


Figura 3. Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato, onde se pode observar os quatro subnúcleos da amígdala medial, a saber AMeAD em amarelo; AMeAV em verde; MePD em azul; MePV em vermelho. Os valores em mm colocados à direita das imagens referem-se às distâncias posteriores ao bregma. As coordenadas espaciais referem-se ao hemisfério direito e são dorsal (D), ventral (V), medial (M), lateral (L). Figuras e abreviaturas baseadas no atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998), reapresentado de Quagliotto (2006).

1.3 Amígdala medial póstero-dorsal

O MePD, parte da “amígdala estendida”, está localizada na parte subcortical do terço anterior do lobo temporal, lateral ao TO e ventral à ST na parte telencefálica basilar do rato (de Olmos et al., 2004).

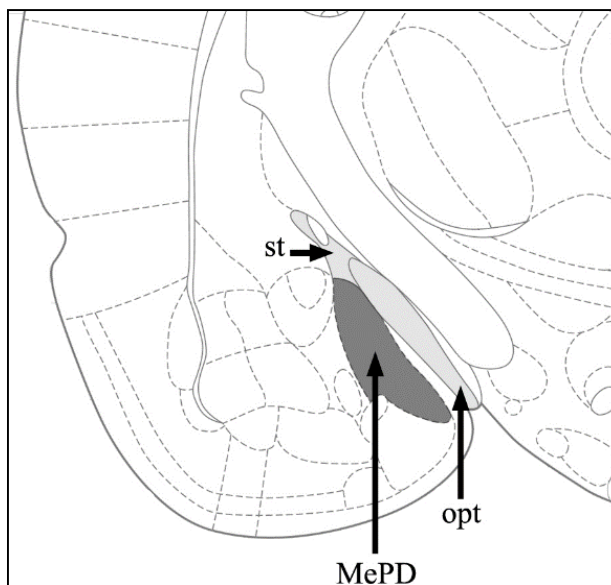


Figura 4. Representação esquemática de corte coronal de encéfalo de rato onde se pode observar o núcleo medial póstero-dorsal da amígdala medial (MePD) e suas adjacências com a estria terminal (st) e o trato óptico (opt). Abreviaturas baseadas no atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998).

O MePD recebe aferências de diferentes regiões encefálicas, como as densas projeções do sistema olfatório, especificamente do bulbo olfatório acessório; de núcleos corticais como o córtex infralímbico, área pré-límbica e ínsula agranular ventral; da formação hipocampal, como o córtex entorrinal e partes proximal e distal do *subiculum* temporal; de núcleos hipotalâmicos, dentre eles, a área pré-óptica medial, regiões dorsal e medial do núcleo paraventricular, núcleos ventromedial, pré-mamilar ventral e dorsal, arqueado, lateral; de núcleos talâmicos, como os núcleos paraventricular, parataenial, parafascicular, basal do complexo ventromedial e divisão medial do complexo geniculado medial; do tronco encefálico; da divisão medial do BNST; e do núcleo da divisão horizontal da faixa diagonal de Broca, entre outras (McDonald, 1998; Pitkänen et al., 2000). Este subnúcleo também se encontra interconectado com os demais subnúcleos do MeA (Canteras et al., 1995). Além disso,

o MePD possui conexões intra-amigdalíacas, sendo muitas delas recíprocas, podendo-se destacar as divisões magnocelular e parvocelular do núcleo basal acessório, as divisões medial e ventro-lateral do núcleo lateral, os núcleos cortical anterior e posterior e as divisões medial e lateral da área amígdalo-hipocámpal (Ottersen e Ben-Ari, 1979; Ottersen, 1980; de Olmos et al., 2004).

O MePD também envia eferências a diversas regiões encefálicas, entre as quais estão aquelas para alguns núcleos hipotalâmicos como o posterior, o anterior, o periventricular ântero-ventral, o pré-óptico medial e o pré-mamilar ventral; para áreas corticais, principalmente entorrinal lateral, de transição pós-piriforme, CA1 hipocámpal e *subiculum*; áreas do tronco encefálico, para tegmental dorsal e substância cinzenta periaqueductal; para outras regiões, como o BNST, parte ântero-dorsal e posterior principal; e para a substância *innominata* (Canteras et al., 1995; Petrovich et al., 2001).

Baseado em sua hodologia, o MePD gera resposta neuroendócrina de aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) em resposta a estímulos estressantes emocionais incondicionados (Dayas et al., 1999), modula comportamentos como o reprodutivo, agressivo e defensivo (revisado em Rasia-Filho et al., 2012) e promove ajustes homeostáticos cardiovasculares com repercussão na elevação da pressão arterial sistêmica (PA; Quagliotto et al., 2008, 2012; Neckel et al., 2012; Quagliotto et al., 2015). Além disso, o MePD também integra parte do controle central dos reflexos dos barorreceptores e quimiorreceptores. Este subnúcleo pode, ainda, modular ajustes simpáticos e parassimpáticos cardiovasculares (Rasia-Filho, 2006; Quagliotto et al., 2008; Neckel et al., 2012; Quagliotto et al., 2012), o que será tema desta dissertação.

1.4 Amígdala medial e controle central cardiovascular

O conceito dos mecanismos do controle neural do sistema cardiovascular modificou-se nas últimas décadas. Os ajustes centrais cardiovasculares podem ocorrer por respostas reflexas e/ou pelos mais diversos comportamentos (Rasia-Filho, 2006; Quagliotto et al., 2006). Dois elementos funcionais estão envolvidos no controle central do sistema cardiovascular: um constituído de áreas do sistema nervoso central (SNC) que mantém atividade basal/tônica simpática/parassimpática para o coração e

leitos vasculares enquanto o outro se relaciona com informações sensoriais fásicas para modular a atividade neural que atinge os órgãos efetores (Longhurst, 2008). Neste, por exemplo, reflexos neurais envolvem os barorreceptores carotídeos e aórticos e as vias neuronais dos quimiorreceptores periféricos, a curto prazo, que convergem principalmente a áreas do tronco encefálico, embora outras regiões do prosencéfalo também sejam relevantes para a resposta cardiovascular final (Longhurst, 2008).

O mecanismo reflexo desencadeado pelos barorreceptores do seio carotídeo e arco aórtico tem fundamental importância no controle a curto prazo da PA. Em circunstâncias normais a PA é mantida em uma faixa de variação estreita assegurando uma perfusão tecidual adequada. Os componentes da PA, o débito cardíaco e a resistência vascular periférica são ajustados por mecanismos complexos envolvendo o sistema nervoso simpático e parassimpático e vários hormônios. Os barorreceptores do arco aórtico e do seio carotídeo constituem o mais importante mecanismo de controle da PA momento-a-momento, devido a sua sensibilidade e alto ganho, relevantes na atenuação de alterações agudas da PA. Comprovando a ação tônica inibitória dos barorreceptores sobre a atividade simpática, observa-se um efeito hipertensor agudo após a deafferentação dos barorreceptores (Krieger, 1964, Franchini e Krieger, 1994, Franchini et al., 1996). Tais receptores emitem fibras mielinizadas e não mielinizadas aferentes ao núcleo do trato solitário (NTS) no bulbo, que é para onde convergem diversas informações sobre a circulação e a atividade cardíaca (Krieger, 1964, Krieger, 1970, Spyer, 1994, Dall'Ago et al., 1997, De Angelis et al., 2000, Dall'Ago et al., 2002, Dall'Ago et al., 2007, Spyer and Gourine, 2009, Díaz-Mataix et al., 2011). As aferências dos barorreceptores são inicialmente integradas no NTS que, por sua vez, projeta eferências para outras estruturas do SNC envolvidas com o controle cardiovascular (Mifflin, 2001, Zhang et al., 2009a, Zhang et al., 2009b, Zhang and Mifflin, 2010). Por exemplo, no tronco encefálico, grupos de neurônios regulam a atividade do barorreflexo pela ativação parassimpática para o coração (via núcleo ambíguo e núcleo dorsal do vago) e simpática para o coração e vasos periféricos (via região caudal e rostral do bulbo ventrolateral; Mifflin, 2001, Dampney et al., 2002, Dampney, 2009, Zhang and Mifflin, 2010). A redução na habilidade do barorreflexo e do quimiorreflexo em controlar a PA pode resultar em aumento da

variabilidade desta e da frequência cardíaca (FC) com consequente comprometimento da função cardiovascular em diferentes situações (Malpas and Maling, 1990, Malpas and Purdie, 1990, Spallone and Menzinger, 1997, Malpas et al., 2001, Malpas, 2002, Salgado et al., 2007, Tobaldini et al., 2009a, Tobaldini et al., 2009b, Malpas, 2010).

Os quimiorreceptores periféricos situados no arco aórtico e no corpo carotídeo são importantes para ajustes ventilatórios em resposta à hipercapnia e hipoxemia, assim como à quedas do pH plasmático. Além disso, essas respostas são mediadas pela interação entre os quimiorreceptores periféricos e centrais. Por exemplo, acidose e hipercapnia aumentam a atividade dos quimiorreceptores periféricos, potencializando o efeito da hipóxia. As aferências provenientes dos quimiorreceptores carotídeos e aórticos chegam ao NTS pelos nervos glossofaríngeo e vago, respectivamente. No bulbo essas aferências desencadeiam um aumento da ventilação, da atividade simpática periférica e da atividade vagal no coração (Thames, 1994). O resultado desses ajustes é uma menor FC, mas um volume de ejeção maior por aumento da força contrátil cardíaca. O papel funcional dessas adaptações envolve a manutenção das trocas gasosas pelo aumento da ventilação, manutenção da perfusão em órgãos vitais como o coração e sistema nervoso, o que pode acarretar uma vasoconstrição momentânea e diminuição da perfusão em leitos vasculares não tão vitais, como por exemplo em músculos esqueléticos, mesentério e rins, concomitantemente à vasodilatação coronariana, por ativação vagal cardíaca e vasodilatação em território nervoso, por razões metabólicas (Quagliotto et al., 2006). Além disso, a ativação dos quimiorreceptores carotídeos é inibida pela ativação dos barorreceptores aórticos em decorrência de aumentos da PA e a desativação dos barorreceptores potencializam a resposta ventilatória e vasoconstritora dos quimiorreceptores (Dall'Ago et al., 1999). Em quimiorreceptores centrais, no bulbo, ainda pode ocorrer estimulação direta de resposta cardiovascular provocada pela quantidade de gás carbônico local e pela variação da composição do líquido cefalorraquidiano (Ganong, 2003).

As respostas cardiovasculares desencadeadas pelos quimiorreceptores, estimulados pelo cianeto de potássio (KCN) são complexas e podem ser moduladas por mecanismos secundários como hiperventilação, mudanças nos gases sanguíneos, ativação dos barorreceptores e resposta de defesa (Franchini and

Krieger, 1992, 1994, Marshall, 1994, Franchini et al., 1996, Dall'Ago et al., 1997, Dall'Ago et al., 2007, Quagliotto et al., 2008, Franchini et al., 2009, Zhang and Mifflin, 2010). De fato, para sua participação no controle reflexo sobre o débito cardíaco e sobre a resistência periférica, os barorreceptores exercem uma ação complexa graças a suas múltiplas conexões com regiões do SNC, como o complexo amigdaliano, hipotálamo lateral, núcleos dorsomedial e periventricular hipotalâmicos e núcleo parabraquial pontino, por exemplo (Franchini and Krieger, 1994, Franchini et al., 1996, Bealer, 1999a, b, Bealer and Crowley, 1999a, b, Dampney et al., 2002, Dampney, 2009, Bealer et al., 2010a, Bealer et al., 2010b). É importante notar que essas estruturas estão interligadas entre si, formando um circuito neural que deve organizar os ajustes simpáticos e parassimpáticos e a emissão de comportamentos relevantes para adequação do animal em seu meio. Não é à toa, então, que também o ACe, que está envolvido com o controle de respostas emocionais, como no caso do medo condicionado, afeta a atividade de estruturas hipotalâmicas e bulbo-pontinas para aumentar a FC e a PA no contexto de “fuga ou luta” do animal (Davis, 1992a, b, c, LeDoux, 1992a, b, Rasia-Filho et al., 2000, de Castilhos et al., 2006, Rasia-Filho, 2006, de Castilhos et al., 2008, de Castilhos et al., 2009, de Castilhos et al., 2010). No entanto, a resposta a estímulos estressantes em ratos depende mais da integridade do MeA do que do ACe (Dayas et al., 1999, 2001, Dayas and Day, 2002, Dayas et al., 2004). O MeA apresenta conexões com o ACe (Pitkanen, 2000, Hayward et al., 2010) e, ademais, desponta como importante área no controle das respostas emocionais (Rasia-Filho et al., 1991, Rasia-Filho et al., 2000, Rasia-Filho and Hilbig, 2005, Rasia-Filho, 2006, 2009).

Muitos núcleos do SNC contribuem com os ajustes neurais e hormonais de variáveis cardiovasculares. Dentre eles, é possível destacar as projeções do MeA que inervam áreas previamente envolvidas com a organização central cardiovascular (Canteras et al., 1995; Petrovich et al., 2001), tais como: o ACe, cuja ativação elétrica leva a um aumento na FC, primeiro devido à diminuição da atividade vagal e, posteriormente, a um aumento do tônus simpático (Turner et al., 1986); as células noradrenérgicas A1 do bulbo ventrolateral caudal e; as células noradrenérgicas A2 do NTS (Canteras et al., 1995; Dayas et al., 1999; Dayas and Day, 2002; Saha and Datta, 2005).

O MePD possui eferências diretas e indiretas (1) aos núcleos hipotalâmicos paraventricular medial e supra-óptico para controle da secreção de ocitocina (OT; Dayas et al., 1999), (2) à zona periventricular hipotalâmica relacionada com respostas simpáticas e parassimpáticas (Petrovich et al., 2001) e (3) ao NTS (Canteras et al., 1995, Longhurst, 2003; Saha, 2005) para controle central dos reflexos mediados pelos barorreceptores e quimiorreceptores periféricos (Neckel et al., 2012). Em conjunto, isso pode fazer com que o MePD module variáveis cardiovasculares concomitantemente à emissão de comportamentos sociais em roedores (Quagliotto et al., 2008, Quagliotto et al., 2012, Neckel et al., 2012). Por exemplo, após a estimulação de alguns núcleos da amígdala, é possível gerar taquicardia em ratos e em humanos, dentro de um conjunto de manifestações relacionadas com o medo (Rasia-Filho et al., 2000). Já em situações de lesão no núcleo central da amígdala de ratos pode-se ter os efeitos contrários aos mencionados anteriormente, como diminuição da FC, por exemplo (Rasia-Filho et al., 2000). Outro estudo, aponta que a estimulação elétrica do MePD pode aumentar a PA em camundongos e que lesões bilaterais, deste mesmo subnúcleo, por agentes neurotóxicos pode atenuar o aumento da PA em ratos espontaneamente hipertensos (Fukumori et al., 2004). Dessa forma, o MePD e suas conexões parecem estar envolvidos na regulação da FC e PA em condições fisiológicas, adaptativas e patológicas (Kubo et al., 2004; Quagliotto et al., 2008). Vários neurotransmissores e neuropeptídeos promovem um “ajuste fino” na atividade cardiovascular reflexa, mas não na basal, quando microinjetados no MePD de ratos (Quagliotto et al., 2008, 2012; Neckel et al., 2012; Quagliotto et al., 2015). Sabe-se que no MePD são encontrados vários neurotransmissores e neuromoduladores como a vasopressina (VP), a substância P (SP), a colecistoquinina (ou colecistocina, CCK) e o óxido nítrico (NO), por exemplo (Herbert et al., 1990, Kakinoki et al., 1998, Jones et al., 1999, Matsumura et al., 1999, Averill and Diz, 2000, Dampney et al., 2002, Yilmazer-Hanke et al., 2003, Jiang et al., 2005, Lacka and Czyzyk, 2008, Szczepanska-Sadowska, 2008, Pyner, 2009, Shirasu et al., 2011).

A VP foi detectada em núcleos do hipotálamo, como o supra-óptico e o paraventricular, mas também no MeA, onde atua no controle hidroeletrólítico, na regulação cardiovascular, na termoregulação e na regulação de uma variedade de outros processos fisiológicos e comportamentais (Ahn et al., 2001, Ebner et al., 2005,

Hatam et al., 2009, Bosch and Neumann, 2012). Os receptores da VP são classificados em V1 e V2 (Ahn et al., 2001, Ebner et al., 2005, Hatam et al., 2009, Bosch and Neumann, 2012). Estudos mostram que a administração de VP na dose de 10 nM no ACe elevou a pressão arterial média (PAM) em ratos em livre deambulação, enquanto agonista de receptor V1, [Phe², Orn⁸]-oxytocin, diminui a PAM (Ahn et al., 2001, Ebner et al., 2005, Hatam et al., 2009, Bosch and Neumann, 2012). O MeA com isso, chama a atenção por conter um número substancial de neurônios vasopressinérgicos e receptores para VP e é o local primário para a geração de respostas simpáticas, parassimpáticas e neuroendócrinas relacionadas ao estresse e ansiedade (Ahn et al., 2001, Ebner et al., 2005, Hatam et al., 2009, Bosch and Neumann, 2012).

A SP tem sido implicada numa vasta gama de comportamentos, incluindo atividade locomotora, memória, aprendizado e ansiedade além da modulação central da atividade cardiovascular (Kertes et al., 2009a, b). Microinjeções de SP na dose de 1 µM na parte rostral do NTS inibe a PA e a atividade quimiorreflexa (Horii et al., 2012). No MeA foram identificados três tipos de receptores para SP: (NK)-1, (NK)-2 e (NK)-3. A SP preferencialmente se liga ao receptor NK-1 comparativamente com os NK-2 e NK-3 (Regoli et al., 1987, Dam et al., 1988, Kertes et al., 2009a, Horii et al., 2012).

A CCK age como um neurotransmissor e como um neuromodulador no SNC de mamíferos na regulação do comportamento alimentar, ansiedade e na regulação cardiovascular (Ivy and Oldeberg, 1928, Vanderhaeghen et al., 1975, Lovick 2009). Esse hormônio pode agir diretamente na circulação sanguínea e ativar seus respectivos receptores no hipotálamo, tronco encefálico, e no complexo amigdaliano (Chung and Moore 2007a, b, Simpson et al., 2012). Microinjeções intracerebroventriculares de CCK na dose de 10 µM em ratos produziram aumento da PA acompanhada por uma bradicardia subsequente (Gaw et al., 1995). No MeA foram identificados dois tipos de receptores para colecistoquinina: CCKA (ou CCK1) e CCKB (ou CCK2; Chung and Moore 2007a, b, Leeyup et al., 2009). O MeA faz parte do circuito para a modulação de respostas ao estresse e da ansiedade em ratos pelo aumento na excitabilidade dos neurônios colecistoquinérgicos e devido à inibição GABAérgica local alterando, assim, a atividade simpática e parassimpática e a modulação das respostas reflexas cardiovasculares (Wank, 1995, Chung and Moore

2007a, b, Leeyup et al., 2009). Há evidências de vias de projeções CCKérgicas entre a núcleo próprio da estria terminal (BNST), o MeA e o ACe (Handelmann et al., 1983).

O NO, que é sintetizado a partir da L-arginina (L-Arg), etapa fundamental para sua produção basal ou induzida, tem sua enzima de síntese, NO sintase (NOS), de três formas: a NOS neuronal (nNOS), a NOS endotelial (eNOS) e a NO induzida (iNOS; Mishima et al., 2003, Paulis et al., 2010a, Paulis et al., 2010b, Buckley and Johns, 2011, Cerrato et al., 2012, Yogo et al., 2012). A nNOS encontrada no SNC é uma enzima citosólica e que, para formar NO, necessita concomitantemente de L-Arg, de uma série de cofatores e de oxigênio (Campese et al., 1997, Mishima et al., 2003, Paulis et al., 2010a, Paulis et al., 2010b, Buckley and Johns, 2011, Cerrato et al., 2012, Yogo et al., 2012). A ativação da nNOS requer que o Ca^{2+} atue tanto na calmodulina como na proteína cinase C para alterar a fosforilação de proteínas intracelulares. A ação sobre a calmodulina estimula a nNOS a produzir NO que, então, pode se difundir retrogradamente à porção pré-sináptica (Campese et al., 1997, Paulis et al., 2010a, Paulis et al., 2010b, Cerrato et al., 2012, Yogo et al., 2012).

Adicionalmente, o glutamato, principal neurotransmissor excitatório, tem alta produção em células, axônios de passagem e terminais sinápticos no MeA de ratos (Hassel e Dingledine, 2006). Quando microinjetado (2 μ g/0,3 μ l) no MePD do hemisfério direito em ratos não anestesiados, glutamato diminuiu a amplitude de resposta da PA mediada pelos barorreceptores ao mesmo tempo que aumentou a relação entre os componentes de baixa frequência e alta frequência na análise espectral de força e aumentou o componente “0V” da análise simbólica dos dados de PA sistólica e intervalo de pulso (Neckel et al., 2012). Esses resultados podem ser interpretados de duas formas complementares, a saber: (1) a ação glutamatérgica no MePD faz com que a resposta cardiovascular, induzida pelas injeções sistêmicas de fenilefrina ou nitroprussiato de sódio, apresente uma menor sensibilidade às ações dos barorreceptores e, com isso, impeça-se que aumentos de PA sejam imediatamente corrigidos com redução da frequência cardíaca. Tal efeito pode ser compreendido como uma forma de modulação central de “estabilização” para que a PA possa variar, como durante a ocorrência de comportamentos como o sexual ou o agressivo, mas que não haja reduções pressóricas imediatas que poderiam comprometer o desempenho da atividade motora animal nesses instantes. E, (2) os

parâmetros analisados são correlacionados com o aumento da atividade central simpática com repercussão cardíaca e hemodinâmica (Guzzetti et al. 2005; Porta et al. 2007; Neckel et al., 2012), o que sugere papel ativo do MePD nos ajustes cardiovasculares, quando estimulada. Dadas as funções amplas do sistema simpático, isso poderia incluir a inervação renal, com vasoconstrição local e redução da diurese e a homeostase hidroeletrolítica em ajustes hemodinâmicos em paralelo à atividade cardíaca e nos demais vasos sanguíneos sistêmicos. A restrição hídrica pode gerar a diminuição da volemia. Conseqüentemente, há redução do débito cardíaco e PA e a necessidade de uma resposta reflexa simpática relacionada com a manutenção hemodinâmica e para isso o MePD poderia estar envolvida igualmente, o que também será tema de estudo dessa dissertação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o papel da modulação neuroquímica do MePD no controle central cardiovascular e na resposta à restrição hídrica em ratos não anestesiados.

2.2 Objetivos específicos

Estudar a FC e a PA em animais não anestesiados após microinjeção de salina, VP, SP, CCK e L-Arg no MePD.

Estudar a FC e a PA após estimulação dos barorreceptores e quimiorreceptores após microinjeção de salina, VP, SP, CCK e L-Arg no MePD.

Determinar a variabilidade nas respostas cardiovasculares pela análise espectral de força e análise simbólica dos dados de FC e PA desencadeados pela microinjeção diretamente no MePD de salina e diferentes doses de VP, SP, CCK e L-Arg.

Estudar o papel do glutamato microinjetado no MePD no controle central da homeostasia hidroeletrolítica no modelo de restrição hídrica em ratos.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo que segue será submetido ao “Canadian Journal of Physiology and Phamacology” (fator de impacto: 2.65, 2017).

Original Research

Posterodorsal medial amygdala and the central cardiovascular control: responses following vasopressin, substance P, cholecystokinin and L-arginine microinjections, and modulation of hydroelectrolytic balance

Fernando A. Oliveira Filho¹; Edson Quagliotto^{1,2}; Natalia Trevisol¹; Vitória Foigt¹; Karina R. Casali³; Pedro Dal Lago⁴, and Alberto A. Rasia-Filho^{1,2*}

¹ Department of Basic Sciences/Physiology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), RS 90050-170, Brazil

² Graduation Program in Neuroscience, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre RS 90050-170, Brazil

³ Institute of Science and Technology, Federal University of São Paulo, São José dos Campos SP 12231-280, Brazil.

⁴ Department of Physical Therapy, UFCSPA, RS 90050-170, Brazil

Running title: MePD and central cardiovascular control

***Corresponding author:**

Alberto A. Rasia-Filho
UFCSPA/Physiology, Sarmiento Leite 245
Porto Alegre 90170-050 RS, Brazil
Phone: + 55 51 91161643
E-mail: rasiafilho@pq.cnpq.br, aarf@ufcspa.edu.br

Acknowledgements

Grants from the Brazilian Agencies “Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento” (CNPq/PDJ, no. 501041/2012-5) and “Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul” (FAPERGS, no. 1016957). PDL and AARF are CNPq researchers.

Abstract

The posterodorsal medial amygdala (MePD) is a relevant component of the central network for the elaboration of emotional/social behaviors and corresponding supramedullary control of the cardiovascular system. Here, we studied both the basal hemodynamic state and reflex-mediated cardiovascular responses after microinjections of saline (0.3 μ L, n=7), vasopressin (VP, 1pg or 100pg/0.3 μ L, n= 5-7), substance P (SP, 10ng or 100ng /0.3 μ L, n= 4-6); cholecystokin (CCK, 10nM or 100 nM/0.3 μ L, n= 4/group), and L-Arginine (L-Arg, 2.87 nM or 100 nM/0.3 μ L, n= 4-5) in the MePD of awake adult male rats. Baroreflex and chemoreflex responses were tested. Power spectral and symbolic analyses were performed to evaluate the central involvement of sympathetic and parasympathetic components in the variability of the heart rate (HR) and arterial blood pressure (AP). In addition, we tested whether glutamate (2 μ g/0.3 μ L) microinjected in the MePD is able to modulate the central response to water deprivation, likely changes in the blood volume and osmolarity and, consequently, AP and HR. Results showed that VP consistently enhanced the power spectral parameters indicative of higher central sympathetic responses, SP induced a dose-dependent effect and increased both the sensibility of the baroreflex and the HR evoked by the chemoreflex as well as a sympathetic activation, CCK increased HR evoked by the chemoreflex and parameters of power spectral and symbolic analyses with mixed physiological meanings, and L-Arg increased HR evoked by the chemoreflex and reduced the central parasympathetic activity. Regarding the hydromineral balance, rats that were microinjected with glutamate had a higher consumption of water, but not a higher intake of water and NaCl compared to glutamate microinjected in rats with free access to water. These data add to the fine-tuned neurochemical modulation of the MePD function on the central sympathetic/parasympathetic functional organization that modulate the cardiovascular system following peripheral reflex stimulation. The MePD also participates in the central control of salt appetite, reducing it, but maintaining thirst and the volume of water intake after dehydration. These findings indicate that the MePD acts to homeostatically control reflex-mediated cardiovascular adjustments, blood volume and AP without inducing high salt intake in rats.

Keywords: Baroreceptor reflex, blood pressure, central cardiovascular control, chemoreceptor reflex, extended amygdala, hydromineral homeostasis.

1. Introduction

The posterodorsal medial nucleus of the amygdala (MePD), part of the medial division of the “extended amygdala” (Alheid et al. 1995; de Olmos et al. 2004), integrates emotionally relevant sensory information (Meredith & Westberry, 2004; Blake & Meredith, 2011) and projects to brain areas that modulate social behaviors in rats (Newman, 1999), such as diverse hypothalamic nuclei (Canteras et al., 1995; Cavalcante et al., 2006; Dong et al., 2001; Petrovich et al., 2001). These hodological data are relevant to understand the synaptic demand that is temporally and spatially integrated by MePD neurons, according to the emotional valence of each ongoing situation, as well as for the animal to elaborate the most adequate display among ample behavioral repertoire (Newman, 1999; Rasia-Filho, 2006, 2009). Neurons in the MePD can also act on parallel and overlapping circuits to modulate homeostatic functions, such as the cardiac work and hemodynamics (as proposed by Newman, 1999; Rasia-Filho, 2006; Rasia-Filho et al., 2009).

In this regard, cardiovascular regulation is aimed at appropriate hemodynamic ranges to prepare, execute and after ending of agonistic behaviors (Rasia-Filho, 2006; Longhurst, 2008; Quagliotto et al., 2008). As reviewed in Quagliotto et al. (2012), the central control of the cardiovascular system involves two sets of interactive functional elements: one consisting of nervous system areas that maintain basal or tonic sympathetic/parasympathetic output to the heart and vascular beds whereas the other provides phasic sensorial information to modulate the neural activity that reaches effector organs (Longhurst, 2008). In this latter, for example, short-term neural reflexes involve carotid/aortic baroreceptor and chemoreceptor input pathways (Longhurst, 2008). Baroreflex responses adjust heart rate (HR), vascular resistance, and the renin–angiotensin system to the perceived pressoric condition; chemoreflex ones increase ventilation, promote a sympathetically-mediated increase in cardiac pumping, vasoconstriction, and a parasympathetically-mediated bradycardia (Quagliotto et al., 2008 and references therein). Projections from the medial amygdala (MeA) are sent to relevant brain areas involved with the central cardiovascular organization (Canteras et al., 1995; Petrovich et al., 2001), such as: (i) the central amygdaloid nucleus (CeA) whose electrical activation lead to a higher HR due to vagal withdrawal and increased sympathetic tone (Turner et al., 1986); (ii) the A1 noradrenergic cells of the caudal ventrolateral medulla; and, (iii) the A2 noradrenergic cells of the nucleus of the solitary tract (Canteras et al., 1995; Dayas & Day, 2001; Saha, 2005). The MePD also innervates the

neuroendocrine and sympathetic/parasympathetic-related parts of the periventricular zone in the hypothalamus of rats (Petrovich et al., 2001) which could allow an integrative role of the cardiovascular responses in association with behavioral occurrence (Quagliotto et al., 2008; Davern et al., 2009, 2011). Accordingly, the MePD appears to be involved in the regulation of HR and AP in both adaptive and pathological conditions (Kubo et al., 2004; Quagliotto et al., 2008). Both Wistar and spontaneously hypertensive rats increased c-fos immunoreactivity in the posterior MeA subnuclei after an air jet stressful protocol (Porter & Hayward, 2011). In addition, (1) electrical stimulation of the MePD increased AP in mice (Zhang et al. 2009), (2) inappropriate activation of the mouse MeA after fear or aversive stress led to sympathetic activation and neurogenic hypertension (Davern & Head, 2011; Davern et al. 2010), and (3) bilateral MePD and MePV neurotoxic lesions attenuated the development of high AP in spontaneously hypertensive rats (Fukumori et al., 2004).

Classical neurotransmitters and neuropeptides modulate the central cardiovascular control when directly microinjected in the MePD in awake rats (Quagliotto et al., 2008; Neckel et al., 2012; Quagliotto et al., 2012, 2015). That is, glutamate in the MePD elicited a selective activation of the central sympathetic response following baroreflex stimulation (Neckel et al., 2012) whereas oxytocin, somatostatin, and angiotensin II (AGII) increased the range of these cardiovascular reflex responses and led to mixed sympathetic and parasympathetic responses (Quagliotto et al., 2012, 2015). Other neuropeptidergic actions or gaseous transmitter modulation of MePD function are not currently known. This is the case for the likely effects of vasopressin (VP), substance P (SP), and cholecystokinin (CCK) as well as the L-arginine (L-Arg) induction of nitric oxide (NO) production in this brain area. These three neuropeptides are able to modulate central cardiovascular control. VP controls sympathetic outflow toward the cardiovascular system when acting in the hypothalamic paraventricular nucleus (Lozic et al., 2018) or, indirectly and related to apelin-induced effects, to increase arterial blood pressure (AP) and sympathetic nerve activity by the rostral ventrolateral medulla (Griffiths et al., 2017). SP inhibits preganglionic cardiovagal motoneurons in brainstem and phasically modulates the parasympathetic control of heart rate (Hou et al., 2009) at the same time that decreases AP when acting in the solitary tract nucleus (NTS) of rats (Bauman et al., 2002). CCK facilitates the activity of amygdaloid, hypothalamic, and midbrain circuits activated by acute cardiovascular and behavioral responses to stressful stimuli (Lovick, 2009) and increased AP and heart rate (HR) when microinjected in the cerebral ventricles (Gillis et

al., 1983). NO modulates ANG II actions and thirst (Coletti et al., 2015) and the expression of NADPH-diaphorase, associated with NO synthase, is well documented in the adult rat MePD (de Castilhos et al. 2009, and references therein). In conjunction, these data indicate the relevant role for the MePD to bring about cardiovascular adjustments in rats. That could also be the case for the central responses to volemic challenges, such as those caused by water restriction and reduction of the extracellular fluid that can affect AP and HR.

Here, we studied both the basal hemodynamic state and reflex-mediated cardiovascular responses after microinjections of VP, SP, CCK, and L-Arg into the MePD of awake male rats. Baroreflex and chemoreflex responses were tested. Power spectral and symbolic analyses were performed to evaluate the central involvement of sympathetic and parasympathetic components in the variability of the HR and AP. We used the same methodological approach previously described to study the central modulatory effect of the MePD on the cardiovascular function (Quagliotto et al., 2008; Neckel et al., 2012; Quagliotto et al., 2012, 2015, and references therein). In addition, we tested whether glutamate microinjected in the MePD is able to modulate the central response to a hydroelectrolytic balance challenge after changes in the blood volume and osmolarity using the water deprivation paradigm.

2. Material and Methods

2.1 Animals

Adult male Wistar rats (3–4 months old, body weight 250-300 g) were kept in groups under standard laboratory conditions, with food and water *ad libitum* and room temperature around 22°C in a 12 h light:dark cycle (lights off at 7 p.m.). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering. Rats were manipulated according to international laws for ethical care and use (European Communities Council Directive of 24 November 1986, 86/609/EEC), conformed to national guidelines and experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Brazil, protocols 101/12-168/13 and 184/16-567/18).

2.2 Stereotaxic surgery

The following experimental procedure is the same as previously published (Quagliotto et al., 2008; Neckel et al., 2012; Quagliotto et al., 2012, 2015). Animals were anesthetized using ketamine and xylazine (90 mg/kg and 10 mg/kg, i.p., respectively) and were stereotaxically implanted with a cannula (0.6 mm of outer diameter, OD) 2 mm above the MePD, according to the following coordinates: 3.3 mm posterior to the bregma, 3.6 mm lateral to the sagittal suture and 6.3 mm below the dura-mater (Figure 2). An unilateral microinjection was directed to the right MePD based on previous data that demonstrated modulation of behavioral and cardiovascular activities by this hemisphere (Adamec & Morgan 1994; de Castilhos et al. 2006; Quagliotto et al. 2008; Neckel et al., 2012; Quagliotto et al., 2015). Each rat then received ketoprofen (3 mg/kg in 0.3 mL, i.p.), one injection per day along two days.

2.3 Experiment 1: Hemodynamic Study Procedure

Following five days, animals were anesthetized as aforementioned and had one polyethylene catheter [PE-10 soldered to a PE-50, inner diameter (ID) 0.28 mm, Australia] filled with saline (sterile NaCl 0.9%, pH= 7.4) and heparin placed into the abdominal aorta and another into the inferior vena cava through the left femoral artery and vein, respectively. Each catheter was tunneled subcutaneously and exteriorized at the back of the rat neck. Gentamicin (2 mg/rat, i.m.) was injected at the end of this procedure. In the next day, the arterial catheter was attached to a 40-cm polyethylene tube (PE-50, 0.5 mm of ID, Australia) and a strain-gauge pressure transducer (P23 Db, Gould Statham, USA) was used for direct hemodynamic measurements. Signals passed through a pre-amplifier (Hewlet-Packard 8805, Puerto Rico) and were delivered to a microcomputer equipped with an analogic-to-digital converter board (CODAS, 1 kHz, Dataq Instruments, USA). The recorded data were analyzed on a beat-to-beat basis.

All rats of the control and experimental groups were subjected to the same recording protocol. That is, after catheter connection to the transducer, rats were allowed to acclimate to a Plexiglas recording box (25 x 15 x 10 cm) during 20 to 30 min while cardiovascular parameters were being continuously monitored. Values of HR and AP were obtained during the last 15 min of this period to provide basal “within group” and “between groups” data to be

compared with the effects of microinjections in the MePD. All recordings occurred during the morning (from 8 to 12 AM) to avoid unpredictable circadian variations in the results.

Immediately after these initial recordings, a microinjection needle (0.3 mm OD) was introduced into and 2 mm below the intracerebral guide cannula. Animals were then randomly assigned to one of the following experimental groups that were manually microinjected with: 1) vehicle (saline, 0.3 μ L, n= 7) as the control group; 2) VP 1 pg/0.3 μ L or 100 pg/0.3 μ L (n= 5 and 7, respectively), 3) SP 10 ng/0.3 μ L or 100 ng /0.3 μ L (n= 4 and 6, respectively); 4) CCK 10 nM/0.3 μ L or 100 nM/0.3 μ L (n= 4 in both groups); and, L-Arg 2.87 nM/0.3 μ L or 100 nM/0.3 μ L (n= 4 and 5, respectively). All drugs were purchased from Sigma Chemicals Co. (USA). The higher and lower values of VP, SP, CCK, and L-Arg proved to be effective in inducing central effects when microinjected in different brain areas (Gaw et al., 1995; Campese et al., 1997; Ahn et al., 2001; Ebner et al., 2005; Hatam et al., 2009; Paulis et al., 2010a,b; Bosch and Neumann, 2012; Cerrato et al., 2012; Horii et al., 2012; Yogo et al., 2012).

The microinjection procedure was monitored by the displacement of liquid and an air bubble inside the catheter connected to a Hamilton microsyringe (2 μ L, USA), lasted for 1 minute and the needle remained inside the cannula for an additional minute to avoid reflux. After 4 min, new cardiovascular recordings were obtained and lasted for the next 15 min. These MePD microinjections were done before testing baroreceptor- and the chemoreceptor-mediated reflexes as well. Then, every rat received a total of three microinjections of each substance assigned to its experimental group, as follows: one to test the MePD microinjection effects on the HR and AP values, one before testing the baroreflex responses, and one before testing the chemoreflex responses. The order for testing baroreflex or chemoreflex activities was randomly chosen for each rat in all experimental groups. Obvious drug carrying-over effects were avoided and new recordings were only started when hemodynamic values returned to baseline levels and remained stable along the recording time.

2.3.1 Baroreflex and chemoreflex stimulation

Reflex responses were tested 5 minutes following each MePD microinjection. Baroreflex-mediated changes were measured during peak increases or decreases in mean

arterial pressure (MAP) after vena cava injection of a single dose of phenylephrine (8 µg/0.1 mL, Sigma Chemicals Co., USA) or sodium nitroprusside (100 µg/0.1 mL, Sigma Chemicals Co., USA) dissolved in saline. For all rats these injections were made manually and at a similar and appropriate infusion rate, leading to changes of MAP in the range of 10-30 mmHg with no evident artifactual activations. Various data points served to compose sigmoidal curves. All changes in MAP and HR were measured and baroreflex sensitivity was determined by fitting the MAP and HR changes to a sigmoidal logistic equation, as follows:

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

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

Chemoreflex sensitivity was tested under the same aforementioned methodological conditions, but after the administration of increasing intravenous doses of potassium cyanide (KCN: 60, 100, 140, and 180 µg/kg; Merck, Germany). Injected volumes ranged from 0.06 to 0.18 mL. Mean HR and MAP were measured continuously 10 s before and 15 s after each injection of these KCN doses. Inter-injection interval for each dose of KCN was around 4 min and a new dose was administered only when appropriate HR and MAP baseline had been re-established.

2.3.2 Power spectral analysis and symbolic analysis

These analyses demonstrate the different components in the variability of the HR and AP recordings and were applied to the results of the experimental groups as long as technically possible. Power spectral analysis was applied to pulse interval (PI) and systolic arterial pressure (SAP) series. Tachogram and systogram were created from AP signals through the beat-to-beat PI and SAP, respectively. Frequency domain analysis of HRV (pulse interval variability) and AP variability (APV) were obtained with an autoregressive algorithm on stationary sequences of 200 beats that were randomly chosen, but without artifacts, using the stationary test based on very low oscillations quantification. Spectral estimation by AR

model, using the residual theorem, provides central frequency and associated power with the additional advantage that even with short segments of data they can provide a reliable spectral resolution. HRV and APV correspond to total power spectrum of PI and SAP.

The low-frequency (LF, 0.2–0.75 Hz) and the high-frequency (HF, 0.75–3.0 Hz) spectral components of PI and SAP were expressed in both absolute (ms^2 and mmHg^2 , respectively) and normalized units (NU). These NU were obtained by calculating the power of LF and HF and correlating them to the total power without the very low frequency component (frequencies that were < 0.2 Hz). This method estimated the center frequency and power of each relevant oscillatory component and indicates the involvement of the central control of the sympathetic/parasympathetic systems in the cardiovascular responses. The ratio between LF and HF components (LF/HF) was considered as a synthetic expression of the sympathovagal balance. The coherence between the PI and the SAP variability was assessed by means of a cross-spectral analysis. Alpha-index was obtained from the square root of the ratio between the R-R interval and the SAP variability within the LF ranges and was calculated only when the magnitude of the squared coherence exceeded 0.5 (range = 0 to 1) in the LF band. Beat-to-beat values of the PI and the SAP were used to estimate the spontaneous baroreflex sensitivity using this alpha-index for the LF component. Finally, the very low frequency (VLF) band corresponds to 0.0033 to 0.04 Hz and may represent various physiological effects on HR, including the renin–angiotensin system, vasomotor tone, and thermoregulation (Dantas et al., 2012 and references therein).

Symbolic analysis was applied on the same sequences of PI and SAP data. This method consisted in the scattering of the time series over 6 bins, each identified by a number (symbol) from 0 to 5. Symbolic series is a sequence of symbols for each bin, converted into patterns of 3 symbols. All possible 3 beats patterns are divided into 4 groups: (1) no variations (0V, i.e., 3 identical symbols); (2) one variation (1V, 2 identical symbols and 1 different); (3) 2 like variations (2LV); and, (4) 2 unlike variations (2UV). The 0V% is a marker of sympathetic modulation, 1V pattern reflects sympathetic and parasympathetic modulations, 2LV pattern indicates sympathetic and parasympathetic modulations with vagal predominance, and 2UV is an exclusive marker of vagal modulation.

2.4 Experiment 2: Volume Restriction Procedure

Procedures were done as described in Vilhena-Franco et al. (2016). Adult male rats were maintained under standard laboratory conditions and were stereotaxically implanted with an unilateral cannula in the MePD as above mentioned. For this experiments, rats were maintained in individual standard metabolic cages for adaptation along 1 week with free access to food and tap water. On the seventh day, animals were submitted to stereotaxic surgery and returned to their cages. After six days, four groups were composed: two groups received saline (0.3 μ L, n= 5) or glutamate (2 μ g/0.3 μ L, n= 5) in the MePD, but continued to have free access to water, other two groups received the same microinjection of saline (n= 5) or glutamate (n= 4) in the MePD and were subjected to 24h water deprivation. Immediately afterwards, all rats had access to volumetric bottles of water and water with NaCl (0.3M, according to Vechiatto et al., 2016). Liquid was reintroduced and remained available for 180 min. Animals freely decided to drink one or other or both liquids. At the end of this period, using volumetric burettes (in mL), the intake of water or the water plus NaCl were measured, and urine samples were collected to determine the urinary volume.

2.5 Histological Procedure

At the end of the experiments, all rats were deeply anesthetized as aforementioned and transcardially perfused with saline and 10% formalin solution (Experiment 1) or quickly decapitated (Experiment 2). Brains were sectioned 60 μ m-thick in a vibratome (Leica, Germany) and stained with hematoxylin-eosin. The microinjection site was histologically determined and compared to the images of an atlas (Paxinos and Watson, 2008). Only those rats that had the microinjections directed to the MePD were considered for further analysis. A representative microinjection site in the MePD is shown in Figure 1. Data from rats that had intraparenchymatous hemorrhage, mechanical lesions in the MePD or microinjections that damaged the stria terminalis (ST) were not included. Nevertheless, “non-target” groups were also included to control for drug effects outside the intended area (n = 10 rats for each microinjected substance). Cannulae and microinjections reached the vicinity of the MePD in these “non-target” groups and their data served to evaluate possible effects of the tested

drugs in other medial amygdala subnuclei, other adjacent amygdaloid nuclei, in the optic tract or in the ventral basal ganglia, all structures close to the MePD.

2.6 Statistical Analysis

The basic requirements for the use of parametric analysis were assessed by the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests. After that, in Experiment 1, the values of HR, SAP, diastolic AP (DAP), and MAP at basal conditions and the results of HR and AP evoked by the chemoreceptor reflex response were submitted to a two-way analysis of variance (ANOVA) test for repeated measures. Data obtained after the stimulation of the baroreflex were analyzed using one-way ANOVA test. The Newman-Keuls *post hoc* test was used for multiple comparisons. In addition, the normal distribution of the data from spectral and symbolic analyses was determined by the Bonferroni confidence interval test. After that, the results were analyzed using the one way ANOVA test followed by the Tukey test. When Gaussian normality failed, a Kruskal–Wallis test on ranks and the Dunn’s test were performed. In Experiment 2, data were compared between the control and glutamate microinjected groups using the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test or by the Mann-Whitney test when necessary to confirm significant differences. In all cases, the statistically significant level was set *a priori* as $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Experiment 1

Present results will focus on the MePD results. To be concise, the “non-target” control data did not reproduce in any way the effects obtained in the experimental groups microinjected with the different neuropeptides or with L-Arg in the MePD (ANOVA test, $P > 0.05$ in all cases; data not shown).

3.1.1 Hemodynamic Status

Basal hemodynamic values were within normal ranges for adult male rats recorded under laboratory conditions. No relevant statistical difference was found in the HR, SAP, DAP and MAP following microinjections of saline, VP, SP, CCK or L-Arg in the MePD (ANOVA

test, $P > 0.05$ in all cases). There were no lasting effects of the microinjections in any experimental group, which provided stable baseline recordings prior to the assessment of the baroreflex and the chemoreflex responses (Table 1).

3.1.2 Effects of Baroreflex Activation

Reflex control of the HR was analyzed by fitting sigmoidal curves to different data points of each animal. Mean values were calculated for each experimental group (Figure 2). There was an overall statistical difference between groups in the maximum gain of the reflex responses when the AP was increased by phenylephrine or decreased by sodium nitroprusside [$F(8,46) = 3.20$, $P = 0.007$]. The *post hoc* comparisons revealed that the MePD microinjection of SP (10 ng) promoted a significant increase in the gain, shifting the barocurve to the left and to lower HR values when compared with the results from the saline and SP (100 ng) microinjected groups ($P < 0.01$ in both cases). There were no statistically significant differences for the MAP50 [$F(8,46) = 0.57$, $P = 0.79$], the HR range [$F(8,46) = 1.89$, $P = 0.08$], the lower plateau [$F(8,46) = 2.04$, $P = 0.07$] and the upper plateau [$F(8,46) = 1.92$, $P = 0.08$] between the experimental groups (Table 2).

3.1.3 Effects of Chemoreflex Activation

Data are shown in Figure 3. There was a statistically significant difference in the HR due to the injection of the increasing doses of KCN [$F(3,114) = 83.32$, $P = 0.01$], between experimental groups [$F(8,114) = 2.60$, $P = 0.02$], and in the interaction between these two factors [$F(24,114) = 2.68$, $P = 0.001$]. The *post hoc* test showed that, compared with saline, VP (100 pg), SP (10 ng), CCK (10 and 100 nM), and L-Arg (2.87 and 100 nM) microinjected in the MePD led to a marked increase in the HR following KCN (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; $P < 0.05$ in all cases; Figure 3A). CCK10 nM reduced HR values at KCN180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0.05$, Figure 3A). No other comparison showed a significant statistical difference between the experimental groups and the control one ($P > 0.05$).

The values of MAP after the injection of the different doses of KCN were also statistically significant [$F(3,114) = 27.85$, $P = 0.01$], but data did not differ between experimental groups

[F (8,114) = 1.46, $P = 0.20$] nor due to the interaction between these two factors [F (24,114) = 1.17, $P < 0.28$; Figure 3B].

3.1.4 Power spectral analysis

Results are shown in Table 3. There were no statistically significant difference in the SAP [F (8,45) = 2.18; $p = 0.06$], in the mean values of $f_{LF, Hz}$ [F (8,45) = 0.96; $P = 0.48$], in the $f_{HF, Hz}$ [F (8,45) = 0.81; $P = 0.59$], in the APV, mmHg^2 [F (8,45) = 2.18; $P = 0.06$] or in the HF, mmHg^2 between the experimental groups [F (8,45) = 1.94; $P = 0.08$].

On the other hand, the HRV (in absolute ms^2 units) was different between groups [F(8,45) = 3.42; $P < 0.01$] and the *post hoc* comparison showed that L-Arg (2.87nM) led to lower values than the saline ones ($P < 0.01$). In addition, the LF (in absolute ms^2 units), presented a statistically significant difference between groups [F (8,45) = 2.67; $P < 0.01$] and the *post hoc* test showed that SP (100 ng) promoted an increase in this parameter compared to saline ($P < 0.05$). There was also an overall difference in the LF (in NU) [F (8,45) = 2.99; $P < 0.05$] and the *post hoc* comparison showed that VP (both 1 and 100 pg) and SP (both 10 and 100 ng) promoted an increase in this parameter compared to saline ($P < 0.05$). LF (in mmHg^2) also showed a statistically significant difference between experimental groups [F(8,45) = 2.68; $P < 0.01$] and VP (100 pg) induced higher values compared to saline ones ($P < 0.01$).

There was also an overall difference in the HF (in ms^2 absolute units) [F (8,45) = 3.02; $P < 0.01$] and the *post hoc* comparison showed that L-Arg (2.87 nM) led to an decrease in this parameter compared to saline ($P < 0.05$). The HF (in NU) showed a statistically significant difference between experimental groups [F (8,45) = 3.54; $p < 0.01$]. The *post hoc* comparison showed that VP (100 pg) and L-Arg (2.87nM) led to decrease values compared with saline ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively).

The VLF (in mmHg^2) showed a statistically significant difference between experimental groups [F(8,45) = 3.33; $P < 0.01$]. The *post hoc* comparison showed that VP (100 pg), SP (10 ng), and CCK (100 nM) led to lower values than saline ones ($P < 0.05$).

The sympathetic/parasympathetic balance obtained from the alpha index (by PI in bpm) also showed a statistically significant difference between experimental groups [F (8,45) =

2.33; $P < 0.01$]. Microinjections of VP (100 pg) and SP (100 ng) promoted higher values compared to saline ones ($P < 0.05$). Alpha index (in ms/mmHg) showed a statistically significant difference between experimental groups [$F(8,45) = 432.0$; $P < 0.01$] and VP (1 pg) promoted higher values compared to saline data ($P < 0.01$).

3.1.5 Symbolic analysis

Results are presented in Table 4. The only statistically significant difference between groups was a decrease in the 2LV pattern after CCK (100 nM) microinjection in the MePD when compared to CCK (10 nM) or saline ($P < 0.05$ in both cases).

3.2 Experiment 2

3.2.1 Fluid Intake and Urinary Volume Data

There were statistically significant differences in the consumption of water (Kruskal-Wallis test, $P < 0.01$) or water and NaCl (Kruskal-Wallis test, $P = 0.01$) between groups (Figure 4). Rats that received saline or glutamate in the MePD, but were not subjected to water restriction, showed a similar low consumption of water or water plus NaCl during the test period (Figure 4A and B, respectively; $P > 0.05$). Rats that were microinjected with saline had a higher consumption of both water and water plus NaCl after hydric restriction ($P < 0.05$ in both cases) compared to saline microinjected in rats with free access to water (Figure 4A and B). However, rats that were microinjected with glutamate had a higher consumption of water ($P = 0.01$; Figure 4A), but not a higher intake of water and NaCl ($P = 0.73$) compared to glutamate microinjected in rats with free access to water (Figure 4B).

There was no statistically significant difference in the urinary volume between experimental groups, neither during the period of free consumption of water nor after reintroducing water following 24h of deprivation for the respective groups ($P = 0.29$; Figure 4C).

4. Discussion

Our present data reinforce that the MePD is a relevant component of the central, supramedullary network for the cardiovascular control and contributes to changes in reflex responses rather than to basal HR and AP levels in awake rats (Quagliotto et al., 2008; Neckel et al., 2012; Quagliotto et al., 2012, 2015). Our novel findings further indicate that the MePD has an active role in the dynamic, reflex-induced changes of AP due to the sympathetic/parasympathetic balance. These findings for the baroreceptor- and chemoreceptor-mediated cardiovascular adjustments match with the evident presence and indicate further functional implications for neuropeptides and NO synthesis in the MePD. It also highlights the role of the MePD on the central control of hydroelectrolytic balance and salt intake, as depicted below.

First, an inherent technical limitation for the present methodological is that the specific diffusion rate for each of the substances microinjected into the MePD were not directly evaluated. The average radius of drug diffusion was not estimated by virtue of comparing a dye with distinct physicochemical properties with the microinjected drugs in Experiment 1. It is assumed that substances can diffuse an average radius of 0.5 mm from the microinjections point (Lohman et al., 2005). Then, it is also likely that the position of the guide cannula for the microinjection let the substances spread from the medial border towards the neuropil of the MePD (c.f., Quagliotto et al., 2008; Neckel et al., 2012; Quagliotto et al., 2015).

In agreement with Quagliotto et al. (2012, 2015), the MePD characteristically has long-lasting effects (in the order of minutes) following local microinjections of classical neurotransmitters and/or neuropeptides. Indeed, it is likely “that transmitter-mediated excitatory, inhibitory, and/or disinhibitory mechanisms in the MePD can promote a flexible, dose- and context-dependent modulation of the central control of sympathetic/parasympathetic output” (Quagliotto et al., 2012). In this sense, “We also propose that the rat MePD is responsive to different neurotransmitters and neuropeptides that code distinct synaptic inputs for specific fine-tunings of centrally mediated cardiovascular reflexes and the dynamic display of behaviors in awake animals” (Quagliotto et al., 2015).

The functional neural network of ascending and descending projections, particularly with respect to integrative processes occurring within the amygdaloid complex during arousal, bring about complex responses in both sympathetic and parasympathetic modulatory

activities on HR and vascular resistance (Turner et al., 1986). For example, in awake cats, the electrical stimulation of the CeA induces an increase in vascular resistance in both the femoral and mesenteric beds, but not in the renal vessels. The AP rises and the HR is increased, initially by vagal withdrawal, and thereafter by enhanced sympathetic activity. During the early phase of this response, baroreceptor reflex sensitivity is decreased (Turner et al., 1986 and references therein). Indeed, it was previously reported that neuropeptides microinjections in the MePD caused wide cardiovascular responses. I.e., oxytocin led to higher absolute LF and HF power values likely due to an increased HRV itself and/or associated with increased respiratory rate, somatostatin induced higher levels of HRV, LF, and alpha index suggestive of a central sympathetic activation along with an increase in baroreflex sensitivity, and AGII potentiated the chemoreflex-mediated decrease in HR frequency likely involving a central parasympathetic effect (Quagliotto et al., 2015).

Moderate to abundant amounts of VP, SP, and CCK have been found in the cell bodies, fibers, and terminals in the MeA subnuclei (Micevych et al. 1988; Oro et al., 1988; Malsbury & McKay, 1994; Gloor, 1997; De Vries & Simerly, 2002; Singewald et al., 2008). Here, we found that the MePD microinjections of VP, SP, CCK, and L-Arg, at both lower and higher doses, affected reflex cardiovascular responses. VP affected chemoreflex response and consistently enhanced the LF and the alpha index, both considered as an indicative of higher central sympathetic responses. This agrees with the results of increased AP modulated by VP on the sympathetic outflow from the bed nucleus of the ST (Hatam et al., 2009). SP induced a dose-dependent effect and increased both the sensibility of the baroreflex and the HR evoked by the chemoreflex as well as a sympathetic activation evidenced by the higher LF and alpha index values. Dose-dependent and region-specific effects are described for the SP actions (Singewald et al. 2008) and can induce anxiety-like responses when microinjected in the MeA of rats (Bassi et al., 2014), likely involving cardiovascular changes as well. CCK increased HR evoked by the chemoreflex and induced a reduction in VLF and 2LV. It is difficult to isolate the actual role for the CCK in the MePD because these two latter parameters can be affected by very different factors on the HR, such mixed sympathetic and parasympathetic modulations with vagal predominance, respiratory pattern, and vasomotor tone, for example (Dantas et al., 2012; Quagliotto et al., 2015 and references therein). L-Arg also increased HR evoked by the chemoreflex, decreased both HRV and HF suggestive of a reduction in the central parasympathetic activity. These data add to the fine-tuned

neurochemical modulation of the MePD function on the central sympathetic/parasympathetic functional organization and outflow to modulate the cardiovascular system following peripheral reflex stimulation (Neckel et al., 2012). It is important to consider that neurotransmitter/neuropeptide actions in the MePD depend on their concentration in the extracellular space and the local neuro-gliial network, which can be dynamically affected by the integrated synaptic activity. Concomitant release of main neurotransmitters together with neuromodulators depend on the firing pattern and calcium concentration inside the pre-synaptic axon terminals, and the tonic or phasic activations of intra-amygdaloid or extra-amygdaloid input connections. The present results can be expanded by testing the receptors involved in these central responses and their interactions.

It is highly conceivable that the MePD can elicit cardiovascular adjustments according to a contextual homeostatic and/or adaptive general in the context of emotional/social stimuli processing (Dayas et al., 1999; Rasia-Filho et al., 2004; 2009). This kind of neural elaboration can reflect in different synaptic inputs to the MePD, either changing the frequency and the firing pattern of afferent axons or the origin of different arriving terminals with various neurotransmitters and neuropeptides. This would explain the wide range of chemical modulation existing in the MePD and its role in the phasic, reflex control of the cardiovascular system. In addition, the MePD projections, directly or indirectly, reach the hypothalamic periventricular zone that controls sympathetic and parasympathetic responses (Petrovich et al., 2001) and to the NTS, a main brainstem nucleus where baroreceptors and chemoreceptors connect to provide prompt reflex adjustments (Canteras et al., 1995, Longhurst, 2003; Saha, 2005).

Furthermore, hydromineral homeostasis is a vital process in which the body liquid compartments have their composition and volume and osmolality strictly controlled by integrated systemic mechanisms and behavioral displays (Dalmasso et al., 2015; Mecawi et al. 2015; Vilhena-Franco et al., 2016). The animal model involving water deprivation increases plasma osmolality and decreases its volume, inducing the release of counteracting hormones such as VP and oxytocin, and the activation of the renin-angiotensin system to maintain homeostasis (Antunes-Rodrigues et al., 2004; da Silveira et al. 2007; Vilhena-Franco et al., 2016). The MePD is a natural candidate to module the responses to water deprivation as well as water and water and salt intake due to both its relevant role in the AP and HR and the presence and actions of local VP, oxytocin, and AGII. The MePD participates in the response

to the pharmacologically-induced AP reduction (Li e Dampney, 1994). Glutamate, the main excitatory neurotransmitter, has a high production in the rat MeA (Hassel e Dingledine, 2006) and would modulate the central responses following hydromineral challenge provoked by water deprivation. The microinjection of glutamate in the MePD stimulates the central sympathetic control of the cardiac function and hemodynamics, reducing the reflex decrease of HR following AP increases, and stabilizing AP values in awake animals (Neckel et al., 2012). Interestingly, as another novel finding for glutamate in the MePD, it reduced specifically the water plus NaCl consumption following water deprivation in rats. This indicates that the MePD also participates in the central control of salt appetite, reducing it, but maintaining thirst and the volume of water intake after dehydration. This might serve to homeostatically control blood volume and AP without inducing high salt intake to indirectly expand the extracellular volume, avoiding the possibility to increase the AP to the other extreme of hypertension. This is a new research line open to be proved by further experimental efforts.

In conclusion, the present work demonstrates that the MePD is relevant for the central regulation of the baroreflex- and chemoreflex-induced cardiovascular responses by promoting selective sympathetic/parasympathetic responses according to each neuropeptide or nitrenergic modulator acting in this brain area. These responses also involve the selection of pure water or water and salt intake for homeostatic reasons. All of them modulate the sympatho-vagal balance. Therefore, the MePD should not only be included in subcortical networks that modulate emotional and social behaviors, but also the neuroendocrine, hydromineral, and cardiovascular responses in awake rats.

References

- Ahn DK, Kim KH, Ju JS, Kwon S, Park JS (2001) Microinjection of arginine vasopressin into the central nucleus of amygdala suppressed nociceptive jaw opening reflex in freely moving rats. *Brain Res Bull* 55:117-121.
- Alheid GF, De Olmos JS, Beltramino CA (1995) Amygdala and extended amygdala. *The Rat Nervous System* San Diego: Academic Press:495-598.
- Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valença MM, McCann SM (2004). Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84: 169–208.
- Bassi GS, de Carvalho MC, Brandão ML (2014). Effects of substance P and Sar-Met-SP, a NK1 agonist, in distinct amygdaloid nuclei on anxiety-like behavior in rats. *Neurosci Lett.* 569: 121-125.
- Bauman NM, Wang D, Luschei ES, Talman WT (2002). Effect of substance P injection into the nucleus tractus solitarius of rats on cricothyroid and thyroarytenoid motor activity and cardiovascular and respiratory systems. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 111(10): 875-83.
- Blake CB, Meredith M (2011) Change in number and activation of androgen receptor-immunoreactive cells in the medial amygdala in response to chemosensory input. *Neuroscience* 190:228-238.
- Bosch OJ, Neumann ID (2012) Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: From central release to sites of action. *Horm Behav* 61:293-303.
- Campese VM, Amar M, Anjali C, Medhat T, Wurgaft A (1997) Effect of L-arginine on systemic and renal haemodynamics in salt-sensitive patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens* 11:527-532.
- 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.* 360:213-45.
- Cavalcante JC, Sita LV, Mascaro MB, Bittencourt JC, Elias CF (2006). Distribution of urocortin 3 neurons innervating the ventral premammillary nucleus in the rat brain. *Brain Res.*, 1089, 116-125.
- Cerrato BD, Frasch AP, Nakagawa P, Longo-Carbajosa N, Peña C, Höcht C, Gironacci MM (2012) Angiotensin-(1-7) upregulates central nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.*

- Coletti R, Almeida-Pereira G, Elias LL, Antunes-Rodrigues J (2015). Effects of hydrogen sulfide (H₂S) on water intake and vasopressin and oxytocin secretion induced by fluid deprivation. *Horm Behav.* 67:12-20.
- Dalmasso C, Antunes-Rodrigues J, Vivas L, De Luca Jr LA (2015). Mapping brain Fos immunoreactivity in response to water deprivation and partial rehydration: Influence of sodium intake. *Physiol Behav.* 15: 1494–1501.
- Dantas EM, Sant'Anna ML, Andreão RV, Gonçalves CP, Morra EA, Baldo MP, Rodrigues SL, Mill JG (2012). Spectral analysis of heart rate variability with the autoregressive method: what model order to choose? *Comput Biol Med.* 42(2):164-170.
- Davern PJ and Head GA (2011) Role of the medial amygdala in mediating responses to aversive stimuli leading to hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38:136-143.
- Davern, PJ, Jackson KL, Nguyen-Huu TP, La Greca L, Head GA (2010). Cardiovascular reactivity and neuronal activation to stress in Schlager genetically hypertensive mice. *Neuroscience*, 170, 551-558.
- Davern PJ, Nguyen-Huu TP, La Greca L, Abdelkader A, Head GA (2009) Role of the sympathetic nervous system in Schlager genetically hypertensive mice. *Hipertension* 54:852-859.
- 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.
- Dayas CV, Buller KM, Day TA (2001) Medullary neurones regulate hypothalamic corticotropin-releasing factor cell responses to an emotional stressor. *Neuroscience* 105:707-719.
- da Silveira LT, Junta CM, Monesi N, de Oliveira-Pelegrin GR, Passos GA, Rocha MJ (2007). Time course of c-fos, vasopressin and oxytocin mRNA expression in the hypothalamus following long-term dehydration. *Cell Molec Neurobiol* 27: 575–584.
- de Castilhos J, Forti CD, Achaval M, Rasia-Filho AA (2006). Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: a Golgi study. *Brain Res* 1240:73-81.
- de Castilhos J, Rigon P, Xavier LL, Rasia-Filho A, Achaval M (2009). Sex differences in NADPH-diaphorase activity in the rat posterodorsal medial amygdala. *Brain Res.* 1305:31-39.
- de Olmos JS, Beltramino CA, Alheid G (2004). Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. Elsevier Academic Press, p. 509-603.

- De Vries GJ and Simerly RB (2002) Anatomy, development and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. In: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahbach SE, Rubin R. *Hormone, Brain and Behavior* Academic Press 137-191.
- Dong HW and Swanson LW (2001) Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Res Brain Res Rev* 38:192-246.
- Ebner K, Bosch OJ, Krömer SA, Singewald N, Neumann ID (2005). Release of oxytocin in the rat central amygdala modulates stress-coping behavior and the release of excitatory amino acids. *Neuropsychopharmacol* 30:223-30.
- Fukumori R, Nishigori Y, Goshima Y, Kubo T (2004) Contribution of the medial amygdaloid nucleus to the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett.* 365: 128-13.
- Gaw AJ, Hills DM, Spraggs CF (1995) Characterization of the receptors and mechanisms involved in the cardiovascular actions of sCCK-8 in the pithed rat. *Br. J. Pharmacol.* 115, 660–664.
- Gillis RA, Quest JA, Pagani FD, Souza JD, Da Silva AM, Jensen RT, Garvey TQ 3rd, Hamosh P (1983). Activation of central nervous system cholecystokinin receptors stimulates respiration in the cat. *J Pharmacol Exp Ther.* 224(2):408-414.
- Griffiths PR, Lolait SJ, Harris LE, Paton JFR, O'Carroll AM (2017). Vasopressin V1a receptors mediate the hypertensive effects of [Pyr1]apelin-13 in the rat rostral ventrolateral medulla. *J Physiol.* 595(11): 3303-3318.
- Hassel, B., and Dingledine R (2006). Glutamate. In *Basic Neurochemistry: Molecular and Medical Aspects*. 7th ed. Edited by G.J. Siegel, R.W. Albers, S.T. Brady, and D.L. Price. Elsevier Academic Press, New York, N.Y. 23, pp. 267–290.
- Hatam M, Kharazmi F, Nasimi A (2009). Vasopressin and sympathetic systems mediate the cardiovascular effects of the GABAergic system in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neurosci Res.* 65(4): 347-52.
- Horii A, Nakagawa A, Uno A, Kitahara T, Imai T, Nishiike S, Takeda N, Inohara H (2012) Implication of substance P neuronal system in the amygdala as a possible mechanism for hypergravity-induced motion sickness. *Brain Res* 30;1435:91-8.
- Hou L, Tang H, Chen Y, Wang L, Zhou X, Rong W, Wang J (2009). Presynaptic modulation of tonic and respiratory inputs to cardiovagal motoneurons by substance P. *Brain Res.* 1284: 31-40.

- 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.
- Li YW, Dampney RA (1994). Expression of Fos-like protein in brain following sustained hypertension and hypotension in conscious rabbits. *Neuroscience* 61: 613-634.
- Lohman RJ, Liu L, Morris M, O'Brien TJ (2005). Validation of a method for localised microinjection of drugs into thalamic subregions in rats for epilepsy pharmacological studies. *J Neurosci Methods* 146: 191-197
- Longhurst JC (2008) Neural regulation of the cardiovascular system. In: Squire LR, Blom FE, McConell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ. Burlington, Academic Press *Fund Neurosci.* 829-853.
- Longhurst JC, Squire LR, Blom FE, McConnel SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ (2003). Neural regulation of the cardiovascular system. *Fundamental Neuroscience.* San Diego Academic Press 935-966.
- Lovick TA (2009). CCK as a modulator of cardiovascular function. *J Chem Neuroanat.* 38(3):176-84.
- Lozić M, Šarenac O, Murphy D, Japundžić-Žigon N (2018). Vasopressin, Central Autonomic Control and Blood Pressure Regulation. *Curr Hypertens Rep.* 20(2):11.
- Malsbury CW and McKay K (1994) Neurotrophic effects of testosterone on the medial nucleus of the amygdala in adult male rats. *J Neuroendocrinol* 6:57–69.
- Mecawi AS, Ruginsk SG, Elias LL, Varanda WA, Antunes-Rodrigues, J (2015). Neuroendocrine regulation of hydromineral homeostasis. *Compreh Physiol.* 5: 1465–1516.
- Meredith M and Westberry JM (2004) Distictive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. *J Neurosci* 24:5719-5725.
- Micevych PE, Matt DW, Go VLW (1988). Concentrations of cholecystokinin, substance P, and bombesin in discrete regions of male and female rat brain: sex differences and estrogen effects. *Exp Neurol* **100**:416–425.
- Neckel H, Quagliotto E, Casali KR, Montano N, Dall'Aggo P, Rasia-Filho AA. Glutamate and GABA in the medial amygdala induce selective central sympathetic/parasympathetic cardiovascular responses. *Can J Physiol Pharmacol.* 90: 525-536, 2012.

- Newman S W (1999) The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann. NY Acad. Sci.*, 877:242-257.
- Oro AE, Simerly RB, Swanson, LW (1988) Estrous cycle variations in levels of cholecystokinin immunoreactivity within cells of three interconnected sexually dimorphic forebrain nuclei. *Neuroendocrinology* 47:225–235.
- Paulis L, Pechanova O, Zicha J, Barta A, Gardlik R, Celec P, Kunes J, Simko F (2010a) Melatonin interactions with blood pressure and vascular function during L-NAME-induced hypertension. *J Pineal Res* 48:102-108.
- Paulis L, Pechanova O, Zicha J, Liskova S, Celec P, Mullerova M, Kollar J, Behuliak M, Kunes J, Adamcova M, Simko F (2010b) Melatonin improves the restoration of endothelium-derived constricting factor signalling and inner diameter in the rat femoral artery after cessation of L-NAME treatment. *J Hypertens* 28 Suppl 1:S19-24.
- Paxinos G, Watson, C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res* 38(1-2):247-89
- Porter K and Hayward LF (2011) Stress-induced changes in c-Fos and corticotropin releasing hormone immunoreactivity in the amygdala of spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res* 216:543-551.
- Quagliotto E, Casali KR, Dal Lago P, Rasia-Filho AA (2015). Neuropeptides in the posterodorsal medial amygdala modulate central cardiovascular reflex responses in awake male rats. *Braz J Med Biol Res* 48(2): 128-139.
- Quagliotto E, Neckel H, Casali KR, Montano N, Dal Lago P, Rasia-Filho AA (2012) Glutamate and GABA in the medial amygdala induce selective central sympathetic/parasympathetic cardiovascular responses. *Can J Physiol Pharmacol* 90(5):525-536.
- Quagliotto E, Neckel H, Riveiro DF, Casali KR, Mostarda C, Irigoyen MC, Dall'ago P, Rasia-Filho AA (2008) Histamine in the posterodorsal medial amygdala modulates cardiovascular reflex responses in awake rats. *Neuroscience* 157:709-719.
- Rasia-Filho AA (2006) Is there anything "autonomous" in the nervous system? *Adv Physiol Educ* 30:9-12.

- Rasia-Filho AA, Brusco, J., Moreira, J.E (2009) Spine plasticity in the rat medial amygdala. In: Baylog L.R. editor. *Dendritic Spines: Biochemistry, Modeling and Properties*. Hauppauge: Nova Science Publishers 23, 67-90.
- Rasia-Filho AA, Fabian C, Rigoti KM, Achaval M (2004) Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience* 126:839-847.
- Saha S (2005). Role of the central nucleus of the amygdala in the control of the blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32:450-456.
- Singewald N, Chicchi GG, Thurner CC, Tsao KL, Spetea M, Schmidhammer H, Sreepathi HK, Ferraguti F, Singewald GM, Ebner K (2008). Modulation of basal and stress-induced amygdaloid substance P release by the potent and selective NK1 receptor antagonist L-822429. *J Neurochem*. 106(6): 2476-88.
- Turner SA, Ganten D (1986) Cardiovascular regulation. In: Lightmann SL, Everitt BJ. *Neuroendocrinology*. London Blackwell Scientific Publications 331-359.
- Vechiatto FMV, Rivas PMS, Ruginsk SG, Borges BC, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J (2016). The type-1 cannabinoid receptor modulates the hydroelectrolytic balance independently of the energy homeostasis during salt load. *Horm Behav* 78:43–51.
- Vilhena-Franco T, Mecawi AS, Elias LL, Antunes-Rodrigues J. (2016) Oestradiol effects on neuroendocrine responses induced by water deprivation in rats. *J Endocrinol*. 231(2):167-180.
- Yogo K, Oki Y, Iino K, Yamashita M, Shibata S, Hayashi C, Sasaki S, Suenaga T, Nakahara D, Nakamura H (2012) Neuropeptide W stimulates adrenocorticotrophic hormone release via corticotrophin-releasing factor but not via arginine vasopressin. *Endocr J*.
- Zhang W, Zhang N, Sakurai T, Kuwaki T (2009) Orexin neurons in the hypothalamus mediate cardiorespiratory responses induced by disinhibition of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 1262:25-37.

Conflict of Interest

Authors declare no actual or potential conflict of interest.

Legends

Figure 1. (A) Schematic representation of a matched coronal section of the rat brain to demonstrate the location of the posterodorsal medial amygdala (MePD). Other amygdaloid nuclei are represented by adjacent dashed areas, for which the reader is referred to the atlas of Paxinos and Watson (1998). opt, optic tract; st, stria terminalis. **(B)** Photomicrography of a representative rat brain coronal section approximately -2.8 mm posterior to the bregma to show the location of the cannula (*) implanted above the MePD. Dashed lines represent the course of the microinjection needle, which caused a tiny mechanical lesion (not shown in details). Scale bar= 1.5 mm. D, dorsal; L, lateral M. medial; V, ventral. Adapted from Quagliotto et al. (2008).

Figure 2. Plots of the average values for the relationship between mean arterial blood pressure (MAP in mm Hg) and heart rate (HR in bpm) using the logistic sigmoidal baroreceptor curve analysis. Data were obtained from rats that received the microinjections in the posterodorsal medial amygdala of saline (0.3 μ l, n = 7), vasopressin (VP; 1 pg/0.3 μ l, n = 5 or 100 pg/0.3 μ l; n = 7), substance P (SP; 10 ng/0.3 μ l, n = 4 or 100 ng/0.3 μ l; n = 6), cholecystinin (CCK; 10 nM/0.3 μ l, n = 4 or 100 nM/0.3 μ l; n = 4) or L-Arginine (L-Arg; 2.87 nM/0.3 μ l, n = 4 or 100 nM/0.3 μ l, n =5). Microinjection of SP (10 ng) promoted a significant increased in the gain, shifting the barocurve to the left and to lower HR values when compared with the results from the saline and SP (100 ng) microinjected groups ($P < 0.01$ in both cases).

Figure 3. (A) Changes (Δ) in heart rate (HR, values are mean + standard deviation) in response to increasing doses of potassium cyanide (KCN). Experimental groups were microinjected saline (0.3 μ l, n = 7), vasopressin (VP; 1 pg/0.3 μ l, n = 5 or 100 pg/0.3 μ l; n = 7), substance P (SP; 10 ng/0.3 μ l, n = 4 or 100 ng/0.3 μ l; n = 6), cholecystinin (CCK; 10 nM/0.3 μ l, n = 4 or 100 nM/0.3 μ l; n = 4) or L-Arginine (L-Arg; 2.87 nM/0.3 μ l, n = 4 or 100 nM/0.3 μ l, n =5) into the right MePD. * $P < 0.05$ compared with the 100 μ g/kg and 180 μ g/kg KCN in the control group. ** $P < 0.01$ compared with the effect evoked by KCN at 100 μ g/kg when compared to the control group (two-way ANOVA for repeated measures and Newman-Keuls post hoc test). **(B)** Changes (Δ) in mean arterial pressure (MAP, values are mean + standard deviation) in response to increasing doses of potassium cyanide (KCN). Experimental groups are the same as in (A). No statistically difference was found between groups ($P > 0.05$).

Figure 4. Values (median and interquartile ranges, dots represent the result from each rat in each experimental group) of the volume (in mL) for the consumption of **(A)** water, **(B)** water and NaCl (0.3M), and **(C)** urinary excretion in adult male rats (n= 4-5/group). Animals were microinjected in the posterodorsal medial amygdala (MePD) with saline (0.3 μ L) or glutamate (2 μ g/0.3 μ L) and were subject to standard laboratory conditions or to water deprivation (WD) for 24h. Rats microinjected in the MePD, but not submitted to WD, had a similar low consumption of water or water and salt ($P >$

0.05). There was a statistically significant increase in the consumption of water or water and salt after WD in rats microinjected with saline in the MePD ($P < 0.05$ in both cases). Rats that were microinjected with glutamate in the MePD had a higher consumption of water ($P = 0.01$), but not a higher intake of water and NaCl ($P > 0.7$) compared to glutamate microinjected in rats with free access to water. No statistically significant difference was found for the urinary volume between experimental groups ($P > 0.2$).

Table 1. Values are means \pm standard deviation (SD). Basal hemodynamic data obtained before (“control” data) and “after” (test data) microinjections in the rat posterodorsal medial amygdala of saline (0.3 μ l, $n = 7$), vasopressin (VP; 1 pg/0.3 μ l, $n = 5$ or 100 pg/0.3 μ l; $n = 7$), substance P (SP; 10 ng/0.3 μ l, $n = 4$ or 100 ng/0.3 μ l; $n = 6$), cholecystokinin (CCK; 10 nM/0.3 μ l, $n = 4$ or 100 nM/0.3 μ l; $n = 4$) or L-Arginine (L-Arg; 2.87 nM/0.3 μ l, $n = 4$ or 100 nM/0.3 μ l, $n = 5$). SAP, systolic arterial pressure; DAP, diastolic arterial pressure; MAP, mean arterial blood pressure; HR, heart rate. No statistically significant differences were found when comparing data between experimental groups.

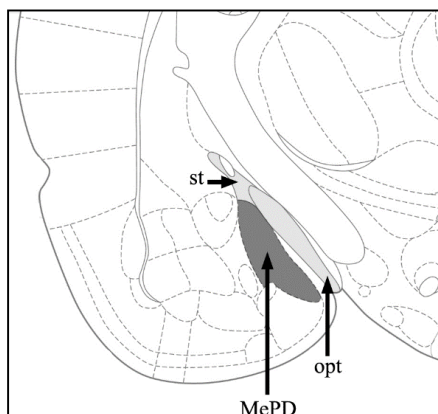
Table 2. Plots of the average values for the relationship between mean arterial blood pressure (MAP in mm Hg) and heart rate (HR) using the logistic sigmoidal baroreceptor curve analysis. Data were obtained from rats that received the microinjections in the posterodorsal medial amygdala of saline (0.3 μ l, $n = 7$), vasopressin (VP; 1 pg/0.3 μ l, $n = 5$ or 100 pg/0.3 μ l; $n = 7$), substance P (SP; 10 ng/0.3 μ l, $n = 4$ or 100 ng/0.3 μ l; $n = 6$), cholecystokinin (CCK; 10 nM/0.3 μ l, $n = 4$ or 100 nM/0.3 μ l; $n = 4$) or L-Arginine (L-Arg; 2.87 nM/0.3 μ l, $n = 4$ or 100 nM/0.3 μ l, $n = 5$). Data were submitted to the one-way ANOVA test and the Newman-Keuls *post hoc* test. ** $P < 0.01$ when compared to saline. † $P < 0.05$ when compared to SP at the doses of 10 ng.

Table 3. Cardiovascular parameters (values are means \pm S.D.) of power spectral analysis calculated from sampled data of rats that received microinjections in the posterodorsal medial amygdala of saline (0.3 μ l, $n = 7$), vasopressin (VP; 1 pg/0.3 μ l, $n = 5$ or 100 pg/0.3 μ l; $n = 7$), substance P (SP; 10 ng/0.3 μ l, $n = 4$ or 100 ng/0.3 μ l; $n = 6$), cholecystokinin (CCK; 10 nM/0.3 μ l, $n = 4$ or 100 nM/0.3 μ l; $n = 4$) or L-Arginine (L-Arg; 2.87 nM/0.3 μ l, $n = 4$ or 100 nM/0.3 μ l, $n = 5$). HRV, heart rate variability; f_{LF} , central low frequency; f_{HF} , central high frequency; VLF, very low frequency power; LF, low frequency power; HF, high frequency power; APV, arterial pressure variability. Data were submitted to the one-way ANOVA test and the Tukey *post hoc* test or the Kruskal-Wallis test and the Dunn’s *post hoc* test. * $P < 0.05$ when compared to saline. ** $P < 0.01$ when compared to saline. † $P < 0.05$ when compared to VP at the dose of 1 pg.

Table 4. Power spectral analysis of cardiovascular parameters in awake rats Cardiovascular parameters (values are means \pm S.D.) of symbolic analysis calculated from sampled data of rats that received microinjections in the posterodorsal medial amygdala of saline (0.3 μ l, $n = 7$), vasopressin (VP; 1 pg/0.3 μ l, $n = 5$ or 100 pg/0.3 μ l; $n = 7$), substance P (SP; 10 ng/0.3 μ l, $n = 4$ or 100 ng/0.3 μ l; $n = 6$), cholecystokinin (CCK; 10 nM/0.3 μ l, $n = 4$ or 100 nM/0.3 μ l; $n = 4$) or L-Arginine (L-Arg; 2.87 nM/0.3 μ l, $n = 4$ or 100 nM/0.3 μ l, $n = 5$). Data were submitted to the one-way ANOVA test and the Newman-Keuls *post hoc* test. * $P < 0.05$ when compared to saline. † $P < 0.01$ when compared to CCK at the doses of 10 nM.

Figure 1

A



B

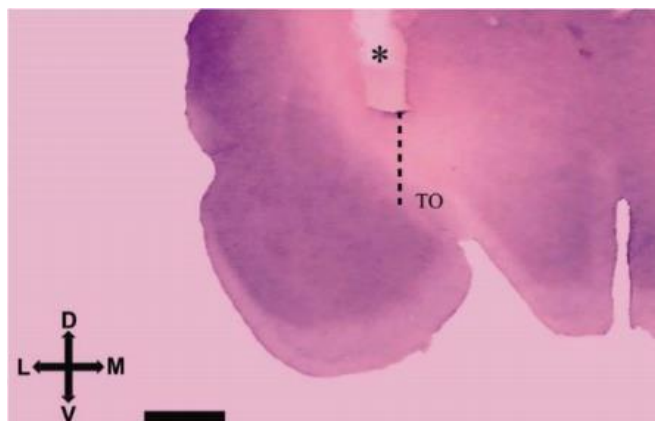


Figure 2

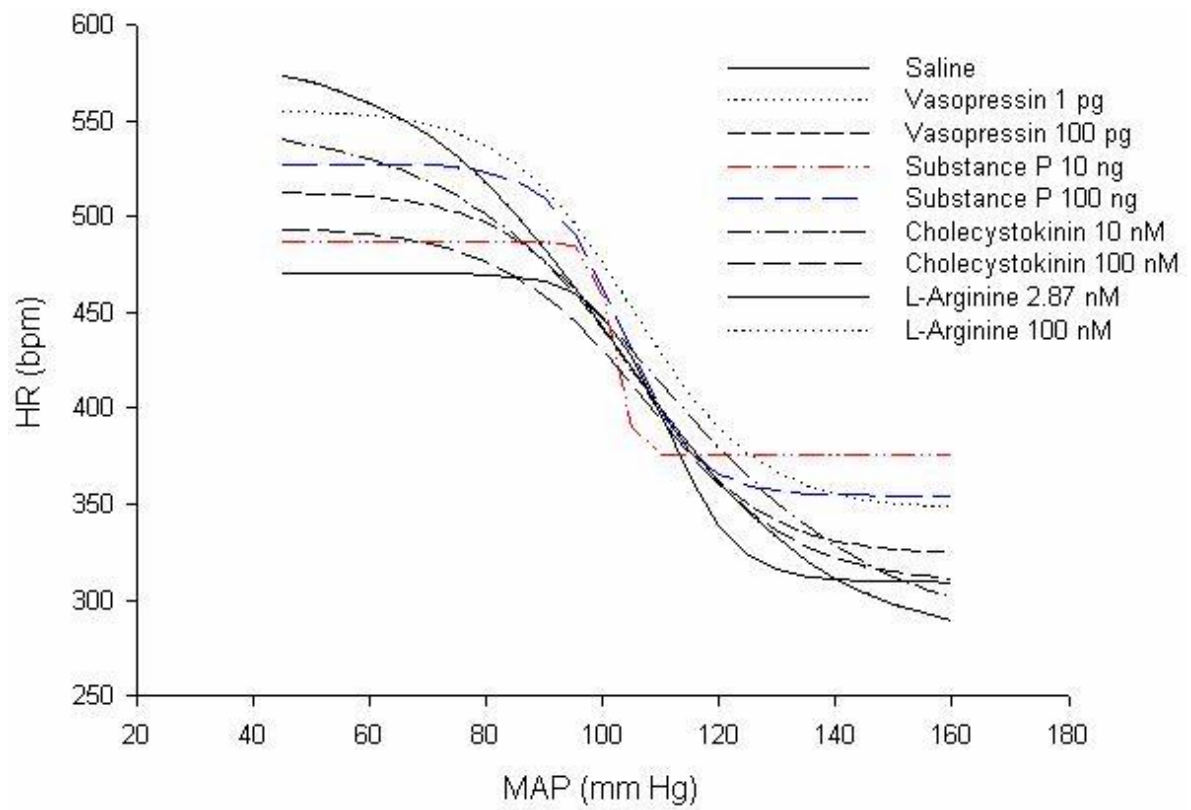


Figure 3

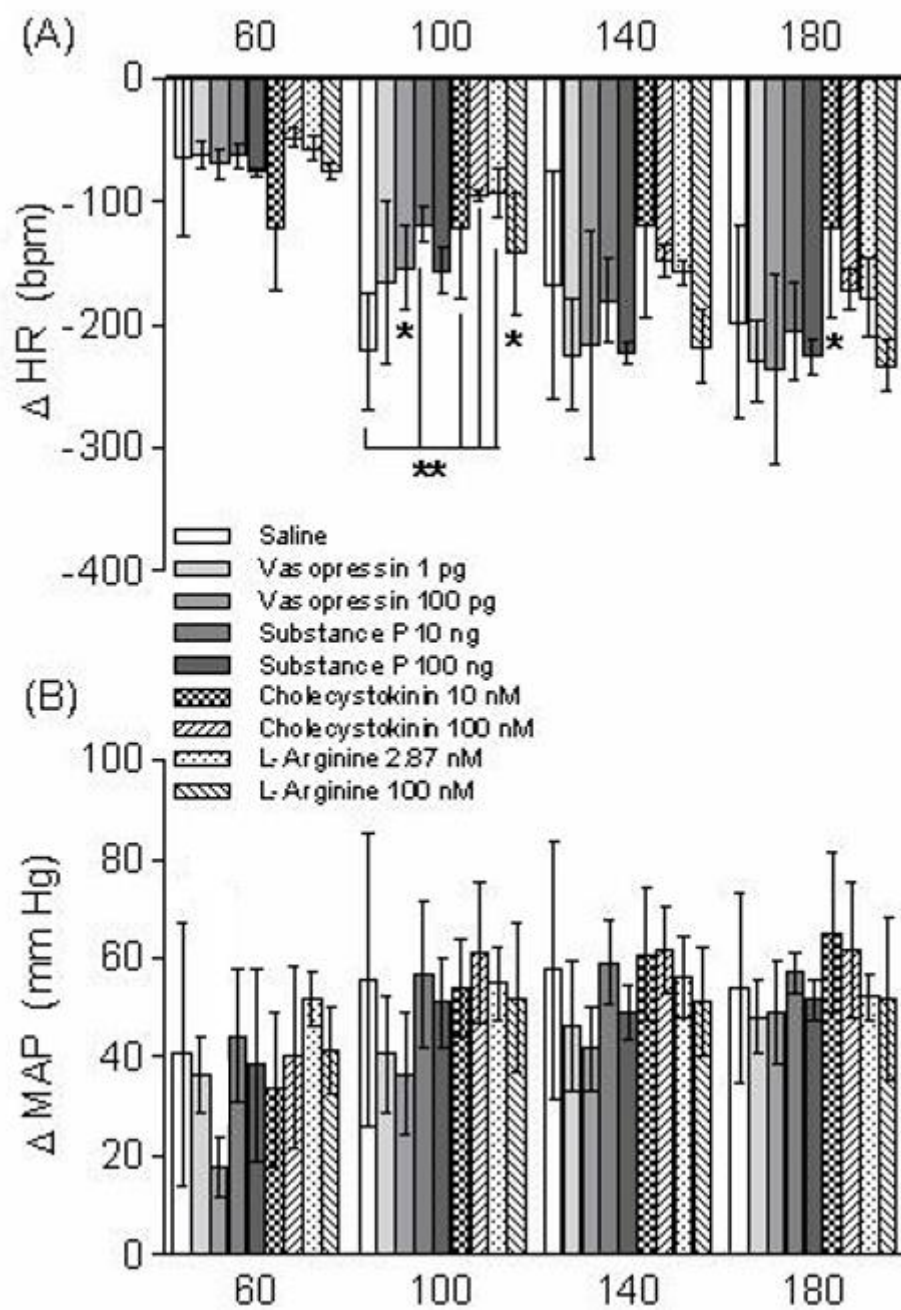


Figure 4

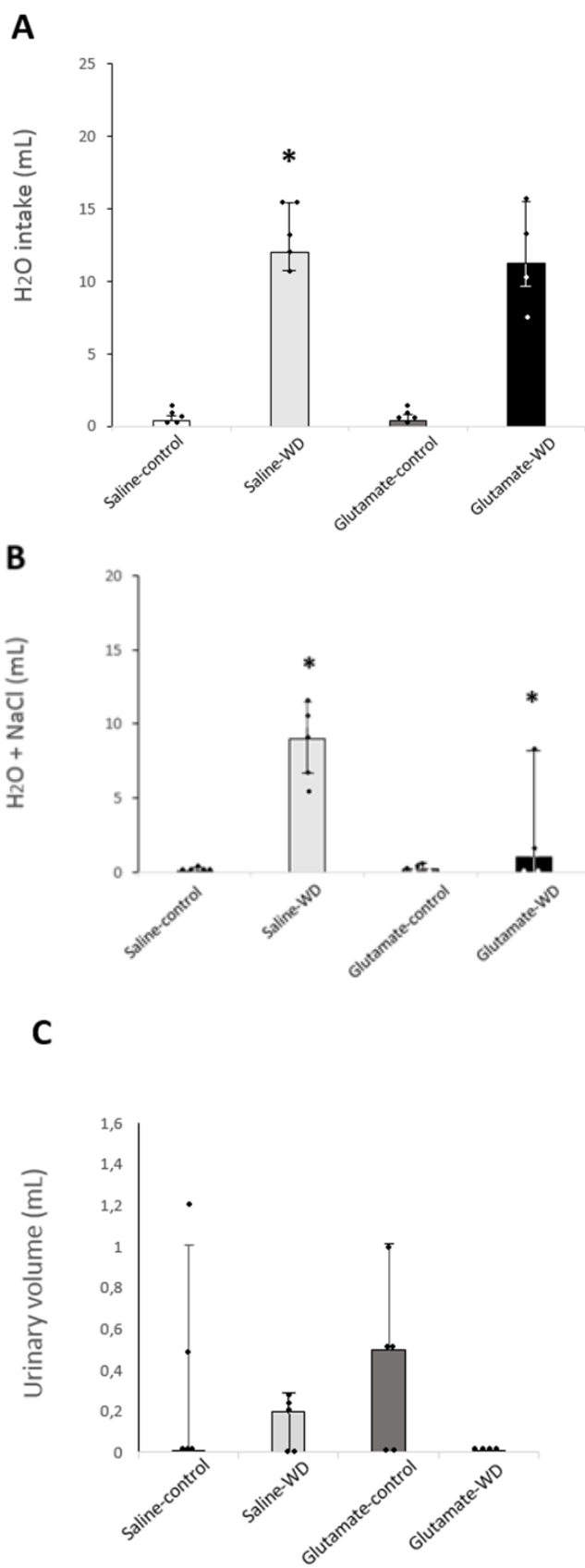


Table 1. Baseline hemodynamic status

Groups	SAP, mmHg		DAP, mmHg		MAP, mmHg		HR, beats/min	
	Control	After	Control	After	Control	After	Control	After
Saline	136 ± 9.0	131.0 ± 12.7	90.1 ± 4.6	89.5 ± 9.3	111.6 ± 5.6	109.0 ± 10.1	360.2 ± 29.3	350.7 ± 31.9
VP 1 pg	127.8 ± 6.0	127.3 ± 6.9	87.9 ± 5.7	87.8 ± 7.43	107.2 ± 5.3	106.9 ± 7.0	389.4 ± 25.6	386.8 ± 4.6
VP 100 pg	124.6 ± 10.9	122.6 ± 14.2	89.9 ± 10.9	89.7 ± 14.5	106.5 ± 10.4	105.6 ± 14.4	386.1 ± 33.5	380.6 ± 47.6
SP 10 ng	136.4 ± 8.1	130.8 ± 12.0	90.1 ± 6.8	88.7 ± 7.0	111.6 ± 7.1	108.6 ± 8.9	391.0 ± 51.1	364.5 ± 33.7
SP 100 ng	126.4 ± 3.8	127.9 ± 7.6	84.5 ± 5.5	89.1 ± 9.1	105.0 ± 2.3	107.8 ± 8.0	384.2 ± 33.0	412.8 ± 60.5
CCK 10 nM	132.6 ± 5.9	130.6 ± 8.3	84.9 ± 2.2	84.4 ± 6.7	108.7 ± 2.9	107.3 ± 7.1	410.6 ± 18.9	396.6 ± 39.8
CCK 100 nM	134.9 ± 4.0	131.9 ± 3.5	84.1 ± 0.9	81.9 ± 3.7	108.6 ± 2.3	105.8 ± 3.4	373.6 ± 16.4	371.3 ± 5.7
L-Arg 2.87 nM	132.4 ± 6.9	133.3 ± 7.9	90.1 ± 1.6	93.1 ± 5.9	109.8 ± 3.2	111.6 ± 5.3	420.1 ± 30.1	437.0 ± 53.7
L-Arg 100 nM	125.8 ± 6.7	126.8 ± 5.4	87.7 ± 5.1	87.5 ± 5.3	105.8 ± 2.4	106.1 ± 4.6	362.0 ± 35.2	371.6 ± 37.8

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

Groups	Upper plateau, bpm	Lower plateau, bpm	HR range, bpm	Maximum gain, bpm.min ⁻¹ .mmHg ⁻¹
Saline	470.6 ± 9.5	309.3 ± 27.8	161.2 ± 30.3	-8.3 ± 3.9
VP 1 pg	555.9 ± 72.3	347.0 ± 82.2	208.8 ± 47.9	-4.8 ± 0.8
VP 100 pg	513.2 ± 66.7	323.4 ± 49.9	189.7 ± 72.1	-8.2 ± 6.3
SP 10 ng	486.9 ± 4.4	375.4 ± 33.5	111.4 ± 31.0	-22.6 ± 18.8**
SP 100 ng	527.5 ± 33.1	375.4 ± 33.5	173.2 ± 41.1	-8.5 ± 3.5†
CCK 10 nM	549.1 ± 74.4	284.0 ± 98.3	265.1 ± 171.0	-3.4 ± 0.3
CCK 100 nM	494.9 ± 38.9	308.0 ± 13.5	186.9 ± 36.4	-3.79 ± 0.75
L-Arg 2.87 nM	525.5 ± 32.9	387.5 ± 21.8	137.9 ± 36.2	-10.9 ± 5.9
L-Arg 100 nM	585.5 ± 128.9	277.6 ± 96.4	307.8 ± 218.2	-6.7 ± 2.9

Table 3. Power spectral analysis of cardiovascular parameters in awake rats

Measurement	Saline	VP 1 pg	VP 100 pg	SP 10 ng	SP 100 ng	CCK 10 nM	CCK 100 nM	L-Arg 2.87 nM	L-Arg 100 nM
HRV, ms ²	26.74 ± 11.48	35.66 ± 12.23	21.45 ± 13.11	26.50 ± 7.96	39.83 ± 13.38	22.30 ± 11.34	19.98 ± 6.04	6.22 ± 4.71*	25.41 ± 11.99
f _{LF} , Hz	0.52 ± 0.14	0.46 ± 0.18	0.40 ± 0.11	0.40 ± 0.14	0.45 ± 0.15	0.54 ± 0.15	0.45 ± 0.14	0.56 ± 0.11	0.46 ± 0.10
LF, ms ²	1.51 ± 1.03	8.35 ± 6.73	4.41 ± 3.26	6.53 ± 5.17	8.09 ± 8.12*	1.09 ± 0.75	2.00 ± 1.05	0.52 ± 0.27	2.28 ± 1.27
LF, NU	8.84 ± 2.88	28.04 ± 15.16*	27.59 ± 14.17*	28.52 ± 8.96*	26.12 ± 19.38*	9.11 ± 3.36	14.14 ± 6.60	15.90 ± 2.29	16.90 ± 7.09
f _{HF} , Hz	1.88 ± 0.19	1.68 ± 0.23	1.81 ± 0.26	1.77 ± 0.19	1.81 ± 0.29	1.94 ± 0.17	1.79 ± 0.11	1.91 ± 0.14	1.69 ± 0.20
HF, ms ²	14.67 ± 9.45	17.70 ± 6.74	9.19 ± 5.16	14.15 ± 6.98	19.52 ± 7.74	8.73 ± 4.27	11.97 ± 3.69	2.13 ± 1.45*	11.26 ± 5.08
HF, NU	90.12 ± 2.25	70.15 ± 17.39	60.44 ± 16.21**	71.49 ± 8.96	69.25 ± 20.46	80.56 ± 12.76	83.32 ± 4.45	60.51 ± 16.31*	81.41 ± 10.52
LF/HF	0.10 ± 0.03	0.46 ± 0.34	0.52 ± 0.32*	0.42 ± 0.17	0.51 ± 0.53*	0.12 ± 0.06	0.17 ± 0.09	0.28 ± 0.11	0.21 ± 0.12
APV, mmHg ²	7.64 ± 2.63	5.49 ± 2.50	16.08 ± 9.18	4.80 ± 0.94	14.46 ± 8.30	9.10 ± 3.66	10.39 ± 5.19	8.66 ± 2.39	11.51 ± 8.36
VLF, mmHg ²	4.81 ± 3.44	2.81 ± 2.28	0.88 ± 0.15*	0.39 ± 0.45*	5.71 ± 4.10	4.18 ± 2.86	0.36 ± 0.67*	1.94 ± 1.91	1.61 ± 1.77
LF, mmHg ²	1.73 ± 1.43	1.54 ± 1.52	9.30 ± 5.78**	3.30 ± 0.92	5.38 ± 4.01	2.92 ± 1.32	7.56 ± 5.19	3.37 ± 1.86	7.50 ± 7.38
HF, mmHg ²	1.11 ± 0.48	1.13 ± 0.81	5.87 ± 5.53	1.09 ± 0.15	3.25 ± 3.39	1.88 ± 0.94	2.42 ± 0.70	3.27 ± 2.19	2.40 ± 1.92
Alpha index, ms/mmHg	1.17 ± 0.81	3.40 ± 2.61**	0.74 ± 0.72†	1.39 ± 0.68	1.20 ± 0.27	0.64 ± 0.36	0.57 ± 0.26	0.44 ± 0.22	0.65 ± 0.64

Table 4. Symbolic analysis of cardiovascular parameters in awake rats

Measurement	Saline (7)	VP 1pg (5)	VP 100 pg (7)	SP 10 ng (4)	SP 100 ng (6)	CCK 10 nM (4)	CCK 100 nM (4)	L-Arg 2.87 nM (4)	L-Arg 100 nM (5)
0V % pattern	14.82 ± 12.74	10.86 ± 6.07	11.45 ± 11.70	12.26 ± 5.78	13.21 ± 5.72	26.21 ± 17.44	8.80 ± 7.35	20.75 ± 7.55	12.72 ± 4.27
1V % pattern	38.58 ± 7.33	42.45 ± 5.87	38.68 ± 5.46	42.20 ± 4.97	42.00 ± 5.50	37.85 ± 6.65	42.08 ± 7.82	41.75 ± 4.22	41.35 ± 2.21
2LV % pattern	8.62 ± 2.89	12.83 ± 7.45	9.90 ± 2.40	10.73 ± 1.88	11.80 ± 5.81	4.04 ± 3.93	16.23 ± 5.33*†	4.86 ± 0.61	11.10 ± 4.31
2UV % pattern	37.98 ± 7.43	33.86 ± 6.60	39.97 ± 10.72	34.82 ± 8.27	33.00 ± 5.73	31.91 ± 9.52	32.90 ± 8.71	32.64 ± 9.21	34.83 ± 5.65

4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo reforçam que o MePD é um componente relevante da circuitaria que integra o controle cardiovascular e contribui nas respostas reflexas de FC e PA em ratos não anestesiados com livre deambulação (Quagliotto et al., 2008; Neckel et al., 2012; Quagliotto et al., 2012, 2015). Nossos novos achados indicam ainda que o MePD tem um papel ativo nas alterações dinâmicas induzidas por reflexos da PA devido ao balanço simpático/parassimpático. Esses achados sobre as adaptações cardiovasculares mediadas por barorreceptores e quimiorreceptores indicam implicações funcionais para diferentes moduladores químicos no MePD. Também destaca o papel do MePD no controle central do balanço hidroeletrólítico e do consumo de sal. Os comentários a seguir visam complementar a interpretação dos dados, sem ser redundante, apresentada no artigo científico acima.

Confirmando dados de Quagliotto et al. (2008, 2012, 2015) com neurotransmissores clássicos e neuropeptídeos no MePD, tal estrutura, caracteristicamente, apresenta efeitos de longa duração (na ordem dos minutos) após microinjeções de neurotransmissores ou neuropeptídios. De fato, é provável que os mecanismos excitatórios, inibitórios e/ou desinibitórios mediados por transmissores no MePD possam promover uma modulação flexível do controle central do simpático/parassimpático, dependente de dose e ambiente onde se encontra o animal (Quagliotto et al., 2012). O MePD pode responder a muitos e diferentes neurotransmissores e neuropeptídeos por codificam demandas sinápticas distintos para ajustes específicos de reflexos cardiovasculares de forma concomitante à comportamentos em ratos em vigília (Quagliotto et al., 2015). Isso se correlaciona com a ampla variedade de comportamentos sociais que o MePD modula em ratos, como discutido anteriormente. Ademais, a rede neural que integra informações que ocorrem no complexo amigdalóide modifica a FC e a resistência vascular. Em situações de estresse, por exemplo, o estímulo estressor chega ao SNC após aferências dos órgãos dos sentidos e a resposta a esses estímulos é integrada pelo MePD, o

qual funciona como um gatilho para as respostas hipotalâmicas de secreção neuroendócrina (Dayas et al., 1999). O MePD também pode promover ativação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), que por sua vez secreta hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela adeno-hipófise atuando sobre a região cortical das glândulas suprarrenais promovendo a liberação de glicocorticoides que são extremamente importantes para a adaptação ao estresse (Raglan et al., 2017). Ou seja, o MePD pode não só gerar modulação das respostas reflexas cardiovasculares como também integrar-se nos circuitos neurais de respostas adaptativas ao contexto do animal e sua sobrevivência. Esse deve ser um dos fatores principais para que mais do que um transmissor químico possa atuar nesta região subcortical.

Seguindo neste raciocínio e tomando-se a “amígdala expandida” com seus componentes, onde se encontra o MePD, ratos anestesiados submetidos à estimulação elétrica do CeA apresentaram reações bradicárdicas e hipotensoras (Mogenson and Calaresu, 1973) ou reduções pressóricas e de fluxo sanguíneo em leitos vasculares como renal e mesentérico (Galeno and Brody, 1983). Não obstante, a estimulação do CeA apresenta um efeito máximo em animais acordados, mas estados de sono ou sob efeito de anestésicos as respostas são atenuadas ou mesmo abolidas, mostrando que a relação do animal com seu ambiente e as demandas sinápticas decorrentes disso apresentam grande influência sobre as respostas cardiovasculares moduladas pelo CeA (Galeno & Brody, 1983; Yamanaka et al., 2017). De fato, em animais acordados, a microinjeção de L-glutamato no CeA provocou elevação de PA e FC, bem como aumento da atividade elétrica local (Iwata et al., 1987). Tais adaptações pressóricas e de FC são decorrentes da atividade de neurônios locais e não a fibras de passagem (Iwata et al., 1987). No CeA, há aumento pressórico relacionado com taquicardia após sua estimulação elétrica ou após microinjeção local de antagonista dos receptores GABA_A (bicuculina; Yamanaka et al., 2017). Já outras regiões do complexo amigdaliano e fora da divisão “expandida”, como é o caso da ABL, quando estimuladas, exibiram manifestações hipotensoras e bradicárdicas variadas (Yamanaka et al., 2017). Em conjunto, esses dados indicam que a modulação central da atividade cardiovascular executada pelos núcleos amigdalianos é dependente de cada

região anatômica, suas aferências e eferências, dos comportamentos com os quais se relacionam e com o tipo de abordagem experimental utilizada para estudo (Yamanaka et al., 2017).

É notável que no MePD podem ser encontradas VP, SP, CCK e L-Arg (Herbert et al., 1990, Kakinoki et al., 1998, Jones et al., 1999, Matsumura et al., 1999, Averill and Diz, 2000, Dampney et al., 2002, Yilmazer-Hanke et al., 2003, Jiang et al., 2005, Lacka and Czyzyk, 2008, Szczepanska-Sadowska, 2008, Pyner, 2009, Shirasu et al., 2011). Poucos dados têm sido adicionados à literatura nos últimos anos referentes às ações de neuromoduladores ou neurotransmissor gasoso retrógrado, tais como esses mencionados, nos núcleos amigdalianos e para estudo concomitante da atividade cardiovascular. Isso torna os dados presentes como contribuição significativa a esse campo de investigação.

Recentemente alguns dados foram adicionados à literatura sobre o papel das substâncias aqui testadas quando microinjetadas em diferentes núcleos. Conforme Griffiths et al. (2017), o bulbo rostral ventro-lateral (RVLM) participa do controle central cardiovascular ao modular a PA após microinjeção bilateral de [Pyr1] apelina-13, que é dependente da ativação do receptor VP V1a. Assim, microinjeção bilateral de [Pyr1] apelina-13 no RVLM de ratos aumentou a PA e o tônus vasomotor simpático avaliado indiretamente pela análise espectral da PA. Por outro lado, o bloqueio dos receptores AT1, OT, glutamato ou GABA no RVLM não tem efeito sobre a resposta pressora e simpatoexcitatória induzida pela [Pyr1] apelina-13.

Por sua vez, o papel da SP nas respostas centrais relacionadas ao estresse foi detalhado com estudos neuroanatômicos mapeando a expressão dos receptores SP e NK1 em circuitos neurais envolvendo a amígdala, o hipotálamo, o hipocampo e o substância cinzenta periaquedutal (Bassi et al., 2014). A concentração de SP é alterada nessas regiões em resposta à estimulação aversiva. Por exemplo, a separação materna em cobaias causa a liberação de SP na amígdala como um todo, respostas de estresse avaliadas por modificação cardiovascular e comportamental. Além de seus efeitos nas regiões límbicas, a SP também tem relação com a atividade monoaminérgica central (Bassi et al., 2014). Para a CCK, Vázquez-León et al. (2018) demonstrou a

indução de comportamento ansiolítico em ratos após a microinjeção de CCK-8 na substância cinzenta periaquidutal em sua porção dorso-lateral. Da mesma forma, quando a microinjeção de CCK-8 ocorreu na porção ventro-lateral dessa estrutura, os comportamentos similares a ansiedade diminuíram significativamente. Isso poderia sugerir que a CCK poderia reduzir respostas centrais de aumento da atividade simpática nessas condições, embora esses dados não tenham sido estudados concomitantemente (Vázquez-León et al., 2018). NO (sintetizado a partir da L-Arg) está aumentado no bulbo ventro-lateral caudal (CVLM) durante a hipertensão arterial (Castro, 2010). Esses níveis elevados de NO parecem ter uma função inibitória sobre os neurônios da CVLM, contribuindo para o desenvolvimento e/ou manutenção da hipertensão renovascular e para a baixa sensibilidade do barorreflexo que ocorre nessa condição (Castro, 2010). Novamente, cada efeito parece depender da estrutura onde está sendo testado cada efeito e pode ser diferente de acordo com o modelo experimental empregado. Os resultados aqui obtidos acrescentam o MePD na lista de regiões neuroanatômicas do controle central cardiovascular e das várias possibilidades de resposta medida por diferentes transmissores químicos.

Por fim, a homeostasia hidroeletrolítica é um processo vital em que a composição, o volume e a osmolaridade dos líquidos corporais tem um papel importante para a manutenção da vida em que pese a volemia, a atividade celular dependente de íons difusíveis e todos os mecanismos de controle na secreção neuroendócrina de VP e AGII (Imai et al., 1989; Toney et al., 2003; Brooks and O'Donoghuy, 2005; Antunes et al., 2006) e na gênese e controle de diferentes comportamentos como o de sede e da saciedade na ingestão hídrica e/ou no apetite por sal (Dalmasso et al., 2015; Mecawi et al. 2015; Vilhena-Franco et al., 2016). Modelos animais que envolvem retração da volemia, partindo do modelo de restrição hídrica, culminam no aumento da osmolaridade plasmática, induzindo a liberação de hormônios, como a VP e OT, e a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Antunes-Rodrigues et al., 2004; da Silveira et al. 2007; Vilhena-Franco et al., 2016). Adicionalmente, estudos sugerem que a osmolaridade plasmática exerça participação direta na modulação da atividade simpática e na regulação da PA (Toney et al., 2003;

Brooks et al., 2005). Áreas livres de barreira hematoencefálica, como o órgão subfornical e o órgão vascular da lâmina terminal, por exemplo, seriam capazes de detectar alterações osmóticas plasmáticas causando aumento da resposta simpática, liberação de VP e elevação da PAM (Hoffman et al., 1977). Pela primeira vez se demonstra que o MePD modula respostas à restrição hídrica, assim como no consumo de água e água e NaCl, ambos com função importante também sobre a PA e a FC.

5. CONCLUSÕES

O MePD tem papel relevante no controle central cardiovascular quando das respostas reflexas após estimulação dos barorreceptores e quimiorreceptores, com ação seletiva nas respostas simpática e/ou parassimpática, e o balanço hidroeletrolítico para homeostasia da composição e volume extracelular.

A microinjeção de VP no MePD aumenta a atividade simpática central. SP modula ambas as respostas barorreflexa e quimiorreflexa e aumenta a atividade simpática central. CCK e L-Arg modulam a resposta quimiorreflexa, mas, envolvendo a atividade nitrérgica local, reduz a atividade parassimpática central.

A microinjeção de glutamato no MePD após restrição hídrica permite a ingestão de água quando disponibilizada para os animais, mas impede maior ingestão de água e sal.

6. PERSPECTIVAS

Estudos futuros devem ser feitos para determinar os receptores para VP, SP e CCK envolvidos nas respostas promovidas no MePD.

Deve-se avaliar a resposta de liberação hormonal por modulação neuroendócrina (como por exemplo, os níveis plasmáticos de AGII, OT, VP e peptídeo atrial natriurético) após microinjeção de glutamato no MePD no modelo de restrição hídrica.

Por fim, estudar o papel do MePD no controle central cardiovascular em resposta à expansão da volemia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamec RE, Morgan HD (1994) The effect of kindling of different nuclei in the left and right amygdala on anxiety in the rat. *Physiology and Behavior* 55:1-12.
- Ahn DK, Kim KH, Ju JS, Kwon S, Park JS (2001) Microinjection of arginine vasopressin into the central nucleus of amygdala suppressed nociceptive jaw opening reflex in freely moving rats. *Brain Res Bull* 55:117-121.
- Alheid GF, De Olmos JS, Beltramino CA (1995) Amygdala and extended amygdala. *The Rat Nervous System* San Diego: Academic Press:495-598.
- Alheid GF, Shammah-Lagnado SJ, Beltramino CA (1999) The interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure: a novel layer of the central division of extended amygdala. *Ann N Y Sci* 877:645-654.
- Antunes VR, Yao ST, Pickering AE, Murphy D, Paton JF (2006) A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation. *J. Physiol* 576:569-583.
- Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valença MM, McCann SM (2004). Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84: 169–208.
- Arpini M, Menezes IC, Dall'Oglio A, Rasia-Filho AA (2010) The density of Golgi-impregnated dendritic spines from adult rat posterodorsal medial amygdala neurons displays no evidence of hemispheric or dorsal/ventral differences. *Neurosci Lett.* 469: 209-213.
- Averill DB, Diz DI (2000) Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Res Bull* 51:119-128.
- Bealer SL (1999a) Central Neuronal Histamine Contributes to Cardiovascular Regulation. *News Physiol Sci* 14:100-105.
- Bealer SL (1999b) Preoptic recess noradrenergic receptors control modification of baroreflex sensitivity by hypertonicity. *Am J Physiol* 276:R44-51.

- Bealer SL, Armstrong WE, Crowley WR (2010a) Oxytocin release in magnocellular nuclei: neurochemical mediators and functional significance during gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:R452-458.
- Bealer SL, Crowley WR (1999a) Neurotransmitter interaction in release of intranuclear oxytocin in magnocellular nuclei of the hypothalamus. *Ann N Y Acad Sci* 897:182- 191.
- Bealer SL, Crowley WR (1999b) Stimulation of central and systemic oxytocin release by histamine in the paraventricular hypothalamic nucleus: evidence for an interaction with norepinephrine. *Endocrinology* 140:1158-1164.
- Bealer SL, Little JG, Metcalf CS, Brewster AL, Anderson AE (2010b) Autonomic and cellular mechanisms mediating detrimental cardiac effects of status epilepticus. *Epilepsy Res* 91:66-73.
- Bosch OJ, Neumann ID (2012) Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: From central release to sites of action. *Horm Behav* 61:293-303.
- Brooks VL, Qi Y, O'Donoghue TL (2005) Increased osmolality of conscious water-deprived rats supports arterial pressure and sympathetic activity via brain action. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R1248-R1255.
- Brusco J, Dall'Oglio A, Rocha LB, Rossi MA, Moreira JE, Rasia-Filho AA (2010) Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial amygdala. *Neurosci Lett.* 483: 152-156.
- Buckley MM, Johns EJ (2011) Impact of L-NAME on the cardiopulmonary reflex in cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301:R1549-1556.
- 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* 360:213-45.
- Campese VM, Amar M, Anjali C, Medhat T, Wurgajt A (1997) Effect of L-arginine on systemic and renal haemodynamics in salt-sensitive patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens* 11:527-532.

- Castro GM (2010) Efeito do óxido nítrico na regulação de parâmetros cardiovasculares pela CVLM em ratos com hipertensão renovascular 2R1C". 109p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- Cerrato BD, Frasca AP, Nakagawa P, Longo-Carbajosa N, Peña C, Höcht C, Gironacci MM (2012) Angiotensin-(1-7) upregulates central nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.*
- Chung L, Moore SD (2007a) Cholecystokinin excites local interneurons in rat basolateral amygdala through CCKB receptors. *Soc Neurosci Abstr* 145.17.
- Chung L, Moore SD (2007b) Cholecystokinin enhances GABAergic inhibitory transmission in basolateral amygdala. *Neuropeptides* 41: 453–463.
- Dall'Ago P, D'Agord Schaan B, da Silva VO, Werner J, da Silva Soares PP, de Angelis K, Irigoyen MC (2007) Parasympathetic dysfunction is associated with baroreflex and chemoreflex impairment in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Auton Neurosci* 131:28-35.
- Dall'Ago P, Fernandes TG, Machado UF, Bello AA, Irigoyen MC (1997) Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 30:119-124.
- Dall'Ago P, Maeda CY, Angelis K, Schann BD, Irigoyen MC (1999) Controle reflexo da pressão arterial no diabetes experimental. *Revista Brasileira de Hipertensão.* 3:255-266
- Dall'Ago P, Silva VO, De Angelis KL, Irigoyen MC, Fazan R, Jr., Salgado HC (2002) Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 35:843-849.
- Dall'Oglio A, Gehlen G, Achaval M, Rasia-Filho AA (2008) Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the "ventral" medial amygdala subnuclei of adult male and female rats. *Neurosci Lett.* 439: 287-92.
- Dalmasso C, Antunes-Rodrigues J, Vivas L, De Luca Jr LA (2015). Mapping brain Fos immunoreactivity in response to water deprivation and partial rehydration: Influence of sodium intake. *Physiol Behav.*15: 1494–1501.

- Dam TV, Escher E, Quirion R (1987) Apparent molecular weight of substance P/neurokinin-1 receptors determined using a photoaffinity labelled probe, [(3'-125I) D-Tyro, (4'-N3)Phe8, Nle11]-substance P. *Biochem Biophys Res Commun* 30;149(1):297-303.
- Dampney R (2004) Medullary pathways regulating sympathetic outflow: the need for more lateral thinking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R446-448.
- Dampney RA (2009) Blood pressure regulation by C1 neurons in the rostral ventrolateral medulla: new light on the subject. *J Physiol* 587:5513.
- Dampney RA, Coleman MJ, Fontes MA, Hirooka Y, Horiuchi J, Li YW, Polson JW, Potts PD, Tagawa T (2002) Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:261-268.
- da Silveira LT, Junta CM, Monesi N, de Oliveira-Pelegrin GR, Passos GA, Rocha MJ (2007). Time course of c-fos, vasopressin and oxytocin mRNA expression in the hypothalamus following long-term dehydration. *Cell Molec Neurobiol* 27: 575–584.
- Davis M (1992a) The role of the amygdala in conditioned fear. In: Aggleton J.P. *The Amygdala* New York: Wiley-Liss:255-306.
- Davis M (1992b) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 15:353- 375.
- Davis M (1992c) The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. *Trends Pharmacol Sci* 13:35-41.
- 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.
- Dayas CV, Buller KM, Day TA (2001) Medullary neurones regulate hypothalamic corticotropin-releasing factor cell responses to an emotional stressor. *Neuroscience* 105:707-719.

- Dayas CV, Buller KM, Day TA (2004) Hypothalamic paraventricular nucleus neurons regulate medullary catecholamine cell responses to restraint stress. *J Comp Neurol* 478:22-34.
- Dayas CV, Day TA (2002) Opposing roles for medial and central amygdala in the initiation of noradrenergic cell responses to a psychological stressor. *Eur J Neurosci* 15:1712- 1718.
- De Angelis KL, Oliveira AR, Dall'Ago P, Peixoto LR, Gadonski G, Lacchini S, Fernandes TG, Irigoyen MC (2000) Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 33:635-641.
- de Castilhos J, Forti CD, Achaval M, Rasia-Filho AA (2008) Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: a Golgi study. *Brain Res* 1240:73-81.
- de Castilhos J, Hermel EE, Rasia-Filho AA, Achaval M (2010) Influence of substitutive ovarian steroids in the nuclear and cell body volumes of neurons in the posterodorsal medial amygdala of adult ovariectomized female rats. *Neurosci Lett* 469:19-23.
- de Castilhos J, Marcuzzo S, Forti CD, Frey RM, Stein D, Achaval M, Rasia-Filho AA (2006) Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. *Brain Res Bull* 69:131-139.
- de Castilhos J, Rigon P, Xavier LL, Rasia-Filho A, Achaval M (2009) Sex differences in NADPH-diaphorase activity in the rat posterodorsal medial amygdala. *Brain Res* 1305:31-39.
- de Olmos JS, Beltramino CA, Alheid G (2004). Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. Elsevier Academic Press, p. 509-603.
- Díaz-Mataix L, Debiec J, LeDoux JE, Doyère V (2011) Sensory-specific associations stored in the lateral amygdala allow for selective alteration of fear memories. *J Neurosci* 31:9538-9543.

- Ebner K, Bosch OJ, Krömer SA, Singewald N, Neumann ID (2005). Release of oxytocin in the rat central amygdala modulates stress-coping behavior and the release of excitatory amino acids. *Neuropsychopharmacol* 30:223-30.
- Everitt B (1995) Limbic lobe and olfactory pathways. In: Berry, M. M., Bannister, L. H., Standring, S. M. *Gray's Anatomy* London, Churchill Livingstone:115-1141.
- Franchini KG, Clemente CF, Marin TM (2009) Focal adhesion kinase signaling in cardiac hypertrophy and failure. *Braz J Med Biol Res* 42:44-52.
- Franchini KG, Krieger EM (1992) Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic-denervated rats. *Am J Physiol* 262:R677-683.
- Franchini KG, Krieger EM (1994) Neurogenic hypertension in the rat, experimental and genetic models of hypertension. In: Ganten, D., Jong, W. *Handbook of Hypertension* 16:472-500.
- Franchini KG, Moreira ED, Ida F, Krieger EM (1996) Alterations in the cardiovascular control by the chemoreflex and the baroreflex in old rats. *Am J Physiol* 270:R310-313.
- Fukumori R, Nishigori Y, Goshima Y, Kubo T (2004) Contribution of the medial amygdaloid nucleus to the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett.* 365: 128-13.
- Galeno TM and Brody MJ (1983) Hemodynamic responses to amygdaloid stimulation in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol* 245:R281-R286
- Ganong WF (2003) Cardiovascular regulatory mechanisms. In: Ganong, W. F. *Review of Medical Physiology* New York: McGraw-Hill Co.:599-613.
- Gaw AJ, Hills DM, Spraggs CF (1995) Characterization of the receptors and mechanisms involved in the cardiovascular actions of sCCK-8 in the pithed rat. *Br. J. Pharmacol.* 115:660–664.
- Griffiths PR, Lolait SJ, Harris LE, Paton JF, O'Carroll AM (2017) Vasopressin V1a receptors mediate the hypertensive effects of [Pry1]apelin-13 in the rat rostral ventrolateral medulla. *J Physiol* 595:3303-3318

- Handelmann GE, Beinfeld MC, O'Donohue TL, Nelson JB, Brenneman DE (1983) Extrahippocampal projections of CCK neurons of the hippocampus and subiculum. *Peptides* 4(3):331-334.
- Hassel B and Dingledine R (2006). Glutamate. In *Basic Neurochemistry: Molecular and Medical Aspects*. 7th ed. Edited by G.J. Siegel, R.W. Albers, S.T. Brady, and D.L. Price. Elsevier Academic Press, New York, N.Y. 23, pp. 267–290.
- Hatam M, Kharazmi F, Nasimi A (2009). Vasopressin and sympathetic systems mediate the cardiovascular effects of the GABAergic system in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neurosci Res.* 65(4): 347-52.
- Hayward NM, Nnode-Ekane XE, Kutchiashvili N, Grohn O, Pitkanen A (2010) Elevated cerebral blood flow and vascular density in the amygdala after status epilepticus in rats. *Neurosci Lett* 484:39-42.
- Herbert H, Moga MM, Saper CB (1990) Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 293:540-580.
- Hoffman PL, Walter R, Bulat M (1977) An enzymatically stable peptide with activity in the central nervous system: its penetration through the blood-CSF barrier. *Brain Res* 122:87-94.
- Horii A, Nakagawa A, Uno A, Kitahara T, Imai T, Nishiike S, Takeda N, Inohara H (2012) Implication of substance P neuronal system in the amygdala as a possible mechanism for hypergravity-induced motion sickness. *Brain Res* 30;1435:91-8.
- Imai Y, Abe K, Sasaki S, Minami N, Munakata M, Yumita S, Nobunaga T, Seiko H, Yoshinaga K (1989) Role of vasopressin in cardiovascular response to central cholinergic stimulation in rats. *Hypertension* 13:549-557.
- Ivy AC, Oldberg E (1928) A hormone mechanism for gall-bladder contraction and evacuation. *Am J Physiol* 86: 599–613.
- Iwata J, Chida K, Ledoux JE (1987) Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses. *Brain Res.* 418, 183-188.

- Jiang X, Chen A, Li H (2005) Histaminergic modulation of excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* 131:691-703.
- Jones NM, Beart PM, Monn JA, Widdop RE (1999) Type I and II metabotropic glutamate receptors mediate depressor and bradycardic actions in the nucleus of the solitary tract of anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 380:129-135.
- Kakinoki H, Ishizawa K, Fukunaga M, Fujii Y, Kamei C (1998) The effects of histamine H3-receptor antagonists on amygdaloid kindled seizures in rats. *Brain Res Bull* 46:461-465.
- Kertes E, László K, Berta B, Lénárd L (2009a) Positive reinforcing effects of substance P in the rat central nucleus of amygdala. *Behav Brain Res* 14;205(1):307-310.
- Kertes E, László K, Berta B, Lénárd L (2009b) Effects of substance P microinjections into the globus pallidus and central nucleus of amygdala on passive avoidance learning in rats. *Behav Brain Res* 198(2):397-403.
- Krieger EM (1964) Neurogenic hypertension in the rat. *Circ Res* 15:511-521.
- Krieger EM (1970) Time course of baroreceptor resetting in acute hypertension. *Am J Physiol* 218:486-490.
- 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.
- Lacka K, Czyzyk A (2008) [Hormones and the cardiovascular system]. *Endokrynol Pol* 59:420-432.
- LeDoux JE (1992a) Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr Opin Neurobiol* 2:191-197.
- LeDoux JE (1992b) Emotion and amygdala. In: Aggleton, J. P. *The Amygdala* Wiley-Liss, New York:255-306.
- Leeyup C, Scott D (2009) Cholecystokinin Excites Interneurons in Rat Basolateral Amygdala. *J Neurophysiol* 102: 272–284.

- Li YW, Dampney RA (1994). Expression of Fos-like protein in brain following sustained hypertension and hypotension in conscious rabbits. *Neuroscience* 1994, 61: 613-634.
- Lohman RJ, Liu L, Morris M, O'Brien TJ (2005). Validation of a method for localised microinjection of drugs into thalamic subregions in rats for epilepsy pharmacological studies. *J Neurosci Methods* 146: 191-197
- Longhurst JC (2008) Neural regulation of the cardiovascular system. In: Squire LR, Blom FE, McConell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ. Burlington, Academic Press Fund Neurosci. 829-853.
- Longhurst JC, Squire LR, Blom FE, McConnel SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ (2003). Neural regulation of the cardiovascular system. *Fundamental Neuroscience*. San Diego Academic Press 935-966.
- Lovick TA (2009) CCK as a modulator of cardiovascular function. *J Chem Neuroanat* 38(3):176-84.
- Malpas SC (2002) Neural influences on cardiovascular variability: possibilities and pitfalls. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H6-20.
- Malpas SC (2010) Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. *Physiol Rev* 90:513-557.
- Malpas SC, Leonard BL, Guild SJ, Ringwood JV, Navakatikyan M, Austin PC, Head GA, Burgess DE (2001) The sympathetic nervous system's role in regulating blood pressure variability. *IEEE Eng Med Biol Mag* 20:17-24.
- Malpas SC, Maling TJ (1990) Heart-rate variability and cardiac autonomic function in diabetes. *Diabetes* 39:1177-1181.
- Malpas SC, Purdie GL (1990) Circadian variation of heart rate variability. *Cardiovasc Res* 24:210-213.
- Marshall JM (1994) Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiol Rev* 74:543-594.

- Matsumura K, Tsuchihashi T, Kagiya S, Abe I, Fujishima M (1999) Subtypes of metabotropic glutamate receptors in the nucleus of the solitary tract of rats. *Brain Res* 842:461-468. 23
- Mecawi AS, Ruginsk SG, Elias LL, Varanda WA, Antunes-Rodrigues, J (2015). Neuroendocrine regulation of hydromineral homeostasis. *Compreh Physiol.* 5: 1465–1516.
- Mc Donald A.J. (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol.* 55: 257-332.
- Mifflin SW (2001) What does the brain know about blood pressure? *News Physiol Sci* 16:266-271.
- Mishima K, Pu F, Kaneko T, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M (2003) Post-ischemic administration [correction of administration] but not pre-ischemic administration [correction of administration] of NG-nitro-L-arginine prevents spatial memory impairments and apoptosis by an inhibition of a delayed increase in NOx- in the hippocampus following repeated cerebral ischemia. *Neuropharmacology* 44:533-540.
- Mogenson GJ and Calaresu FR (1973) Cardiovascular responses to electrical stimulation of the amygdala in the rat. *Exp.Neurol.* 39, 166-180.
- Neckel H, Quagliotto E, Casali KR, Montano N, Dall'Ago P, Rasia-Filho AA. Glutamate and GABA in the medial amygdala induce selective central sympathetic/parasympathetic cardiovascular responses. *Can J Physiol Pharmacol.* 90: 525-536, 2012.
- Ottersen OP, Ben-Ari Y (1979) Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat. I. Projections from the thalamus. *J Comp Neurol.* 187: 401-424.
- Ottersen OP (1980) Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat: II. Afferents from the hypothalamus and the basal telencephalon. *J Comp Neurol.* 194: 267-289.

- Paulis L, Pechanova O, Zicha J, Barta A, Gardlik R, Celec P, Kunes J, Simko F (2010a) Melatonin interactions with blood pressure and vascular function during L-NAME-induced hypertension. *J Pineal Res* 48:102-108.
- Paulis L, Pechanova O, Zicha J, Liskova S, Celec P, Mullerova M, Kollar J, Behuliak M, Kunes J, Adamcova M, Simko F (2010b) Melatonin improves the restoration of endothelium-derived constricting factor signalling and inner diameter in the rat femoral artery after cessation of L-NAME treatment. *J Hypertens* 28 Suppl 1:S19-24.
- Paxinos G, Watson, C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pyner S (2009) Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation. *J Chem Neuroanat* 38:197-208.
- Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res* 38(1-2):247-89
- Pitkänen A (2000) Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: Aggleton JP. *The Amygdala: A Functional Analysis*. Oxford: Oxford University Press. 31-115, 2000.
- Porta A, Tobaldini E, Montano N, Gneccchi-Ruscione T (2007). The strength of QT-RR coupling decreases during graded head-up tilt. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.*2007:5959-62.
- Quagliotto E, Casali KR, Dal Lago P, Rasia-Filho AA (2015). Neuropeptides in the posterodorsal medial amygdala modulate central cardiovascular reflex responses in awake male rats. *Braz J Med Biol Res* 48(2): 128-139.
- Quagliotto E, Neckel H, Casali KR, Montano N, Dal Lago P, Rasia-Filho AA (2012) Glutamate and GABA in the medial amygdala induce selective central sympathetic/parasympathetic cardiovascular responses. *Can J Physiol Pharmacol* 90(5):525-536.
- Quagliotto E, Neckel H, Riveiro DF, Casali KR, Mostarda C, Irigoyen MC, Dall'ago P, Rasia-Filho AA (2008) Histamine in the posterodorsal medial amygdala

modulates cardiovascular reflex responses in awake rats. *Neuroscience* 157:709-719.

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

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

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

Rasia-Filho AA, Hilbig A (2005) Papel da amígdala e do hipocampo no transtorno do estresse pós-traumático. In: Caminha, R. *Transtornos do Estresse Pós-traumático* São Paulo: Casa do Psicólogo:37-53.

Rasia-Filho AA, Londero RG, Achaval M (2000) Functional activities of the amygdala: an overview. *J Psychiatry Neurosci* 25:14-23.

Rasia-Filho AA, Peres TM, Cubilla-Gutierrez FH, Lucion AB (1991) Effect of estradiol implanted in the corticomедial amygdala on the sexual behavior of castrated male rats. *Braz J Med Biol Res* 24:1041-1049.

Rasia-Filho AA, Haas D, de Oliveira AP, de Castilhos J, Frey R, Stein D, Lazzari VM, Back F, Pires GN, Pavesi E, Winkelmann-Duarte EC, Giovenardi M (2012) Morphological and functional features of the sex steroid-responsive posterodorsal medial amygdala of adult rats. *Mini Rev Med Chem*. 12: 1090-106.

Raglan GB, Schmidt LA, Schulkin J (2017) The role of glucocorticoids and corticotropin-releasing hormone regulation on anxiety symptoms and response to treatment. *Endocr.Connect* 6:R1-R7

Regoli D (1987) Peptide receptors in the airways. *Am Rev Respir Dis* 136(6 Pt 2):S35-39.

- Saha S (2005). Role of the central nucleus of the amygdala in the control of the blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32:450-456.
- Saha S and Datta D (2005) Two-way active avoidance training-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein in the dorsal hippocampus, amygdala and hypothalamus. *Eur J Neurosci* 12:3403-14.
- Salgado HC (2002) Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 35:843-849.
- Shirasu M, Takahashi T, Yamamoto T, Itoh K, Sato S, Nakamura H (2011) Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the mesencephalic trigeminal nucleus in rats. *Brain Res* 1400:19-30.
- Simpson K, Parker j, Plumer J, Bloom S (2012) CCK, PYY and PP: the control of energy balance. *Handb Exp Pharmacol* 209: 209-30.
- Spallone V, Menzinger G (1997) Diagnosis of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes. *Diabetes* 46 Suppl 2:S67-76.
- Spyer KM (1994) Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. *J Physiol* 474:1-19.
- Spyer KM, Gourine AV (2009) Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:2603-2610.
- Swanson LW, Petrovich GD (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21:323-331.
- Szczepanska-Sadowska E (2008) Role of neuropeptides in central control of cardiovascular responses to stress. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 8:61-89.
- Thames MD, Dibner-Dunlap ML, Smith ML (1994) Mechanism of arterial baroreflex control. In: Levy MN, Schwartz PJ. *Vagal control of the heart: experimental basis and clinical implications*. Futura Publishing Company, Inc 369-380.
- Tobaldini E, Montano N, Wei SG, Zhang ZH, Francis J, Weiss RM, Casali KR, Felder RB, Porta A (2009a) Autonomic cardiovascular modulation. *IEEE Eng Med Biol Mag* 28:79-85.

- Tobaldini E, Porta A, Wei SG, Zhang ZH, Francis J, Casali KR, Weiss RM, Felder RB, Montano N (2009b) Symbolic analysis detects alterations of cardiac autonomic modulation in congestive heart failure rats. *Auton Neurosci* 150:21-26.
- Toney GM, Chen QH, Cato MJ, Stocker SD (2003) Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand* 177:43-55
- Turner SA, Ganten D (1986) Cardiovascular regulation. In: Lightmann SL, Everitt BJ. *Neuroendocrinology*. London Blackwell Scientific Publications 331-359.
- Vanderhaeghen JJ, Signeau JC, Gepts W (1975) New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigastrin antibodies. *Nature* 257: 604–605.
- Vázquez-León P, Campos-Rodríguez C, Gonzalez-Pliego C, Miranda-Páez A (2018) Differential effects of cholecystokinin (CCK-8) microinjection into the ventrolateral and dorsolateral periaqueductal gray on anxiety models in Wistar rats. *Horm Behav* 106:105-111.
- Vilhena-Franco T, Mecawi AS, Elias LL, Antunes-Rodrigues J. (2016) Oestradiol effects on neuroendocrine responses induced by water deprivation in rats. *J Endocrinol*. 231(2):167-180.
- Wank SA (1995) Cholecystokinin receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 269: G628–G646.
- Yamanaka K, Takagishi M, Kim J, Gouraud SS, Waki H (2017) Bidirectional cardiovascular responses evoked by microstimulation of the amygdala in rats. *J.Physiol Sci* 68:233-242
- Yilmazer-Hanke DM, Roskoden T, Zilles K, Schwegler H (2003) Anxiety-related behavior and densities of glutamate, GABAA, acetylcholine and serotonin receptors in the amygdala of seven inbred mouse strains. *Behav Brain Res* 145:145-159.
- Yogo K, Oki Y, Iino K, Yamashita M, Shibata S, Hayashi C, Sasaki S, Suenaga T, Nakahara D, Nakamura H (2012) Neuropeptide W stimulates adrenocorticotrophic hormone release via corticotrophin-releasing factor but not via arginine vasopressin. *Endocr J*.

Zhang W, Carreno FR, Cunningham JT, Mifflin SW (2009a) Chronic sustained hypoxia enhances both evoked EPSCs and norepinephrine inhibition of glutamatergic afferent inputs in the nucleus of the solitary tract. *J Neurosci* 29:3093-3102.

Zhang W, Mifflin S (2010) Plasticity of GABAergic mechanisms within the nucleus of the solitary tract in hypertension. *Hypertension* 55:201-206.

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

8. ANEXO I

Pareceres de aceitação do CEUA (anexos)



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº:101/12

2) DATA DO PARECER:09/01/13

Parecer 168/13

3) TÍTULO DO PROJETO:

Efeito da microinjeção de serotonina, colecistoquinina, substancia P, vasopressina e L-arginina no núcleo póstero-dorsal da amígdala medial no controle central cardiovascular em ratos.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Prod Dr Alberto Antônio Rasia Filho

5) RESUMO DO PROJETO:

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título Adequado Comentários

Introdução Adequada Comentários

Objetivos Adequados Comentários

Relevância e Justificativa Adequados Comentários
Unificar o numero de animais nas páginas 1º e 13 do projeto.

Materiais e Métodos Adequados Comentários



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B C D E

Justifique:

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório): UFCSPA

Outra instituição. Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
------	---------	------	------------

12) RECOMENDAÇÃO:

- Aprovado
 Com Pendência
 Não aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:

Reencaminhar projeto com as correções conforme carta aos avaliadores de 15/12/12.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 184/16

2) DATA DO PARECER: 567/18

Parecer 567/18

3) TÍTULO DO PROJETO:

Papel do glutamato na amígdala medial póstero-dorsal como modulador das respostas neuroendócrinas à expansão e retração da volemia em ratos

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Alberto Antonio Rasia Filho

5) RESUMO DO PROJETO:

A amígdala medial póstero-dorsal (AMePD) gera resposta neuroendócrina frente a estímulos estressantes, modula comportamentos sociais e promove ajustes homeostáticos no sistema cardiovascular por ação local de diferentes neurotransmissores e neuropeptídeos. O glutamato, principal neurotransmissor excitatório, tem alta expressão em células, axônios de passagem e terminais sinápticos na amígdala medial de ratos. Entretanto, ainda não se sabe sobre o papel específico da AMePD de ratos no controle da função renal para excreção hidroeletrolítica, na modulação da excreção neuroendócrina para controle hemodinâmico sistêmico ou na influência glutamatérgica nesse processamento.

Ratos Wistar adultos serão adaptados e mantidos em gaiolas metabólicas individuais. Inicialmente, serão estudados dois grupos que servirão como **controle geral: 1) controle geral da atividade basal de ingestão hídrica e de diurese e 2) controle geral da secreção basal de ocitocina, vasopressina, peptídeo atrial natriurético e angiotensina II**. Para o modelo de



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

expansão da volemia serão utilizados 18 grupos experimentais. Ao animais serão submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula na AMePD direita como guias para microinjeções centrais de glutamato e salina. Também serão submetidos à canulação vascular via veia jugular externa direita. Serão compostos 2 grupos controle para esse modelo: **1) microinjeção central de salina sem expansão volêmica e 2) microinjeção central de glutamato sem expansão volêmica.** Em um período de 10 min após a microinjeção na AMePD, a expansão da volemia será realizada através da injeção intravenosa de solução hipertônica ou isotônica nos animais. Desta forma serão constituídos 4 grupos: 1) microinjeção de salina e expansão volêmica isotônica; 2) microinjeção de salina e expansão volêmica hipertônica; 3) microinjeção de glutamato e expansão volêmica isotônica e 4) microinjeção de glutamato e expansão volêmica hipertônica. A excreção de sódio e o volume urinário serão dosados e comparados entre os grupos experimentais ao longo das próximas 2h de experimento. **Doze novos grupos de animais serão submetidos aos mesmos procedimentos de cirurgia estereotáxica, canulação de veia jugular externa direita, microinjeção central e expansão da volemia. Entretanto não serão avaliados quanto à excreção urinária, pois serão submetidos à decapitação nos tempos de 5 e 40 min. após a expansão volêmica. Ou seja, o mesmo procedimento descrito para os seis grupos experimentais será feito para estudar os níveis plasmáticos de ocitocina, vasopressina, peptídeo atrial natriurético e angiotensina II em dois momentos diferentes para estabelecer mínimos pontos de referência para o estudo do padrão de secreção hormonal e os valores de excreção urinária.**

No modelo de restrição hídrica serão utilizados 12 grupos de animais estudados em gaiola metabólica. Os procedimentos serão os mesmos da cirurgia estereotáxica, mas não haverá canulação venosa. **Dois grupos servirão como controle: 1) microinjetados com salina sem restrição hídrica de 24h e 2) microinjetados com glutamato sem restrição hídrica de 24h. Dois outros grupos serão mantidos em suas gaiolas metabólicas individuais com livre acesso à comida, porém privados de água 24h antes da microinjeção de salina ou glutamato na ANePD e formarão os grupos: 3) microinjetados com salina para servir como controle e 4) microinjetados com glutamato.** Imediatamente após, os animais receberão água e solução de NaCl em buretas volumétricas separadas e serão avaliados os volumes consumidos aos 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 e 180 min após a microinjeção e a oferta de líquidos. **Oito novos grupos serão submetidos. Por fim, os animais serão decapitados, sangue troncular será coletado e os níveis plasmáticos de ocitocina, vasopressina, peptídeo atrial natriurético e angiotensina II serão mensurados. Cada rato fornecerá plasma para todas as dosagens hormonais e os dados serão comparados entre os grupos experimentais.**

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Estudar a participação da atividade glutamatérgica na AMePD em dois modelos experimentais que envolvem função hemodinâmica, renal e regulação eletrolítica:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

1) em resposta à expansão da volemia (isotônica ou hipertônica) avaliando-se a função renal natriurética e a modulação neuroendócrina da liberação de ocitocina, peptídeo atrial natriurético, vasopressina e angiotensina II induzidas por tal procedimento

2) utilizar o modelo de restrição hídrica de 48h para verificar a participação da AMePD no processo comportamental de ingestão de água e NaCl, além da secreção dos hormônios acima descritos

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título

Adequado

Comentários

Introdução

Adequada

Comentários

Objetivos

Adequados

Comentários

Relevância e Justificativa

Adequados

Comentários

Materiais e Métodos

Adequados

Comentários



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B | C D E

Justifique:

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

O referencial bibliográfico utilizado no planejamento estatístico aponta chance de perda de 50% dos animais ao longo do experimento. Considerando essa informação e partindo do número amostral de 256, calcula-se a necessidade de 384 animais. Ajustar esta informação nos itens 9.2 e 9.4 do formulário unificado.

Substituição de Metodologia:

Sim

Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia:

Sim

Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais:

Adequada

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais:

Adequada

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável):

Adequada

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Anestesia dos animais (se aplicável):

Adequada

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável):

Adequada

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório): Laboratório de Fisiologia UFCSPA e Laboratório de Fisiologia USP – Ribeirão Preto

Outra instituição. Qual? Universidade de São Paulo (USP) – Ribeirão Preto

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
	Ratos Wistar	Machos	512

12) RECOMENDAÇÃO:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Aprovado

Com Pendência

Não aprovado

Data de início: jun/2017 Data do término: nov/2018

Comentários gerais sobre o projeto: