



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

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DE FILAMENTOS
INTERMEDIÁRIOS ASTROCITÁRIOS DE SUBNÚCLEOS DA
AMÍGDALA MEDIAL SOB AÇÃO DE HORMÔNIOS
GONADAIS EM RATOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO
PÓS-NATAL E EM RATAS ADULTAS**

Flávia Gomes Martinez

Porto Alegre

2007



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

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DE FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS
ASTROCITÁRIOS DE SUBNÚCLEOS DA AMÍGDALA MEDIAL SOB AÇÃO DE
HORMÔNIOS GONADAIS EM RATOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-
NATAL E EM RATAS ADULTAS**

Flávia Gomes Martinez

Orientadora: Profa. Dra. Matilde Achaval Elena

Co-orientador: Prof. Dr. Alberto A. Rasia Filho

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

Porto Alegre

2007

Este trabalho é humildemente dedicado à minha
família: meus amados pais e irmãos,
à UFRGS e
ao Cody, meu amor e companheiro de vida.

“Desvendar os enigmas da vida:
busca intrigante, prazerosa e
infinita”.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Matilde Achaval Elena, meu carinho e reconhecimento por sua confiança, apoio, amizade, exemplo de dedicação à ciência e obstinação em tudo o que faz. Sua disponibilidade alia-se ao entusiasmo em aprender e ensinar. És um exemplo muito importante na minha formação! Obrigada por sua amizade e ensinamentos de vida.

À toda a minha amadíssima família, por me apoiarem em todas as minhas escolhas; por seu amor incondicional, compreensão, ensinamentos, estímulo e dedicação incansável, desde o dia em que fui concebida.

Ao Cody, meu companheiro, obrigada por tudo! Pelo amor, apoio, companhia e pela tua amorosa paciência de sempre...obrigada pela tua parte na nossa história...te amo muito!

Ao Prof. Dr. Alberto Antonio Rasia-Filho pelas idéias e orientação. Obrigada também pelo exemplo de competência profissional e acadêmica.

À Prof. Dra. Maria Cristina Faccioni-Heuser pelo apoio e amizade. A todos os professores PPG Neurociências, muito obrigada pelos ensinamentos e disponibilidade; pelo excelente nível em que elevam este PPG; pela competência e seriedade refletida nos seminários, aulas e eventos. Obrigada pela imensa paciência e confiança da Comissão do PPG Neurociências.

Aos colegas do laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS, os “da antiga”: Erica Hermel (Errica, valeram todos os SOS durante o curso, idas a congressos e tudo o mais!), Léder Xavier (Lédi, obrigada pelos ensinamentos regados a risadas, obrigada por tua parceria a qualquer hora), as queridíssimas Cláudia Puperi e Aline Pagnussat, (Gurias: muito obrigada por fazerem do terceiro experimento uma lembrança pra toda a vida... foi demais! Aline: te agradeço muuuuito mesmo pela tua doce companhia e pela tua ajuda imprescindível!), Maria Isabel de Ugalde Rocha (Bebel, obrigada pelos teus valiosos ensinamentos femininos e momentos ótimos), Giordano Viola (Giorgi, sem palavras, adorei conviver contigo, parceiro “Djisus”!), Paula Santos, (Paulinha, foste um exemplo na arte de ensinar, obrigada pela disponibilidade e

dedicação); Paula Rigon, (Suuuuuper Paula, exemplo de mulher batalhadora e vencedora), Alessandra Swarowsky, (Ale, teu escracho divertidíssimo no dia-a-dia é insubstituível!), obrigada também a Juliana de Castilhos, Claudia Forti, Aline Dall'Oglio e aos colegas “da nova fase”: Jocemar Ilha (Joce), Patrícia Nascimento, Simone Marcuzzo, Leonardo Tartaruga, Gisele Lovatel, Rafaela Trois, Márcio Dutra e Pedro Gaspar, *gracias* pelo carinho e disponibilidade!

Aos funcionários do ICBS UFRGS, especialmente a Antonio G. Severino pelas sugestões, colaboração e bons momentos no laboratório. Às secretárias do PPG Neuro, Maria e Andréia. Obrigada também ao pessoal do Biotério da UFRGS pela boa vontade e colaboração, sobretudo no experimento dos filhotes. Valeu Dona Geni!

Ao pessoal da Acquaticus, todos queridos amigos e colegas que muito “seguraram a bronca” durante as minhas ausências necessárias... Lipe, Maristela, Ângela, Vã, Vivi, Lisi, Cris, Lili, Fê, Simone, Miúdo, Michel, Dani A., Dani K., Cyrio, Tatá, Alemão, Mari, Guilherme, Emerson e Peterson, a todos, muito obrigada meeesmo! Especialmente à Carol, amiga, colega e enteada, obrigada pela disponibilidade e ajuda de sempre.

Aos amigos com quem sempre aprendo: Zaro, Jeffe, Kruel, Dilmar, Bahia, Ivan, De Paula, e com quem muito brindei a curiosidade científica...

A todos os pacientes a quem atendi ao longo da minha jornada, os quais, com seu exemplo e história de vida, me ensinaram muitos dos valores que realmente valem à pena na minha vida. Vocês foram o maior estímulo e incentivo à busca de respostas e alternativas para melhor compreendê-los e reabilitá-los.

A todos, que de uma forma ou de outra contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

Ao CNPq e à CAPES pelo financiamento de minha tese.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XV
RESUMO	XVI
TRACT	XIX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais.....	2
1.2 Amígdala: conceito, localização e funções.....	4
1.2.1 Amígdala medial.....	6
1.2.1.1 Subnúcleos da MeA.....	12
1.2.1.2 Conexões da MeA.....	13
1.3 Hormônios gonadais: ciclo estral, dimorfismo sexual e desenvolvimento.....	18
1.3.1 Neurodiferenciação.....	20
1.3.2 Ciclo estral.....	22
1.3.3 Dimorfismo sexual nos subnúcleos da MeA.....	25
1.4 Astrócitos: estrutura, funções, interações e plasticidade.....	29
2. OBJETIVOS	44
3. MATERIAL e MÉTODOS	46
3.1 Animais.....	47
3.2 Experimento 1: Detecção da GFAP-ir durante o ciclo estral.....	47
3.2.1 Avaliação do ciclo estral.....	47
3.2.2 Procedimento imunistoquímico para GFAP.....	48
3.2.3 Aquisição dos dados.....	50
3.2.4 Análise estatística.....	51
3.3 Experimento 2: Detecção da GFAP-ir em ratas ovariectomizadas e tratadas com hormônios ovarianos.....	52
3.3.1 Procedimento cirúrgico.....	52
3.3.2 Análise estatística.....	55
3.4 Experimento 3: Detecção da GFAP-ir e VIM-ir de machos e fêmeas em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal.....	55
3.4.1 Procedimento imunistoquímico para GFAP e VIM.....	56
3.4.2 Aquisição dos dados.....	56

3.4.3 Análise estatística.....	57
4. RESULTADOS.....	58
4.1 Experimento 1 e 2: <i>Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats.....</i>	<i>59</i>
4.2 Experimento 3: <i>An immunohistochemical analysis of two astrocytic intermediate filaments in different ages of rats postnatal development: sexual dimorphism in medial amygdala subnuclei.....</i>	<i>70</i>
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	113
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AOB	Bulbo olfatório acessório
AOS	Sistema olfativo acessório
BFGF	Fator de crescimento fibroblástico
BNST	Núcleo próprio da estria terminal
BE	Benzoato de estradiol
CCK	Colecistoquinina
CF	Corante fluorescente
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E	Estrogênio
ECM	Mediadores extra-celulares de adesão
FAK	Quinase de adesão focal
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD	Glutamato descarboxilase
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HHG	Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal
IgG	Imunoglobulina G
IF	Filamento intermediário
IFAP	Proteína associada a filamento intermediário
IGF-I	Fator de crescimento similar à insulina
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
Ir	Imunorreatividade
LH	Hormônio luteinizante
LHRH	Hormônio liberador de hormônio luteinizante

MAP	Proteína ligante associada a microtúbulo
MeA	Amígdala medial
MeAD	Subnúcleo ântero-dorsal da amígdala medial
MeAV	Subnúcleo ântero-ventral da amígdala medial
MePD	Subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial
MePDi	Porção intermediária do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial
MePDI	Porção lateral do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial
MePDM	Porção medial do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial
MePV	Subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial
NSF	Fator protéico envolvido na exocitose
OC	Ocitocina
OD	Densidade óptica
OC-R	Receptor de ocitocina
OT	Trato óptico
OVX	Ovariectomia
P	Progesterona
PBS	Tampão fosfato salino
PG	Prostaglandina vasodilatadora
PN1	Primeiro dia pós-natal
PN5	Quinto dia pós-natal
PN11	Décimo primeiro dia pós-natal
PN21	Vigésimo primeiro dia pós-natal
PN31	Trigésimo primeiro dia pós-natal
PN45	Quadragesimo quinto dia pós-natal
PVN	Núcleo paraventricular hipotalâmico
PRL	Prolactina
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SNC	Sistema nervoso central
SNARE	Receptor para SNAP - proteína solúvel acessória do NSF
SON	Núcleo supra-óptico hipotalâmico
st	Estria terminal
TGF	Fator de crescimento transformador

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1 Diagrama da amígdala do rato apresentando subdivisões anatômicas e componentes principais (ALHEID et al., 1995; modificado por RASIA-FILHO et al., 2000)..... 8
- Figura 2 Representação esquemática do MeA de rato com seus quatro subnúcleos: ântero-dorsal (azul), ântero-ventral (verde), pósterodorsal (vermelho) e pósteroventral (amarelo). O asterisco localiza o trato óptico e os números à direita correspondem à distância posterior ao bregma (PAXINOS; WATSON, 1997; modificada por HERMEL, 2005).....11
- Figura 3 Concentrações plasmáticas de progesterona (P), prolactina (PRL), estradiol, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) obtidas em intervalos de 2 horas nas quatro fases do ciclo estral da rata. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo diário claro-escuro (SMITH et al., 1975).....24
- Figura 4 Mecanismos genômicos e neuronais da influência de hormônios sobre o reconhecimento social. Estrogênios produzidos nos ovários circulam no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), onde se ligam aos ER- β e estimulam a transcrição da ocitocina (OC). OC é transportada para a amígdala. Enquanto isso, estrogênios circulam na amígdala, onde se ligam a ER- α , estimulando a transcrição do receptor OC (OC-R). OC, operando nos OC-R da amígdala, promove o reconhecimento social. Em camundongos, animais altamente olfativos, a sinalização olfativa ao longo dos sistemas olfatórios principal e acessório provém estímulos para a amígdala, pela qual o camundongo reage, utilizando o sistema OC/OC-R, influenciado pelo estrogênio (adaptado de CHOLERIS; GUSTAFSSON, 2003).....26
- Figura 5 Esquema dos principais tipos de células astrogliais e endoteliais e sua localização em diferentes camadas/regiões teciduais especializadas do sistema nervoso central. I: tanócitos (a: pial; b: vascular); II: astrócito radial (célula glial de Bergmann); III: astrócito marginal; IV: astrócito protoplasmático; V: astrócito velado; VI: astrócito fibroso; VII: astrócito perivascular; VIII: astrócito interlaminar; IX: astrócito/glioblasto imaturo; X: endoteliócito; XI: célula do plexo coróide (KETENMANN; RANSOM, 2005).....31
- Figura 6 A. Modelo esquemático de interações entre GFAP e a proteína associada a IFs (IFAP), ou plectina. Plectina liga o altamente conservado domínio *rod* de GFAP à membrana nuclear via interações com a lamina nuclear B e à membrana plasmática via possíveis interações com o sistema microfilamentoso de actina. A plectina pode também desempenhar um importante papel pela

ligação a outras proteínas citoesqueléticas como os microtúbulos. **B.** Modelo de interações citoesqueleto-matriz. Neste modelo, filamentos gliais ligam o espaço citoplasmático entre as membranas nuclear e plasmática, atuando como um suporte, no qual outras moléculas, como os microfilamentos plectina e actina podem se fixar. Os microfilamentos actina são ligados com um número de proteínas actina-ligantes como vinculina, paxilina, α -actinina e talina. Estas proteínas actina-ligantes estão intimamente associadas com integrinas ao nível da membrana plasmática e sítios de adesão focal. Por adesões focais, o citoesqueleto é acoplado a substratos de mediadores extra-celulares de adesão (ECM) tais como a fibronectina, conhecida integrina-ligante. Ligantes de fibroconectina a integrinas levam a ativação da quinase de adesão focal (FAK), que fosforila proteínas-chave capazes de regular a morfologia celular regional. Cdc é uma das várias quinases capazes de despolimerizar GFAP conhecidas fosforilações na região da cabeça da molécula. Proteínas ligantes associadas a microtúbulos (MAP) podem ligar a plectina (RUTKA et al., 1997).....35

Figura 7

Visão tridimensional da organização de astrócitos em domínios anatômicos separados. Um grupo de astrócitos protoplasmáticos corados, da camada molecular da CA1 do hipocampo foi examinado por meio de células limitantes, com diferentes corantes fluorescentes (CF; Alexa 468, CF verde e Alexa 488, CF vermelho) por microinjeção. A discreta região de interação dos finos processos terminais foi revelada pelo amarelo, primeiramente esboçando levemente como imagens (utilizando um filtro normal) e então remapeando a cor da área resultante de sobreposição para destacar o amarelo. Isto mostra onde os finos processos terminais dos astrócitos divisórios estão intimamente próximos um ao outro, apesar de não haver sobreposição de fato. Uma fronteira de cada astrócito tem uma superfície distinta que limita astrócitos circunjacentes. Os processos finos e longos que se estendem de cada célula, apresentados nesta figura, são o sifão dos processos dos astrócitos, os quais terminam em superfícies podais que se alinham ao vaso sanguíneo adjacente. (BUSHONG et al., 2002).....39

Figura 8

Astrócitos acoplados aumentam o fluxo sanguíneo local para a atividade neuronal. Pelo envio de processos especializados para arteríolas (pés terminais astrocitários) e para sinapses glutamatérgicas, astrócitos corticais formam uma ligação anatômica entre neurônios e suporte vascular. Durante a atividade neuronal, glutamato transborda de sinapses glutamatérgicas, e, por meio de ativação de receptores metabotrópicos de glutamato, libera uma onda de cálcio astrocitária. Como a onda de cálcio invade um pé terminal astrocitário, Ca^{2+} estimula a fosfolipase A2 para produzir ácido araquidônico (AA). O AA é metabolizado pela ciclooxigenase, COX-1, em uma prostaglandina vasodilatadora (PG). A vasodilatação coordenada é facilitada pela produção de IP_3 induzida por Ca^{2+} , o qual passa ao longo de junções *gap* para liberar ondas de cálcio sincronizadas e produção de PG na vizinhança dos pés terminais. Para simplificação, PG é representada como um indutor de vasodilatação pela ação de pericitos que circundam a arteríola. Todavia, o sítio de ação da PG é desconhecido e existem outros tipos de células associadas a arteríolas (TAKANO et al., 2006).....40

ARTIGO 1

- Figura 1 (A, B, C) Digitized images of GFAP-ir in the medial amygdala (MeA) subnuclei of female rats in the different phases of the estrous cycle. On the right, there is a schematic representation (modified from Paxinos and Watson, 1998) showing coronal brain sections through different subnuclei of the medial amygdala (A=MeAD; B=MePD; C=MePV). Note the higher expression of the GFAP-ir in the proestrus phase. (A', B', C') Digitized images at higher magnification from the same regions (A, B, C) showing GFAP-ir astrocytes. OT, optic tract; ST, stria terminalis; D, dorsal; L, lateral; M, medial; V, ventral. A, B, C scale bars = 50 μ m; A', B', C' scale bars = 200 μ m.....62
- Figura 2 (A, B, C) Digitized images of GFAP-ir in the medial amygdala (MeA) subnuclei of ovariectomized females treated with vehicle, estradiol benzoate (EB) or estradiol benzoate plus progesterone (EB + P). On the right, there is a schematic representation (modified from Paxinos and Watson, 1998) showing coronal brain sections through different subnuclei of the medial amygdala (A=MeAD; B=MePD; C=MePV). Note the higher GFAP immunoreactivity in the MePD and MePV after EB or EB + P treatments compared to vehicle. (A', B', C') Digitized images at higher magnification from the same regions (A, B, C) showing GFAP-ir astrocytes. OT, optic tract; ST, stria terminalis; D, dorsal; L, lateral; M, medial; V, ventral. A, B, C scale bars = 50 μ m; A', B', C' scale bars = 200 μ m.....63
- Figura 3 Optical density measurements (mean \pm SEM) of GFAP immunoreactivity. (A) measurements done in four phases of estrous cycle. (B) Measurements done in the anterodorsal (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) medial amygdala subnuclei. There was a significant difference when the proestrus data were compared with diestrus, estrus and metaestrus (a: $P < 0.02$ in panel A) and when data from the MePD were compared with the MeAD (b: $P < 0.001$ in panel B) and to the MePV (c: $P < 0.02$ in panel B), and MePV were compared with MeAD (d: $P < 0.001$ in panel B).....64
- Figura 4 Optical density measurements (mean \pm SEM) of GFAP-ir in the anterodorsal (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) medial amygdala of ovariectomized females that received vehicle (V), estradiol benzoate (EB) or estradiol benzoate plus progesterone (EB+P). (a) Significantly different when compared with vehicle ($P < 0.001$). (b) Significantly different when compared to females treated with EB ($P < 0.02$). (c) Significantly different when compared with the vehicle data from the MeAD ($P < 0.002$). (d) Significantly different when compared with EB or EB+P data from the MeAD ($P < 0.001$).....64

ARTIGO 2

- Figura 1** Representative photomicrographs of vimentin immunoreactivity (VIM-ir) in anterodorsal medial amygdala (MeAD), posterodorsal medial amygdala (MePD), and posteroventral medial amygdala (MePV) of male and female rats along the different postnatal (PN) developmental days (1, 5, 11, 21, 31 and 45). Top: MeAD. Middle: MePD. Botton: MePV. Note the higher VIM-ir expression at PN1 and at PN5 (radial glia) and a less intense VIM-ir at PN21, at PN31 and at PN45 in both sexes. Schematic representations of the studied areas are presented on the right, based on schematic coronal diagrams from Paxinos and Watson (1998). OT: optic tract; st: stria terminal. For each region studied and in each sex, the first lines are topographic pictures (scale bars=200 μm) and the second lines are higher magnification images (scale bars=50 μm).....108
- Figura 2** Representative photomicrographs of GFAP immunoreactivity (GFAP-ir) in anterodorsal medial amygdala (MeAD), posterodorsal medial amygdala (MePD), and posteroventral medial amygdala (MePV) of male and female rats along the different postnatal (PN) developmental days (1, 5, 11, 21, 31 and 45). Top: MeAD. Middle: MePD. Botton: MePV. Note the higher GFAP-ir expression at PN1 (radial glia), less intense GFAP-ir at PN5, at PN11 and its increase at PN45 owards in both sexes. Schematic representations of the studied areas are presented on the right, based on schematic coronal diagrams from Paxinos and Watson (1998). OT: optic tract; st: stria terminal. For each region studied and in each sex, the first lines are topographic pictures (scale bars=200 μm) and the second lines are higher magnification images (scale bars=50 μm).....109
- Figura 3** Relative optical density measurements (mean \pm SEM) of VIM-ir in the anterodorsal (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) medial amygdala of males and females rats in the different postnatal ages (PN) 1 (PN1), 5 (PN5), 11 (PN11), 21 (PN21), 31 (PN31) and 45 (PN45). * significantly different when compared with the same region of the females (PN1 and PN21) or males (PN5) ($p < 0.001$).....110
- Figura 4** **A:** Relative optical density measurements (mean \pm SEM) of GFAP-ir (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) medial amygdala of males and females rats in different postnatal ages (PN) 1 (PN1), 5 (PN5), 11 (PN11), 21 (PN21), 31 (PN31) and 45 (PN45). * Significantly different when compared with the MeAD at PN1, and when compared with MeAD at PN5 ($p < 0.001$). ** Significantly different when compared with MeAD and MePV at PN45 ($p < 0.001$). **B:** Relative optical density measurements (mean \pm SEM) of GFAP-ir in the anterodorsal (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) medial amygdala of males and females rats in the different postnatal ages (PN) 1 (PN1), 5 (PN5), 11 (PN11), 21 (PN21), 31 (PN31) and 45 (PN45). * Significantly different when compared with females in the MePV ($p < 0.001$). **C:** Relative optical density measurements (mean \pm SEM) of GFAP-ir in the anterodorsal (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) medial amygdala in the different postnatal ages (PN) 1 (PN1), 5 (PN5), 11 (PN11), 21 (PN21), 31 (PN31) and 45 (PN45). *

Significantly different when compared with females at PN1 ($p < 0.001$) and when compared with males at PN45 ($p < 0.001$).....111

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

- Tabela 1 Aferências intra- e extra-amigdalianas para os diferentes subnúcleos da amígdala medial (HERMEL, 2005, conforme PITKÄNEN, 2000).....15
- Tabela 2 Tabela 2. Eferências intra- e extra-amigdalianas dos diferentes subnúcleos da amígdala medial de ratos (HERMEL, 2005, conforme CANTERAS et al., 1995).....16

RESUMO

A amígdala medial (MeA) é uma área sexualmente dimórfica que modula atividades neuroendócrinas e comportamentais e onde hormônios desempenham um importante papel na plasticidade neuro-glial e sináptica. Filamentos intermediários, como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e a vimentina (VIM) são eficientes marcadores do citoesqueleto de astrócitos e sofrem modificações sob ação de hormônios gonadais. Os objetivos do presente estudo foram mensurar e estudar pela densitometria óptica a imunorreatividade dos filamentos intermediários e marcadores astrocitários GFAP e VIM (GFAP-ir; VIM-ir) nos três subnúcleos da amígdala medial, ântero-dorsal (MeAD), pósterodorsal (MePD) e pósteroventral (MePV), de ratos machos e fêmeas durante o desenvolvimento pós-natal. Além disso, também foi investigada a GFAP-ir nas mesmas regiões de fêmeas adultas, tanto em condições fisiológicas de variação hormonal (ao longo do ciclo estral), como em situações suprafisiológicas (reposição hormonal após ovariectomia). Três experimentos foram realizados: o primeiro utilizou ratas Wistar nulíparas adultas durante as fases do ciclo estral (diestro, proestro, estro e metaestro; n = 20) para revelar diferenças provocadas pelos hormônios gonadais femininos na composição astrocitária dos subnúcleos da MeA. No segundo experimento, utilizaram-se fêmeas adultas nulíparas submetidas à ovariectomia (OVX) (n = 18) e tratadas com substituição hormonal de benzoato de estradiol adicionado ou não à progesterona. No terceiro experimento foram utilizados ratos machos e fêmeas durante o desenvolvimento pós-natal (n = 72), cujas idades foram: 1 dia pós-natal (PN1), 5, (PN5), 11 (PN11), 21 (PN21), 31 (PN31) e 45 (PN45). Todos os animais foram fixados por perfusão transcardíaca e seus encéfalos foram removidos, pós-fixados e processados para técnica de imunistoquímica do anticorpo não marcado. Os dados foram comparados entre os grupos por meio de um teste de análise da variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas,

sendo aplicados testes *post-hoc* Tukey-Kramer. Além disso, ratas em proestro apresentaram maior GFAP-ir do que nas outras fases do ciclo estral (diestro, estro e metaestro; $P < 0,02$). GFAP-ir é maior no MePD do que no MePV ou no MeAD ($P < 0,02$). Em fêmeas ovariectomizadas, injeções de estradiol adicionado ou não à progesterona provocaram aumento da GFAP-ir no MePD e no MePV ($P < 0,001$), mas não no MeAD ($P > 0,3$). Esses achados sugerem que a GFAP astrocitária pode ser afetada tanto por níveis fisiológicos de hormônios ovarianos quanto por manipulação hormonal destes esteróides, o que pode contribuir para a plasticidade neuro-glial relacionada a atividades locais e integradas destas áreas encefálicas em fêmeas. Ratos em desenvolvimento apresentam dimorfismo sexual nos subnúcleos da MeA investigados. VIM é substituída por GFAP ao longo do desenvolvimento pós-natal. Houve diferença entre os sexos na VIM-ir em PN1, sendo que machos apresentaram maior VIM-ir no MeAD ($P = 0,001$) e no MePV, ($P < 0,0001$); em PN5, no MePD, com fêmeas apresentando maior VIM-ir ($P < 0,0001$); e, em PN21, em todos os três subnúcleos estudados, machos apresentaram maior VIM-ir (MeAD, $P = 0,009$; MePD, $P < 0,001$; e, MePV, $P = 0,012$). A comparação dos dados de GFAP-ir também apresentou diferenças significativas. A interação entre sexo e idade demonstrou que há dimorfismo sexual em PN1 (machos com maior GFAP-ir; $P < 0,001$) e em PN45 (fêmeas com maior GFAP-ir; $P = 0,033$). Quanto à interação de sexo e subregiões da MeA, houve diferença estatística no MePV, onde machos apresentaram maior GFAP-ir ($P < 0,001$). Já quanto à interação das idades e subregiões da MeA, houve diferenças entre as áreas estudadas em PN1 (MePV $>$ MeAD e MePD; $P < 0,001$), em PN5 (MePV $>$ MeAD; $P < 0,003$), e em PN45 (MePD $>$ MeAD e MePV; $P < 0,001$). Esses achados permitem concluir que o dimorfismo sexual da MeA está presente ainda em fases iniciais do desenvolvimento do SN de ratos, apresentando particularidades subregionais nesta estrutura. Além disso, as diferenças de composição astrocitárias encontradas nas subregiões estudadas da MeA, ao longo do

desenvolvimento, provavelmente se relacionam com a interação neurônio-glia em consonância com aspectos comportamentais e ajustes neuroendócrinos pertinentes a cada sexo, e a cada fase de diferenciação do sistema nervoso.

ABSTRACT

The medial amygdala (MeA) is a sexually dimorphic area that modulates neuroendocrinol and behavioral activities and where gonadal hormones play an important role in neuron-gial and synaptic plasticity. Intermediate filaments, like the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (VIM) are efficient markers of astrocytic cytoskeleton and are modified by gonadal hormones. The present study aimed to measure and study the optic densitometry of immunoreactivity in intermediate filaments and astrocytic markers GFAP and VIM (GFAP-ir; VIM-ir) in the three subnuclei; anterodorsal (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) of the medial amygdala, of male and female rats during postnatal development. Moreover, the GFAP-ir in the same regions of adult females were also studied, in physiological conditions (across the estrous cycle), and by ovariectomy followed by ovarian hormone treatment. Three experiments were performed: the first used adult virgin females across the different phases of estrous cycle, diestrus, proestrus, estrus and metaestrus (n=20) in order to reveal any ovarian hormone induced alterations to astrocytic morphology in the MeA subnuclei. The second experiment used ovariectomized adult virgin (OVX) females (n=18) that received hormonal substitution with estradiol benzoate alone or plus progesterone. The third experiment used male and female Wistar rats (n=72) at different stages of postnatal development; postnatal day 1 (PN1), PN5, PN11, PN21, PN31 and PN45. All the animals were fixed by transcardiac perfusion and had their brains removed, post-fixed and processed following the unlabeled antibody procedure. The data were compared by two-way ANOVA for repeated measures and by the post-*hoc* Tukey-Kramer and t tests. The results show that the structural characteristics of GFAP-ir astrocytes in the MeA subnuclei are similar to those of other areas of the brain. Also, females in proestrus phase show higher GFAP-ir than the other phases of estrous cycle (diestrus, estrus and metaestrus) ($P < 0.02$). GFAP-ir is higher in the MePD than in either the MePV or MeAD ($P < 0.02$). In ovariectomized females,

injections of estradiol alone or combined with progesterone led to an increase in GFAP-ir in both the MePD and MePV ($P < 0.001$), but not in the MeAD ($P > 0.3$), when compared to the control group data. These findings suggest that astrocytic GFAP may be affected by physiologic levels of ovarian hormones as well as by hormonal manipulation of these steroids, which may contribute to the neural plasticity related to local and integrated activities of these areas in the female rat brain. Developing rats showed sexual dimorphism in the investigated subnuclei of the MeA. VIM is apparently substituted by GFAP during postnatal development. In relation to VIM-ir, differences were found between the sexes: at PN1, males showed higher VIM-ir in the MeAD ($P = 0.001$) and in the MePV ($P < 0.0001$); at PN5, females showed higher VIM-ir in the MePD, ($P < 0.0001$); and, at PN21, in all studied subnuclei, males showed higher VIM-ir in the (MeAD, $P = 0.009$; MePD, $P < 0.001$ and MePV, $P = 0.012$). Significant differences were also found in relation to the GFAP-ir data. The interaction between sex and age showed that there is sexual dimorphism at PN1 (males with higher GFAP-ir; $P < 0.001$) and at PN45 (females with higher GFAP-ir; $P = 0.033$). The interaction between sex and the MeA subregions showed a significant difference in the MePV, where males showed higher GFAP-ir ($P < 0.001$). With regard the interaction between age and the MeA subregions there were differences at PN1 (MePV>MeAD and MePD; $P < 0.001$), at PN5 (MePV>MeAD; ($P < 0.003$), and at PN45 (MePD>MeAD and MePV; $P < 0.001$ in both sexes). These findings suggest the presence of sexual dimorphism in the MeA at early developmental phases of rat nervous system, exhibiting regional particularities in the MeA. Moreover, the morphological differences found in the astrocytes from the studied MeA subnuclei across the development are probably related to the neuron-glia interaction, in accordance with behavioral aspects and neuroendocrine adjustments pertinent to each sex, and each phase of differentiation of the nervous system.

TRABALHOS EFETUADOS

A presente tese de doutorado permitiu a apresentação dos seguintes trabalhos:

- 1) Resumo publicado, trabalho no prelo ou submetidos para publicação

MARTINEZ, F.G.; ERMEL, E.E.S.; VIOLA, G.G.; XAVIER, L.L.; RIBOLDI, J.; RASIA-FILHO, A.A.; ACHAVAL, M. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats, *Brain Research*, v. 1108: 117-126, 2006

MARTINEZ, F.G; PAGNUSSAT, A.; PUPERI, C.; UGALDE, M.I.; XAVIER, L.L., RIBOLDI, J., RASIA-FILHO, A.A., ACHAVAL, M., An immunohistochemical analysis of two astrocytic intermediate filament immunoreactivity in different ages of rats postnatal development: sexual dimorphism in medial amygdala subnuclei, em vias de ser submetido.

- 2) Apresentação em Congressos:

- a. no exterior:

MARTINEZ, F. G.; PEYRÉ-TARTARUGA, L. A.; HERMEL, E. E. S.; XAVIER, L. L.; RASIA-FILHO, A. A. ; ACHAVAL, M. *Intermediate filament expression in the medial amygdala subnuclei during postnatal development of male and female rats In: 5th Forum of European Neuroscience, FENS 2006, Viena - AU, 2006.*

MARTINEZ, F. G.; HERMEL, E. E. S.; XAVIER, L. L.; VIOLA, G. G.; CASTILHOS, J.; A, RASIA-FILHO, A. A.; ACHAVAL, M. *Effects of gonadal hormones on glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei of female rats. In: 4th Forum of European Neuroscience, FENS 2004, Lisboa - PT, 2004.*

HERMEL, E.E.S.; MARTINEZ, F. G.; XAVIER, L. L ; VIOLA, G. G. ; SANTOS, P. C.; A., RASIA-FILHO, A. ; ACHAVAL, M. *GFAP-Immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei of female rats during estrous cycle. In: 4th Forum of European Neuroscience, FENS 2004, Lisboa - PT, 2004.*

b. no Brasil:

MARTINEZ, F. G.; HERMEL, E. E. S.; VIOLA, G. G.; CASTILHOS, J.; XAVIER, L. L.; RASIA-FILHO, A. A.; ACHAVAL, M. Imunorreatividade da GFAP na amígdala medial (AMe) de ratas submetidas a ovariectomia com terapia hormonal substitutiva. Em: XIX Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE 2004, Águas de Lindóia - SP, 2004.

MARTINEZ, F. G.; HERMEL, E. E. S.; VIOLA, G. G.; CASTILHOS, J.; XAVIER, L. L.; RASIA-FILHO, A. A.; ACHAVAL, M. Imunorreatividade da GFAP na amígdala medial (AMe) de ratas submetidas a ovariectomia com terapia hormonal substitutiva. Em: Neurobiologia da Glia, Porto Alegre - RS, 2003.

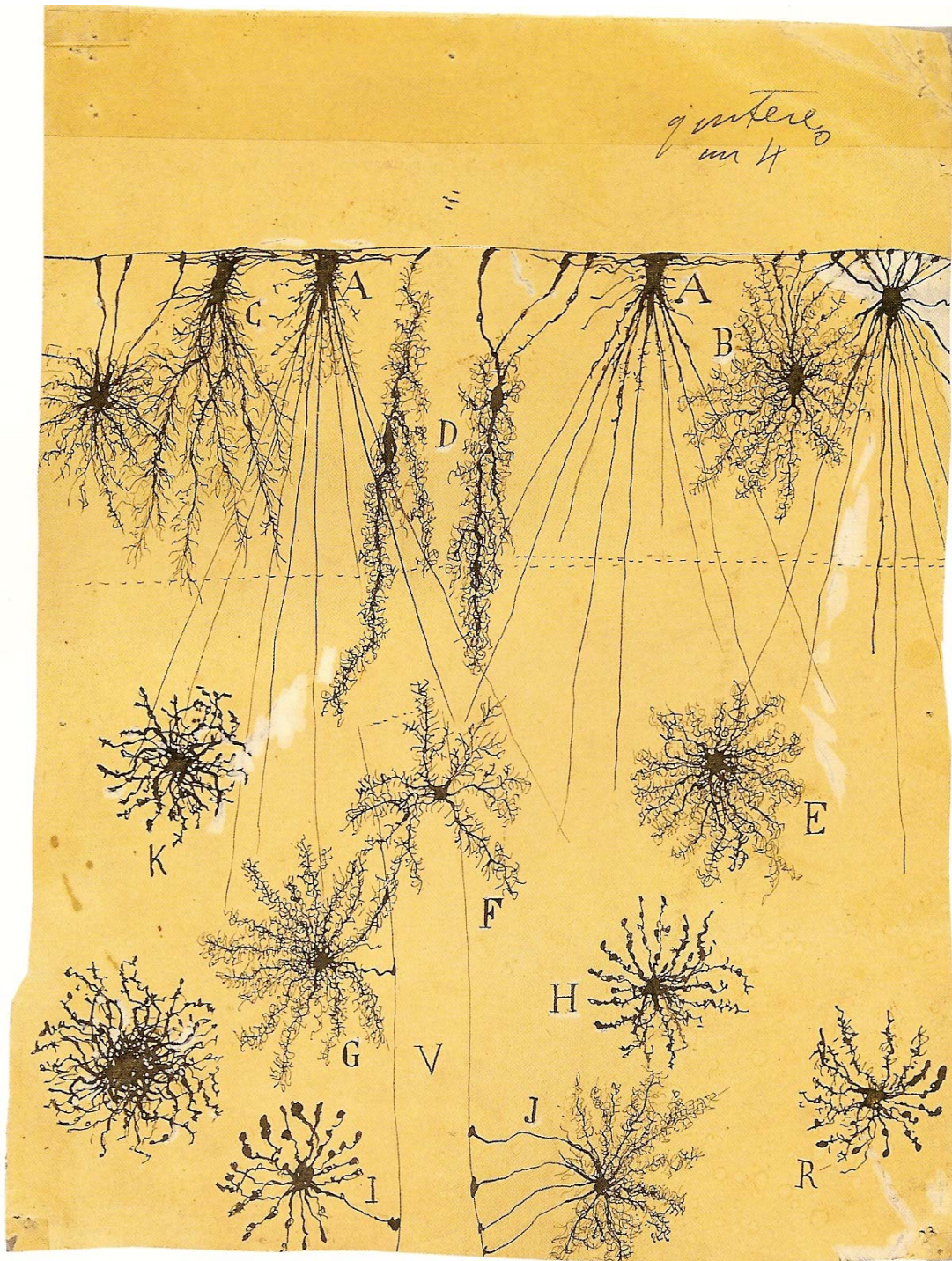
MARTINEZ, F. G.; HERMEL, E. E. S.; VIOLA, G. G.; SANTOS, P. C.; XAVIER, L. L.; RASIA-FILHO, A. A.; ACHAVAL, M. Estudo imunohistoquímico da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) na amígdala medial pósterodorsal (AMePD) de ratas nas diferentes fases do ciclo estral. Em: XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, Porto Alegre - RS, 2002.

MARTINEZ, F. G.; HERMEL, E. E. S.; VIOLA, G. G.; SANTOS, P. C.; XAVIER, L. L.; CHARCANSKY, A.; RASIA-FILHO, A. A.; ACHAVAL, M. Expressão da proteína ácida glial fibrilar (GFAP) na amígdala medial pósterodorsal (AMePD) de ratas em diferentes fases do ciclo estral. Em: XVII Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE 2002, Salvador - BA, 2002.

MARTINEZ, F. G.; HERMEL, E. E. S.; VIOLA, G. G.; SANTOS, P. C.; XAVIER, L. L.; RASIA-FILHO, A. A.; ACHAVAL, M. Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) na amígdala medial pósterodorsal (AMePD) de ratas durante o ciclo estral: estudo imunohistoquímico. Em: Encontro de Fisiologia: 25 Anos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia - UFRGS, 2002, Gramado - RS, 2002.

MARTINEZ, F. G.; HERMEL, E. E. S.; VIOLA, G. G.; SANTOS, P. C.; XAVIER, L. L.; RASIA-FILHO, A. A.; ACHAVAL, M. *Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactivity in the posterodorsal medial amygdala of cycling female rats*. Em: Congresso de Microscopia e Microanálise no Mercosul, 2002. Congresso de Microscopia e Microanálise no Mercosul, Curitiba - PR, 2002.

MARTINEZ, F. G.; HERMEL, E. E. S.; VIOLA, G. G.; SANTOS, P. C.; RASIA-FILHO, A. A.; ACHAVAL, M. *Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in the posterodorsal medial amygdala of cycling female rats*. Em: Simpósio de Metodologias Integradas no Estudo da Biologia, 2002, Curitiba - PR, 2002.



1. INTRODUÇÃO

2.

2.1. Considerações Gerais

O dimorfismo sexual é um fenômeno comum onde fêmea e macho da mesma espécie diferem entre si, o que se manifesta em diversas características fisiológicas e comportamentais das espécies animais, incluindo reprodução, agressividade, emoções e cognição (STEFANOVA; OVTCHAROFF, 2000). A reprodução sexual depende de uma variedade de comportamentos individuais e sociais, os quais diferem entre machos e fêmeas. O funcionamento do sistema hormonal gonadal tônico do macho contrasta com o caráter cíclico das fêmeas e muitas diferenças se estabelecem entre os gêneros, refletidas tanto estruturalmente como no aspecto comportamental. O comportamento e a morfologia espelham as funções endócrinas, uma vez que os hormônios têm poderosa influência sobre ambos, atuam durante muitos períodos de tempo e podem variar em qualquer direção (NAFTOLIN, 1981; BECKER et al., 2002; PFAFF; PHILIPS; RUBIN, 2004).

Uma das mais importantes relações causais hormônio-comportamento é o complexo setor dos mecanismos de controle da agressividade. Entre os animais, machos quase sempre são mais agressivos do que fêmeas (SIMON, 2002), o que depende da ação de estrogênios, androgênios e da interação entre ambos. Os esteróides gonadais atuam no sistema nervoso promovendo mudanças que persistem durante toda a vida do animal, como no caso das áreas ditas sexualmente dimórficas, que se diferenciam entre os sexos quanto à sua estrutura e organização (MIZUKAMI; NISHIZUKA; ARAI, 1983; HINES; ALLEN; GORSKI, 1992; PILGRIM; REISERT, 1992). Além disso, esteróides sexuais modulam o comportamento reprodutivo em uma grande variedade de espécies animais (PFAFF; PHILLIPS; RUBIN, 2004). Esta característica filogeneticamente primitiva inclui roedores e seres humanos. O

comportamento reprodutivo, incluindo o sexual propriamente dito, o comportamento maternal, defensivo, territorial e de exploração do ambiente dependem da plasticidade das células neuronais e gliais provocadas por hormônios sexuais (McEWEN et al., 1990; WOOD; NEWMAN, 1995; GARCIA-SEGURA et al., 1999).

A ação transformadora dos hormônios soma-se às do genoma e do ambiente, para determinar o desenvolvimento de estruturas nervosas sexualmente dimórficas, que, por sua vez, modulam a fisiologia do comportamento reprodutivo típico de machos e fêmeas (KELLY, 1991). Além disso, os hormônios são componentes críticos da interação neurônio-glia, provocando ações neuromodulatórias e neurotróficas em situações fisiológicas ou patológicas (GARCIA-SEGURA; McCARTHY, 2004). Células neurais e gliais possuem receptores para hormônios esteróides, os quais provocam efeitos genômicos e não-genômicos sobre o sistema nervoso central (SNC; McEWEN; COIRINI; SCHUMACHER, 1990; McEWEN et al., 1991; TORAN-ALERAND, 1995; GARCIA-SEGURA et al., 1999; FERNANDEZ-GALAZ et al., 1997). A ação dos hormônios sexuais sobre o SNC provoca mudanças definitivas na vida do animal, como é o caso de áreas sexualmente dimórficas, diferentes entre machos e fêmeas em vários aspectos, como forma e arranjo (McEWEN; COIRINI; SCHUMACHER, 1990; WOOD; NEWMAN, 1995). Tais mudanças podem ocorrer durante um período crítico chamado “organizacional”, quando ocorrem mudanças permanentes em estruturas sensíveis do SNC ou, atuando sobre animais púberes ou adultos, desempenham papéis “ativacionais”, controlando a função reprodutiva adulta, embora haja exceções quanto a esta regra. O período organizacional ocorre no período pré-natal e no rato se estende de aproximadamente 4-5 dias antes do nascimento até 5-10 dias pós-natais (KELLY, 1991).

A presença de receptores para hormônios gonadais na amígdala medial de ratos (SHERIDAN, 1979; SIMERLY et al., 1990; LI; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997;

SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997; ÖSTERLUND et al., 1998), é comparável a do hipotálamo (SIMERLY et al., 1990; SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997), o que suscita muitas curiosidades a respeito da inter-relação da plasticidade entre essas e outras estruturas do SNC.

No SNC, células gliais participam da regulação hormonal de funções sinápticas, plasticidade sináptica, formação de mielina, cognição, sono e respostas do tecido nervoso à lesão, sendo também elementos fundamentais para o entendimento de ações hormonais no SN e na regulação de eventos neuroendócrinos (GARCIA-SEGURA; McCARTHY, 2004). A plasticidade neuro-glial mediada pela ação de hormônios e suas repercussões funcionais, bem como o próprio ajuste neuroendócrino, são a base neural para comportamento reprodutivo e parental tão diferente estabelecido entre machos e fêmeas de uma mesma espécie (KELLY, 1991; RASIA-FILHO et al., 1991; 2002).

1.2 Amígdala: conceito, localização e funções

A amígdala, ou complexo amigdalóide, é uma massa de substância cinzenta componente do SNC e que pelo menos parcialmente faz parte do sistema límbico. O termo “amígdala” é originado do grego para definir amêndoa, devido ao formato ovóide que possui. Ela é na realidade um conjunto de núcleos interconectados e localizados na região subcortical do lobo temporal (ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995; PITKÄNEN; SAVANDER; LeDOUX, 1997; SWANSON; PETROVICH, 1998; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004).

A amígdala compõe de fato diferentes sistemas funcionais. Sendo formada por um grupo de células que parecem ser partes diferenciadas do córtex cerebral tradicional, do claustró e do estriado, ela pertence a quatro sistemas funcionais: “vegetativo” (núcleo central),

cortical frontotemporal (núcleos basolateral anterior e lateral), olfativo acessório (MeA) e olfativo principal (demais núcleos da amígdala). Uma complexa rede estrutural multifuncional inter-relacionada é formada por estes núcleos, envolvendo modulação de vários comportamentos e ajustes ditos “vegetativos” (ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995; SWANSON; PETROVICH, 1998; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004).

Embora seus limites anatômicos precisos e a classificação de suas subdivisões permaneçam ainda controversos (SWANSON; PETROVICH, 1998), a amígdala é dividida em quatro regiões principais de acordo com as suas características citoarquitetônicas, imunoistoquímicas e hodológicas (Figura 1): (1) amígdala expandida, a qual se estende além dos seus limites anatômicos e se subdivide em central e medial (MeA); (2) amígdala superficial com características corticais, a qual se divide em complexo basolateral e porções conectadas com vias olfativas e vomeronasal; (3) áreas de transição, localizada entre a amígdala expandida e a porção ventral dos núcleos da base; e (4) núcleos não classificados. (ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995; SWANSON; PETROVICH, 1998; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999).

A amígdala cumpre um papel integrativo em atividades comportamentais, vegetativas e endócrinas, fundamentais para relação do animal com seu ambiente (LeDOUX, 1992; DAVIS, 1992; 2000). Ela participa seja na percepção, modulação ou integração de funções associadas com o medo e ansiedade, atenção, aprendizado e memória de cunho emocional, além de comportamento defensivo, reprodutivo, cognitivo e social (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; PITKÄNEN; SAVANDER; LeDOUX, 1997; SWANSON; PETROVICH, 1998; DAVIS, 1992; 2000; PITKÄNEN, 2000; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 2000; SHEEHAN et al., 2000; 2001; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001;

PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004).

Múltiplas informações sensoriais interoceptivas (viscerais) e exteroceptivas (estímulos auditivos, olfativos e visuais) são necessárias para a participação da amígdala nestas atividades, modificando sua própria atividade ao analisar a informação recebida e estimulando diversas regiões do SNC para que se inicie, ou que seja modulada a resposta (comportamento, função vegetativa ou endócrina) ao estímulo inicial (DAVIS, 1992; QUIRK; REPA; LeDOUX, 1995; KNUEPFER et al., 1995; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 2000).

1.2.1 Amígdala medial

O núcleo medial da amígdala ou a amígdala medial (MeA) é parte da "amígdala expandida" e estabelece muitas conexões, em ratos, (Tabelas 1 e 2), recíprocas ou não, com outras subregiões da amígdala, como o núcleo central, e com outras regiões tais como o bulbo olfatório, órgão vomeronasal, hipocampo, estriado e globo pálido ventral, núcleo próprio da estria terminal, vários núcleos do hipotálamo e tálamo, substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo e núcleos da rafe mesencefálicas (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; GUILLAMÓN; SEGOVIA, 1997; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004).

A MeA é um membro proeminente da amígdala superficial que ocupa seu aspecto rostromedial, iniciando medial e caudalmente ao núcleo do trato olfativo lateral, estendendo-se caudalmente até o corno temporal do ventrículo lateral. Neste nível, está situado dorsomedialmente ao pólo cefálico da área de transição amígdalo-hipocampal. Ao longo de toda sua extensão, a MeA encontra-se em aposição com a região ventrolateral do trato óptico. Embora este núcleo seja bem definido em sua região mais caudal, seu limite rostral com a

amígdala anterior e lateralmente com as camadas profundas do núcleo cortical anterior não estão claramente estabelecidos. Há ainda uma zona pobre em células que separa a MeA da porção medial do núcleo central da amígdala no sentido dorso-lateral, a qual é substituída ventral e caudalmente pelo núcleo próprio da estria terminal (BNST). Em orientação caudal, as fibras ascendem da estria terminal e se interpõem entre a MeA e outros núcleos amigdalóides. Além disso, em posição dorsal, grupos de fibras nervosas que ascendem dentro da estria terminal estão interpostos entre o MeA e outros núcleos da amígdala (ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995; PAXINOS; WATSON, 1998; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004).

Embora outras formas de subdivisão da MeA tenham sido apresentadas (PITKÄNEN, 2000), os quatro subnúcleos conhecidos são: ântero-dorsal (MeAD), ântero-ventral (MeAV), pósterodorsal (MePD) e póstero-ventral (MePV) (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; PAXINOS e WATSON, 1998; de OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004; Figura 2). Em relação a suas conexões, ela pode estar organizada em uma região anterior, da qual fazem parte a MeAD, a MeAV e a MePV, e uma região posterior, formada basicamente pela MePD (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995).

A MeA participa da integração de estímulos quimiossensoriais retransmitidos às vias vomeronasais e olfativas, bem como estímulos somatosensoriais genitais, integrando-os aos núcleos hipotalâmicos (SIMERLY; SWANSON, 1995; SEGOVIA; GUILLAMÓN, 1993; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001; SIMERLY, 2002; de OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004). Ela participa também da adequação do animal ao seu ambiente, modulando comportamentos social e sexual, e o aprendizado com envolvimento de componente emocional (ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995).

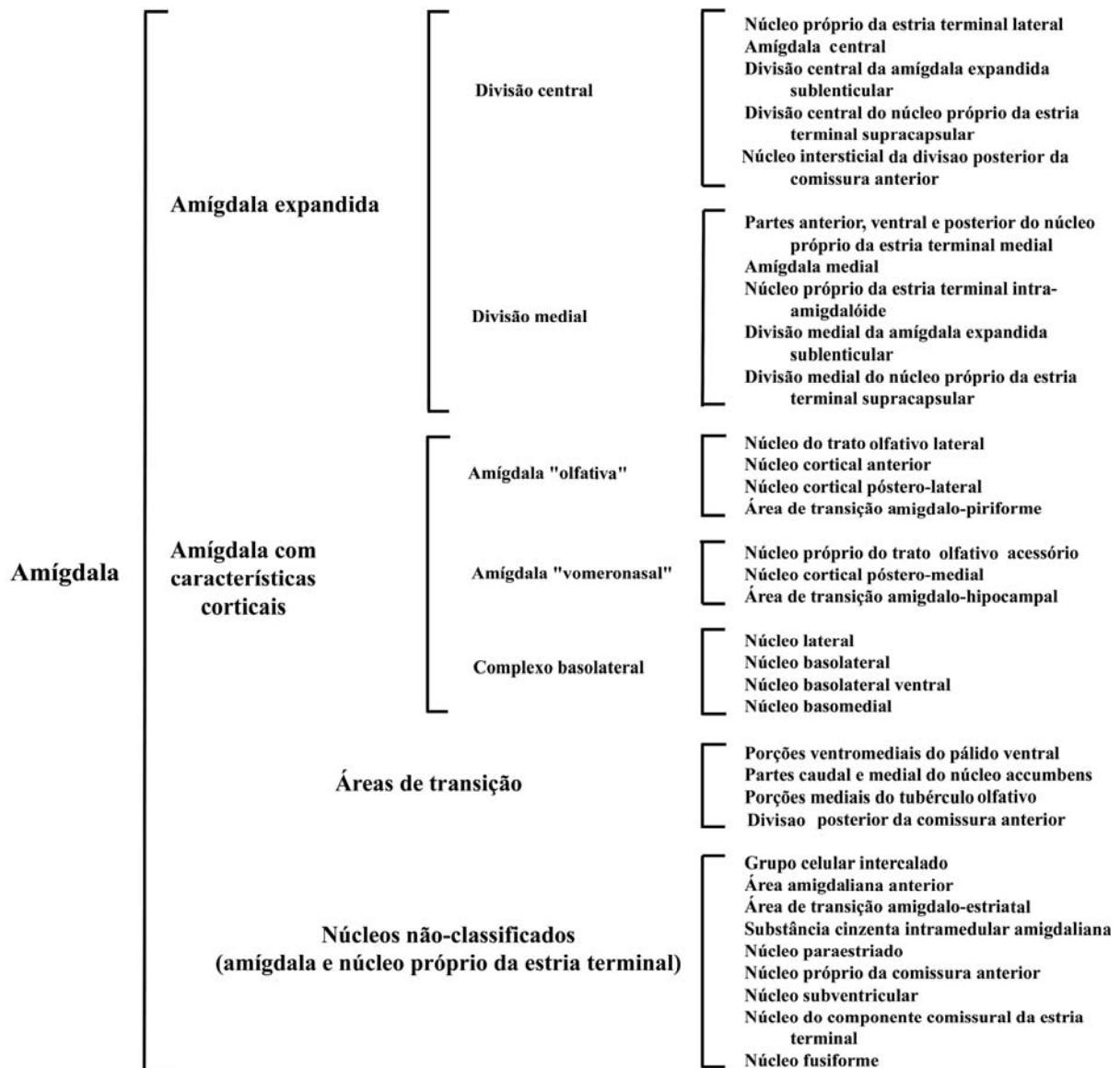


Figura 1. Diagrama da amígdala do rato apresentando subdivisões anatômicas e componentes principais (ALHEID et al., 1995; modificado por RASIA-FILHO et al., 2000).

Lesões na MeA comprometem a ejaculação de ratos (HARRIS; SACHS, 1975) e reduzem a ocorrência de comportamento sexual em fêmeas, enquanto a estimulação promove efeito oposto em ambos os sexos (MASCÓ; CARRER, 1980; SMOCK et al., 1992), além de facilitar o comportamento agressivo em gatos (SHAIKH e SIEGEL, 1994). Hormônios gonadais influenciam as atividades funcionais da MeA, como comportamento sexual e reprodutivo (MASCÓ; CARRER, 1980; WOOD; NEWMAN, 1995; GUILLAMÓN; SEGOVIA, 1997; RASIA-FILHO et al., 1991). Lesões induzidas por injeções com aminoácidos excitotóxicos na MeA provocaram facilitação do comportamento maternal em ratas virgens, sendo este comportamento abolido após ovariectomia, indicando assim a participação de hormônios gonadais nesta resposta (NUMAN; NUMAN; ENGLISH, 1993). Já a eletroestimulação da MeA provocou inibição do comportamento maternal (neofobia) em ratas virgens, bem como diminuição da latência para o surgimento deste comportamento em ratas múltiparas (MORGAN et al., 1999). Por sua vez, lesões eletrolíticas na MeA reduziram o comportamento neofóbico de ratas virgens, o que possibilitaria subsequente o desenvolvimento do comportamento maternal (FLEMMING; VACCARINO; LUEBKE, 1980). Os subnúcleos da MeA parecem integrar estruturas relacionadas com a inibição do comportamento maternal em ratas, o que se faz por meio de projeções diretas ou indiretas para os núcleos hipotalâmicos ventromedial e anterior (SHEEHAN et al., 2000; 2001). Lesão eletrolítica bilateral extensa na MeA provocou redução do comportamento agressivo de ratos comparados aos controles em situação de disputa territorial (VOCHTELLO; KOOLHAAS, 1987).

Há também um aumento da expressão da proteína c-fos nos subnúcleos da MeA ao longo de diferentes estágios da discriminação do aprendizado olfativo durante a exploração inicial da genitália das fêmeas por parte dos machos (HINES; ALLEN; GORSKI, 1992; HESS et al., 1997). Sinais olfativos gerados por filhotes induzem a ativação da proteína c-fos

na MeA, o que provoca aversão e inibição da resposta maternal em ratas virgens (FLEMMING; VACCARINO; LUEBKE, 1980; NUMAN; NUMAN; ENGLISH, 1993; LONSTEIN et al., 2000). O processamento de informações olfativas pela MeA também está relacionado com a regulação de outros comportamentos, como o agressivo e o defensivo, tanto em ratos quanto em gatos (KOOLHAAS; SCHUURMAN; WIEPKEMA, 1980; SLODDART-APTER; MacDONNELL, 1980; DIELENBERG; HUNT; McGREGOR, 2001). A modulação de comportamentos reprodutivos de machos e fêmeas pelos subnúcleos da MeA também ocorre a partir da percepção de estímulos olfativos (LEHMAN; WINANS, 1982; KLING; BROTHERS, 1992; KONDO, 1992; WONG; CHEN; MOSS., 1993; KONDO; ARAI, 1995; DOMÍNGUEZ; HULL, 2001).

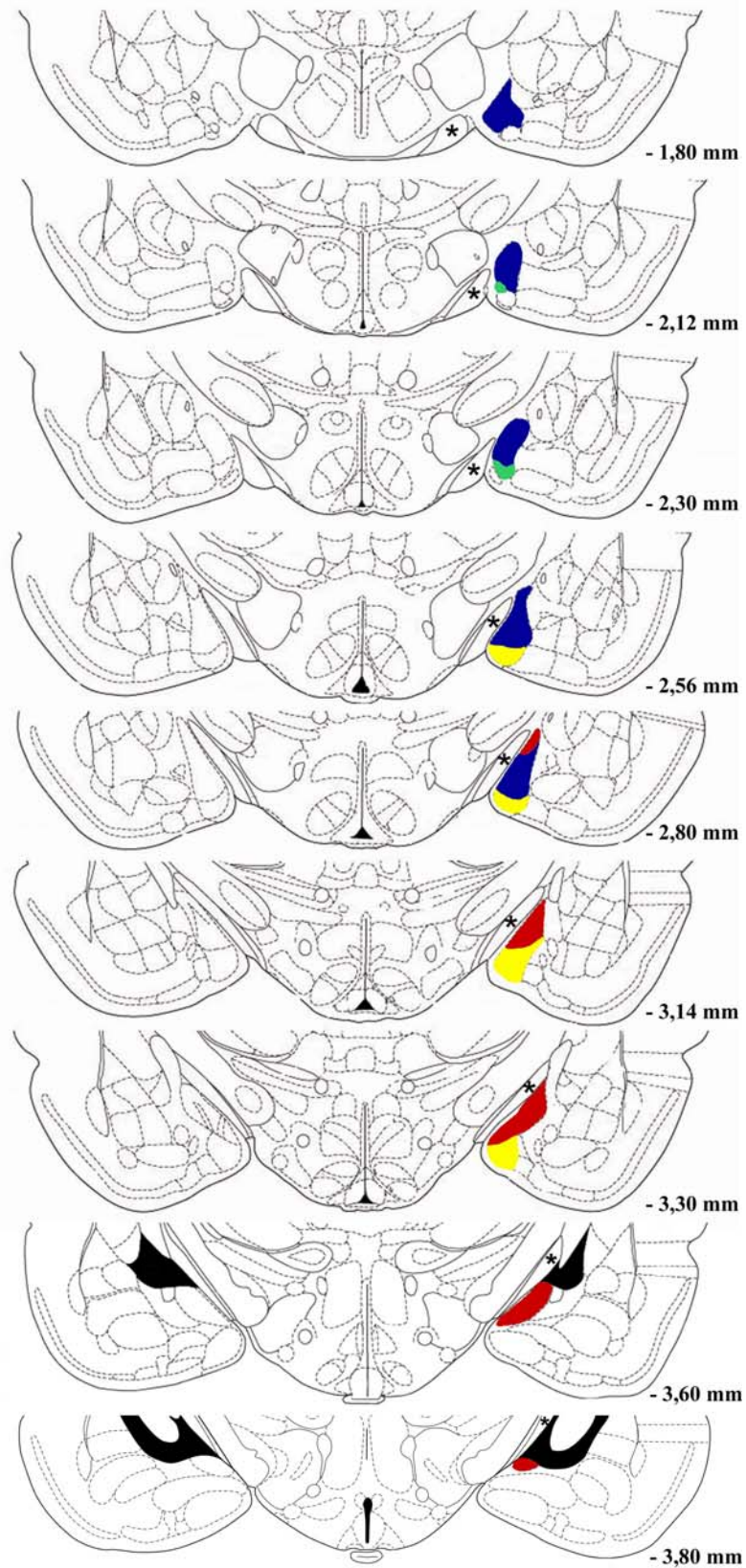


Figura 2. Representação esquemática da MeA de rato com seus quatro subnúcleos: ântero-dorsal (azul), ântero-ventral (verde), póstero-dorsal (vermelho) e póstero-ventral (amarelo). O asterisco localiza o trato óptico e os números à direita correspondem à distância posterior ao bregma.(PAXINOS; WATSON, 1997; modificada por HERMEL, 2005).

1.2.1.1 Subnúcleos da MeA

Os subnúcleos da MeA têm um importante papel na modulação de diversos comportamentos e respostas neuroendócrinas em ratos. Todavia, além de diferenças morfológicas e anatômicas entre os subnúcleos da MeA, eles diferem entre si por participarem de diferentes funções (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995, PAXINOS; WATSON, 1997; 1998). Os subnúcleos MeAD, MeAV e MePV possivelmente participam da modulação hipotalâmica dos comportamentos reprodutivo e defensivo, enquanto o MePD pode influenciar a regulação neuroendócrina hipotalâmica (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; SIMERLY, 2004). O MePD modula ainda o comportamento maternal (LONSTEIN et al., 2000; SHEEHAN et al., 2000; 2001), defensivo (DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001) e sexual, tanto de fêmeas (MASCÓ; CARRER, 1980) como de machos (RASIA-FILHO et al. 1991; WOOD; NEWMAN, 1995; SWANN; FIBER, 1997).

MeAD e MePD estão envolvidos no processamento de informações olfativas oriundas do órgão vomeronasal e do bulbo olfativo, as quais são enviadas para áreas motoras e neuroendócrinas do telencéfalo basal, para a área pré-óptica medial, para outros núcleos hipotalâmicos e, também, para o tronco encefálico (LEHMAN; WINANS, 1982; CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; KONDO; ARAI, 1995; WOOD, 1997; DOMÍNGUEZ; HULL, 2001; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001).

Após o contato sexual, fêmeas em proestro apresentam mais células imunorreativas à c-fos no MePD (ROWE; ERSKINE, 1993). Além disso, lesões na região anterior do MeA ou no MePD reduziram a ocorrência de comportamento sexual em ratas (MASCÓ; CARRER, 1980; LEHMAN; WINANS, 1982) e em ratos (COOLEN; PETERS; VEENING, 1997; NEWMAN, 1999; KONDO; TOMIHARA; SAKUMA, 1999; DOMÍNGUEZ; HULL, 2001). A estimulação das mesmas áreas em fêmeas promoveu, por sua vez, o aumento deste comportamento (MASCÓ; CARRER, 1980). O MePD parece ainda influenciar as atividades

neuroendócrinas e vegetativas moduladas pelo hipotálamo (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995).

A distribuição de receptores para hormônios sexuais na MeA é heterogênea. Apesar de receptores para andrógenos existirem em neurônios de todos os subnúcleos da MeA, a maior concentração destes foi detectada da parte média à posterior da MeA (SHERIDAN, 1979). Receptores neuronais dos tipos α e β para estrógenos são encontrados com maior frequência no MePD (SIMERLY et al., 1990; LI; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997; ÖSTERLUND et al., 1998), embora também estejam presentes no MeAD e no MePV (LI; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997; SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997; ÖSTERLUND et al., 1998).

1.2.1.2 Conexões da MeA

Quanto às conexões e distribuição de neurotransmissores e receptores para hormônios gonadais, a MeA apresenta duas divisões principais: uma ventral, incluindo o MeAD, o MeAV e o MePV, e uma dorsal, que inclui o MePD (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995). A MeA e seus subnúcleos apresentam várias conexões intra- e extra-amigdalíacas, relacionando-se com diferentes estruturas do SNC (Tabelas 1 e 2). Esta amplitude de conexões aparentemente se relaciona com seu papel na modulação de comportamentos e ajustes vegetativos diversos (ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995; CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; PITKÄNEN, 2000; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004).

A MeA recebe aferências de muitas regiões do SNC (Tabela 1), sendo que há interconexões entre seus próprios subnúcleos (MeAD, MeAV, MePD e MePV). Ela recebe projeções intra-amigdalíacas como do núcleo central, cortical pósterolateral, pósteromedial,

acessório basal e lateral bem como da área amígdalo-hipocampal e de outras regiões encefálicas como o córtex parietal, córtex frontal (principalmente infralímbico), formação hipocampal (parte distal e proximal do subiculum temporal), do sistema olfatório, tálamo, hipotálamo (núcleos premamilar e ventromedial, área pré-óptica medial e lateral, etc.) e do núcleo próprio da estria terminal (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995).

A tabela 2 apresenta as eferências intra- e extra-amigdalianas, discriminando os subnúcleos da MeA e suas relações anatômicas (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; PITKÄNEN, 2000; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001). Tais relações anatômicas permitem observar a complexidade hodológica sob a qual se baseiam os subnúcleos da MeA para exercerem suas funções juntamente com outras estruturas do SNC.

Tabela 1. Aferências intra- e extra-amigdalianas para os diferentes subnúcleos da amígdala medial (HERMEL, 2005; conforme PITKÄNEN, 2000).

<p><u>INTRA-AMIGDALIANAS</u> Área amígaló-hipocampal Córtex periamigdalóide Núcleo basal Núcleo basal acessório Núcleo cortical anterior e posterior Núcleo lateral Subnúcleos componentes do núcleo medial</p>	<p><u>CORTICAIS</u> Área pré-límbica Córtex entorrinal Córtex infralímbico Córtex perirrinal dorsal Ínsula agranular posterior Ínsula agranular ventral <i>Subiculum</i> temporal distal e proximal</p>
<p><u>INTER-AMIGDALIANAS</u> (contralaterais) Córtex periamigdalóide Núcleo basal acessório Núcleo cortical posterior Núcleo do trato olfativo lateral</p>	<p><u>TALÂMICAS</u> Núcleo centromediano Núcleo medial Núcleo parafascicular Núcleo paratenial Núcleo paraventricular Núcleo posterior Núcleo <i>reuniens</i> Núcleo subparafascicular Núcleo talâmico póstero-ventral</p>
<p><u>SISTEMA OLFATÓRIO</u> Córtex piriforme Bulbo olfativo Bulbo olfativo acessório Bulbo olfativo anterior Núcleo endopiriforme</p>	<p><u>TRONCO ENCEFÁLICAS</u> Área retrorubral A8 Área tegmental ventral Grupo celular adrenérgico C1 e noradrenérgico A1 no bulbo ventrolateral Núcleo central superior Núcleo dorsal da rafe Núcleo dorsal do lemnisco lateral Núcleo parabraquial Núcleo peripeduncular Núcleo tegmental pedúnculo-pontino</p>
<p><u>HIPOTALÂMICAS</u> Área hipotalâmica anterior Área pré-óptica medial e lateral Área retroquiasmática Núcleo arqueado Núcleo dorsomedial Núcleo hipotalâmico posterior Núcleo lateral Núcleo pré-mamilar Núcleo supramamilar Núcleo supra-óptico Núcleo tuberal Núcleo ventromedial <i>Tuber cinereum</i></p>	<p><u>OUTRAS</u> Núcleo da banda diagonal de Broca Núcleo próprio da estria terminal <i>Substancia inominata</i></p>

Tabela 2. Eferências intra- e extra-amigdalianas dos diferentes subnúcleos da amígdala medial de ratos (HERMEL, 2005; conforme CANTERAS et al., 1995).

PROJEÇÕES:		MeAD	MePD	MePV
INTRA-NUCLEARES:				
Núcleo medial	ântero-dorsal		++	+++
	ântero-ventral	+++	++	+++
	póstero-dorsal	++		++
	póstero-ventral	+++	++	
INTRA-AMIGDALÓIDES:				
Área amígdalo-piriforme		+++	+	+++
Área amígdalóide anterior		+++	+	+++
Núcleo basolateral	anterior	+	-	+
	Posterior	+	+	+
Núcleo basomedial	anterior	+++	+	+++
	Posterior	+++	+	+++
Núcleo central	medial	++	+	+
	central	+++	++	++
	lateral	+	-	+
Núcleo cortical	anterior	+++	+	++
	póstero-lateral	++	+++	++
	póstero-medial	++	+++	++
Núcleo lateral		++	+	++
Núcleo posterior		++	++	+++
Núcleo próprio do trato olfativo acessório		+++	+	+++
CORTICAIS:				
Área de transição pós-piriforme		+++	++	+
Área insular agranular		+	-	+
Área piriforme		++	+	+
Área entorrinal	lateral	+++	++	++
	medial	+	+	+
	ventromedial	+	+	-
Área infralímbica		+	+	+
Área pré-límbica		+	-	+
Bulbo olfativo acessório - camada mitral		+++	-	-
CA1 hipocampal		+	+	+
Claustro		+	-	+
Estriado		++	-	+
Núcleo do trato olfativo lateral		+	-	+
Núcleo endopiriforme	dorsal	+	+	+
	Ventral	++	+	++
Núcleo olfativo anterior	dorsal	+	-	-
	externo	+	-	-
	lateral	+	-	-
	medial	+	-	-
	póstero-ventral	++	-	-
<i>Parasubiculum</i>		+	-	+
<i>Subiculum</i>		+	+	+
<i>Tênia tecta</i>	dorsal	+	-	-
	Ventral	+	-	+
Tubérculo olfativo		++	-	+
HIPOTALÂMICAS:				
Nível pré-óptico:				
Área pré-óptica lateral		+	-	-
Área pré-óptica medial		+++	-	+++
Núcleo periventricular ântero-ventral		+	+++	-
Núcleo pré-óptico medial	medial	+++	+++	+
	central	+	+++	+
	lateral	+++	++	+
Nível hipotalâmico anterior:				
Núcleo anterior	anterior	+	+	+++
	central	++	++	+++
	dorsal	++	-	+
	posterior	++	++	+++
Núcleo paraventricular	magnocelular anterior	+	-	-
	magnocelular póstero-medial	+	-	-
	parvocelular anterior	++	-	-
	parvocelular dorsal	+	-	-
	parvocelular dorsomedial	+	-	-
	periventricular	+	-	-

Tabela 2. (Continuação)

PROJEÇÕES:		MeAD	MePD	MePV	
HIPOTALÂMICAS (continuação):					
Núcleo periventricular	anterior	+	-	++	
	intermediário	++	+	+++	
	pré-óptico	+	-	++	
Núcleo supraquiasmático		++	-	+++	
Zona subparaventricular		+++	-	+++	
Nível tuberal:					
Área hipotalâmica anterior		++	-	+	
Núcleo arqueado		++	+	+	
Núcleo dorsomedial	anterior	++	+	+	
	posterior	+	+	+	
	ventral	+	+	+	
Núcleo ventromedial	anterior	+++	-	+++	
	central	+++	+	+++	
	dorsomedial	+++	-	+++	
	ventrolateral	+++	+	+	
Nível mamilar:					
Núcleo mamilar medial		+	+	+	
Núcleo periventricular posterior		+++	+	+	
Núcleo posterior		+++	+++	+++	
Núcleo supra-mamilar		+	+	+	
Núcleo pré-mamilar ventral		+++	+++	+++	
TALÂMICAS:					
Habênula lateral		+	-	-	
Núcleo dorsomedial	medial	++	-	-	
	central	-	-	-	
	lateral	-	-	-	
Núcleo paratenial		+	-	-	
Núcleo <i>reuniens</i> medial		+++	-	++	
Núcleo subparafascicular	magno celular	-	-	-	
	parvo celular	+	-	-	
TRONCO ENCEFÁLICO:					
Área tegmental ventral		+	+	+	
Núcleos da rafe	dorsal	+++	-	+	
	interfascicular	+	-	+	
	rostral linear	+	-	+	
	central linear	+	-	+	
Substância cinzenta periaqueductal		+	+	+	
OUTRAS:					
<i>Núcleo accumbens</i>		+	-	-	
Núcleo próprio da estria terminal					
Anterior	ântero-dorsal	+++	+++	+++	
	ântero-lateral	++	+	++	
	ântero-ventral	+++	+	+	
	dorsolateral	++	+	++	
	dorsomedial	+++	+	+++	
	fusiforme	+	-	-	
	justacapsular	+	-	-	
	magno celular	++	-	++	
	oval	+	+	+	
	rombóide	++	-	+	
	subcomissural	++	+	+	
	Posterior	interfascicular	+++	+	+++
		principal	+	+++	+
transverso		+++	+	+++	
Núcleo septal lateral	dorsal	+	-	-	
	intermediário	+++	+	+	
	ventral	+++	+	+	
Núcleo septal medial		+	+	+	
Núcleo septofimbrial		+	+	+	
<i>Substancia inominata</i>		+++	+++	+++	
Zona incerta		++	-	+	

As projeções foram classificadas em: +++ densas; ++ moderadas; + fracas; - ausentes.

1.3 Hormônios gonadais: ciclo estral, dimorfismo sexual e desenvolvimento

Hormônios são tradicionalmente definidos como compostos liberados na corrente sanguínea principalmente pelas glândulas endócrinas, os quais agem em sítios-alvo localizados a variadas distâncias da glândula secretora (KAWATA, 1995; GREENSPAN; GARDNER, 2004, PFAFF; PHILLIPS; RUBIN, 2004, BALTHAZART; BALL, 2006). O colesterol é o precursor das cinco principais classes de hormônios esteróides: progestinas, estrogênios, androgênios, glicocorticóides, mineralocorticóides e vitamina D (KAWATA, 1995; GREENSPAN; GARDNER, 2004). O colesterol pode ser um fator derivado de neurônios (ULLIAN et al., 2004) ou astrócitos (HU et al., 2007).

O SNC é um tecido-alvo de hormônios gonadais, onde estes últimos promovem alterações na expressão gênica e na síntese protéica, interferindo então no genoma da célula (MURDOCH e GORSKI, 1991; TORAND-ALLERAND, 1995). Esses processos ocorrem por meio da ligação dos hormônios aos receptores, preferencialmente no núcleo da célula, onde então estabelece contato com o sítio de reconhecimento, o que provoca aumento na duplicação do DNA e, subseqüentemente, o aumento da síntese da proteína correspondente (TORAND-ALLERAND, 1995; McEWEN; ALVES, 1999; CORNIL; BALL; BALTHAZART, 2006). Essas proteínas incluem enzimas de síntese (como a tirosina hidroxilase), transportadores, receptores, proteínas de transdução de sinal (fosfatases, kinases, proteínas acessórias, etc) ou enzimas de degradação (como monoamina oxidases), os quais modificam a neurotransmissão (McEWEN; ALVES, 1999).

Os esteróides sexuais não se restringem a ações genômicas. Eles podem agir alterando o potencial de membrana neuronal e o metabolismo de neurotransmissores, influenciando as transmissões sinápticas. Ações gênicas e não-gênicas diferem em tempo de ação: efeitos resultantes em segundos são considerados não-gênicos, enquanto efeitos gênicos demandam

vários minutos ou mesmo dias (McEWEN et al., 1991; CORNIL; BALL; BALTHAZART, 2006). Pelas rápidas mudanças no ambiente neural causadas por hormônios sexuais como o estradiol, não envolvendo mecanismos genômicos, eles poderiam inclusive ser classificados como neuromoduladores ou mesmo neurotransmissores (BALTHAZART; BALL, 2006; CORNIL; BALL; BALTHAZART, 2006). Considera-se ainda que o estrogênio possa ser sintetizado no encéfalo por meio da enzima aromatase, sendo uma fonte local de altas concentrações deste esteróide (CORNILL; BALL; BALTHAZART, 2006). As alterações neuroquímicas provocadas por hormônios têm repercussão na modulação comportamental e nas atividades neuroendócrinas, entre outras funções (McEWEN et al., 1990; WOOD; NEWMAN, 1999).

O eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) é regulado primariamente pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) a partir do hipotálamo. O GnRH estimula a secreção de gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH) por parte da hipófise anterior, a qual, por sua vez: a) estimula o crescimento folicular e produção de estrogênio (FSH), formação do corpo lúteo e produção de progesterona (LH) no ovário da fêmea, e b) estimula a produção de testosterona (LH) e produção de espermatozóides (FSH) no testículo do macho (GREENSPAN; GARDNER, 2004, PFAFF; PHILLIPS; RUBIN, 2004). Esses hormônios esteróides, produzidos predominantemente pelas gônadas, mas com uma mínima quantidade de andrógenos sintetizadas nas adrenais, atuam sobre a diferenciação do sistema nervoso por meio da ligação de receptores específicos para testosterona, estrógeno e progesterona (SIMERLY, et al., 1990; KELLY, 1991; GORSKY, 1993; FITCH; DENESBERG, 1998).

Os estrogênios, importante classe de hormônios esteróides, exercem uma ampla variedade de ações em funções reprodutivas e não-reprodutivas (CORNIL; BALL; BALTHAZART, 2006) relacionando-se a processos neuroendócrinos, fisiológicos e

comportamentais tanto durante o desenvolvimento quanto em animais adultos (PILGRIM; REISERT, 1992; LI; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997). A administração experimental de estrogênios (E; 48 h ou mais) seguida de progesterona (P) em roedores promove o comportamento sexual típico da fêmea. Já o estrogênio em altos níveis e a queda de progestinas configuram a combinação ótima para o comportamento maternal. O comportamento social, por sua vez, envolve outras configurações hormonais, envolvendo além de E e P, ocitocina e, dependendo da espécie, vasopressina (PFAFF, 1999).

1.3.1 Neurodiferenciação

No tecido nervoso em desenvolvimento, os esteróides gonadais criam um determinado padrão comportamental, refletido, por exemplo, na expressão de comportamento sexual específico ao estímulo hormonal. Durante a vida adulta, a sensibilidade de uma dada liberação hormonal para induzir agressão depende da exposição ao hormônio previamente, durante o desenvolvimento do SNC (GORSKI, 2000; PFAFF; PHILLIPS; RUBIN, 2004).

Em fetos de mamíferos, antes da diferenciação hormonal, os ductos wolffianos e müllerianos estão presentes em ambos os sexos. O cromossomo sexual Y carrega um gene ou genes codificados para a produção do fator determinante de testículos, habilitando um indivíduo XY a ser fenotipicamente macho. Em ratos, a presença de altos níveis de androgênios circulantes durante o período de desenvolvimento intra-uterino e também nos dois ou 3 primeiros dias após o nascimento determina a tendência neuroendócrina e comportamental do animal ser uma fêmea ou macho adulto normal. Desta forma, características visíveis da vida sexual adulta, tanto no aspecto endócrino quanto comportamental, em resposta à administração de hormônios sexuais, são essencialmente determinadas pela exposição neonatal de androgênios (PFAFF; PHILLIPS; RUBIN, 2004).

Os roedores são altriciais (indefesos, desprotegidos, cegos ao nascimento) e seu SNC apresenta períodos críticos de desenvolvimento após o nascimento (KELLY, 1991; PFAFF; PHILLIPS; RUBIN, 2004; RAO; JACOBSON, 2005;). A neurogênese da MeA em ratos ocorre até aproximadamente o 16° dia de vida intra-uterina. Ela se inicia primeiramente nas regiões anterior e ventral, o que provavelmente se relaciona com as conexões que se formam com o sistema olfativo. Aos 20 dias de idade pós-natal, ratos apresentaram maior volume e densidade neuronal na MeA de forma geral do que fêmeas na mesma idade. Essas diferenças sexuais são mantidas no animal adulto (MIZUKAMI; NISHIZUKA; ARAI, 1983). A castração de machos recém-nascidos, ou na puberdade, ou ainda, o tratamento nos primeiros 10 dias de vida com um antagonista do estrógeno, ou com um inibidor da aromatase (a enzima que transforma testosterona em estradiol), resultaram em uma diminuição do volume e da densidade de neurônios imunorreativos ao GABA na MeA, quando comparado aos machos adultos intactos (STEFANOVA; OVTSCHAROFF, 2000). Machos gonadectomizados entre o primeiro dia pós-natal (PN1) e o quinto dia PN (PN5) têm reduzido o comportamento sexual em fase adulta, o que não ocorre se os animais forem castrados a partir do PN10, se comparados a ratos normais (SÖDERSTEIN; HANSEN, 1978; RASIA-FILHO et al., 1991). Já os ratos castrados imediatamente ao nascimento, quando receberam estradiol e progesterona em idade adulta, apresentaram comportamento sexual feminino na presença de machos intactos (GERALL et al., 1967).

O tratamento com testosterona no PN4, durante o período crítico de diferenciação sexual em fêmeas, resulta em um baixo número de espinhos dendríticos no núcleo pré-óptico hipotalâmico, secreção de LH acíclica, baixo comportamento sexual feminino e alto comportamento sexual masculino. No entanto, o tratamento com testosterona no PN16 realizado após o período crítico do desenvolvimento, não houve efeito. Correspondentemente, em machos, a castração no PN1, durante o período crítico da diferenciação sexual masculina,

produz um alto número de contatos sinápticos, secreção cíclica de LH, baixo comportamento sexual masculino e alto comportamento feminino. Castração no PN7, após o período crítico, não provoca efeitos (PFAFF; PHILLIPS; RUBIN, 2004).

Estes dados sugerem que, embora não sejam os únicos, os hormônios sexuais são substâncias ativas importantes na morfologia e neuroquímica de estruturas dimórficas do SNC, o que se reflete em funções neuroendócrinas e comportamentos. Isto pode estar relacionado com modificações tanto em células neuronais quanto em células gliais da MeA. As interrelações morfológicas de astrócitos com funções desempenhadas pela amígdala medial necessitam ainda esclarecimentos.

1.3.2. Ciclo Estral

O ciclo sexual ou estral de ratas compõe um meio natural e repetitivo para estudar as variações dos hormônios esteróides e suas ações fisiológicas. Muito do conhecimento que há sobre o controle do ciclo ovariano de vários mamíferos que possuem ovulação espontânea é baseado em estudos sobre o controle do ciclo estral da rata. Esse ciclo tem uma duração de 4 a 5 dias, se repete durante o ano inteiro e é composto por quatro fases: diestro (55 a 57 h), proestro (12 a 14 h), estro (25 a 27 h) e metaestro (6 a 8 h). Cada uma das fases do ciclo caracteriza-se por expressar mudanças no útero e cérvix uterina, detectáveis por características do epitélio vaginal, como a presença predominante de leucócitos (diestro), de células epiteliais nucleadas (proestro), de células epiteliais cornificadas (estro), ou uma mistura homogênea de todos os tipos já citados (metaestro). As fases mudam conforme as variações nas concentrações de gonadotrofinas e conseqüentemente de esteróides gonadais (MATTHEWS; KENYON, 1984). A figura 3 esquematiza o ciclo estral conforme a concentração hormonal presente no plasma da fêmea.

Na fase do proestro o estradiol chega à sua máxima concentração, de forma a desencadear um *feedback* positivo, o qual promove a liberação do GnRH, o qual é requisito para a ovulação (FREEMAN, 1994). Nesta fase, a presença de um rato macho e uma fêmea fértil dá início a um comportamento reprodutivo de ambos que inclui uma prévia investigação social do casal, por meio de informações sensoriais, como olfatórias e ultra-sônicas (MEISEL; LUMIA; SACHS, 1980; MO et al., 1992). A fêmea receptiva responde às lambidas realizadas pelo macho em sua genitália, com um comportamento que envolve corridas breves em direção oposta a ele, saltos e paradas rápidas, sempre posicionando os quadrantes posteriores em direção ao macho (KARPAS et al., 1983). A intromissão peniana e a ejaculação do macho na fêmea só ocorrem na ocasião do reflexo de lordose, desencadeado pela monta do macho sobre a fêmea. O circuito neural e alguns dos genes envolvidos nos mecanismos de suporte para este tipo de comportamento requer estrogênio (E) seguido de progesterona (P), a fim de que o comportamento sexual da fêmea ser sincronizado com o fenômeno da ovulação, o que apresenta o mesmo efeito combinatorial (E + P; PFAFF et al., 1994; PFAFF, 1999; PFAFF; PHILLIPS; RUBIN, 2004).

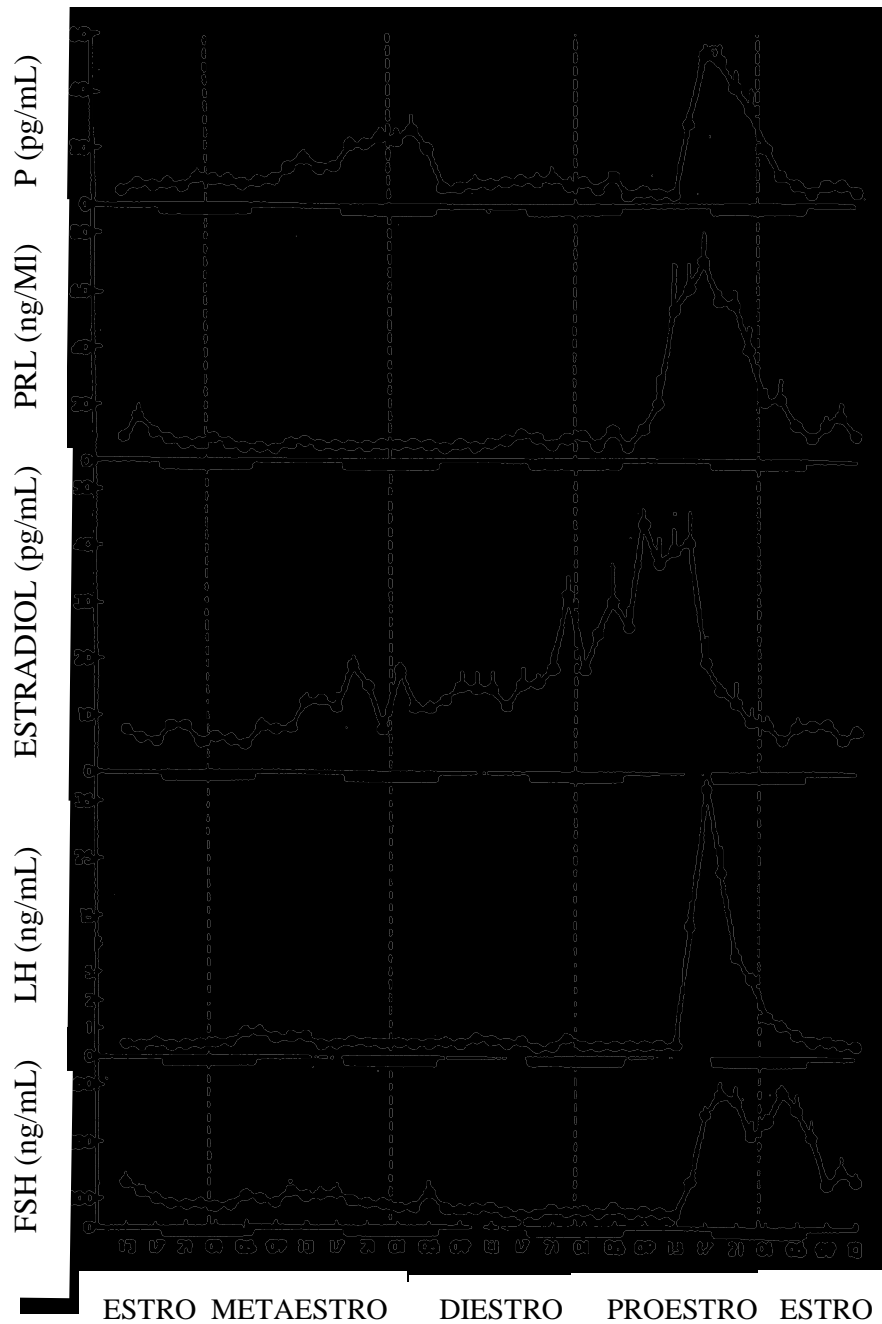


Figura 3. Concentrações plasmáticas de progesterona (P), prolactina (PRL), estradiol, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) obtidas em intervalos de 2 horas nas quatro fases do ciclo estral da rata. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo diário claro-escuro (SMITH et al., 1975).

A via dependente de E e P, a qual exerce um efeito facilitatório sobre o reflexo de lordose, inclui a MeA, o sistema olfatório acessório (AOS), e o hipotálamo ventromedial

(VMH). O AO é formado pelo órgão vomeronasal (VO), pelo bulbo olfatório acessório (AOB), e por projeções do bulbo olfatório acessório. Entre outros odores, os feromônios são detectados pelo VO e enviados para a MeA, a qual envia axônios para o VMH (RAJEDREN; DUDLEY; MOSS, 1991; 1992; RAJEDREN; MOSS, 1993; KONDO; ARAI, 1995).

Com base em investigações acerca do envolvimento dos hormônios na plasticidade da MeA e sua interrelação com funções de regiões dimórficas sexualmente, propõe-se o esquema apresentado na figura 4.

1.3.3. Dimorfismo sexual nos subnúcleos da MeA

Cerca de 80 a 90% dos neurônios da MeA que apresentam receptores para estrógenos também possuem para andrógenos (GRECÓ et al., 1998). A distribuição de receptores para hormônios sexuais entre os subnúcleos da MeA, entretanto, não é homogênea. Neurônios com receptores para andrógenos estão mais concentrados no MePD e no MePV (SIMERLY et al., 1990; GRECÓ et al., 1998). Há receptores de tipos α e β para estrógeno no MeAD e no MePV (LI; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997; SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997; ÖSTERLUND et al., 1998), mas foram detectados mais frequentemente no MePD (SIMERLY et al., 1990; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997; ÖSTERLUND et al., 1998).

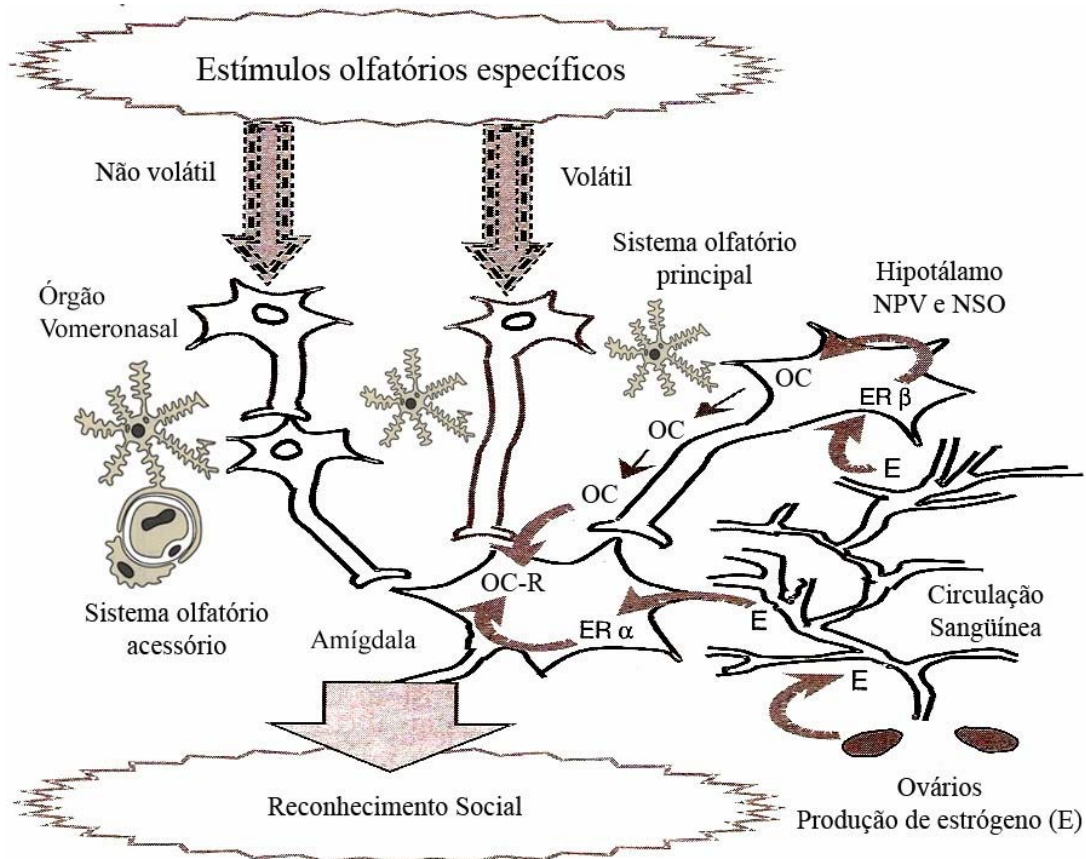


Figura 4: Mecanismos genômicos e neuronais da influência de hormônios sobre o reconhecimento social. Estrogênios produzidos nos ovários circulam no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), onde se ligam aos ER- β e estimulam a transcrição da ocitocina (OC). OC é transportada para a amígdala. Enquanto isso, estrogênios circulam na amígdala, onde se ligam a ER- α , estimulando a transcrição do receptor OC (OC-R). OC, operando nos OC-R da amígdala, promove o reconhecimento social. Em camundongos, animais altamente olfativos, a sinalização olfativa ao longo dos sistemas olfatórios principal e acessório provém estímulos para a amígdala, pela qual o camundongo reage, utilizando o sistema OC/OC-R, influenciado pelo estrogênio (adaptado de CHOLERIS; GUSTAFSSON, 2003)

O papel fisiológico desses receptores parece estar relacionado com o aumento das atividades dos neurônios dos subnúcleos da MeA. É interessante observar que o bloqueio do receptor para androgênios no núcleo medial da amígdala não inibe o comportamento sexual do rato (McGINNIS; WILLIAMS; LUMIA, 1978), mas o estradiol implantado na amígdala corticomedial aumenta o comportamento de acasalamento de ratos adultos castrados (RASIA-FILHO et al., 1991). Além disso, o estradiol na amígdala medial de hamsters machos pode

aumentar o comportamento sexual destes animais, o que não ocorre com a diidrotestosterona (SWANN; FIBER, 1997).

Receptores de progesterona também foram detectados na MeA (SIMERLY, 2002), além de aromatase (SHINODA; NAGANO; OSAWA, 1994; WAGNER; MORRELL, 1996), o que denota a amplitude da sua relação com hormônios sexuais.

A expressão de diferentes substâncias na MeA também tem características dimórficas. Machos apresentam uma maior expressão de peptídeos como colecistoquinina (CCK; MICEVYCH; MATT; GO, 1988; SIMERLY, 1990), substância P (FRANKFURT et al., 1985; MICEVYCH; MATT; GO, 1988), vasopressina (DE VRIES, 1995) e leucina-encefalina (STEFANOVA; OVTSCHAROFF, 2000) do que as fêmeas. Alguns dos neurotransmissores presentes na MeA também mostraram uma variação ao longo do ciclo estral. A densidade de células imunorreativas à CCK, as quais se localizam preferencialmente no MePD, é maior durante o proestro e menor durante o diestro. O papel do estradiol na regulação dessas células também foi demonstrado quando ratas ovariectomizadas apresentaram um declínio no número de células que expressavam CCK, resultado que se reverteu após terapia substitutiva com estrógeno (ORO; SIMERLY; SWANSON, 1988; SIMERLY, 1990).

O volume da MeA em ratos é maior em machos do que em fêmeas (HINES; ALLEN; GORSKI, 1992; MIZUKAMI; NISHIZUKA; ARAI, 1983). A castração destes animais provoca a redução do volume da MeA em ratos adultos (MALSBUURY; MCKAY, 1994) e modifica a morfologia dendrítica dos neurônios da MeA em hamsters machos adultos (GOMEZ; NEWMAN, 1991). Além disso, embora as fêmeas tenham um maior número de neurônios expressando GABA do que os machos (STEFANOVA, 1998; STEFANOVA; OVTSCHAROFF, 2000), estes últimos também apresentam mais RNAm para a glutamato descarboxilase (GAD) na MeA do que as fêmeas (SEARLES et al., 2000).

Machos apresentam maior volume total na MePD (HINES; ALLEN; GORSKI, 1992; KERCHNER et al., 1995; COOKE; TABIBNIA; BREEDLOVE, 1999) e mais espinhos dendríticos (RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999; RASIA-FILHO et al., 2004) do que fêmeas. Ratas em proestro apresentaram um menor número de espinhos dendríticos nos primeiros micrômetros dendríticos de neurônios na MePD e na MePV do que fêmeas em diestro (RASIA-FILHO et al., 2004), enquanto ratas ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol ou benzoato de estradiol adicionado de progesterona, apresentaram mais espinhos dendríticos na MePD do que as ratas ovariectomizadas tratadas somente com veículo oleoso (DE CASTILHOS, 2005).

O sistema vomeronasal, o núcleo cortical pósteromedial da amígdala, o BNST, a área pré-óptica medial e o hipotálamo ventromedial apresentam características sexualmente dimórficas. Todas estas regiões conectam-se com a MeA, o que sugere haver uma circuitaria neural exclusiva de cada sexo envolvendo essas regiões (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; GUILLAMÓN; SEGOVIA, 1997).

Hormônios gonadais podem provocar outras variações morfológicas nos neurônios da MeA, onde foi observado que o tamanho deste núcleo, o número de espinhos dendríticos e a quantidade de receptores nicotínicos para acetilcolina é maior em ratos do que em ratas (HINES; ALLEN; GORSKI, 1992; RASIA-FILHO et al., 1999; 2004; DE CASTILHOS, 2005). Ratos adultos gonadectomizados tratados com testosterona apresentam um aumento da MePD quando comparados a ratos controles (COOKE; TABIBNIA; BREEDLOVE, 1999).

O volume somático neuronal é um parâmetro sexualmente dimórfico na MePD e na MePV, sendo maior em machos do que em fêmeas em proestro e estro, mas não em fêmeas em diestro e, embora apresente uma tendência de diminuição, não se modifica significativamente ao longo do ciclo estral em ambos os subnúcleos citados (HERMEL et al., 2006; ROCHA, 2006).

Hormônios gonadais atuam também sobre células gliais, podendo modificar a morfologia e função destas células, especialmente nas áreas sabidamente dimórficas (GARCIA-SEGURA; McCARTHY, 2004). Diferenças sexualmente dimórficas foram também detectadas na glia, uma vez que fêmeas apresentaram uma maior expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) dos astrócitos do que os machos (RASIA-FILHO et al., 2002).

Por muitos anos as células gliais não foram consideradas como componentes relevantes no processo de diferenciação sexual das estruturas do SN. Todavia, evidências recentes têm demonstrado que as células gliais são igualmente afetadas por esteróides gonadais e ativamente envolvidas nos efeitos desses esteróides na organização estrutural do sistema nervoso (GARCIA-SEGURA et al., 1999; GARCIA-SEGURA; McCARTHY, 2004).

1.4. Astrócitos: estrutura, funções, interações e plasticidade

As células não-neuronais, chamadas neurógliá ou células da glia, foram reconhecidas como elementos independentes no sistema nervoso há aproximadamente um século e meio por Virchow (1846). Historicamente, as células gliais eram consideradas um tipo de tecido conjuntivo do SNC, as quais tinham a função de prover suporte às verdadeiras células funcionais do encéfalo, os neurônios. Em contraste com estas crenças antigas, as células gliais são hoje reconhecidas como parceiras íntimas de neurônios em virtualmente toda a função nervosa, além de participantes da fisiopatologia do SN com disfunção ou doença (KETTENMANN; RANSON, 1995; 2005; LAMING et al., 2000; GARCIA-SEGURA; McCARTHY, 2004).

Como o nome sugere, *astrócitos* são células em forma de estrela que constituem cerca de 20 a 50% do volume das principais áreas do encéfalo. As duas principais formas,

protoplasmática e *fibrosa*, predominam na substância cinzenta e branca respectivamente (PRIVAT et al., 1995). Todavia, os astrócitos apresentam particularidades e variações que permitem classificá-los de modo mais abrangente (KETENNMAN; RANSOM, 2005; RAO; JACOBUS, 2004; HOF et al., 1999). A figura 5 apresenta diferentes morfologias e funções das células astrogliais.

No SNC adulto, os astrócitos são localizados quase uniformemente ao longo do parênquima encefálico, oferecendo a ele isolamento através da extensão de longos processos, com projeções para o epêndima e a superfície da pia-máter. Além disso, os astrócitos associam-se a vasos sanguíneos, cobrindo a superfície dos capilares com terminações gliais ou pés terminais. Eles também envolvem sinapses e dendritos e projetam processos para somas neuronais, oligodendrócitos e outros astrócitos, além de formarem uma bainha entre os nodos de Ranvier (HOF et al., 1999; RAO; JACOBUS, 2004; KETENNMAN; RANSOM, 2005).

As células astrocitárias são conectadas entre si por junções comunicantes do tipo “*gap*”, formando um sincício que permite difundir íons e pequenas moléculas através do parênquima nervoso. Estas células têm em comum propriedades citológicas e imunológicas únicas que as tornam de fácil identificação, incluindo, além do seu formato, uma única população de grandes feixes de filamentos intermediários (HOF et al., 1999).

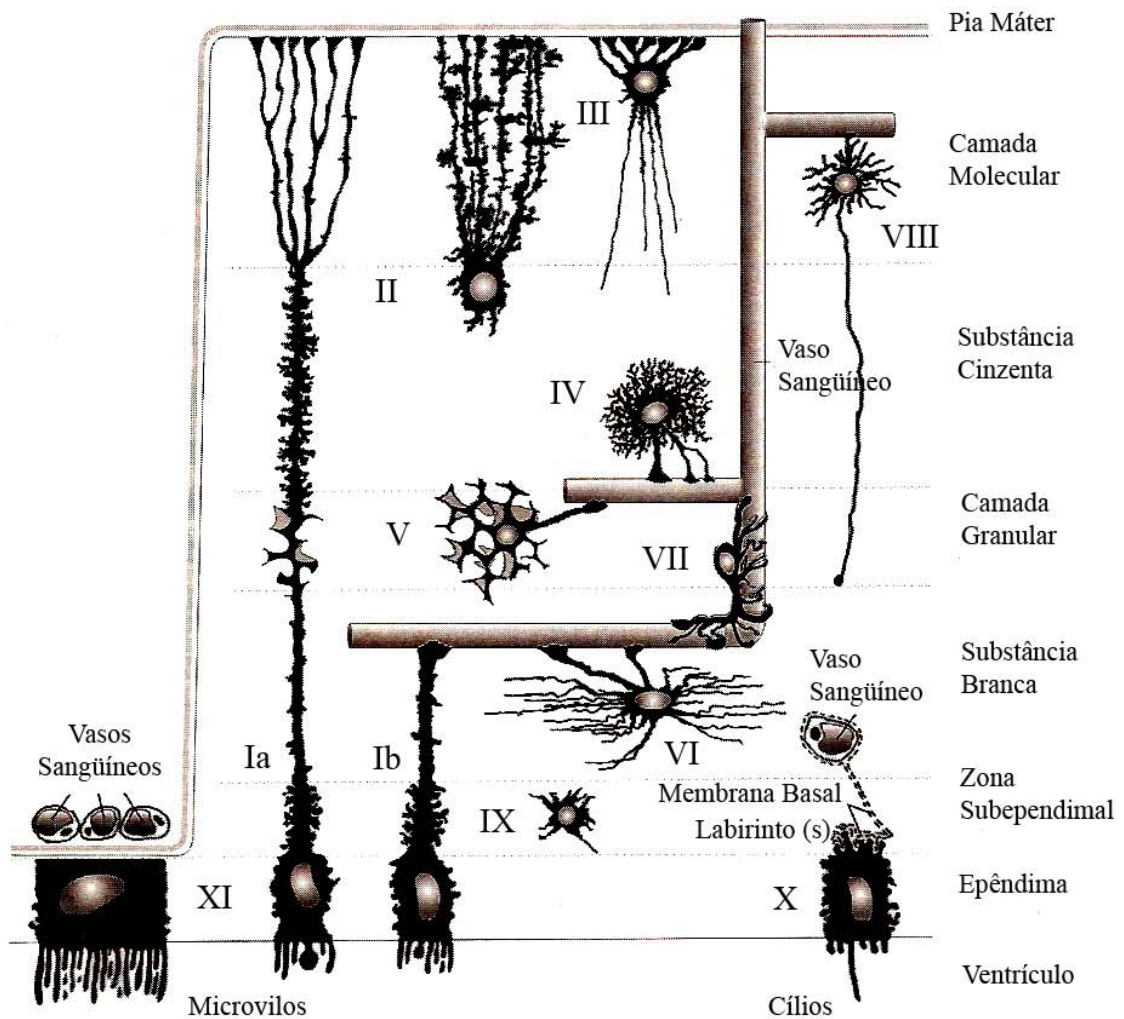


Figura 5. Esquema dos principais tipos de células astrogliais e endoteliais e sua localização em diferentes camadas/regiões especializadas do sistema nervoso central. I: tanócitos (a: pial; b: vascular); II: astrócito radial (célula glial de Bergmann); III: astrócito marginal; IV: astrócito protoplasmático; V: astrócito velado; VI: astrócito fibroso; VII: astrócito perivascular; VIII: astrócito interlaminar; IX: astrócito/glioblasto imaturo; X: ependimócito; XI: célula do plexo coróide (KETENMANN; RANSOM, 2005).

A característica eletrofisiológica predominante das células gliais é manter a alta permeabilidade relativa ao K^+ da sua membrana, já que estas células possuem muitos tipos de canais de K^+ (DUFFY; FRASER; MACVICAR, 1995), o que permite a elas regular o K^+ extracelular. Esta função se relaciona funcionalmente com atividade sensorial, aprendizado e estados motivacionais (LAMING et al., 2000).

Dentre as muitas funções dos astrócitos, são incluídas a regulação da concentração iônica extracelular, detoxificação xenobiótica, modificação da eficácia sináptica, inativação de neurotransmissores, indução e manutenção da barreira hemato-encefálica, e glia limitante, além de prover nutrientes e suporte trófico para neurônios e oligodendrócitos (RAO; JACOBUS, 2004; KETTENMAN; RANSON, 2005).

O citoesqueleto é essencial para muitos processos celulares, incluindo força mecânica, movimento, adesão, polaridade e trânsito intracelular (KETTENMANN; RANSOM, 2005). As estruturas citoplasmáticas mais específicas dos astrócitos são os gliofilamentos intermediários, organizados em feixes, variando em quantidade total de um astrócito para outro. Estes filamentos parecem ser mais abundantes em astrócitos fibrosos, além de serem mais abundantes nos processos do que no citoplasma perinuclear (PRIVAT; GIMENEZ-RIBOTTA; RIDET, 1995), com disposição radial ao longo do citoplasma, onde se associam com a membrana celular (ENG; LEE, 2005). O citoesqueleto dos astrócitos é composto de três principais componentes filamentosos, os quais são *microfilamentos* (principalmente actina), *microtúbulos* (principalmente tubulinas) e *filamentos intermediários* (IFs; HOF et al., 1999; GOMES; PAULIN; MOURA-NETO, 1999).

Originalmente, cinco classes distintas de proteínas IF foram definidas no tipo básico de célula ou tecido específico, onde foram isoladas e caracterizadas: queratina nas células epiteliais, vimentina (VIM) nas células de origem mesenquimal, desmina nas células musculares e proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em astrócitos e neurofilamentos em neurônios (KETTENMANN; RANSOM, 2005). Todas as proteínas formadoras de IFs possuem uma haste central tipo α -hélice, conservando comprimento e estrutura secundária, mas com diferenças específicas. Goldman e Steinert (1990) sugeriram então uma classificação em diferentes subtipos de IFs, o que foi mais tarde complementado por Fuchs e Weber (1994), conforme propriedades como a homologia da seqüência protéica, o padrão

de expressão do tipo específico de célula e a similaridade de posição de íntrons e seus genes (ENG; LEE, 1995; 2005).

Tipo I: queratinas acídicas

Tipo II: queratinas básicas-neutras

Tipo III: incluem vimentina, desmina, GFAP, sinemina, periferina

Tipo IV: neurofilamentos clássicos, α -internexina, nestina

Tipo V: lâminas nucleares/ laminas

As investigações da GFAP iniciaram com as pesquisas sobre esclerose múltipla. A GFAP pode funcionar oferecendo estabilidade estrutural ao astrócito e seus processos (ENG; LEE, 1995; 2005). Esta subunidade dos filamentos intermediários gliais, é uma proteína com peso molecular entre 47-53 kD, que tem como função estabilizar o citoesqueleto dos astrócitos para manter a forma celular, por meio de interação entre seus filamentos, formando uma conexão entre as membranas nuclear e plasmática. Há ainda proteínas associadas aos IFs, tais como a plectina, a qual se co-localiza com IFs em contato focal, bem como em sítios de fibras de actina (RUTKA et al., 1997). Os IFs parecem se ligar com filamentos de actina por meio de proteínas ligantes, de forma que se conectam aos domínios citoplasmáticos das integrinas. Integrinas tipo I são proteínas transmembranas com domínio extracelular e citoplasmático. Sugere-se então que a actina e portanto a GFAP estejam fisicamente ligadas à membrana plasmática e juntas respondam à mudanças na morfologia celular ou ao microambiente celular (figura 6; RUTKA et al., 1997).

GFAP, tal como outros IFs, possui algumas propriedades químicas e domínios polipeptídicos intramoleculares comuns. Esta proteína tem ainda alguns epítomos únicos e altamente imunogênicos. Anticorpos policlonais de alta afinidade e anticorpos monoclonais preparados para GFAP detectam esses epítomos específicos, por isso têm sido utilizados para auxiliar em pesquisas relativas à plasticidade glial (ENG; LEE, 1995; ENG et al., 2000). Ao invés de uma mera integrante mecânica do espaço celular, a GFAP pode prover sítios de

ancoragem para importantes quinases que reconhecem substratos celulares importantes, os quais habilitam a GFAP a formar uma rede contínua e dinâmica com microfilamentos, receptores de integrinas e a matriz extracelular (RUTKA et al., 1997).

IFs são regulados por modificações pós-translacionais e de proteínas-ligantes. As principais modificações pós-translacionais incluem fosforilação, transglutaminação, glicosilação e proteólises mediadas por caspases (TOIVOLA et al., 2005). A fosforilação e a desfosforilação de resíduos de aminoácidos específicos da região amino-terminal dos filamentos intermediários está envolvida na regulação da polimerização da GFAP, o que pode trazer profundos efeitos na estrutura do citoesqueleto, podendo induzir a mudanças na morfologia similar ao que ocorre na gliose reativa. A fosforilação de subunidades inibe a polimerização da GFAP (INAGAKI et al., 1994).

Nos estágios iniciais do desenvolvimento do SNC, os filamentos intermediários da glia radial e astrócitos imaturos são compostos de VIM. Seu filamento, medindo de 7 a 11 nm, é encontrado sobretudo em células mesenquimais, fibroblastos, células de musculatura lisa e em culturas de células (PIXLEY; VELLIS, 1984). Estudo com gliose reativa identificou VIM na periferia da lesão, o que se sugeriu estar relacionado com astrócitos em proliferação (SCHIFFER et al., 1986).

Próximo ao nascimento começa a ocorrer uma troca da VIM por GFAP no SNC de ratos. Os filamentos intermediários contendo VIM parecem ser reunidos primeiro em células precursoras de astrócitos, seguida pela co-expressão de GFAP e VIM por volta das duas primeiras semanas pós-natal e, finalmente, a presença de duas populações de astrócitos diferenciados, uma expressando somente GFAP e a outra também expressando VIM no adulto (PIXLEY; VELLIS, 1984; CALVO et al., 1991).

Os IFs desempenham também funções reguladoras em organelas como mitocôndria, complexo de Golgi e também no núcleo celular. Embora algumas destas funções tenham sido comprovadas apenas em células em cultura, outras puderam ser constatadas em tecidos animais (TOIVOLA et al., 2005).

Os astrócitos, tal como as células de Schwann, por sua íntima associação com sinapses, estão estrategicamente posicionados para regular a transmissão sináptica. Esta capacidade permite a inferência de que astrócitos são elementos integrais da circuitaria e plasticidade sináptica. Além disso, devido ao fato de que a alta razão glia-neurônio é encontrada no topo da árvore filogenética no cérebro humano, recentes demonstrações da sinalização entre astrócitos e neurônios deixam a questão se astrócitos são elementos reguladores-chave para altas funções corticais (ARAQUE; CARMIGNOTO; HAYDON, 2001).

As células astrocitárias podem ainda responder à atividade neuronal e ativamente modular a neurotransmissão por meio da liberação de transmissores gliais tais como o glutamato, ATP e serina D (HAYDON; CARMIGNOTO, 2006). A liberação vesicular de gliotransmissores em resposta à ativação de receptores de membrana é cálcio-dependente, o que depende de proteínas *SNARE*. Entretanto, muitas questões acerca da modulação da exocitose de gliotransmissores permanecem desconhecidas (CRAVEN, 2005).

Astrócitos são considerados elementos sinalizadores dinâmicos que integram aferências neuronais, exibem excitabilidade ao cálcio e podem modular neurônios vizinhos. A atividade neuronal pode levar a uma ativação de receptores astrocíticos, considerada neurotransmissor-evocada. Elevações do cálcio astrocitário, por sua vez, provocam a liberação de transmissores químicos dos astrócitos, os quais podem causar ações modulatórias sustentadas nos neurônios vizinhos (LAMING et al., 2000; ARAQUE; CARMIGNOTO; HAYDON, 2001).

A comunicação entre neurônios e astrócitos é recíproca, de forma que o astrócito responde à atividade neuronal, mas também modula a excitabilidade dos primeiros e até a transmissão sináptica (GARCIA-SEGURA; McCARTHY, 2004). Os astrócitos parecem liberar alguns gliotransmissores, os quais atuam como moduladores da fisiologia neuronal. Evidências recentes indicam que os astrócitos possuem algumas propriedades-chave. Eles discriminam atividades de diferentes sinapses e respondem seletivamente a diferentes vias axonais (KETENMAN; RANSOM, 2005). Além disso, o sinal de Ca^{2+} astrocitário é modulado pela atividade simultânea de diferentes aferências sinápticas. Esta modulação do sinal de Ca^{2+} depende das propriedades intrínsecas do astrócito, sendo regulada bidirecionalmente pelo nível da atividade sináptica, bem como por controles da extensão espacial do sinal de Ca^{2+} intracelular (COOPER, 1995; ARAQUE; CARMIGNOTO; HAYDON, 2001).

O modelo arquitetural das interdigitações entre astrócitos vizinhos com processos sobrepostos, baseados nos procedimentos de prata e imunorreatividade à GFAP, foi desafiado pelos resultados obtidos com o uso de microinjeções de corantes fluorescentes em astrócitos hipocâmpais. O arranjo ordenado destas células pode ser mostrado com a mínima sobreposição. Esta ordem determinada no período pós-natal precoce, em paralelo com os territórios vascular e neuronal, permite que cada astrócito cubra um território específico entre

vasos e sinapses. Frações deste território podem todavia ser controladas autonomicamente por micro-domínios astrocitários especializados. Estes micro-domínios de finas expansões celulares, de composição estrutural e motilidade única, permitem interrelações específicas com as sinapses que as rodeiam, com os pés sugadores, de onde os sinais podem ser propagados aos pés terminais seguintes sem difundir pelo resto da célula (figura 7; BUSHONG et al., 2002).

Como conseqüência de evidências sugestivas da existência da comunicação bidirecional entre astrócitos e neurônios, há uma forte indicação de papel ativo das células astrocitárias na fisiologia do sistema nervoso. Como conseqüência desta evidência, um novo conceito de fisiologia sináptica, “a sinapse tripla”, tem sido proposto, onde a sinapse é formada por três elementos funcionais: os elementos pré- e pós-sinápticos e os astrócitos circunjacentes (ARAQUE et al., 1999; PEREA; ARAQUE, 2002; 2006).

A atenção de pesquisadores recentemente se voltou para o papel dos astrócitos como intermediários primários entre a atividade neuronal e o aumento do fluxo sanguíneo (ROSSI, 2006). A ativação de astrócitos induz vasodilatação local e aumento do fluxo sanguíneo, por meio de uma via de sinalização que inclui metabólitos de ciclooxigenase (COX1; TAKANO et al., 2006). Enviando processos especializados para a vasculatura (SIMARD et al., 2003) e para os contatos sinápticos (VENTURA; HARRIS, 1999), astrócitos individuais provêm uma clara ligação anatômica entre neurônios e arteríolas. Estas células gliais percebem e respondem ao glutamato liberado sinápticamente (HAYDON, 2001; ZONTA et al., 2003). A ativação dos receptores glutamatérgicos dos astrócitos elevam as ondas de cálcio que se espalham ao longo dos processos astrocitários (figura 8).

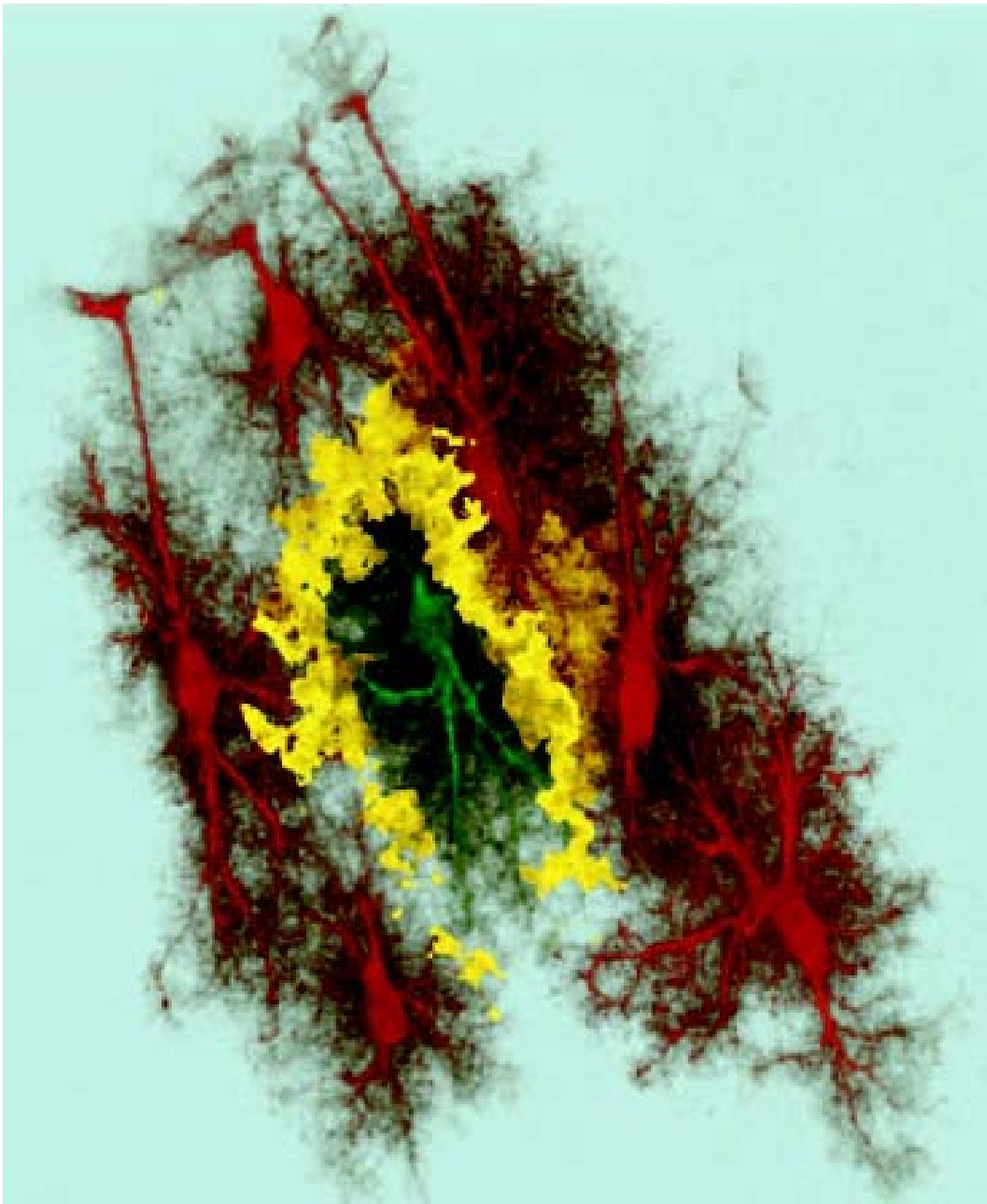


Figura 7: Visão tridimensional da organização de astrócitos em domínios anatómicos separados. Um grupo de astrócitos protoplasmáticos corados, da camada molecular da CA1 do hipocampo foi examinado por meio de células limitantes, com diferentes corantes fluorescentes (CF; Alexa 468, CF verde e Alexa 488, CF vermelho) por microinjeção. A discreta região de interação dos finos processos terminais foi revelada pelo amarelo, primeiramente esboçando levemente como imagens (utilizando um filtro normal) e então remapeando a cor da área resultante de sobreposição para destacar o amarelo. Isto mostra onde os finos processos terminais dos astrócitos divisórios estão intimamente próximos um ao outro, apesar de não haver sobreposição de fato. Uma fronteira de cada astrócito tem uma superfície distinta que limita astrócitos circunjacentes. Os processos finos e longos que se estendem de cada célula, apresentados nesta figura, são o sifão dos processos dos astrócitos, os quais terminam em superfícies podais que se alinham ao vaso sanguíneo adjacente (BUSHONG et al., 2002).

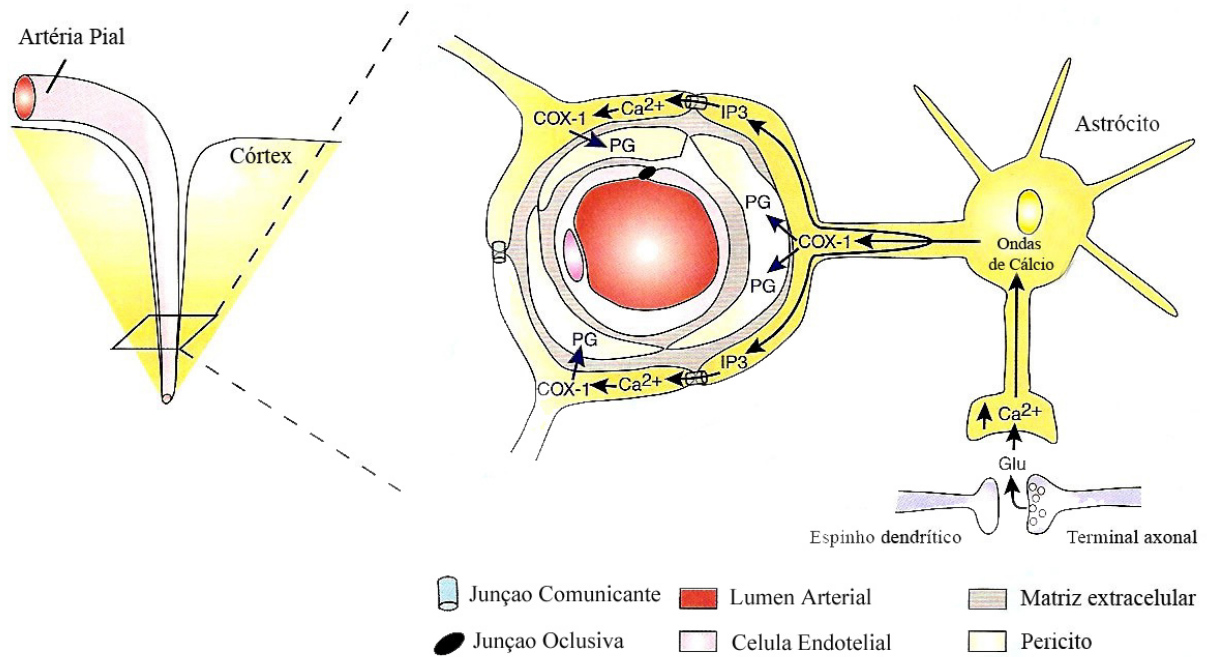


Figura 8: Astrócitos acoplados aumentam o fluxo sanguíneo local para a atividade neuronal. Pelo envio de processos especializados para arteríolas (pés terminais astrocitários) e para sinapses glutamatérgicas, astrócitos corticais formam uma ligação anatômica entre neurônios e suporte vascular. Durante a atividade neuronal, glutamato transborda de sinapses glutamatérgicas, e, por meio de ativação de receptores metabotrópicos de glutamato, libera uma onda de cálcio astrocitária. Como a onda de cálcio invade um pé terminal astrocitário, Ca^{2+} estimula a fosfolipase A2 para produzir ácido araquidônico (AA). O AA é metabolizado pela ciclooxigenase, COX-1, em uma prostaglandina vasodilatadora (PG). A vasodilatação coordenada é facilitada pela produção de IP3 induzida por Ca^{2+} , o qual passa ao longo de junções *gap* para liberar ondas de cálcio sincronizadas e produção de PG na vizinhança dos pés terminais. Para simplificação, PG é representada como um indutor de vasodilatação pela ação de pericitos que circundam a arteríola. Todavia, o sítio de ação da PG é desconhecido e existem outros tipos de células associadas a arteríolas (TAKANO et al., 2006).

O glutamato parece ser o principal sinal que transita entre neurônios excitados e astrócitos, além de amônia, produzida e liberada pelos neurônios excitados no espaço extracelular. Ambas substâncias são metabolizados por astrócitos e formam glutamina. Desequilíbrios na interação neurônio-glia podem comprometer tais mecanismos, contribuindo para doenças do SNC (TSACOPOULOS, 2002).

As interações neurônio-glia desempenham um importante papel em várias etapas da morfogênese do sistema nervoso, desde os primeiros estágios de neurogênese e gliogênese até estágios tardios de estabelecimento de conexões neurais. Muitos fatores de crescimento estão envolvidos na gliogênese. Além disso, fatores epigenéticos estão relacionados ao destino neural, especificação de linhagens e diferenciação celular no SNC. Dentre eles, alguns iniciam em fases muito precoces do desenvolvimento, devido a fatores difusíveis e contatos celulares encontrados no ambiente do desenvolvimento (GOMES; MARTINEZ; MOURA-NETO, 2001). A síntese e secreção do fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) estão fortemente envolvidas no processo de diferenciação astrocitária, o que provavelmente seja mediado pelos neurônios (SPOHR et al., 2002).

Estudos em cultura de células apontam outro papel para as células gliais na formação e plasticidade de conexões sinápticas. Neurônios necessitam importar colesterol derivado da glia via lipoproteínas para formar conexões sinápticas numerosas e eficientes (GÖRITZ et al., 2002).

A presença de receptores para esteróides hormonais não é limitada a neurônios, sendo também encontradas concentrações similares em elementos gliais (VIELKIND et al., 1990). Além disso, o complexo enzimático 5α -reductase- 3α -hidroxiesteróide desidrogenase é também funcional nas células gliais. Conseqüentemente, hormônios sexuais como a progesterona e a testosterona podem ser convertidos em seus respectivos metabólitos (MELCANGI et al., 1993; 1994).

As células gliais estão ativamente envolvidas nos efeitos ativacionais e organizacionais dos hormônios esteróides (GARCIA-SEGURA et al., 1999). De fato, parece haver uma participação simultânea de neurônios e células gliais no metabolismo da testosterona e talvez de outros esteróides, em diferentes populações celulares do SNC (MELCANGI et al., 1993; 2002).

O estradiol pode modular o formato celular e a distribuição de proteínas nos astrócitos em cultura, sugerindo que os astrócitos podem ser suscetíveis a esteróides sexuais durante o desenvolvimento do SNC (GARCIA-SEGURA et al.,1989). Estudos *in vivo* e *in vitro* evidenciaram diferenças nos níveis de estradiol em astrócitos e microglia de ratos em diferentes fases do ciclo estral (STONE et al., 1997), demonstrando também que a GFAP-ir pode ser modificada pela manipulação dos hormônios esteróides em áreas encefálicas sexualmente dimórficas (CONEJO et al., 2003; GARCIA-SEGURA et al., 1994; HAJÓS et al., 2000; KOHAMA et al., 1995). Estudo imunistoquímico de GFAP no globo pálido, hipocampo e hipotálamo demonstrou a influência do estradiol sobre as células gliais (TRANQUE et al.,1987).

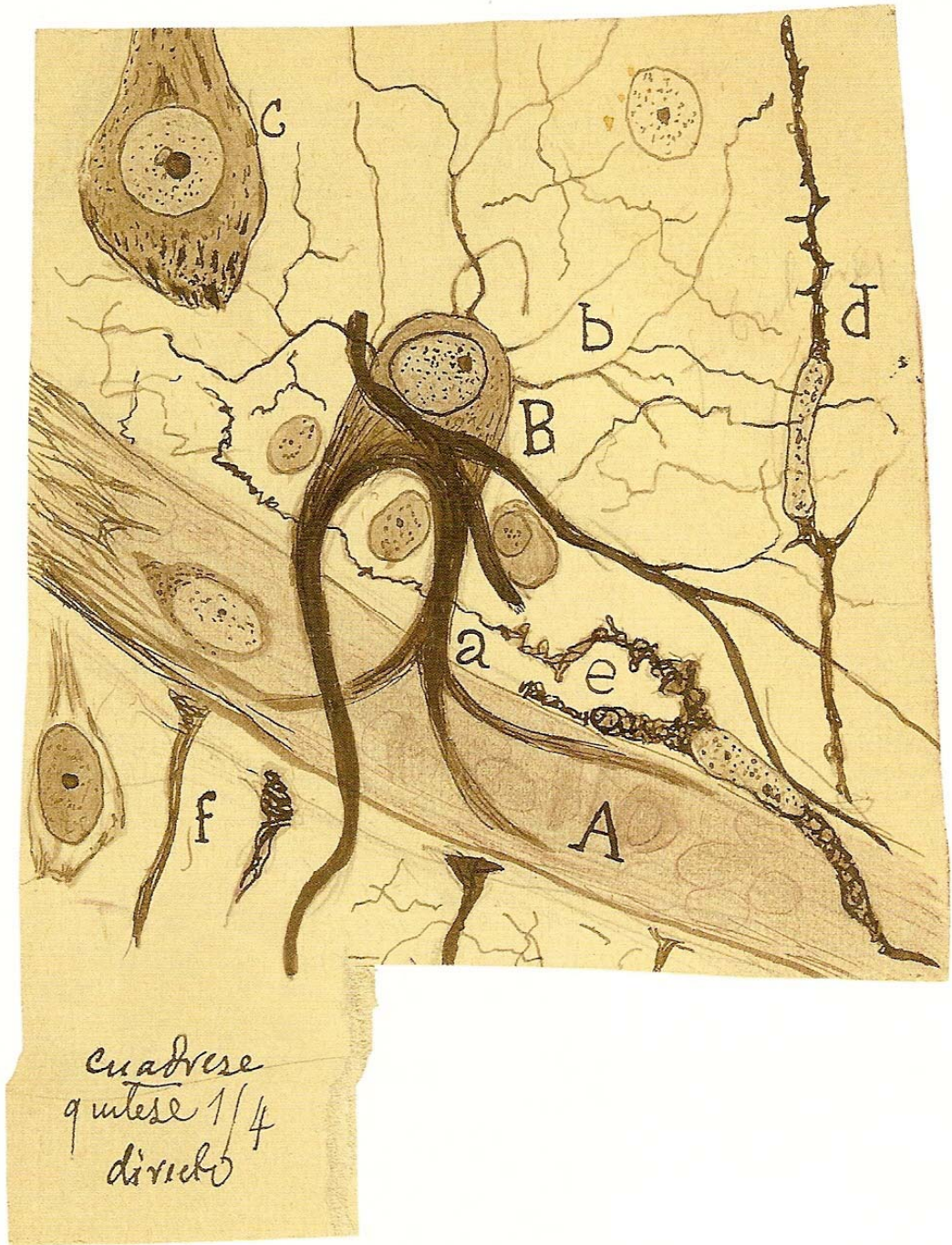
A castração de ratos machos provocou o aumento dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) para GFAP no hipocampo (DAY et al., 1990; 1993), efeito que foi revertido pelo estradiol, mas não pela testosterona e dihidrotestosterona. Houve redução da GFAP-ir no hipotálamo após a castração, o que foi revertido pela testosterona ou dihidrotestosterona, mas não pelo estradiol, (DAY et al., 1993).

Considera-se ainda que células gliais podem modular a atividade de neurônios que sintetizam e liberam o hormônio GnRH. Astrócitos tanto de origem cortical quanto hipotalâmica também podem intervir na liberação do LH (MELCANGI et al.,1995). Os fatores de crescimento envolvidos nestes efeitos são o TGF α , o TGF β 1, o TGF β , o fator de crescimento fibroblástico básico (BFGF) e o fator de crescimento similar à insulina (IGF-I), o que se une ao controle de secreção de GnRH por meio de aferências neuronais e ação dos hormônios gonadais por meio de *feedback* positivo ou negativo (MELCANGI; MARTINI; GALBIATI, 2002).

Células gliais são consideradas elementos-chave do SNC por serem capazes tanto de enviar quanto de receber sinais hormonais. Embora haja um interesse investigativo evidente

quanto à glia e ao dimorfismo sexual, poucas pesquisas referentes a este aspecto especificamente na amígdala têm sido realizadas. A existência de dimorfismo sexual em alguns núcleos amigdalianos sugere que a mesma contribua para diferenças comportamentais entre ratos fêmeas e machos (RASIA-FILHO et al., 1999; 2004; DE CASTILHOS et al., 2006; HERMEL et al., 2006). A amígdala medial de machos e fêmeas em diestro apresenta diferença na expressão de GFAP em astrócitos, sendo maior em fêmeas (RASIA-FILHO et al., 2002). Todavia, mais investigações sobre a plasticidade glial na MeA são necessárias, tanto em animais adultos quando durante o desenvolvimento. Tal demanda motivou a realização deste trabalho.

Hipotetiza-se aqui que o ciclo estral da rata provoque variações na GFAP-ir de um ou mais subnúcleos da MeA, o que também deve ocorrer com a ovariectomia seguida de reposição de estradiol adicionado ou não à progesterona. Além disso, acredita-se que haja dimorfismo sexual quanto à GFAP-ir e VIM-ir na MeA, durante o desenvolvimento pós-natal de ratos.



2. OBJETIVOS

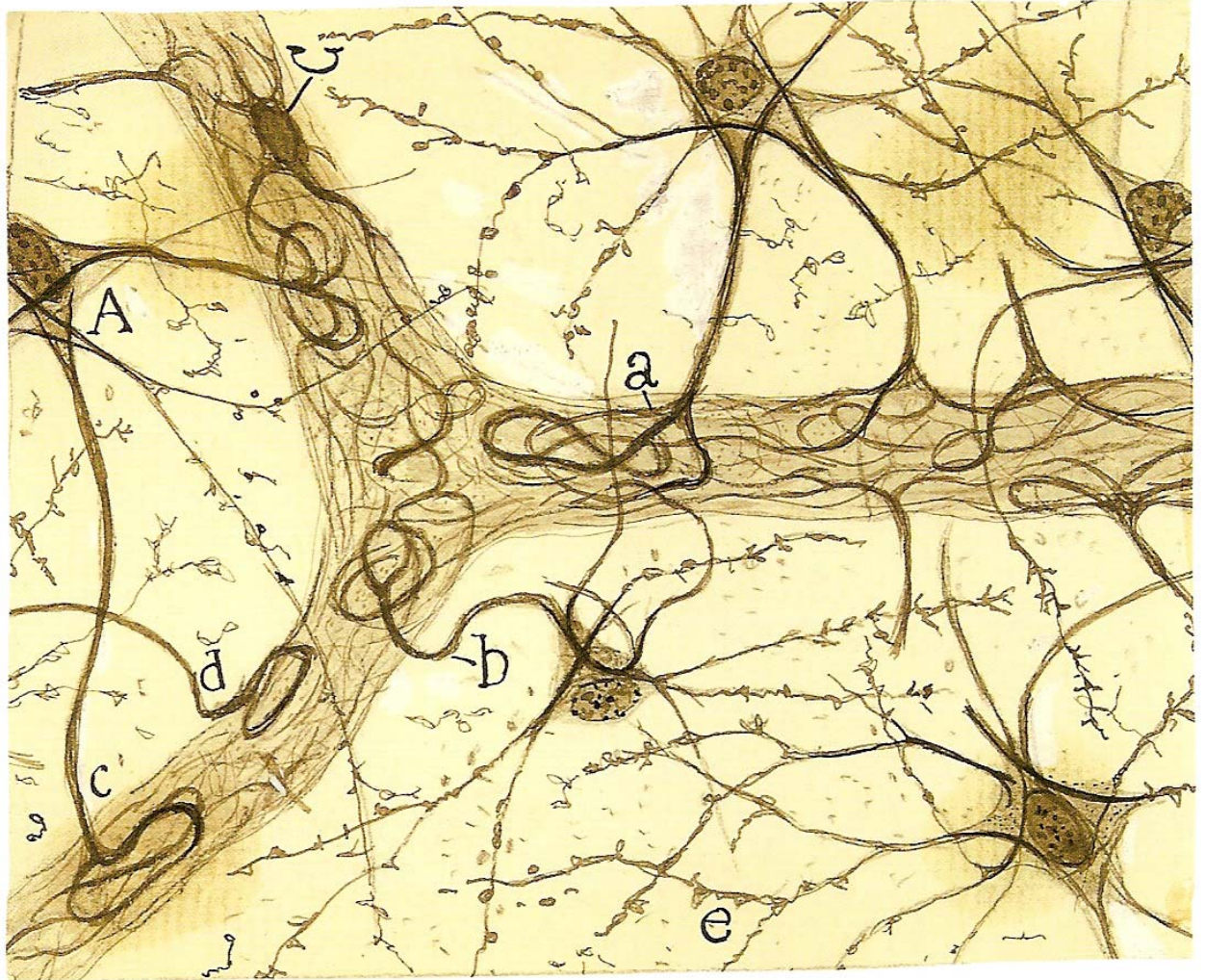
a) Objetivo Geral

Estudar as diferenças relacionadas ao sexo, ao ciclo estral e à influência dos hormônios gonadais na expressão de gliofilamentos dos subnúcleos da MeA.

b) Objetivos Específicos

Considerando-se a susceptibilidade dos gliofilamentos dos subnúcleos da MeA aos níveis de hormônios gonadais de roedores, estudar-se-ão:

- 1) A plasticidade astrocitária nos subnúcleos da amígdala medial durante o desenvolvimento pós-natal de ratos machos e fêmeas utilizando-se imunohistoquímica para os marcadores de filamentos intermediários de células gliais, GFAP e VIM;
- 2) O dimorfismo sexual de ratos durante o desenvolvimento da expressão dos filamentos intermediários GFAP e VIM relacionando as variáveis idade, sexo e subregião da MeA;
- 3) A influência dos hormônios gonadais femininos em níveis fisiológicos sobre a expressão de GFAP nos subnúcleos da MeA: MeAD, MePD e MePV, relacionando subregiões e fases do ciclo estral;
- 4) A influência da castração de fêmeas ou dos hormônios estradiol e progesterona em níveis supra-fisiológicos, combinados ou não, em terapia substitutiva sobre a expressão de GFAP nos subnúcleos da MeA: MeAD, MePD e MePV, relacionando subregiões e grupo experimental.



3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos (3 a 5 meses de idade; fêmeas nulíparas) e também filhotes da mesma espécie em diferentes idades: 1 dia pós-natal (PN1), 5 dias (PN5), 11 dias (PN11), 21 dias (PN21), 31 dias (PN31) e 45 (PN45); machos e fêmeas. Todos os animais eram provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foram mantidos sob temperatura ambiente em torno de 22°C, um ciclo claro-escuro de 12:12 horas e com água e comida *ad libitum*.

Esforços máximos foram realizados para minimizar o número de animais estudados e seu sofrimento. Os ratos utilizados para os experimentos foram manipulados de acordo com as normas brasileiras para o uso ético de animais, além das leis internacionais de cuidados éticos e uso de animais de laboratório (Conselho Diretivo da Comunidade Européia de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC).

Para a realização deste estudo, foram realizados três experimentos. Os dois primeiros utilizaram fêmeas adultas e o terceiro analisaram-se machos e fêmeas em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal. Os procedimentos realizados para cada um dos experimentos estão descritos a seguir.

3.2 Experimento 1: Detecção da GFAP-ir durante o ciclo estral

3.2.1. Avaliação do ciclo estral

O estudo da citologia vaginal foi realizado nas ratas por duas semanas antes do experimento para determinar a regularidade do ciclo estral. Durante este período, diariamente foi utilizada uma pipeta de tamanho adequado preenchida com solução salina. Após a coleta, o material obtido do esfregaço vaginal foi colocado sobre uma lâmina histológica e observado ao microscópio óptico para a identificação dos tipos celulares característicos de cada fase (Diestro: predominância de leucócitos; Proestro: predominância de células epiteliais nucleadas; Estro: predominância de células queratinizadas; Metaestro: presença de todos os tipos celulares apresentados nas outras fases do ciclo; NELSON, 1995). Foram excluídas deste estudo as ratas que não apresentavam dois ciclos estrais normais consecutivos, consideradas com secreção de esteróides ovarianos irregular.

3.2.2. Procedimento imunoistoquímico para GFAP

Foram utilizadas 5 fêmeas em cada fase do ciclo estral (diestro, metaestro, estro e proestro) (n= 20), as quais foram sacrificados na tarde de cada fase. Os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (50 mg/Kg, i.p.; Cristalia, Brasil), injetados com 1000 UI de heparina (Cristalia, Brasil) no ventrículo cardíaco esquerdo e perfundidos utilizando-se uma bomba peristáltica (Control Company, Brasil, 20 ml/min) com 200 mL de solução salina, seguida por 200 mL de paraformaldeído 4 % (Reagen, Brasil) diluído em tampão fosfato (PB) 0,1M e pH 7,4. Os encéfalos foram removidos, pós-fixados na mesma solução fixadora em temperatura ambiente por 4 horas, crioprotetidos em uma solução de sacarose em PB a 30% a 4°C até afundarem. Os encéfalos foram então congelados em isopentano e nitrogênio líquido e seccionados coronalmente em criostato (Leitz, Alemanha). Secções de 50 µm foram coletadas em

solução salina de tampão fosfato (PBS) e processadas para imunohistoquímica de GFAP seguindo o procedimento do anticorpo não marcado peroxidase-antiperoxidase (PAP; Sternberger, 1979).

Secções em livre flutuação foram pré-tratadas com metanol 10% diluído em H₂O₂ 3% por 30 min e então cuidadosamente lavadas e bloqueadas com soro de cabra normal (NGS) a 3% em PBS contendo Triton X-100 0.4% (PBS-Tx; Sigma Chemical Co., USA) por 30 min. As secções foram então incubadas com anticorpo policlonal de GFAP em coelho (Sigma Chemical Co., USA) com diluição de 1:150 em NGS 3% em PBS-Tx por 48 h a 4°C em agitação contínua.

Após várias lavagens com PBS-Tx, os cortes foram incubados em uma imunoglobulina G (IgG) coelho anti-coelho (Sigma Chemical Co., USA) com diluição de 1:50 em PBS-Tx por 2 h a temperatura ambiente. As secções foram então lavadas novamente em PBS e incubadas em PAP para coelho (Sigma Chemical Co., USA) diluído em PBS 1:500 por 2 h a temperatura ambiente. A reação foi revelada pela incubação das secções em meio histoquímico o qual continha 3,3'-diaminobenzidina 0.06% (DAB, Sigma Chemical Co., USA) dissolvida em PBS por 10 min e na mesma solução contendo 1µL de H₂O₂ 3% por mL de meio de DAB por mais 10 min. As secções foram finalmente lavadas em PBS, montadas em lâminas histológicas, desidratadas com etanol, clareadas com xilol e cobertas com Permount e lamínulas. Secções-controle foram realizadas omitindo-se o anticorpo primário, substituído por PBS.

Todos os encéfalos utilizados foram fixados e pós-fixados durante o mesmo período de tempo em soluções idênticas. Foram igualmente processado ao mesmo tempo, seguindo-se exatamente os mesmos passos histológicos, bem como incubados nos mesmos meios, pelo mesmo período de tempo. Estes procedimentos foram

realizados a fim de reduzir a possibilidade de *overreaction*, diferenças na reação do cromógeno ou alterações nos níveis de fundo nos grupos experimentais.

3.2.3. Aquisição dos dados

Os subnúcleos MeAD, MePD e MePV foram localizados e selecionados para a aquisição dos dados de acordo com um atlas anatômico de rato (PAXINOS; WATSON, 1998), bem como descrições de diferentes autores (ALHEID et al., 1995; CANTERAS; SWANSON; PETROVICH, 1995; DE OLMOS et al., 2004). A fim de auxiliar a precisão da localização das subregiões da MeA, foi realizada a técnica de Nissl e então utilizadas as imagens coletadas das lâminas, para melhor localização da região de interesse.

A intensidade de imunorreação para GFAP foi medida por meio de análise densitométrica semi-quantitativa (RASIA-FILHO et al., 2002; FERRAZ et al., 2003; XAVIER et al., 2005). Para isso utilizou-se um microscópio Nikon Eclipse E-600 (500x, Japão) acoplado a uma câmera de alta performance Pro-Series CCD e ao *software* Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, USA). As imagens digitalizadas obtidas das áreas selecionadas foram convertidas em uma escala de cinza de 8-bit (0-255 níveis de cinza). As condições de iluminação e ampliação de imagem foram mantidas constantes durante todo o procedimento.

Os elementos de imagem (pixels) empregados para medida da densidade óptica foram obtidos de quadros com $30 \mu\text{m}^2$, ou área de interesse (AOI), os quais foram sobrepostos sobre uma imagem de escala de cinza. Uma grade de quadros foi disposta sobre as imagens obtidas dos diferentes subnúcleos da MeA. A fim de se obter uma avaliação mais representativa destas subregiões, a primeira AOI foi colocada

randomicamente, utilizando-se para tanto uma tabela de números aleatórios. Todas as AOIs foram colocadas seguindo-se um padrão constante com intervalos eqüidistantes na grade “máscara”. Lúmen de vasos e artefatos evidentes foram evitados. Foram obtidas pelo menos 10 leituras em cada secção analisada e a média dos dados de cada corte foi registrada. Foram utilizados ambos os lados de cada encéfalo. No mínimo 30 secções foram analisadas por subregião da MeA de cada grupo estudado (6 cortes por animal) ao longo do ciclo estral. Uma área de tecido livre foi determinada e utilizada para corrigir as medidas da densidade óptica, servindo como imagem de *background*. Foi realizada a subtração de cada fundo marcado com o fundo de correção (XAVIER et al., 2005).

A densidade óptica (DO) foi calculada usando a fórmula abaixo:

$$DO(x,y) = - \log \left[\frac{INT_{(x,y)} - \text{preto}}{INC - \text{preto}} \right] ,$$

onde: “DO(x,y)” é a densidade óptica de pixel_(x,y), “INT_(x,y)” ou intensidade = intensidade de pixel_(x,y), “preto” = imagem capturada na ausência de luz (5,3), e “INC” ou incidente = intensidade de luz incidente (252,4).

3.2.4. Análise Estatística

Foram realizadas as médias dos valores para cada corte e então os dados foram submetidos à análise estatística, por meio de uma análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, considerando-se as fases do ciclo estral (diestro, proestro, estro ou metaestro) como o fator entre-sujeitos e região (MeAD, MePD e MePV) como o fator intra-sujeitos. Foi utilizado ainda o teste *post hoc* de Tukey. O nível estatístico estabelecido foi $P < 0,05$ (ZAR, 1999).

3.3. Experimento 2: Detecção da GFAP-ir de fêmeas ovariectomizadas e tratadas com hormônios ovarianos

Para o segundo experimento realizou-se ovariectomia e injeção de hormônios para detectar o efeito destes sobre a expressão de GFAP na amígdala medial. Nesta etapa, objetivou-se detectar a ação da terapia substitutiva com hormônios gonadais sobre a glia da MeA.

Os animais (30 fêmeas em idade adulta, 3 meses de idade) foram perfundidos no período da manhã e seus encéfalos processados da mesma forma como no Experimento 1.

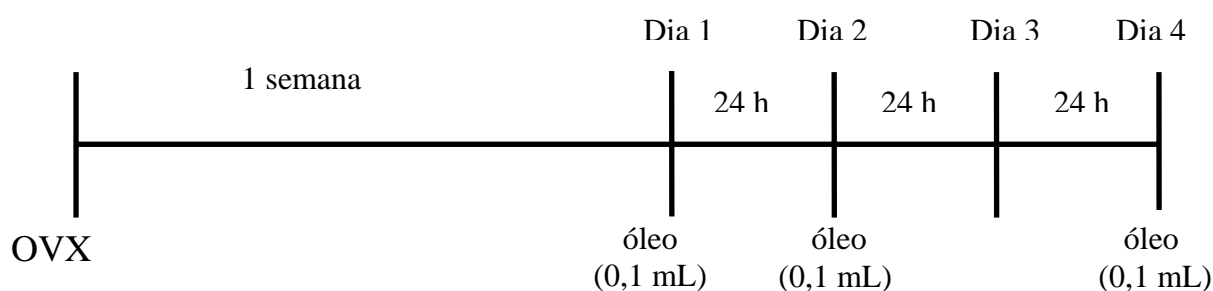
3.3.1. Procedimento cirúrgico

As fêmeas adultas foram estudadas ao longo do ciclo estral. Durante três semanas, estudos diários da citologia vaginal foram realizados sempre no mesmo período do dia (entre 8 e 10 horas da manhã). As células da mucosa vaginal eram observadas em microscópio óptico para verificação da fase do ciclo em que o animal se encontrava. Desta forma, ratas com o ciclo estral irregular foram descartadas deste estudo.

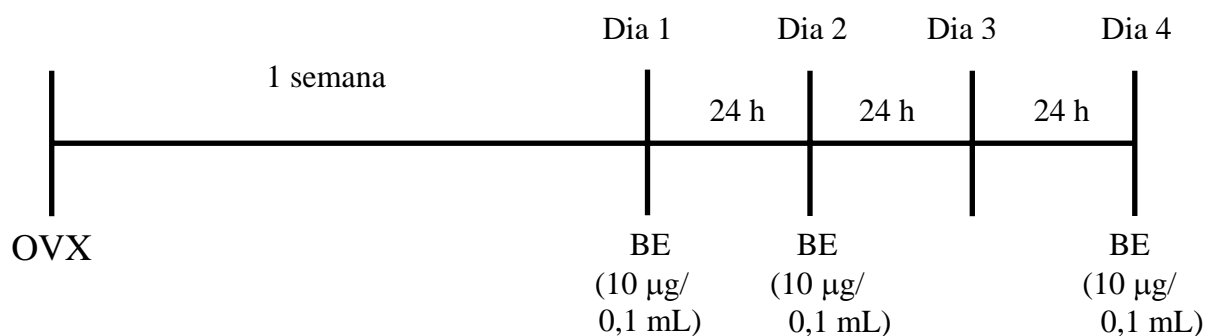
As fêmeas foram então submetidas a ovariectomia. Para tanto, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina e xilazina (Vetbrands, Brasil; 80mg/kg e 20mg/kg, respectivamente) intramuscular (i.m.). Após assepsia e tricotomia da região lombar, as ratas foram ovariectomizadas bilateralmente, por acesso cirúrgico dorsal. Após a retirada dos ovários e a sutura por planos, os animais foram cuidadosamente devolvidos para o biotério, onde ocorreu a recuperação pós-operatória. Houve acompanhamento diário das fêmeas por uma semana, quando se iniciou o protocolo de

injeção dos hormônios. Nesta etapa, as ratas foram divididas em três grupos experimentais:

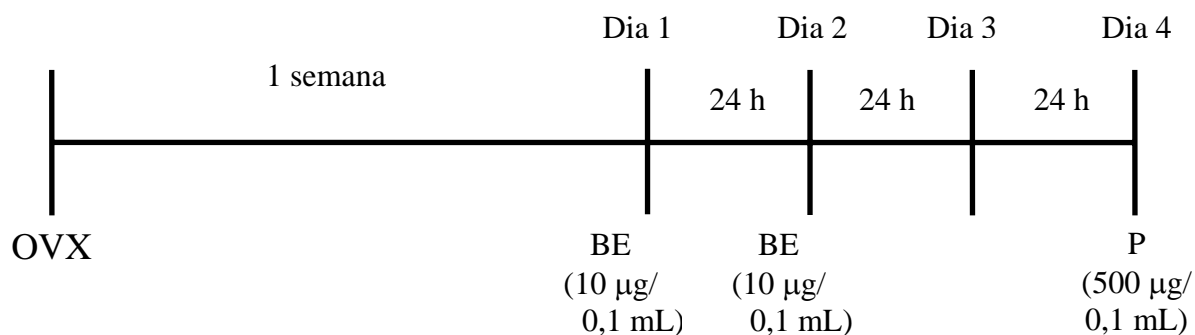
Grupo 1 (n=6): fêmeas OVX que receberam três injeções subcutâneas (s.c.) de injeção de veículo (óleo de gergelim) (V; 0,1 mL/sc), no horário da manhã (às 9 h), servindo como grupo controle. A primeira dose foi dada no primeiro dia da terapia substitutiva (dia 1), a segunda dose de óleo foi dada 24 h depois da primeira dose (dia 2), e a terceira dose foi dada 48 h após a segunda dose e 5 h antes do sacrifício, conforme o seguinte esquema:



Grupo 2 (n=6): fêmeas OVX que receberam injeção de benzoato de estradiol (BE; Sigma Chemicals Co., EUA) na dose de 10 μ g diluídos em 0,1 mL de veículo (óleo de gergelim) sob o seguinte protocolo: a primeira dose de BE foi dada no primeiro dia de terapia substitutiva (dia 1), a segunda dose de BE foi dada 24 h depois da primeira dose (dia 2) e a terceira dose na dose 48 h após a segunda dose de BE e 5h antes do sacrifício (dia 4), conforme o esquema a seguir:



Grupo 3 (n=6): fêmeas OVX e que receberam 10 µg de BE e 500 µg de progesterona (P; Sigma Chemicals Co., EUA) ambos diluídos em 0,1 mL de veículo (óleo de gergelim), sob o seguinte esquema: a primeira dose de BE foi dada no primeiro dia da terapia substitutiva (dia 1), a segunda dose de BE foi dada 24 h depois da primeira dose (dia 2) e a terceira dose foi de P, 48 h após a segunda dose de BE e 5h antes do sacrifício, conforme o esquema abaixo:



Não houve controle para progesterona. Os animais foram então anestesiados e perfundidos para realização de procedimento imunoistoquímico e densitometria óptica para GFAP. Nesta etapa, os procedimentos foram idênticos aos realizados no primeiro experimento, descrito previamente.

Logo após o sacrifício dos animais, o útero de cada rata foi cuidadosamente retirado, através de uma incisão cirúrgica na região inferior da parede abdominal. O peso do útero de cada animal foi obtido e registrado com a finalidade de comparação estatística dos dados, para então serem constatados os efeitos sistêmicos dos hormônios administrados.

3.3.2. Análise Estatística

Foram realizadas as médias dos valores para cada corte e então os dados foram submetidos à análise estatística, por meio do teste da ANOVA para medidas repetidas, considerando-se o grupo experimental (veículo, EB ou EB + P) como o fator entre-sujeitos e região (MeAD, MePD e MePV) como o fator intra-sujeitos. Foi realizado também o teste *post hoc* Tukey. O nível estatístico estabelecido foi $P < 0,05$.

O peso do útero dos animais estudados foi comparado pelo teste da ANOVA de uma via e o teste *post hoc* Tukey. Igualmente, o nível de significância ficou considerado como $P < 0,05$ (ZAR, 1999).

3.4 Experimento 3: Detecção da GFAP-ir e VIM-ir de machos e fêmeas em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal

Ratas pesando entre 280-320g foram acasaladas com machos hípidos. Fêmeas prenhas foram isoladas em um ambiente de 22°C de temperatura média e um ciclo claro-escuro 12:12 h e receberam acesso livre à comida e à água. As ratas grávidas foram conferidas regularmente para detectar o dia do nascimento de filhotes (P0). Filhotes e mães foram mantidos juntos até o dia do sacrifício, quando um casal de

filhotes foi obtido de cada fêmea. Os ratos foram identificados e agrupados por idade ou dias pós-natais PN1, PN5, PN11, PN21, PN31 e PN45. Cada subgrupo foi composto por 6 animais de cada sexo (n=72). Todos os animais de diferentes idades foram submetidos a todos procedimentos experimentais ao mesmo tempo, incluindo perfusão, secção do encéfalo e procedimento imunoistoquímico.

Durante a secção dos encéfalos de cada animal, um corte era coletado para imunoistoquímica de GFAP, outro para VIM e, um terceiro, para a técnica de Nissl.

3.4.1. Procedimento imunoistoquímico para GFAP e VIM

O procedimento imunoistoquímico para GFAP foi realizado conforme descrito no experimento 1, adequando-se soluções para o peso de cada filhote: heparina (500-1000 UI), solução salina (50-200 mL), paraformaldeído em 0,1M, pH 7,4 de tampão-fosfato (50-200 mL).

O procedimento para imunoistoquímica de VIM foi realizado utilizando-se um anticorpo específico obtido de rato contra VIM (1:100, Dako Co., Dinamarca) e um segundo anticorpo *anti-mouse* IgG (Amersham, Reino Unido) diluído em PBS-TX 1:200. Para revelação da reação, as secções foram incubadas no complexo streptavidina (Amersham, Reino Unido) diluído 1:100 em PBS à temperatura ambiente. Todos os demais procedimentos foram idênticos aos do experimento 1, previamente descrito.

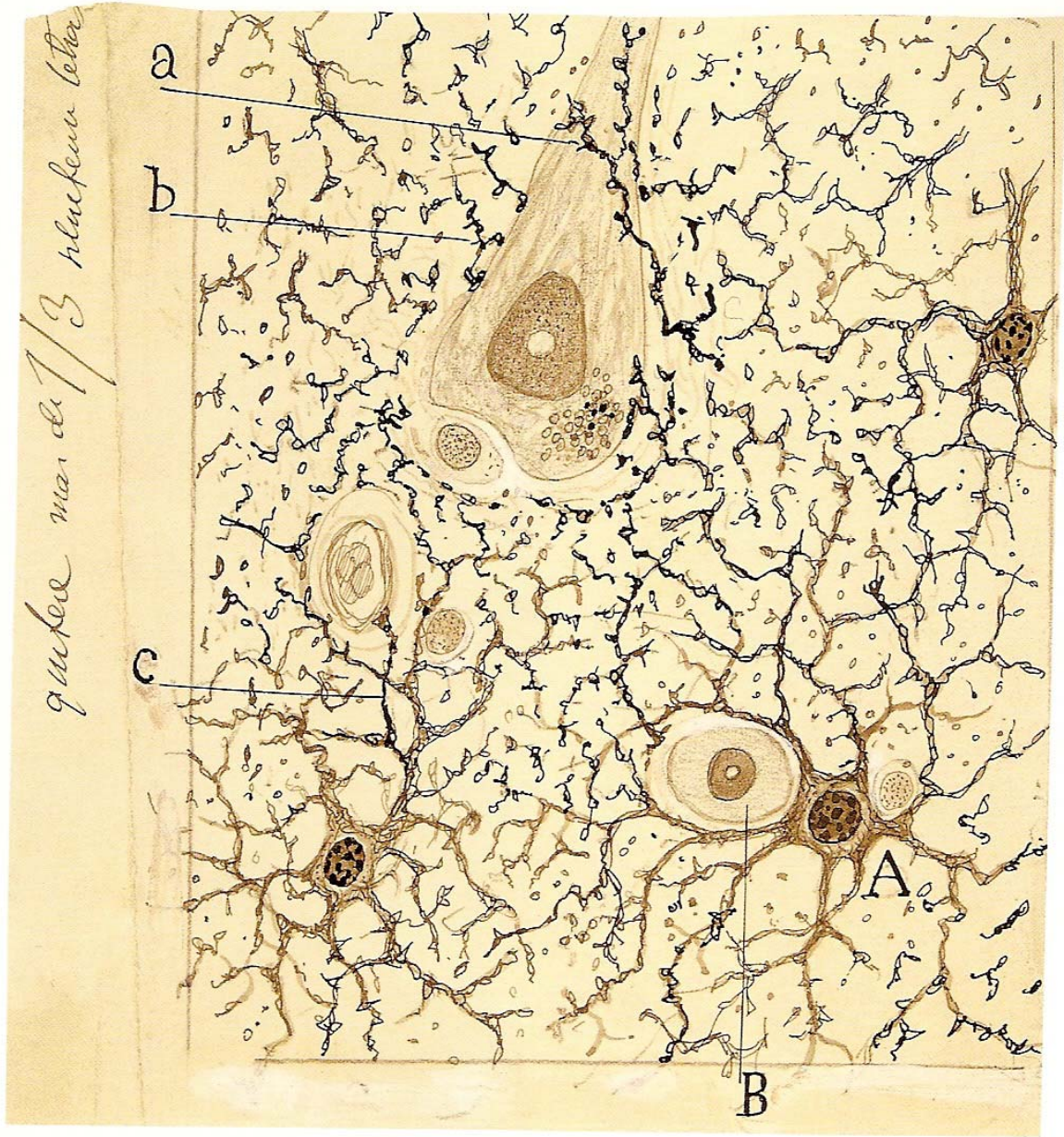
3.4.2. Aquisição dos dados

Embora o protocolo utilizado para tratamento dos dados tenha sido o mesmo que o descrito no experimento 1, há algumas diferenças quanto à aquisição das imagens.

Neste estudo, devido às diferenças do tamanho dos encéfalos e portanto do volume dos subnúcleos da MeA durante o desenvolvimento, foram utilizadas diferentes AOIs. Os filhotes com idades PN1, PN5 e PN11 receberam sobre cada um dos subnúcleos da MeA selecionados, dois quadrados de $45000 \mu\text{m}^2$, enquanto para os animais de idades PN21, PN31 e PN45 utilizaram-se AOIs de $96000 \mu\text{m}^2$. A média de duas leituras de densidade óptica (OD) foi empregada para cada secção analisada. Foram usadas as médias de quatro secções de cada animal para cada subnúcleo da MeA, de forma que foram obtidos 16 registros por subregião da MeA de cada animal estudado.

3.4.3. Análise Estatística

Os dados foram comparados quanto ao efeito de idade, sexo e região por meio de um teste da ANOVA de duas vias para medidas repetidas. As comparações múltiplas envolvendo todas as combinações dos fatores (sexo, idade e subregião da MeA) foram realizados através dos testes *post-hoc* Tukey-Kramer. O nível estatístico estabelecido foi $P < 0,05$ (ZAR, 1999).



4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1 e 2: Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats.

Este trabalho foi publicado na revista *Brain Research*, 1108:1, 117-126, 2006.

BRAIN RESEARCH 1108 (2006) 117–126

Research Report

Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats

Flávia G. Martinez ^{a,b}, Erica E.S. Hermel ^{a,b}, Léder L. Xavier ^c, Giordano G. Viola ^b, João Riboldi ^d, Alberto A. Rasia-Filho ^{a,e}, Matilde Achaval ^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Neurociências, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, R. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre 90050-170, RS, Brazil

^b Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, R. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre 90050-170, RS, Brazil

^c Laboratório de Biologia Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6689, Porto Alegre 90619-900, RS, Brazil

^d Departamento de Estatística, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9550, Porto Alegre 91509-900, RS, Brazil

^e Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, R. Sarmiento Leite 245, Porto Alegre 90170-050, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 5 June 2006

Available online 13 July 2006

Keywords:

Amygdaloid complex

Sex steroid

Ovarian hormone

Glial plasticity

GFAP

Immunohistochemistry

Optical densitometry

ABSTRACT

The medial amygdala (MeA) is a sexually dimorphic area that modulates neuroendocrine and behavioral activities and where gonadal hormones play an important role in neuron–glial and synaptic plasticity. Immunohistochemistry was used to identify the astrocytic marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the different MeA subnuclei – anterodorsal (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) – of intact female rats in the different phases of the estrous cycle and in ovariectomized females treated with hormonal substitutive therapy. Data semi-quantified by optical densitometry showed that, in the proestrus phase, the GFAP immunoreactivity (GFAP-ir) was higher when compared to the other phases of the estrous cycle ($P < 0.02$). GFAP-ir was also higher in the MePD than in the MeAD or in the MePV ($P < 0.02$). In ovariectomized females, injections of estradiol alone or estradiol plus progesterone increased GFAP-ir in the MePD and in the MePV ($P < 0.001$), but

not in the MeAD ($P > 0.3$), when compared to control data. These findings suggest that astrocytic GFAP in the MeA subnuclei can be affected either by physiological levels or by hormonal manipulation of the ovarian steroids, which may contribute to the plasticity of local and integrated functional activities of these brain areas in female rats.

Abbreviations:

MeAD, anterodorsal medial amygdala
 AVPV, anteroventral periventricular nucleus
 EB, estradiol benzoate
 ER- α , estrogen receptor α
 ER- β , estrogen receptor β
 GFAP, glial fibrillary acidic protein
 MeA, medial amygdala
 OT, optic tract
 MePD, posterodorsal medial amygdala
 MePV, posteroventral medial amygdala
 P, progesterone
 V, vehicle
 ST, stria terminalis

1. Introduction

The rat amygdala is composed of different nuclei and subnuclei that form a complex neuronal afferent and efferent network that, altogether, process sensorial information needed for an animal to deal with emotionally loaded stimuli and organize behavioral displays and homeostatic adjustments (Davis, 1992; Petrovich et al., 2001; Rasia-Filho et al., 2000; Swanson and Petrovich, 1998). The medial amygdala (MeA), a part of the extended amygdala (Alheid et al., 1995; De Olmos and Heimer, 1999; De Olmos et al., 1985, 2004), is a group of nuclei recognized by its intrinsic associative projections and extensive connections with some hypothalamic areas (Alheid et al., 1995; Canteras et al., 1995; De Olmos et al., 2004; De Vries and Simerly, 2002; Petrovich et al., 2001). The MeA has been subdivided into four subregions based on its cytoarchitectonic organization, hodology and function: anterodorsal (MeAD), anteroventral (MeAV), posterodorsal (MePD) and posteroventral ones (MePV) (Alheid et al., 1995; Canteras et al., 1995; De Olmos et al., 2004; Petrovich et al., 2001; Rasia-Filho et al., 2004).

The MeAD receives vomeronasal inputs, perceives their importance and relies information to the MePD (Guillamón and Segovia, 1997; Meredith and Westberry, 2004) to modulate several social behaviors (De Vries and Simerly, 2002; Newman, 1999, 2002; Rasia-Filho et al., 2000). Lesions of the anterior corticomедial amygdala decrease sexual receptivity of female rats, whereas stimulation of this region increased lordosis behavior (Mascó and Carrer, 1980). Sparse to moderate inputs from the MeA subregions reach the hypothalamic arcuate nucleus, but the MePD does project to the central and medial subregions of the medial preoptic nucleus, the anteroventral periventricular nucleus (AVPV), the ventromedial nucleus and the ventral premammillary nucleus (Canteras et al., 1995; De Vries and Simerly, 2002; Petrovich et al., 2001; Simerly, 1998). Because these hypothalamic areas are relevant for female sexual behavior, it may thus be assumed that the MePD relays multimodal sensory information to influence the reproductive behavioral display and the hormonal release by the anterior pituitary gland (De Vries and Simerly, 2002; Lehmann and Erskine,

2005; Petrovich et al., 2001; Rasia-Filho et al., 2004; Sheehan et al., 2001). The MePD can also modulate maternal and avoidance behaviors in female rats (Sheehan et al., 2000, 2001) and the MePV can affect hypothalamic neuroendocrine secretion as well (Coopersmith et al., 1996; Petrovich et al., 2001).

The action of gonadal steroids in the MeA subnuclei are relevant for the control of the sexual behavior of male and female rats (Lehmann and Erskine, 2005; Mascó and Carrer, 1980; Newman, 1999; Rasia-Filho et al., 1991, 2004). Indeed, neurons in the MeA subnuclei are sensitive to sex steroids and present androgen receptors, both α and β estrogen receptors (ER- α , ER- β), and progesterone receptors (De Vries and Simerly, 2002; Gréco et al., 2001; Shughrue et al., 1997; Simerly et al., 1990). ER- α and ER- β show higher densities in the MePD (Li et al., 1997; Österlund et al., 1998; Shughrue et al., 1997) and coexpression of ER- α and ER- β in the same neurons was already described (Gréco et al., 2001). Fos expression was induced by male mating stimuli in cells expressing either ER- α , ER- β or both ERs in the female MePD (Gréco et al., 2003).

Gonadal hormones can modify morphology and function of some neurons and glial cells in certain nervous system areas (Garcia-Segura and McCarthy, 2004; Garcia-Segura et al., 1994, 1995; Wooley and McEwen, 1992). The glial cells are involved in the developmental and activational effects promoted by these steroids in synaptic formation and plasticity (Garcia-Segura and McCarthy, 2004; Garcia-Segura et al., 1995; Klintsova et al., 1995). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is an intermediate filament of astroglia and an important cell marker of mature astrocytes (Garcia-Segura and McCarthy, 2004; Gomes et al.,

1999; Kettenmann and Ranson, 2005). Astrocytic shape and motility are influenced by changes in GFAP expression and phosphorylation (Gomes et al., 1999; Laping et al., 1994). And the assembly and morphology of GFAP filaments are affected by its own concentration and physicochemical factors, such as pH, divalent cations, ionic strength, amino acids and temperature (Kettenmann and Ranson, 2005; McLendon and Bigner, 1994). Experimental findings in vivo and in vitro have shown that GFAP immunoreactivity (GFAP-ir) can also be modified by gonadal steroid manipulation in different sexually dimorphic brain areas (Conejo et al., 2003; Garcia-Segura and McCarthy, 2004; Garcia-Segura et al., 1994; Hajós et al., 2000; Kohama et al., 1995). For instance, females in the diestrus phase displayed a higher GFAP-ir in the MePD and in the MePV than males (Rasia-Filho et al., 2002). It was suggested that ovarian steroids, particularly elevations of estradiol and progesterone during the proestrus phase, coordinate synaptic remodeling by modulating GFAP expression (Garcia-Segura et al., 1994; Kohama et al., 1995; Luquin et al., 1993; Pérez et al., 1993). Interestingly, again, this occurs in brain regions that regulate sexual and maternal behavior as well as pituitary secretions, such as the MeA (Rasia-Filho et al., 2000, 2002, 2004; Sheehan et al., 2000, 2001) and the ventromedial and arcuate hypothalamic nuclei (Kohama et al., 1995; Mong et al., 1999). Studies on sexual dimorphism in the MeA subnuclei have focused on its neural circuits, neuronal morphology, neurochemistry and GFAP-ir (Canteras et al., 1995; De Vries and Simerly, 2002; McDonald, 1998; Micevych et al., 1988; Rasia-Filho et al., 1999, 2002, 2004), but there are no reports on the variations occurring during the estrous cycle and the influence of female gonadal hormones on GFAP-ir. Therefore, the aims of the present study were, initially, to determine the intensity of GFAP-ir in the MeA subnuclei of female rats during the estrous cycle and, afterwards, in ovariectomized female rats treated with a hormonal substitutive therapy with estradiol and progesterone. In both cases, immunohistochemical technique was

semi-quantified by optical densitometry (Ferraz et al., 2003; Rasia-Filho et al., 2004; Xavier et al., 2005).

2. Results

2.1. Qualitative light microscopic observations

In the three studied subregions of the MeA, GFAP-ir was detected in the glial cell bodies and their processes. No reaction occurred when the first antibody was omitted. The GFAP-ir in the MePD and in the MePV subnuclei displayed strong labeling when compared to the MeAD in all the studied females (Fig. 1). Moreover, GFAP-ir distribution appeared to be similar in both virgin females with normal cycles and in hormonally treated ovariectomized ones (Figs. 1 and 2).

The distribution pattern of the astrocytes within the MeA subnuclei has been previously described elsewhere (Rasia-Filho et al., 2002). Briefly, and in accordance with that description, the MeAD displayed less GFAP-ir than the other subregions. In the MePD, the GFAP-ir astrocytes were found in the dorsal through the ventral aspects of this region and exhibited three layers: a medial layer with intense reaction; a second intermediate layer with less reactivity; and a third lateral layer with stellate astrocytes. The GFAP-ir in the MePV also appeared to exhibit heterogeneities, though with some differences from the MePD: one layer was found more ventrally accompanying the subpial border and displayed radially oriented GFAP-ir processes; a second intermediate layer had abundant processes but not so many cell bodies; and a third part in the inner portion of the MePV showed visible cell bodies and processes (Fig. 1). For both the MePD and MePV, further studies are needed to determine where medially and ventrally, respectively, the GFAP-ir corresponds to astrocytes within the efferent pathway of the bed nucleus of the accessory olfactory tract in a cell-sparse region (De Olmos et al., 2004; Scalia and Winans, 1975).

2.2. Semi-quantitative analysis

2.2.1. GFAP-ir across the estrous cycle

Data are presented in Fig. 3. There were significant statistical effects due to the phases of the estrous cycle [$F(3,16) = 7.07$; $P = 0.003$] and the different MeA subregions [$F(2,32) = 165.86$; $P < 0.001$] in the GFAP-ir optical density, but the interaction between them was not significantly different [$F(6,32) = 0.73$; $P = 0.62$].

Independently of the region, the post hoc test showed that there was a higher GFAP-ir in females in proestrus than in diestrus ($P < 0.01$), estrus ($P < 0.02$) or metaestrus ($P < 0.01$; Fig. 3), whereas no other phase showed a statistical difference when compared among themselves ($P > 0.8$).

Independently of the phase of the estrous cycle, the three MeA subregions were significantly different in their GFAP-ir, with the MePD showing the highest values when compared to the MeAD ($P < 0.001$) and to the MePV ($P < 0.02$). The MePV GFAP-ir was also higher than the MeAD one ($P < 0.001$).

2.2.2. GFAP-ir in ovariectomized and treated females

Data are presented in Fig. 4. There were significant statistical effects due to ovariectomy and hormonal treatment [$F(2,15) = 83.39$; $P < 0.001$], different MeA subregions [$F(2,30) = 99.83$; $P < 0.001$] and the interaction between them [$F(4,30) = 11.35$; $P < 0.001$] in the GFAP-ir optic density.

The post hoc test showed that there was no statistical difference in the data obtained in the MeAD from vehicle, EB and EB + P groups ($P > 0.3$). But there were a marked effect of treatment in the MePD and in the MePV, where the vehicle group showed the lowest results ($P < 0.001$) and those ovariectomized females that received EB + P displayed higher GFAP-ir than the group that received EB alone ($P < 0.02$).

In addition, the MeA subregions were significantly different in their GFAP-ir following ovariectomy and treatment. Basically, the MeAD showed the lowest values and the MePD and the MePV had similar results. That is, for the oil injected groups, the MePD showed higher values when compared to the MeAD ($P < 0.002$), but not to the MePV ($P = 0.32$). MePV and MeAD data were not different in this control condition ($P = 0.36$). In the groups that received EB or EB + P, the GFAP-ir in the MePD and in the MePV were comparable ($P > 0.8$), but both were significantly higher than the GFAP-ir in the MeAD ($P < 0.001$).

A significant difference was found in the weight of the uteri from ovariectomized females in the different experimental studied groups [$F(2,17) = 42.37$; $P < 0.001$]. The vehicle-injected group exhibited thinner and atrophied uteri (mean \pm SD, 0.20 ± 0.04 g) when compared to the EB (0.47 ± 0.07 g; $P < 0.001$). The EB group showed higher results than the EB + P group (0.27 ± 0.03 g; $P < 0.001$). When vehicle and the EB + P groups were compared, a clear trend for the latter group to present heavier uteri was found ($P = 0.07$).

3. Discussion

The present findings showed that GFAP-ir varied across the rat estrous cycle as well as following ovariectomy and ovarian hormones manipulation in the different MeA subnuclei, thus confirming that astrocytic GFAP is susceptible to the effects of these sex steroids. More GFAP-ir was observed in the afternoon of the proestrus phase, when estrogen and progesterone are at their highest circulating values (Gomes et al., 2005), decreasing afterwards in the estrus. In these females, GFAP-ir clearly indicates the existence of subregion differences within the MeA (MePD higher than the other parts). Additionally, hormonal substitutive therapy provided some similarities but also differences compared with ovarian cycle effects (i.e., EB alone and EB + P administered to ovariectomized females increased GFAP-ir, but this occurred equally in the MePD and in the MePV). No effects of EB or EB + P were found in the MeAD. These findings indicate a distinct subregion-specific responsiveness to endogenous and supraphysiological sex steroids actions.

These reported data expand on a previous study that showed a sexual dimorphism in the MeA subnuclei (Rasia-Filho et al., 2002) and are in accordance with results reported for other CNS regions (Conejo et al., 2003; Garcia-Segura and McCarthy, 2004). Although the number of astrocytes was not counted in the present study, it is possible that the rapid modification of GFAP expression during the estrous cycle might be related to the increase in the GFAP-ir of astrocytic processes and the degree of their phosphorylation and dephosphorylation (Kettenmann and Ranson, 2005). This hypothesis is based on previous demonstrations that the number of astrocytes was not affected by estrogen in the rat globus pallidus, in the interpeduncular nucleus, in the arcuate nucleus or in the hippocampal subfields CA1, CA3 and CA4 (Garcia-Segura et al., 1994; Hajós et al., 2000; Lâm and Leranth, 2003; Tranque et al., 1987). Compared to the data obtained on the afternoon of estrus, astrocytic volume was lower on the afternoon of proestrus in the CA1 region (Klintsova et al., 1995). In the arcuate nucleus, there was a probable change in astrocytic branching across the estrous cycle (Garcia-Segura et al., 1994).

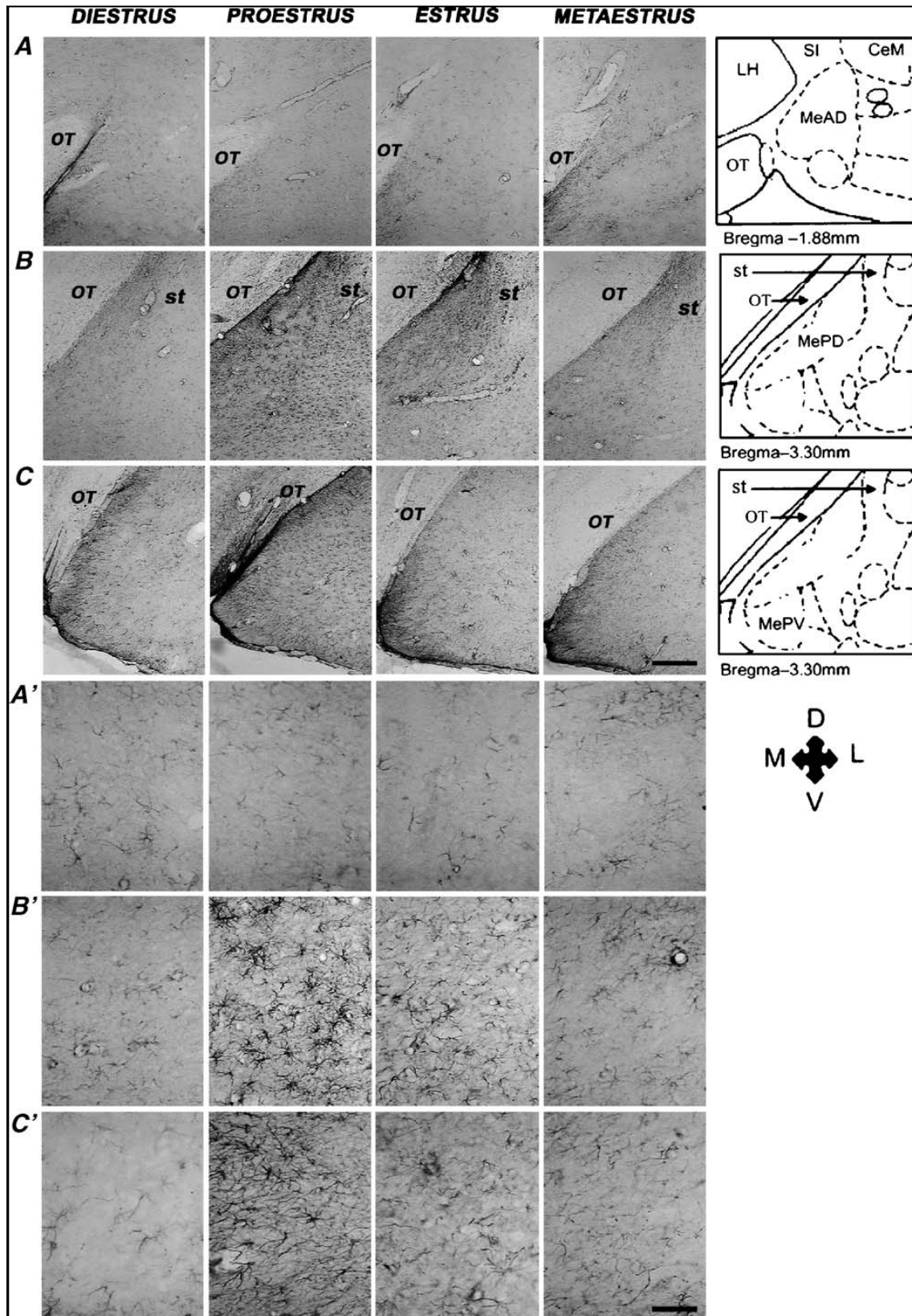


Fig. 1 – (A, B, C) Digitized images of GFAP-ir in the medial amygdala (MeA) subnuclei of female rats in the different phases of the estrous cycle. On the right, there is a schematic representations (modified from Paxinos and Watson, 1998) showing coronal brain sections through different subnuclei of the medial amygdala (A = MeAD; B = MePD; C = MePV). Note the higher expression of the GFAP-ir in the proestrus phase. (A',B',C') Digitized images at higher magnification from the same regions (A, B, C) showing GFAP-ir astrocytes. OT, optic tract; ST, stria terminalis; D, dorsal; L, lateral; M, medial; V, ventral. A, B, C scale bars = 50 μ m; A',B',C' scale bars = 200 μ m.

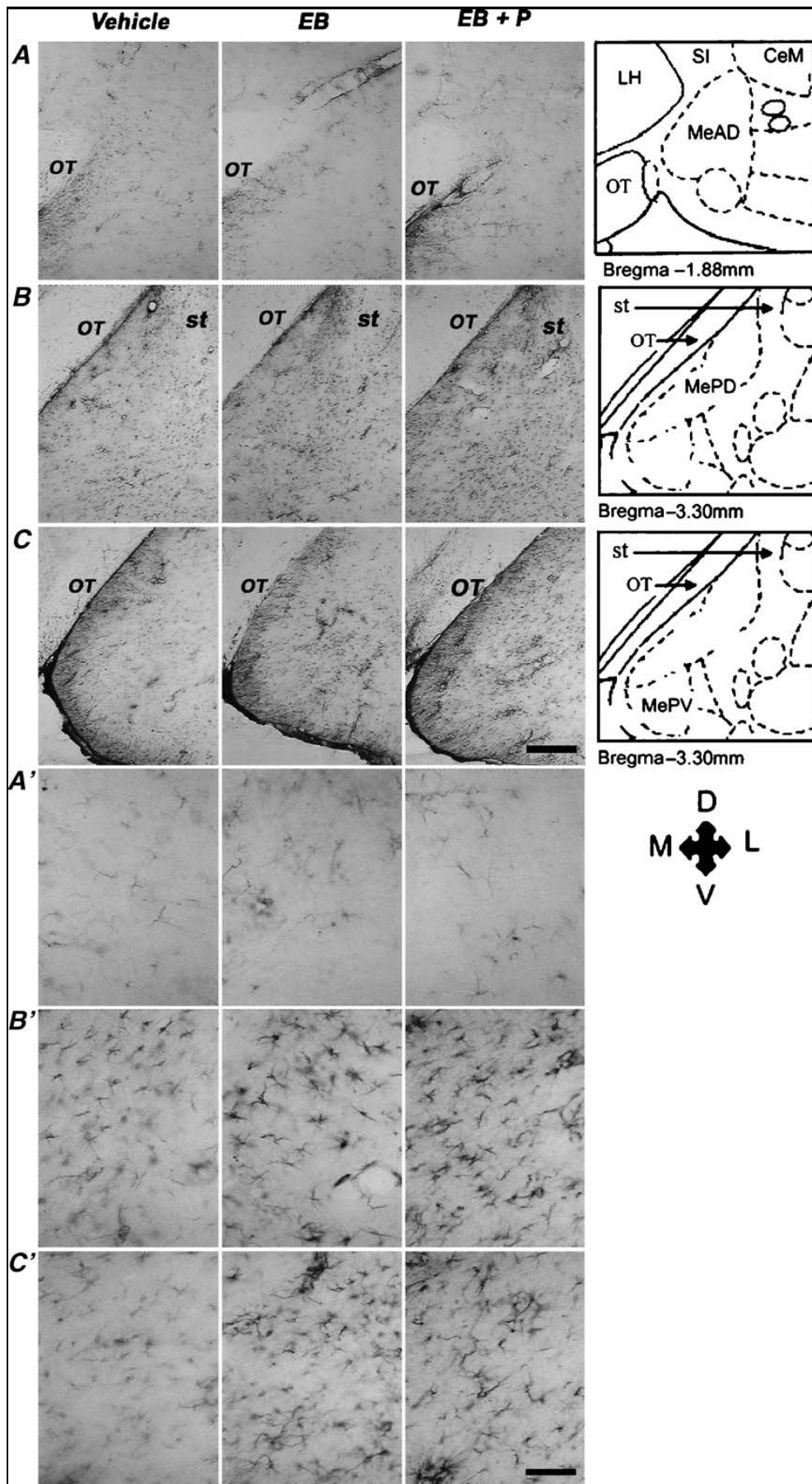


Fig. 2 - (A, B, C) Digitized images of GFAP-ir in the medial amygdala (MeA) subnuclei of ovariectomized females treated with vehicle, estradiol benzoate (EB) or estradiol benzoate plus progesterone (EB + P). On the right, there is a schematic representation

(modified from Paxinos and Watson, 1998) showing coronal brain sections through different subnuclei of the medial amygdala (A = MeAD; B = MePD; C = MePV). Note the higher GFAP immunoreactivity in the MePD and MePV after EB or EB + P treatments compared to vehicle. (A', B', C') Digitized images at higher magnification from the same regions (A, B, C) showing GFAP-ir astrocytes. OT, optic tract; ST, stria terminalis; D, dorsal; L, lateral; M, medial; V, ventral. A, B, C scale bars = 50 μ m; A', B', C' scale bars = 200 μ m.

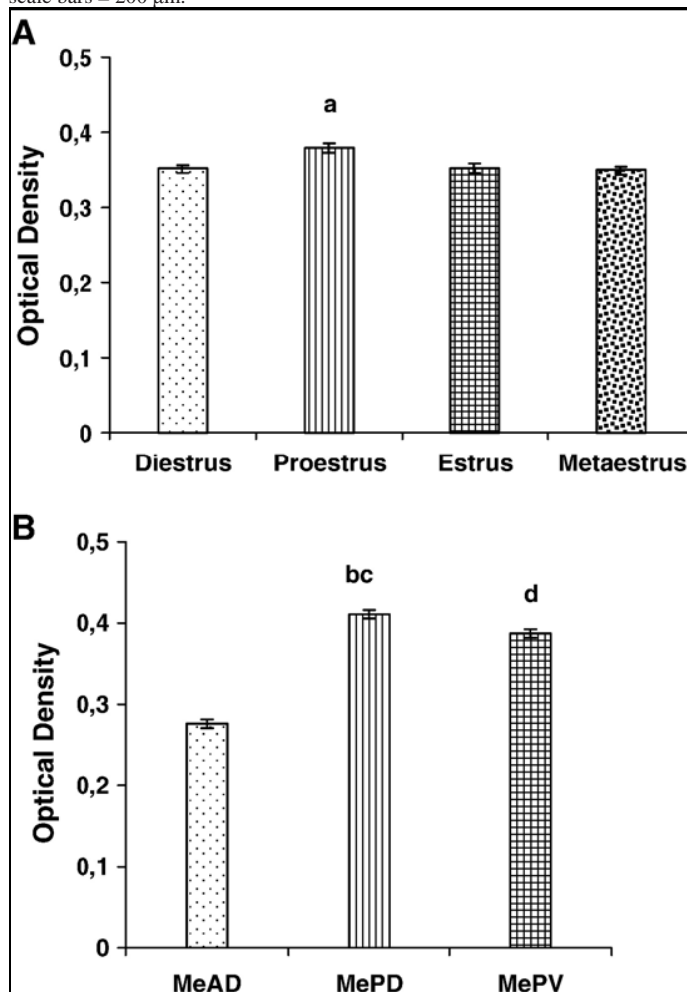


Fig. 3 – Optical density measurements (mean \pm SEM) of GFAP immunoreactivity. (A) Measurements done in the four phases of estrous cycle. (B) Measurements done in the anterodorsal (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) medial amygdala subnuclei. There was a significant difference when the proestrus data were compared with diestrus, estrus and metaestrus (a: $P < 0.02$ in panel A) and when data from the MePD were compared with the MeAD (b: $P < 0.001$ in panel B) and to the MePV (c: $P < 0.02$ in panel B), and MePV were compared with MeAD (d: $P < 0.001$ in panel B).

The selective effects of the ovarian hormones on MeA subregions GFAP-ir may well be related to the presence of gonadal hormone receptors in glial cells (Garcia-Segura and McCarthy, 2004). Accordingly, ER- α are found less frequently in the MeAD and more frequently in the MePD and MePV (Österlund et al., 1998; Shughrue et al., 1997; Simerly et al., 1990). ER- β are abundant in the MePD, appear in fewer number in the MePV and are sparsely distributed in the MeAD (Li et al., 1997; Österlund et al., 1998; Shughrue et al., 1997). As noted, GFAP-ir increased in the MePD and in the MePV following EB or EB + P, but not in the MeAD. For each MeA subnuclei, the participation of both types of ER in local plasticity and response to hormonal manipulation needs to be clarified. For example, in the MePD of ovariectomized females treated with EB, a significantly reduction in the number of neurons expressing both ER- α and ER- β and in the immunoreactivity for ER- α occurred 48 h after hormone administration, whereas ER- β were not affected under this experimental condition (Gréco et al., 2001). At the same time, receptors for progesterone did not alter their number but showed an increased staining intensity (Gréco et al., 2001). These data

indicate that different expression, regulation and probable action of ER- α and ER- β and progesterone receptors can occur normally in cycling females or are set about in the MePD following ovariectomy (for example, see Isgor et al., 2002).

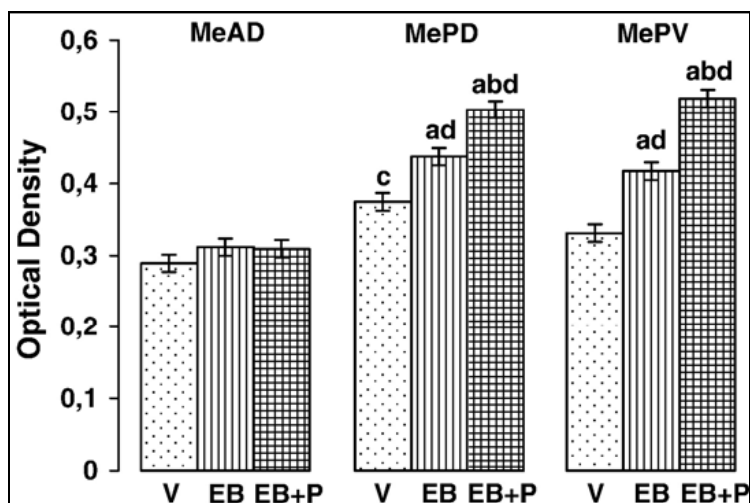


Fig. 4 – Optical density measurements (mean \pm SEM) of GFAP-ir in the anterodorsal (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) medial amygdala of ovariectomized females that received vehicle (V), estradiol benzoate (EB) or estradiol benzoate plus progesterone (EB + P). (a) Significantly different when compared with vehicle ($P < 0.001$). (b) Significantly different when compared to females treated with EB ($P < 0.02$). (c) Significantly different when compared with the vehicle data from the MeAD ($P < 0.002$). (d) Significantly different when compared with the EB or the EB + P data from the MeAD ($P < 0.001$).

Both the direct action of estradiol on neurons and astrocytes and the estradiol-dependent release of cytokines and neurotrophic factors (such as insulin-like growth factor-I) can affect astrocytic processes and their intermediate filaments (Cardona-Gomez et al., 2000; Garcia-Segura and McCarthy, 2004; Gomes et al., 1999; Laping et al., 1994; Ojeda and Ma, 1999; Ojeda et al., 1992). What are the substances and how they act in the MePD and in the MePV is currently unknown. But it is noteworthy that females have higher dendritic spine density in diestrus than in the proestrus, estrus and metaestrus in the MePD and MePV (Rasia-Filho et al., 2004). The increase in the GFAP-ir observed in normally cycling females suggests astrocytic involvement in the local synaptic plasticity of these subnuclei, with gonadal steroids almost showing an inverse effect on the number of spines and GFAP-ir in these MeA subnuclei neuropil. Recently, it was demonstrated that estrogen increase immunolabeling of calcium/calmodulin-dependent kinase IV, AMP response element-binding protein (CREB), phosphorylated CREB and CREB-related gene target brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the MeA (Zhou et al., 2005). CREB and BDNF are relevant for modulation of spine number and trophic effects mediated by estrogens (Murphy and Segal, 1997; Zhao et al., 2005). How these elements are involved in MeA subnuclei response to gonadal hormones is not already known but clearly indicates a stimulating new field of investigation for glia–neuron signaling in these microcircuits.

Additionally, although P actions alone were not tested, its administration increased GFAP-ir in the MePD and MePV, indicating a possible relationship between this hormone, phasic alterations in astrocytic processes and a synergistic and potentializing action with estradiol. This is a relevant finding because the estradiol effect that increased GFAP-ir in the neuroendocrine hypothalamus during the proestrus phase could be blocked by simultaneous administration of estradiol and P (500 $\mu\text{g}/\text{rat}$) in ovariectomized rats (Garcia-Segura et al., 1994). Because estrogen can evoke LH surges

(Garcia-Segura and McCarthy, 2004; Pérez et al., 1993), P might serve to determine the end of the proestrus phase and let the subsequent phase begin. P is also essential for the expression of proceptive female behavior (Gonzalez-Flores et al., 2004). The MeA subnuclei may play a role in this context based on their direct influence on GnRH release by the AVPV, as well as their effects on the occurrence of ovulation, copulatory behavior and pregnancy (Lehmann and Erskine, 2005; Rasia-Filho et al., 2004; Simerly, 1998). In this sense, serum fluctuation in gonadal hormones may change the activity of a circuit involving the MePD and other regions for the perception of olfactory and vomeronasal inputs and for neuroendocrine control (De Vries and Simerly, 2002; Guillamón and Segovia, 1997; Meredith and Westberry, 2004; Rasia-Filho et al., 2004; Simerly, 1998). The MePV also appears to be involved in reproductive functions associated with vaginocervical stimulation (Pfaus et al., 1996) and the secretion of prolactin on the afternoon of proestrus (Polston and Erskine, 2001). Therefore, there are some important hodological implications to the present data.

In conclusion, the present study intended to demonstrate that astrocytic GFAP-ir in normally cycling females is higher in the MePD compared to the other MeA subnuclei and, independently of the region studied, is higher in the proestrus, accompanying the physiological fluctuations of circulating ovarian steroids. Furthermore, the MePD and the MePV showed enhanced GFAP-ir following injections of estradiol alone or estradiol and progesterone to females submitted to ovariectomy, whereas the MeAD did not show the same result. These data encourage new studies involving the MeA subnuclei and their functions, mainly the interactions between neuron–astrocyte, neuroendocrine regulation and female reproductive behavior. It is necessary to further investigate the possible involvement of the different estrogen receptor stimulation and the release of trophic factors on the dynamic modulation of local microcircuits, which deal with multimodal information and that are related with sex steroiddependent events changeable across the estrous cycle.

4. Experimental procedures

4.1. Animals

Adult female Wistar rats (3–5 months old) were used; 5 animals for each phase of the estrous cycle (n = 20) in the first experiment (GFAP-ir during the estrous cycle) and 6 for each of the three experimental groups (n = 18) in the second experiment (GFAP-ir following ovariectomy and hormonal substitution, as described below). Animals were bred locally and housed in groups with free access to food and water, temperature maintained around 22 °C and a 12:12 h lightdark cycle. All efforts were made to minimize the number of animals studied and their suffering. Rats were manipulated according to international laws for the ethical care and use of laboratory animals (European Communities Council

Directive of 24 November 1986, 86/609/EEC) and to local guidelines on the ethical use of animals.

Vaginal smears were taken from virgin females during two weeks before the beginning of the experiment to determine the regularity of ovarian steroid secretion. Normal females were killed in the afternoon of each phase of the estrous cycle. In the second experiment, virgin female rats were submitted to ovariectomy under ketamine and xylazine anesthesia (20 and 80 mg/kg i.p., respectively). After 1 week of recovery, animals were divided into three groups. The first group received 2 injections of sesame oil as vehicle (V; 0.1 mL, s.c.) 24 h apart, and a third injection of oil 48 h later. The second group received 2 injections of estradiol benzoate (EB; Sigma Chemical Co.,

USA; 10 µg/0.1 mL, s.c.) 24 h apart, and a third injection of EB 48 h later. Rats in the third group received 2 injections of EB (10 µg/0.1 mL, s.c.) as performed in the second group, but the third injection was of progesterone (P; Sigma Chemical Co., USA; 500 µg/0.1 mL, s.c) 48 h later. The action of progesterone alone was not tested here. In each of these three groups, the last injection was given 5h prior to the beginning of the immunohistochemical study. The injection dosages and protocols were based and adapted from previously published data (Gould et al., 1990; Gréco et al., 2001; Lee et al., 2004). Uterine weight was used to assess the systemic effects of the hormonal therapy administered to the experimental groups of ovariectomized females.

4.2. Immunohistochemical procedure

For the immunohistochemical study, all animals were deeply anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, i.p.) and injected with 1000 IU of heparin. Thereafter, they were transcardially perfused through the left cardiac ventricle using a peristaltic pump (20 mL/min) with 200 mL of saline solution followed by 200 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4; PB). The brains were removed and post-fixed in the same fixative solution at room temperature for 4 h, were cryoprotected in a 30% sucrose solution in PB at 4 °C until they sank and were frozen in isopentane and liquid nitrogen. Coronal sections (50 µm) were obtained using a cryostat (Leitz, Germany). Sections were collected in phosphate buffer saline solution (PBS) and processed for GFAP immunohistochemistry following the unlabeled antibody peroxidase–antiperoxidase (PAP) procedure (Sternberger, 1979). Free-floating sections were pretreated with 10% methanol and 3% H₂O₂ for 30 min and then, carefully washed and blocked with 3% normal goat serum (NGS) in PBS containing 0.4% Triton X-100 (PBS-Tx, Sigma Chemical Co., USA) for 30 min. Then, sections were incubated with polyclonal GFAP antiserum raised in rabbit (Sigma Chemical Co., USA) diluted 1:150 in 3% NGS in PBS-Tx for 48 h at 4 °C. After being washed several times with PBS-Tx, sections were incubated in a rabbit anti-rabbit IgG (Sigma Chemical Co., USA) diluted 1:50 in PBSTx at room temperature for 2 h. Sections were again washed in PBS and incubated in a rabbit PAP (Sigma Chemical Co., USA) diluted 1:500 in PBS for 2 h at room temperature. The reaction was developed by incubating the sections in a histochemical medium that contained 0.06% 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical Co., USA) dissolved in PBS for 10 min and in the same solution containing 1 µL of 3% H₂O₂ per mL of DAB medium for additional 10 min. Finally, the sections were rinsed in PBS, dehydrated in ethanol, cleared with xylene and covered with Permount and coverslips. Control sections were prepared omitting the primary antibody by replacing it with PBS.

The brains from the females in the different phases of the estrous cycle and those from ovariectomized females submitted to vehicle or hormonal injections were fixed and post-fixed for the same time period and in identical solutions. Being processed together, they underwent exactly the same histological steps and were incubated in an identical medium for the same time period. These procedures were taken to reduce the possibility of overreaction, differences in the chromogen reaction or changes in the background levels between the experimental groups of rats.

4.3. Data acquisition

The MeAD, the MePD and MePV were selected for data acquisition based on their location in accordance with a rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1998) (Figs. 1 and 2) and landmark descriptions (Alheid et al., 1995; Canteras et al., 1995; De Olmos et al., 2004).

The intensity of the GFAP immunoreaction was measured by semi-quantitative densitometric analysis (Ferraz et al., 2003; Guedes et al., 2004; Rasia-Filho et al., 2002; Xavier et al., 2005) using a Nikon Eclipse E-600 microscope (500×, Japan) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and to the Image Pro Plus Software 4.1 (Media Cybernetics, USA). The digitized images obtained from the selected areas were converted to an 8-bit gray scale (0–255 gray levels). All lighting conditions and magnifications were held constant. Picture elements (pixels) employed to measure optical density were obtained from squares with 30 μm² (our area of interest, AOI) overlaid in the gray scale image. A grid mask was placed in the images obtained from different MeA subnuclei. To obtain a more representative evaluation of these subregions, the first AOI was placed randomly (using a table of random numbers), all other AOIs were placed following a constant pattern with equidistant intervals in the grid mask. The obvious blood vessels and other artifacts were avoided. At least 10 readings were performed in each analyzed section and the data average of each section was recorded. Both left and right sides of each brain were used. At least, 30 sections were analyzed per subregion of the MeA from each studied group (6 sections per animal) across the estrous cycle and in ovariectomized and treated rats. The subtraction of background staining and the background correction were done in accordance with our previous published protocol (Xavier et al., 2005).

The optical density (OD) was calculated using the following formula:

$$OD(x,y) = \frac{1}{4} \log \frac{INT(x,y)}{BL} - \frac{1}{4} \log \frac{INC}{BL}$$

where “OD(x,y)” is the optical density at pixel(x,y), “INT(x,y)” or intensity is the intensity at pixel(x,y), “BL” or black is the intensity generated when no light goes through the material (5.3 in our case) and “INC” or incident is the intensity of the incident light (252.4 in our case).

4.4. Statistical analysis

Data regarding the GFAP-ir optical densities obtained from the MeAD, the MePD and the MePV of females studied across the estrous cycle were compared by a two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, considering the condition (the four phases of the ovarian cycle) as the between-subjects factor and region (the three MeA subnuclei) as the within-subjects factor. When appropriate, post hoc comparisons were done using the Tukey test. The same was employed to analyze the data from the three ovariectomized and treated female rats groups. Uterine weights were compared among these last experimental groups using a one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. In all cases, the level of statistical significance was set as $P < 0.05$.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Paula Santos for her assistance with the immunohistochemical procedure and to Juliana de Castilhos, M.Sci., for the surgical procedure. This work was supported by Brazilian funding agencies CNPq and FINEP. M.A. and A.A.R.F. are CNPq investigators.

REFERENCES

Alheid, G.F., de Olmos, J.S., Beltramino, C.A., 1995. Amygdala and extended amygdala, In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, pp. 495–578.

- Canteras, N.S., Simerly, R.B., Swanson, L., 1995. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 360, 213–245.
- Cardona-Gomez, G.P., Trejo, J.L., Fernandez, A.M., Garcia-Segura, L.M., 2000. Estrogen receptors and insulin-like growth factor-I receptors mediate estrogen-dependent synaptic plasticity. *NeuroReport* 11, 1735–1738.
- Conejo, N.M., González-Pardo, H., Pedraza, C., Navarro, F.F., Vallejo, G., Arias, J.L., 2003. Evidence for sexual difference in astrocytes of adult rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 339, 119–122.
- Coopersmith, C., Gans, S.E., Rowe, D.W., Erskine, M.S., 1996. Infusions of lidocaine into the amygdala, but not the preoptic area, block pseudopregnancy in the rat. *Neuroendocrinology* 8, 259–266.
- Davis, M., 1992. The role of amygdala in conditioned fear. In: Aggleton, J.P. (Ed.), *The Amygdala*. Wiley-Liss, New York, pp. 255–306.
- De Olmos, J.S., Heimer, L., 1999. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877, 1–32.
- De Olmos, J.S., Alheid, G., Beltramino, C.A., 1985. Amygdala. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*. Academic Press, Sydney, pp. 223–334.
- De Olmos, J.S., Beltramino, C.A., Alheid, G., 2004. Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*, 3rd ed. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 509–603.
- De Vries, G.J., Simerly, R.B., 2002. Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. In: Pfaff, D.W., Arnold, A.P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T. (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior*, vol. 4. Elsevier, New York, pp. 137–191.
- Ferraz, A.C., Xavier, L.L., Hernandez, S., Sulzbach, M., Viola, G.G., Franci, J.A., Achaval, M., Cunha, C., 2003. Failure of estrogen to protect the substantia nigra pars compacta of female rats from lesion induced by 6-hydroxydopamine. *Brain Res.* 986, 200–205.
- Garcia-Segura, L.M., McCarthy, M.M., 2004. Minireview: role of glia in neuroendocrine function. *Endocrinology* 145, 1082–1086.
- Garcia-Segura, L.M., Luquin, S., Parducz, A., Naftolin, F., 1994. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia* 10, 59–69.
- Garcia-Segura, L.M., Dueñas, M., Busiguina, S., Naftolin, F., 1995. Gonadal hormone regulation of neuronal–glial interactions in the developing neuroendocrine hypothalamus. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 293–298.

- Gomes, F.C., Paulin, D., Moura Neto, V., 1999. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 619–631.
- Gomes, C.M., Reineki, C., Ramos de Paula, P., Severino, G.S., Anselmo-Franci, J.A., Sanvitto, G.L., Lucion, A.B., 2005. Neonatal handling and reproductive function in female rats. *J. Endocrinol.* 184, 435–445.
- Gonzalez-Flores, O., Camacho, F.J., Dominguez-Salazar, E., Ramirez-Orduna, J.M., Beyer, C., Paredes, R.G., 2004. Progestins and place preference conditioning after paced mating. *Horm. Behav.* 46, 151–157.
- Gould, E., Woolley, C.S., Frankfurt, M., McEwen, B.S., 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J. Neurosci.* 10, 1286–1291.
- Gréco, B., Allegretto, E.A., Tetel, M.J., Blaustein, J.D., 2001. Coexpression of ER β with ER α and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology* 142, 5172–5181.
- Gréco, B., Blasberg, M.E., Kosinski, E.C., Blaustein, J.D., 2003. Response of ER α -IR and ER β -IR cells in the forebrain of female rats to mating stimuli. *Horm. Behav.* 43, 444–453.
- Guedes, R.P., Marchi, M.I., Viola, G.G., Xavier, L.L., Achaval, M., Partata, W.A., 2004. Somatostatin, calcitonin gene-related peptide, and gamma aminobutyric acid-like immunoreactivity in the frog lumbosacral spinal cord: distribution and effects in the sciatic nerve transection. *Comp. Biochem. Physiol.* 138, 19–28.
- Guillamón, A., Segovia, S., 1997. Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res. Bull.* 44, 377–382.
- Hajós, F., Halasy, K., Gerics, B., Szalay, F., Michaloudi, E., Papadopoulos, G.C., 2000. Ovarian cycle-related changes of glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in the rat interpeduncular nucleus. *Brain Res.* 862, 43–48.
- Isgor, C., Huang, G.C., Akil, H., Watson, S.J., 2002. Correlation of estrogen β -receptormessenger RNA with endogenous levels of plasma estradiol and progesterone in the female rat hypothalamus, the bed nucleus of stria terminalis and the medial amygdala. *Mol. Brain Res.* 106, 30–41.
- Kettenmann, H., Ransom, B.R., 2005. *Neuroglia*, 2nd ed. Oxford Univ. Press, New York, p. 601.
- Klintsova, A., Levy, W.B., Desmond, L., 1995. Astrocytic volume fluctuates in the hippocampal CA1 region across the estrous cycle. *Brain Res.* 690, 269–274.

Kohama, S.G., Gross, J.R., McNeill, T.H., Finch, C.E., 1995. Glial fibrillary acidic protein mRNA increases at proestrus in the arcuate nucleus of mice. *Neurosci. Lett.* 183, 164–166.

Lâm, T.T., Leranath, C., 2003. Gonadal hormones act extrinsic to the hippocampus to influence the density of hippocampal astroglial processes. *Neuroscience* 116, 491–498.

Laping, N.J., Teter, B., Nichols, N.R., Rozowsky, I., Finch, C.E., 1994. Glial fibrillary acidic protein: regulation by hormones, cytokines and growth factors. *Brain Pathol.* 1, 259–275.

Lee, S.J., Romeo, R.D., Svenningsson, P., Campomanes, C.R., Allen, P.B., Greengard, P., McEwen, B.S., 2004. Estradiol affects spinophilin protein differently in gonadectomized males and females. *Neuroscience* 127, 983–988.

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

Li, X., Schwartz, P.E., Rissman, E.F., 1997. Distribution of estrogen receptor β -like immunoreactivity in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 66, 63–67.

Luquin, S., Naftolin, F., Garcia-Segura, L.M., 1993. Natural fluctuation and gonadal hormone regulation of astrocyte immunoreactivity in dentate gyrus. *J. Neurobiol.* 24, 913–924.

Mascó, D.H., Carrer, H., 1980. Sexual receptivity in female rats after lesions or stimulation in different amygdaloid nuclei. *Physiol. Behav.* 24, 1073–1080.

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

McLendon, R.E., Bigner, D.D., 1994. Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: basic and applied considerations. *Brain Pathol.* 4, 221–228.

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

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

Mong, J.A., Glaser, E., McCarthy, M.M., 1999. Gonadal steroids promote glial differentiation and alter neuronal morphology in the developing hypothalamus in a regionally specific manner. *J. Neurosci.* 19, 1464–1472.

Murphy, D.D., Segal, M., 1997. Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1482–1487.

Newman, S.W., 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877, 242–257.

Newman, S.W., 2002. Pheromonal signals access the medial extended amygdala: one node in a proposed social behavior network. In: Pfaff, D.W., Arnold, A.P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T. (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior*, vol. 2. Academic Press, San Diego, pp. 17–31.

Ojeda, S.R., Ma, Y.J., 1999. Glial–neuronal interaction in the neuroendocrine control of mammalian puberty: facilitatory effects of gonadal steroids. *J. Neurobiol.* 40, 528–540.

Ojeda, S.R., Dissen, G.A., Junier, M.P., 1992. Neurotrophic factors and female sexual development. *Front. Neuroendocrinol.* 13, 120–162.

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

Paxinos, G.A., Watson, C., 1998. *The Rat Nervous System in Stereotaxic Coordinates*, 4th ed. Academic Press, San Diego.

Pérez, J., Luquin, S., Naftolin, F., Garcia-Segura, L.M., 1993. The role of estradiol and progesterone in paced synaptic remodeling of the rat arcuate nucleus. *Brain Res.* 608, 38–44.

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

Pfaus, J.G., Marcangione, C., Smith, W.J., Manitt, C., Abillama, H., 1996. Differential induction of Fos in female rat brain following different amount of vaginocervical stimulation: modulation by steroid hormones. *Brain Res.* 741, 314–330.

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

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

Rasia-Filho, A.A., Londero, R.G., Achaval, M., 1999. Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. *Brain Res. Bull.* 2, 173–183.

Rasia-Filho, A.A., Londero, R.G., Achaval, M., 2000. Functional activities of the amygdala: an overview. *J. Psychiatry Neurosci.* 25, 14–23.

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

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

Scalia, F., Winans, S.S., 1975. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.* 161, 31–55.

Sheehan, T.P., Cirrito, J., Numan, M.J., Numan, M., 2000. Using c-fos immunohistochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Behav. Neurosci.* 114, 337–352.

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

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

Simerly, R.B., 1998. Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behav. Neurosci.* 114, 337–352.

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

Sternberger, L.A., 1979. *Immunohistochemistry*. Wiley, Chichester. Swanson, L.W., Petrovich, G.D., 1998. What is the amygdala? *Trends Neurosci.* 21, 323–331.

Tranque, P.A., Suarez, I., Olmos, G., Fernandez, B., Garcia-Segura, L.M., 1987. Estradiol-induced redistribution of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res.* 406, 348–351.

Wooley, C.S., McEwen, B.S., 1992. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J. Neurosci.* 12, 2549–2554.

Xavier, L.L., Viola, G.G., Ferraz, A.C., Da Cunha, C., Deonizio, J.M.D., Netto, C.A., Achaval, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res. Protoc.* 16, 58–64.

Zhao, L., Chen, S., Ming Wang, J., Brinton, R.D., 2005. 17 β -Estradiol induces Ca²⁺ influx, dendritic and nuclear Ca²⁺ rise and subsequent cyclic AMP response element-binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism. *Neuroscience* 132, 299–311.

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

4.2 Experimento 3: An immunohistochemical analysis of two astrocytic intermediate filament immunoreactivity in different ages of rats postnatal development: sexual dimorphism in medial amygdala subnuclei

Este artigo está em vias de ser submetido.

AN IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF TWO ASTROCYTIC INTERMEDIATE FILAMENT IN DIFFERENT AGES OF RATS POSTNATAL DEVELOPMENT: SEXUAL DIMORPHISM IN MEDIAL AMYGDALA SUBNUCLEI OF RATS

Flávia G. Martinez^{a,b}, Aline Pagnussat^{a,b}, Claudia Puperi^{a,b}, Maria Izabel Ugalde da Rocha^b, João Riboldi^c, Léder L. Xavier^d, Alberto A. Rasia-Filho^{a,e} and Matilde Achaval^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, ICBS Universidade Federal do Rio Grande do Sul, R. Sarmento Leite 500, Porto Alegre, 90170-050, RS, Brazil

^bLaboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, R. Sarmento Leite 500, Porto Alegre, 90170-050, RS, Brazil

^cDepartamento de Estatística, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9550, Porto Alegre 91509-900, RS, Brazil

^dLaboratório de Biologia Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6689, Porto Alegre 91509-900, RS, Brazil

^eDepartamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite 245, Porto Alegre, 90170-050 RS, Brazil

Correspondence address: Matilde Achaval
Laboratório de Histofisiologia Comparada
Departamento de Ciências Morfológicas
ICBS, UFRGS
Rua Sarmento Leite 500
90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil
Phone and fax: +55 5133083092
E-mail address: achaval@ufrgs.br

Abstract - The medial amygdala (MeA) is a sexually dimorphic area where gonadal hormones play an important role in neuro-glial and synaptic plasticity. Glial markers could indicate morphological alterations and sexual dimorphism in astrocytes, in both genders during the neurodevelopment. Immunohistochemistry was used to identify the astrocytic marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (VIM) in the different MeA subnuclei: anterodorsal (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) of intact male and female rats in different ages of the ontogenetic development: 1, 5, 11, 21, 31 and 45 postnatal days (PN). Immunoreactivity (ir) data were semi-quantified by optical densitometry and showed sexual dimorphism and differences among PNs in the MeA subnuclei. The astrocytic morphology, VIM-ir and GFAP-ir changes during postnatal development, indicates that genetic/or epigenetic actions of gonadal hormones influence on MeA subnuclei glial plasticity. Glial radial cells were mainly labelled by VIM-ir, although a scanty GFAP-ir labelling was also observed at PN1, PN5 and although less, also at PN11. A pronounced vascular domain of GFAP-ir was observed from PN5 onwards. On the other hand, the perineuronal GFAP-ir was less intense in the three first ages, when compared with that of perivascular glial cells. As expected, there was a sharp decrease in VIM-ir in all the subnuclei during the development. That is, VIM-ir showed to be affected by the interaction of the sex of the animal, by the postnatal development and also varied according to the MeA subnuclei where it was measured. These factors interacted among themselves and contributed for the VIM-ir results. A sexual dimorphism was found in the three MeA subnuclei, although, at different postnatal days. Notably, at PN21 significant effects could still be found, but they did not last for longer periods, i.e., at PN31 or at PN45, as studied here. That is, GFAP-ir showed to be affected by postnatal development and by the MeA subregions studied, but not by the interaction of them

with the sex of the animal. A sexual dimorphism was found at the very first day studied (PN1) and at the last one (PN45). Within each sex, PN and MeA subregion differences in the GFAP-ir could also be reliably found although with a complex and dynamic pattern.

Theme: Other system of the CNS

Topic: Limbic system and hypothalamus

Keywords: amygdaloid complex, astrocyte, development, GFAP, glial cells, immunohistochemistry, optical densitometry, sexual dimorphism, vimentin

Running title: GFAP and vimentin during development in the medial amygdala

Abbreviations: glial fibrillary acidic protein (GFAP), medial amygdala (MeA), posterodorsal medial amygdala (MePD), posteroventral medial amygdala (MePV), anterodorsal medial amygdala (MeAD), estrogen receptor α (ER- α), estrogen receptor β (ER- β), gonadotrophin releasing hormone (GnRH), anteroventral periventricular nucleus (AVPN), optic tract (OT), stria terminalis (ST), vimentin (VIM), postnatal day (PN).

1. Introduction

Throughout life, gonadal steroids may contribute to sexually dimorphic functions that occur in different regions of the nervous system. Sex hormones exert influence in the formation and modulation of neural circuits, by altering cell birth, migration, differentiation and death (De Vries and Simerly, 2002). The gonadal

hormone-receptor complex interacts with genome and promotes alterations of steroids hormones, brain structure, function and behavior (McEwen, 2004).

The medial amygdala (MeA), part of the "extended amygdala" (Alheid et al., 1995; De Olmos et al., 2004), is a group of subnuclei with several intrinsic associative projections and extensive connections with some hypothalamic areas (Canteras et al., 1995; Petrovich et al., 2001). The MeA is subdivided into four subnuclei: anterodorsal (MeAD), anteroventral (MeAV), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV), according its cytoarchitectonic organization, hodology and function (Alheid et al., 1995; Canteras et al., 1995; De Olmos et al., 2004). These subnuclei can be involved with the perception of vomeronasal inputs (Guillamón and Segovia, 1997) and the modulation of social behaviors many of which differ between males and females (Bolhuis et al., 1984; Mascó and Carrer, 1980; Rasia-Filho et al., 2004; Newman, 1999). Indeed, the MeA subnuclei are related to the modulation of reproductive behavior in male and female rats (Lehman et al., 1980; Swann and Fiber, 1997; Mascó and Carrer, 1980; Rasia-Filho et al., 2000) and also contributes to the associative learning and memory with emotion content modulation, besides defensive and social behavior (Canteras et al., 1995; Pitkänen et al., 1997; De Olmos et al., 2004). Additionally, the adult rat MeA subnuclei have sex steroid sensitive neurons, which express testosterone receptors, both α and β estrogen receptors (ER- α , ER- β) and also progesterone receptors (Simerly, et al., 1990; Shughrue et al., 1997; De Vries and Simerly, 2002).

The presence of receptors for gonadal hormones in the MeA suggests that neuronal morphofunctional plasticity can be dependent in part, of their local actions (Newman, 1999; Rasia-Filho et al., 2002; Martinez et al., 2006). Rat MeA subnuclei display sexually dimorphic characteristics, for instance, the volume is higher in males than females (Nishizuka and Arai, 1981; Mizukami et al., 1983; Hines et al., 1992), the

neuronal somatic volume is higher in males than proestrus and estrus females in MePD and MePV (Hermel et al., 2006; Rocha, 2006). Moreover, in males dendrites have a higher dendritic spine density than females in different phases of the estrous cycle (Rasia-Filho et al., 2004); and males have different electrophysiological activity in the MePD than females at prepuberal ages (Cooke and Woolley, 2005).

Glial cells are targets for gonadal hormones in the MeA as in other regions of CNS (Guillamón and Segovia, 1997; Amateau and McCarthy, 2002; Catalani et al., 2002; Mong and McCarthy, 2002). The regulation of cytoskeletal proteins may be relevant for normal astrocytic physiology and are different in males and females (Garcia-Segura and Melcangi, 2006). GFAP is an important glial marker and also vimentin (VIM), a subtype of intermediate filaments (IFs), which has a different pattern of expression, since this protein appears transiently during development (Gomes et al., 1999). During the pre- and postnatal life, the astrocytes display three IF proteins such as nestin, vimentin (VIM) and glial fibrillary acidic protein (GFAP). Nestin and vimentin are the main IFs in immature astrocytes, whereas maturing and adult astrocytes contain VIM and/or GFAP (Eng et al., 2000; Kettenman and Ranson, 2005). Radial glial cells fit the profile of both neuronal and glial precursor, may create boundaries in some regions of developing brain to limit neuronal migration, and contribute to regional neurogenesis in many ways (Campbell and Götz, 2002). Its modulation could affect neuron production, neuronal migration, and overall cortical architecture (Weissman et al., 2004).

Astrocytes are dynamic cells that play important roles in neuron metabolism, regulating extracellular ion concentrations, detoxifying xenobiotics, modify synaptic efficacy, inactivating neurotransmitters, inducing and maintaining the blood-brain barrier and glial limitans, and providing nutrients and trophic support for neurons and

oligodendrocytes (Kettenman and Ransom, 2005; Rao and Jacobus, 2004). Experimental findings *in vivo* and *in vitro* have shown that GFAP immunoreactivity (GFAP-ir) is modified by gonadal steroid manipulations in different sexually dimorphic brain areas (Garcia-Segura et al., 1989; Lâm and Leranth, 2003). For instance, diestrus females displayed a higher GFAP-ir in the MePD and in the MePV than males (Rasia-Filho et al., 2002), proestrus females presented more GFAP-ir in these same subnuclei than in the other estrous phases, and ovariectomized (OVX) rats showed less GFAP-ir in all MeA subnuclei than OVX females that received estradiol and progesterone as substitutive therapy (Martinez et al., 2006). It is suggested that ovarian steroids, particularly elevations of estradiol and progesterone during the proestrus phase, coordinate synaptic remodeling within the MeA by modulating GFAP expression (Garcia-Segura et al., 1999).

During development, the ultimate determinant of brain phenotype is dimorphism in the steroid hormone milieu during perinatal sensitive period (Matsumoto, 1999). Estradiol initiates a cascade of events that determines the majority of masculine brain (McCarthy et al., 1993) and aromatase causes newborn males to have high hypothalamic estradiol concentrations (Rhoda et al., 1983). Astrocytes can also be target of sex steroid actions during development of the CNS, which may involve different trophic factors, such as cytokines and growth factors (Garcia-Segura et al., 1989; Laping et al., 1994; Garcia-Segura et al., 1996). The mechanisms of hormonally mediated astrocytic differentiation are likely to be region specific (McCarthy et al., 2002). Although the sexual dimorphism and the action of female steroids the GFAP-ir in the MeA subnuclei in adult rats were already described (Rasia-Filho et al., 2002; Martinez et al., 2006), there are no reports about GFAP-ir and VIM-ir during postnatal development. The aim of this study was investigate the GFAP-ir and VIM-ir to reveal a

probable difference in the expression of both intermediate filaments between male and female rats in the three medial amygdaloid subnuclei along the postnatal development or postnatal days (PN): 1 (PN1), 5 (PN5), 11 (PN11), 21 (PN21), 31 (PN31) and 45 (PN45).

2. Materials and Methods

Animals

Female Wistar rats weighting 280-320 g, were housed and mated with age-mated males. Free access to food and water were everytime available, at a temperature maintained around 22°C and a 12:12 h light-dark cycle. Pregnant females were isolated and allowed to deliver normally. Cages were checked regularly for the presence of pups to determine the day of birth (PN0). One couple of pups (one male and one female) was obtained from each parents offspring. Rats were identified and separated in groups of PN1, PN5, PN11, PN21, PN31 and PN45, each composed by six animals of each sex (n=72). All efforts were made to minimize the number of animals studied and their suffering. Rats were manipulated according to international laws for the ethical care and use of laboratory animals (European Communities Council Directive of 24 November 1986, 86/609/EEC) and to local guidelines on the ethical use of animals.

Immunohistochemical Procedure

The animals were deeply anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, i.p.), injected with heparin (500-1000 IU), and transcardially perfused through the left cardiac ventricle, using a peristaltic pump (10-20 mL/min), with 50-200 mL of saline solution

followed by 50-200 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (PB; pH 7.4). Volumes differed due to the animals' size. The brains were removed and post-fixed in the same fixative solution at room temperature for 4 h. Afterwards, they were cryoprotected in a 30% sucrose solution in PB at 4°C until they sank and were frozen in isopentane and liquid nitrogen and stocked at -70°C. Coronal sections (50 µm) were obtained using a cryostat (Leitz, Germany). Three sections were successively collected in phosphate buffer saline solution (PBS). The first two slices of each series of the same animal were processed for VIM-ir and GFAP-ir using peroxidase-antiperoxidase (PAP) procedure (Stenberger, 1979), while the third slice served to localize the amygdaloid regions by Nissl technique.

Free-floating sections were pretreated with 10% methanol dissolved in 0.3% H₂O₂ to block endogenous peroxidase for 30 min and carefully washed in PBS and incubated with non-immune 3% normal goat serum (NGS) in PBS containing 0.3% Triton X-100 (PBS-Tx, Sigma Chemical Co., USA) for 30 min. Sections were incubated in a specific antibody raised in mouse against vimentin (1:100; Dako Co., Denmark) and specific antiserum raised in rabbit against GFAP (1:75; Sigma Chemical Co., USA) diluted in 3% NGS in PBS-Tx for 48 h at 4°C. After being washed several times with PBS-Tx, sections were incubated with either anti-mouse IgG serum (Amersham, UK) diluted 1:200 or anti-rabbit IgG serum (Sigma Chemical Co., USA) diluted 1:50 in PBS-Tx at room temperature for 2 h. Sections were again washed in PBS and incubated in either streptavidin complex (Amersham, UK) diluted 1:100 or rabbit PAP (Sigma Chemical Co., USA) diluted 1:500 in PBS for 2 h at room temperature. The reaction was developed by pre-incubating the sections in a histochemical medium that contained 0.06% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Chemical Co., USA) dissolved in PBS for 10 min and, then, incubated in the same solution

containing 0.001% H₂O₂ for 10 min at room temperature. Finally, the sections were rinsed in PBS, mounted in slides, dehydrated in ethanol, cleared with xylene and covered with Permount and coverslips. Control sections were incubated omitting the primary antibody by replacing it with PBS.

The brains from the rats in the different development phases were fixed and post-fixed for the same time period in identical solutions, they underwent exactly the same histological processes and were incubated in an identical medium for the same time period. These procedures were taken to reduce the possibility of overreaction, differences in the chromogen reaction or changes in the background levels among the experimental groups of rats.

Data Acquisition

For the immunohistochemical study, the MeAD, the MePD and MePV were selected for data acquisition. The location of each of them was based on a rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1998), and in accordance with other descriptions (Alheid et al., 1995; Canteras et al., 1995). The positions of the MeA subnuclei in relation to the optic tract (OT) and the stria terminalis (ST) served as anatomical references for all groups studied here.

The intensity of the GFAP immunoreaction was measured by semi-quantitative densitometric analysis using a Nikon Eclipse E-600 microscope (500X, Japan) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and the Image Pro Plus Software 4.1 (Media Cybernetics, USA). The digitized images obtained from the selected areas were converted to an 8-bit gray scale (0-255 gray levels). All lighting conditions and magnifications were held constant. Picture elements (pixels) employed to measure optical density were obtained from squares with 45000 or 96000 μm^2 (our area of

interest, AOI), depending of the ages of the animals, that is, PN21, PN31 and PN45 larger AOI were used and for PN1, PN5 and PN11, were smaller one was employed. Two squares containing the AOI were placed over each different MeA subnuclei, avoiding their boundaries. The obvious artifacts were avoided. Two measurements were performed and four sections for each MeA subnuclei were used from each animal. The average data of the each section was recorded. Both left and right sides of each brain were used and 16 readings per subregion of the MeA were obtained from each animal studied (Rasia-Filho et al., 2002; Xavier et al., 2005; Martinez et al., 2006).

The formula used to measure the optical density (OD) was the following:

$$OD_{(x,y)} = -\log [(intensity_{(x,y)} - black)] / (incident - black)$$

where “intensity_(x, y)” is the intensity at pixel_(x, y), “black” is the intensity generated when no light goes through the material, and “incident” is the intensity of the incident light.

Macros and other algorithms employed to perform the background correction were done in accordance with a previously described protocol (Xavier, et al., 2005).

Statistical Analysis

Data regarding the GFAP-ir and VIM-ir optical densities obtained from the MeAD, MePD and MePV in the different PN days were compared using an analysis of variance (ANOVA) for repeated measures and the interaction among all the factors of interest (sex, postnatal days, and MeA subregions). *Post hoc* comparisons were done using the Tukey test. The level of significance was set as $p < 0.05$.

2. Results

Qualitative light microscopic observations

In the three studied subregions of the MeA, GFAP-ir and VIM-ir were detected in glial cell bodies and their processes, although changing the intensities along the different development stages. No reaction occurred when the first antibody was omitted.

Based solely on these qualitative observations, evident differences between sexes could not be identified and the following descriptions can apply for both sexes. Nevertheless, the GFAP-ir in the MePD and in the MePV subnuclei displayed strong labeling when compared to the MeAD in both males and females studied along the different PN ages.

MeAD –VIM-ir

At PN1, the MeAD displayed strong VIM-ir radial glial cells. In both sexes, VIM-ir long processes ran through the MeAD with a parallel to optic tract distribution and a lightly oblique course. These processes arrived to the subpial region.

From PN5 to PN11 the VIM-ir progressively decreased in this subnucleus as well as in its vicinity. The parallel distribution of labeled processes coursed a dorsoventral direction and labeled cells decreased when compared with PN1. Nevertheless, VIM-ir stellate astrocytes with long processes were identified. In addition, the reactive vascular glial cells allowed to identify an improved vascular bed at this ages.

At the PN11, besides the VIM-ir cells decrease, the OT was more prominent at the medial MeAD border. Long processes of radial glial cells ran to different directions, and labeled end-feet towards long vessels were observed yet.

At the PN21, labeled radial glial cell processes were significantly diminished. Sometimes, VIM-ir vascular portions and some reactive long processes running to the subpial region were observed, while within this subnucleus no VIM-ir cells were found.

At the PN31 as in the PN45, the VIM-ir glial cells were only restricted to vascular walls. In the remaining parenchyma of the MeAD no reactive processes were observed.

MePD – VIM-ir

The PN1 was characterized by the abundant presence of reactive radial glial cells. These cells with long processes were much more labeled with VIM than GFAP. Some of the processes were distributed parallel to the OT, others were oriented perpendicular to it and still others did not show preferred direction. The MePD medial aspect showed strongly labeled processes in many directions, its intermediate aspect displayed some oblique processes in relation to OT and, in the lateral part, there were heavily and condensed VIM-ir cells.

These cells were also detected at the PN5 of both sexes, but with reduced length and few branches. In addition, these three parts of MePD displayed flattened-like and stellate astrocytes. Markedly in the PN11, they could not be differentiated as in the previous ages. VIM-ir glial cells at PN11 were characterized by the presence of numerous polygonal-like astrocytes with long processes and scanty stellate astrocytes. In all cellular layers, flattened-like astrocytes were identified. The increase of the VIM expression also contributed to suggest that an increase in the vascular net could have occurred locally.

At PN21, VIM-ir abruptly decreased. Astrocytes were only found in the dorsal aspect of the MePD and some few reactive long processes, free or attached to blood

vessels, were observed. At PN31, the VIM-ir still decreased and reactivity was found in long processes within the nucleus or surrounding blood vessels. At PN45, VIM-ir almost disappeared in the MePD, of both sexes.

MePV – VIM-ir

At PN1 males showed strong VIM-ir in radial glial cells, in all MePV subnuclei. In the subpial region and in the lateral surface of the OT there were long and parallel processes with an oblique direction and converging to the MePV lateral and dorsal regions.

At PN5 a significant decrease in VIM-ir cells occurred. Radial glial cells were still present, but sparse stellate and long processes were distributed within this subnucleus, a condition more evident in males than in females. At PN11, VIM-ir radial glial cells and more stellate astrocytes with long processes were identified. Vascular processes were also observed. VIM-ir cells were less perpendicular at the subpial region than at PN5. That is, at PN1 the glial processes were rather parallel to the MePV surface, otherwise at PN5 and at PN11 these processes were distributed in several directions.

At PN21, VIM-ir glial cells become more intense from males, where VIM-ir radial glial cells emerged perpendicularly from the subpial region. Sparse cells were observed within the MePV, although immunoreactivity surrounding blood vessels were also identified. At PN31 and at PN45 VIM-ir cells showed a marked reduction in both sexes.

MeAD – GFAP-ir

In the MeAD and adjacent structures GFAP-ir was scarce and displayed less GFAP-ir than the other two MeA subregions studied here. At PN1 for either males and females, the OT and the medial region of the MeAD showed few stellate astrocytes. On the other hand, the branches of the anterior cerebral artery in this area, paralleling and juxtaposed to the OT, showed GFAP-ir astrocytic end-feet.

At PN5, the myelin of the OT began to appear. In the ventral region of the MeAD, adjacent to the leptomeninges, scanty labeled stellate astrocytes with short processes were observed. Similarly to PN1, they were also scarce. At PN11, GFAP-ir stellate cells increased and from PN21 to PN45 the GFAP-ir stellate astrocytes progressively enhanced their appearance, as occurred with end-feet of the vascular glial cell domains.

At PN1, PN5 and PN11 there were no identifiable GFAP-ir radial glial cells, as seen in the other MeA subnuclei, and it was difficult to perceive the border of anatomical structures in relation to the vicinity. Several blood vessels with surrounding GFAP-ir astrocytic end feet were detected. At PN1 no myelin was seen in the OT, while at PN5 it was scanty, and at PN11 pale myelin sheaths within the OT were clearly recognized.

At PN21, the volume of the MeAD had a significant increase. The OT notably contrasted with its vicinity, probable due to an increase in the myelin sheaths of their nervous fibers, as well as with fibrous astrocytes. Within the MeAD, the GFAP-ir enhanced in their branches, and so in glial cells around the blood vessels that also displayed more reaction.

At PN31, numerous and more volumous GFAP-ir astrocytes displayed more branches and longer processes while, at PN45, GFAP-ir reached highest expression and astrocytic processes were more branched. At the same time, more labeled astrocytes and a vasculature clearly expanded, with more marked end-feet, were observed.

MePD – GFAP-ir

At PN1 in both sexes, few and less intense GFAP-ir radial glial cells with long processes were identified. At PN5, GFAP-ir in glia limitans against and parallel to the OT and few flattened-like and stellate astrocytes in the medial cellular layer of the MePD were detected. Some flattened-like astrocytes also were presented in the intermediate layer. Nevertheless, in the most dorsal part of the MePD, between the OT and the ST the most intense GFAP-ir occurred. Anterior cerebral artery branches invaded the nervous parenchyma and GFAP-ir glial cells surrounded them.

At PN11, the labeled astrocytes were scarce although GFAP-ir increased in relation to PN5. The medial and lateral cellular layers showed more intense reaction in scant and disperse flattened-like and stellate astrocytes. In the medial cellular layer, perpendicular to the OT, several reactive processes could be observed. In the intermediate cellular layer of the MePD, more astrocytes were visualized when compared with data from PN1 and PN5.

At PN21, the volume of the brain and also the MePD appeared significantly increased. In both sexes the MePD layers become more evident, which occurred mainly for the medial and the lateral cellular layers. GFAP-ir in flattened-like astrocytes persisted and immunoreactive stellate astrocytes were more evident. Although the most dorsal part of the MePD showed more GFAP-ir in flattened-like and stellate astrocytes, the perpendicular GFAP-ir processes to the OT decreased, when compared with the data from PN11.

At PN31, the MePD showed a stronger GFAP-ir than at PN21. GFAP-ir in stellate astrocytes was now distinguished in the three cellular layers in this subnucleus, in the dorsal most part of the MePD and in the medial and in the lateral borders of the OT and the ST. Astrocytes were more branched and with short processes, being the

reactive processes shorter in the intermediate cellular layer than in the medial one. Several immunoreactive end-feet of polygonal-like astrocytes were observed close to the vascular bed.

At PN45, a very intense GFAP-ir in astrocytes was identified in the three cellular layers of the MePD. The GFAP-ir I glial processes in the medial layer was longer than in its intermediate or lateral layers. In addition, the immunoreactive astrocytes of the medial layer were closely apposed among themselves and in relation to the other layers. The remarkable aspect of the MePD at this developmental period was the marked GFAP-ir in the perivascular astrocytic domain. Besides, the perpendicular reactive processes directed to the OT acquired a multidirectional distribution.

MePV-GFAP-ir

The GFAP-ir cells in the MePV were distributed in three layers, although with some differences when compared to the MePD. At PN1, the subpial region was immunoreactive and in the inner part of this subnucleus, less GFAP-ir was observed. Radial glial cells were detected, but with thinner processes when compared to the VIM-ir radial cells already described. At PN5, GFAP-ir glial cells with shorter processes were more evident and immunoreactive astrocytic clusters in the medial region of the MePV were also identified.

At PN11, the volume of the MePV increased as the capillary network and GFAP-ir astrocytes were higher than at PN5. The subpial region was increased and the astrocytic cluster improved. PN21 was characterized by the enhanced of more branched immunoreactive astrocytes. Dense astrocytes with short processes were observed throughout the MePV and the intense reaction in the subpial region persisted. At PN31, GFAP-ir increased, as also occurred with the quantity of blood vessels. Astrocytes

displayed GFAP-ir in longer processes when compared to the other studied PN. At PN45, strongly GFAP-ir astrocytes with more numerous and long processes were distinguished in both sexes. The subpial region also showed the strongest GFAP-ir than at the other studied ages.

Semi-quantitative analysis:

VIM-ir

For the VIM-ir, there were statistically different effects in the data obtained due to postnatal ages [$F(5,60) = 43.12$; $p < 0.0001$], for the MeA subregions [$F(2,120) = 35.52$; $p < 0.0001$], and for the interactions between sex *vs* postnatal ages [$F(5,60) = 8.45$; $p < 0.0001$], sex *vs* MeA subregions [$F(2,120) = 4.80$; $p < 0.01$], and postnatal ages *vs* MeA subregions [$F(10,120) = 4.97$; $p < 0.001$]. Moreover, the interaction among these three factors (sex, postnatal ages and MeA subregions) was also statistically significant [$F(10,120) = 2.71$; $p < 0.005$]. Based on these latter data and because one factor influences the others too, results are presented together in Figure 3.

By the use of the triple significant interaction test among the studied factors, it was found that there was a sexual dimorphism at PN1 in the MeAD [$F(1,168) = 11.14$; $p = 0.001$] and in the MePV [$F(1,168) = 22.40$; $p < 0.0001$]; at PN5 in the MePD [$F(1,168) = 20.85$; $p < 0.0001$]; and, at PN21, in the MeAD [$F(1,168) = 6.81$; $p = 0.009$], in the MePD [$F(1,168) = 11.86$; $p < 0.001$] and in the MePV [$F(1,168) = 6.34$; $p = 0.012$]. In fact, the *post hoc* test showed that at PN1 males had a higher VIM-ir than females in the MeAD ($p = 0.001$) and in the MePV ($p < 0.0001$). At PN5, males displayed less VIM-ir than females in the MePD ($p < 0.0001$). At no other postnatal day

or in no other MeA subregion than the aforementioned ones there were statistically significant differences.

GFAP-ir

Also for the GFAP-ir they were statistically different effects in the data obtained in relation to the PN development [$F(5,60) = 7.60$; $p < 0.0001$], for the MeA subregions [$F(2,120) = 18.30$; $p < 0.0001$], and for the interactions between sex *vs* postnatal ages [$F(5,60) = 4.53$; $p < 0.002$], sex *vs* MeA subregions [$F(2,120) = 10.46$; $p < 0.0001$], and postnatal ages *vs* MeA subregions [$F(10,120) = 9.14$; $p < 0.001$]. Nevertheless, the interaction among these three factors (sex, postnatal ages and MeA subregions) was not statistically significant [$F(10,120) = 0.78$; $p = 0.643$]. Based on these data, results are presented grouped two by two among these factors in Figures 4-6.

In this case, by the use of the simple significant interaction procedure between the studied factors, it was found that, independently of any MeA subregion in specific, there was a sexual dimorphism in the GFAP-ir at PN1 [$F(1,60) = 16.94$; $p < 0.001$] and at PN45 [$F(1,60) = 4.72$; $p = 0.033$]. That is, males displayed higher GFAP-ir than females at PN1 and less than females at PN45. In addition, there were statistically differences in the GFAP-ir among the postnatal days for both males [$F(5,60) = 9.54$; $p < 0.0001$] and females [$F(5,60) = 2.60$; $p = 0.034$]. In males, the *post hoc* comparisons showed that: a) data obtained at PN1 were different from that at PN5, at PN11 and at PN21 ($p < 0.007$ in all cases), but not at PN31 and at PN45 ($p > 0.3$ in both cases); b) data obtained at PN5 were different only when compared with those at PN45 ($p = 0.003$); c) data at PN11 and at PN21, were only different to those at PN45 ($p < 0.007$); and, d) data at PN31 were not different when compared with those obtained at PN45.

I.e., with the exception of PN31, the GFAP-ir obtained at PN45 in males was higher when compared to the other postnatal days. By contrast, in females, the *post hoc* comparisons showed no statistical difference in the GFAP-ir when data from each different postnatal days were compared among themselves ($p > 0.3$ in all cases).

For the interaction of sex and MeA subregions, there were no differences between males and females in the MeAD [$F(1,145) = 2.52$; $p = 0.114$], a trend was found in the MePD [$F(1,145) = 2.94$; $p = 0.08$], and a highly statistical significance was revealed in the MePV [$F(1,145) = 11.83$; $p < 0.001$]. The *post hoc* comparison revealed that the GFAP-ir in the male MePV was higher than the one in females ($p = 0.01$). There were also statistically differences in the GFAP-ir among the MeA subregions at males [$F(2,120) = 17.76$; $p < 0.001$] and females [$F(2,120) = 11.0$; $p < 0.001$]. In males, the *post hoc* comparisons showed that data from the MeAD and from the MePD were not different ($p = 0.9$). On the other hand, data from the MePV were higher than those obtained from the MeAD and the MePD ($p < 0.0001$ in both cases). In females, another condition was found: GFAP-ir in the MeAD was less intense when compared to MePD ($p < 0.001$) and to the MePV ($p = 0.02$). GFAP-ir from the MePD was not different than the one from the MePV ($p = 0.66$).

For the interaction of postnatal ages and MeA subregions, there were statistically significant differences among the studied areas at PN1 [$F(2,120) = 20.20$; $p < 0.0001$], at PN5 [$F(2,120) = 10.92$; $p < 0.0001$], at PN11 [$F(2,120) = 7.06$; $p < 0.002$] and later on at PN45 [$F(2,120) = 24.69$; $p < 0.0001$]. There were significantly differences along the postnatal days in the MeAD [$F(5,145) = 2.52$; $p = 0.03$], in the MePD [$F(5,145) = 17.19$; $p < 0.0001$], and in the MePV [$F(5,145) = 5.10$; $p < 0.0003$]. The *post hoc* comparison showed that the GFAP-ir at PN1 was less intense in the MeAD than in the MePV ($p < 0.0001$), and the same occurred for the MePD than in the MePV ($p < 0.001$).

At PN5, GFAP-ir was weaker in the MeAD than in the MePV ($p < 0.003$), whereas a trend for a statistical difference was found when comparing data from the MePD with those from the MePV ($p = 0.06$). At PN11, data from the MeAD were not different than those from both the MePD and the MePV ($p > 0.8$ in both cases), but GFAP-ir in the MePD was less intense than in the MePV ($p = 0.02$). At both PN21 and PN31, there were no GFAP-ir differences among the MeA subnuclei ($p > 0.9$). Finally, at PN45, statistical differences in the GFAP-ir were again observed in the studied areas, i.e., data were higher in the MePD than in the MeAD and in the MePV ($p < 0.001$ in both cases).

Discussion

During the PN development of the MeA subnuclei, three types of astrocytic cells (radial, bipolar and polygonal ones) were identified. In both sexes, as expected, the astrocytic VIM-ir was gradually replaced by a predominant GFAP-ir in differentiated glial cells (Kettenman and Ransom, 2005, Collado et al., 1995, Sancho-Tello et al., 1995). Furthermore, in most part of analyzed sections, VIM-ir pattern was not the same as the GFAP-ir one. VIM-ir was shown in long and thin processes and with a predominant flattened pattern when in contact with blood vessels. In contrast, GFAP-ir showed a polygonal shape surrounding blood vessel, flattened or bipolar astrocytes, varying the predominant shape according to the age and the subregions of each MeA subnuclei. Moreover, the present data indicate that astrocytic IFs in the three MeA subnuclei have a sexual dimorphism during the rat development, adding and complementing previous results in the adult rat MeA (Rasia-Filho et al., 2002; Martinez et al., 2006) and in other CNS regions (Mong and McCarthy, 2002, Guillamón and Segovia, 1997, Lâm and Leranath, 2003).

The expression of VIM in pre-differentiated cells types during the development suggests that it may play a role in the early structural scaffold, which will be later replaced by more specialized networks constituted by GFAP-ir cells (Cochard and Paulin, 1984). Our results showed, in both sexes, that at early ages VIM is co-expressed with GFAP in all the rat MeA subnuclei investigated here and, rather, in the MePD and in the MePV. Besides it has been considered that VIM is the major or only expressed IF during the early astrocytic development (Schnitzer et al., 1981), co-expression of VIM and GFAP at early stages of development in other regions of CNS and/or other species were found (Arochena et al., 2004; Sancho-Tello et al., 1995). In addition, there is a possible relationship between these IFs, i.e., VIM may form IFs with either nestin or GFAP as obligatory components in immature astroglial cells, whereas GFAP is the only IF protein of these three that may form filaments on its own. The IF protein partnerships is a requisite for IF formation in normal and reactive astrocytes. Thus, the co-expression of both IFs during development may be relevant for an IF assembly, and the presence of vimentin associated with synemin or other elements could be involved in the stabilization of the IF network in the glial cytoskeleton (Eliasson, et al., 1999). The arrangement of these glial elements, which modulate their interaction with neurons, are under multifactorial influences and 17β -estradiol, which may promote the gradual replacement of VIM expression and the significant increase in GFAP-ir, the increase in process-bearing astrocytes, and a decrease in the frequency of astrocytes with a polygonal shape whereas leading to a polygonal morphology in hippocampal cultures (Garcia-Segura et al., 1989).

Radial glia appeared in early ages in the three MeA subnuclei and decreased with development. Likely as cortical radial cells, in the MeA these cells probably could be involved with neuronal migration (Lemke, 2001). Progenitor cells have processes

that span the distance between the ventricular and pial surface, where they form pial end-feet (Kettenmann and Ransom, 2005). While these cells are referred to as radial glial cells, their processes may not be strictly radial and, depending upon their location in the CNS, their processes may emerge and radiate perpendicular to pial surface or they may curve substantially (Rao and Jacobus, 2004). This curved morphology was observed in the MePD and the MePV, but not in the MeAD. These cells were present until PN11, with scarce long processes distributed in all MeA subnuclei, specially in the MePV.

In astrocytes from superficial cortex of rats, radial VIM-ir fibers vanished by PN20, with the greatest rate of disappearance occurring between PN8 and PN15 (Pixley and De Vellis, 1984). This latter result is in accordance with our observations. In general, VIM-ir declined progressively during postnatal development until PN21 and then remained almost constant at adult levels in the MeA subnuclei. Indeed, VIM-ir decreased from PN5 to PN11 in the three subnuclei studied here. Moreover, from PN21 to PN45, the VIM-ir glial cells were only restricted to vascular walls and, in the remaining parenchyma, no reactive processes were observed. VIM-ir vascular portions and some reactive long processes running to the subpial region, “tanicytes-like”, were observed mostly in the MePV, where sparse cells were also observed. Some glial cells with radial morphologies persisted at the adulthood and could remain, among other roles, stem-cell properties (Rao and Jacobus, 2004). However, this possibility needs additional experimental evidences.

Although we have found GFAP-ir astrocytes since PN1, this astroglial marker decreased sharply until PN5, maintained almost a constant level at PN5 and, from PN11 onwards started to increase progressively until PN45. From PN1 to PN5, it is possible that these higher values might be related with GFAP-ir in radial glia cells. In a parallel

experiment, Catalani et al. (2002) reported that GFAP-ir astrocytes in the hippocampal subfields had a maturation pattern consisting in an increase in overall cell size and expanded arborization from PN11 to PN30. The greatest increase in the number of GFAP positive cells was observed before weaning and between PN11 and PN16. The adult astrocytes number was reached at PN30 (Catalani et al., 2002). The developmental pattern observed in our data demonstrated that, although glial cells numbers were not presently analysed in the MeA subnuclei of both sexes, GFAP-ir in expanded astrocytic arborization occurred mostly from PN11 to PN31, as also occurred in the hippocampus (Catalani et al., 2002).

Our results showed that the astroglial process pattern revealed by VIM-ir and GFAP-ir during development was, although with different manner, closely related to the vascular bed and vessel distribution in all the subregions studied. Thus, it is important to take into account that in the different studied stages of the MeA postnatal development the vascular domain of the astrocytes could be identified. At all ages studied, VIM-ir labeled processes accompanied the length of the vessel. From PN1, both radial glial cells and astrocytes, which were mostly GFAP-ir, displayed end-feet that were in an intimate contact with vessels within the different MeA subnuclei. In the cerebral cortex also GFAP-ir cells appeared to encapsulate blood vessels, as a thin rim around blood vessels and with few perivascular glial cell bodies (Suzuki et al., 2003). This observation was also made in immature and mature astrocytes studied in the rat superficial cortex (Pixley and De Vellis, 1984). Along the PN period evaluated here, the blood brain barrier elements are acquiring maturation (Bauer and Bauer, 2000). It was also proposed that astrocytes contact each other during development and establish individual domains (Bushong et al., 2002), probably coupling blood flow to neural activity (Rossi, 2006).

Sexual dimorphism

The semi-quantitative analysis of VIM-ir showed that there were sex differences in the MeA, males had higher VIM-ir than females at PN1 in the MeAD and in the MePV, but not in MePD, and also at PN21 in all three studied MeA subnuclei. At PN5, males displayed less VIM-ir than females in the MePD, but this dimorphism did not persist onwards. On the other hand, GFAP-ir data from the MeA revealed also higher results in males than in females at PN1, although the opposite relation occurred at PN45 (females higher). While a testicular secretory function, contrasting with an immature ovarian, could explain the sexual dimorphism at PN1 (Rhoda et al., 1983), at PN45 the similar pattern of adult rats were observed, since females displayed a higher GFAP-ir in the MeA posterior subnuclei than males (Rasia-Filho et al., 2002) and ovarian steroids, particularly elevations of estradiol and progesterone during the proestrus phase, promote higher GFAP expression.

Indeed, the perinatal developmental period is characterized by dramatic sex differences in circulating gonadal steroids (Garcia-Segura et al., 1994). Testosterone reaches significantly higher levels in the CNS of newborn male rats compared to the corresponding values in newborn females (Rhoda et al., 1983). There are two peaks of testosterone in males: one at embryonic day 18 and another in the day of birth, while the ovary is quiescent and exposure to gonadal remains uniform and low in females until the puberty (Rhoda et al., 1983; Weisz and Ward, 1980). There are some other reports regarding this sort of sexual dimorphism. For example, astrocytes in the neonatal arcuate nucleus of the rat hypothalamus exhibit a sexually dimorphic morphology at PN1, with males having complex stellate cells compared to simple bipolar ones found in females (Mong and McCarthy, 1999a; Mong and McCarthy, 2002). These astrocytes are sexually

dimorphic by the day of birth, continue throughout postnatal development and persist into adulthood (Mong and McCarthy, 2002). As early as the day of birth, astrocytes of the male preoptic area exhibit significantly higher values for primary process length and number of primary processes and these differences remain at PN3 (Amateau and McCarty, 2002).

Our data showed that in the three MeA subnuclei, from PN11 to PN21, females had a more rapidly decrease in VIM-ir than males in MePD, but not in the MeAD and in the MePV. In rats, the MeA neurogenesis initiates in the anterior and ventral regions, which probably could be related with the arriving connexions of the olfactory system (Bayer, 1980). The MeA area increases around PN1 and PN5 and, at PN21, males showing greater MeA volume and neuronal densities than females (Mizukami et al., 1983). Treatment with estrogen for the first PN20 or PN30 enhanced synaptogenesis in the MeA of females, increased the nuclear size and the volume to a comparable one of males, all of which induce a permanent and specific modification in the functional capacity of this brain area (Nishizuka and Arai, 1981). These differences might be related with the neuropil composition and the present data could help to understand this issue.

In females, it is possible that further central activation of the pubertal process involves the participation of both neuronal and astroglial networks and the contribution of upstream transcriptional regulators acting on their neuronal and glial components. Growth factors of glial origin are also important in the control of mammalian puberty via a cell-cell interaction that affects neurons to release GnRH (Ma and Ojeda, 1997). In the rat hypothalamus, astrocytes secrete several growth factors that can stimulate the release of GnRH, which is essential for the sexual development and adult reproductive functions (Ojeda and Ma, 1999; Ojeda et al., 2000). MeA subnuclei astrocytes could be

involved with this neuroendocrine maturation process, based on their morphology and concomitant pattern of development.

In this sense, there are some functional implications for the present data. For example, the MePD neurons project to several hypothalamic nuclei, such the central and medial preoptic nucleus, the anteroventral periventricular nucleus (AVPV), the ventromedial nucleus (VMN) and the ventral pre-mammillary nucleus (Canteras et al., 1995; De Vries and Simerly, 2002; Petrovich et al., 2001). The MePD is an important region related to sensory information processing that mediates female sexual behavior (De Vries and Simerly, 2002; Petrovich et al., 2001; Sheehan et al., 2001; Rasia-Filho et al., 2004) and appear to influence neuroendocrine secretion (Canteras; Simerly; Swanson, 1995). The MePD also shows the highest densities of ER- α and ER- β (Li et al., 1997; Österlund et al., 1998; Shughrue et al., 1997) and may be more sensitive to the actions of this sex steroid during the development. Although at PN5 female rats are obviously immature to reproduction, it is possible that at early stages of development starts the glial arrangement in the MePD that will remain in the adult life and that will serve as the “substrate” for the local and integrated functions that this subnucleus displays. The same could be done for the MePV and the MeAD, as described elsewhere (Rasia-Filho et al., 2004).

Although the mechanisms establishing region-specific dimorphic differences in cellular morphology remain unknown (Amateau and McCarthy, 2002), the modulation of astrocytic shape by gonadal hormones may be related to the effects of these hormones in the determination of the pattern of synaptic contacts during sexual differentiation and in the adult brain. Glial cell processes typically connect neuronal processes throughout the neuropil, where they influence activity at individual synapses (Bacci et al., 1999). This relationship between neuron-glia and the concept of tripartite

synapses (Araque et al., 2001) are integrated parts of the synaptic plasticity, sex hormones influence, and sexual dimorphism upon male and female behaviors and neuroendocrine adjustments. The relevance and implications of the present data are foreseen in the next experimental data that will have to take into account that glial cells are dynamic and plastic components of the MeA subnuclei studied here.

Acknowledgements- The authors thank to Giordano Viola MSc and Antônio Severino for their assistance with the immunohistochemical procedure. This work was supported by Brazilian funding agencies CNPq and FINEP. M.A. and A.A.R.F. are CNPq investigators.

References

1. Alheid, G.F.; Olmos, J.S.; Beltramino, C.A., 1995. Amygdala and extended amygdala; In: Paxinos, G. (Ed.), *The rat nervous system*, 2nd. ed., Academic Press, San Diego, pp. 495-578.
4. Amateau, S.K.; McCarthy, M.M., 2002. Sexual differentiation of astrocyte morphology in the developing rat preoptic area, *J. Neuroendocrin.*, 14: 904-910.
5. Araque, A.; Carmignoto, G.; Haydon, P.G., 2001. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annual Review Physiology*, 63: 795-813.
6. Arochena, M.; Anadón, R.; Díaz-Regueira, S. M., 2004. Development of vimentin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivities in the brain of gray mullet (*chelon labrosus*), an advanced teleost. *J. Comp. Neurol.*, 469: 413-436.

7. Bacci, A., Verdeiro, C., Pravettoni, E., Matteoli, M., 1999. The role of glial cells in synaptic function. *Phil. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.*, 354: 403-409.
8. Bauer, H. C.; Bauer, H., 2000. Neural induction of the blood-brain barrier: still na enigma. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 20: 13-28.
9. Bayer, S. A., 1980. Quantitative ³H-thymidine radiographic analysis of neurogenesis in the rat amygdala. *J. Comp. Neurol.*, 194: 845-875.
10. Bolhuis, J.J.; Fitzgerald, R.E.; Dijk, D.J.; Koolhaas, J.M., 1984. The corticomedial amygdala and learning in an agonistic situation in the rat. *Physiol. Behav.* 32: 575-579.
11. Bushong, EA.; Martone, ME.; Jones, YZ., and Ellisman, MH., 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains, *J. Neurosci* 22: 183-192.
12. Campbell, K.; Götz, M., 2002. Radial glia: multi-propose cells for vertebrate brain development, *TRENDS in Neurosci.*, 25 (5): 235-238.
13. Canteras, N.S.; Simerly, R.B.; Swanson, L., 1995. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 360: 213-245.
14. Catalani, A., Sabbatini, M.; Consoli, C.; Cinque, C.; Tomassoni, D.; Azmitia, E., Angelucci, L.; Amenta, F., 2002. Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus, *Mechan. Ageing and Develop.*, 123: 481-490.
15. Cochard, P.; Paulin, D., 1984. Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo *in vivo* *J. Neurosci.* 4: 2080-2094.

16. Cooke, B.M.; Wooley, C.S., 2005. Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala, *The J. of Neurosci.*, 25(46): 10759-10767.
17. De Olmos, J.S.; Beltramino, C.A.; Alheid, G., 2004. Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey, In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*, 3rd ed. Elsevier Academic Press, San Diego, 509-603
18. DeVries, G.J.; Simerly, R.B., 2002. Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain, in: *Hormones, Brain and Behavior*, vol 4, Elsevier Science, New York.
19. Eliasson, C.; Sahlgren, C.; Berthold, C. H.; Stakeberg, J.; Celis, J. E.; Betsholtz, C.; Eriksson, J. E.; Pekny, M., 1999. Intermediate filament protein partnership in astrocytes, *J. Biol. Chem.*, 274: 23996-24006.
20. Eng, L. F.; Ghirnikar, R. S.; Lee, Y. L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000), *Neurochem. Res.*, 25: 1439-1451.
21. Garcia-Segura, L.M.; Torres-Aleman, I.; Naftolin, F., 1989. Astrocytic shape and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity are modified by estradiol in primary rat hypothalamic cultures. *Dev. Brain Res.*, 47: 298-302.
22. Garcia-Segura, L.M.; Lunquin, S; Párducz, A; And Naftolin, F., 1994. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus, *Glia*, 10:56-59.
23. Garcia-Segura, L.M.; Chowen, J.A.; Duenãs, M.; Párducz, A.; Naftolin, F., 1996. Gonadal steroids and astroglial plasticity, *Cell Mol. Neurobiol.*, 16:225-237.
24. Garcia-Segura, L.M.; Cardona-Gomez, G.P.; Trejo, J.L.; Fernandez-Galaz, G.P.; Chowen, J.A., 1999. Glial cells are involved in organizational and activacional

- effects of Sex hormones in the brain; cap 6 of Matsumoto, A., *Sexual Differentiation of the brain*. CRC Press, BR, Florida.
25. Garcia-Segura, L.M.; Melcangi, R., 2006. Steroids and glial cell function, *Glia*, 54: 485-498.
 26. Gomes, F.C.A.; Paulin, D.; Moura Neto, V., 1999. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation, *Braz. Med. Biol. Res* 32: 619-631.
 27. Guillamón A; Segovia, S., 1997. Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res Bull* 44: 377-382.
 28. Hermel, E.E.S.; Faccioni-Heuser, M.C.; Marcuzzo, S.; Rasia-Filho, A.A.; Achaval, M. , 2006. Ultrastructural features of neurons and synaptic contacts in the posterodorsal medial amygdala of adult male rats. *Journal of Anatomy*, v. 208, p. 565-575.
 29. Hines, M.; Allen, L.S.; Gorski, A., 1992. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res.*, 579:321-326.
 30. Kettenmann, H.; Ransom, B.R., 2005. *Neuroglia*. Oxford Univ. Press, New York.
 31. Lãm, T.T.; Leranth, C., 2003. Gonadal hormones act extrinsic to the hippocampus to influence the density of hippocampal astroglial processes, *Neurosci.*, 116: 491-498.
 32. Laping, N.J.; Teter, B.; Nichols, N.R.; Rozowsky, I.; Finch, C.E., 1994. Glial fibrillary acidic protein: regulation by hormones, cytokines and growth factors, *Brain Pathol.*, 1:259-275.

33. Lehman, M.N.; Winous, S.S.; Powers, J.B., 1980. Medial nucleus of the amygdala mediates chemosensory control of male hamster sexual behavior. *Science* 210:557-559.
34. Lemke, G., 2001, Glial control of neuronal development, *Annu. Rev. Neurosci.*, 24:87-105.
35. Li, X.; Schwartz, P. E.; Rissman, E. F., 1997. Distribution of estrogen receptor- β -like immunoreactivity in rat forebrain. *Neuroendocrinology*, 66: 63-67.
36. Ma, Y.J.; Ojeda, S.R., 1997, Neuroendocrine control of female puberty: glial and neuronal interactions, *J Invest Dermatol Symp Proc.*, 2(1): 19-22.
37. Martinez, F.G.; Hermel, E.E.S.; Xavier, L.L.; Viola, G.G.; Riboldi, J.; Rasia-Filho, A.A.; Achaval, M., 2006. Gonadal hormone relation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats, *Brain Res.*, 1108:117-126.
38. Mascó, D.H.; Carrer, H., 1980. Sexual receptivity in female rats after lesions or stimulation in different amygdaloid nuclei. *Physiol. Behav.*, 24: 1073-1080.
39. Matsumoto, A., 1999. *Sexual Differentiation of the brain*. CRC Press, BR, Florida.
40. McCarthy, M. M.; Schlenker, E. H.; Pfaff, D. W., 1993. Enduring consequences of neonatal treatment with antisense oligodeoxynucleotides to estrogen receptor mRNA on sexual differentiation of rat brain. *Endocrinol.*, 133: 433- 439.
41. McCarthy, M. M.; Auger, A. P.; Perrot-Sinal, T. S., 2002. Getting excited about GABA and sex differences in the brain. *TRENDS in Neurosci.*, 25(6): 307- 312.
42. McEwen, B. S., 2004. *Steroid effects on the brain*, Neurosci. Enciclopedia, NY.
43. Mizukami, S.; Nishizuka, M.; Arai, Y., 1983. Sexual difference in nuclear volume and its ontogeny in the rat amygdala. *Exp. Neurol.* 79: 569-575.

44. Mong, J.A.; McCarthy, M.M., 1999. Steroid-induced developmental plasticity in hypothalamic astrocytes: implication for synaptic patterning, *J. Neuroendocrin.* 40: 602-619.
45. Mong, J.A.; McCarthy, M.M., 2002. Ontogeny of sexually dimorphic astrocytes in the neonatal arcuate, *Development. Brain Res.*, 139: 151-158.
46. Newman, S.W., 1999. The medial and extended amygdala in male reproductive behavior. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 877: 242-257.
47. Nishizuka, M.; Arai, Y., 1981. Organizational action of estrogen on synaptic pattern in the amygdala: implications for differentiation of the brain. *Brain Res.*, 213:422-426.
48. Nishizuka, M.; Arai, Y., 1981. Sexual dimorphism in synaptic organization in the amygdala and its dependence on neonatal hormone environment. *Brain Res.*, 212:31-38.
49. Nishizuka, M.; Arai, Y., 1983. Regional difference in sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *Exp. Brain Res.*, 49:462-465.
50. Ojeda, S. R.; Ma, Y. J., 1999. Glial-neuronal interaction in the neuroendocrine control of mammalian puberty: facilitatory effects of gonadal steroids, *J. Neurobiol.* 40: 528-540.
51. Ojeda, S. R.; Ma, Y. J.; Lee, B. J.; Prevot, V., 2000. Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty, *Re. Prog. Horm. Res.*, 55:197-223.
52. Österlund, M.; Kuiper, G. G.; Gustafsson, J.-A.; Hurd, Y. L. , 1998. Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Molecular Brain Research*, 54: 175-180.

53. Paxinos, G.; Watson, C., 1998. *The Rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th ed., Academic Press, San Diego.
54. Petrovich, G. D.; Canteras, N. S.; Swanson, L. W., 2001. Combinatorial amygdalar inputs to hypothalamic behavior systems. *Brain Research Reviews*, v. 38, p. 247-289.
55. Pitkänen, A.; Savander, V.; LeDoux, J. E., 1997. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: An emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neurosciences* 20: 517-523.
56. Pixley, S.K.R.; De Vellis, J., 1984. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin, *Develop. Brain Res.*, 15: 201-209.
57. Rao, M.S.; Jacobus, M.J., Eds., 2004. *Developmental Neurobiology*, 4th ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
58. Rasia-Filho, A.A.; Londero, R.G.; Achaval, M. , 1999. Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. *Brain res. Bull.*, 2:173-183.
59. Rasia-Filho, A.A.; Londero, R.G.; Achaval, M., 2000. Functional activities of the amygdala: na overview. *J. Psychiatry Neurosci.*, 25 (1): 14-23.
60. Rasia-Filho, A.A.; Xavier, L.L.; Santos, P.; Gehler, G.; Rodnight, R.; Achaval, M., 2002. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats, *Brain Res. Bull.* 58: 67-75.
61. Rasia-Filho, A. A.; Fabian, C.; Rigoti, X. M.; Achaval, M. , 2004. Influence of sex estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience*, 126: 839-847.

62. Rhoda, J., Corbier, P., and Roffi, J., 1983. Hypothalamic testosterone increase in the male rat at birth, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1:187-190.
63. Rocha, M.I.U.M., 2006. *Amígdala medialpósterio-ventral: caracterização ultraestrutural e volume somático neuronal em ratos machos e fêmeas no ciclo estral*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Neurociências), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
64. Rossi, D., 2006. Another bold role for astrocytes: coupling blood flow to neural activity. *Nature Neuroscience*, v. 9, p. 159-160.
65. Sancho-Tello M.; Valles, S.; Montoliu, C.; Renal-Piqueras; J., Guerra, C., 1995. Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures, *Glia*, 15(2): 157-66.
66. Schnitzer, J.; Franke, W. W.; Schachner, M., 1981. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J. Cell. Biol.*, 90: 435-447.
67. Sheehan, T.; Paul, M.; Amaral, E.; Numan, M.J.; Numan, M., 2001. Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. *Neuroscience*, 106: 341-356.
68. Shughrue, P.J.; Lane, M.; Merchenthaler, I., 1997. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 388, p. 507-525.
69. Simerly, R.B.; Chang, C.; Muramatsu, M; Swanson, L.W., 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An *in situ* hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 294:76-95.
70. Sternberger, L.A., 1979. *Immunohistochemistry*. Wiley, Chichester.

71. Suzuki, M., Obara, K., Sasaki, Y., Matoh, K., Kitabatake, A., Sasaki, K., Nunosawa, F., 2003. Comparison of perivascular astrocytic structure between white matter and gray matter of rats, *Brain Res.*, 992(2): 294-297.
72. Swann, J.; Fiber, J., 1997. Sex differences in function of a pheromonally stimulated pathway: role of steroids and the main olfactory system. *Brain Res. Bull.*, 44: 409-413.
73. Xavier, L.L.; Viola, G.G.; Ferraz, A.C.; Da Cunha, C.; Deonizio, J.M.D.; Netto, C.A.; Achaval, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegumental area, *Brain Res. Protocol*, 16:58-64.
74. Weissman, T.A., Riquelme, P.A., IVIC, L., Flint, A.C.; Kriegstein, A.R., 2004. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*, 43: 599-601
75. Weisz, J.; Ward, I.L., 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses and neonatal offspring, *Endocrinology* 106, 306-313.

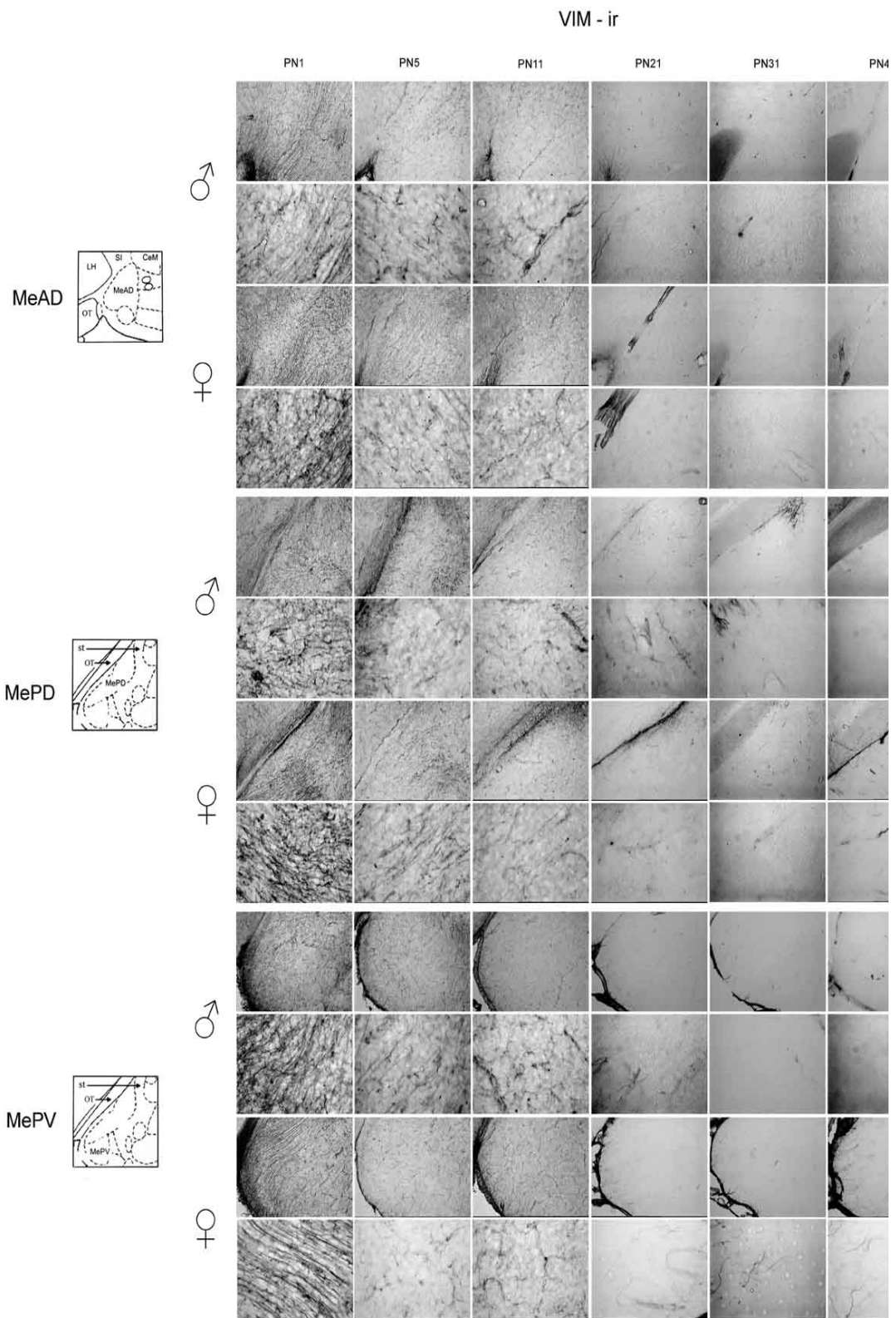
Legends

Figure 1- Representative photomicrografies of vimentin immunoreactivity (VIM-ir) in anterodorsal medial amygdala (MeAD), posterodorsal medial amygdal (MePD), and posteroventral medial amygdala (MePV) of male and female rats along the different postnatal (PN) developmental days (1, 5, 11, 21, 31 and 45). Top: MeAD. Middle: MePD. Botton: MePV. Note the higher VIM-ir expression at PN1 and at PN5 (radial glia) and a less intense VIM-ir at PN21, at PN31 and at PN45 in both sexes. Schematic representations of the studied areas are presented on the right, based on schematic coronal diagrams from Paxinos and Watson (1998). OT: optic tract; st: stria terminal. For each region studied and in each sex, the first lines are topographic pictures (scale bars=200 μ m) and the second lines are higher magnification images (scale bars=50 μ m).

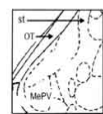
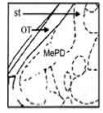
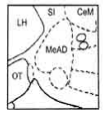
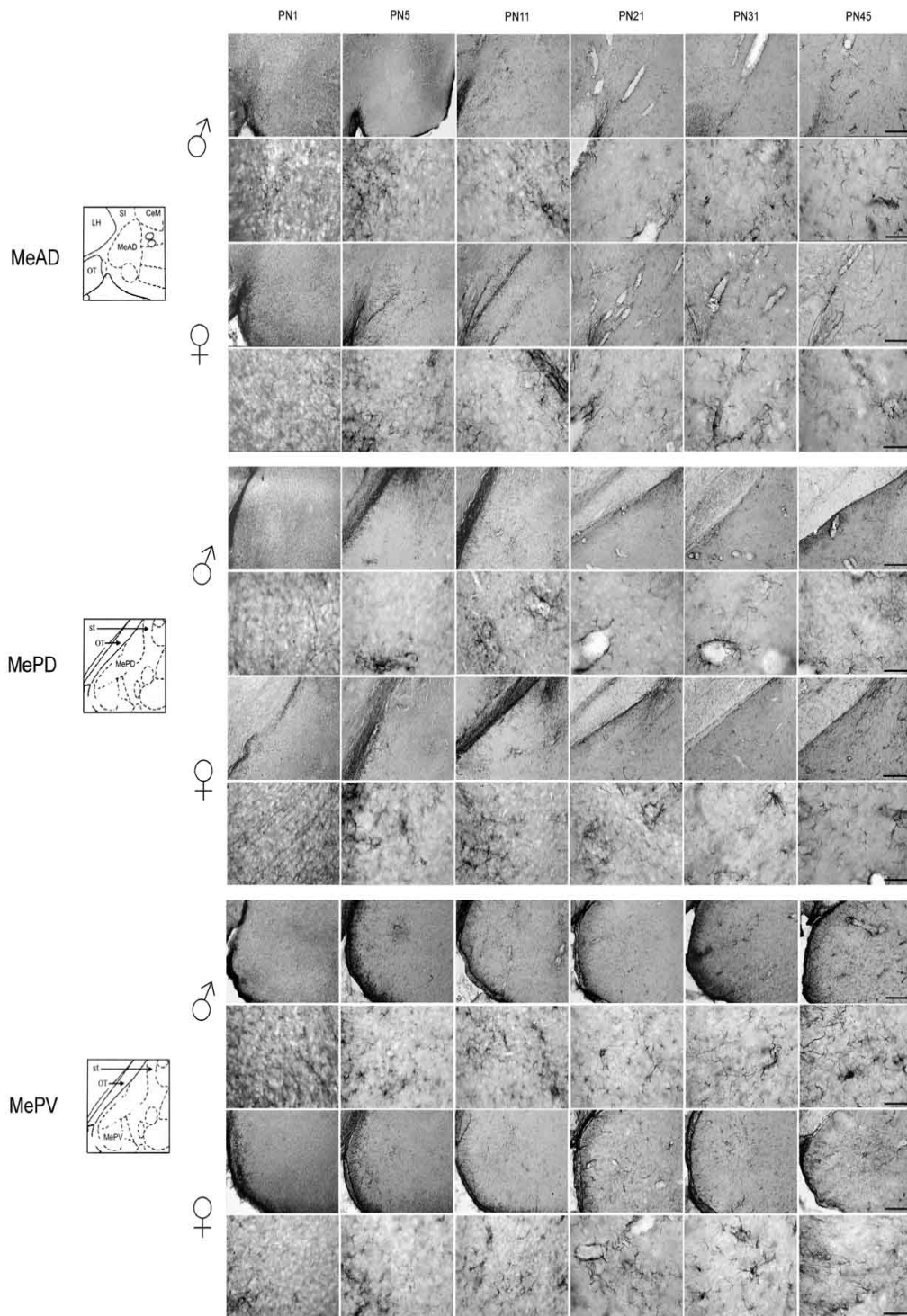
Figure 2- Representative photomicrografies of GFAP immunoreactivity (GFAP-ir) in anterodorsal medial amygdala (MeAD), posterodorsal medial amygdal (MePD), and posteroventral medial amygdala (MePV) of male and female rats along the different postnatal ages (PN): 1 (PN1), 5 (PN5), 11 (PN11), 21 (PN21), 31 (PN31) and 45 (PN45). Top: MeAD. Middle: MePD. Botton: MePV. Note the higher GFAP-ir expression at PN1 (radial glia), less intense GFAP-ir at PN5, at PN11 and its increase at PN45 owards in both sexes. Schematic representations of the studied areas are presented on the right, based on schematic coronal diagrams from Paxinos and Watson (1998). OT: optic tract; st: stria terminal. For each region studied and in each sex, the first lines are topographic pictures (scale bars=200 μ m) and the second lines are higher magnification images (scale bars=50 μ m).

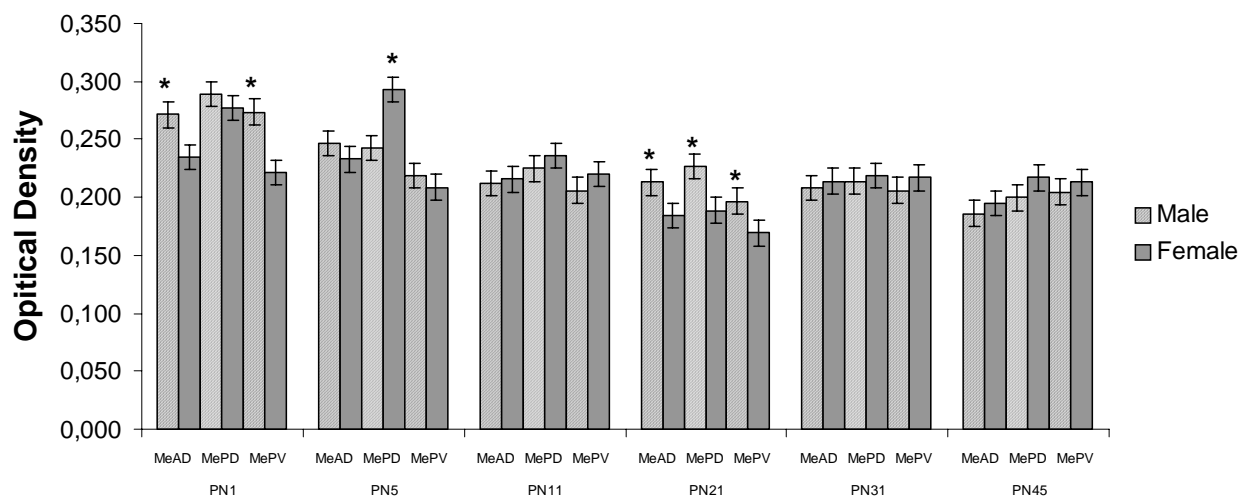
Figure 3- Relative optical density measurements (mean \pm SEM) of VIM-ir in the anterodorsal (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) medial amygdala of males and females rats in the different postnatal ages (PN) 1 (PN1), 5 (PN5), 11 (PN11), 21 (PN21), 31 (PN31) and 45 (PN45). * Significantly different when compared with the same region of the females (PN1 and PN21) or males (PN5) ($p < 0.001$).

Figure 4- A: Relative optical density measurements (mean \pm SEM) of GFAP-ir (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) medial amygdala of males and females rats in the different postnatal ages (PN) 1 (PN1), 5 (PN5), 11 (PN11), 21 (PN21), 31 (PN31) and 45 (PN45). * Significantly different when compared with the MeAD at PN1, and when compared with MeAD at PN5 ($p < 0.001$). ** Significantly different when compared with MeAD and MePV at PN45 ($p < 0.001$). **B:** Relative optical density measurements (mean \pm SEM) of GFAP-ir in the anterodorsal (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) medial amygdala of males and females rats in the different postnatal ages (PN) 1 (PN1), 5 (PN5), 11 (PN11), 21 (PN21), 31 (PN31) and 45 (PN45). * Significantly different when compared with females in the MePV ($p < 0.001$). **C:** Relative optical density measurements (mean \pm SEM) of GFAP-ir in the anterodorsal (MeAD), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) medial amygdala in the different postnatal ages (PN) 1 (PN1), 5 (PN5), 11 (PN11), 21 (PN21), 31 (PN31) and 45 (PN45). * Significantly different when compared with females at PN1 ($p < 0.001$) and when compared with males at PN45 ($p < 0.001$).



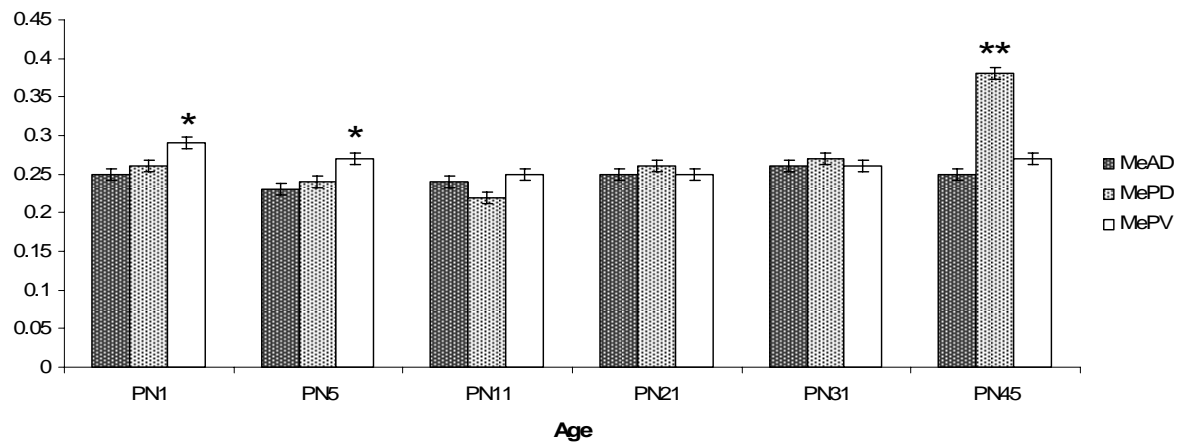
GFAP - ir



VIM-ir

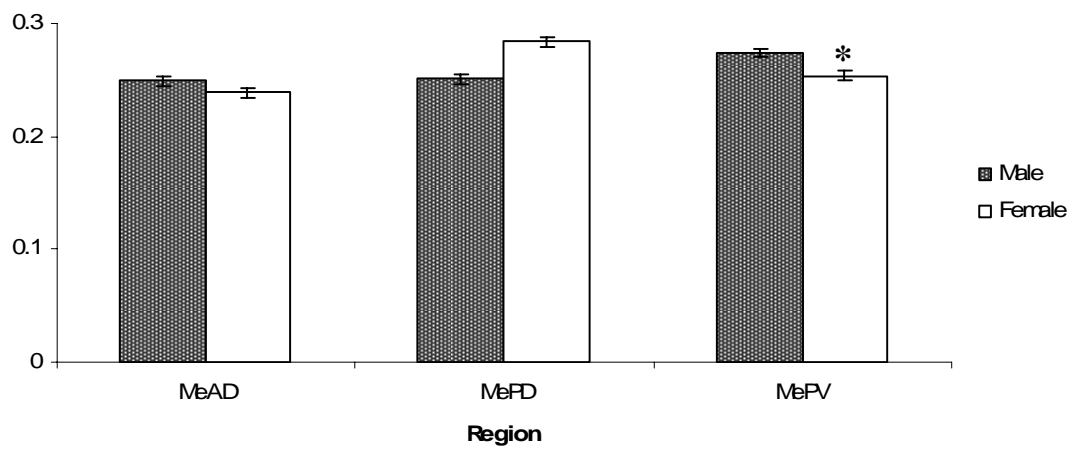
GFAP - ir

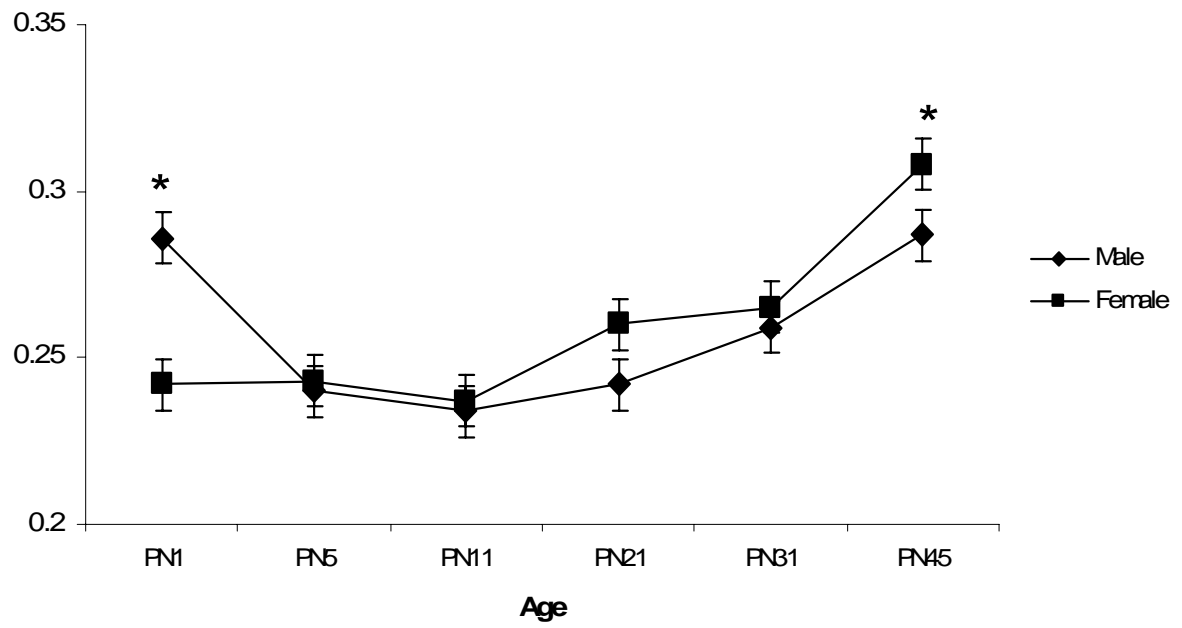
A

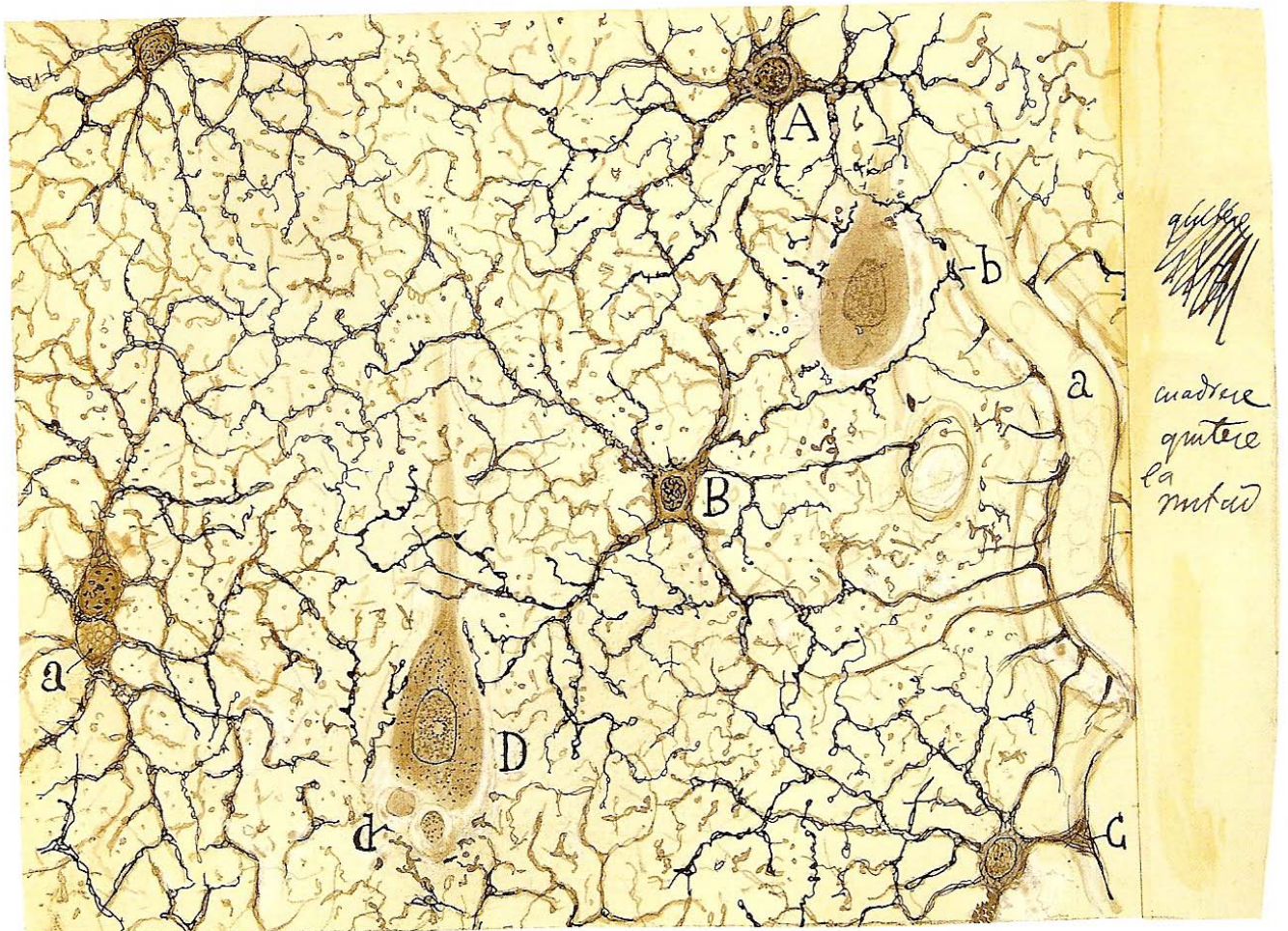


GFAP - ir

B



GFAP - ir**C**



5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A presente tese foi dividida em duas seções, as quais poderíamos definir como, primeira, estudo imunistoquímico da GFAP nos subnúcleos da MeA (MeAD, MePD e MePV) em ratas adultas e, segunda, estudo da VIM-ir e GFAP-ir nas mesmas subregiões da MeA de ratos machos e fêmeas ao longo do desenvolvimento pós-natal. Ambos os estudos obtiveram resultados que levaram à confirmação da hipótese formulada e apresentada no final da Introdução.

No estudo realizado utilizando fêmeas adultas intactas ao longo do ciclo estral, os resultados obtidos com nas fases de diestro, proestro, estro e metaestro confirmaram o efeito trófico significativo dos hormônios ovarianos sobre a GFAP-ir nos subnúcleos da MeA, sobretudo no MePD e no MePV. O remodelamento sináptico coordenado pela modulação da expressão de GFAP deve ser considerado (GARCIA-SEGURA et al., 1994; KOHAMA et al., 1995; LUQUIN et al., 1993; PÉREZ et al., 1993), enquanto achados compatíveis com os nossos resultados ocorreram em outras regiões do SNC (CONEJO et al.; GARCIA-SEGURA; McCARTHY, 2004).

Além disso, o MePD apresenta maior GFAP-ir do que o MePV ou o MeAD, indicando a plasticidade nesses subnúcleos e que provavelmente está relacionada com a sinaptogênese local e, conseqüentemente, com as funções por eles desempenhadas, como o comportamento reprodutivo e social de roedores (DE VRIES; SIMERLY, 2002; RASIA-FILHO et al., 2000). Os presentes resultados vão ao encontro com outros estudos sobre o dimorfismo sexual na MeA, onde fêmeas em diestro apresentaram maior expressão de GFAP no MePD e no MePV do que machos (RASIA-FILHO et al., 2002). O MePD pode influenciar a regulação neuroendócrina hipotalâmica (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; SIMERLY, 2004), o comportamento maternal (LONSTEIN et al., 2000; SHEEHAN et al., 2000; 2001) e o sexual de fêmeas (MASCÓ; CARRER, 1980). Os subnúcleos MeAD e MePD estão envolvidos no processamento de informações olfativas, tanto com aferências oriundas do órgão vomeronasal e do bulbo olfativo, quanto com eferências para áreas motoras e neuroendócrinas do SNC (LEHMAN; WINANS, 1982; CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; KONDO; ARAI, 1995; WOOD, 1997; DOMÍNGUEZ; HULL, 2001; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001). O contato sexual de fêmeas em proestro provoca aumento das células imunorreativas à c-fos no MePD (ROWE; ERSKINE, 1993), enquanto lesões ou estimulação deste subnúcleo reduzem ou

umentam, respectivamente, a ocorrência de comportamento sexual em ratas (MASCÓ; CARRER, 1980; LEHMAN; WINANS, 1982). De fato, os subnúcleos MeAD, MeAV e MePV estão muito relacionados com a modulação hipotalâmica dos comportamentos reprodutivo e defensivo (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; SIMERLY, 2004).

Os ajustes morfológicos e neuroquímicos ocorridos tanto em neurônios quanto nas células da glia também estão sob a influência de receptores para hormônios e fatores a eles associados (DE VRIES; SIMERLY, 2002; GRECÓ et al., 2001). Esta variável deve ser considerada também porque a distribuição de receptores para hormônios sexuais na MeA não é homogênea (SHERIDAN, 1979). Receptores neuronais dos tipos α e β para estrógenos são encontrados com maior frequência no MePD (SIMERLY et al., 1990; LI; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997; ÖSTERLUND et al., 1998), embora também estejam presentes no MeAD e no MePV (LI; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997; SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997; ÖSTERLUND et al., 1998).

Nosso estudo demonstrou que níveis supra-fisiológicos de estradiol e progesterona, combinados ou não, também exerceram efeito trófico significativo sobre marcadores do citoesqueleto astrocitário, em todos os subnúcleos estudados. A combinação de benzoato de estradiol adicionado à progesterona provocou aumento da GFAP-ir nos subnúcleos da MeA, mas não de forma homogênea. Esses achados indicam que a plasticidade glial apresenta respostas específicas nas subregiões da MeA, uma vez que MePD e MePV apresentaram maior expressão de GFAP quando as fêmeas estiveram sob a influência dos hormônios ovarianos. Em contrapartida, houve menor GFAP-ir no MeAD quando comparado aos outros subnúcleos da MeA aqui investigados, indicando a importância de considerar cada um dos subnúcleos da MeA como uma unidade morfofuncional.

A plasticidade neuro-glial mediada pela ação de hormônios e suas repercussões funcionais, bem como o próprio ajuste neuroendócrino, são a base neural para comportamentos demonstrados por machos e fêmeas de uma mesma espécie (KELLY, 1991; RASIA-FILHO et al., 1991; 2002). Hormônios são componentes críticos da interação neurônio-glia, provocando ações neuromodulatórias e neurotróficas em situações fisiológicas ou patológicas (GARCIA-SEGURA; McCARTHY, 2004). No

presente estudo, os esteróides sexuais foram capazes de exercer uma ação marcada nos subnúcleos da MeA.

O segundo foco desta tese, o estudo do dimorfismo sexual ao longo do desenvolvimento pós-natal também apresentou resultados interessantes. Primeiro, enquanto machos apresentaram maior VIM-ir do que fêmeas no PN1, este resultado se inverteu na última idade estudada, PN45. Esses achados remetem a considerar a diferença temporal de maturação da função das gônadas, uma vez que os testículos dos machos já produzem testosterona em PN1, enquanto os ovários das fêmeas ainda são quiescentes (RHODA; CORBIER; ROFFI, 1983). Entretanto, nossos dados foram de encontro, pelo menos neste aspecto, com a afirmação que as mudanças plásticas ocorridas em fases precoces do desenvolvimento perduram na vida adulta (MONG et al., 1999). Além disso, durante o desenvolvimento, PN5 demonstrou ser uma idade chave para o que ocorre em fêmeas, uma vez que a expressão de VIM foi maior no MePD, mas não nos outros núcleos. Esse achado pode estar relacionado com mudanças plásticas neurais específicas das fêmeas neste subnúcleo, as quais, conforme anteriormente mencionado, afetam comportamentos especificamente femininos. PN21 também foi uma fase significativa para a VIM-ir, uma vez que machos apresentaram um menor decréscimo de VIM, um marcador específico de astrócitos imaturos (KETENMAN; RANSOM, 2005). Nessa mesma fase, Mizukami, Nishizuka e Arai (1983) encontraram um aumento significativo do volume da MeA, maior em machos do que em fêmeas.

O marcador astrocitário GFAP também apresentou características sexualmente dimórficas durante o desenvolvimento. Analisando-se todas as idades em conjunto, machos apresentaram maior GFAP-ir no MePV do que fêmeas. Além da consideração de particularidades funcionais deste subnúcleo, somam-se informações interessantes,

como os achados de maior volume somático neuronal de machos do que de fêmeas no MePV encontrados por Rocha (2006), o que também ocorreu no MePD (HERMEL et al., 2006). Embora as funções da GFAP também não estejam completamente compreendidas, o formato astrocitário e sua motilidade são influenciados por mudanças na expressão e fosforilação de GFAP (LAPING et al, 1994), a qual é envolvida na manutenção a longo prazo da arquitetura encefálica, função de barreira hematoencefálica e modulação de funções neuronais pelos astrócitos (LIEDTKE, et al., 1996).

Os esteróides gonadais provocam efeitos gênicos e não-gênicos no SNC (McEWEN; COIRINI; SCHUMACHER, 1990; McEWEN et al., 1991; TORAN-ALERAND, 1995; GARCIA-SEGURA et al., 1999; FERNANDEZ-GALAZ et al., 1997), mas achados recentes surpreendem ao indicar que o estrogênio sintetizado e secretado pelos astrócitos podem regular a formação e a transmissão sináptica (HU et al., 2007). O quanto isso ocorre nos subnúcleos da MeA ainda precisa ser determinado.

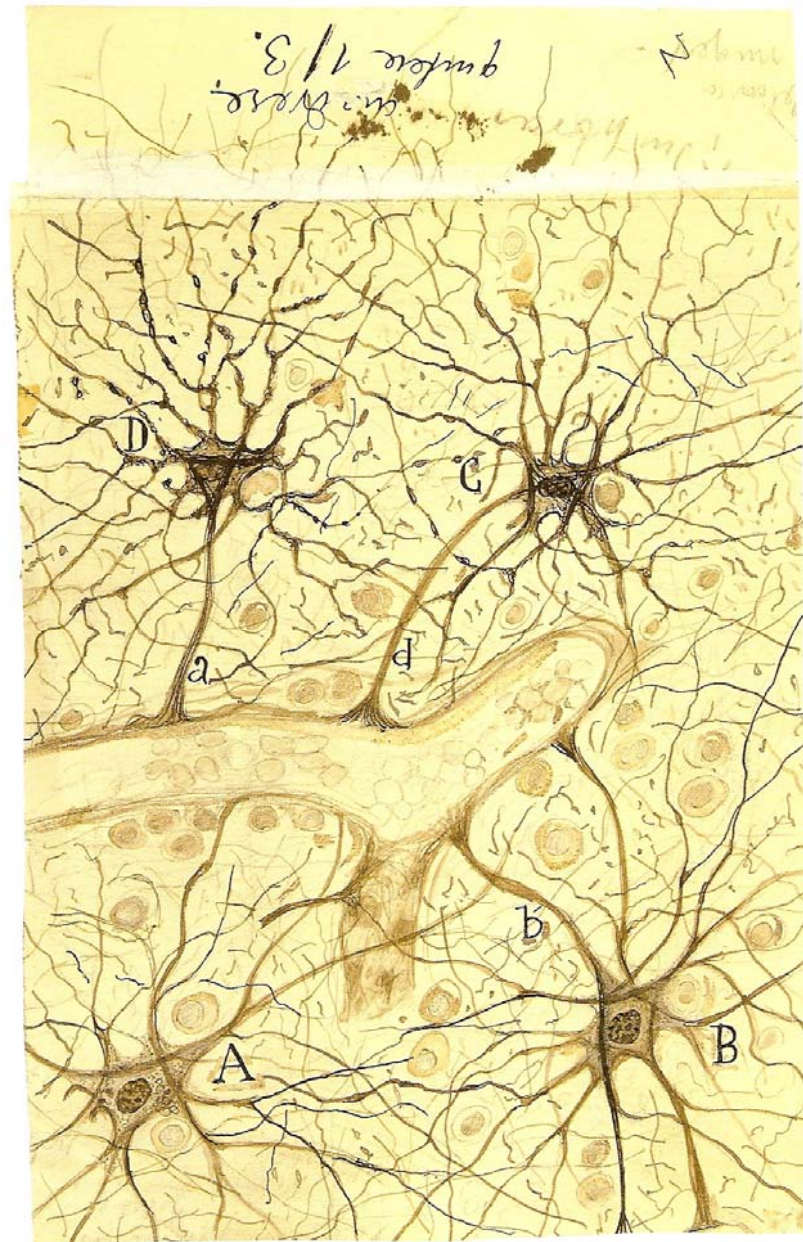
Os astrócitos, são também elementos sinalizadores dinâmicos que integram estímulos neuronais, exibem excitabilidade, conhecidas como ondas de Ca^{+} , e podem modular a ação de neurônios vizinhos (ARAQUE; CARMIGNOTO; HAYDON, 2001). Embora sejam evidentes os avanços no campo do entendimento da interação neurônio-glia, muitas questões se mantêm desconhecidas, o que desafia muitos estudos acerca do dimorfismo sexual, conectividade da MeA e as estruturas do SNC a ela associadas.

Enfim, diante dos objetivos traçados para a realização de cada um dos três experimentos e dos resultados obtidos, o presente trabalho permite concluir:

- 1) Os hormônios ovarianos tanto em níveis fisiológicos quanto em terapia substitutiva pós-ovariectomia, exercem ação trófica sobre os astrócitos, provocando aumento da expressão de GFAP, sobretudo no MePD e MePV de ratas. Experimentos utilizando

fêmeas e que envolvam imunistoquímica para GFAP devem considerar as diferentes fases do ciclo estral das fêmeas.

- 2) Níveis suprafisiológicos de benzoato de estradiol adicionado à progesterona injetados em ratas ovariectomizadas provocam maior aumento da expressão de GFAP do que benzoato de estradiol sozinho, mas ambos provocam efeitos tróficos nos astrócitos GFAP-ir, nos subnúcleos MePD, MePV, mas não no MeAD, quando comparados com tratamento com veículo.
- 3) Há dimorfismo sexual na expressão de VIM e GFAP durante o desenvolvimento pós-natal de ratos nos subnúcleos da MeA.
- 4) Machos apresentam maior expressão de VIM no PN1 no MeAD e MePV, mas não no MePD. Fêmeas apresentam maior expressão de VIM do que machos no MePD aos 5 dias pós-natais.
- 5) O MePV apresenta maior GFAP-ir em ambos os sexos nos estágios iniciais do desenvolvimento, enquanto o MePD apresenta maior GFAP-ir em ratos em idade adulta.
- 6) De acordo com cada subnúcleo da MeA, machos apresentam maior GFAP-ir do que fêmeas no primeiro dia pós-natal. Fêmeas apresentam maior GFAP-ir quando adultas.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHEID, G. F.; de OLMOS, J. S.; BELTRAMINO, C. A. Amygdala and extended amygdala. In: PAXINOS, G. *The Rat Nervous System*. San Diego: Academic Press, p. 495-578, 1995.

ARAQUE, A.; PARPURA, V.; SANZGIRI, R. P.; HAYDON, P. G. Tripartite synapses: glia the unacknowledged partner. *TINS*, v. 22, p. 208-214, 1999.

ARAQUE, A.; CARMIGNOTO, G.; HAYDON, P.G. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annual Review Physiology*, v. 63, p. 795-813, 2001.

BALTHAZART, J., BALL, G. F., Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *TRENDS in Neurosciences*, v. 29, 5: 241-249, 2006.

BECKER, J.B.; BREEDLOVE, S.M.; CREWS, D.; McCARTHY, M.M. Behavioral *Endocrinology*, 2nd ed. Cambridge, MA: The MIT Press, p. 776, 2002.

BLOCH, C. H.; GORSKI, R. A. Estrogen/Progesterone treatment in adulthood affects the size of several components of the medial preoptic area in the male rat. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 275, p. 613-622, 1988.

BUSHONG, E.A.; MARTONE, M.E.; JONES, Y.Z.; ELLISMAN, M.H. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *Journal of Neuroscience*, v. 22, p. 183-192, 2002.

CALVO, J.L.; CARBONELL, A.L.; BOYA, J. Coexpression of glial acidic fibrillary protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Research*, v. 566, p. 333-336, 1991.

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

CHOLERIS, E.; GUSTAFSSON, J.A. An estrogen-dependent four-gene micronet regulating social recognition: a study with oxytocin and estrogen receptor -alpha and -beta knockout mice, *Proceedings in National Academy of Sciences of the USA*, v.100, p.6192-6197, 2003.

CONEJO, N. M.; GONZÁLEZ-PARDO, H.; PEDRAZA, C.; NAVARRO, F. F.; VALLEJO, G.; ARIAS, J. L. 2003. Evidence for sexual difference in astrocytes of adult rat hippocampus. *Neuroscience Letters* v. 339, 119–122, 2003.

COOKE, B. M.; TABIBNIA, G.; BREEDLOVE, S. M. A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. *Proceedings in National Academy of Sciences of the USA*, v. 96, p. 7538-7540, 1999.

COOLEN, L. M.; PETERS, H. J. P. W.; VEENING, J. G. Distribution of FOS immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain. *Neuroscience*, v. 77, p. 1151-1161, 1997.

COOPER, M. S. Intercellular signaling in neuronal-glia networks. *BioSystems*, v. 34, p. 65-85, 1995.

CORNIL, C.A.; BALL, G.F.; BALTHAZART, J. Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: where do the estrogens come from? *Brain Research*, v. 13:16978590, 2006.

CRAVEN, R. From kiss-and-run to crosstalk, in Research Highlights. *Nature Reviews Neuroscience.*, v. 6, p. 914, 2005.

DAVIS, M. The role of the amygdala in conditioned fear. In AGGLETON, J. P. *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss, pp. 255–306, 1992.

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

DAY, J. R.; LAPING, N. J.; McNEILL, T. H.; SCHREIBER, S. S.; PASINETTI, G.; FINCH, C. E. Castration enhances expression of glial fibrillary acidic protein and sulfated glycoprotein-2 in the intact and lesion-altered hippocampus of the adult male rat. *Molecular Endocrinology*, v. 4, p. 1995-2002, 1990.

DAY, J. R.; LAPING, N. J.; LAMPERT-ETCHELLS, M.; BROWN, S. A.; O'CALLAGHAN, J. P.; McNEILL, T. H.; FINCH, C. E. Gonadal steroids regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the adult male rat hippocampus. *Neuroscience*, v. 55, p. 435-443, 1993.

DE CASTILHOS, J. *Estudo sobre a ação dos hormônios gonadais na densidade de espinhos dendríticos na amígdala medial póstero-dorsal de ratas*. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

DE OLMOS, J.; BELTRAMINO, C. A.; ALHEID, G. F. Amigdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. In: PAXINOS, G. *The Rat Nervous System*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, p.509-603, 2004.

DE VRIES, G. J.; SIMERLY, R. B. Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. In: PFAFF, D. W.; ARNOLD, A. P.; ETGEN, A. M.; FAHRBACH, S. E.; RUBIN, R. T. (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior*, v. 4. Elsevier, New York, pp. 137–191, 2002.

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

DE VRIES, G. J. Studying neurotransmitter systems to understand the development and function of sex differences in the brain: the case of vasopressin. In: MICEVYCH, P. F.; HAMMER JR., R. P. *Neurobiological effects of sex steroid hormones*. New York: Cambridge University Press, p.254-278, 1995.

DIELENBERG, R. A.; HUNT, G. E.; MCGREGOR, I. S. 'When a rat smells a cat': The distribution of FOS immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience*, v. 104, p.1085-1097, 2001.

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

ENG, L. F.; VANDERHAEGHEN, J. J.; BIGNAMI, A.; GERSTL, B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Research*, v. 28, p. 351-354, 2000.

ENG, L.F., LEE, Y.L., Intermediate filaments in astrocytes; cap. 43 de KETTENMANN, H., RANSOM, B.R., *Neuroglia*. Oxford Univ. Press, New York, 1995.

_____. Cytoskeletal proteins in astroglia; cap. 18 de KETTENMANN, H., RANSOM, B.R., *Neuroglia*. Oxford Univ. Press, New York, 2005.

FERNANDEZ-GALAZ, M. C.; PARDUCZ, A.; NAFTOLIN, G; TORRES-ALEMAN, J.; GARCIA-SEGURA, L. M. Interaction of gonadal steroids and growth factors in the brain sex differentiation. *Biomedical Reviews*, v. 7, p. 67-74, 1997.

FITCH, R. H.; DENENBERG, V. H. A role for ovarian hormones in sexual differentiation of the brain. *Behavior and Brain Sciences*, v. 21, p. 311-352, 1998.

FLEMMING, A. S.; VACCARINO, F.; LUEBKE, C. Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat. *Physiology and Behaviour*, v. 25, p. 731-743, 1980.

FRANKFURT, M.; SIEGEL, R. A.; SIM, I.; WUTTKE, W. Cholecystokinin and substance P concentrations in discrete areas of the rat brain: sex differences. *Brain Research*, v. 358, p. 53-58, 1985.

FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. Eds., *The Physiology of Reproduction*. New York; Raven Press, 1994.

FUCHS, E.; WEBER, K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annual Revision in Biochemistry*, v. 63, p. 345-382, 1994.

GARCIA-SEGURA, L. M.; LUNQUIN, S.; PÁRDUEZ, A.; NAFTOLIN, F. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus, *GLIA*, 10:56-59, 1994.

GARCIA-SEGURA, L. M.; McCARTHY, M. M. Minireview: role of glia in neuroendocrine function. *Endocrinology*, v. 145, p. 1082-1086, 2004.

GARCIA-SEGURA, L. M.; CARDONA-GOMEZ, G. P.; TREJO, J. L.; FERNANDEZ-GALAZ, G. P.; CHOWEN, J. A. Glial cells are involved in organizational and activational effects of Sex hormones in the brain; cap 6 de MATSUMOTO, A., *Sexual Differentiation of the brain*. CRC Press, BR, Florida, 1999.

GERALL, A. A.; HENDRICKS, S. E.; JOHNSON, L. L.; BOUNDS, T. W. Effects of early castration in male rats on adult sexual behavior. *Journal of Comparative Physiologic Psychology*, v. 64, p. 206-212, 1967.

GOMES, F. C. A.; PAULIN, D.; MOURA-NETO, V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, p. 619-631, 1999.

GOMES, F. C. A.; MARTINEZ, T. C. L. S. R.; MOURA-NETO, V. Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, p. 611-620, 2001.

GOMEZ, D. M.; NEWMAN, S. W. Medial nucleus of the amygdala in the adult Syrian hamster: A quantitative Golgi analysis of gonadal hormonal regulation of neuronal morphology. *Anatomy Records*, v. 231, p. 498-509, 1991.

GORSKI, R. A. Editorial: Estradiol acts via estrogen receptor in the sexual differentiation of the brain, but What does This Complex do? *Endocrinology*, v.133 n.2, p.431-432, 1993.

GORSKI, R. A. Sexual differentiation of the nervous system. In KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M., Eds., *Principles of Neural Science*, 4th ed. New York: McGraw-Hill, p.463-485, 2000.

GOULD, E.; WOOLEY, C. S.; FRANKFURT, M.; MCEWEN, B. S. Gonadal steroids regulate spine density on hippocampal pyramidal cells in adulthood. *The Journal of Neuroscience*, v. 10, p. 1286-1291, 1990.

GRÉCO, B., ALLEGRETTO, E. A., TETEL, M. J., BLAUSTEIN, J. D. Coexpression of ER β with ER α and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology*, v. 142, 5172–5181, 2001.

GRECÓ, B.; EDWARDS, D. A.; MICHAEL, R. P.; CLANCY, N. A. Androgen receptors and estrogen receptors are colocalized in male rat hypothalamic and limbic neurons that express Fos immunoreactivity induced by mating. *Neuroendocrinology*, v. 67, p. 18-28, 1998.

GREENSPAN, F. S.; GARDNER, D. G., *Basic & Clinical endocrinology*, 7th ed., Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, 2004.

GUILLAMÓN, A.; SEGOVIA, S. Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Research Bulletin*, v. 44, p. 377-382, 1997.

HAYDON, P. G. Glia: listening and talking to the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, p. 185-193, 2001.

HAYDON, P. G.; CARMIGNOTO, G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiology Reviews*, v. 86, p. 1009-10031, 2006.

HARRIS, V. S.; SACHS, B. D. Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. *Brain Research*, v. 86, p. 514-518, 1975.

HERMEL, E. E. S.; FACCIANI-HEUSER, M. C.; MARCUZZO, S.; RASIA-FILHO, A. A.; ACHAVAL, M. Ultrastructural features of neurons and synaptic contacts in the posterodorsal medial amygdala of adult male rats. *Journal of Anatomy*, v. 208, p. 565-575, 2006.

HESS, U. S.; GALL, C. M.; LYNCH, G.; GRANGER, R. Differential patterns of c-fos mRNA expression in the amygdala during successive stages of odor discrimination learning. *Learning and Memory*, v. 4, p. 262-283, 1997.

HINES, M.; ALLEN, L. S.; GORSKI, R. G. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Research*, v. 579, p. 321-326, 1992.

HOF, P. R.; TRAPP, B. D.; DE VELLIS, J.; CLAUDIO, L.; COLMAN, D. R. The cellular components of nervous tissue. In: Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L., Squire, L.R. Eds. *Fundamental of Neuroscience*. San Diego: Academic Press, p.41-70, 1999.

INAGAKI, M.; NAKAMURA, Y.; TAKEDA, M. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol*, v. 4, p. 239-243, 1994.

KARPAS, A. E., BREMNER, W.J., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A., DORSA, D.M., Diminished luteinizing hormone pulse frequency and amplitude with aging in the male rat. *Endocrinology*, 112: 788-789, 1983.

KAWATA, M. Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neuroscience Research*, v. 24, p.1-46, 1995.

KELLY, D. Sexual differentiation of the nervous system. In: KANDEL, E.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. *Principles of Neural Sciences*. New York: Elsevier, p. 959-973, 1991.

KERCHNER, M.; MALSBUY, L. W.; WARD, O. B.; WARD, I. L. Sexual dimorphic areas in the rat medial amygdala: resistance to the demasculinizing effect of prenatal stress. *Brain Research*, v.672, p.251-260, 1995.

KIPP, J. L.; RAMIREZ, V. D. Estradiol and testosterone have opposite effects on microtubule polymerization. *Neuroendocrinology*, v.77, n.4, p.258-72, 2003.

KETTENMANN, H., RANSOM, B. R., *Neuroglia*. Oxford Univ. Press, New York, 2005.

_____. *Neuroglia*. Oxford Univ. Press, New York, 1995.

KLING, A. S.; BROTHERS, L. A. The amygdala and social behavior. In: AGGLETON, J. P. *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss, p. 353-377, 1992.

KNUEPFER, M.M.; EISMAN, N.; SCHÜTZE, I.; STUMPF, H.; STOCK, G. Responses of single neurons in amygdala to interoceptive and exteroceptive stimuli in conscious cats. *American Journal of Physiology*, v. 268, p. R666-R675, 1995.

KOHAMA, S. G; GROSS, J. R; McNEILL, T. H.; FINCH, C. E. Glial fibrillary acidic protein mRNA increases at proestrus in the arcuate nucleus of mice. *Neuroscience Letters* 183: 164-166, 1994.

KONDO, Y. Lesions of the medial amygdala produce severe impairment of copulatory behavior in sexually inexperienced male rats. *Physiology and Behavior*, v. 51, p. 939-943, 1992.

KONDO, Y.; ARAI, Y. Functional association between the medial amygdala and the medial preoptic area in regulation of mating behavior in the male rat. *Physiology and Behavior*, v. 57, p. 69-73, 1995.

KONDO, Y.; TOMIHARA, K.; SAKUMA, Y. Sensory requirements for noncontact penile erection in the rat. *Behavioral Neuroscience*, v. 113, p. 1062-70, 1999.

KOOLHAAS, J. M.; SCHUURMAN, T.; WIEPKEMA, P. R. The organization of intraspecific agonistic behavior in the rat. *Progresses in Neuroscience*, v. 15, p. 247-268, 1980.

KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 178, p. 255-280, 1978.

LAMING, P. R.; KIMELBERG, H.; ROBINSON, S.; SALM, A.; HAWRYLAK, N.; MÜLLER, C.; ROOTS, B.; NG, K. Neuronal-glia interactions and behaviour, *Neuroscience and Biobehavior Reviews*, v. 24, p. 295-340, 2000.

LAPING, N. J.; TETER, B.; NICHOLS, N. R.; ROZOWSKY, I.; FINCH, C. E. Glial fibrillary acidic protein: regulation by hormones, cytokines and growth factors. *Brain Pathology*, v. 1, p. 259–275, 1994.

LeDOUX, J. E. Emotion and amygdala. In: AGGLETON, J. P. *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss, p. 339-352, 1992.

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

LI, X.; SCHWARTZ, P. E.; RISSMAN, E. F. Distribution of estrogen receptor- β -like immunoreactivity in rat forebrain. *Neuroendocrinology*, v. 66, p. 63-67, 1997.

LONSTEIN, J. S.; GRÉCO, B.; De VRIES, G. J.; STERN, J. M.; BLAUSTEIN, J. D. Maternal behavior stimulates C-fos activity within estrogen receptor alpha-containing neurons in lactating rats. *Neuroendocrinology*, v. 72, p. 91-101, 2000.

LUQUÍN, S.; NAFTOLIN, F.; GARCIA SEGURA, L.M. Natural fluctuation and gonadal hormone regulation of astrocyte immunoreactivity in dentate gyrus. *Journal of Neurobiology*, 24: 913-924, 1993.

MALSBURY, C. W.; MCKAY, K. Neurotrophic effects of testosterone on the medial nucleus of the amygdala in adult male rats. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 6, p. 57-69, 1994.

MASCÓ, D. H.; CARRER, H. F. Sexual receptivity in female rats after lesions or stimulation in different amygdaloid nuclei. *Physiology and Behavior*, v. 24, p. 1073-1080, 1980.

MATSUMOTO, A.; ARAI, Y. Sex difference in volume of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. *Endocrinologia Japonica*, v.30, n.3, p.277-280, 1983.

MATTHEWS JR., M. K.; KENYON, R. Four- versus five-day estrous cycles in rats: vaginal cycling and pregnancy. *Physiology and Behavior*, v. 33, p. 65-67, 1984.

McEWEN, B. S.; ALVES, S.E. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrinology Reviews*, v. 20, p. 279-307, 1999.

McEWEN, B. S.; WOOLLEY, C. S. Estradiol and progesterone regulate neuronal structure and synaptic connectivity in adult as well as developing brain. *Experimental Gerontology*, v.29, n.3-4, p.431-6, 1994.

McEWEN, B. S.; COIRINI, H.; WESTLIND-DANIELSSON, A.; FRANKFURT, M.; GOULD, E; SCHUMACHER, M; WOOLLEY, C. Steroids hormones as mediators of neural plasticity. *Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology*, v.39, p.223-232, 1991.

McEWEN, B. S.; COIRINI, H.; SCHUMACHER, M. Steroid effects on neuronal activity: when is the genome involved? In: CHADWICK, D.; WIDDOWS, K. *Steroids and Neuronal Activity*. CIBA Foundation Symposium 153. Chichester, John Wiley & Sons, p.3-12, 1990.

McEWEN, B. S. Gonadal steroid influences on brain development and sexual differentiation. *International Review of Physiology*, v.27, p.99-145, 1983.

McGAUGH, J. L.; INTROINI-COLLISON, I. B.; CAHILL, L.; KIM, M.; LIANG, K. C. Involvement of the amygdala in neuromodulatory influences on memory storage. In: AGGLETON, J. P. *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*. New York: Wiley-Liss, p. 431-451, 1992

McGINNIS, M. Y.; WILLIAMS, G. W.; LUMIA, A. R. Inhibition of male sex behavior by androgen receptor blockade in preoptic area of hypothalamus, but not amygdala or septum. *Physiology and Behavior*, v. 60, p. 783-789, 1996.

MELCANGI, R. C.; CELOTTI, F.; CASTANO, P.; MARTINI, L., Differential localization of the 5 α -reductase and the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in neuronal and glial cultures. *Endocrinology*, v. 93, p. 1252-1259, 1993.

MELCANGI, R. C.; CELOTTI, F.; MARTINI, L., Progesterone 5 α -reduction and in different types of glial cell cultures: type 1 and 2 astrocytes and oligodendrocytes. *Brain Research*, v. 639, p. 202-206, 1994.

MELCANGI, R. C.; MARTINI, L.; GALBIATI, M. Growth factors and steroid hormones: a complex interplay in the hypothalamic control of reproductive functions. *Progress in Neurobiology*, v. 67, p. 421-449, 2002.

MEISEL, R. L.; LUMIA, A. R.; SACHS, B. D. Effects of olfactory bulb removal and flank shock on copulation in male rats. *Physiology and Behavior*, v. 25, p. 383-387, 1980.

MEISEL, R. L.; SACHS, B. S. The physiology of male sexual behavior. In: KNOBIL, E.; NEILL, I. D. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven, p. 3-105, 1994.

MICEVYCH, P. F.; MATT, D. W.; GO, V. L. W. Concentrations of cholecystokinin, substance P, and bombesin in discrete regions of male and female rat brain: sex differences and estrogen effects. *Experimental Neurology*, v. 100, p. 416-425, 1988.

MIZUKAMI, S.; NISHIZUKA, M.; ARAI, Y. Sexual difference in nuclear volume and its ontogeny in the rat amygdala. *Experimental Neurology*, v. 79, p. 569-575, 1983.

MO, Z. L., KATAFUCHI, T., MURATANI, H. e HORI, T. Effects of vasopressin and angiotensin II on neurones in the rat dorsal motor nucleus of the vagus in vitro. *Journal of Physiology* , v. 458, p. 561-577, 1992.

MONG, J. A.; McCARTHY, M. M. Gonadal steroids promote glial differentiation and alter neuronal morphology in the developing hypothalamus in a regionally specific manner, *Journal of Neuroscience*. 19: 1464-1472, 1999.

MONG, J. A.; NUNEZ, J. L.; McCARTHY, M. M. GABA mediates steroid-induced astrocyte differentiation in the neonatal rat hypothalamus, *Journal of Neuroendocrinology*, v. 40, p. 602-619, 1999.

MONG, J. A.; McCARTHY, M. M. Ontogeny of sexually dimorphic astrocytes in the neonatal arcuate, *Developmental Brain Research*, v.139, p.151-158, 2002.

MORGAN, H. D.; WATCHUS, J. A.; MILGRAM, N. W, FLEMING, A. S. The long lasting effects of electrical stimulation of the medial amygdala on maternal behavior in female rats. *Behavioral Brain Research*, v.99, p.61-73, 1999.

NAFTOLIN, F. Understanding the bases of sex differences. *Science*, v.211, p.1263-1264, 1981.

NELSON, R. J. *An introduction to behavioral endocrinology*. Sunderland: Sianuer Associates, cap. 6, p. 231-288, 1995.

NEWMAN, S. W. The medial extended amygdala in the male reproductive behavior: A node in the mammalian social behavior network. *Annual New York Academy Sciences*, v.877, p. 242-257, 1999.

NISHIZUKA, M.; ARAI, Y. Organizational action of estrogen on synaptic pattern in the amygdala: Implications for sexual differentiation of the brain. *Brain Research*, v. 213, p. 422-426, 1981.

NISHIZUKA, M.; PFAFF, D. W. Intrinsic synapses in the ventromedial nucleus of the hypothalamus: an ultrastructural study. *The Journal of Comparative Neurology*, v.286, n.2, p.260-268, 1989.

NUMAN, M.; NUMAN, M. J.; ENGLISH, J. B. Excitotoxic aminoacid injections into the medial amygdala facilitate maternal behavior in virgin female rats. *Hormones and Behavior*, v. 27, p. 56-81, 1993.

ORO, A. E.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Estrous cycle variations in the levels of cholecystokinin immunoreactivity within cells of three interconnected sexually dimorphic forebrain nuclei. *Neuroendocrinology*, v. 47, p. 225-235, 1988.

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

OTTERSEN, O. P. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat: II. Afferents from the hypothalamus and the basal telencephalon. *The Journal of Comparative Neurology*, v.194, p. 267-289, 1980.

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

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

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press, 1997.

_____. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press, 1998.

PEREA, G.; ARAQUE, A. Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *Journal of Physiology*, v. 96, p. 199-207, 2002.

_____. Synaptic information processing by astrocytes. *Journal of Physiology*, v. 99,

p. 92-97, 2006.

PÉREZ, J., LUQUIN, S., NAFTOLIN, F., GARCIA-SEGURA, L.M. The role of estradiol and progesterone in paced synaptic remodeling of the rat arcuate nucleus. *Brain Research*, 608, 38–44, 1993.

PETERS, A.; PALAY, S. L.; WEBSTER, D. E. F. *The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and their Supporting Cells*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1991.

PETERS, A.; KAISERMAN-ABRAMOF, I. R. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *The American Journal of Anatomy*, v. 127, p. 321-356, 1970.

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

PFAFF, D. W.; SCHWARTZ-GIBLIN, S.; MCCARTHY, M. M.; KOW, L. M. Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behaviors. In: *Physiology of Reproduction*. E. Knobil and J. Neil Eds. 2nd ed. New York: Raven Press, 2: 107-220, 1994.

PFAFF, D. W., *Neurobiological and molecular mechanisms of sexual motivation*, Cambridge, M.A.: MIT Press, 1999.

PFAFF, D. W., PHILLIPS, M. I., RUBIN, R. T. *Principles of hormone/behavior relations*. New York: Elsevier Academic Press, 2004.

PILGRIM, C. H.; REISERT, I. Differences between male and female brains - Developmental mechanisms and implications. *Hormones Metabolism Research*, v.24, p.353-359, 1992.

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

PITKÄNEN, A.; SAVANDER, V.; LeDOUX, J. E. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: An emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neurosciences*, v. 20, p. 517-523, 1997.

PIXLEY, S. K.; VELLIS, J. Transition between imature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Developmental Brain*

Research, v. 15, p. 201-209, 1984.

PRIVAT, A.; GIMENEZ-RIBOTTA, M.; RIDET, J. Morphology of astrocytes. In KETTENMANN, H.; RANSOM, B. R. *Neuroglia*. New York: Oxford University Press, 1995.

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

RAJENDREN, G.; DUDLEY, C. A.; MOSS, R. L. Role of the ventromedial nucleus of hypothalamus in the male-induced enhancement of lordosis in female rats. *Physiology and Behavior*, v. 50, p. 705-710, 1991.

_____. Influence of vomeronasal organ on lordosis behavior and luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system in female rats. *Society of Neuroscience Abstract*, 369-1, 1992.

RAJENDREN, G. e MOSS, R. L. The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neural system. *Brain Research*, v. 617, p. 81-87, 1993.

RAMON Y CAJAL, S. *Ciência e Arte*. Madrid: Obra Social, 2003.

RAO, M. S.; JACOBUS, M. J., Eds. *Developmental Neurobiology*, 4th ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004.

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

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

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

_____. Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of the rats. *Brain Research Bulletin*, v. 48, p.173-183, 1999.

RASIA-FILHO, A. A.; PERES, T. M. S.; CUBILLA-GUTIERREZ, F. H.; LUCION, A. B. Effect of estradiol implanted in the corticomедial amygdala on the sexual behavior of castrated male rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 24, p. 1041-1049, 1991.

RHODA, J.; CORBIER, P.; ROFFI, J. Hypothalamic testosterone increase in the male rat at birth, *International Journal of Developmental Neuroscience* v.1, p. 187-190, 1983.

ROCHA, M. I. U. M. *Amígdala medialpósterio-ventral: caracterização ultraestrutural e volume somático neuronal em ratos machos e fêmeas no ciclo estral*. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Neurociências), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ROSSI, D. Another bold role for astrocytes: coupling blood flow to neural activity. *Nature Neuroscience*, v. 9, p. 159-160, 2006.

ROWE, D. W.; ERSKINE, M. S. c-Fos proto-oncogene activity induced by mating in the preoptic area, hypothalamus and amygdala in the female rat: role of afferent input via the pelvic nerve. *Brain Research*, v.621, p. 25-34, 1993.

RUTKA, J. T.; MURAKAMI, M.; DIRKS, P. B.; HUBBARD, S. L.; BECKER, L. E.; FUKUIAMA, K.; JUNG, S.; TSUGU, A.; MATSUZAWA, K. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review, *Journal of Neurosurgery*, v. 87, p. 420-430, 1997.

SCALIA, F.; WINANS, S.S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 161, p. 31-55, 1975.

SEARLES, R. V.; YOO, M. J.; HE, J. R.; SHEN, W. B.; SELMANOFF, M. Sex differences in GABA turnover and glutamic acid decarboxylase (GAD 65 and GAD 67) mRNA in the rat hypothalamus. *Brain Research*, v. 878, p.11-19, 2000.

SEGOVIA, S.; GUILLAMÓN, A. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Research Reviews*, v. 18, p. 51-74, 1993.

SHAIKH, D. A.; SIEGEL, A. Neuroanatomical and neurochemical mechanisms

underlying amygdaloid control of defensive rage behavior in the cat. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, v. 27, p. 2759-79, 1994.

SHEEHAN, T.; CIRRITO, J.; NUMAN, M. J.; NUMAN, M. Using c-fos immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Behavioral Neuroscience*, v. 114, p. 337-352, 2000.

SHEEHAN, T.; PAUL, M.; AMARAL, E.; NUMAN, M. J.; NUMAN, M. Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. *Neuroscience*, v. 106, p. 341-356, 2001.

SHERIDAN, P. J. The nucleus interstitialis stria terminalis and the nucleus amygdaloideus medialis: prime targets for androgen in the rat forebrain. *Endocrinology*, v. 104, p. 130-136, 1979.

SHINODA, K.; NAGANO, M.; OSAWA, Y. Neuronal aromatase expression in preoptic, strial, and amygdaloid regions during late prenatal and early postnatal development in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 343, p. 113-129, 1994.

SHUGHRUE, P. J.; LANE, M.; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 388, p. 507-525, 1997.

SIMERLY, R. B. Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: PAXINOS, G. *The Rat Nervous System*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, p.335-368, 2004.

_____. Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annual Review Neuroscience*, v. 25, p.507-536, 2002.

_____. Hormonal control of neuropeptide gene expression in sexually dimorphic olfactory pathways. *Trends in Neuroscience*, v. 13, p. 104-110, 1990.

SIMERLY, R. B.; CHANG, C.; MURAMATSU, M.; SWANSON, L. W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 294, p. 76-95, 1990.

SIMARD, M.; ARCUINO, G.; TAKANO, T.; LIU, O.S.; NEDERGAARD, M. Signaling at the gliovascular interface, *Journal of Neuroscience*, v. 23, p. 9254-9262, 2003.

SIMON, N. G. Hormonal processes in the development and expression of aggressive behavior. In: PFAFF, D. W.; ARNOLD, A. P.; ETGEN, A. M.; FAHRBACH, S. E.; RUBIN, R. T. Eds, *Hormones, Brain and Behavior*, vol. 1. San Diego, CA: Academic Press, p. 339-392.

SLODDART-APTER, S. L.; MacDONNELL, M. F. Septal and amygdalar efferents to the hypothalamus which facilitate hypothalamically elicited intraspecific aggression and associated hissing in the cat. Na autoradiographic study. *Brain Research*, v. 193, p. 19-32, 1980.

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels association with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, v. 96, p. 219-226, 1975.

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

SÖDERSTEIN, P.; HANSEN, S. Effects of castration and testosterone, dihydrotestosterone or estradiol replacement treatment in neonatal rats on mounting behavior in the adult. *Journal of Endocrinology*, v. 76, p. 337-346, 1978.

STEFANOVA, N. Gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the amygdala of the rat - sex differences and effect of early postnatal castration. *Neuroscience Letters*, v. 255, p. 175-177, 1998.

STEFANOVA, N.; OVTSCHAROFF, W. Sexual dimorphism of the bed nucleus of the stria terminalis and the amygdala. *Advances in Anatomy Embriology and Cell Biology*, v. 158, p. 1-78, 2000.

STONE, D. J., ROZOWSKY, I., MORGAN, T. E., ANDERSON, C. P., HAJIAN, H., FINCH, C. E., Astrocytes and microglia respond to estrogen with increased apoE mRNA in vivo e in vitro. *Experimental Neurology*, 143: 313-318, 1997.

SWANN, J.; FIBER, J. M. Sex differences in function of a pheromonally stimulated pathway: role of steroids and the main olfactory system. *Brain Research Bulletin*, v. 44, p.409-413, 1997.

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

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E.; RIVIER, J.; VALE, W. W. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*, v. 36, p. 165-186, 1983.

TAKANO, T.; TIAN, G. F.; PENG, W.; LOU, N.; LIBIONKA, W.; XIAONING, H. astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature Neuroscience*, v. 9, p. 260-267, 2006.

TOIVOLA, D. M.; TAO, G. Z.; HABTEZION, A.; LIAO, J.; OMARY, M. B. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *TRENDS in Cell Biology*, v. 15, p. 608-617, 2005.

TORAN-ALERAND, C. D. Developmental interactions of estrogens with neurotrophins and their receptors. In: MICEVYCH, P. E.; HAMMER Jr, R. P. *Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones*. New York: Cambridge, p. 391-411, 1995.

TRANQUE, P.A.; SUAREZ, I.; OLMOS, G.; FERNANDEZ, B.; GARCIA-SEGURA, L.M. Estradiol-induced redistribution of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat brain. *Brain Research*, 406: 348-351, 1987.

TSACOPOULOS, M. Metabolic signalling between neurons and glial cells: a short review. *Journal of Physiology*, v. 96, p. 283-288, 2002.

VENTURA, R; HARRIS, K. M. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes, *Journal of Neuroscience*, v. 19, p. 6897-6907, 1999.

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

WONG, M.; CHEN, Y.; MOSS, R. L. Excitatory and inhibitory synaptic processing in the accessory olfactory system of the female rat. *Neuroscience*, v. 56, p. 355-365, 1993.

WOOD, R. I. Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Hormones and Behavior*, v. 32, p. 40-45, 1997.

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

ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. Upper Saddle, New Jersey: Prentice Hall, 1999.

ZONTA, M.; ANGULO, M. C.; GOBBO, S.; ROSENGARTEN, B.; HOSSMANN, K. A. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neuroscience*, v. 6, p. 43-50, 2003.

Nota da autora:

As ilustrações das capas dos capítulos foram retiradas da obra de Ramon y Cajal (reeditada em 2003). Elas unem arte ao pioneirismo científico, representando parte do rico universo das células gliais. Abaixo estão descritas as respectivas legendas:

Página 1, Capítulo 1. INTRODUÇÃO: Células neurogliais da substância branca do cérebro, h. 1913. 16,6 X 12,7 cm [irreg.].

Página 44, Capítulo 2. OBJETIVOS: Neuroglia das camadas superficiais do cérebro da criança, h. 1904. 19,3 X 14,8 cm [irreg.].

Página 46, Capítulo 3. MATERIAL E MÉTODOS: Astrócitos fibrosos do córtex do corno de Amon do gato, h. 1913. 10 X 12,4 cm [irreg.].

Página 58, Capítulo 4. RESULTADOS: Célula neuroglial gigante da substância cinzenta na paralisia geral progressiva, h. 1925. 14 X 5 X 11,1 cm [irreg.].

Página 116, Capítulo 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES: Astrócitos da substância cinzenta do cérebro, h. 1913. 12 X 16,5 cm [irreg.].

Página 126, Capítulo 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Astrócito do córtex cerebral, h. 1913. 12 X 16,5 cm [irreg.].