



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

**AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-VENTRAL:
CARACTERIZAÇÃO
ULTRA-ESTRUTURAL E VOLUME SOMÁTICO
NEURONAL EM RATOS MACHOS E FÊMEAS AO
LONGO DO CICLO ESTRAL**

Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha

Porto Alegre

2006



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

**AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-VENTRAL: CARACTERIZAÇÃO
ULTRA-ESTRUTURAL E VOLUME SOMÁTICO NEURONAL EM RATOS
MACHOS E FÊMEAS AO LONGO DO CICLO ESTRAL.**

Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha

Orientadora: Profa. Dra. Matilde Achaval Elena

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

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de doutora.

Porto Alegre
2006

“Quando você acha que sabe todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas”

Bob Marley

Tente outra vez

Veja
Não diga que a canção está perdida
Tenha fé em Deus, tenha fé na vida
Tente outra vez
Beba
Pois a água viva ainda está na fonte
Você tem dois pés para cruzar a ponte
Nada acabou, não não não não
Tente
Levante sua mão sedenta e recomece
a andar
Não pense que a cabeça agüenta se
você parar,
Há uma voz que canta, uma voz que
dança, uma voz que gira
Bailando no ar
Queira
Basta ser sincero e desejar profundo
Você será capaz de sacudir o mundo,
vai
Tente outra vez
Tente
E não diga que a vitória está perdida
Se é de batalhas que se vive a vida
Tente outra vez

Raul Seixas/Paulo Coelho/Marcelo Motta

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro pela confiança em mim depositada no início deste crescimento, pelo profissionalismo, orientação, incentivo e amizade.

À Profa. Dra. Matilde Achaval pela orientação construtiva, atenção, dedicação e estímulo na preparação deste trabalho tão importante na minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Alberto Antônio Rasia Filho pelas sugestões e contribuições.

À Profa. Dra. Maria Cristina Faccioni-Heuser pela contribuição e auxílio.

À Cristiane Lopes e a Moema Queirós pelo profissionalismo e disponibilidade.

Em especial ao Ernesto e aos meus filhos, Felipe e Gabriel pelo carinho, paciência, compreensão, apoio nas horas difíceis, por entenderem a minha ausência durante a realização deste trabalho e por acreditarem em mim.

À minha mãe, pela confiança em mim e pelo incentivo em todos os momentos.

Às minhas irmãs e sobrinhos pela assistência aos meus filhos na minha ausência.

À Aline Pagnussat pela amizade, afinidade, cumplicidade, estímulo, desprendimento, integridade e auxílio valioso nos momentos difíceis.

À Susie Andrade pela convivência preciosa e amizade.

À Cláudia Puperi pelo incentivo, amizade e pela alegria que sempre transmite.

Às minhas amigas Lauren, Dircinha, Márcia, Martha, Marta, Gizele, Vania, Vera Lúcia, Clarice, Leonor e Beatriz pelo interesse e pela força quando o desânimo me superava.

Às amigas criadas durante a convivência enriquecedora no laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS: Cláudia Forti, Jocemar Ilha, Paula Rigon, Juliana de Castilhos, Erica Hermel, Rafaela Araújo, Gustavo Mânica, Simone Marcuzzo, Pedro Kalil Gaspar, Flávia Martinez, Régis Mestriner, Taís Sarzenski, Marina Marchi, Alessandra Swarowsky, Giordano Viola, Aline Dall'Oglio, Nice Artemi, Patrícia Nascimento, Eudira da Silva, Antônio Severino, Günther Gehlen e Léder Xavier.

Aos colegas do Departamento de Morfologia da UFSM pela disponibilidade e apoio durante a minha ausência.

Ao CCS e ao Dep. Morfologia pelo auxílio nas minhas viagens.

À UFSM, à CAPES, à UFRGS e ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia pela oportunidade.

A todos, que contribuíram para minha formação e para que este trabalho se tornasse realidade.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais.....	2
1.2 Amígdala.....	2
1.2.1 Amígdala medial.....	5
1.2.1.1 Localização, divisão e função.....	5
1.2.1.2 Conexões da amígdala medial.....	8
1.2.1.3 Citoarquitetura da amígdala medial.....	13
1.2.2 Dimorfismo sexual, hormônios, ciclo estral, neurotransmissores.....	20
1.3 Lateralidade.....	23
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL e MÉTODOS	27
3.1 Animais.....	28
3.2 Identificação das fases do ciclo estral.....	28
3.3 Experimentos	29
3.3.1 Experimento 1 - Avaliação do volume somático de neurônios da MePV de ratos machos e fêmeas ao longo do ciclo estral.....	29
3.3.2 Experimento 2 - Estudo das características ultra-estruturais dos neurônios e dos seus contatos sinápticos da MePV de ratos machos e fêmeas em diestro	32
3.3.2.1. Microscopia eletrônica.....	32
4. RESULTADOS	33

4.1 Experimento 1: Volume somático neuronal de células da amígdala medial pósteroventral de ratos machos e fêmeas no ciclo estral.....	34
4.1.1 Análise histológica.....	34
4.1.2 Análise estatística do volume somático neural.....	34
4.2 Experimento 2: Características ultra-estruturais dos neurônios e contatos sinápticos na amígdala medial pósteroventral de ratos machos adultos e fêmeas em diestro.....	38
4.2.1 Análise ultra-estrutural.....	38
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	67
7. PERSPECTIVAS.....	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
9. ANEXOS.....	86

ABREVIATURAS

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-Methylisoxazolepropionoc Acid
BNST	Núcleo próprio da estria terminal
IP ₃	Inositol trifosfato
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
5-HT	5-Hidroxitriptamina
MeA	Núcleo medial da amígdala
MeAD	Subnúcleo ântero-dorsal da amígdala medial
MeAV	Subnúcleo ântero-ventral da amígdala medial
MePD	Subnúcleo pósterio-dorsal da amígdala medial
MePV	Subnúcleo ântero-ventral da amígdala medial
NMDA	N-metil- <i>D</i> -aspartato
PB	Tampão fosfato
PBS	Tampão fosfato salino
REL	Retículo endoplasmático liso
RER	Retículo endoplasmático rugoso
SNC	Sistema nervoso central
VMN	Núcleo ventro-medial do hipotálamo
VMNvl	Porção ventro-lateral do núcleo ventro-medial do hipotálamo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Divisão esquemática da amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais.....	4
Figura 2	Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo de rato onde se observam os quatro subnúcleos da Amígdala Medial.....	7
Figura 3	Fotomicrografias de neurônios impregnados pela técnica de Golgi modificada.....	15
Figura 4	Representação esquemática das diferentes morfologias dos espinhos dendríticos, como se observam na microscopia óptica.....	18
Figura 5	Fotomicrografias mostrando a clássica citologia vaginal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral.....	29
Figura 6	Fotomicrografia de cortes semifinos seriados mostrando secções em diferentes níveis do soma neuronal da amígdala medial póstero-ventral de ratas fêmeas em diestro.....	36
Figura 7	Médias do volume somático neuronal da amígdala medial póstero-ventral de machos e fêmeas em diestro, proestro e estro.....	37
Figura 8	Eletromicrografias da amígdala medial póstero-ventral de ratos machos, mostrando soma neuronal.....	42
Figura 9	Eletromicrografias da amígdala medial póstero-ventral de ratos machos, mostrando diferentes tipos de sinapses	44
Figura 10	Eletromicrografias da amígdala medial póstero-ventral de ratos machos mostrando diferentes tipos de espinhos	46
Figure 11	Eletromicrografias da amígdala medial póstero-ventral de ratas em diestro, mostrando soma neuronal.....	48
Figura 12	Eletromicrografias da amígdala medial póstero-ventral de ratas em diestro mostrando diferentes tipos de sinapses.....	50
Figura 13	Eletromicrografias da amígdala medial póstero-ventral de ratas em diestro mostrando diferentes tipos de espinhos	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Aferências intra- e extra-amigdalianas para os diferentes subnúcleos da amígdala medial.....	9
Tabela 2	Eferências intra- e extra-amigdalianas dos diferentes subnúcleos da amígdala medial de ratos.....	10

RESUMO

A amígdala medial pósterio-ventral (MePV) é uma estrutura encefálica onde os hormônios gonadais têm um efeito neurotrófico nos ratos. Os objetivos deste trabalho foram: 1) estimar e comparar o volume somático neuronal da MePV de machos (n=5) e fêmeas nas fases de diestro, proestro e estro (n=5 em cada fase) do ciclo ovariano, além de avaliar o possível efeito na lateralidade em ambos os hemisférios cerebrais. Para tanto utilizou-se a reconstrução estereológica de cortes seriados. 2) Caracterizar os aspectos ultra-estruturais neuronais e descrever a ultra-estrutura dos contatos sinápticos nas diferentes porções de tais células (dendritos, espinhos dendríticos, soma e axônio) da mesma região de ratos machos (n=8) e fêmeas em diestro (n=8). Todos os animais foram manipulados de acordo com os procedimentos éticos, anestesiados e perfundidos por via transcardíaca, tendo seus encéfalos sido removidos, pós-fixados e processados para a microscopia eletrônica. No primeiro experimento, as estimativas do volume somático médio de neurônios da MePV esquerda e direita foram realizadas usando-se o método de Cavalieri associado à técnica de contagem de pontos. Os dados foram comparados entre os grupos usando-se o teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas e pelo teste *post-hoc* das mínimas diferenças significativas. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$. A análise estatística dos dados mostrou que houve uma diferença no volume somático da MePV entre os grupos experimentais, machos, fêmeas em diestro, proestro e estro [$F(3,16) = 3,42$; $p = 0,043$], mas não houve diferença quanto à lateralidade [$F(1,16) = 0,19$; $p = 0,668$] nem na interação entre grupos e lateralidade [$F(3,16) = 0,99$; $p = 0,421$]. As comparações *post-hoc* mostraram que a média do volume dos machos não diferem quando comparados com fêmeas em diestro ($p > 0,05$), mas foi significativamente maior do que em fêmeas em proestro e em estro ($p < 0,05$ em ambos os casos). Quando foram comparadas as médias do volume somático da MePV nas diferentes fases do ciclo estral das fêmeas, não houve diferença significativa entre esses todos ($p > 0,05$). No segundo experimento, secções ultrafinas (70-80 nm) foram analisadas e a ultra-estrutura da MePV descrita. No neuropilo da MePV de machos e fêmeas em diestro, neurônios e suas organelas, dendritos com e sem espinho, processos axonais, feixes axônicos não-mielinizados e poucos axônios mielinizados,

processos gliais e vasos sanguíneos foram identificados. Além disso, foram observadas sinapses axo-dendríticas supostamente excitatórias com suas regiões pré-sinápticas contendo vesículas claras arredondadas com algumas achatadas e outras de centro denso. Os dendritos algumas vezes recebem vários terminais axonais sobre um mesmo ramo e axônios contatando com mais de uma estrutura pós-sináptica também foram observados. Os espinhos dendríticos apresentavam diferentes morfologias e geralmente recebiam um único contato sináptico, ainda que se tenha observado espinhos com mais de um terminal em oposição a sua membrana. Sinapses simétricas supostamente inibitórias também foram observadas e geralmente no soma neuronal.

Os presentes resultados demonstram que: 1) o volume somático neuronal é um parâmetro sexualmente dimórfico na MePV, sendo maior em machos do que em fêmeas em proestro e estro, mas não em fêmeas em diestro. 2) para evidenciar portanto, os efeitos dos hormônios gonadais nos neurônios da MePV é relevante considerar os estágios do ciclo estral das ratas. 3) o volume somático neuronal não mostrou lateralidade nem interação entre os grupos e lateralidade. 4) as peculiaridades nucleares e citoplasmáticas dos neurônios da MePV de ratos machos e fêmeas em diestro não diferem entre si e são semelhantes àquelas de outras áreas encefálicas. 5) espinhos dendríticos formam somente sinapses assimétricas (tipo I), aparentemente excitatórias, e podem ter mais de um contato sináptico. 6) sinapses simétricas (tipo II), aparentemente inibitórias, ocorrem somente sobre ramos dendríticos proximais e somas neuronais. 7) os terminais axonais formando sinapses foram observadas vesículas claras arredondadas e algumas achatadas e ocasionalmente algumas de centro denso. 8) aparentemente as fêmeas apresentaram maior quantidade de vesículas de centro denso do que em machos. O presente trabalho acrescenta novos achados que são importantes para o estudo da organização celular e sináptica da MePV e que podem se associar a outros dados morfológicos previamente descritos na literatura de modo a aumentar a compreensão que se tem a respeito da atividade funcional dessa área do encéfalo de ratos machos e fêmeas, ainda pouco explorada.

ABSTRACT

The posteroventral medial amygdala (MePV) is a brain structure in which gonadal hormones have a neurotrophic effect on rats. The aims of this study were: a) to estimate and compare the neuronal somatic volume of the MePV of males (n=5) and females in the diestrus, proestrus and estrus phases (n=5 in each phase) of the ovarian cycle, besides evaluating the possible effect on laterality in both brain hemispheres. For this purpose the stereological reconstruction of serial sections was used. 2) to characterize the ultrastructural aspects of the neuronal cell bodies and describe the ultrastructure of the synaptic contacts in the different portions of those cells (dendrites, dendritic spines, soma and axon) in the same region of male rats (n=8) and females in diestrus (n=8). All the animals were manipulated according to ethical procedures, anesthetized and transcardially perfused, their brains were removed, post-fixed and processed for electron microscopy. In the first experiment, the estimates of the mean somatic volume of the neurons of the left and right MePV were performed using the Cavalieri method combined with the point counting technique. The data were compared among the groups using a two-way analysis of variance test (ANOVA) for repeated measures, followed by the least significance difference *post-hoc* test. The statistical level of significance was established as $p < 0.05$. The statistical analysis of the data showed that there was a difference in the somatic volume of the MePV among the experimental groups [$F(3.16) = 3.42$; $p = 0.043$], but there was no difference as to laterality [$F(1.16) = 0.19$; $p = 0.668$], nor in the interaction between groups and laterality [$F(3.16) = 0.99$; $p = 0.421$]. The *post-hoc* comparisons showed that the data on the males are not different when compared with females in diestrus ($p > 0.05$), but were significantly higher than in females in proestrus and in estrus ($p < 0.05$ in both cases). When the means of the somatic volumes of the MePV in the different phases of the estrous cycle of females were compared, no significant difference was found between all of them ($p > 0.05$). In the second experiment, ultrafine sections (70-80 nm) were analyzed and the ultra-structure of the MePV was described. In the neuropile of the MePV of males and females in diestrus, neurons and their organelles, dendrites with and without a spine, axonal processes, non-myelinated axonal bundles and a few myelinated axons, glial processes and blood vessels were identified. Besides this, probably excitatory axo-dendritic synapses were

observed with their pre-synaptic regions containing clear, rounded vesicles, a few of them flattened and others with a dense center. The dendrites sometimes receive several axonal terminals on a same branch and axons contacting more than one post-synaptic structure were also observed. The dendritic spines presented different morphologies and generally received a single synaptic contact, although spines were observed with more than one terminal opposing the membrane. Apparently inhibitory symmetrical synapses were also detected and generally in the neuronal soma.

The present results show that: 1) the neuronal somatic volume is a sexually dimorphic parameter in MePV, and it is larger in males than in females in proestrus and estrus, but not in females in diestrus. 2) therefore, in order to show the effects of gonadal hormones on the neurons of MePV, it is relevant to consider the stages of the estrous cycle in the female rats. 3) the neuronal somatic volume did not present laterality nor interaction between the groups and laterality. 4) the nuclear and cytoplasmatic features of the MePV neurons of male rats and females in diestrus are not different from each other and are similar to those in other areas of the brain. 5) dendritic spines form only apparently excitatory asymmetrical synapses and many have more than one synaptic contact. 6) apparently inhibitory symmetrical synapses (type II) occur only on proximal dendritic branches and neuronal soma. 7) in the axonal terminals forming synapses clear, rounded and some flattened vesicles were observed, and occasionally a few with a dense center. 8) apparently, females presented a greater quantity of vesicles with a dense center than males. The present study provides important new findings to the study of cellular and synaptic organization of the MePV, which may be associated with other morphological data previously described in the literature, in a way that increases the understanding of the functional activity of this so far little explored area of the male and female rat brains.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

O prosencéfalo é uma confluência de sistemas que são cruciais para o entendimento de muitas funções importantes do encéfalo, incluindo punição e recompensa, aprendizado e cognição, alimentação e reprodução. A base para o entendimento deste amplo aspecto é desvendar o sistema funcional do prosencéfalo e uma das estruturas envolvidas neste contexto é a amígdala (ALHEID, 2003).

1.2 Amígdala

Em primatas, a amígdala é caracterizada como uma massa ovóide de substância cinzenta localizada na porção terminal e rostral da formação hipocampal, tendo como limite anterior o corno temporal do ventrículo lateral (ALHEID; de OLMOS; BELTRAMINO, 1995). Ela recebe esta denominação devida sua semelhança com uma amêndoa (SWANSON; PETROVICH, 1998). Embora o termo amígdala tenha sido originalmente usado por Burdach (1819), mais tarde Johnston (1923) a definiu como complexo amigdalar.

Em ratos a amígdala não é nem uma unidade anatômica nem unidade funcional, pois é uma coleção de grupos de células não homogêneas relativamente agrupadas (SWANSON, 2003).

Para Swanson e Petrovich (1998) a amígdala não compõe uma unidade anatômica ou funcional única, formando, de fato, diferentes sistemas funcionais. Eles consideraram a amígdala como sendo um grupo de células que parecem ser partes diferenciadas do córtex cerebral tradicional, do cláustro e do estriado, e pertencendo a quatro sistemas funcionais: vegetativo (núcleo central), cortical frontotemporal (núcleos

basolateral anterior e lateral), olfativo acessório [amígdala medial (MeA)] e olfativo principal (demais núcleos da amígdala).

Aos núcleos amigdalianos são atribuídos diferentes funções associadas com a atenção, medo condicionado, ansiedade e a modulação de comportamentos como o reprodutivo, defensivo e social (MEGA *et al.*, 1997, WALKER; TOUFEXIS; DAVIS, 2003, ARGIOLAS; MELIS, 2003, BAUMAN; KEMPER, 2003; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 2000; AMARAL; CORBETT, 2003; AMARAL, 2002, BAAS; ALEMAN; KAHN, 2004). Para a realização destas funções, as diferentes partes da amígdala recebem vários tipos de informações interoceptivas e exteroceptivas, modificando sua própria atividade ao analisar a informação recebida e estimulando outras regiões do sistema nervoso central (SNC) para que se inicie a resposta ao estímulo inicial (QUIRK; REPA; LeDOUX, 1995; KNUEPFER *et al.*, 1995; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 2000).

No rato, a amígdala pode ser dividida em 4 grandes porções: 1) amígdala "expandida", que é composta por uma divisão central e outra medial, onde está a amígdala medial (MeA) e seus subnúcleos, objeto de estudo desta tese; 2) amígdala com aspecto cortical e que se divide em complexo basolateral e nas porções que se conectam com as vias olfativa e vomeronasal; 3) região de transição, localizada entre a porção ventral dos núcleos da base e a amígdala expandida; e 4) núcleos ainda não classificados (ALHEID; de OLMOS; BELTRAMINO, 1995, Figura 1). Estes núcleos e subnúcleos formam uma complexa rede estrutural inter-relacionada e multifuncional, uma vez que está envolvida na modulação de diversos comportamentos e ajustes homeostáticos ou alostáticos (ALHEID; de OLMOS; BELTRAMINO, 1995; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 2000; RASIA-FILHO *et al.*, 2004).

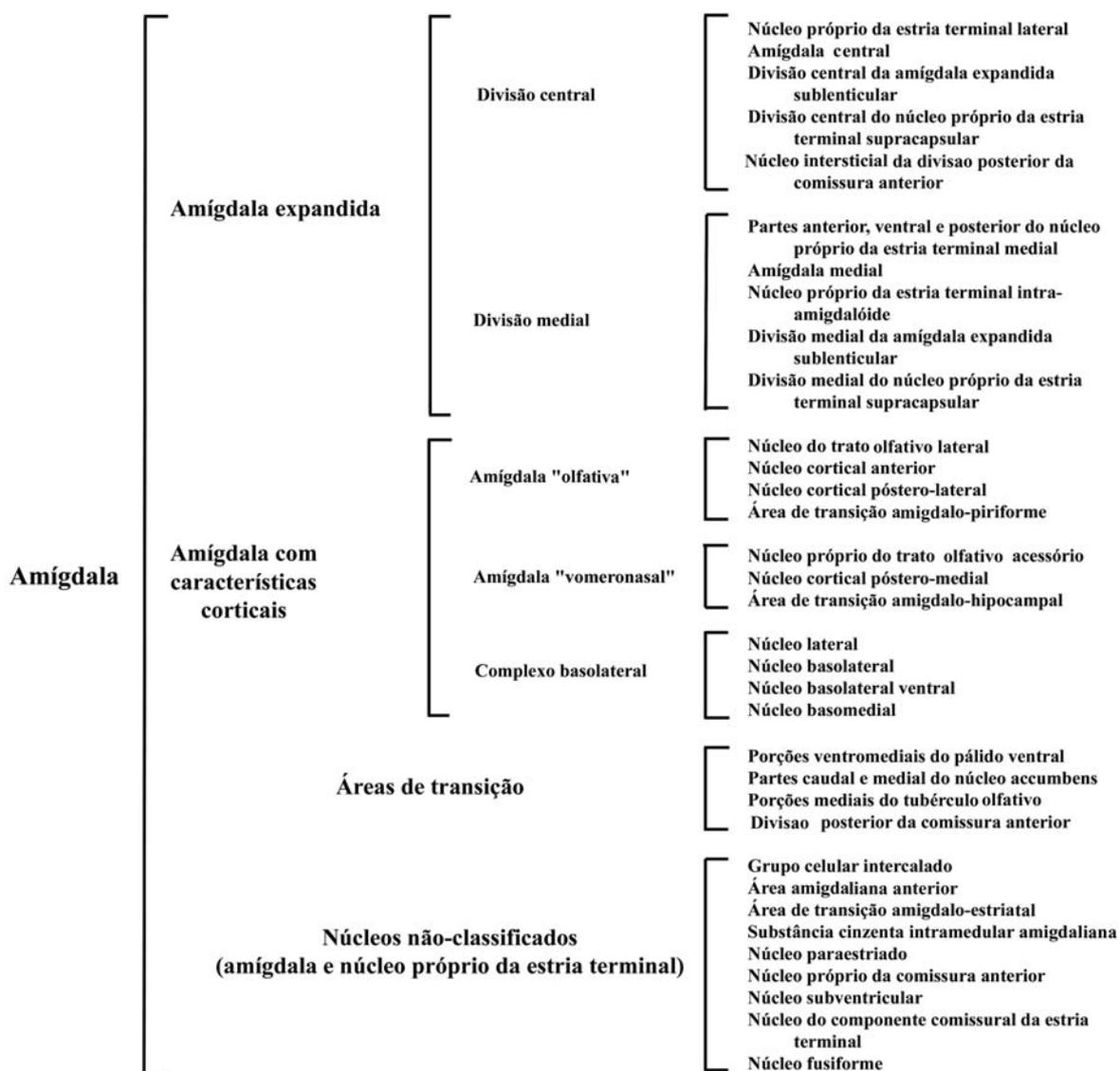


Figura 1. Divisão esquemática da amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais, descrito por Alheid e colaboradores (1995), modificado de Rasia-Filho e colaboradores (2000).

1.2.1 Amígdala medial

1.2.1.1 Localização, divisão e função

A MeA é um dos núcleos superficiais do complexo amigdalóide. De função preponderante participa na adequação do animal a seu ambiente, modulando comportamentos social e sexual e o aprendizado onde o componente emocional está envolvido (ALHEID; de OLMOS; BELTRAMINO, 1995).

A MeA surge caudalmente e medialmente ao núcleo do trato olfativo lateral e se estende caudalmente até o surgimento do corno temporal do ventrículo lateral. Neste nível ela localiza-se dorso-medialmente ao pólo cefálico da área de transição amígdalo-hipocampal e forma o aspecto medial da parede anterior da porção do ventrículo. Ao longo de sua extensão, a MeA acompanha o lado ventro-lateral do trato óptico. Os limites rostral e lateral não estão claramente definidos. Existe uma zona pobre em células que separa a MeA da porção medial do núcleo central no sentido dorso-lateral. Em porções médio-caudais fibras axonais ascendem pela estria terminal em direção dorsal superior as quais se interpõem entre a MeA e outros núcleos amigdalóides (ALHEID; de OLMOS; BELTRAMINO, 1995).

A MeA tem sido dividida em subnúcleos de diversas maneiras, segundo critérios de vários autores. Pitkänen (2000) divide-a em três regiões denominadas: rostral, central (porção dorsal e ventral) e caudal. Alheid e cols (1995), Paxinos e Watson (1998) e de Olmos e cols (2004) dividem-na nos subnúcleos ântero-dorsal (MeAD), ântero-ventral (MeAV), pósterodorsal (MePD) e póstero-ventral (MePV; Figura 2). Para se descrever as subdivisões dessas diferentes áreas tem sido utilizado a coloração de Nissl, a reação de Timm para metais pesados, a reação histoquímica para

acetilcolinesterase e o procedimento imunistoquímico para detecção da angiotensina II, substância P, tirosina hidroxilase, bem como glutamato descarboxilase, dopamina- β -hidroxilase e neurotensina (ALHEID; de OLMOS; BELTRAMINO, 1995).

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).

Os subnúcleos da MeA tem diferentes funções (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995, PAXINOS; WATSON, 1988). Por exemplo, a MePD parece influenciar as atividades neuroendócrinas e o controle dos sistemas simpático e parassimpático que o hipotálamo regula, enquanto as regiões MeAD, MeAV e MePV podem estar relacionados com a modulação hipotalâmica dos comportamentos reprodutivo e defensivo (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995).

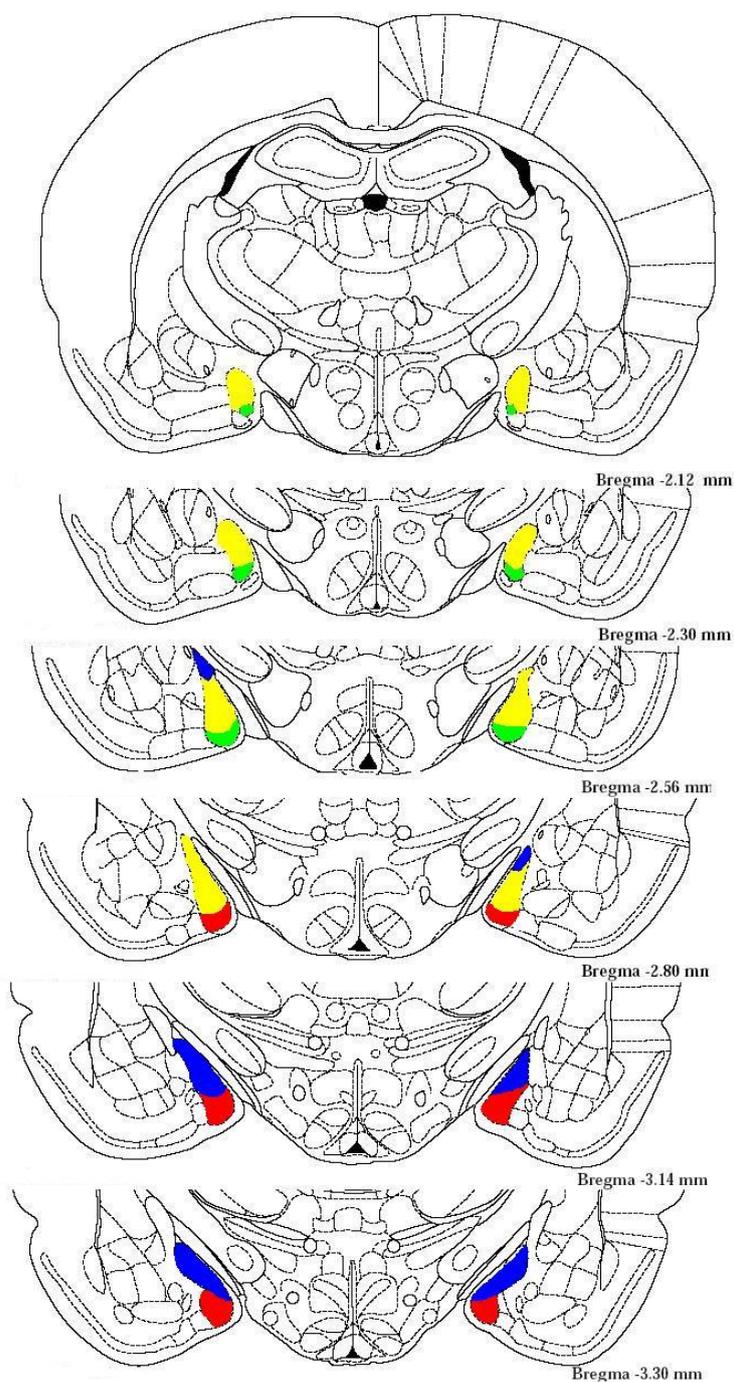


Figura 2. Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo de rato onde se observam os quatro subnúcleos da amígdala medial: amígdala medial ântero-dorsal (em amarelo), amígdala medial ântero-ventral (em verde), amígdala medial pótero-dorsal (em azul) e amígdala medial pótero-ventral (em vermelho). Os valores em mm colocados no lado direito das imagens referem-se à distância posterior ao bregma. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1997), equivale às figuras 26 a 31 deste.

1.2.1.2 Conexões da amígdala medial

A MeA recebe projeções intra-amigdalóides como do núcleo cortical posterior, acessório basal e lateral bem como da área amigdaló-hipocampal. A MeA recebe projeções de outras regiões encefálicas como o córtex parietal, córtex frontal (principalmente infralímbico), formação hipocampal (parte distal e proximal do subiculum temporal), do sistema olfativo, tálamo, hipotálamo (núcleos premamilar e ventromedial, área pré-óptica medial e lateral, etc) e núcleo próprio da estria terminal (BNST; CANTERAS; SWANSON, 1992).

A MeA estabelece conexões (vide Tabelas 1 e 2), muitas delas recíprocas, com várias regiões dentro da própria amígdala, como é o caso do núcleo central e cortical e póstero-medial, e com regiões fora da amígdala tais como o bulbo olfativo, órgão vomeronasal, hipocampo, estriado e globo pálido ventral, núcleo próprio da estria terminal, diversos núcleos do hipotálamo e tálamo, substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo e núcleos da rafe mesencefálicos (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995).

Tabela 1. Aferências intra- e extra-amigdalóides para os diferentes subnúcleos da amígdala medial, de acordo com Pitkänen (2000).

<p><u>INTRA-AMIGDALIANAS</u> Área amigalo-hipocampal Córtex periamigdalóide Núcleo basal Núcleo basal acessório Núcleo cortical anterior e posterior Núcleo lateral Subnúcleos componentes do núcleo medial</p> <p><u>INTER-AMIGDALIANAS</u> (contralaterais) Córtex periamigdalóide Núcleo basal acessório Núcleo cortical posterior Núcleo do trato olfativo lateral</p> <p><u>SISTEMA OLFATIVO</u> Córtex piriforme Bulbo olfativo Bulbo olfativo acessório Bulbo olfativo anterior Núcleo endopiriforme</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>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>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>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>OUTRAS</u> Núcleo da banda diagonal de Broca Núcleo próprio da estria terminal <i>Substantia innominata</i></p>
--	---

Tabela 2. Eferências intra- e extra-amigdalianas dos diferentes subnúcleos da amígdala medial de ratos machos adultos, adaptado de Canteras e colaboradores (1995) adaptado por HERMEL (2005). As projeções foram classificadas em: +++ densas; ++ moderadas; + fracas; - ausentes

PROJEÇÕES:		MeAD	MePD	MePV
INTRA-NUCLEARES:				
Núcleo medial	ântero-dorsal		++	+++
	ântero-ventral	+++	++	+++
	pósterio-dorsal	++		++
	pósterio-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	+++	+	++
	pósterio-lateral	++	+++	++
	pósterio-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	+	-	-
	pósterio-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	magno celular anterior	+	-	-
	magno celular pósterio-medial	+	-	-
	parvo celular anterior	++	-	-
	parvo celular dorsal	+	-	-
	parvo celular 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:				
Núcleo <i>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>Substantia innominata</i>		+++	+++	+++
Zona incerta		++	-	+

Notavelmente, a MePV recebe densas projeções do sistema olfativo (bulbo olfativo acessório), de núcleos corticais (córtex infralímbico, área pré-límbica e ínsula agranular ventral), da formação hipocampal (córtex entorrinal e partes proximal e distal do *subiculum* temporal), de núcleos hipotalâmicos (área pré-óptica medial; regiões dorsal e medial ao núcleo paraventricular; núcleos ventromedial, pré-mamilar ventral e dorsal, arqueado, lateral), de núcleos talâmicos (núcleos paraventricular e divisão medial do complexo geniculado medial), do tronco encefálico, da divisão medial do BNST e do núcleo da divisão horizontal da faixa diagonal de Broca, dentre outras (OTTERSEN; BEN-ARI, 1979; OTTERSEN, 1980; McDONALD et al., 1999; PITKÄNEN, 2000; de OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004, DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001).

Como mostra a Tabela 2, a MePV envia densas projeções intra-amigdalianas, principalmente para a MeAD e a MeAV, supostamente para outras regiões tais como as áreas amígdalo-piriforme e amigdalóide anterior, núcleo basomedial, núcleo posterior e núcleo próprio do trato olfativo acessório. Também envia projeções extra-amigdalianas para diversas regiões como para diferentes partes do córtex cerebral, tálamo, núcleos do hipotálamo, principalmente para a área pré-óptica medial, os núcleos anterior, periventricular e supraquiasmático, a área sub-paraventricular, as regiões anterior, central e dorsomedial do núcleo ventro medial, os núcleos posterior e pré-mamilar ventral deste. E ainda conecta com outras áreas como as regiões anterior e posterior do núcleo próprio da estria terminal e a *substantia innominata* (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995), com isso a MePV envia projeções para componentes relacionados aos comportamentos reprodutivos e defensivos, também para o hipotálamo que contém neurônios que liberam hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) e somatostatina e

ainda para regulação neuroendócrina como no caso da secreção da dopamina e hormônio de crescimento regulado pelo núcleo arqueado (PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001).

A distribuição de receptores para hormônios sexuais na MeA não é homogênea. Neurônios com receptores para andrógenos estão presentes em todos seus subnúcleos, porém sua concentração maior é observada da parte média à posterior da MeA (SHERIDAN, 1979). Neurônios que possuem receptores dos tipos α e β para estrógenos encontram-se preferentemente na MePD (SIMERLY *et al.*, 1990; LI; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997; ÖSTERLUND, 1998), mas eles também foram detectados na MePV (LI; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997; SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997; ÖSTERLUND, 1998). Receptores de progesterona também foram detectados na MeA (McEWEN, 1983; SIMERLY, 2002). Isto deve servir de base para que se entenda as ações dos hormônios gonadais nesta região de ratos, como será descrito em detalhes mais adiante.

1.2.1.3 Citoarquitetura da amígdala medial

De forma geral, quase a totalidade da MeA é constituída por neurônios de tamanho médio e de formas variadas. Os neurônios de maior tamanho são mais abundantes na região rostro-dorsal deste núcleo, principalmente a MePD e a MePV que são regiões constituídas de células de tamanho médio morfologicamente semelhantes (de OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004)

Um neurônio pode apresentar atividade específica de acordo com a sua morfologia, as conexões sinápticas que estabelece e as propriedades de membrana

que possui (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991). A morfologia dos neurônios da MeA tem sido estudada pelo método de Golgi que pode impregnar até 10% dos neurônios de uma determinada área. Na MeA encontram-se neurônios multipolares com somas de morfologia variada tais como ovóide, fusiforme, redondo, estrelado ou piriforme, apresentando dendritos de extensão variável, pouco ramificados, retilíneos ou tortuosos (RIGOTI, 2002). Estes neurônios são classificados como bipenachado, com dois dendritos simétricos, ou neurônios estrelados com três ou mais dendritos primários (RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999; 2004; Figura 3).

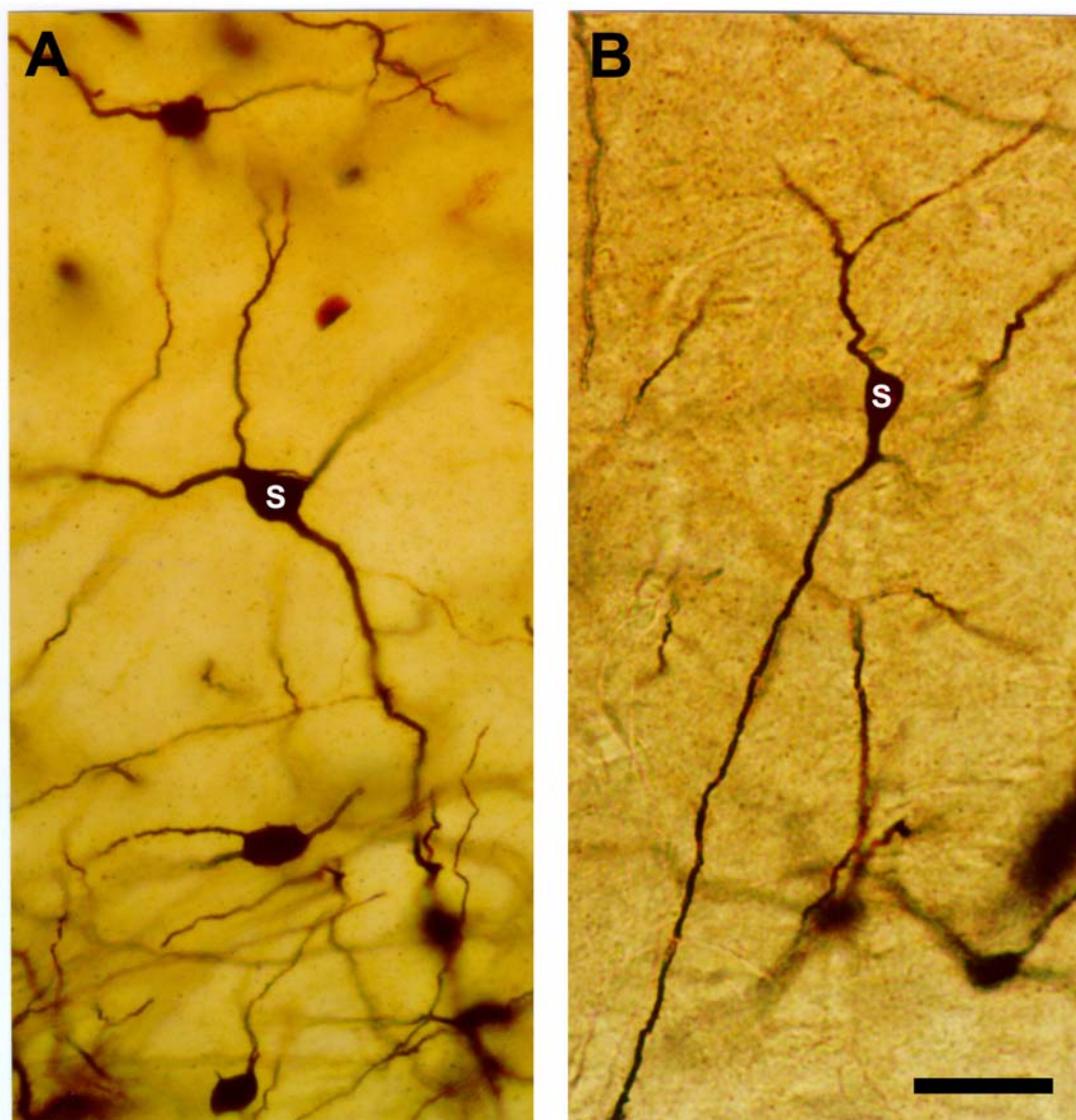


Figura 3. Fotomicrografias de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi modificada, de tipo estrelado (A) ou bipenachado (B) do subnúcleo póstero-dorsal da amígdala medial de rata adulta. S, soma. Barra: 50 μm . (conforme de CASTILHOS, 2005).

As células bipenachadas originam dois ramos dendríticos primários de comprimento variado em cada extremo do corpo celular e que se dirigem ventralmente e dorsalmente no interior dos subnúcleos do MeA ao qual pertencem. Tais dendritos, quando curtos, quase sempre se ramificam próximo ao soma em dois dendritos secundários longos, sendo que muitos deles mantêm a mesma orientação do dendrito

de origem. É comum encontrar os dendritos ventrais, tanto os primários quanto os secundários, descendo obliquamente em direção ao trato óptico ou paralelamente a ele em direção à superfície pial. Além disso, também são observados dendritos secundários e terciários difusamente distribuídos (RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; RIGOTI, 2002).

As células estreladas geralmente apresentam três ou quatro dendritos primários de diferentes comprimentos. Esses dendritos dispõem-se radialmente no interior dos subnúcleos do MeA, mas podem seguir ventralmente e, nesse trajeto, colocam-se obliquamente ao trato óptico, dirigindo-se ao mesmo, ou posicionam-se de forma paralela a este, até a superfície pial. Frequentemente, os dendritos secundários e terciários seguem de forma perpendicular em direção ao trato óptico (RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999; RASIA-FILHO *et al.*; 2004; RIGOTI, 2002).

Os dendritos são considerados o principal sítio receptivo do neurônio, são formados em diferentes períodos durante o desenvolvimento (VAN PELT; DITYATEV; UYLINGS, 1997) e recebem aferências sinápticas que se transformam em potenciais de membrana (SEGEV; RALL, 1998). Na MeA os dendritos são de comprimento e diâmetro variáveis (RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999). Quando presentes os espinhos são protusões nos ramos dendríticos e são o sítio de um grande número de contatos sinápticos, aumentando substancialmente a superfície receptiva da arborização dendrítica (HOF *et al.*, 1999).

Os espinhos, todavia podem se originar do soma, dos dendritos ou do cone axonal. São encontrados em várias populações neuronais, em todos os vertebrados e em alguns invertebrados (NIMCHINSKY; SABATINI; SVOBODA, 2002). O espinho tem a forma determinada pela presença de uma “cabeça” (volume de aproximadamente

0,001 a $1 \mu\text{m}^3$) conectada ao neurônio por um “pescoço” (diâmetro menor que $0,1 \mu\text{m}$; HARRIS; KATER, 1994). A cabeça do espinho contém uma densidade pós-sináptica e algumas estruturas especializadas, como filamentos de actina (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991). Embora mitocôndrias e microtúbulos estejam ausentes, os espinhos contêm retículo endoplasmático liso (REL) e que pode formar uma estrutura chamada “aparelho do espinho” (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991). A função desta estrutura poderia ser de manutenção da concentração de cálcio intracelular em níveis não patológicos, o que está associado com o processo de neuroproteção (BURGOYNE; GRAY; BARRON, 1983). Os polirribossomos e os elementos da via lisossomal-endossomal também estão presentes em alguns espinhos dendríticos, perto de sua base, sugerindo que pode ocorrer síntese protéica local, bem como existir proteínas para degradação de elementos citoplasmáticos ou de membrana celular (STEWART; SCHUMAN, 2001). Alguns espinhos podem modificar sua morfologia e esse processo reflete o rearranjo rápido do citoesqueleto de actina em seu interior, podendo levar a mudanças no tamanho e no número de espinhos (OERTNER; MATUS, 2005; TADA; SHENG, 2006).

Em geral, os espinhos são classificados de acordo com sua morfologia em: “filopódio”, que não apresenta uma cabeça definida e é fino e comprido e acredita-se que seja a forma precursora dos espinhos definitivos; “fino”, o qual apresenta pescoço fino e pode não ter uma cabeça muito volumosa; “achatado”, que não apresenta pescoço diferenciado, e se mostra como uma elevação maior do contorno dendrítico; em forma de “cogumelo”, que parece ser o espinho mais estável (em termos de mudanças numéricas e contatos sinápticos duradouros); e, “ramificado”, onde um pescoço pode dar origem a mais de uma cabeça de espinho (PETERS; KAISERMAN-

ABRAMOF, 1970; PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991; HERING; SHENG, 2001; GONZÁLEZ-BURGOS, 2004; Figura 4). Os espinhos na MeA são pleomórficos e são encontrados ao longo dos dendritos, mas também foram visualizados no soma e, algumas vezes, no segmento inicial de axônios (de CASTILHOS *et al.*, 2006; HERMEL *et al.*, 2006a).

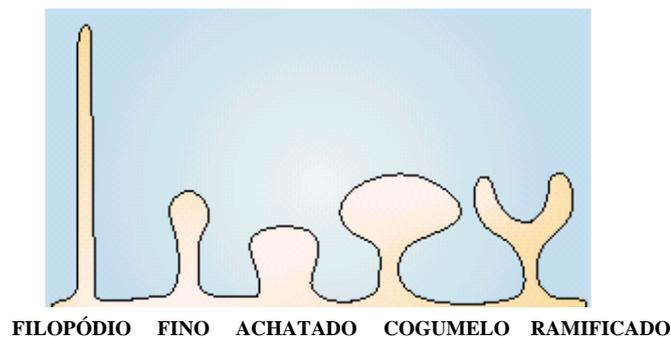


Figura 4. Representação esquemática das diferentes morfologias dos espinhos dendríticos, como se observam na microscopia óptica, surgindo a partir de uma linha de base que representa o tronco dendrítico (conforme MARCUZZO, 2006; adaptado de HERING; SHENG, 2001).

Espinhas dendríticas recebem a maioria dos sinais excitatórios, apresentam uma morfologia dinâmica trocando sua forma rapidamente em resposta a mudanças impostas sinapticamente e em diferentes condições hormonais. Este comportamento dinâmico é fundamental para a eficácia e plasticidade da transmissão sináptica (WOOLLEY, 1997). Há uma densa rede de proteínas responsáveis por este dinamismo, mas principalmente espinofilina, que é uma proteína fosfatase 1 e proteína ligadora de actina, que modula a transmissão sináptica excitatória (HSIEH-WILSON, *et al.*, 2003).

É clássico que, as sinapses químicas interneuronais são constituídas de um elemento pré-sináptico que contém vesículas sinápticas e um outro elemento oposto dito pós-sináptico, o qual é separado pela fenda sináptica. Sinapses, com proeminente

densidade pós-sináptica são chamadas de tipo I (GRAY, 1959), assimétricas e apresentam também uma nítida fenda sináptica. Há várias exceções a esta organização geral (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991). Um outro tipo de sinapse, a do tipo II, é simétrica, tem pouca densidade pós-sináptica e a fenda sináptica é estreita (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991). A análise ultra-estrutural de neurônios da MePD mostrou que as sinapses axodendríticas são as mais freqüentemente encontradas e parecem ser principalmente excitatórias. Suas regiões pré-sinápticas apresentam vesículas claras arredondadas sozinhas ou mescladas com algumas vesículas de centro denso (HERMEL *et al.*, 2006a). Até a presente tese, não haviam dados descritos sobre a ultra-estrutura das sinapses da MePV de ratos.

Em princípio as vesículas claras arredondadas contêm neurotransmissores de tipo excitatórios. Por exemplo, os terminais axônios que fazem contatos sinápticos do tipo assimétricos nos ramos dendríticos e espinhos parecem conter neurotransmissores excitatórios como o glutamato (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991). De acordo com estes mesmos autores, os axônios podem conter GABA nas vesículas claras achatadas. As vesículas de centro denso contêm neuropeptídeos (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991) e também foram encontradas tais estruturas na MePD, embora em menor número (HERMEL *et al.*, 2006a). Não obstante, a MeA parece ser alvo de fibras GABAérgicas, que se originam, pelo menos em parte, de neurônios GABAérgicos do núcleo dorsal basal da amígdala (NITECKA; FROTSCHER, 1989) e do núcleo amigdalóide intercalado (MEREDITH; WESTBERRY, 2004).

Os axônios dos subnúcleos da região posterior da MeA (MePD e MePV) preferentemente dirigem-se medialmente ao núcleo basal ou à porção principal do

BNST, enquanto os da MeAD forma parte da *ansa peduncularis*, também chamada de via amígdalo-fugal ventral (KAMAL; TÖMBÖL, 1975; COOKE; SIMERLY, 2005).

Especificamente, os astrócitos da MePV estão organizadas em três camadas distintas; a borda medial da MePV, que acompanha o tracto óptico, parece ter uma camada de processos que possuem a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) orientados radialmente e onde os corpos celulares de astrócitos não são facilmente distinguidos. Mais internamente há uma camada intermediária com poucos astrócitos, mas com abundantes processos reativos à GFAP seguindo em direção ventral. Mais ao centro da MePV há uma terceira camada com corpos celulares de forma estrelada ou alongada (RASIA-FILHO *et al.*, 2002, MARTINEZ *et al.*, 2006).

1.2.2 Dimorfismo sexual, hormônios, ciclo estral, neurotransmissores

A reprodução sexuada depende de uma variedade de comportamentos individuais e sociais, diferentes entre machos e fêmeas. 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 a sua estrutura e organização. A produção hormonal, cíclica em fêmeas e tônicas em machos, provocam mudanças estruturais e comportamentos específicos de cada sexo, que espelham as funções endócrinas (NAFTOLIN, 1981). Alguns mecanismos celulares que geram tais diferenças estão relacionados com a sensibilidade dada pelos tipos de receptores a estes hormônios, o número de células responsivas e a conectividade sináptica entre estruturas com a mesma possibilidade de modulação de função exercida pelos esteróides sexuais (KELLEY, 1988). A exposição do sistema nervoso a hormônios influencia permanentemente uma variedade de

características como o tamanho e o número de neurônios, ramos dendríticos e conexões sinápticas em diferentes áreas não somente no desenvolvimento, mas também em adultos (GOMEZ; NEWMAN, 1991). Por exemplo, o estradiol induz novas sinapses e espinhos dendríticos nas células piramidais de CA1 do hipocampo (WOLLEY *et al.*, 1997). O mesmo ocorre na porção ventro-lateral do núcleo ventro medial (VMNvl) do hipotálamo, onde a ação do estradiol também é capaz de causar hipertrofia somática (ERSKINE; MILLER 1995). No VMNvl durante o proestro, quando o nível de estrogênio em circulação sanguínea está em seu valor mais alto, a arborização dendrítica apresenta-se alongada e com maior densidade de espinhos dendríticos (MADEIRA *et al.*, 2001). Estrogênio administrado em ratas ovariectomizadas causa um aumento das sinapses axodendríticas na VMNvl (NISHIZUKA; PFAFF, 1989). Variações morfológicas mediadas por hormônios gonadais também foram encontradas nos neurônios da MeA de ratas, onde foi observado que o tamanho deste núcleo, o número de espinhos dendríticos e a quantidade de receptores nicotínicos para acetilcolina é maior em machos do que em fêmeas (HINES; ALLEN; GORSKI, 1992; RASIA-FILHO *et al.*, 1999; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; de CASTILHOS *et al.*, 2006). Ratos adultos gonadectomizados tratados com testosterona apresentam um aumento da MePD quando comparados a ratos castrados sem reposição hormonal (COOKE; TABIBNIA; BREEDLOVE, 1999). SHIMA e cols (2003) mostraram que na MeA, o RNAm para o receptor β do estradiol apresenta uma diminuição dada pelo nível fisiológico do estrogênio em ratas.

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 é composto por quatro fases – diestro, proestro, estro e metaestro – que, além de expressarem mudanças no epitélio vaginal como a presença de células epiteliais nucleadas, leucócitos e células queratinizadas em cada período, exibem variações nas concentrações de gonadotrofinas e conseqüentemente de esteróides gonadais (MATTHEWS; KENYON, 1984).

É interessante que a variação do nível de estrogênio e progesterona durante o ciclo estral altera o número dos espinhos dendríticos nos diferentes núcleos da amígdala medial (RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999). Em outros estudos houve aumento dos espinhos e das sinapses nos espinhos dos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo durante o pró-estro, momento em que há maior receptividade da fêmea. (McEWEN; WOOLEY, 1994)

O volume total da MePD de ratos machos é significativamente maior do que o de fêmeas (HINES; ALLEN; GORSKI, 1992; KERCHNER *et al.*, 1995) No núcleo ventromedial do hipotálamo, o volume do neuropilo é significativamente maior em machos do que em fêmeas, sem apresentar modificação durante o ciclo estral (MADEIRA *et al.*, 2001). Além disso, em outros estudos, o volume somático do núcleo pré-óptico medial é maior em machos do que em fêmeas (MADEIRA *et al.*, 1999). Parece com isso, que um padrão de dimorfismo sexual pode ser encontrado nas estruturas nervosas que apresentam uma conexão direta com a MeA, tais como as duas regiões acima mencionadas (SANCHEZ; DOMINGUES, 1994). Ademais o núcleo próprio da estria terminal é sexualmente dimórfico e parece enviar as maiores eferências para tais regiões também que contém uma grande quantidade de neurônios que expressam receptores para hormônios esteróides, em um padrão semelhante ao detectado na MeA (GU; CORNEA; SIMERLY, 2003).

Os núcleos central e medial da amígdala são um importante alvo de fibras GABAérgicas na amígdala (DAVIS; MYERS, 2000). Na MeA de ratos e hamsters, há neurônios que sintetizam substância P (MICEVYCH; MATT; GO, 1988), arginina-vasopressina (De VRIES, 1995), colecistoquinina (FRANKFURT *et al*, 1985; ORO; SIMERLY; SWANSON, 1988), somatostatina (Mc DONALD, 1989), ocitocina (VEINANTE *et al.*, 1997), angiotensina II (LIND; SWANSON; GANTEN, 1985), hormônio liberador de corticotrofina e GnRH (SWANSON *et al*, 1983), neuropeptídeo Y (GUSTAFSON; CARD; MOORE, 1986), peptídeo intestinal vasoativo (McDONALD, 1989), peptídeo liberador de gastrina/bombesina e peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (MARCOS *et al.*, 1999). Além disso a MeA apresenta imunorreatividade à serotonina e RNAm para o receptor 5HT_{1A} em ratos (ÖSTERNLUND; HURD, 1998). É interessante salientar que na MePV foram identificados os seguintes neuropeptídeos: peptídeo natriurético atrial, colecistoquinina, neuropeptídeo Y e somatostatina (de OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004), embora o papel funcional de neurotransmissores clássicos e de neuropeptídeos neste subnúcleo não esteja nada claro ainda. Há, no entanto, diferenças neuroquímicas nos subnúcleos da MeA o que sugere que possa haver distintas inter-relação entre eles, e deles com outras regiões do SNC (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; PITKÄNEN, 2000).

1.5 Lateralidade

A assimetria no cérebro tem sido observada em animais e em seres humanos na sua estrutura, função e no comportamento. Esta lateralidade se reflete na evolução, hereditariedade, desenvolvimento e em condições patológicas (TOGA *et al*, 2003). Há

vários achados relacionados com diferenças entre os lados direito e esquerdo na morfologia e funcionamento de diversas estruturas nervosas em mamíferos.

O padrão de lateralidade difere entre os sexos, sendo isto evidenciado no cérebro de seres humanos e em outros animais. Em ovelhas parece haver um envolvimento do hemisfério direito cerebral no controle das experiências emocionais negativas (da COSTA *et al.*, 2004). Em seres humanos a amígdala esquerda é mais freqüentemente ativada do que a amígdala direita no processamento neural da percepção de fâcias do medo (BAAS; ALEMAN; KAHN, 2004). Na aquisição e retenção do medo condicionado, a amígdala direita de ratos está mais envolvida do que à esquerda (BAKER *et al.*, 2004).

Ratos e camundongos também possuem diversas funções encefálicas lateralizadas, bem como assimetrias neuroquímicas e morfológicas (PALESTINI *et al.*, 1997; DLUZEN; KREUTZBERG, 1996, CROWNE *et al.*, 1992; CARLSON; GLICK, 1989; GLICK; SHAPIRO, 1985; GLICK; ROSS, 1981a, GLICK; ROSS, 1981b) que talvez causem as diferenças no conteúdo de dopamina, serotonina e noradrenalina presentes no tecido nervoso (ROSEN *et al.* 1984; SLOPSEMA; VAN DER GUGTEN; BRUIN, 1982, ANDERSEN; TEICHER, 1999; DLUZEN; KREUTZBERG, 1996). Em ratos a amígdala esquerda e direita podem ter uma contribuição diferente na consolidação da memória, sendo que a direita parece ser mais importante para a memória com treinamento motivado aversivo (COLEMAN-MESCHES; McGAUGH, 1995).

Isso indica que pode haver diferença na estrutura da MePV de acordo com o lado em que se encontra e suas conexões. Não há dados na literatura sobre tal assunto até o momento.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a morfologia ultra-estrutural das conexões sinápticas em neurônios localizados na MePV, região envolvida na modulação neuroendócrina hipotalâmica em ratos machos e fêmeas (ALHEID; de OLMOS; BELTRAMINO, 1995). Buscou-se também identificar possíveis diferenças no volume neuronal neste núcleo em machos e fêmeas adultas, a possibilidade de que o volume neuronal das fêmeas pudesse modificar durante o ciclo estral e se ocorre ou não diferenças neste parâmetro quanto ao hemisfério (direito ou esquerdo) estudado.

Assim pretendeu-se:

1. Estimar e comparar o volume somático neuronal da MePV de machos e fêmeas nas fases de diestro, proestro e estro do ciclo estral, além de avaliar o possível efeito da lateralidade, usando-se a reconstrução estereológica de cortes seriados (CRUZ-ORIVE; WEIBEL 1990; LEDDA *et al.*, 2000) e o método de Cavalieri em associação com a técnica de contagem de pontos (GUNDERSEN; JENSEN, 1978; HERMEL *et al.*, 2006b). Com isso, esperava-se encontrar dados sexualmente dimórficos e efeito das variações cíclicas dos esteróides sexuais neste parâmetro morfológico.
2. Descrever a ultra-estrutura dos neurônios e seus contatos sinápticos nas diferentes porções de neurônios (dendritos, espinhos dendríticos, soma e axônio) da MePV de ratos machos e de fêmeas em diestro. Com isso, esperava-se apresentar dados relevantes para futuras investigações juntando morfologia e funções dos neurônios da MePV de ratos machos e fêmeas. Todos os dados aqui apresentados são ainda inéditos e contribuem para a área do conhecimento que, embora relevante, ainda é pouco estudada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos de ambos os sexos (3 meses de idade, 13 machos e 23 fêmeas) provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Todos os animais foram mantidos sob temperatura ambiente (22°C), ciclo claro-escuro de 12:12 horas e com água e comida *ad libitum*.

Todos os ratos foram manipulados de acordo com as normas internacionais de cuidados éticos e uso de animais em laboratório (Conselho Diretivo da Comunidade Européia de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC) e as normas brasileiras para o uso ético de animais em experimentação científica.

3.2 Identificação das fases do ciclo estral

A verificação da citologia vaginal foi realizada nas ratas por duas semanas antes do início do experimento para determinar a regularidade do ciclo estral. Apenas as ratas que apresentaram dois ciclos estrais normais e consecutivos foram utilizadas nos experimentos relatados a seguir. Para identificar as fases do ciclo estral foi utilizada uma pequena pipeta com solução salina para a coleta. O conteúdo foi colocado sobre uma lâmina histológica e observado sob microscópio óptico para a identificação da fase do ciclo estral pela análise dos tipos celulares presentes (Fig. 5). Em diestro identificou-se a predominância de leucócitos; proestro, de células epiteliais nucleadas; em estro, células queratinizadas; e, em metaestro, uma mescla desses tipos celulares, conforme classicamente descrito. Não utilizamos fêmeas em diestro por ser uma fase rápida, de difícil detecção e com nível hormonal intermediário entre estro e proestro.

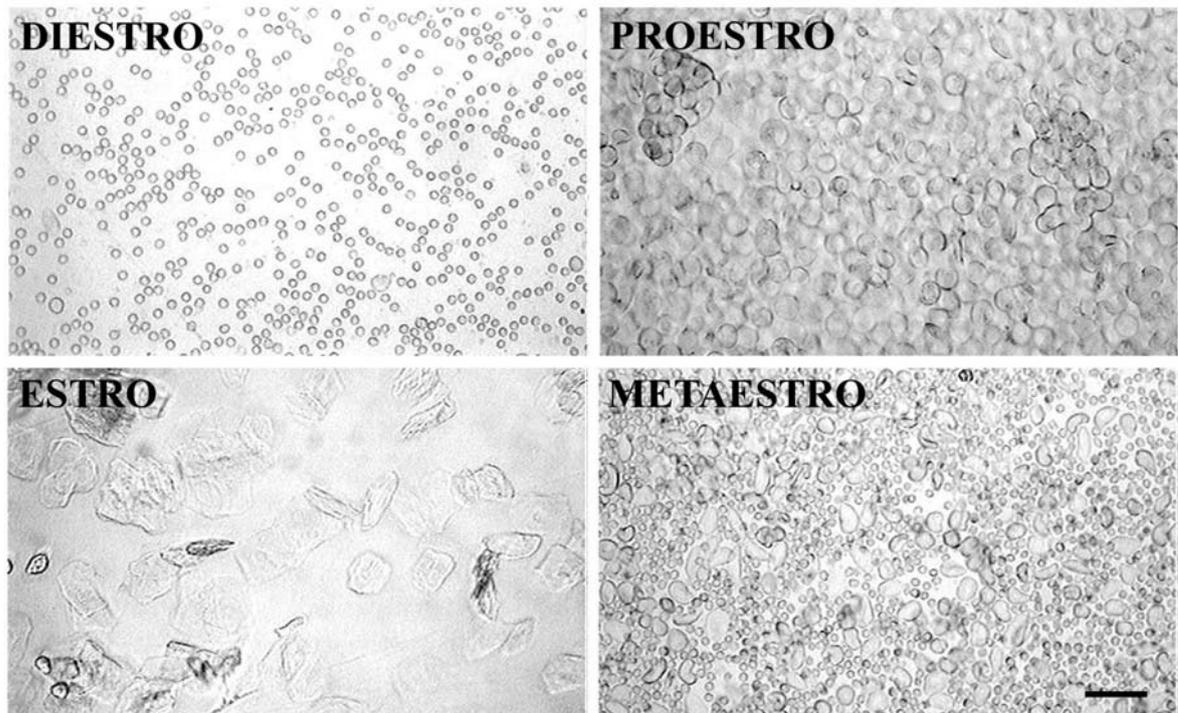


Figura 5. Fotomicrografias mostrando a clássica citologia vaginal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral. Diestro: predominância de leucócitos; Proestro: predominância de células epiteliais nucleadas; Estro: predominância de células queratinizadas; Metaestro: presença de todos os tipos celulares anteriores. Barra: 20 µm (HERMEL, 2005).

3.3 Experimentos

3.3.1 Experimento 1 - Avaliação do volume somático de neurônios da MePV de ratos machos e fêmeas ao longo do ciclo estral.

Os animais (n = 5 machos, 5 fêmeas em diestro, 5 fêmeas em proestro e 5 fêmeas em estro) foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/Kg, i.p.; Cristalia, Brasil), injetados com 1000 UI de heparina (Cristalia, Brasil) no ventrículo esquerdo e perfundidos com o auxílio de uma bomba peristáltica (*Control Company*, Brasil, 20 ml/min) com 200 ml de solução salina, seguida por 100 ml de paraformaldeído 4 % (Reagen, Brasil) e glutaraldeído 0,5 % (Sigma, EUA) diluídos em tampão fosfato 0,1M e

pH 7,4. Os encéfalos foram removidos, seccionados coronalmente em vibrátomo (100 µm; Leica, Alemanha) e as áreas contendo a MePV (-3,30 mm posteriormente à sutura bregmática) foram selecionadas e identificadas segundo o atlas para encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1998). A seguir foram pós-fixadas na mesma solução durante a noite.

As secções foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS, 3 vezes de 30 min), pós-fixadas por 1 h em tetróxido de ósmio 1% (Sigma, EUA), em seguida o material foi novamente lavado em PBS (3 vezes de 15 min) e desidratado em uma série de concentrações crescentes de álcool e óxido de propileno (*Electron Microscopy Sciences*, EUA). Posteriormente foi feita a inclusão em resina (Durcupan, ACM-Fluka, Suíça). Para isso, o material foi submetido ao seguinte protocolo: álcool 50% 2 vezes de 5 min; álcool 70% 2 vezes de 10 min; álcool 96% 2 vezes de 20 min; álcool 100% 2 vezes de 20 min. Posteriormente as secções foram embebidas em óxido de propileno, durante 5 min; depois foi feita uma mistura 1:1 com resina (Durcupan ACM-Fluka, Suíça) e óxido de propileno onde as secções ficaram durante 10 min; finalmente, as secções foram colocadas em resina pura a vácuo durante 24 h a temperatura ambiente. Após isso, as secções ainda com resina foram colocadas lâminas de vidro e cobertas com lâminas de acetato a 60°C por 48 h (RODRIGO *et al.*, 1996). Com ajuda de um estereomicroscópio (*Wild*, Suíça) a MePV foi identificada, e novamente seccionada, colada sobre um bloco de resina e novamente polimerizado por 48 h a 60°C. Secções semifinas (1µm) foram obtidas em um ultramicrótomo (MT 6000-XL, RMC, Tucson, EUA) usando-se navalhas de vidro e analisadas sob microscópio óptico após coloração com azul de toluidina 1% diluída em tetraborato de sódio 1% (Merck, Alemanha).

Para a avaliação do volume somático neuronal foi utilizada a técnica de reconstrução de secções seriadas (CRUZ-ORIVE; WEIBEL 1990; LEDDA *et al.*, 2000; HERMEL *et al.*, 2006b), ou seja, imagens seriadas contendo a MePV foram obtidas e digitalizadas usando-se um microscópio Nikon Eclipse E-600 (Japão) acoplado a uma câmara CCD Pro-Series “High Performance” com o auxílio do programa “Image Pro Plus Software 4.1” (Media Cybernetics, EUA). Um mínimo de 9 secções e 42 áreas/ponto por soma neuronal foram analisadas. As MePV direita e esquerda foram analisadas separadamente (10 neurônios foram mensurados em cada hemisfério, somando um total de 20 neurônios para cada animal de cada um dos grupos experimentais). Somente os corpos celulares contidos completamente na série de secções foram utilizados na avaliação quantitativa (Fig.6). A estimativa do volume somático neuronal da MePV direita e esquerda de todos os animais foi obtida com o método de Cavalieri associado com a técnica de contagem de pontos. O valor médio do volume somático neuronal foi calculado com a equação:

$$V = \Sigma P \cdot A/P \cdot T$$

onde V= volume, ΣP = total de áreas/ponto contadas, a/p= área/ponto ($16,415 \mu\text{m}^2$), T= espessura da secção ($1 \mu\text{m}$).

Para a análise estatística dos dados obtidos, compararam-se os valores obtidos nos diferentes grupos experimentais e os obtidos na MePV direita e esquerda de cada um deles utilizando-se o teste da análise da variância (ANOVA) de duas vias para

medidas repetidas seguido do teste das mínimas diferenças significativas (LSD). O nível estatístico foi estabelecido em $P < 0.05$.

3.3.2. Experimento 2- Caracterização ultra-estrutural dos neurônios e dos seus contatos sinápticos da MPV de ratos machos e fêmeas em diestro

3.3.2.1. Microscopia eletrônica

Os animais ($n = 8$ machos e 8 fêmeas em diestro) foram anestesiados, perfundidos e os tecidos preparados conforme protocolo do experimento 1. Após confecção dos blocos de resina contendo o material exatamente conforme anteriormente detalhado, foi feita a identificação da área de interesse nas secções semi-finas. Os blocos foram trimados e a área a ser seccionada foi diminuída, para serem obtidas secções ultrafinas (70-80 nm) no mesmo ultra-micrótomo e montadas em grades de cobre (200 *Mesh*). Posteriormente, as secções foram contrastadas com acetato de uranila 2% (Merck, Alemanha) por 30 min e citrato de chumbo 1% (Merck, Alemanha) por 20 min (REYNOLDS, 1963), observadas e fotografadas no microscópio eletrônico JEM 1200 EX II (Centro de Microscopia Eletrônica, UFRGS).

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1

Avaliação do volume somático neuronal de neurônios da MePV de ratos machos e fêmeas ao longo do ciclo estral.

4.1.1 Análise histológica

Nos cortes semi-finos da MePV observaram-se neurônios multipolares, células neurogliais, capilares sangüíneos e numerosos neuritos. Os neurônios tinham tamanhos variados, exibiram um núcleo grande pálido com escassos grânulos de heterocromatina contra a membrana nuclear e um denso nucléolo, envolto pelo citoplasma (Fig.6). Também identificaram-se diferentes processos, embora foram observados apenas os segmentos proximais de seus neuritos. O neuropilo mostrou numerosos processos dendríticos e ocasionalmente feixes axonais compostos tanto por axônios amielínicos como por alguns axônios finos mielinizados. Maiores detalhes serão descritos no experimento 2. Alguns pequenos núcleos observados no neuropilo revelou a existência de diferentes tipos de células gliais.

4.1.2 Análise estatística do volume somático neuronal

A análise estatística dos dados mostrou que houve uma diferença no volume somático da MePV entre os grupos analisados [$F(3,16) = 3,42$; $p = 0,043$], mas não houve diferença na lateralidade [$F(1,16) = 0,19$; $p = 0,668$] nem na interação entre os grupos e lateralidade [$F(3,16) = 0,99$; $p = 0,421$].

As análises *post-hoc* mostraram que não houve diferença no volume somático na MePV entre machos quando comparados com fêmeas em diestro ($p > 0,05$), mas o volume somático dos neurônios dos machos foi significativamente maior do que o

obtido em fêmeas em proestro e em estro ($p < 0,05$ em ambos os casos). Quando foram comparadas as médias do volume somático da MePV de fêmeas nas diferentes fases do ciclo, não houve diferença estatisticamente significativa entre elas ($p > 0,05$, em todos os casos; Fig. 7).

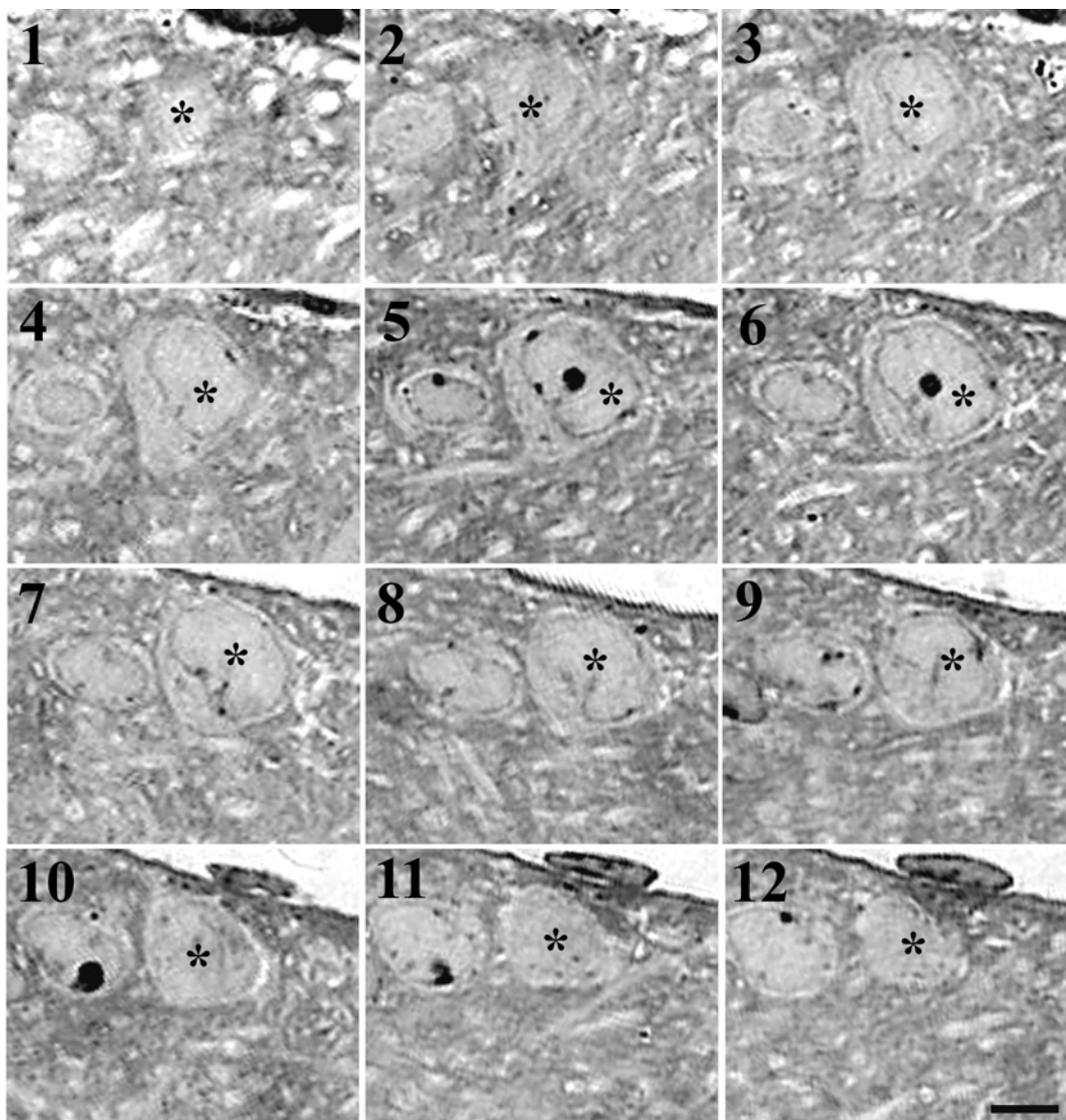


Figure 6. Fotomicrografia de cortes semifinos seriados mostrando secções em diferentes níveis (1-12) do soma neuronal (*) da amígdala medial pósterio-ventral de ratas em diestro. A numeração de cada fotomicrografia indica as secções correspondentes na série. A estimativa do volume somático foi determinada pela borda do corpo celular de cada neurônio usando o método Cavalieri. Coloração azul de toluidina Barra = 5 μ m

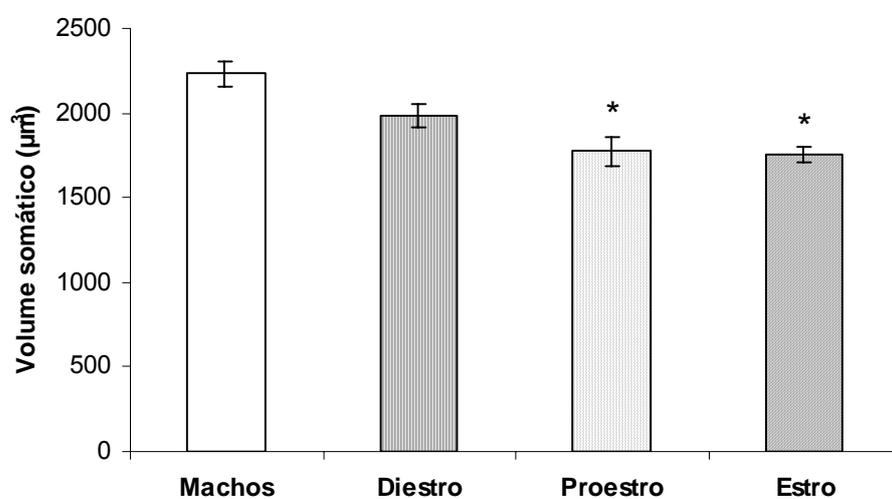


Figura 7. Médias (\pm erro padrão da média) do volume somático neuronal (em μm^3) amígdala medial póstero-ventral de machos e fêmeas em diestro, proestro e estro, estimada de acordo com a técnica de Cavalieri e a técnica de contagem de pontos.
* $P < 0,05$ quando comparados com machos.

4.2 Experimento 2

Estudo das características ultra-estruturais dos neurônios e dos seus contatos sinápticos MePV de ratos machos e fêmeas em diestro.

4.2.1 Análise Ultra-estrutural

Os resultados mostraram que tanto em machos como em fêmeas, os corpos celulares dos neurônios da MePV são arredondados ou ovais apresentam núcleo de forma similar situado no centro do soma, e com o carioplasma homogeneamente disperso, e um grande nucléolo situado excêntricamente (Figs. 8A, D; 11C). O carioplasma consistiu em uma matriz difusa com heterocromatina localizada contra o envelope nuclear, e em pequenos acúmulos dispersos no carioplasma. Uma profunda indentação pode ser vista no envelope nuclear tanto em machos como em fêmeas (Figs. 8D, E).

O citoplasma da região do soma continha aparelho de Golgi desenvolvido (Fig. 8A, E), um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido (Fig. 8E) ribossomos e polissomos livres ou formando grânulos de Nissl (Figs. 8A; 11B), mitocôndrias de diversos tamanhos e formas (Figs. 8A; 11A) e numerosos lisossomos (Fig. 11A).

Quanto ao neuropilo, este exibiu axônios amielínicos entre um pequeno número de axônios mielinizados (Figs. 12E; 13A, E) seccionados transversalmente, ramos dendríticos isolados (Figs. 10A, C e 13A) e vários contatos sinápticos. Também foram observados vasos sangüíneos assim como células gliais e seus processos (não mostrado).

No citoplasma da região inicial dos dendritos ocorriam muitos lisossomos, algumas mitocôndrias, aparelho de Golgi e ribossomos (11A). Ao longo do citoplasma dos dendritos notou-se principalmente microtúbulos, mitocôndrias e retículo endoplasmático liso (Fig. 10A, E). Nos dendritos maiores houve uma predominância de microtúbulos alinhados paralelamente ao eixo dos dendritos (Fig. 10A), estando regularmente distribuídos nas secções transversais (Fig. 9A). Os microtúbulos nos dendritos estavam em arranjos paralelos entre mitocôndrias e o retículo endoplasmático liso. Ainda identificaram-se uma pequena quantidade de ribossomos e um pequeno número de neurofilamentos (Fig. 11A). Quando os dendritos passavam a ter menor diâmetro, as mitocôndrias se apresentavam mais centrais (Fig. 13B).

Os espinhos foram observados em dendritos embora também ocorram no soma neuronal (Fig. 8B). Os espinhos formavam sinapses do tipo assimétricas. De acordo com a classificação de Peters e Kaiserman-Abramof (1970) foram observados três tipos de espinhos: os finos (Figs. 10B, D, E1; 13B, D), com finas hastes delgadas, e que podem ter um pequeno bulbo terminal. O mais comum foi o em forma de cogumelo (Figs. 10E, F; 13C, F), com uma haste curta e um grande bulbo terminal; e, finalmente o achatado (Figs. 10A, C, G; 13E) com uma pequena protusão a partir do ramo dendrítico de base.

No citoplasma dos espinhos encontraram-se retículo endoplasmático liso, filamentos finos de actina e em sua base alguns ribossomos livres, não sendo observados microtúbulos (Fig. 10A) e neurofilamentos. Em alguns espinhos em formato de cogumelo puderam ser detectados polirribossomos em sua base e retículo endoplasmático liso que se estendeu pelo seu interior formando o aparelho do espinho (10F e E). Foram detectadas vesículas lisas entre o aparelho do espinho e a membrana

pré-sináptica (Fig. 13A), além de filamentos de actina que formavam o citoesqueleto do espinho (Fig. 13C; F). A membrana pós-sináptica das sinapses assimétricas mostravam-se eletron-densas contra sua face citoplasmática (como por exemplo, Fig. 9 C, D; E).

No restante do neuropilo da MePV, tanto em machos como em fêmeas, identificaram-se processos neuronais seccionados transversalmente, tangencialmente e longitudinalmente, entre numerosos processos de células gliais e vasos sanguíneos. As porções proximais dos dendritos continham algumas organelas também encontradas no soma neuronal, tais como RER, lisossomos, mitocôndrias e grânulos de Nissl, permitindo distinguir axônios de dendritos (Fig.11A). Os dendritos se desprendem do soma e apresentavam um contorno irregular com protuberâncias, projetando-se de diversas formas de apêndices, como os espinhos em sua superfície. Ademais, os dendritos bifurcavam-se em ângulos agudos e diminuía de calibre à medida que se afastavam do soma neuronal (Fig. 11C). Pelo contrário, os axônios apresentavam um contorno liso, de forma cilíndrica e com um calibre constante, apesar das ramificações. Os dendritos continham RER, ribossomos e microtúbulos, em contraste com os axônios onde predominaram neurofilamentos e não eram observados ribossomos, exceto na sua porção proximal ao soma (Fig. 11A).

Nos dendritos observaram-se sinapses com proeminente densidade pós sináptica, classificadas como sinapse de tipo I (GRAY, 1959). Essas sinapses assimétricas foram as predominantes (Figs. 9A, D, E, F ; 12F), sendo a maioria delas axo-dendríticas. O bulbo terminal dos axônios continha vesículas claras arredondadas e ocasionalmente mitocôndrias na porção mais afastada do contato sináptico, enquanto o axônio terminal que forma sinapses simétricas, classificadas como de tipo II (GRAY,

1959) apresentam vesículas claras achatadas (Fig 9B). As sinapses simétricas foram geralmente encontradas nos espinhos somáticos (Fig. 8C) e axônios. Nesses caso em alguns botões sinápticos identificaram-se vesículas claras arredondadas e algumas de centro denso (Fig. 12G, H, I). Tais vesículas de centro denso sempre se localizavam afastadas da membrana pré-sináptica (Fig. 12G, H) e foram mais visualizadas nas fêmeas em diestro do que nos machos. Também foram observadas algumas sinapses perfuradas (Fig 12 I) tanto em machos como em fêmeas em diestro.

Figura 8. Eletromicrografias da amígdala medial póstero-ventral de ratos machos. **A.** Observar um soma neuronal com núcleo claro (N), com grânulos de heterocromatina dispersos e um grande nucléolo (ncl) excêntrico. No citoplasma notar lisossomos (Lys), complexo de Golgi (G), corpos de Nissl (Nb) e mitocôndrias (m). **B.** No quadro superior da figura A, contem espinho somático (seta) com um contato axônico lateral (s). Notar na base do espinho ribossomos livres (r). **C.** No quadro inferior da figura A observar em maior aumento sinapse axo-somática simétrica, com vesículas claras arredondadas (asterisco duplo) e mitocôndrias (m). **D.** Observar dois somas neuronais ovais com núcleo (N) elíptico e mitocôndrias (m) no citoplasma. **E.** Soma neuronal exibindo núcleo (N) com eucromatina dispersa, nucléolo (ncl) e uma invaginação da membrana nuclear (seta). No citoplasma observar mitocôndria (m), ribossomos (r), retículo endoplasmático rugoso (rer), cisternas de complexo de Golgi (G). Notar axônio com vesículas claras fazendo sinapse com o soma neuronal (asterisco duplo) Barras = 1 μm (A), 300 nm (B e C), 2 μm (D) e 500 nm (E).

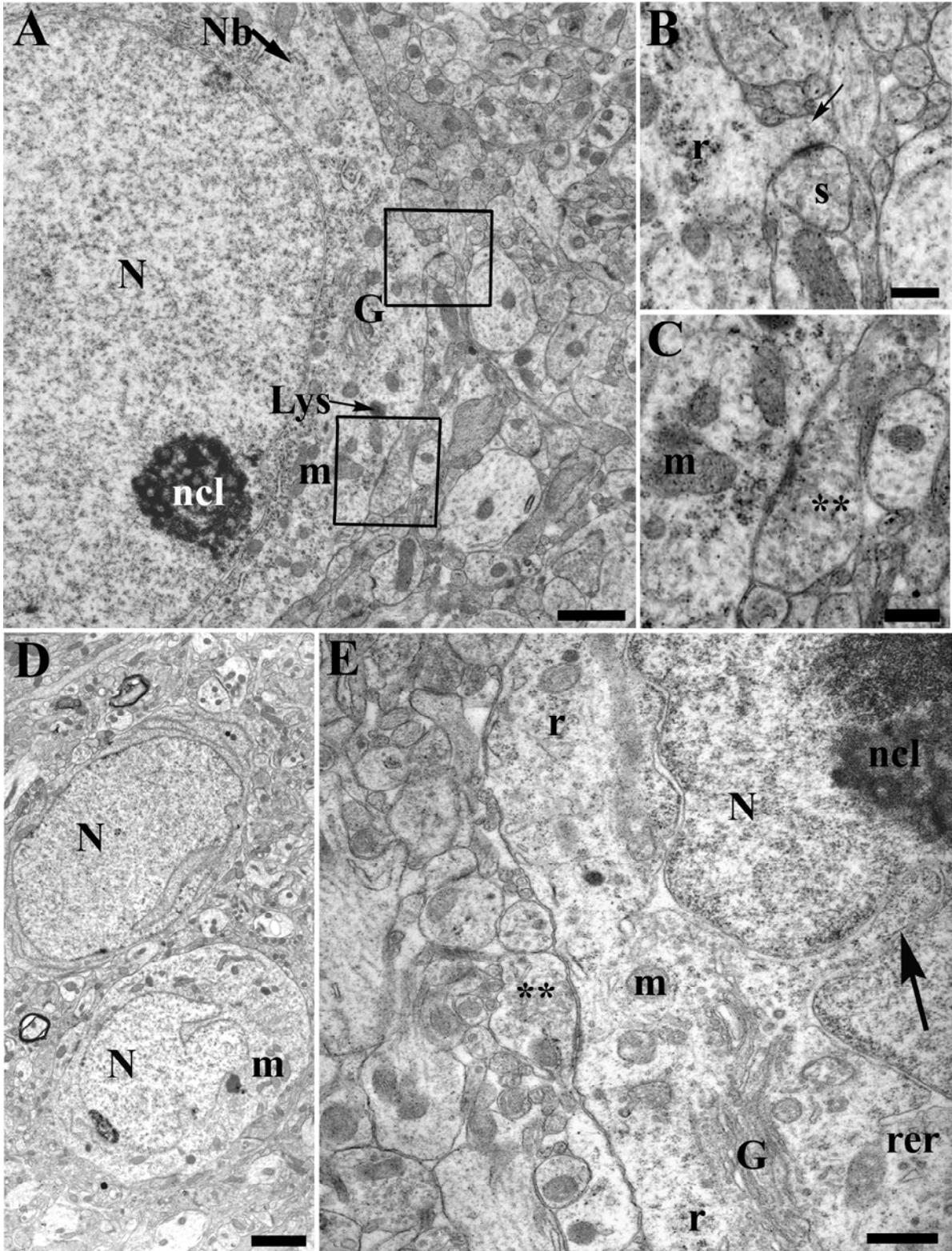


Figura 9. Eletromicrografias da amígdala medial pósterio-ventral de ratos machos mostrando diferentes tipos de sinapses assimétricas. **A.** Notar sinapses assimétricas (seta dupla) com axônios terminais contendo vesículas claras arredondadas (asterisco) e poucas vesículas de centro denso (cabeça de seta), microtúbulos (mt), mitocôndrias (m), dendrito (d). **B.** Observar terminal axonal contendo vesículas claras achatadas (asterisco duplo) e, no dendrito, notar retículo endoplasmático liso (ser). **C, D e E.** Sinapses assimétricas. Notar densidades pré- sinápticas (C e E, seta dupla) e pós- sinápticas (D, seta dupla) assimetricamente distribuídas, vesículas claras arredondadas (asterisco) e aumento do espaço sináptico. **F.** Observar dois terminais axônicos contatando (setas duplas) com um único dendrito. Terminais axônicos com numerosas vesículas claras arredondadas (asterisco) e algumas achatadas (asterisco duplo). Barras = 250 nm (A), 160 nm (B), 200 nm (C, D e F), 100 nm (E).

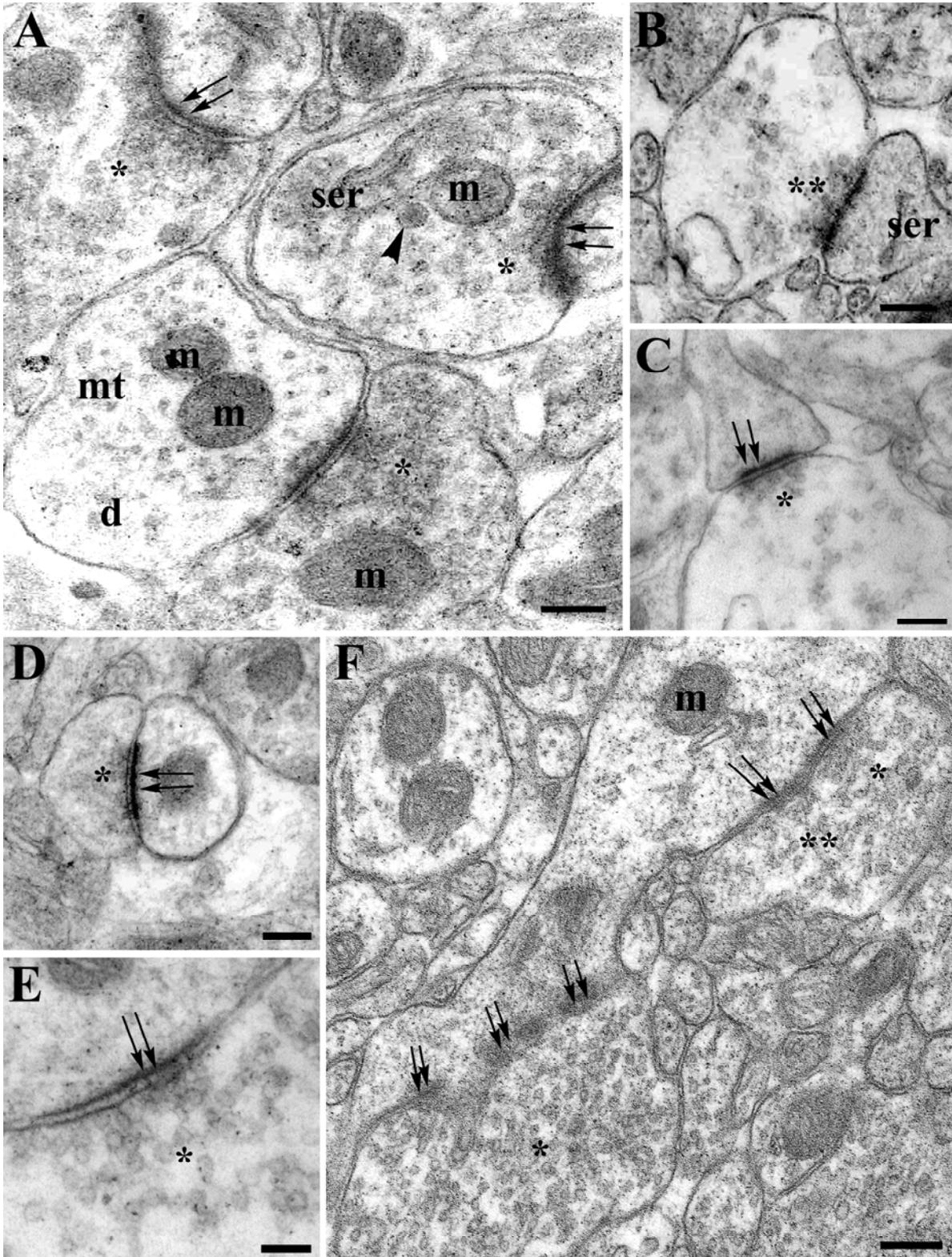


Figura 10. Eletromicrografias da amígdala medial pósterio-ventral de ratos machos mostrando diferentes tipos de espinhos (setas): achatados (A, C e G), finos (B, D, E1), em formato de cogumelo (E2 e F). **A.** Processo dendrítico (d) emitindo um espinho do tipo achatado (seta) com mitocôndrias alongadas (m) e microtúbulos (mt). Um terminal axônico com vesículas claras arredondadas (asterisco) e achatadas (asterisco duplo) está fazendo contato com o espinho achatado assinalado. **B.** Terminal axônico com vesículas claras arredondadas (asterisco) e algumas vesículas de centro denso (cabeça de seta) contatando com espinho somático (seta). **C.** Sinapse axodendrítica assimétrica com vesículas claras arredondadas (asterisco) e dendrito (d). **D.** Três botões sinápticos (1, 2 e 3) contatando com espinho contendo vesículas claras arredondadas (asterisco) e dendrito (d), densidade pós-sináptica (cabeça de seta) aparelho do espinho (cabeça de seta dupla). **E.** Dendrito de onde se desprende um espinho fino (seta 1) e na parte inferior, um espinho com formato de cogumelo (seta 2), neste último observar o aparelho do espinho (sa). A região pré-sináptica contém vesículas claras arredondadas (asterisco) e de centro denso (cabeça de seta). **F.** Sinapse axo-espinhosa. Região pré-sináptica com vesículas claras arredondadas (asterisco) fazendo contato com espinho dendrítico com formato de cogumelo. Neste há cisternas de retículo endoplasmático liso (ser) formando o aparelho do espinho, densidade pós-sináptica (cabeça de seta dupla). **G.** Dendrito com espinho de tipo achatado (seta), dendrito (d). Retículo endoplasmático rugoso (rer), núcleo (N), mitocôndria (m) Barras = 500 nm (A, B e G), 200 nm (C, F e E) e 250 nm (D).

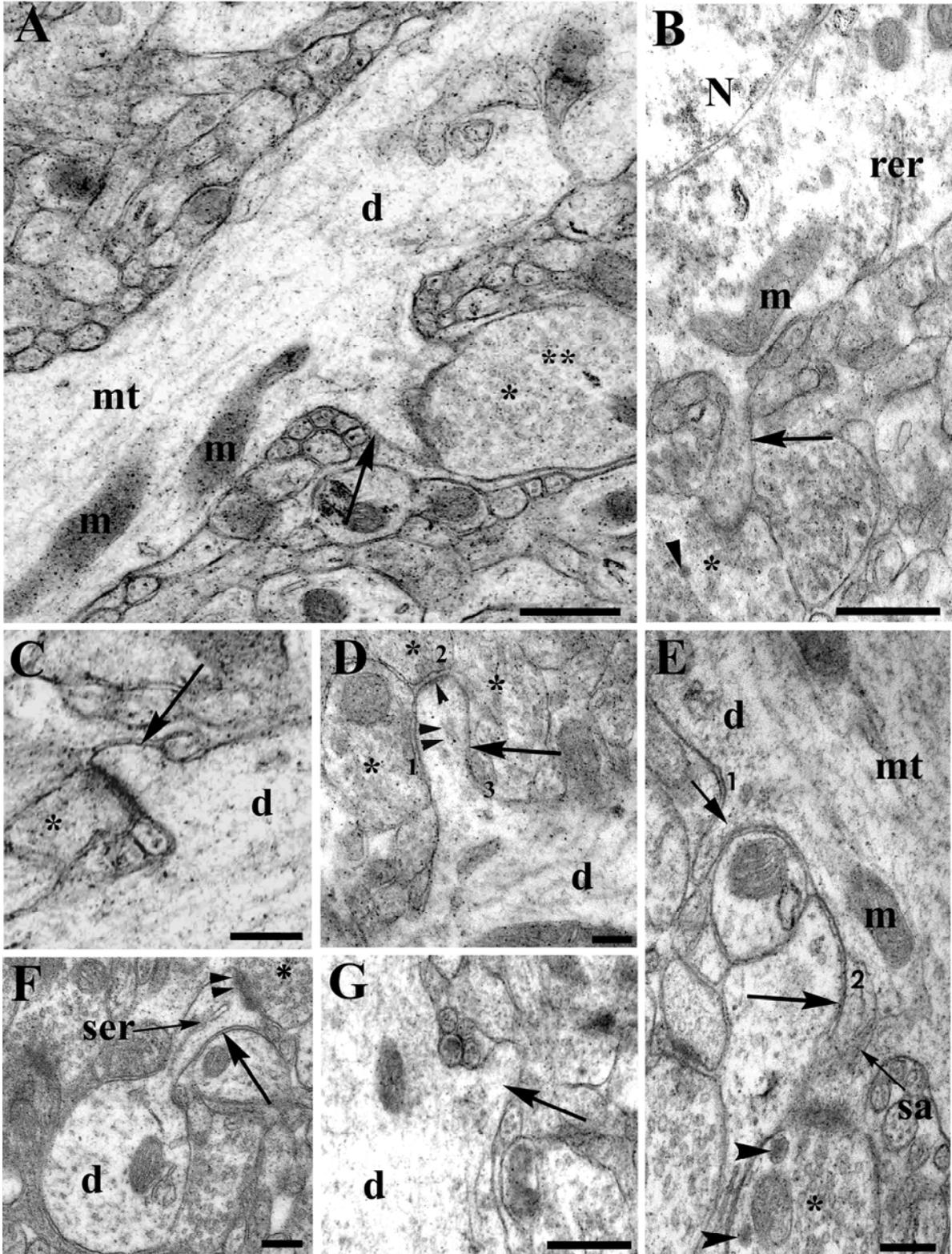


Figura 11. Eletromicrografias da amígdala medial póstero-ventral de ratas em diestro. **A.** Notar núcleo neuronal eucromático (N) no neuropilo uma fibra mielinizada (x). No citoplasma, observar lisossomos (Lys), mitocôndrias (m), complexo do Golgi (G) e ribossomos livres (r). A porção proximal do dendrito mostra microtúbulos (mt), neurofilamentos (nf), retículo endoplasmático liso (ser) e lisossomos (Lys). **B.** Detalhe de um neurônio com identificação nuclear (seta), o pericário tem algumas cisternas de retículo endoplasmático rugoso (rer), e grânulos de Nissl (Nb). Notar no neuropilo uma fibra mielinizada (x). **C.** Neurônio estrelado mostrando núcleo eucromatínico esférico (N) e com nucléolo periférico (ncl) observar dois processos dendríticos (d), grânulos de Nissl (Nb). Barras 1 μm (A e C), 400 nm (B).

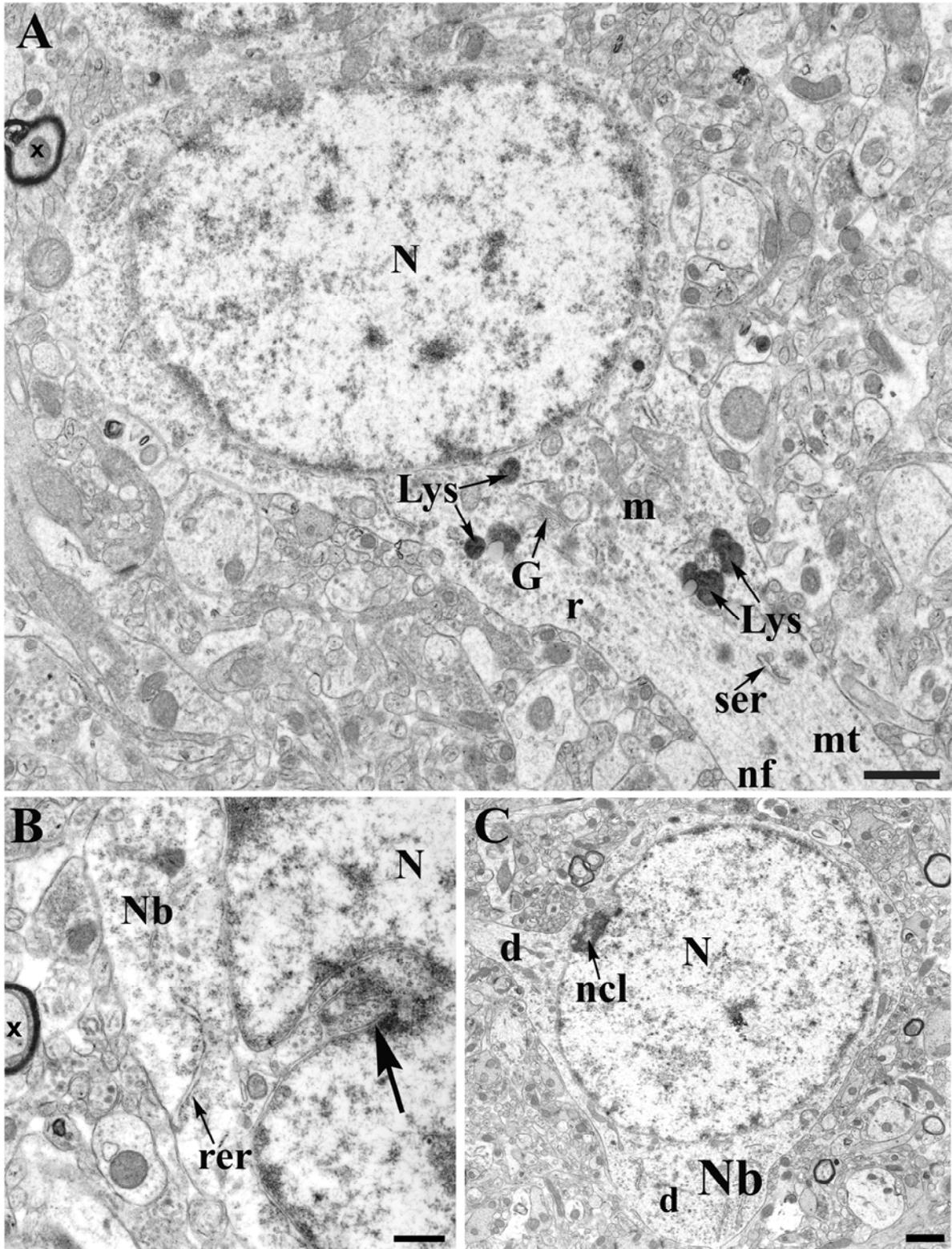


Figura 12. Eletromicrografias da amígdala medial pósterio-ventral de ratas em diestro mostrando diferentes tipos de sinapses. **A.** Sinapse axo-dendrítica, notar vesículas claras arredondadas (asterisco) no terminal axonal contatando com o dendrito (d). **B.** Dois terminais axônicos (1, 2) contatando com o mesmo processo dendrítico (d), notar vesículas sinápticas claras arredondadas (asterisco). **C.** Terminal axônico contendo numerosas vesículas claras arredondadas (asterisco) contatando com um dendrito (d). **D.** Sinapse axo-dendrítica. Observar numerosas vesículas claras arredondadas (asterisco). **E.** Sinapse axo-dendrítica. Notar na região pré-sináptica vesículas claras arredondadas (asterisco), espaço sináptico aumentado e na região pós-sináptica retículo endoplasmático liso (ser). Fibra mielínica (x). **F.** Sinapse assimétrica com vesículas claras arredondadas (asterisco) e uma mitocôndria alongada (m) na região pré-sináptica. **G.** Dois terminais axônicos com vesículas claras arredondadas (asteriscos) e uma delas com algumas vesículas de centro denso (seta) contatando com um processo dendrítico (d) com microtúbulo (mt). **H.** Sinapse assimétrica com axônio com vesículas claras arredondadas (asterisco) e algumas vesículas de centro denso (seta). **I.** Notar sinapse assimétrica perfurada (seta dupla) e em outra sinapse axo-dendrítica notar vesículas claras (asterisco) e de centro denso (seta), mitocôndria (m). Barras 200 nm (A, D, F, G e H); 300 nm (B e C), 320 nm (E) e 160 nm (I).

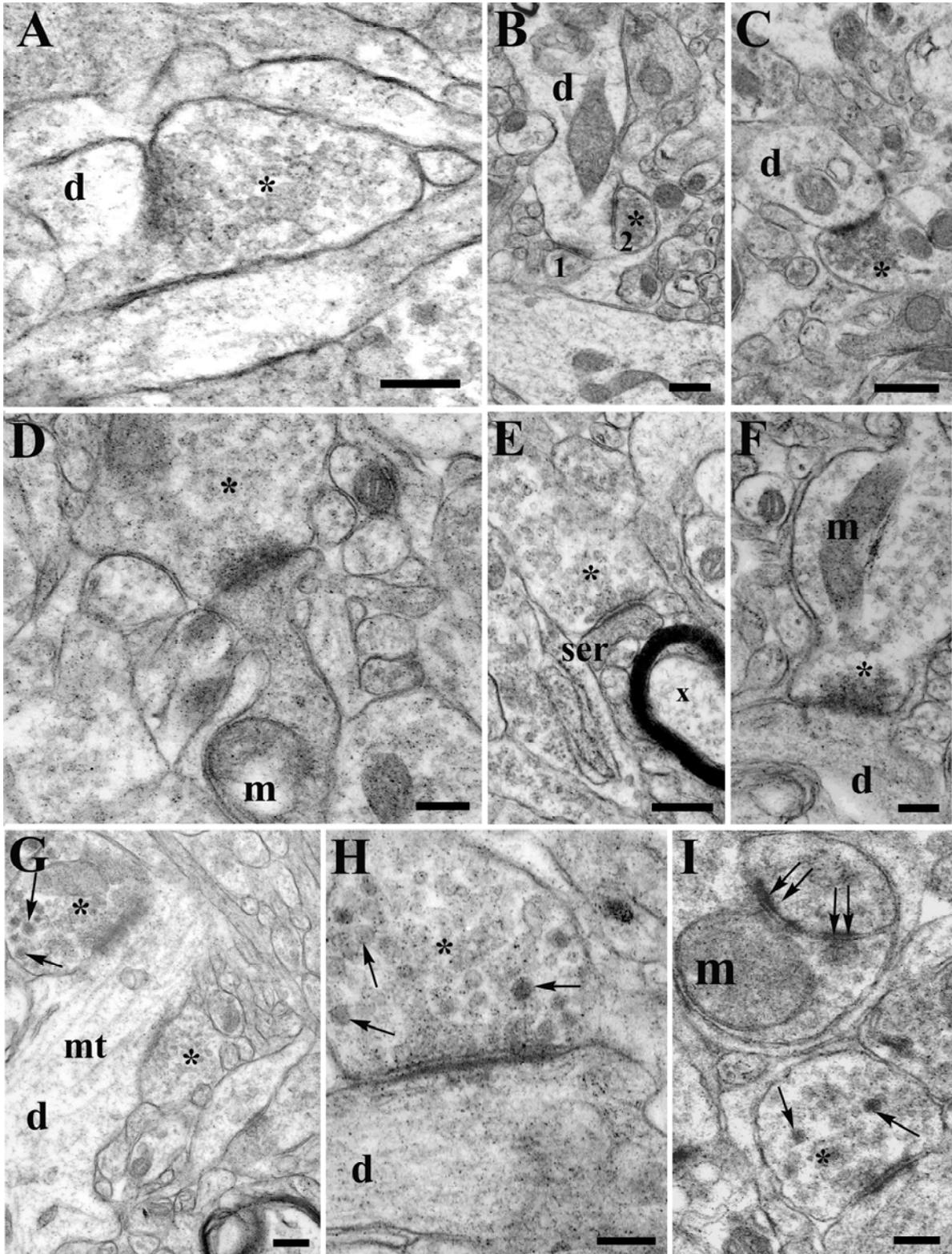
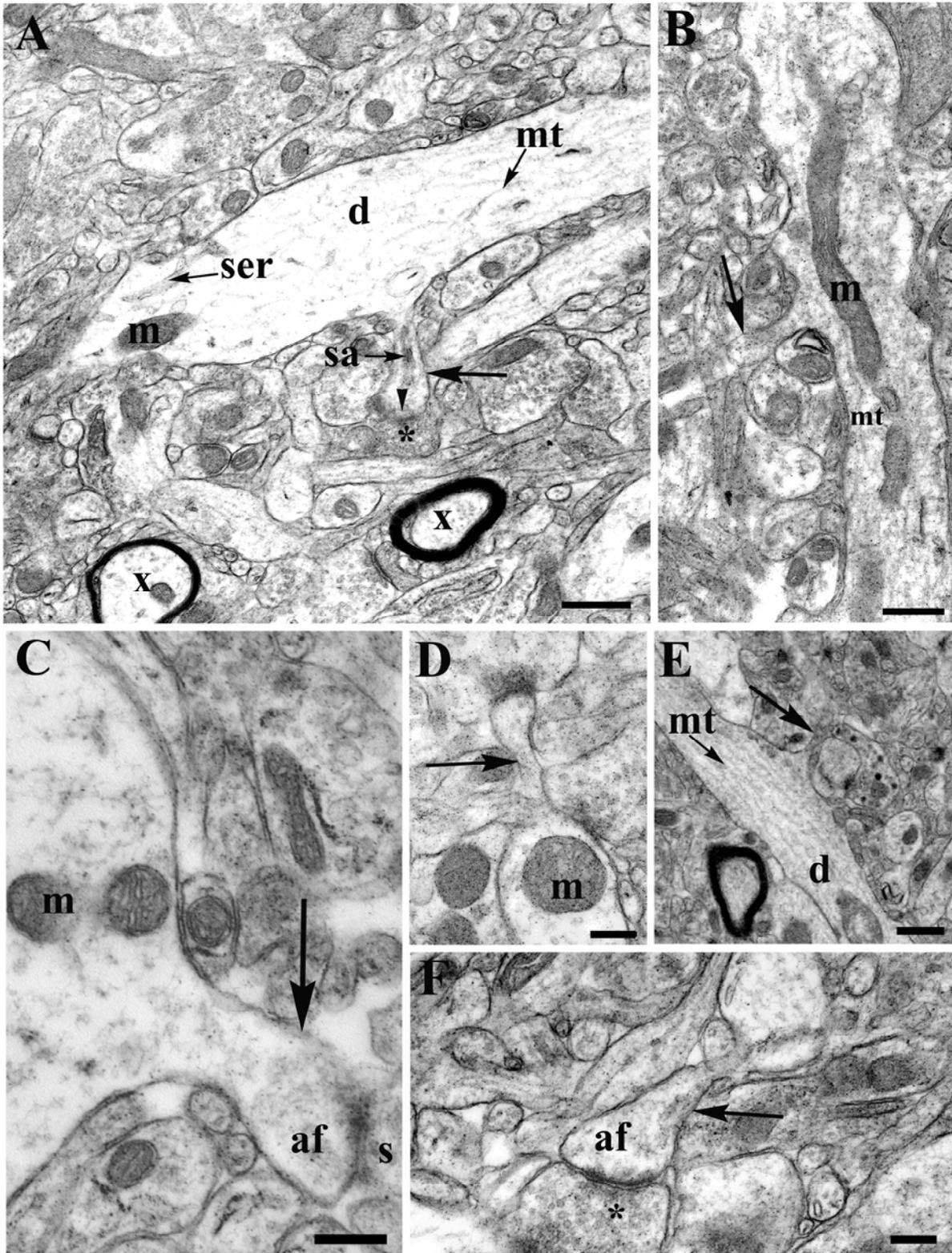


Figura 13. Eletromicrografias da amígdala medial póstero-ventral de ratas em diestro mostrando diferentes tipos de espinhos (seta): formato de cogumelo (A, C e F), finos (B e D) e achatado (E). **A.** Processo dendrítico (d) com mitocôndria (m), microtúbulos (mt), retículo endoplasmático liso (ser), onde se observa um espinho formato de cogumelo (seta) com aparelho do espinho (sa), entre este e a densidade pós-sináptica observar vesículas lisas (cabeça de seta). A porção distal do espinho recebe um terminal axônico com vesículas claras arredondadas (asterisco). Axônios claros mielinizados (x) também estão na proximidade do dendrito mostrado. **B.** Processo dendrítico com mitocôndrias alongadas (m) mais centrais, microtúbulos (mt) e um espinho fino (seta). **C.** Processo dendrítico cortado transversalmente de onde emerge um espinho com formato de cogumelo (seta) com filamentos de actina (af) próximo à área sináptica com marcada densidade pós-sináptica, mitocôndrias (m), sinapse (s). **D.** Notar espinho do tipo fino (seta) emergindo do dendrito cortado transversalmente, mitocôndria (m). **E.** Processo dendrítico com numerosos microtúbulos (mt), observar um espinho achatado (seta). **F.** Espinho do tipo formato de cogumelo (seta), com filamentos de actina (af), ampla fenda sináptica e na região pré-sináptica vesículas claras arredondadas (asterisco). Barras = 500 nm (A), 200 nm (C, D e F), 400 nm (B) e 600 nm (E).



5. DISCUSSÃO

A MeA faz parte da circuitaria neuronal envolvida com os comportamentos reprodutivos e mostra algumas características sexualmente dimórficas incluindo diferença de volume nuclear, na morfologia de seus componentes, na conectividade sináptica e na quantidade de neurotransmissores e neuropeptídeos (MADEIRA; LEAL; PAULA-BARBOSA, 1999; WILSON; MASCAGNI; McDONALD, 2002). Os subnúcleos na MeA contêm altas concentrações de receptores para estradiol, progesterona e testosterona. O que muito bem pode significar que neurônios responsivos a esteróides sexuais geram a base das diferenças entre machos e fêmeas encontrados localmente.

Durante o ciclo estral os hormônios sexuais apresentam variações em circulação sanguínea onde, no diestro o nível de estrogênio começa a aumentar e a progesterona está baixa; na próxima fase, no proestro, estes hormônios circulantes alcançarão seu pico máximo e no estro, os níveis de estrogênio e progesterona declinam. Durante o metaestro são observados valores intermediários entre estro e diestro (RASIA-FILHO *et al.*, 2004).

No experimento 1 analisou-se o volume somático neuronal da MePV, comparando-se machos e fêmeas em diestro, proestro e estro. Este procedimento mostrou uma diferença significativa relacionada ao sexo, sendo maior em machos do que em fêmeas no proestro e estro. Estes dados concordam com estudo prévio do volume do soma neuronal da MePD, utilizando o mesmo procedimento deste trabalho, onde a diferença significativa foi observada entre machos e fêmeas em proestro e estro (HERMEL *et al.*, 2006b). Por outro lado, em nosso estudo,

também observamos que não houve diferença significativa entre machos e fêmeas em diestro, assim como ocorreu na MePD (HERMEL *et al.*, 2006b). É interessante que esses dados são similares ao estudo da área somática de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, da MePV e da MePD estudadas conjuntamente, onde a MeA posterior não apresentou diferença significativa entre machos e fêmeas em diestro (RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999). Por outro lado convém salientar que os neurônios da MePD e a MePV diferem na expressão de receptores dos hormônios esteróides, maiores na primeira região do que na outra (SIMERLY *et al.*, 1990; ÖSTERLUND *et al.*, 1998). De fato, embora a testosterona pareça ter um efeito neurotrófico na expressão de substância P em ratos machos na MePD e na MePV (MALSBURY; MCKAY, 1994), esses dois subnúcleos da MeA não compartilham a mesma organização funcional e hodológica (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001). Isto pode significar que, apesar da menor quantidade de receptores para esteróides sexuais na MePV, o dimorfismo sexual identificado na MePD ocorre ainda assim. Ainda que as implicações fisiológica disto possam ser diferentes, pois estes dois subnúcleos posteriores tem conexões sinápticas distintas.

Em outras estruturas encefálicas, o volume somático do núcleo pré-óptico medial (MADEIRA *et al.*, 1999) e o volume do soma das células piramidais das regiões CA1 e CA3 do hipocampo (ISGOR; SENGELAUBT, 1998) são maiores em machos do que nas fêmeas, embora não tenham sido correlacionadas com as fases do ciclo estral. Fêmeas ovariectomizadas tratadas com estrogênio

e progesterona têm o volume de neurônios da área pré-óptica medial aumentados em comparação com fêmeas adultas em diestro ou ovariectomizadas sem terapia hormonal substitutiva (KEISER-MARCUS *et al.*, 2001). Machos e fêmeas em proestro têm a área somática de neurônios do núcleo ventro-medial hipotalâmico semelhantes entre si, embora maiores em comparação com fêmeas em metaestro (MADEIRA *et al.*, 2001). Existem evidências que mostram claras conexões sinápticas diretas ou indiretas, entre a MePV e essas áreas descritas acima (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995), o que permite supor que essas estruturas entrariam em um circuito neural sensível à ação dos esteróides sexuais, e onde tais hormônios poderiam afetar de forma semelhante componentes do soma neuronal.

Os androgênios parecem também estar envolvidos na regulação da expressão de algumas proteínas estruturais tais como a actina e a tubulina (MATSUMOTO, 1997). A testosterona parece favorecer a polimerização e a organização dos microtúbulos ao mesmo tempo em que diminui a despolimerização destes. O estradiol tem efeito oposto (KIPP; RAMIREZ, 2003), isto poderia explicar o aumento do volume somático neuronal na MePV dos machos, envolvendo a reorganização dos microtúbulos induzida pela testosterona normalmente presente na circulação. Além disso, o estrogênio ou a progesterona estariam inibindo este processo durante o proestro das fêmeas e subseqüentemente no estro. Este tipo de efeito também foi encontrado nas densidades dos espinhos na MePV, isto é, as fêmeas tem mais espinhos no diestro e o número destes sítios diminui no proestro, permanecendo baixo no estro

e no metaestro (RASIA-FILHO *et al.*, 2004). Esta modificação cíclica e relativamente rápida (na ordem de horas para dia) implica numa plasticidade estrutural de neurônios da MePV de fêmeas vinculada ao nível de estradiol e progesterona em circulação e na duração de efeitos gênicos iniciados pelos esteróides.

Na MePV a morfologia completa do soma neuronal em cada célula selecionada foi estudada com secções seriadas para obtenção de estimativa tridimensional. Embora os neurônios da MePV tenham forma do corpo celular variada e estão em diferentes orientações neste subnúcleo, esta variação não afeta o resultado deste estudo, dada a metodologia empregada. Ademais, não foi encontrada diferença entre os hemisférios nos grupos examinados no parâmetro estimado, ou seja, em nossos dados não foram encontradas evidências que mostrem que o volume celular seja lateralizado na MePV. Tampouco foram encontradas modificações do volume neuronal em relação à lateralidade na MePD de ratos (HERMEL, *et al.*, 2006b). No entanto, outros autores como Cooke e cols (2003) mostraram que o tamanho neuronal (bidimensional), é lateralizado na MePD de ratos adultos, com neurônios maiores no hemisfério esquerdo do que no direito. Embora tal efeito de lateralidade não foi encontrado em ratos prepubertais (COOKE; WOOLLEY, 2005). Isto sugere que a diferença entre nosso dados e de Cooke e cols (2003) possa ser devido a diferença de espécies de ratos, entre metodologias distintas ou discretas diferenças regionais dentro da MePD possam ser responsáveis pelos achados diferentes relatados.

Nesta tese o volume somático neuronal é um parâmetro sexualmente dimórfico na MePV, que não está ainda descrito na literatura, para o que é relevante observar as diferentes fases do ciclo estral a fim de se detectar a ação dos hormônios gonadais na plasticidade estrutural desta estrutura nervosa. Há necessidade, a partir de agora de investigar a densidade dos receptores específicos para estrógenos e progesterona na MePV nas diferentes fases do ciclo estral a fim de elucidar essas interações. Assim como identificar os transmissores químicos e suas possíveis variações neste subnúcleo durante o ciclo estral. E são candidatos para isso a síntese e expressão de colecistoquinina, vasopressina, substância P e opióides, todos sexualmente dimórficos e presentes em alguns dos subnúcleos da MeA (De VRIES; MILLER, 1998; MALSBUY; McKAY, 1994).

No experimento 2 analisou-se a ultra-estrutura dos neurônios da MePV bem como a distribuição dos contatos sinápticos nos seus diferentes componentes neuronais em ratos adultos machos e em fêmeas em diestro.

As características citoplasmáticas e nucleares dos neurônios da MePV de machos e de fêmeas se assemelham a outras áreas do encéfalo de ratos (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991) e são muito similares aos encontrados nos neurônios da MePD em ratos adultos machos (HERMEL *et al.*, 2006a; HERMEL, 2005). Na MePV foram identificados diferentes tipos de botões sinápticos com numerosas vesículas sinápticas claras e arredondadas que, por vezes, continham também vesículas com centro denso, chamadas ao conjunto de vesículas pleiomórficas (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991). Outros botões sinápticos mostravam tanto vesículas claras e achatadas como arredondadas. Os dois

primeiros tipos de botões sinápticos contatavam com ramos dendríticos e espinhos, o terceiro tipo com somas neuronais. Isto é semelhante ao encontrado nos neurônios do MePD (HERMEL, *et al.*, 2006a). Ocorreram tais características na MePV em ambos os sexos. Adicionalmente, parece haver um maior número de vesículas sinápticas de centro denso em fêmeas em diestro, porém isto necessita ser avaliado quantitativamente (HERMEL, *et al.*, 2006a). Ainda que a dinâmica funcional dos circuitos neurais no qual a MePV está inserida não está completamente elucidada, mas relações entre a morfologia e a fisiologia podem representar uma forma de explicar a dinâmica destes processos.

As vesículas claras arredondadas têm sido descritas como contendo neurotransmissores do tipo excitatórios. Nos terminais axônios que fazem contatos sinápticos do tipo assimétricos nos ramos dendríticos e espinhos parecem conter neurotransmissores excitatórios como o glutamato (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991). Por outro lado, a MeA parece formar parte do circuito córtico-estriadopalidal envolvido no sistema motor e recebe aferências glutamatérgicas do córtex olfativo acessório, do córtex olfativo principal, da área pré-frontal e insular agranular (DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001). Outra fonte de vesículas claras arredondadas poderiam corresponder à presença de acetilcolina e, provavelmente tais aferências colinérgicas, procederiam da *substantia innominata* (CANTERAS *et al.*, 1992).

Vesículas claras achatadas também foram encontradas nos contatos sinápticos simétricos da MePV. De acordo com Peters, Palay, Webster (1991), os axônios podem conter GABA. A MeA é um importante alvo de fibras GABAérgicas advindas da própria amígdala. A MeA parece ser alvo de fibras GABAérgicas, que

se originam, pelo menos em parte, de neurônios do núcleo dorsal basal da amígdala (NITECKA; FROTSCHER, 1989) e do núcleo amigdalóide intercalado (MEREDITH; WESTBERRY, 2004). Isto sugere que axônios terminais formando sinapses simétricas na MePV podem ter uma ação inibitória no soma neuronal. Estudos mostraram ocorrer imunorreatividade GABAérgica na MeA de gatos (PARÉ; SMITH, 1993), gerbilos (SIMONS; YAHR, 2003) e ratos (NITECKA; BEN-ARI, 1987; STENOVA, 1998; STENOVA; OVTCHAROFF, 2000). Em estudo imunoistoquímico microscopia óptica e com análise ultra-estrutural em gatos mostrou que, embora a MeA possua escassos neurônios imunorreativos, está ricamente inervada, por fibras GABAérgicas. Essas fibras contactariam com somas neuronais e dendritos primários (PARÉ; SMITH, 1993). Também foram encontrados na MeA de camundongos numerosos neurônios GABAérgicos e um neuropilo com imunorreatividade difusa. A análise por microscopia confocal mostrou coexistência em neurônios de terminais GABA e neuropeptídeo Y. Mais detalhadamente axônios contendo neuropeptídeo Y faziam sinapse com neurônios GABAérgicos (OBERTO; PANZICA; ALTRUDA, 2001). Isto pode sugerir que alguns destes axônios terminais formam sinapses assimétricas na MePV dos ratos, tendo uma atividade inibitória nos ramos dendríticos e soma neuronal. Isto nos permite afirmar que os contatos simétricos detectados em somas e dendritos primários no MePV corresponderiam a fibras possivelmente GABAérgicas.

A presença de vesículas de centro denso na MePV poderia estar relacionada a existência de neuropeptídeos tais como: o peptídeo natriurético atrial, a colecistoquinina, o neuropeptídeo Y, a somatostatina, a angiotensina II e a substância P (de OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004; BREIGERON *et al.*,

2002, EBNER *et al.*, 2004). A ação fisiológica desses neuropeptídeos na MePV ainda não está nada clara. Sabe-se que a angiotensina II administrada na MeA inibe o comportamento sexual de ratos machos (BREIGERON *et al.*, 2002) e o estresse induz a liberação de substância P na MeA (EBNER *et al.*, 2004), mas o quanto esses efeitos localizam-se especificamente na MePV ainda não foi estudado. Ao se estudar a relação dos contatos sinápticos com estruturas pós-sinápticas o procedimento de Golgi permitiu determinar que os espinhos da MePV têm diferentes morfologias (RASIA-FILHO *et al.*, 1999; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 2004) assim como ocorre no córtex cerebral de ratos (PETERS; KEISERMAN-ABRAMOF, 1970) e em diversas regiões do hipocampo (SORRA; HARRIS, 2000). Em nosso estudo observaram-se três tipos de espinhos, o fino, o achatado e o com formato de cogumelo. O conteúdo dos espinhos é variável, encontrando-se polirribossomos, relacionados à síntese protéica do espinho; REL, que está envolvido na regulação do cálcio intracelular inerente ao processo sináptico; e, filamentos de actina. Na MePV alguns espinhos contêm cisternas amplas de REL que constituem o aparelho do espinho (GRAY 1959, SPACEK; HARRIS, 1997; SABATINI; MARAVALL; SVOBODA, 2001; REID, 2002). Estudos ultra-estruturais mostraram uma densidade sináptica proporcional ao seu volume do espinho. A densidade pós-sináptica é constituída de uma placa densa que pode apresentar uma ou mais perfurações (PETERS; KAISERMAN-ABRAMOF, 1969) e esta densidade pode se modificar de acordo com o nível da atividade sináptica (HARRIS; STEVENS, 1989). Como foi encontrado nos diferentes subnúcleos da MeA (RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 2004), aparentemente os espinhos menores, com cabeça

pouco proeminente como ocorre nos classificados como finos, são considerados morfológicamente instáveis e têm pouca contribuição nas conexões sinápticas mais estáveis (HERING; SHENG, 2001). Ao contrário, os espinhos que têm cabeças maiores, como os classificados como achatados e com formato de cogumelo são mais estáveis, expressam grande número de receptores para glutamato de tipo AMPA e cooperam nas conexões sinápticas de longa duração (KASAI et al., 2003). Pequenos espinhos mudam sua forma rapidamente e novos espinhos são formados ou eliminados de acordo com a atividade neuronal. Espinhos grandes são mais estáveis e podem persistem até meses ou anos (KASAI *et al.*, 2003). Os espinhos chamam a atenção por refletirem a plasticidade sináptica. O tamanho do espinho está relacionado com o tamanho da sinapse excitatória; a superfície, o volume e o número de vesículas pré-sinápticas estão relacionados com a área sináptica; o comprimento do espinho e o diâmetro do pescoço, são independentes do tamanho da sinapse (HARRIS; SULTAN, 1995). Os espinhos podem modificar suas estruturas em poucos minutos a horas, alterando o comprimento do pescoço, embora o significado funcional destas mudanças ainda permaneça obscuro (KORKOTIAN; SEGAL, 2000). Os espinhos dendríticos geralmente recebem uma sinapse excitatória na cabeça, mas alguns podem receber uma segunda sinapse também em seu pescoço (SPACEK; HARTMANN, 1983). Isto também foi identificado por nós na MePV de machos.

Os espinhos têm diferentes funções como de conectividade, compartimentalizam o cálcio e outros componentes sinalizadores como inositol trifosfato (IP₃) e sódio (HARRIS; KATER 1994, ROSE *et al.*, 1999). Recentemente, foi descrito que o REL dos espinhos também tem um papel na secreção de

lipídios/proteínas na superfície do espinho. O retículo organizado no aparelho do espinho encontra-se predominantemente em espinhos dendríticos maduros. Em sua porção mais distal, observam-se vesículas de diâmetro pequeno claras, que se desprenderiam do REL, e contribuiriam para o crescimento do espinho ou para um possível trânsito de proteínas sinápticas, tais como receptores NMDA e AMPA já presentes no aparelho do espinho (KENNEDY; EHLERS, 2006).

No hipocampo, a estimulação sináptica causa a liberação de glutamato na fenda sináptica, provocando ativação dos receptores pós-sinápticos NMDA que são também dependente de voltagem, localizados nos espinhos dendríticos, e isto pode ativar o influxo de cálcio neste território (KOVALCHUK *et al*, 2000). O cálcio entra por canais ativados mediante ligantes ou sensíveis à voltagem (ROSE, *et al.*, 2000). Desta forma, observar os espinhos em diferentes condições pode ajudar a entender a importância dessas funções celulares. Tanto em machos como em fêmeas em diestro, foram identificados todos os tipos de espinhos na MePV e não foi detectada a predominância de algum tipo. Não obstante, esta afirmação requer que seja realizado um estudo quantitativo. Um estudo ultra-estrutural posterior permitirá verificar se ocorre variações na morfologia dos espinhos durante o ciclo estral para correlacionar com modificações numéricas já identificadas com o procedimento de Golgi (RASIA-FILHO *et al.*, 2004), e se isso pode decorrer de variações na forma no conteúdo dos mesmo como, por exemplo, no REL, poliribossomos, filamentos de actina.

Nos espinhos dendríticos da MePV, sobretudo no formato de cogumelo, foram observados numerosos filamentos de actina. O citoesqueleto de actina

presente nos espinhos dendríticos têm uma natureza dinâmica, mudando de forma continuamente, espontaneamente ou em resposta a estímulos como da atividade sináptica (FISHER *et al.*, 1998; MATUS, 2000). Dentro dos espinhos dendríticos a actina parece estar concentrada perto da densidade pós-sináptica. A rápida regulação do arranjo e desarranjo do citoesqueleto de actina é importante para a formação, manutenção e morfologia dos espinhos. Esta actina está relacionada com a espinofilina, que é uma proteína fosfatase 1 que se liga a actina, envolvida na transmissão sináptica excitatória (HSIEH-WILSON, *et al.*, 2003). A espinofilina possui características de andaime, unindo diretamente membranas ao citoesqueleto e pode formar o eixo de um complexo macromolecular coordenando e integrando a um complexo de sinais extra- e intracelulares com filamentos de actina. Assim a espinofilina é um bom candidato para servir de ligação entre a transmissão sináptica excitatória e a alteração de morfologia e na densidade dos espinhos.

Ainda que não tenha sido realizado um estudo quantitativo ultra-estrutural dos diferentes tipos de sinapses, sabe-se que em outras áreas nervosas, como no córtex cerebral, 84% das sinapses são assimétricas e destas, 79% são em espinhos dendríticos, 21% em ramos dendríticos e somente 0,1% no soma neuronal. As sinapses simétricas ocorrem em 16% e, destas, 31% são em espinhos dendríticos, 62% em ramos dendríticos e 7% no soma neuronal. Estas sinapses simétricas são mais comuns na base dos ramos dendríticos e no soma neuronal. Ademais à medida que a distância do soma neuronal aumentava nos neurônios estudados a proporção de sinapses assimétricas aumentam igualmente

(PETERS, PALAY, WEBSTER, 1991). O mesmo observou-se na MePV de machos em neurônios estudados (RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999; RASIA-FILHO *et al.*, 2004). Para finalidade comparativa futura na MePD 67,5% das sinapses foram em ramos dendríticos, sendo 92,1% excitatórias e 7,9% inibitórias; 23,1% foram em espinhos dendríticos, sendo 100% excitatórias; 8,2% foram no soma neuronal, com 65% delas excitatórias e 35% inibitórias e apenas 1,2% foram em axônios mas 100% excitatórias (HERMEL *et al.*, 2006a).

A obtenção desses dados nos permitirá obter achados relevantes que contribuam para definir a organização celular da MePV, resultados esses, que combinados com outros dados morfológicos esclarecerão a atividade funcional desta área em ratos.

6. CONCLUSÕES

1. O volume somático neuronal é um parâmetro sexualmente dimórfico na MePV, sendo maior em machos do que em fêmeas em proestro e estro, mas não em fêmeas em diestro. Além disso, o volume somático neuronal apresenta uma tendência de diminuição, embora não alcance significância estatística ao longo do ciclo estral. Para evidenciar os efeitos dos hormônios gonadais nos neurônios da MePV é fundamental e de extrema relevância considerar as fases do ciclo estral das ratas;
2. Apesar de outros autores acharem lateralidade na MePD, o volume somático neuronal na MePV não mostrou diferença entre os hemisférios cerebrais nos grupos experimentais estudados, nem interação entre estes grupos.
3. Características morfológicas nucleares e citoplasmáticas dos neurônios da MePV de ratos machos e fêmeas em diestro não diferem entre si e são semelhantes àquelas de outras áreas encefálicas já descritos na literatura;
4. Sinapses simétricas (tipo II), aparentemente inibitórias, ocorrem somente sobre ramos dendríticos proximais e somas neuronais; sugerindo uma importante modulação GABAérgica na atividade funcional da MePV em ratos adultos;
5. Espinhos dendríticos na MePV apresentam somente sinapses assimétricas (tipo I), aparentemente excitatórias, e podem ter mais de um contato sináptico sobre si ao mesmo tempo. As vesículas claras e arredondadas destas sinapses parecem conter neurotransmissores excitatórios tais como o glutamato e acetilcolina;
6. Apesar de diversos trabalhos demonstrarem a presença de peptídeos em somas e fibras neuronais da MePV do rato, o presente estudo mostrou que as vesículas com centro denso foram ocasionalmente observadas na MePV do rato e sempre em terminais sinápticos contendo numerosas vesículas claras arredondadas. Além disso, aparentemente as fêmeas apresentaram uma maior quantidade de vesículas de centro denso, o que precisa ser confirmado com dados quantitativos em experimentos futuros.

7. PERSPECTIVAS

1. Estudar as distribuições de cada tipo de sinapse e de suas vesículas sinápticas na MePV de ratos machos e fêmeas em diestro utilizando uma análise semi-quantitativa das vesículas sinápticas em eletromicrografias com aumentada magnificação, da mesma forma que Hermel e cols, 2006a;
2. Descrever a ultra-estrutura da MePV de fêmeas nas outras fases do ciclo estral e analisar os contatos sinápticos sobre ramos dendríticos, somas neuronais e axônios comparando-os com os presentes resultados com machos e fêmeas em diestro;
3. Com a técnica de imunistoquímica associada à microscopia óptica e eletrônica, detectar quais neurotransmissores estão presentes nas aferências sinápticas nos neurônios da MePV;
4. Investigar um possível efeito da manipulação dos hormônios gonadais sobre o volume somático neuronal da MePV de ratas fêmeas gonadectomizadas e submetidas à terapia hormonal substitutiva com estradiol, progesterona ou estradiol e progesterona, para identificar quais esteróides ovarianos apresentam ação na ultra-estrutura da MePV.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGLETON, J.P.; SAUDERS, R.C. The amygdala - What's happened in the last decade. In: AGGLETON, J. P. (ed) *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss., p. 1-30, 2000.
- ALHEID, G.F. Extend amygdala and basal forebrain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 985 p.185-205, 2003.
- ALHEID, G.F.; de OLMOS, J.S.; BELTRAMINO, C.A. Amygdala and extended amygdala. In: Paxinos, G., ed. *The Rat Nervous System*. San Diego: Academic Press, p.495-578, 1995.
- AMARAL D.G., The primate amygdala and the neurobiology of social behavior: implications for understanding anxiety. *Biological Psychiatry*, v. 51, n.1, p.11-7, 2002.
- AMARAL, D.G.; CORBETT, B.A. The amygdala, autism and anxiety. *Novartis Foundation Symposium*, v.251, p.177-187; 2003.
- ANDERSEN, S.L.; TEICHER, M.H. Serotonin laterality in amygdala predicts performance in the elevated plus maze in rats. *NeuroReport*, v.10, n.17, p.3497-3500, 1999.
- ARGIOLAS, A.; MELLS, M.R. The neurophysiology of the sexual cycle. *Journal of Endocrinological Investigation*, v.26, n.3, p.20-22, 2003.
- BAAS, D.; ALEMAN, A.; KAHN, R.S. Lateralization of amygdala activation: a systematic review of functional neuroimaging studies. *Brain Research Reviews*. v. 45, n.2, p.96-103, 2004.
- BAKER, K.B., KIM, J.J. Amygdalar lateralization in fear conditioning: evidence for greater involvement of the right amygdala. *Behavioral Neuroscience*, v.118, n.1, p.15-23, 2004.
- BAUMAN, M.L.; KEMPER, T.L. The neuropathology of the autism spectrum disorders: what have we learned? *Novartis Foundation Symposium*, v.251, p.112-122, 2003.
- BREGEIRON, M. K.; MORRIS, M.; LUCION, A. B.; SANVITTO, G. L. Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Hormones and Behavior*, v. 41, n. 3, p. 267-274, 2002.
- BURDACH, K.F. *Vom Baume and Leben des Gehirns*. Leipzig, 1819-1822. In Apud: AGGLETON, J.P.; SAUDERS, R.C. The amygdala - What's happened in the last decade. In: AGGLETON, J. P. *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss., pp. 1-30, 2000.

- BURGOYNE, R. D.; GRAY, E. G., BARRON, J. Cytochemical localization of calcium in the dendritic spine apparatus of the rat cerebral cortex and at synaptic sites in the cerebellar cortex. *Journal of Anatomy*, v. 136, p. 634-635, 1983.
- 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.
- CANTERAS, N.S.; SWANSON, L.W. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde track-tracing study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, v.324, p.180–194, 1992.
- CARLSON, J.N.; GLICK, S.D. Cerebral lateralization as a source of interindividual differences in behavior. *Experientia*, 45: 788-798, 1989.
- CHRISTENSEN, M.K., FREDERICKSON, C.J.. Zinc-containing afferent projections to the rat corticalmedial amygdaloid complex: a retrograde tracing study, *The Journal of Comparative Neurology*, v.400, p.375-390, 1998.
- COLEMAN-MESCHES, K.; McGAUGH J.L. Differential involvement of the right and left amygdalae in expression of memory for aversively motivated training. *Brain Research*. v.670, n.1, p.75-81, 1995.
- COOKE, B.M.; BREEDLOVE, S.M.; JORDAN, C.L. Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. *Hormones and Behavior*, v.43, n.2, p.336-346, 2003.
- COOKE, B. M.; TABIBNIA, G.; BREEDLOVE, S. M. A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 96, p. 7538-7540, 1999.
- COOKE, B. M.; SIMERLY, R. B. Ontogeny of bidirectional connections between the medial nucleus of the amygdala and the principal bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, v.489, p.42-58, 2005.
- CROWNE, D.P.; NOVOTNY, M. F.; MAIER, S.E.; VITOLS, R. Effects of unilateral parietal lesions on spatial localization in the rat. *Behavioral Neuroscience*, v.106, n. 5, p.808-819, 1992.
- CRUZ-ORIVE, L. M.; WEIBEL, E. R. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *American Journal of Physiology*, v. 4, p. 136-149, 1990.
- da COSTA, A.P.; LEIGH, A.E.; MAN, M.S.; KENDRICK, K.M. Face pictures reduce behavioural, autonomic, endocrine and neural indices of stress and fear in

- sheep. *Proceedings of Biological Sciences*. v.271, n.1552, p.2077-2084, 2004.
- DAVIS, M. The role of the amygdala in conditioned fear. In AGGLETON (ed.) *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss, pp. 255–306, 2000.
- DAVIS, M.; MYERS, K.M. The role of glutamate and gamma-aminobutyric acid in fear extinction: Clinical implications for exposure therapy. *Biological Psychiatry*, v.52, n.10, p.998-1007, 2002.
- de CASTILHOS, J. *Estudo sobre a ação dos hormônios gonadais na densidade de espinhos dendríticos na amígdala medial pósterodorsal de ratas*. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005, 100 p.
- de CASTILHOS, J.; MARCUZZO, S.; FORTI, C. D.; FREY, R. M.; STEIN, D., ACHAVAL, M.; RASIA-FILHO, A. A. Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: Dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. *Brain Research Bulletin*, v.69, n.2, p.131-139, 2006.
- de OLMOS, J.; ALHEID, G.F.; BELTRAMINO, C.A. Amygdala. In PAXINOS, G. (Ed.) *The Rat Nervous System, Australia*, p. 223-234, 1985.
- de OLMOS, J.; BELTRAMINO, C. A.; ALHEID, G. F. Amígdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. In: PAXINOS, G. (Ed.) *The Rat Nervous System*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, p.509-603, 2004.
- 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. (eds) *Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones*. New York: Cambridge University Press, p.254-278, 1995.
- De VRIES G.J., MILLER MA. Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin systems in the brain. *Progress in Brain Research*. v.119, p. 3-20, 1998.
- DLUZEN, D.E.; KREUTZBERG, J.D. Norepinefrine is lateralized within the olfactory bulbs of male mice. *Journal of Neurochemistry*, v.66, n.3, p.1222-1226, 1996.
- DONG, H-W.; PETROVICH, G.D.; SWANSON, L.W., Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis, *Brain Research Review*, v.38, p.192-246, 2001.

- EBNER, K.; RUPNIAK, N.M.; SARIA, A.; SINGEWALD, N. Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 101, p. 4280–4285, 2004.
- ERSKINE, M.S.; MILLER, S. Ultrastructural effects of estradiol and 5 alpha-androstane-3 alpha, 17 beta-diol on neurons within the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Neuroendocrinology*, v.61, n.6, p.669-679, 1995.
- FISCHER, M., KAECH, S., KNUTTI, D., AND MATUS, A. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, v.20, p.847–854, 1998.
- 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.
- GLICK S. D.; ROSS, D.A. Lateralization of function in the rat brain. *Trends in Neuroscience*, v. 4, n.8, p.196-199, 1981a.
- GLICK S. D.; ROSS, D.A. Right-sided population bias and lateralization of activity in normal rats. *Brain Research*, v.205, p. 222-225, 1981b.
- GLICK S. D.; SHAPIRO, R.M. Functional and neurochemical mechanisms of cerebral lateralization in rats. IN: *Cerebral lateralization in nonhuman species*. Academic Press, pp 157-183, 1985.
- 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. *The Anatomical Record*, v.231, p.498-509, 1991.
- GONZÁLEZ-BURGOS, I.; ALEJANDRE-GÓMEZ, M.; CERVANTES, M. Spine-type densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats. *Neuroscience Letters*, v. 379, p. 52-54, 2005.
- GRAY, E.G. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *Journal of Anatomy*, v. 93, p.420–433, 1959.
- GU, G.; CORNEA, A.; SIMERLY, R.B. Sexual differentiation of projections from the principal nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis. *The Journal of Comparative Neurology*, v.460, n.4, p.542-562, 2003.
- GUNDERSEN, H.J.G.; JENSEN, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, v.147, p.229-263, 1987.
- GUSTAFSON, E.L.; CARD, J.P.; MOORE, R.Y. Neuropeptide Y localization in the rat amygdaloid complex. : *The Journal of Comparative Neurology*. v.251, n.3, p.349-362, 1986.

- HARRIS, K. M. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*, v.9, p.343–348, 1999.
- HARRIS, K. M.; KATER, S. B. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annual Review of Neuroscience*, v. 17, p. 341–371, 1994.
- HARRIS, K.M., STEVENS, J.K. Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *Journal of Neuroscience*, v.9, p.2987–2997, 1989.
- HARRIS, K.M.; SULTAN, P. Variation in the number, location, and size of synaptic vesicles provides an anatomical basis for the nonuniform probability of release at hippocampal CA1 synapses. *Neuropharmacology*, v.34, p.1387–1395, 1995.
- HERING, H.; SHENG, M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, p. 880-888, 2001.
- HERMEL, E.E.S. Características ultra-estrutural e volumétrica somática dos neurônios do subnúcleo póstero-dorsal da amígdala medial de ratos adultos, Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Neurociências) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005, 102 p.
- HERMEL, E.E., FACCIÓNI-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,n.5, p.565-75, 2006a.
- HERMEL, E.E., ILHA, J.; XAVIER, L.L.; RASIA-FILHO, A.A., ACHAVAL, M. Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. *Neuroscience*, v. 405, n.1-2, p. 153-158, 2006b.
- 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 Neuroscience*. San Diego: Academic Press, p.41-70, 1999.
- HSIEH-WILSON, L. C.; BENFENATI, F.; SNYDER, G.L.; ALLEN, P.B., NAIRN, A. C., GREENGARD, P. Phosphorylation of spinophilin modulates its interaction with actin filaments. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 278, n.2, p.1186-

- 1194, 2003.
- ICHIKAWA, M. Synaptic reorganization in the medial amygdaloid nucleus after lesion of the accessory olfactory bulb of adult rat: II. New synapse formation in the medial amygdaloid nucleus by fibers from the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Research*. v.420, p.253–258, 1987.
- ISGOR, C., SENGEAUB, D.R. Prenatal gonadal steroids affect adult spatial behavior, CA1 and CA3 pyramidal cell morphology in rats. *Hormones and Behavior*. V.34, n.2, p.183-198, 1998.
- JOHNSTON, J.B. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain *Journal of Comparative Neurology*, v.35, p.337-481, 1923. Apud: AGGLETON, J.P.; SAUDERS, R.C. The amygdala - What's happened in the last decade. In: AGGLETON, J. P. *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss., p. 1-30, 2000.
- KAMAL, A. M.; TÖMBÖL, T. Golgi studies on the amygdaloid nuclei of the cat. *Journal für Hirnforschung*, v.16, p. 175-201, 1975.
- KASAI H, MATSUZAKI M, NOGUCHI J, YASUMATSU N, NAKAHARA H () Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends in Neuroscience*, v. 26, p.360–368, 2003.
- KEYSER-MARCUS, L.; STAFISSO-SANDOZ, G.; GERECKE, K.; JASNOW, A.; NIGHTINGALE, L.; LAMBERT, K.G.; GATEWOOD, J.; KINSLEY, C.H. Alterations of medial preoptic area neurons following pregnancy and pregnancy-like steroidal treatment in the rat. *Brain Research Bulletin*, v.55, n.6, p.737-45, 2001.
- KELLEY, D. B. Sexually dimorphic behaviors. *Annual Review of Neuroscience*. 11:225-51, 1988.
- KENNEDY, M. J.; EHLERS, M. D. Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, v.29, 325-362, 2006.
- KERCHNER, M.; MALSBURY, L. W.; WARD, O. B.; WARD, I. L. Sexual dimorphic areas in the rat medial amygdala: resistance to the desmaculinizing effect of prenatal stress. *Brain Research*, v.672, p.251-260, 1995.
- KIPP JL, RAMIREZ VD Estradiol and testosterone have opposite effects on microtubule polymerization. *Neuroendocrinology*, v.77, n.4, p.258-272, 2003.
- 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.

- KORKOTIAN, E.; SEGAL, M. Structure-functional relations in dendritic spines: Is size important? *Hippocampus*, v.10, p.587-595, 2000.
- KOVALCHUK, Y.; EILERS, J.; LISMAN, J.; KONNERTH, A. NMDA receptor-mediated subthreshold Ca²⁺ signals in spines of hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, v.20, p.1791-1799, 2000.
- LEDDA, M.; BARNI, L.; ALTIERI, L.; PANNESE, E. Decrease in the nucleocytoplasmic volume ratio of rabbit spinal ganglion neurons with age. *Neuroscience Letters*, v. 286, p. 171-174, 2000.
- 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.
- LIND, R.W.; SWANSON, L.W.; GANTEN, D. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. *Neuroendocrinology*, v. 40, p. 2-24, 1985.
- MADEIRA, M.D.; LEAL S; PAULA-BARBOSA, M.M. Stereological evaluation and Golgi study of the sexual dimorphisms in the volume, cell numbers, and cell size in the medial preoptic nucleus of the rat. *Journal of Neurocytology*, v. 28, n.2, p.131-148, 1999.
- MADEIRA, M. D.; FERREIRA-SILVA, L.; RUELA, C.; PAULA-BARBOSA, M. Differential effects of the aging process on the morphology of the hypothalamic ventromedial nucleus of male and female rats. *Neuroscience Letters*, v. 314, p. 73-76, 2001.
- 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, n.1, p.57-69, 1994.
- MARCOS, P.; COVENAS, R.; NARVÁEZ, J. A; DIAZ-CABIALE, Z.; AGUIRRE, J. A; TRAMU, G.; GONZÁLEZ-BARÓN, S. Immunohistochemical mapping of enkephalins, NPY, CGRP, and GRP in the cat amygdala. *Peptides*, v. 20, p. 635-644, 1999.
- MARCUZZO, S. Estudo sobre a densidade de espinhos dendríticos de neurônios da amígdala medial pósterodorsal de ratos em diferentes condições experimentais. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Neurociências), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006, 100 p.
- MARTINEZ, F.G, HERMEL, E.E, XAVIER, L.L., VIOLA, G.G., 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*, (no prelo), 2006.
- MATTHEWS JR., M. K.; KENYON, R. Four- versus five-day estrous cycles in rats: vaginal cycling and pregnancy. *Physiology & Behavior*, v. 33, p. 65-67, 1984.
- MATUS, A. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science*, v.290, p.754–758. 2000.
- MATUS, A. Growth of dendritic spines: a continuing story. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 15, p. 67-72, 2005.
- MATSUMOTO, A. Hormonally induced neuronal plasticity in the adult motoneurons. *Brain Research Bulletin*, v.44, n.4, p.539-47, 1997.
- McDONALD, A. J. Coexistence of somatostatin with neuropeptide y, but not with cholecystokinin or vasoactive intestinal peptide, in neurons of the rat amygdala. *Brain Research*, v.500, p. 37-45, 1989.
- McDONALD, A.J. SHAMMAH-LAGNADO, S.J., SHI, C., DAVIS, M. Cortical afferents to the extended amygdala. *Annual New York Academy. Science*. 877, 309-338,1999.
- McEWEN, B. S. Gonadal steroid influences on brain development and sexual differentiation. *International Review of Physiology*, v.27, p.99-145, 1983.
- 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.
- MEGA, M.S., CUMMINGS, J.L., SALLOWAY, S., MALLOY, P. The limbic system: an anatomic, phylogenetic, and clinical perspective. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, v.9, n.3, p.315-30, 1997.
- MEREDITH, M.; WESTBERRY, J.M. Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. *Journal of Neuroscience*, v.24, p.5719–5725, 2004.
- 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.
- NAFTOLIN. F. Understanding the bases of sex differences. *Science*, v.211, p.1263-1264, 1981.
- NIMCHINSKY, E. A.; SABATINI B. L.; SVOBODA, K. Structure and function of

- dendritic spines. *Annual Review of Physiology*, v. 64 p. 313-353, 2002.
- NISHIZUKA, M; ARAI Y Sexual dimorphism in synaptic organization in the amygdala and its dependence on neonatal hormone environment. *Brain Research* v.212, p.31–38, 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.
- NITECKA, L.; BEN-ARI, Y. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *The Journal of Comparative Neurology*, v.266, n.1, p.45-55, 1987.
- NITECKA, L.; FROTSCHER, M. Organization and synaptic interconnections of GABAergic and cholinergic elements in the rat amygdaloid nuclei: single- and double-immunolabeling studies. *The Journal of Comparative Neurology*, v.279, p.470–488, 1989.
- OBERTO, A; PANZICA, G. C., ALTRUDA, C. E. GABAergic and NPY-Y₁ network in the medial amygdala: a neuroanatomical basis for their functional interaction. *Neuropharmacology*, v.41, p. 639-642, 2001.
- OERTNER, T.; MATUS, A. Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium*, v. 37, p. 477-482, 2005.
- 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.
- 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.

PALESTINI, O.; TOPPI, N.; FERRARETTO, A., PITTO, M; MASSERINI, M. Ganglioside lateralization in the brain of female rats. *Journal of Neuroscience Research*, v.50, n.4, p.643-648, 1997.

PARÉ, D.; SMITH, Y. Distribution of GABA immunoreactivity in the amygdaloid complex of the cat. *Neuroscience*, v.57, p.1061–1076, 1993.

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.

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.

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

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

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.

RASIA-FILHO, A. A.; FABIAN, C.; RIGOTI, K. 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.; LONDERO, R. G.; ACHAVAL, M. On some functional activities of the amygdala: an overview. *The Journal of Psychiatry and 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.

- REID, C.A. The role of dendritic spines: comparing the complex with the simples. *European Journal of Pharmacology*, v. 447, p.173–176, 2002.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 17, p. 208-212, 1963.
- RIGOTI, K. M. *Análise morfológica neuronal e da densidade de espinhos dendríticos da amígdala medial de ratas durante o ciclo estral*. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Neurociências), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002. 100p.
- RODRIGO, J.; PEINADO, M. A.; SÁNCHEZ, E.S., PEDROSA, J A.; BENTURA, M.L.; ESTEBAN, F.J. et al. Técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la microscopía electrónica. In: PEINADO, M.A.; PEDROSA, J.A.; RODRIGO, (eds) *Inmunocitoquímica y Técnicas Relacionadas*. Jaén: Universidad, 1996. p. 177-201.
- ROSE C. R.; KOVALCHUK, Y.; EILERS, J, KONNERTH, A. Two-photon Na⁺ imaging in spine and fine dendrites of central neurons. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, v. 439, p.201-207, 1999.
- ROSEN, G.D.; FINKLESTEIN, S.; STOLL, A.L.; YUTZEY, D.A.; DENENBERG, V.H. neurochemical asymmetries in the albino rat's cortex, striatum and nucleus accumbens, *Life Sciences*, v.34, p.1143-1148, 1984.
- SABATINI, B.L.; MARAVALL, M.; SVOBODA, K. Ca²⁺ signaling in spines. *Current Opinion in Neurobiology*, v.11, p.349–356, 2001.
- SANCHEZ, M.A.; DOMINGUEZ, R. Differential effects of unilateral lesions in the medial amygdala on spontaneous and induced ovulation. *Brain Research Bulletin*, v.38, n.4, p 313-317, 1995.
- SARROUILHE, D.; DI TOMMASO, A.; METAYE, T.; LADEVEZE, V. Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie*, v.17, 2006.
- SEGEV, I.; RALL, W. Excitable dendrites and spines: earlier theoretical insights elucidate recent direct observations. *Trends in Neuroscience*, v.21, p.453-460, 1998.
- 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.

- SHIMA, N., YAMAGUCHI, Y., YUR, I. K. Distribution of estrogen receptor beta mRNA-containing cells in ovariectomized and estrogen-treated female rat brain. *Anatomical Science International*, v.78, n.2, p.85-97, 2003
- 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. (eds) *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 of Neuroscience*, v. 25, p.507-536, 2002.
- SIMERLY, R.B.; CHANG, C.; MURAMATSU, M. SWANSON, L.W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: in situ hybridization study, *The Journal of Comparative Neurology*. v.294, p.76-95, 1990.
- SIMMONS, D.A.; YAHR, P. GABA and glutamate in mating activated cells in the preoptic area and medial amygdala of male gerbils. *The Journal of Comparative Neurology*, v.459, p.290–300, 2003.
- SLOPSEMA, J.S.; VAN DER GUGTEN, J.; BRUIN, P.C. Regional concentrations of noradrenaline in the frontal cortex of the rat: dopaminergic innervation of the pre-frontal subareas and lateralization of pre-frontal dopamine. *Brain Research*, v.250, p.197-200, 1982.
- SORRA, K.E.; HARRIS, K.M. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, v. 10, p.501–511, 2000.
- SPACEK, J.; HARRIS, K.M. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *Journal of Neuroscience*, v 17, p.190–203, 1997.
- SPACEK, J; HARTMANN, M. Three-dimensional analysis of dendritic spines. I. Quantitative observations related to dendritic spine and synaptic morphology in cerebral and cerebellar cortices. *Anatomy and Embryology*, v.167, n.2, p.289-310, 1983.
- STEFANOVA, N. γ -Aminobutyric acid-immunoreactivity 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, Embryology, and Cell Biology*, v.158, p.1–78, 2000.
- STEWART, O.; SCHUMAN, E. M. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annual Review of Neuroscience*, v. 24, p. 299–325, 2001.
- SWANSON, L. W. The amygdala and its place in cerebral hemisphere. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.985, p.174-184, 2003.
- 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, n.3, p.165-186, 1983.
- TADA, T.; SHENG, M. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 16, p. 1-7, 2006.
- TOGA A.W, THOMPSON P.M. Temporal dynamics of brain anatomy. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v.5, p.119-145, 2003.
- VAN PELT, J.; DITYATEV, A.E.; UYLINGS, H.B. Natural variability in the number of dendritic segments: Model-based inferences about branching during neurite outgrowth. *The Journal of Comparative Neurology*, v.387, p.325-340, 1997.
- VEINANTE, P.; FREUND-MERCIER, M.J. Distribution of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the rat extended amygdala: a histoautoradiographic study. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 383, p. 305-325, 1997.
- WALKER, D.L.; TOUFEXIS, D.J.; DAVIS M. role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *European Journal of Pharmacology*, v.463, n.1-3, p.199-216, 2003.
- WILSON, M.A.; MASCAGNI, F.; McDONALD, A.J. Sex differences in delta opioid receptor immunoreactivity in rat medial amygdala. *Neuroscience Letters*, v.328, p.160-164, 2002.
- WOOLLEY, C.S.; McEwen, B.S. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *The Journal of Neuroscience*, v. 12, n.7, p.2549–2554,1992.
- WOOLEY, C.S.; WEILAND, N.; McEWEN, B.S.; SCHWARTZKRON, P.A. Estradiol

increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *Journal of Neuroscience*, v.17, p.1848-1859, 1997.

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

9. ANEXOS

TRABALHOS APRESENTADOS E PUBLICAÇÕES RESULTANTES

A presente tese de doutorado resultou em trabalhos apresentados em congressos nacionais e internacionais, em resumos publicados, trabalhos no prelo e em redação.

1. Trabalhos apresentados

ROCHA, M.I.U.M.; XAVIER, L.L.; RASIA-FILHO, A; ACHAVAL, M. Amígdala medial póstero-ventral: estereologia e lateralidade. In I MOSTRA UFRGS, 2005.

ROCHA, M.I.U.M.; XAVIER, L.L.; RASIA-FILHO, A; ACHAVAL, M. Postero-ventral medial amygdala: neuronal somatic volume and laterality in rats. In: XX CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROSCOPIA E MICROANÁLISE, Águas de Lindóia, v. 1, suppl 222-223, 2005.

2. Trabalhos enviados ou em fase de redação

ROCHA, M.I.U.M.; MESTRINER, R.G.; HERMEL, E.E.S; XAVIER, L.L.; RASIA-FILHO, A; ACHAVAL, M. Neuronal somatic volume of posteroventral medial amygdala cells from male and female rats across the estrous cycle. *Neuroscience Letters*, enviado.

ROCHA, M.I.U.M.; RASIA-FILHO, A; ACHAVAL, M. The posteroventral medial amygdala: an ultrastructural analysis, em fase de redação.