



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**ESTUDO SOBRE A AÇÃO DOS HORMÔNIOS
GONADAIS NA DENSIDADE DE ESPINHOS
DENDRÍTICOS NA AMÍGDALA MEDIAL
PÓSTERO-DORSAL DE RATAS**

Juliana de Castilhos

Porto Alegre

2005



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

**ESTUDO SOBRE A AÇÃO DOS HORMÔNIOS GONADAIS NA DENSIDADE
DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NA AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-
DORSAL DE RATAS**

Juliana de Castilhos

Orientadora: Profa. Dra. Matilde Achaval Elena

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Porto Alegre

2005

“Não sei como o mundo me vê: mas eu me sinto como um garoto brincando na praia, contente em achar aqui e ali uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita, tendo sempre diante de mim, ainda por descobrir, o grande oceano da verdade”.

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Matilde Achaval Elena pela orientação e oportunidade. A ela todo o meu respeito e gratidão.

Ao Prof. Dr. Alberto Antonio Rasia Filho, pela constante ajuda e incentivo. Mais do que mestre, um amigo.

A minha família (Teresa, Josmiro e Beth), que mesmo longe estiveram sempre ao meu lado, pelo incentivo em todos os momentos e a Márcio Vinícius Donadio pela paciência e pelo amor.

Aos queridos colegas de laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS Erica do Espírito Santo Hermel, Simone Marcuzzo, Maria Izabel Ugalde, Aline Dall'Oglio, Flávia Martinez, Paula Rigon, Cláudia Pupperi, Aline Pagnussat, Günther Gelhen, Léder Leal Xavier, Rafaela Araújo e Jocemar Ilha pelas sugestões, colaboração e, principalmente, amizade.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia da FFFCMPA Édson e Helington pelos momentos de descontração entre um experimento e outro.

À amiga Márcia Scherem de Azevedo pelo incentivo nas horas difíceis e por sempre acreditar que todas as coisas eram possíveis.

À Claudio Alexandre, Pró-Diretor de Pós-Graduação e Pesquisa da FFFCMPA, pela aquisição da substância LY235959, utilizada na presente dissertação.

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

Este trabalho teve o apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) (bolsa de mestrado).

SUMÁRIO

Abreviaturas

Lista de Figuras

Resumo

INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.	11
Amígdala		11
Amígdala Medial.....		14
Localização, Divisãoe Hodologia		14
Funções da AMe		19
Citoarquitetura da AMe e Estrutura Neuronal		25
Importância do Estudo dos Espinhos Dendríticos sob Ação dos Hormônios Gonadais Femininos.....		32
OBJETIVOS		
Gerais.....		37
Específicos.....		37
MATERIAL E MÉTODO		39
Animais		39
Procedimento Cirúrgico e Terapia Hormonal Substitutiva.....		39
Procedimento Histológico		43
Aquisição de Dados.....		44
Análise Estatística		47
RESULTADOS.....		48
DISCUSSÃO		57
CONCLUSÃO.....		69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		70

ABREVIATURAS

ACe	Amígdala central
AMBI	Amígdala basolateral
AMe	Amígdala medial
AMeAD	Amígdala medial ântero-dorsal
AMeAV	Amígdala medial ântero-ventral
AMePD	Amígdala medial pósterio-dorsal
AMePDc	Porção central da amígdala medial pósterio-dorsal
AMePDi	Porção intermediária da amígdala medial pósterio-dorsal
AMePDI	Porção lateral da amígdala medial pósterio-dorsal
AMePDM	Porção medial da amígdala medial pósterio-dorsal
AMePV	Amígdala medial pósterio-ventral
AVPV	Núcleo hipotalâmico periventricular ântero-ventral
BNSTi	Porção intermediária do núcleo próprio da estria terminal
BNSTpm	Núcleo próprio da estria terminal pósterio-dorsal
e.p.m	Erro padrão da média
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFAP	Proteína fibrilar ácida glial
GFAP-ir	Imunoreatividade da proteína fibrilar ácida glial
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
LTD	Atividade diminuída a longo prazo
LTP	Atividade potencializada a longo prazo
MPOA	Área pré-óptica medial
NMDA	N-metil- <i>D</i> -aspartato
SNC	Sistema nervoso central
VMN	Núcleo ventromedial do hipotálamo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar os quatro subnúcleos da AMe, a saber: AMeAD, AMeAV, AMePD e AMePV....16
- Figura 2 Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde está identificada a AMePD, representando os cortes de onde foram estudados os neurônios deste presente trabalho.....45
- Figura 3 Fotomicrografias de neurônios do tipo estrelado (A) e bipeinado (B) na AMePD.....50
- Figura 4 Fotomicrografias de neurônios da AMePD de ratas dos grupos 1, 2 e 351
- Figura 5 Desenhos dos espinhos dos primeiros 40 μm dendríticos de neurônios da AMePD de ratas dos grupos 1, 2 e 3.....52

Figura 6	Densidade de espinhos dendríticos (média \pm e.p.m) dos primeiros 40 μ m dendríticos na AMePD de ratas submetidas à ovariectomia e à terapia hormonal substitutiva subcutânea dos grupos 1, 2 e 3.....	53
Figura 7	Fotomicrografias de neurônios da AMePD de ratas dos grupos 4 e 5.....	54
Figura 8	Desenhos dos espinhos dos primeiros 40 μ m dendríticos de neurônios da AMePD de ratas dos grupos 4 e 5.....	55
Figura 9	Densidade de espinhos dendríticos (média \pm e.p.m) dos primeiros 40 μ m dendríticos na AMePD de ratas submetidas à ovariectomia e à terapia hormonal substitutiva subcutânea dos grupos 4 e 5.....	56

RESUMO

A amígdala medial (AMe) é um núcleo superficial do complexo amigdalóide e que ocupa seu aspecto rostromedial. A AMe modula uma série de comportamentos além de modular a memória e o aprendizado associado a estímulos olfativos e visuais. Em ratos é uma estrutura sexualmente dimórfica e está dividida em quatro subnúcleos: ântero-dorsal (AMeAD), ântero-ventral (AMeAV), pósterodorsal (AMePD) e póstero-ventral (AMePV). A AMe apresenta células com características morfológicas variadas e receptores para hormônios gonadais amplamente distribuídos entre todos os seus subnúcleos, mas principalmente na AMePD. O presente trabalho teve por objetivo estudar a ação dos esteróides sexuais na densidade de espinhos dendríticos na AMePD de ratas ovariectomizadas e se sua ação pode ser mediada pelos receptores do tipo NMDA. Para tanto, foram utilizadas ratas Wistar adultas (n = 6 por grupo experimental, descritos a seguir) que foram ovariectomizadas e injetadas com veículo oleoso (“O”; 0,1ml s.c.); benzoato de estradiol (“BE”; 10µg/0,1ml s.c.); benzoato de estradiol e progesterona (“BE+P”; 10µg/0,1ml e 500µg/0,1ml s.c.). Adicionalmente, foram estudadas fêmeas ovariectomizadas e que receberam benzoato de estradiol e salina (“BE+S”; 10µg/0,1ml s.c. e 0,2 ml i.p.) ou benzoato de estradiol e LY235959, antagonista específico dos receptores do tipo NMDA para o glutamato (“BE+LY235959”; 10µg/0,1ml s.c. e 3mg/Kg i.p.). Todas as injeções foram feitas ao longo de 4 dias. Cinco horas após a última injeção, os animais foram anestesiados e submetidos à técnica de Golgi do tipo “single-section”. Os encéfalos foram seccionados

em vibrátomo e os cortes foram colocados, após fixação, em solução de bicromato de potássio e, a seguir, em nitrato de prata. Neurônios bem impregnados e indubitavelmente presentes na AMePD foram selecionados para estudo. Os espinhos presentes nos primeiros 40 μm dendríticos foram desenhados com auxílio de uma câmara clara acoplada a microscópio óptico em aumento de 1000X. Cada animal teve 8 ramos dendríticos selecionados, um por neurônio diferente, perfazendo 48 ramos ao total em cada grupo experimental. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via e ao teste *post hoc* de Bonferroni (primeiros 3 grupos) ou ao teste “t” de Student não-pareado (últimos 2 grupos), ambos com $\alpha = 5\%$. Os resultados indicaram que as ratas que foram ovariectomizadas e tratadas com O, BE e BE+P apresentaram uma diferença estatisticamente significativa entre si [$F(2,143) = 104,24$; $p < 0,001$]. Os grupos BE e BE+P (média \pm epm = $1,91 \pm 0,04$ e $2,67 \pm 0,05$, respectivamente) apresentaram maior densidade de espinhos dendríticos na AMePD quando comparados ao grupo controle injetado com óleo ($1,60 \pm 0,05$; $p < 0,001$). Adicionalmente, nos grupos BE+S e BE+LY235959, a densidade de espinhos dendríticos diminuiu no grupo que recebeu o antagonista dos receptores do tipo NMDA ($2,02 \pm 0,04$) em relação ao que recebeu salina ($2,15 \pm 0,04$; $p = 0,04$). O presente estudo sugere que a densidade de espinhos dendríticos na AMePD é afetada pelos hormônios gonadais femininos, sendo que a progesterona potencializa o efeito do estradiol. De forma muito interessante, a ação do estradiol parece ocorrer, pelo menos em parte, pela interação com receptores do tipo NMDA. Esses resultados podem contribuir para o entendimento da plasticidade morfológica e sináptica representada pela densidade de espinhos dendríticos na AMePD, a qual parece ser mediada pelos esteróides sexuais e em área do sistema nervoso relacionada com a modulação de comportamento reprodutivo feminino.

INTRODUÇÃO

Amígdala

A amígdala, ou complexo amigdalóide, constitui-se de núcleos subcorticais que se situam no lobo temporal, lateral ao hipotálamo e ventral ao estriado, no encéfalo de mamíferos. Em primatas, 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 et al., 1995; de OLMOS, 1999). Em ratos, é formada por núcleos e subnúcleos que formam uma complexa rede estrutural inter-relacionada e multifuncional, uma vez que está envolvida na modulação de diversos comportamentos e ajustes vegetativos (ALHEID et al, 1995; EVERITT, 1995; SWANSON; PETROVICH, 1998; RASIA-FILHO et al., 2000; de OLMOS et al., 2004).

O termo amígdala foi empregado, primeiramente, para se referir a uma região do cérebro de mamíferos formada por um conjunto de núcleos em forma de amêndoa, de onde surgiu seu nome (conforme SWANSON; PETROVICH, 1998). Foram os estudos de Johnston, Humphrey e Crosby, como descrito em Kamal e Tömböl (1975), os primeiros a descrever que a estria terminal representaria a maior via de ligação entre a amígdala e as regiões médio-basais do telencéfalo, sobre a organização citoarquitetônica da amígdala na escala evolucionária e suas divisões.

Esses mesmos autores sugeriram que a amígdala estaria dividida em uma região corticomédial e outra basolateral. A primeira constituída pelos núcleos central, medial e cortical, representando a área filogeneticamente mais antiga dessa região nuclear; e a segunda, composta pelos núcleos basal e lateral, representando a região mais recente na escala evolutiva. Além desses núcleos, existiria um terceiro grupo, denominado de amígdala anterior, do qual fazem parte os núcleos laterais do trato olfativo, áreas de transição e núcleos não classificados. Estudos mais recentes sobre a divisão da amígdala de ratos apresentam-na dividida em quatro regiões, segundo a sua citoarquitetura, hodologia e função, que são: 1) amígdala “expandida”, denominada assim por se estender além de seus limites anatômicos, sendo formada pelos núcleos medial (AMe) e central (ACe). A AMe, por sua vez, poderia ser composta por dois circuitos funcionalmente diferentes, associados com as divisões anterior e posterior do núcleo medial, e que se diferenciaria também por distintas presenças de neurotransmissores (NEWMAN, 1999); 2) amígdala com características corticais, subdividida em porção basolateral e em porções que se ligam às vias olfativas e vomeronasal; 3) área de transição, localizada entre a porção ventral dos núcleos da base e a amígdala “expandida”; e 4) núcleos ainda não classificados, constituídos por um grande grupo de células dispersas na substância branca e no interior do núcleo próprio da estria terminal (ALHEID et al., 1995; de OLMOS et al., 2004).

O modelo atual de estudo da organização da amígdala sugere que ela não é nem uma unidade funcional nem estrutural, mas sim é definida como um conjunto heterogêneo de grupos celulares nos hemisférios cerebrais (SWANSON; PETROVICH, 1998; PETROVICH et al., 2001). Atribui-se à amígdala de ratos diversas funções, tais

como: respostas a estímulos gerados por medo e ansiedade, percepções de estímulos olfativos e hormonais, modulação do comportamento reprodutivo e participação na aquisição do aprendizado e da memória condicionada (RASIA-FILHO et al., 1991; KLING; BROTHERS, 1992; LeDOUX, 1992; EVERITT, 1995; KONDO; ARAI, 1995; WOOD; NEWMAN, 1995; QUIRK et al., 1995; GUILLAMÓN; SEGOVIA, 1997; SWANSON; PETROVICH, 1998; DAVIS, 2000; PITKÄNEN et al., 2000). Para participar dessas atividades, ela possui a capacidade de receber diferentes informações sensoriais, tanto interoceptivas (viscerais) quanto exteroceptivas (estímulos olfativos, auditivos e visuais), que acabam por modificar sua atividade e estimular diversas regiões do sistema nervoso central (SNC) em resposta ao estímulo inicial (KLING; BROTHERS, 1992; LeDOUX, 1992; QUIRK et al., 1995; DAVIS, 2000). Assim, a amígdala apresenta a capacidade de adequar a relação do animal com seu ambiente, modulando o comportamento social e conjugando-o com alterações vegetativas e neuroendócrinas. Para avançar este conhecimento, é preciso que sejam detalhados os papéis dos subnúcleos que a compõe.

Em ratos, alguns subnúcleos da amígdala são sexualmente dimórficos. Tal característica pode ser evidenciada na comparação entre a área total da AMe de machos e fêmeas, sendo maior nos primeiros (NISHIZUKA; ARAI, 1981 a; NISHIZUKA; ARAI, 1982; MIZUKAMI et al., 1983; HINES et al.; 1992; MALSBURY; McKAY, 1994). Este dimorfismo está na dependência da ação dos hormônios gonadais em ambos os sexos (NISHIZUKA; ARAI, 1981a, 1981b; NISHIZUKA; ARAI, 1982; MIZUKAMI et al., 1983; GOMEZ; NEWMAN, 1991; RASIA-FILHO et al., 1999, 2002.). A AMe, junto com outras estruturas do SNC, apresenta neurônios com características morfológicas variadas e que apresentam receptores para hormônios

gonadais amplamente distribuídos em seus subnúcleos (SAR; STUMPF, 1973; SHERIDAN, 1979; SIMERLY et al., 1990; LI et al., 1997; ÖSTERLUND, 1998). Esses hormônios, devido a sua capacidade de gerar alterações nos circuitos neurais, influenciam a plasticidade do SNC e causam alterações morfológicas nos neurônios e nas células gliais (NISHIZUKA; ARAI, 1982; ARNOLD; BREEDLOVE, 1985; ARNOLD; JORDAN, 1988; RASIA-FILHO, 1999), o que, em parte, será descrito com mais detalhes a seguir.

Amígdala Medial

Localização, Divisão e Hodologia

A AMe é um dos núcleos superficiais do complexo amigdalóide, ocupando seu aspecto rostromedial. É formada por uma coluna proeminente de células que surgem em justaposição à superfície lateral de fibras que ascendem pelo trato óptico (ALHEID, et al., 1995). Inicia medialmente e posteriormente ao núcleo do trato olfativo, estendendo-se caudalmente até o surgimento do corno temporal do ventrículo lateral. Neste nível, ela situa-se dorso-medialmente ao pólo cefálico da área de transição amígdalo-hipocampal, formando a região medial da parede anterior desta porção do ventrículo. Ao longo de toda sua extensão, a AMe encontra-se lateralmente e em íntimo contato com a região ventro-lateral do trato óptico, separada por região com células esparsas dentro do feixe de axônios eferentes do núcleo próprio da via olfativa acessória (SCALIA; WINANS, 1975; NISHIZUKA; ARAI, 1983). Seu limite rostral com a amígdala anterior e lateralmente com as camadas profundas do núcleo cortical anterior

não estão claramente definidos (ALHEID; HEIMER, 1988; ALHEID et al., 1995; PITKÄNEN, 2000).

Dorso-lateralmente, a AMe é separada da porção medial da ACe por uma região pobre em células, a qual é substituída mais ventralmente e caudalmente pelo núcleo próprio da estria terminal (ALHEID et al., 1995). Caudalmente, o grupo de núcleos intercalados da amígdala separa a AMe da amígdala basolateral (AMBl). Também caudalmente, mas em posição dorsal, grupos de fibras que ascendem pela estria terminal são interpostos entre a AMe e outros núcleos amigdalóides (ALHEID et al., 1995; PAXINOS; WATSON, 1998).

Na literatura, a AMe tem sido dividida em subnúcleos de diversas maneiras, segundo critérios de diversos autores. Pitkänen (2000) divide-a em três regiões: rostral, central (porção dorsal e ventral) e caudal. Alheid et al. (1995), Paxinos e Watson (1998) e de Olmos et al. (2004) dividem-na nos subnúcleos ântero-dorsal (AMeAD), ântero-ventral (AMeAV), pósterodorsal (AMePD) e póstero-ventral (AMePV; Figura 1). E, em função de suas conexões, ela pode estar organizada em uma região anterior, da qual fazem parte a AMeAD, a AMeAV e a AMePV, e uma região posterior, formada basicamente pela AMePD (CANTERAS et al., 1995).

A neurogênese na AMe em ratos ocorre até aproximadamente o 16^o dia de vida intra-uterina. É interessante que ela se inicia antes nas regiões anterior e ventral, o que provavelmente se relaciona com o estabelecimento de conexões com o sistema olfativo

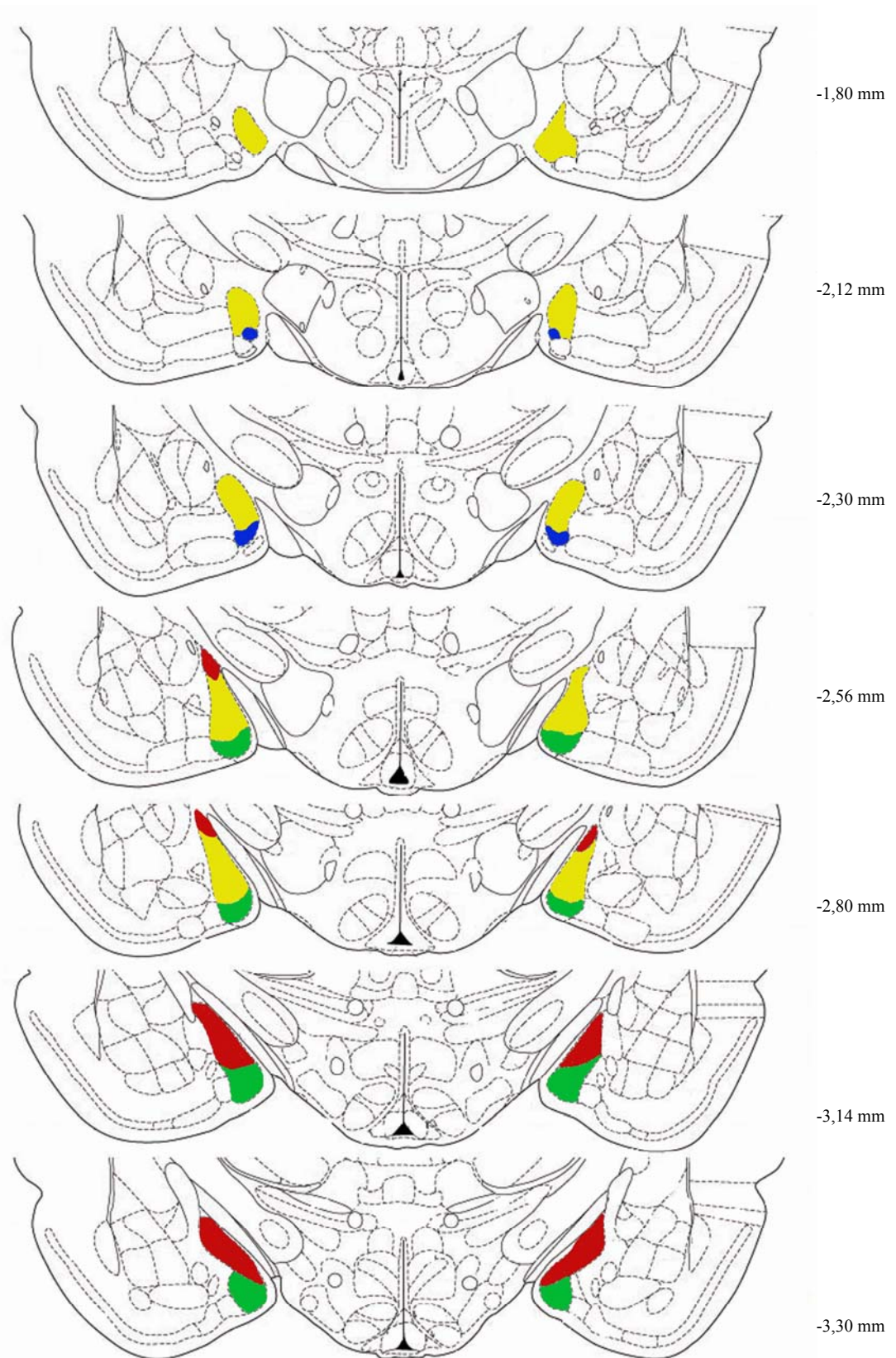


Figura 1. Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar os quatro subnúcleos da AMe: AMeAD (em amarelo), AMeAV (em azul), AMePD (em vermelho) e AMePV (em verde). Valores em mm referentes à distância posterior ao bregma. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998), equivale às figuras 25 a 31 deste atlas. As imagens correspondente à AMePD serão mais detalhadas na figura 2 adiante.

(BAYER, 1980). Baseado nisso, Wood e Newman (1995) propuseram que a região anterior da AMe estaria sendo influenciada principalmente por informações olfativas; e a região posterior, pelos hormônios gonadais, embora essa divisão anátomo-funcional não seja absolutamente rígida. Isso porque há receptores para esteróides sexuais e conexões sinápticas recíprocas bem documentadas entre todas as subregiões da AMe (SIMERLY et al., 1990; WOOD; NEWMAN, 1995; LI et al., 1997; SHUGHRUE et al., 1997; OSTERLUND, 1998; PITKÄNEN, 2000). Ademais, a distribuição de receptores para hormônios sexuais na AMe não é uniforme. Neurônios com receptores para andrógenos estão presentes em todos os seus subnúcleos, porém sua concentração maior é observada da parte média à posterior da AMe (SHERIDAN, 1979). Neurônios com receptores dos tipos α e β para estrógenos são encontrados preferentemente na AMePD (SIMERLY et al., 1990; LI et al., 1997; ÖSTERLUND, 1998), mas também há descrições da presença desses receptores tanto na AMeAD como na AMePV (LI et al., 1997; SHUGHRUE et al., 1997; ÖSTERLUND, 1998), sendo que a quantidade de receptores para estrógenos na AMePD chega a ter a mesma intensidade que no hipotálamo (SIMERLY et al., 1990). Receptores de progesterona também já foram relatados na AMe (McEWEN et al., 1983; KATO, 1985; SAR, 1988, ROMANO et al., 1989; HAGIHARA et al., 1992; De VRIES; SIMERLY, 2002). Cerca de 80 a 90% dos neurônios na AMePD que possuem receptores para estrógenos também possuem para andrógenos (GRECÓ et al., 1998).

A AMePD possui várias aferências que advêm de diferentes regiões do encéfalo. Dentre as aferências mais importantes, estão as hipotalâmicas (da área hipotalâmica anterior, área pré-óptica medial (MPOA) e lateral e núcleo arqueado, núcleos dorsomedial, hipotalâmico posterior, lateral, pré-mamilar, supraóptico, tuberal e

ventromedial), as do córtex cerebral (da área pré-límbica, córtex entorrinal, infralímbico e perirrinal dorsal), as aferências talâmicas (do núcleo medial, parafascicular, paraventricular e posterior, dentre outros), as do tronco encefálico (principalmente do núcleo dorsal da rafe e núcleo parabraquial), do sistema olfativo (do córtex piriforme, bulbo olfativo acessório e núcleo endopiriforme) e de outras regiões distintas, como, por exemplo, do núcleo da faixa diagonal de Broca, do núcleo próprio da estria terminal e da substância *inominata*. Além destas, existem também as aferências intra-amigdalóides, onde, dentre outras, destacam-se as da área amígdalo-hipocampal, núcleo basal, basal acessório, cortical anterior, posterior, lateral e medial. As aferências inter-amigdalóides são exemplificadas pelas provenientes do córtex periamigdalóide, núcleo basal acessório, cortical posterior e núcleo do trato olfativo lateral (McDONALD, 1998). Em relação às eferências da AMePD (tema principal desta dissertação), dentre as mais importantes e significativas estão as hipotalâmicas (para o núcleo hipotalâmico periventricular ântero-ventral, MPOA e núcleo pré-mamilar, entre outros), as corticais (principalmente para a área entorrinal lateral, área de transição pós-piriforme, área CA1 hipocampal e subículo), as do tronco encefálico (para a área tegmental dorsal e substância cinzenta periaqueductal), e de outras regiões, como, por exemplo, para o núcleo próprio da estria terminal (parte ântero-dorsal e posterior principal) e para a substância *inominata*, principalmente. Ademais, existem também as eferências intra-amigdalóides onde, dentre elas, destacam-se aquelas para o núcleo central, cortical póstero-lateral e póstero-medial (CANTERAS et al, 1995).

Funções da AMe

A AMe tem sido descrita como uma região envolvida na modulação da memória em condicionamentos Pavlovianos clássicos e de aprendizado onde o componente emocional esteja envolvido (ALLEN; ALLEN, 1974; AGGLETON; BLINT, 1989; SHINDOU et al., 1993; CANTERAS et al., 1995; WATANABE et al., 1995; ROOZENDAAL; McGAUGH, 1996; RASIA-FILHO et al., 2000). Isso foi observado em testes de esquia inibitória (ROOZENDAAL; McGAUGH, 1996), nas respostas neuroendócrinas a um evento estressor (McGAUGH, 1992; LU et al., 1995; DAYAS et al., 1999) e em uma série de testes de comportamentos sociais, tais como o agressivo (SLODDART-APTER et al., 1980; VOCHTELOO; KOOLHAAS, 1987; SIEGEL, 1990; HINES et al., 1992; DIELENBERG et al., 2001), defensivo (SHAIKH et al., 1993; BOLHUIS, 1984), sexual (RASIA-FILHO et al., 1991; KONDO, 1992; WONG et al., 1993; MEISEL; SACHS, 1994; KONDO; ARAI, 1995; NEWMAN, 1999; DOMÍNGUEZ; HULL, 2001, BREIGEIRON et al. 2004) e maternal (NUMAN et al., 1993; MORGAN et al., 1999; SHEEHAN et al., 2000).

A AMe, associada à AMBL, está relacionada à indução da formação da memória modulada pelos glicocorticóides (ROOZENDAAL; McGAUGH, 1996). Isto é observado quando situações emocionais, tais como a exposição do animal a seu predador natural, iniciam uma seqüência de eventos fisiológicos envolvendo a liberação de hormônios advindos da medula da adrenal (como a epinefrina) e a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical (HPA), resultando em aumento de corticosterona em circulação sanguínea (ROOZENDAAL; McGAUGH, 1996). Muitos estudos têm determinado que glicocorticóides modulam os processos de memória em animais

treinados em uma variedade de testes de aprendizado (BOHUS; de KLOET, 1991; MITCHELL; MEANEY, 1991). Esta modulação se dá por dois sistemas de receptores para corticosterona: os mineralocorticóides e os glicocorticóides (de KLOET et al., 1988; de KLOET, 1991). A AMe, a ACe e a AMBl apresentam alta densidade desses dois receptores (ALLEN; ALLEN, 1974) e acredita-se que, por isto, tais regiões estejam relacionadas a esse tipo de processo mnemônico.

A AMe possui um grande envolvimento nas atividades neuroendócrinas hipotalâmicas durante uma resposta emocional. Em roedores, as respostas do eixo HPA para o estresse são seguidas pela ativação de células secretórias de ocitocina, um dos hormônios relacionados com o estresse (MIYATA et al., 1995). Lesões excitotóxicas na AMe de ratos suprimiram respostas do eixo HPA quando esse animais foram expostos a um efeito estressor (isolamento) bloqueando, também, a neurosecreção de ocitocina nos núcleos supra-óptico e paraventricular. Os achados desse estudo demonstraram que a AMe é o primeiro local, dentro da amígdala, responsável pelo controle do HPA e pelas respostas secretórias ocitocinérgicas frente a um evento estressor emocional incondicionado (DAYAS et al., 1999).

O aprendizado modulado pela AMe está relacionado a estímulos olfativos (HINES et., 1992; McGAUGH, 1992; HESS et al., 1997). Nos estudos onde foram comparados diferentes estágios da discriminação do aprendizado olfativo em ratos foi detectado um aumento da proteína Fos neste núcleo durante a exploração genital inicial feita pelo macho em fêmeas. No entanto, durante treino da discriminação olfativa, a expressão de Fos na AMe mostrou-se baixa em comparação a outros núcleos amigdalóides. Pode-se observar com isso que a ativação de AMe se alterna,

comparativamente a outros núcleos amigdalóides, conforme a demanda da tarefa e os estágios de aprendizado (HESS et al., 1997).

Além do envolvimento em respostas ao estresse, em gatos e ratos está bem estabelecido o papel da AMe na regulação do comportamento agressivo e defensivo relacionado com informações sensoriais olfativas (KOOLHAAS et al., 1980; SLODDART-APTER et al., 1980; SIEGEL et al., 1986; BLOCH; GORSKI, 1988; SIEGEL; BRUTUS, 1990; DIELENBERG et al., 2001). Por exemplo, ratos com lesão eletrolítica bilateral da AMe e colocados em uma caixa para disputa de território, apresentaram diminuição do comportamento agressivo quando comparados aos controles (VOCHTELOO; KOOLHAAS, 1987). Em outros modelos experimentais, onde o comportamento defensivo foi desencadeado pelo odor de um predador (como por exemplo, o cheiro de um gato quando colocado próximo ao rato), somente a AMePV parece estar envolvida (SHEEHAN et al., 2000). Onde, porém, o odor não é o fator preponderante a ser testado, regiões envolvidas nas respostas de ansiedade, como a ACe, AMBI e outros subnúcleos da AMe, como a AMePD, podem estar ativadas (DIELENBERG et al., 2001). Sabe-se que, em ratos, a AMe constitui o primeiro componente facilitatório do sistema límbico para a expressão do componente defensivo e para ataque predatório (SHAIK et al., 1993). Esta função foi observada quando a AMe e o hipotálamo medial e lateral foram estimulados eletricamente. Como resultado, concluiu-se que a AMe gera importante aferência monossináptica excitatória ao hipotálamo medial, promovendo a expressão do comportamento agressivo (CUELLO; KANAZAVA, 1978; McLEAN et al., 1985; HARLAN et al., 1989; SWANN; NEWMAN, 1992).

Ademais, o controle do comportamento reprodutivo também envolve a AMe de machos e fêmeas e, acredita-se que isto ocorra possivelmente a partir de estímulos olfativos (KLING; BROTHERS, 1992; KONDO; ARAI, 1995). Em ratos, aferências quimiossensoriais do bulbo olfativo e do órgão vomeronasal (LEHMAN; WINANS, 1982; KONDO, 1992; WONG et al., 1993; KONDO; ARAI, 1995; DOMÍNGUEZ; HULL, 2001) projetam-se para a AMe. Esse núcleo, por sua vez, processa tais informações olfativas e envia-as para áreas motoras e neuroendócrinas do telencéfalo basal, para a MPOA e outros núcleos hipotalâmicos e, também, para o tronco encefálico (LEHMAN; WINANS, 1982; CANTERAS et al., 1995; KONDO; ARAI, 1995; WOOD, 1997; DOMÍNGUEZ; HULL, 2001; PETROVICH et al., 2001). De fato, hamsters machos que sofreram lesão na AMe perderam o comportamento de acasalamento e diminuíram sua investigação olfativa direcionada aos genitais das fêmeas (LEHMAN; WINANS, 1982; TAKAHASHI; GLADSTONE, 1988). Já ratas submetidas à lesão na AMePD, que quando colocadas junto a ratos, mostraram redução da ocorrência de atividade pré-copulatória (exploração olfativa) e aumento na duração da cópula. Após a cópula, elas buscavam menos freqüentemente seus companheiros de acasalamento quando comparadas às ratas submetidas à lesão fictícia. Tais fêmeas foram colocadas também junto a outras lesadas e apresentaram diminuição do comportamento ofensivo dentro de seu grupo e direcionado aos animais controle (LEHMAN; WINANS, 1982). Sugeriu-se, assim, que lesões na AMe causam alterações significativas nos modelos de respostas sociais e sexuais em ratas, o que reforça a sugestão de que a AMe poderia ser um componente neural do sistema de regulação do comportamento copulatório de ratas (VOCHTELOO; KOOLHAAS, 1987; TAKAHASNI; GLADSTONE, 1998).

Em ratos, a AMe facilita as respostas aos estímulos sexuais. Lesões nesta área de machos afetaram o comportamento sexual, produzindo diminuição na frequência de ejaculações, aumento do número de intromissões precedendo a primeira ejaculação e aumento do intervalo entre as intromissões, quando comparados a animais não lesionados (KONDO, 1992; MEISEL; SACHS, 1994). Estudos mais detalhados sugerem que os subnúcleos da AMe são capazes de apresentar diferentes papéis na regulação do comportamento sexual masculino (NEWMAN, 1999; DOMÍNGUEZ et al., 2001; de CASTILHOS et al., artigo submetido). E isto ficou caracterizado quando ratos, com lesão na AMePD, reduziram o comportamento copulatório e a ereção peniana desencadeada pelo odor da fêmea em estro (KONDO et al., 1999). Por outro lado, a investigação olfativa genital, realizada por machos nas fêmeas, leva a um aumento na ativação da proteína Fos na AMePD e na divisão medial da AMBL (COOLEN et al., 1997). A proteína Fos também se mostrou aumentada na AMePD de ratos após a ejaculação (COOLEN et al., 1997). Torna-se congruente, portanto, o fato de que ratos com lesão da AMePD apresentaram decréscimo na investigação genital e um aumento na latência para ejaculação e intromissões precedendo a primeira ejaculação (NEWMAN, 1999; DOMÍNGUEZ et al., 2001).

Foi descrito por Newman (1999) que células pertencentes ao circuito que incluía a AMeAD e a porção intermediária do núcleo próprio da estria terminal (BNSTi), assim como a porção central da AMePD (AMePDc) e a porção póstero-medial do núcleo próprio da estria terminal (BNSTpm), apresentaram aumento na produção da proteína Fos de forma diferenciada após comportamentos sociais variados. Ratos com lesão da AMeAD diminuíram suas atividades copulatórias e de investigação olfativa, enquanto neurônios da AMeAD e BNSTi mostraram aumento generalizado e equivalente na

produção de Fos após acasalamento e encontro agressivo entre machos. Grupamentos de células na AMePDc e BNSTpm exibiram aumento da imunoreatividade à proteína Fos relacionada à percepção de feromônios ou após ejaculações, isto de forma mais intensa na parte mais lateral da AMePD (NEWMAN et al., 1999; COOLEN et al., 1997).

Também no comportamento maternal observou-se o envolvimento da AMe quando tal atividade foi desencadeada por estímulos olfativos e sensoriais. O comportamento maternal depende de sinais olfativos que ativam a AMe durante a interação da mãe com os filhotes (NUMAN et al., 1993; FLEMING et al., 1994). Ratas com lesão na AMe reduzem seu contato com sua própria prole, enquanto que a exposição da mãe ao filhote induz a ativação da proteína Fos nesta região (KIRKPATRICK et al., 1994a; 1994b). Estimulação de abrasamento (um dos procedimentos que serve para gerar aumento de atividade neural e sináptica) na amígdala é capaz de gerar concomitantemente agressão, rejeição aos filhotes, ansiedade e também inibir a ocorrência do comportamento maternal em ratas (BAWDEN; RACINE, 1979; ADAMEC, 1991). Baseado nisso, há indícios que a AMe de roedores, onde o sistema de transmissão vomeronasal é modulado por neurônios sensíveis a estrógenos e a andrógenos, faça parte de um sistema integrado que controla o comportamento maternal e sexual de machos e fêmeas (HINES et al., 1992). E sendo assim, a AMe apresenta um papel inibitório sobre o comportamento maternal de ratas. Essa inibição envolve projeções da AMe para os núcleos hipotalâmicos anterior e ventromedial, de forma direta ou indireta, em um circuito neural que inibe o comportamento maternal pelo processamento de informações olfativas (SHEEHAN et al., 2001). De fato, a AMePD e regiões hipotalâmicas mediais são apontadas como as principais áreas moduladoras desse comportamento em experimentos usando a proteína

Fos para identificar regiões encefálicas mais ativadas pela exposição de ratas nulíparas a filhotes de outras ratas (SHEEHAN et al., 2000). Estudos subseqüentes, no entanto, apontam também a AMePV e o hipotálamo anterior como as áreas igualmente envolvidas nesta inibição (SHEEHAN, et al., 2001).

É muito importante também ressaltar que um dos principais papéis funcionais das projeções da AMePD para o núcleo hipotalâmico ântero-ventral periventricular (AVPV) é a regulação da liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), imprescindível para o ciclo reprodutivo (SIMERLY, 1998). Recentemente, Newman (1999) sugeriu que as conexões neuronais e sua sensibilidade aos hormônios sexuais são dinamicamente moduladas no decorrer da vida e que essas células regulam os comportamentos sexuais femininos. Neste sentido, os subnúcleos da AMe podem estar envolvidos na organização das fases do ciclo estral, juntamente com o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMN), AVPV, MPOA e núcleo arqueado. Sendo assim, as conexões da AMePD com os núcleos hipotalâmicos podem regular a liberação do GnRH (KALRA, McCANN, 1975; SIMERLY, 1998; ETGEN et al., 1999) e/ou diminuir a ocorrência de comportamento defensivo e modular a receptividade sexual feminina.

Citoarquitetura da AMe e Estrutura Neuronal

A morfologia dos neurônios da AMe tem sido estudada pelo método de Golgi, técnica que quando bem sucedida, impregna corpo celular, axônio, dendritos e espinhos de aproximadamente 1-10% de todos os neurônios de uma determinada região do

sistema nervoso central (RAMÓN Y CAJAL, 1909; VALVERDE, 1962; SCHEIBEL, 1978; WOOLLEY; McEWEN, 1993; RASIA-FILHO et al., 1999, 2004). Por meio dessa técnica, foram estudados neurônios da AMe de gatos (HALL, 1972; TÖMBÖL; SZAFRANSKA-KOSMOL, 1972; PRICE, 1987), cães (MUKHINA; LEONTOVICH, 1970), camundongos (VALVERDE, 1962) e ratos (YU, 1969; de OLMOS et al., 1985; PRICE, 1987). Nesses estudos foram observadas semelhanças histológicas nas células da AMe das diferentes espécies e a presença de um tipo celular apenas, ou seja, neurônios multipolares, sendo eles muito parecidos ao principal tipo celular encontrado na subdivisão medial da ACe (KAMAL; TÖMBÖL, 1975; McDONALD, 1992).

Os neurônios multipolares da AMe são de tamanho pequeno (corpos celulares com 8-10 μm de diâmetro) ou médio (corpos celulares com 10-15 μm de diâmetro; McDONALD, 1992; RASIA-FILHO et al., 1999) ou uniformemente pequenos (KAMAL; TÖMBÖL, 1975; GOMEZ; NEWMAN, 1991), havendo ainda a possibilidade de se encontrar células grandes em direção à porção rostro-dorsal deste núcleo (ALHEID et al., 1995). Seus corpos celulares podem ser ovais (McDONALD, 1992) ou fusiformes (KAMAL; TÖMBÖL, 1975; GOMEZ; NEWMAN, 1991).

Os subnúcleos AMeAV e AMePD caracterizam-se por apresentar denso conjunto de células de tamanho médio, enquanto a AMeAD e AMePV apresentam células isomórficas. A AMePD, particularmente no sentido dorso-ventral, apresenta células que se distribuem em três colunas orientadas paralelamente em relação a sua superfície medial. A primeira coluna é a coluna superficial ou coluna medial (AMePDm), sendo formada por células agrupadas e de tamanho médio, a segunda coluna está arranjada de modo a constituir uma coluna intermediária de células também

de tamanho médio (AMePDi; ALHEID et al., 1995). A terceira coluna é a mais “profunda” e é a coluna mais lateral (AMePDI), também formada por células de tamanho médio densamente agrupadas, mas menores com relação à primeira coluna (ALHEID et al., 1995; de OLMOS et al., 2004). Como anteriormente descrito, a AMe é envolta, medialmente e ventralmente, por uma camada distinta de células mais dispersas, denominada originalmente de camada molecular (NISHIZUKA; ARAI, 1983), mas que constitui eferência da via olfativa acessória (SCALIA; WINANS, 1975).

Nos casos em que axônios dos neurônios da AMe foram impregnados pela prata em toda sua extensão foi observado que eles se dirigiam medialmente em direção à própria AMe ou em direção à estria terminal (TÖMBÖL; SZAFRANSKA-KOSMAL, 1972; KAMAL; TÖMBÖL, 1975). Também é característico dos axônios dos neurônios da AMe seguir um curso sinuoso e originar ramos colaterais, com poucas ramificações que são distribuídos nas proximidades de seus corpos celulares. Esses axônios entram na estria terminal, e, por esta razão, os neurônios têm sido classificados como de projeções longas (VALVERDE, 1962; KÄMAL; TÖMBÖL, 1975). Além de seguirem para a estria terminal, esses axônios dirigem-se para a “ansa peduncularis”. Essas projeções, especificamente as da porção posterior da AMe, que terminam na área medial da região posterior do núcleo próprio da estria terminal são conexões densas e bidirecionais (VALVERDE, 1962; CANTERAS et al., 1995). Botões terminais com vesículas sinápticas do tipo achatadas foram observados nos axônios dos neurônios da AMe de gatos. Tanto a AMe quanto a ACe apresentaram numerosos botões sinápticos com este tipo de vesículas. Os botões terminais eram frequentemente grandes, e,

ocasionalmente, muito alongados e as vesículas eram densamente distribuídas, algumas ovais, outras esféricas (NARKIEWICZ et al., 1978).

Neurônios multipolares do tipo bipenachado, com dois ramos dendríticos primários (FERNANDEZ-GALAZ et al., 1997) e do tipo estrelado, com três ou mais ramos dendríticos originados do soma neuronal, também foram descritos como característicos da AMeAD, AMePD e AMePV (RASIA-FILHO et al., 1999, 2004). As células bipenachadas usualmente apresentam dois dendritos primários os quais originam poucos ramos subseqüentes e se estendem a distâncias variadas dentro dos subnúcleos da AMe (MILHOUSE; de OLMOS, 1981; McDONALD, 1992; ALHEID et al., 1995). Os ramos dendríticos são descritos como sendo longos (GOMEZ; NEWMAN, 1991; McDONALD, 1992) ou de comprimento variável (NARKIEWICZ et al., 1978; RASIA-FILHO et al., 1999), grossos, razoavelmente retilíneos e pouco numerosos. A esparsa arborização dendrítica é uma característica peculiar da AMe de forma geral, porém esta diferenciação não é válida quando se pretende distinguir esse núcleo da substância *inominata*, área amigdalóide anterior e da porção medial da ACe, pois os neurônios de todas essas regiões adjacentes são muito parecidos aos da AMe (McDONALD, 1992). Muitos dendritos da AMe estendem-se ao longo da superfície pial de uma maneira oblíqua ou perpendicular. Alguns deles, localizados na porção profunda, mais lateral da AMe, são orientados paralelamente às fibras da estria terminal adjacente, sendo que esses dendritos são geralmente de células bipenachadas.

Historicamente, os dendritos têm servido para auxiliar na nomenclatura neuronal e apresentam uma função estrutural relacionada com a seleção e o estabelecimento de conexões sinápticas (JONES; COWAN, 1983). Seu papel na integração de sinais

elétricos, de forma passiva ou ativa recebe cada vez mais atenção (WOOLF et al., 1991; SHEPHERD, 1999; SEGAL; ANDERSEN, 2000). Os dendritos apresentam formas e tamanhos variados, estão presentes em todas as espécies animais que possuem sistema nervoso e continuam a se desenvolver após o nascimento de acordo com o estabelecimento dos circuitos neurais. A diversidade observada no padrão de excitabilidade dendrítica aumenta com a sua variação morfológica e pela distribuição espacial de seus canais iônicos com suas cinéticas de abertura e fechamento ou inativação. Algumas destas alterações são rápidas, outras são a longo prazo (HÄUSSER et al., 2001). A arborização dendrítica desempenha um papel chave na integração de entradas e saídas sinápticas com a atividade própria do neurônio. O padrão de arborização dendrítica pode refletir a atividade sináptica da célula nervosa, como, por exemplo, arborizações amplas significam uma maior superfície disponível para contatos sinápticos para o neurônio, ou, alternadamente, dendritos de menor diâmetro podem representar maior resistência para propagação de impulsos nervosos (KOCK; ZADOR, 1993; SHEPHERD, 1999; HÄUSSER et al., 2000; SEGAL; ANDERSEN, 2000).

Os dendritos podem apresentar protusões membranosas denominadas de espinhos que, conjuntamente, influenciam a atividade celular. O espinho dendrítico clássico é caracterizado por uma cabeça bulbosa que está conectada ao dendrito por um pescoço fino. Esta cabeça pode conter algumas estruturas especializadas como microfilamentos de actina (MATUS et al., 1982; CAPANI et al., 2001), retículo endoplasmático liso (REL; SPACEK; HARRIS, 1997) e o dito “aparato do espinho” (GRAY; GUILLERY; 1963) que consiste de dois ou mais discos de REL separados por um material elétron-denso (WESTRUM et al., 1980; CAPANI et al., 2001). Uma característica peculiar dos espinhos dendríticos é a sua variabilidade morfológica. Por

isso, eles foram divididos em várias categorias segundo sua forma. A nomenclatura mais comumente utilizada, consolidada por Peters & Kaserman-Abramof (1970), divide os espinhos em três categorias principais baseadas essencialmente nos tamanhos relativos da cabeça e do pescoço: “mushroom spines”, ou espinhos em forma de cogumelo, com uma cabeça grande e um pescoço fino; “thin spines”, ou espinhos delgados e que têm uma cabeça pequena e um pescoço fino; e, espinhos do tipo “stubby” que não possuem pescoço, estando sua cabeça diretamente ligada ao dendrito. Alguns outros autores incluem uma quarta categoria, o espinho em forma de filopódio (SKOFF; HAMBURGER, 1974).

O espinho é uma estrutura especializada para a transmissão sináptica. Os receptores para diversos transmissores estão restritos à superfície do espinho e concentrados próximo aos elementos pré-sinápticos (NUSSER et al., 1998). Via de regra (e a exceção ocorre no bulbo olfativo, por exemplo), os espinhos dendríticos são referidos como especializações pós-sinápticas (BRADLEY et al., 1999) e constituem uma unidade de entrada para a atividade sináptica (WOOLF et al., 1991). São estruturas que desempenham papel essencial na transmissão sináptica rápida e em processos relacionados com a plasticidade nervosa tal como a atividade potencializada a longo prazo (LTP) ou diminuída a longo prazo (LTD), que podem ser as bases do aprendizado e da memória em diferentes áreas do SNC (KOCK; ZADOR, 1993; SHEPHERD, 1996). Também apresentam função importante na regulação do cálcio intracelular, que é lançado para os ramos dendríticos após a atividade sináptica em situações fisiológicas, o que lhes confere propriedades neuroprotetoras para evitar que os níveis de Ca^{++} atinjam valores capazes de induzir morte celular não planejada (GUTHRIE et al., 1991; KOCK;

ZADOR, 1993; GOLD; BEAR, 1994; HARRIS; KATER, 1994; SEGAL, 1995a; 1995b; SHEPHERD, 1996; KORKOTIAN; SEGAL, 1998).

Alguns estudos de ultraestrutura considerando o aparecimento de sinapses nos espinhos dendríticos na AMePD sugerem que esses espinhos possam ter um importante papel excitatório (GRAY, 1959). Algumas vesículas elétron-lúcidas foram descritas contendo transmissores excitatórios (PETERS et al, 2001). Células imunorreativas ao glutamato foram encontradas na AMe de gerbilos machos (SIMMONS; YAHR, 2003), embora a quantidade de glutamato e aspartato nesse núcleo seja menor do que em outros núcleos amigdalóides (OTTERSEN et al., 1986; GLOOR, 1997). Por outro lado, também foram observados axônios terminais contendo vesículas elétron-lúcidas pleomórficas em sinapses simétricas na AMePD. De acordo com Peters e colaboradores (1991), esses axônios podem conter GABA, e estudos prévios já demonstraram a presença deste neurotransmissor na AMe de gatos (PARÉ; SMITH, 1993), de gerbilos (SIMMONS; YAHR, 2003) e de ratos (NITECKA; BEM-ARI, 1987; STEFANOVA, 1998; STEFANOVA; OVTSCHAROFF, 2000). Tanto as conexões da AMeAD com a região pósterointermediária da estria terminal como a região pósteromedial da estria terminal formam um circuito que contém neurônios que produzem glutamato descarboxilase (GAD), enzima que converte glutamato em GABA (WONG; MOSS, 1992; WATANABE et al., 1995; STEFANOVA, 1998; OBERTO et al., 2001). A imunistoquímica para GABA e a hibridização *in situ* para GAD revelaram uma banda densa de neurônios que se estendem ventralmente e ininterruptamente através dos núcleos caudado, putâmen, ACe e AMe, terminando ao longo da extremidade ventromedial do hemisfério cerebral. Isto levou alguns autores (SWANSON; PETROVICH, 1998) a presumir que a AMe deveria fazer parte de um circuito estriatal

ou fazer parte do que veio a se chamar de “amígdala expandida” (de OLMOS et al., 1985; ALHEID, 1995; NEWMAN, 1999, 2002; de OLMOS et al., 2004; mas veja-se também CANTERAS et al., 1995).

Vários outros transmissores químicos e neuromoduladores são encontrados na AMe, predominantemente na porção caudal da AMePD. Em ratos e hamsters, há neurônios que sintetizam substância P, arginina-vasopressina, colecistoquinina, encefalinas, somatostatina, ocitocina, angiotensina II, neurotensina, galanina, hormônio liberador de corticotrofina e GnRH (FRANKFURT et al, 1985; MALSBURY; McKAY, 1987; MICEVICH, 1988; SWANN; ADAMEC, 1991; NEWMAN, 1992; MALSBURY; McKAY, 1994; De VRIES, 1995; LU et al., 1995; ECKERSELL; MICEVICH, 1997; HOLT, 1997; VEINANTE; FREUND-MERCIER, 1997; GLOOR, 1997; NEWMAN, 1999; De OLMOS, 2004 BREIGEIRON et al., 2004). As células da AMePDc apresentam imunoreatividade característica para dopamina (ASMUS et al., 1992), enquanto a AMePDi contém menor quantidade de ocitocina quando comparada às colunas medial e lateral desta subregião (VEINANTE; FREUND-MERCIER, 1997). É interessante que na AMePD seja observada a maior quantidade de neurônios expressando colecistoquinina, substância P e angiotensina II (LIND; GANTEN, 1990; SIMERLY et al., 1990). Essas diferenças neuroquímicas dos subnúcleos da AMe são indícios de que a inter-relação entre eles, e deles com outras regiões do SNC, podem ser distintas (CANTERAS et al., 1995; PITKÄNEN, 2000).

Importância do Estudo dos Espinhos Dendríticos sob Ação dos Hormônios Gonadais Femininos

A AMe, por ser uma área sexualmente dimórfica em ratos, apresenta diferenças morfológicas, neuroquímicas e nas conexões de seus neurônios quando se comparam machos e fêmeas. Igualmente, diferenças entre os sexos são encontradas na imunoreatividade para a proteína fibrilar ácida glial (GFAP) sendo maior em fêmeas do que em machos na AMePD e AMePV (RASIA-FILHO et al., 2002). Esse dimorfismo tem sido relacionado à ação dos hormônios gonadais, já que a AMe apresenta neurônios com receptores para esteróides sexuais (SIMERLY et al., 1990), como mencionado anteriormente. Isto é importante porque diferenças morfológicas nos neurônios, induzidas por hormônios gonadais, foram evidenciadas em algumas outras regiões do sistema nervoso, como, por exemplo, no VMN, que constitui uma importante estrutura na mediação do comportamento sexual de “lordose” em ratas e é dependente da ação seqüencial de estrógeno e progesterona durante o ciclo estral normal (FRANKFURT et al., 1990; WONG et al., 1993; MURPHY; SEGAL, 1996). Neste núcleo foi observada uma diminuição significativa na densidade de espinhos dendríticos nos neurônios de ratas ovariectomizadas. Submetidas à castração, as fêmeas apresentaram menor densidade de espinhos em dendritos primários quando comparadas a ratas ovariectomizadas mas tratadas com estrógeno, ou ovariectomizadas e tratadas com estrógeno e progesterona ou ainda, em ratas intactas não manipuladas experimentalmente (McEWEN, 1990). Ademais, a densidade de espinhos dendríticos em neurônios do VMN apresentou uma notável plasticidade quando se estudou sua variação ao longo do ciclo estral, sendo que na fase de diestro e pró-estro a densidade de espinhos foi significativamente menor do que nas demais fases (FRANKFURT et al.,

1990). E o mesmo ocorreu nos dendritos das camadas lacunosa e molecular de neurônios piramidais da região CA1 hipocampal (WOOLLEY; GOULD; FRANKFURT; McEWEN, 1990).

Variações morfológicas mediadas por hormônios gonadais também foram verificadas nos neurônios da AMe de ratas, onde foi observado que o tamanho deste núcleo (mas não área do corpo celular neuronal nas regiões anterior e posterior da AMe), o número de espinhos dendríticos e a quantidade de receptores nicotínicos para acetilcolina são maiores em machos do que em fêmeas (NISHIZUKA; ARAI, 1981a; ARIMATSU et al., 1981; HINES et al., 1992; RASIA-FILHO et al., 1999, 2004). Dessa forma, parece ser o neuropilo o local das mudanças morfológicas mediada pelos esteróides sexuais nos neurônios da AMe (RASIA-FILHO et al., 1999). Esses dados passam a ter especial relevância ao se entender que neurônios podem desempenhar várias ações de acordo com sua hodologia, atividade elétrica, forma e propriedade intrínseca da membrana e que suas respostas aos hormônios gonadais podem alterar tais propriedades (WOOLLEY; McEWEN, 1993; EVERITT, 1995; RASIA-FILHO et al., 1999). Por exemplo, essas modificações são ratificadas nos trabalhos onde neurônios do hipocampo dorsal ou do núcleo ventromedial do hipotálamo (VMN) tiveram modificadas as densidades de espinhos dendríticos após ovariectomia e / ou administração de hormônios gonadais em ratas adultas (FRANKFURT et al., 1990; WOOLLEY; McEWEN, 1993). Em níveis fisiológicos, a própria variação hormonal detectada durante o ciclo estral da rata é capaz de modificar a morfologia e a funcionalidade dos neurônios e dos astrócitos hipotalâmicos (GARCIA-SEGURA et al., 1989; FRANKFURT et al., 1990).

Como os espinhos são considerados indicadores de atividade sináptica de um neurônio (PETERS, et al., 1991; SHEPHERD, 1996; SHEPHERD, 1999; KANDEL, 2000) e sua distribuição, forma e tamanho estão diretamente relacionados com a função do neurônio (WOOLF et al., 1991), o estudo da densidade de espinhos na AMePD poderá ajudar a elucidar a atividade celular local. A densidade de espinhos dendríticos tanto no hipocampo quanto na AMe varia conforme as flutuações dos hormônios esteróides durante o ciclo estral (WOOLLEY et al., 1990; WOOLLEY, McEWEN, 1993, RASIA-FILHO et al., 2004). Quando os hormônios ovarianos são removidos pela castração, a densidade de espinhos dendríticos nas células piramidais na região CA1 do hipocampo diminui, e esta diminuição nos espinhos pode ser prevenida ou revertida pelo tratamento com estradiol (WOOLLEY, McEWEN, 1993). Não há dados até o momento sobre o que ocorre na AMePD de fêmeas neste sentido.

Por fim, receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-*D*-aspartato (NMDA) apresentam um papel fundamental no estabelecimento de conexões sinápticas apropriadas durante o desenvolvimento do SNC (CLINE et al., 1987; BEAR et al., 1990; LAU et al., 1992; RABACCHI et al., 1992). Também é claro o fato de que mudanças na estrutura neuronal e no padrão de conectividade sináptica ocorre não somente no desenvolvimento, mas também no sistema nervoso adulto (ARNOLD; BREEDLOVE, 1985; GOULD et al., 1991; HORNER et al., 1993). Woolley e McEwen (1994) demonstraram que o estradiol induz mudanças na densidade de espinhos dendríticos no hipocampo de ratas castradas e que, algo muito interessante, tal alteração requer inicialmente ativação de receptores do tipo NMDA. Isto poderia indicar que parte das ações do estradiol ocorre por intermédio das conexões sinápticas feitas em CA1. Igualmente, não há, até o momento, estudos semelhantes a este de Woolley e

McEwen (1994) envolvendo a AMePD de ratas. Sabe-se que tal estrutura possui espinhos dendríticos que variam inversamente com os níveis hormonais durante o ciclo ovulatório normal (RASIA-FILHO et al., 2004), mas não há nenhum relato na literatura dos efeitos da ovariectomia e da reposição hormonal com estradiol e/ou progesterona sobre a densidade de espinhos dendríticos na AMePD. E nem se o aumento dos espinhos dendríticos depende da atividade de sinapses glutamatérgicas e de receptores do tipo NMDA na AMePD. E esse tipo de conhecimento é relevante face ao fato de que a AMePD é região sexualmente dimórfica, participa da modulação do comportamento sexual e maternal de fêmeas e da liberação de GnRH por influenciar a atividade de áreas hipotalâmicas, imprescindíveis para a fisiologia do comportamento reprodutivo feminino.

OBJETIVOS

Gerais:

Estudar a ação dos hormônios gonadais femininos na densidade de espinhos dendríticos, estudados pela técnica de Golgi, na AMePD de ratas ovariectomizadas e tratadas com estradiol e progesterona como terapia substitutiva. Busca-se também determinar se a ação do estradiol na indução da ocorrência de espinhos dendríticos está relacionada com a transmissão sináptica glutamatérgica via receptor do tipo NMDA.

Específicos:

Determinar a densidade de espinhos nos primeiros 40 μm dendríticos, por ser medida fidedigna deste parâmetro, nos neurônios da AMePD de ratas ovariectomizadas submetidas à terapia hormonal substitutiva com estradiol ou estradiol e progesterona, comparadas com grupo controle específico.

Estudar se a ação dos hormônios gonadais sobre a densidade de espinhos dendríticos na AMePD é dependente de receptores do tipo NMDA, utilizando-se um antagonista competitivo (LY235959) desses receptores em conjunto com a terapia

hormonal substitutiva com estradiol e comparando seu resultado com seu respectivo grupo controle.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

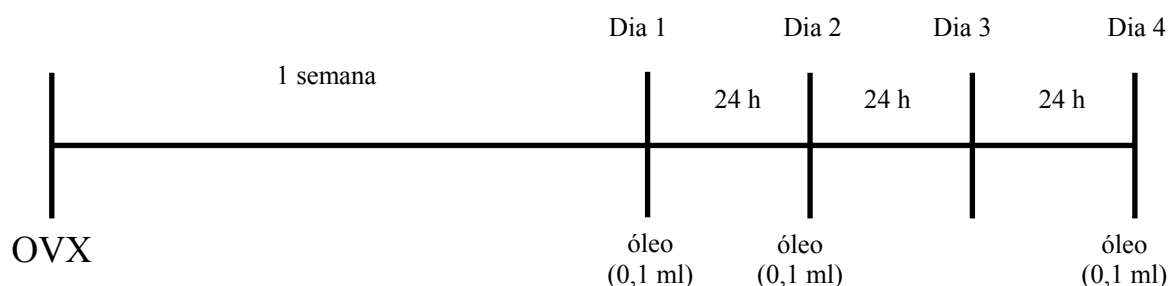
Foram utilizadas ratas Wistar virgens e adultas (n = 30), com 3-5 meses de idade, obtidas no biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. As fêmeas foram mantidas em grupos (no máximo cinco por caixa padrão) com livre acesso à água e comida. A temperatura foi mantida em torno de 20° C e em ciclo claro/escuro de 12 h cada (ciclo claro iniciando às 9 h). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais empregados ou seu sofrimento ao longo de todo o experimento, guardada a variabilidade dos resultados inerente à técnica de Golgi empregada. Foram também seguidas todas as normas nacionais e internacionais para experimentação animal em condições éticas de trabalho.

Procedimento Cirúrgico e Terapia Hormonal Substitutiva

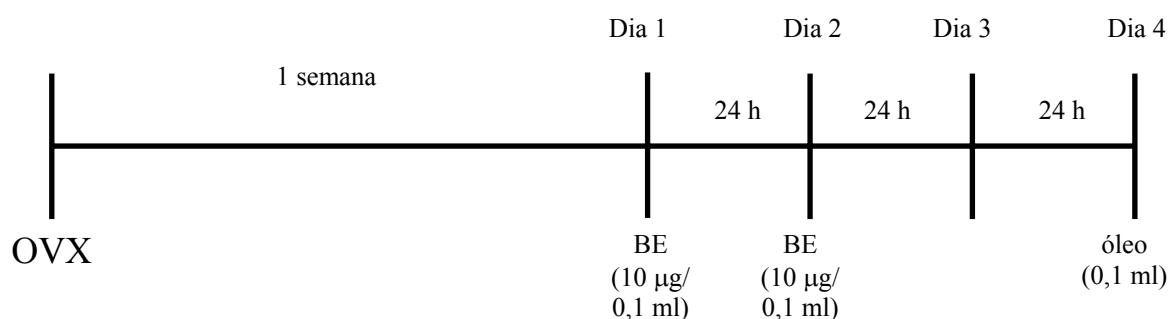
As ratas tiveram seu ciclo estral avaliado quanto à sua normalidade (fases de diestro, pró-estro, estro e metaestro) por meio da citologia vaginal realizada diariamente durante um período de duas semanas. Classicamente, cada uma dessas fases distingue-se pela preponderância de tipos celulares característicos, que são: leucócitos em diestro,

células epiteliais em pró-estro, células queratinizadas no estro ou uma mescla dos três tipos celulares no metaestro (NELSON, 1995). Ao final dessas duas semanas somente as fêmeas que tinham ciclos regulares foram selecionadas para estudo, o que ocorreu com a imensa maioria. As ratas foram anestesiadas com quetamina (46 mg/0,4 ml) e xilasina (4 mg/0,2 ml) injetadas por via intramuscular (i.m.), e ovariectomizadas, bilateralmente, por acesso cirúrgico dorsal. Após a retirada dos ovários e a sutura por planos, as ratas foram recolocadas em suas respectivas caixas para recuperação pós-operatória. Sete dias após o procedimento cirúrgico, as ratas foram divididas nos seguintes grupos experimentais com $n = 6$ em cada um deles, e com metodologia baseada em estudos previamente publicados (WOOLLEY; McEWEN, 1994):

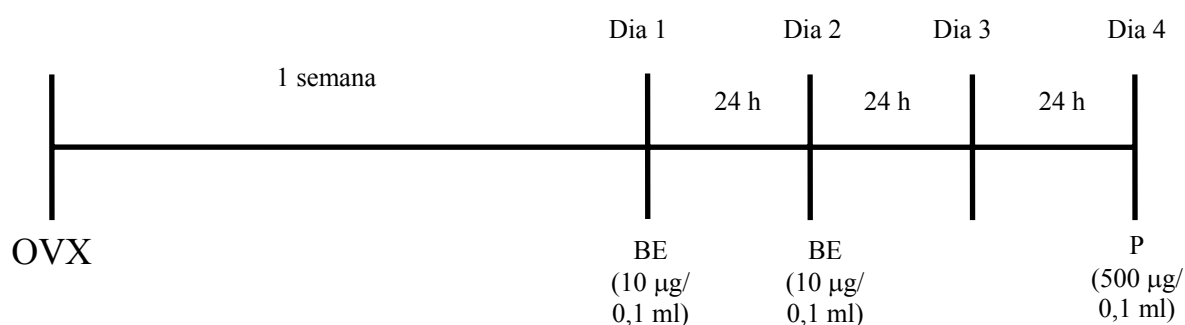
- grupo 1: fêmeas ovariectomizadas (OVX) e que receberam três injeções subcutâneas (s.c.) de veículo (óleo de gergelim) em volume de 0,1 ml, no horário da manhã (às 9 h), servindo como grupo controle. A primeira dose foi dada no primeiro dia da terapia substitutiva (dia 1), a segunda dose de óleo foi dada 24 h depois da primeira dose (dia 2), e a terceira dose foi dada 48 h após a segunda dose e 5 h antes da rata ser submetida à técnica de Golgi (dia 4 da terapia substitutiva), conforme o seguinte esquema:



- grupo 2: fêmeas OVX e que receberam benzoato de estradiol (BE; Sigma Chemicals Co., EUA) na dose de 10 μ g diluídos em 0,1 ml de veículo (óleo de gergelim) sob o seguinte protocolo: a primeira dose de BE foi dada no primeiro dia de terapia substitutiva (dia 1), a segunda dose de BE foi dada 24 h depois da primeira dose (dia 2) e a terceira dose foi de veículo (óleo) na dose de 0,1 ml, 48 h após a segunda dose de BE e 5h antes da rata ser submetida à técnica de Golgi (dia 4), conforme o esquema a seguir:

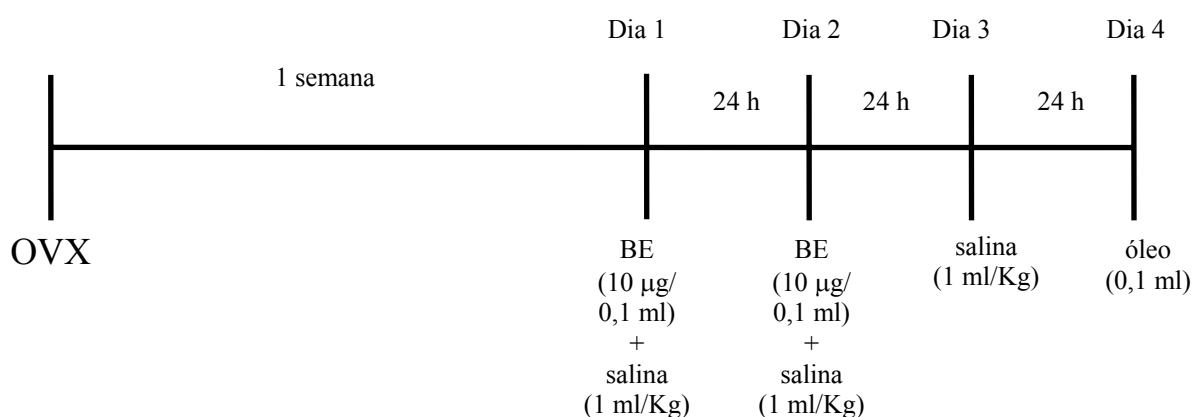


- grupo 3: fêmeas OVX e que receberam 10 μ g de BE e 500 μ g de progesterona (P; Sigma Chemicals Co., EUA) ambos diluídos em 0,1 ml de veículo (óleo de gergelim), sob o seguinte esquema: a primeira dose de BE foi dada no primeiro dia da terapia substitutiva (dia 1), a segunda dose de BE foi dada 24 h depois da primeira dose (dia 2) e a terceira dose foi de P, 48 h após a segunda dose de BE e 5h antes da rata ser submetida à técnica de Golgi, conforme seguinte protocolo:

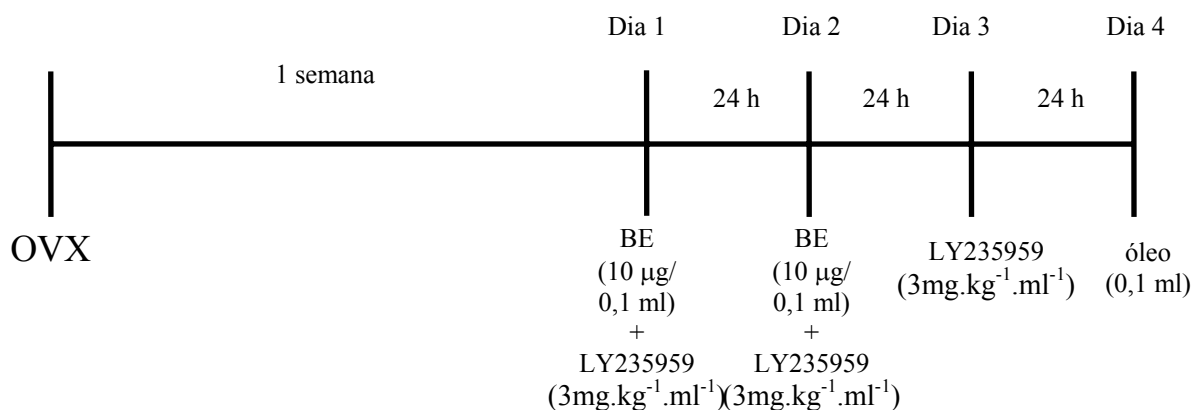


Adicionalmente, adaptado do que foi previamente realizado por Woolley e McEwen (1993), dois grupos experimentais foram incluídos para testar a ação dos receptores do tipo NMDA nas respostas específicas ao estrógeno:

- grupo 4: fêmeas OVX submetidas ao mesmo tratamento hormonal com BE e ao final com óleo, como as ratas do grupo 2, porém com duas injeções diárias de salina (1 ml/Kg i.p.) às 9 h e 30 min e às 17 h e 30 min, durante três dias consecutivos, conforme o seguinte esquema:



- grupo 5: fêmeas OVX que receberam o mesmo tratamento que as ratas do grupo anterior (grupo 4), porém com injeções de LY235959 (Tocris, EUA; 3 mg/Kg i. p.) ,antagonista competitivo dos receptores NMDA para o glutamato, duas vezes ao dia, às 9 h e 30 min e às 17 h e 30 min, durante três dias consecutivos, conforme esquema a seguir:



Não foi incluído grupo controle adicional ao experimento, quer seja submetido à castração fictícia e injeção de óleo em 3 doses, porque os dados de densidade de espinhos dendríticos (descritos a seguir) mostraram que o grupo 1 apresentou resultado muito próximo do que se encontra na fase de metaestro na AMePD de fêmeas (conforme RASIA-FILHO et al., 2004). Ademais, fêmeas após castração fictícia poderiam acabar sendo estudadas ao final de onze dias de experimento (7 dias após a castração e 4 dias de tratamento, como descrito nos outros grupos) em qualquer fase do ciclo estral. Isto acarretaria uma variabilidade indesejada nos resultados da densidade de espinhos dendríticos na AMePD (RASIA-FILHO et al., 2004).

Procedimento Histológico

Ao final do 11^o dia pós-operatório, ou seja, no 4^o dia após o início da terapia substitutiva, todas as ratas foram avaliadas quanto à citologia vaginal para avaliação da ação dos hormônios administrados e, a seguir, foram submetidas à técnica de Golgi, conforme descrito por Gabbot e Somogyi (1984), Woolley e McEwen (1993) e Rasia-Filho et al. (1999, 2004). Para tanto, as ratas de todos os grupos experimentais foram

anestesiadas com tiopental sódico (50 mg/kg i.p.) e perfundidas, por via transcardíaca, com uma solução de paraformaldeído a 4%, ácido pícrico a 1,5% e tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Após, os encéfalos foram retirados e mantidos na mesma solução fixadora por mais 24 h, sendo, então, seccionados em vibrátomo (Leica, Alemanha) em cortes coronais de 200 μ m de espessura. Esses cortes foram imersos em solução de bicromato de potássio (Merck, Alemanha) a 3% por 24 h, ao abrigo da luz. A seguir, foram lavados em água destilada, colocados em lamínulas sobrepostas e mergulhados em solução de nitrato de prata (Merck, Alemanha) a 1,5% por no mínimo 48 h, resguardados da luz. Após esse período, os cortes foram lavados com água destilada, montados em lâminas histológicas, desidratados em álcool, clareados com xilol e cobertos com bálsamo do Canadá e lamínulas.

Aquisição de dados

Para a precisa localização da AMePD foi utilizado como referencial anatômico o atlas das coordenadas estereotáxicas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998) e as descrições da AMe foram baseadas nas descrições de Alheid et al. (1995) e Canteras et al (1995). As secções contendo esta região foram projetadas em desenhos esquemáticos de cortes coronais do encéfalo. Os locais onde puderam ser identificados neurônios na AMePD, 3,14 a 3,30 mm posterior ao bregma, (PAXINOS; WATSON, 1998), foram selecionadas para estudo em microscópio óptico (Olympus BX-41, Japão) (figura 2). Os cortes do encéfalo que apresentavam aproximadamente o mesmo tamanho foram usados para análise, enquanto aqueles que pareciam estar “retraídos”, devido ao procedimento histológico e que poderiam gerar resultados incorretos, foram

descartados. O número de neurônios impregnados pela prata variou de secção para secção e, por isso, ambos os lados do encéfalo foram utilizados (GOMEZ; NEWMAN, 1991, RASIA-FILHO et al., 1999). Apesar da lateralidade da AMePD em relação ao tamanho do soma neuronal, os esteróides sexuais produzem efeitos em ambos os lados direito e esquerdo da AMePD (COOKE et al., 2003).

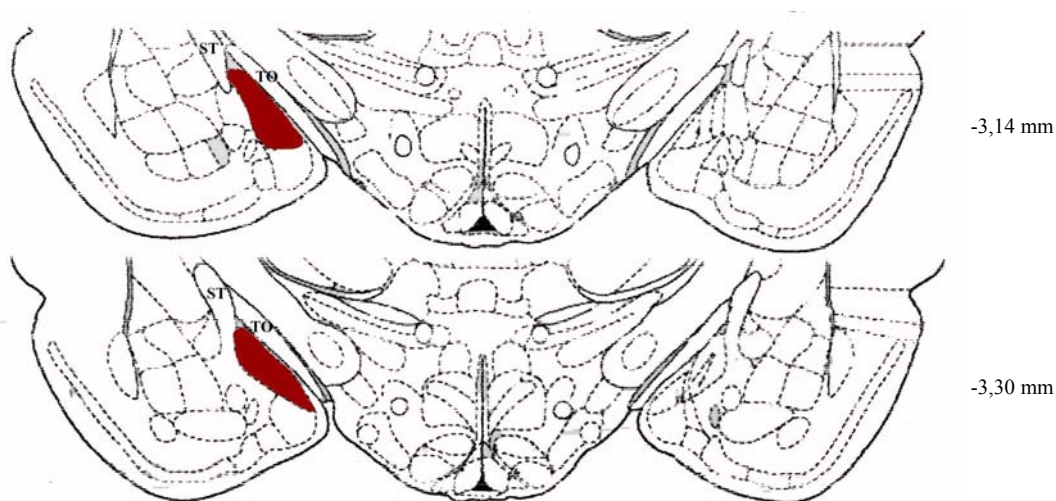


Figura 2. Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato de onde foram estudados os neurônios deste presente trabalho. Valores em mm referentes à distância posterior ao bregma. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998), equivale às figuras 30 e 31 deste atlas. TO = trato óptico, ST = estria terminal

Necessariamente, para serem selecionados para estudo, os neurônios desenhados obedeceram aos seguintes critérios de aceitação: a) localizavam-se indubitavelmente na região desejada, isto é, na AMePD mas relativamente afastados de seus bordos limítrofes, como precaução para não se coletar dados de outras áreas vizinhas à área de interesse; b) ter, no mínimo, seus primeiros 40 μm bem impregnados pela prata; c) ter espinhos claramente distinguíveis quando comparados com o precipitado de prata presente no “fundo” de cada secção selecionada; e, d) estavam relativamente isolados

das demais células vizinhas. Após seleção, os dendritos e os espinhos foram desenhados manualmente com auxílio de câmara clara acoplada a microscópio óptico (Olympus BX-41, Japão) e em aumento de 1000 X. Foram, igualmente, fotografados alguns neurônios representativos da AMePD de cada um dos grupos experimentais estudados (Figuras 3, 4 e 7).

Seis ratas diferentes foram estudadas em cada grupo experimental. Cada uma delas contribuiu com 8 dendritos diferentes. Cada dendrito adveio de um neurônio distinto dos demais, selecionados pelos rígidos critérios de inclusão no estudo acima descrito. A densidade de espinhos foi calculada como a relação do número total destes divididos pelo comprimento dendrítico estudado (valores expressos como número de espinhos/ μm dendrítico), o qual foi mensurado por programa de análise de imagens (Image Pro-Plus, Media Cybernetica, EUA). Isto é, a densidade de espinhos dendríticos na AMePD foi obtida de um total de 48 dendritos em cada grupo estudado (grupos 1, 2, 3, 4 e 5).

No presente estudo, os espinhos foram diretamente contados a partir dos desenhos feitos ao longo dos primeiros 40 μm de comprimento dendrítico. Este critério foi escolhido baseado em experimentos prévios (RASIA-FILHO et al., 1999, 2004) nos quais a densidade de espinhos dendríticos nos primeiros 40 μm mostrou-se ser representativa de valores obtidos até comprimentos dendríticos maiores, como, por exemplo, até 160 μm a partir do soma em neurônios da AMe posterior de ratos ($n = 10$ neurônios). Além disso, o nível de arborização dendrítica (primária ou secundária) não parece influenciar a densidade de espinhos (RASIA-FILHO et al., 2004). Como não se pode diferenciar, somente pela morfologia celular, quais os neurônios que respondem ao

estradiol dos que não respondem (NABEKURA et al., 1986), foram utilizados para estudo os dois tipos de neurônios multipolares encontrados na AMePD. Felizmente, também parece não haver diferença estatística no que diz respeito à densidade de espinhos dendríticos nos dois tipos característicos de neurônios multipolares encontrados na AMePD de ratos machos adultos (De CASTILHOS et al., artigo submetido).

Análise Estatística

Devido à possibilidade de diferenças sutis na realização da técnica de Golgi (como osmolaridade das soluções ou tempo exato de permanência dos cortes nas soluções), foram calculadas a média e o erro padrão da média (e.p.m.) para os grupos 1, 2 e 3 e tais dados foram analisados, em conjunto devido ao desenho experimental, pela análise da variância (ANOVA) de uma via. A seguir, os dados foram submetidos ao teste *post hoc* de Bonferroni. Por representarem outro experimento, com diferenças metodológicas na sua execução, os dados dos grupo 4 e 5 foram analisados pelo teste “t” de Student não-pareado. O nível de significância em ambos os casos foi estabelecido em $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na AMePD foram observados neurônios multipolares e que foram classificados como sendo do tipo bipeachados ou estrelados (Figura 3). As células do tipo bipeachadas apresentaram somas ovais, fusiformes, arredondados ou alongados. Originaram dois ramos dendríticos primários de comprimentos variados em cada extremo do corpo celular, de onde advém sua nomenclatura. Os neurônios do tipo estrelado possuíam o soma de forma estrelada, também descrito como multiangular. Eles apresentaram de 3 a 5 dendritos primários, raramente mais do que isso. Os dendritos primários nestas células, da mesma forma que os neurônios do tipo bipeachados são de diferentes comprimentos. Em ambos os tipos de neurônios estudados distinguiram-se células com quantidades, formas e tamanhos variáveis de espinhos presentes tanto nos dendritos quanto no soma neuronal.

Para os grupos 1, 2 e 3, todas as recomendações para utilização da ANOVA foram atendidas para a execução deste procedimento estatístico e a análise estatística mostrou que há diferença na densidade de espinhos dendríticos nos grupos estudados. Ou seja, os resultados indicaram que os grupos OVX e tratados com O, BE e BE+P apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si [$F(2,143) = 104,24$; $p < 0,001$; Figuras 5 e 6]. O grupo BE+P apresentou maior densidade de espinhos dendríticos quando comparado ao grupo O e BE ($p < 0,001$; Figura 6). Já o grupo BE

apresentou maior densidade de espinhos dendríticos quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$; Figura 6).

Nos grupo 4 e 5 igualmente foram atendidas as recomendações para utilização do teste “t” de Student, e de modo muito interessante, nos grupos BE+S e BE+LY235959, a densidade de espinhos dendríticos diminuiu no grupo que recebeu o antagonista glutamatérgico em relação ao que recebeu salina ($p = 0,04$; Figuras 8 e 9).

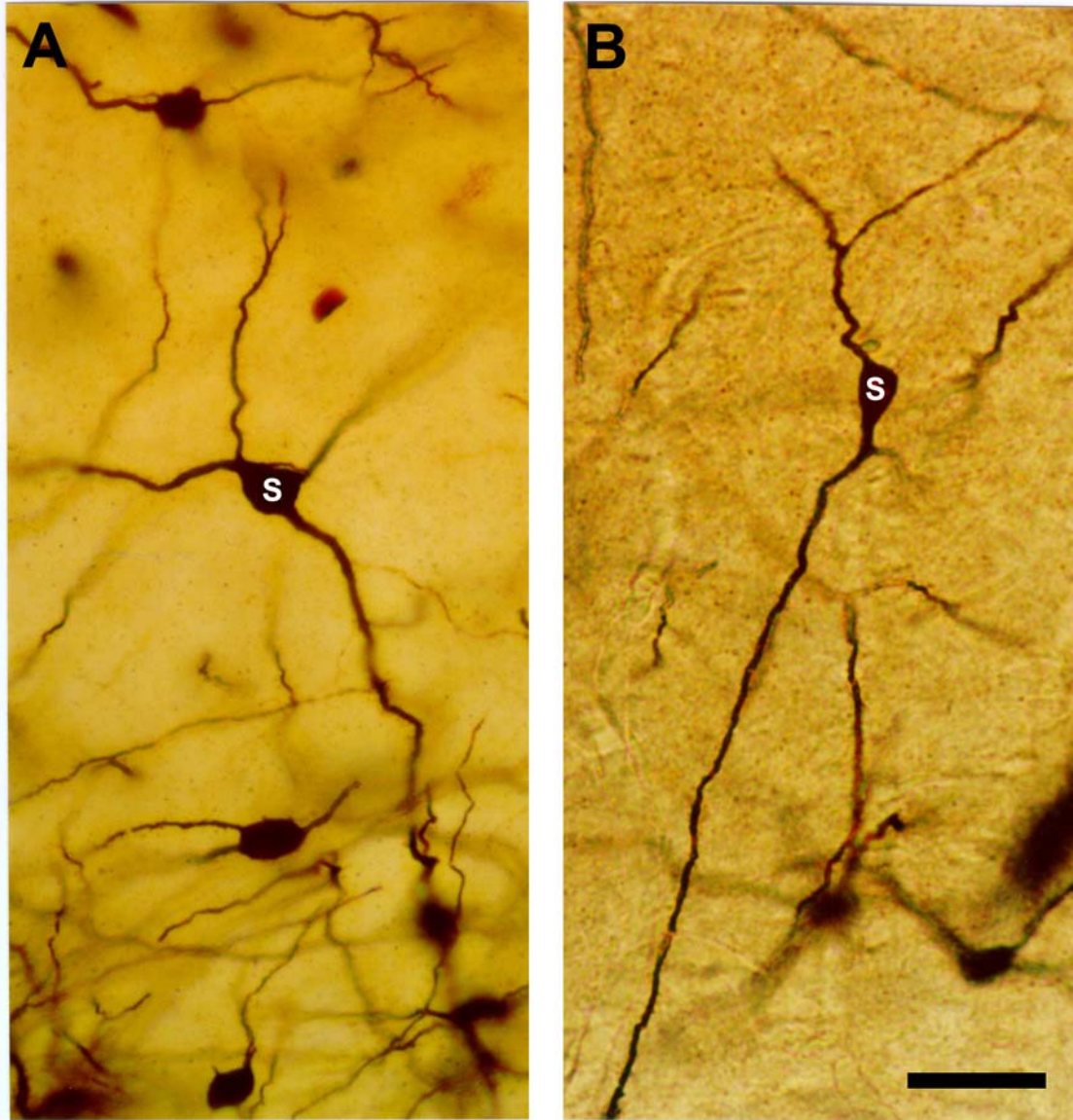


Figura 3. Fotomicrografias de neurônios impregnados pela técnica de Golgi do tipo estrelado (A) e bipenachado (B) na AMePD. S = soma. Barra = 50 μ m.

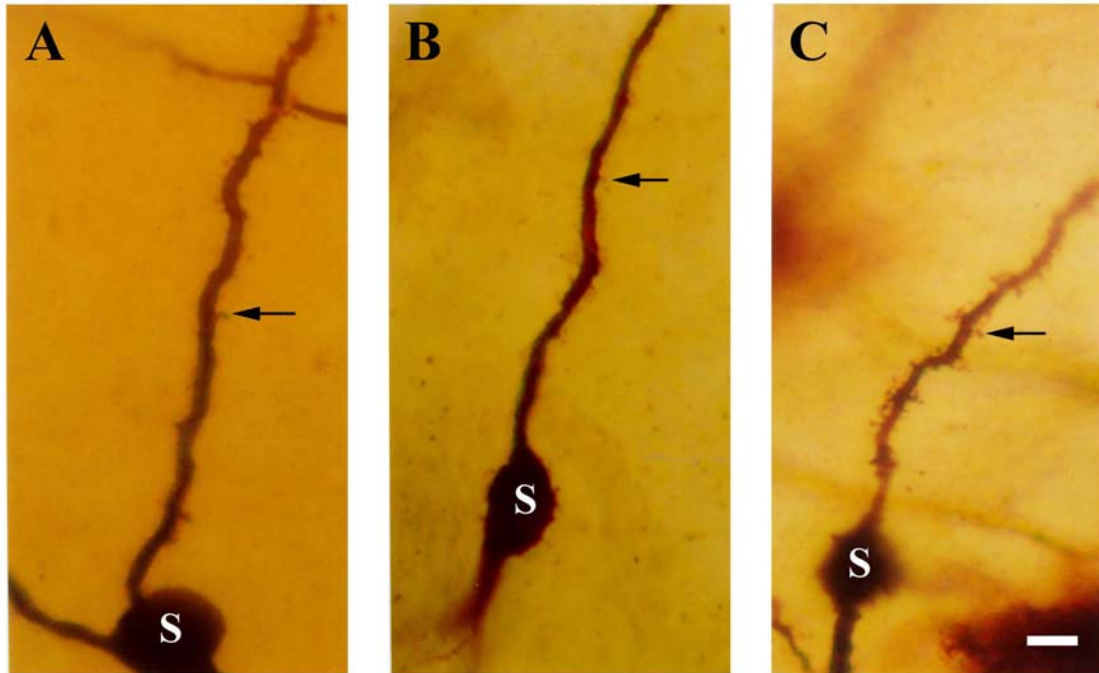


Figura 4. Fotomicrografias de neurônios impregnados pela prata da AMePD de ratas dos grupos 1, 2 e 3. (A) neurônio da AMePD de rata do grupo 1 (O); (B) neurônio da AMePD de rata do grupo 2 (BE); neurônio da AMePD de rata do grupo 3 (BE+P). Observe as setas indicando os espinhos dendríticos. S = soma. Barra = 10 μ m.

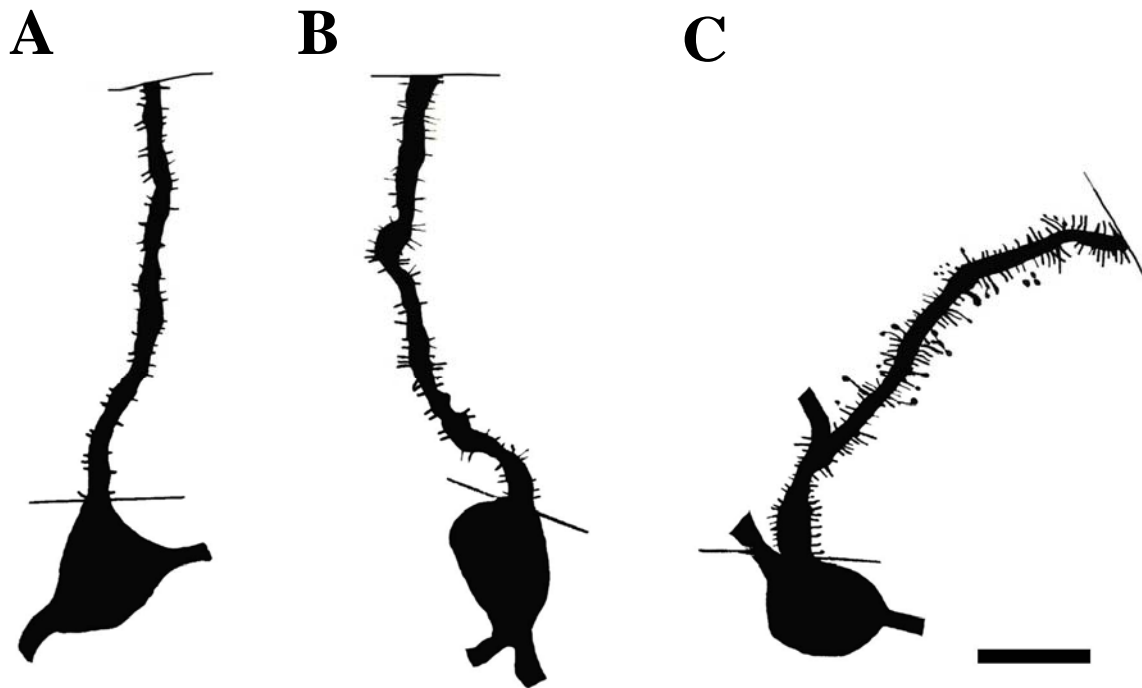


Figura 5. Desenhos esquemáticos feitos em câmara clara dos espinhos dos primeiros 40 μm dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi da AMePD de ratas dos grupos 1, 2 e 3. (A) neurônio da AMePD de rata do grupo 1 (O); (B) neurônio da AMePD de rata do grupo 2 (BE); e (C) neurônio da AMePD de rata do grupo 3 (BE+P). Barra = 10 μm .

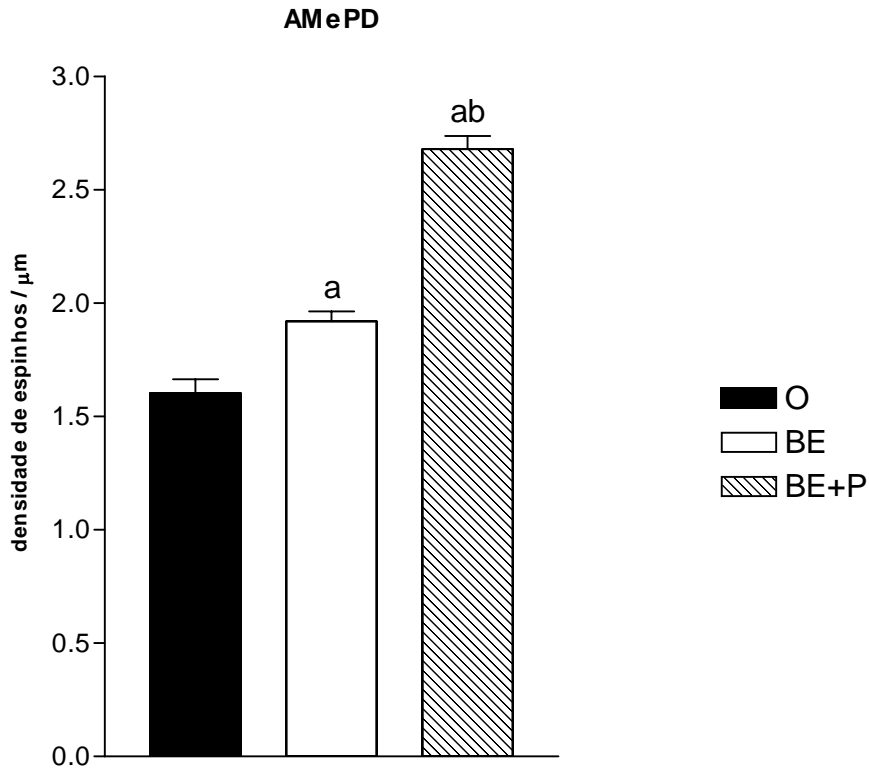


Figura 6. Densidade de espinhos dendríticos (média \pm e.p.m.) obtida nos primeiros 40 μm dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi na amígdala medial pósterodorsal (AMePD) de ratas submetidas à ovariectomia e injetadas com veículo oleoso (O) como controle, benzoato de estradiol e óleo (BE) ou benzoato de estradiol e progesterona (BE+P), correspondente aos grupos experimentais 1, 2 e 3.

^a $p < 0,01$ quando comparado ao grupo O

^b $p < 0,01$ quando comparado ao grupo BE

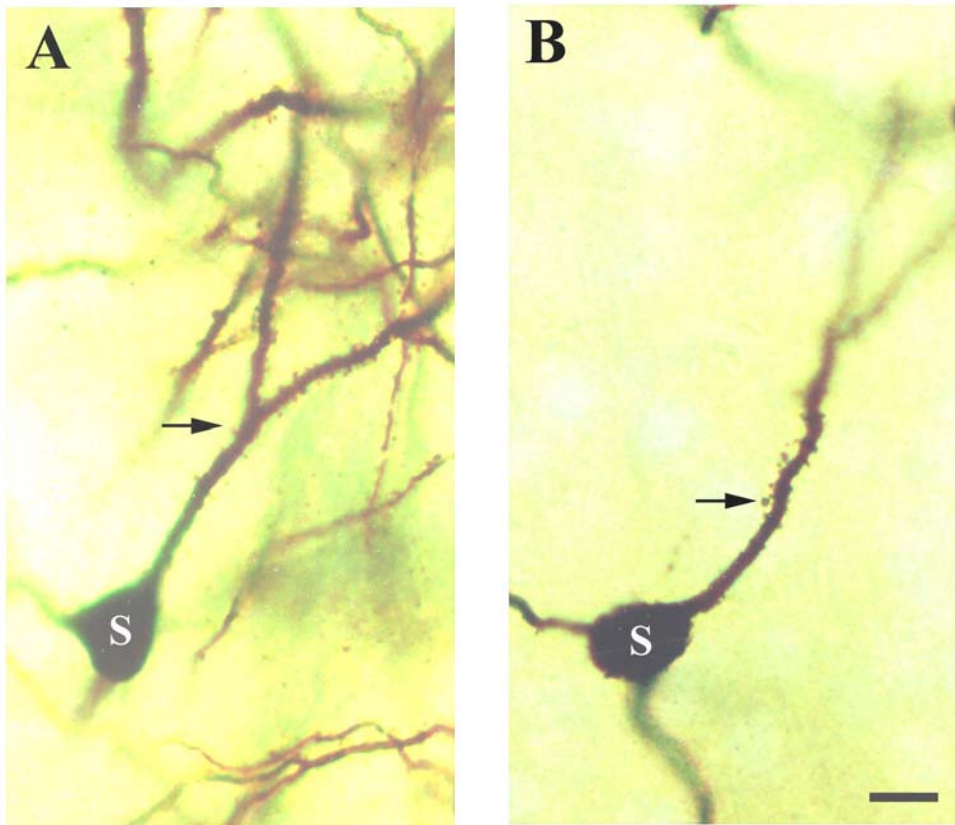


Figura 7. Fotomicrografias de neurônios impregnados pela técnica de Golgi da AMePD de ratas dos grupos 4 e 5. (A) neurônio da AMePD de rata do grupo 4 (BE+S) e (B) neurônio da AMePD de rata do grupo 5 (BE+LY235959). Observe as setas indicando os espinhos dendríticos. S = soma. Barra = 10 μ m.

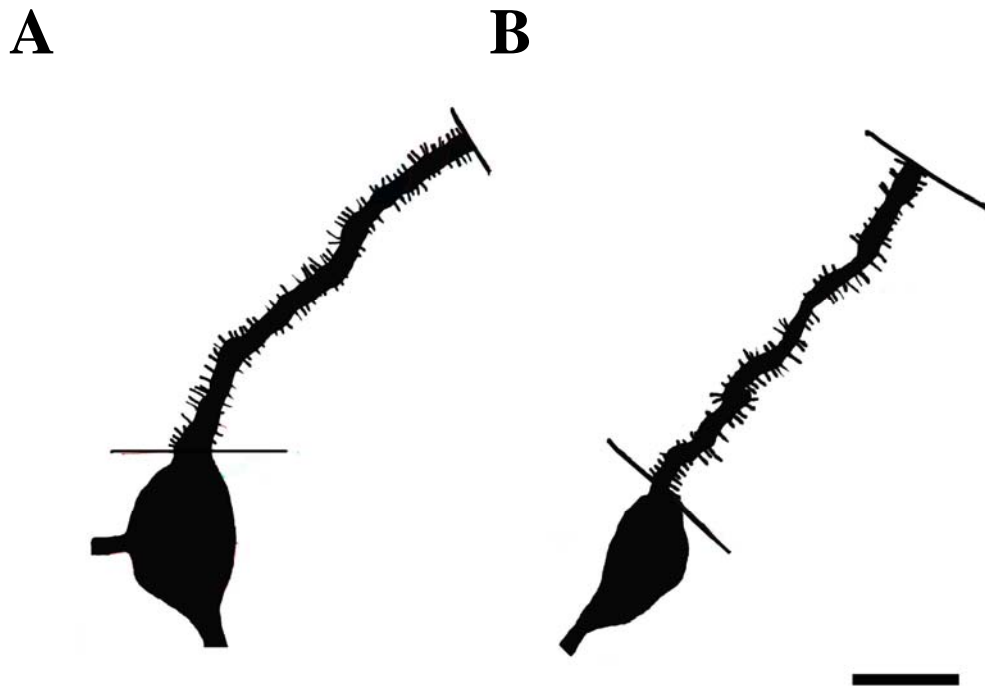


Figura 8. Desenhos esquemáticos feitos em câmara clara dos espinhos dos primeiros 40 μm dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi da AMePD de ratas dos grupos 4 e 5. (A) neurônio da AMePD de rata do grupo 4 (BE+S) e (B) neurônio da AMePD de rata do grupo 5 (BE+LY235959). Barra = 10 μm .

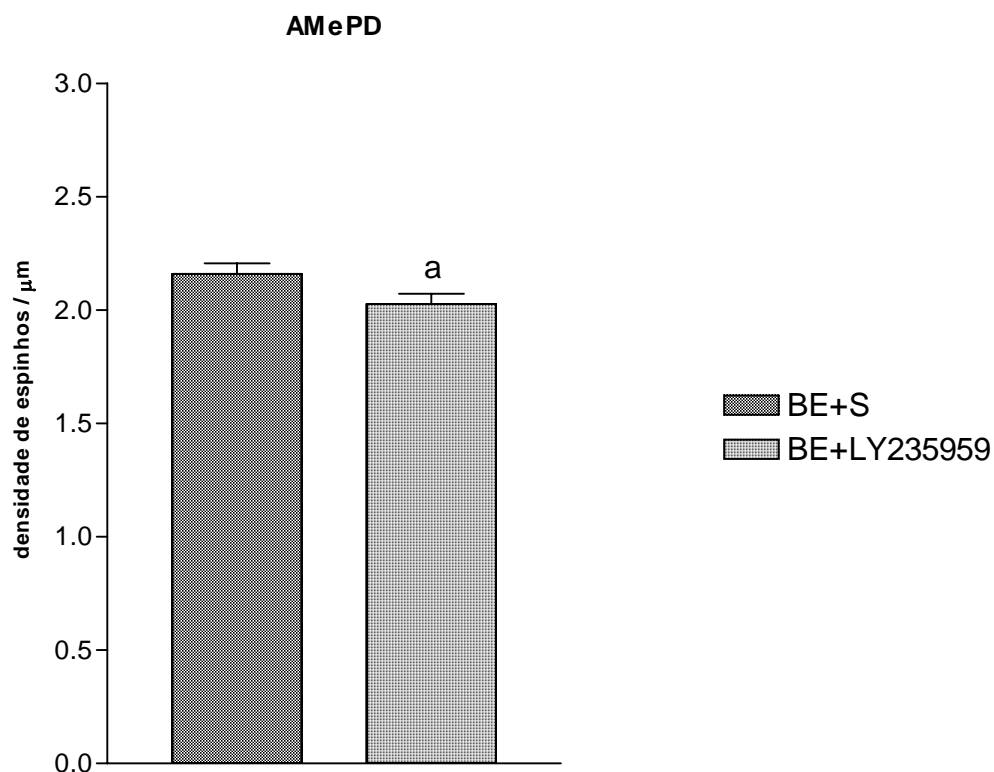


Figura 9. Densidade de espinhos dendríticos (média \pm e.p.m.) obtida nos primeiros 40 μm dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi na amígdala medial pósterodorsal (AMePD) de ratas submetidas à ovariectomia e à terapia hormonal substitutiva de benzoato de estradiol e óleo concomitantemente com injeções de salina (BE+S) ou benzoato de estradiol e óleo em conjunto com injeções de LY235959 (BE+LY235959), correspondente aos grupos experimentais 4 e 5.

^a $p = 0,04$ quando comparado ao grupo BE+S

DISCUSSÃO

Os presentes resultados demonstraram que as densidades de espinhos dendríticos em neurônios da AMePD apresentam variações devido à ovariectomia seguida da terapia substitutiva em todos os grupos estudados. Além disso, constatou-se que tais modificações causadas pelo estradiol são potencializadas pela progesterona, e as ações do estradiol requerem ativação de receptores do tipo NMDA, pelo menos em parte. Na avaliação dos resultados também é importante ressaltar que a técnica de Golgi impregna de 1 – 10% dos neurônios de uma determinada região e não diferencia neurônios com ou sem receptores para hormônios esteróides (GABBOTT; SOMOGYI, 1984; WOOLLEY; McEWEN, 1993). Não se pode afirmar que as alterações encontradas são exclusivas da ação dos hormônios gonadais e que elas ocorram em todos os neurônios estudados. Mas, quando o tamanho da amostra não é pequeno e os resultados não parecem ser heterogêneos como presentemente, é possível que eles representem dados de uma mesma população neuronal.

Mudanças na densidade de espinhos dendríticos de neurônios de diferentes regiões do SNC induzidas por ovariectomia já foram previamente descritas (WOLLEY et al., 1990; WOOLLEY, McEWEN, 1993). Isso poderia ser esperado porque os esteróides sexuais agem no genoma da célula, para promover alterações na expressão gênica e na síntese protéica (TORAN-ALLERAND, 1984; MURDOCH; GORSKI,

1991). Para que isto aconteça, esses hormônios ligam-se a receptores preferentemente encontrados no núcleo da célula. Lá estabelecem contato com o sítio de reconhecimento, promovendo aumento da replicação do DNA, o que culmina em aumento da síntese de proteínas específicas correspondentes (TORAN-ALLERAND, 1984; MURDACH; GORSKI, 1991; MURPHY; SEGAL, 1996, McEWEN et al., 1999). Ademais, os esteróides sexuais também podem gerar efeitos não gênicos ao alterar o potencial de membrana neuronal e o metabolismo dos transmissores químicos (McEWEN et al., 1999).

Neste sentido, tomando-se outras áreas do SNC como referencial, estabeleceu-se a influência de hormônios gonadais, como o estradiol e a progesterona, na densidade de espinhos dendríticos de células piramidais da região CA1 do hipocampo (GOULD et al., 1990; WOOLLEY; McEWEN, 1993). O estradiol levou ao aumento da densidade de espinhos em dendritos apicais e basais dessas células. E o aumento da densidade de espinhos apresentou-se associado ao aumento no número de sinapses com axônios aferentes, indicando que novos espinhos foram formados para tais contatos (WOOLLEY; McEWEN, 1993). Ao alterar a morfologia neuronal, o estradiol também gerou conseqüente mudança na fisiologia do hipocampo, o que sugere que o aumento do número de espinhos dendríticos e da densidade sináptica resulta em aumento da excitabilidade do neurônio (WOOLLEY et al., 1990), diminui o limiar de ocorrência de potencial de ação da célula e aumenta a ocorrência de LTP, principalmente quando o nível de estradiol está elevado (WOOLLEY et al., 1997). Outros resultados apontaram para uma via indireta de ação dos hormônios gonadais sobre a morfologia celular (CALIZO; FLANAGAN-CATO, 2000; SEGAL; ANDERSEN, 2000). Esses estudos se referem à ação de hormônios esteróides indiretamente sobre as células do VMN e

indicam que a densidade de espinhos seja regulada por aferências moduladas por estrógenos sobre dendritos específicos. Esta sugestão resultou da observação de que alterações morfológicas evidentes ocorreram com a variação de esteróides gonadais mas em células que não apresentavam receptores esses para hormônios (CALIZO; FLANAGAN-CATO, 2000).

Os astrócitos também são influenciados por hormônios gonadais (McEWEN et al., 1991; MICEVYCH et al., 1997; GARCIA-SEGURA et al., 1999; HOSLI et al., 2001; RASIA-FILHO et al., 2002). As células gliais estão envolvidas na organização e na ativação de efeitos promovidos pelos esteróides sexuais na formação de sinapses e sua plasticidade (GARCIA-SEGURA et al., 1999). A GFAP é um filamento intermediário e importante marcador celular de astrócitos maduros (KETTENMANN, 1995). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a imunoreatividade à GFAP (GFAP-ir) é modificada pela manipulação dos esteróides gonadais em diferentes áreas cerebrais sexualmente dimórficas (GARCIA-SEGURA et al., 1999; LÂM; LERANTH, 2003). Por exemplo, no giro denteado, a GFAP-ir fica diminuída após ovariectomia e mostra aumento dependente da dose empregada de hormônios sexuais em ratas ovariectomizadas (LUQUIN et al., 1993). Ademais, fêmeas na fase de diestro apresentaram maior GFAP-ir na AMePD e AMePV do que machos (RASIA-FILHO et al., 2002). Isto sugere que os esteróides ovarianos, e particularmente aumentos de estradiol e progesterona na fase de pró-estro podem igualmente coordenar o remodelamento sináptico por influenciar a expressão da GFAP e a atividade astrocitária localmente na AMePD. O quanto isto se repercute nos presentes achados experimentais necessita de investigações futuras.

A AMePD recebe aferências olfativas provenientes do bulbo olfativo principal e do bulbo olfativo acessório que a atingem via AMeAD e núcleos intercalados amigdalóides (WESTBERRY, 2003) ou via núcleo cortical posterior (PITKÄNEN, 2000), área pré-límbica e córtex entorrinal (McDONALD, 1998). A presença de maior densidade de espinhos dendríticos no grupo que recebeu estradiol e no grupo que recebeu estradiol e progesterona pode significar maiores entradas de estímulos sensoriais na amígdala, uma vez que maior densidade de espinhos implica em aumento do campo receptivo sináptico (WOOLF et al., 1991; KOCH; ZADOR, 1993) e em maior número de sinapses (HARRIS; KATER, 1994; TROMALD; HULLENBERG, 1997). Conexões intrínsecas intra-amigdalóides, ou seja, entre seus núcleos e subnúcleos (PITKÄNEN, 2000), podem estar aumentadas e reforçando a modulação feita pela AMe dos comportamentos desencadeados por estímulos olfativos, tais como o agressivo e o reprodutivo. Daqui pode-se perceber que ainda há necessidade de ser estabelecido se os efeitos do estradiol e da progesterona ocorrem diretamente nos neurônios da AMePD, de forma gênica ou não gênica, em interneurônios ou por ação de aferências de outras estruturas sensíveis a tais hormônios, em circuito.

Os espinhos dendríticos são uma unidade individual de entrada e saída de informação do neurônio (GAMBLE; KOCH, 1987; HARRIS; KATER, 1994; WOOLF et al., 1991; SHEPHERD, 1999). Eles também têm papel importante na mediação de sinapses e na modificação passiva tal potencial, uma vez que atenuam o potencial sináptico, mantêm a corrente constante, amplificam a voltagem pós-sináptica excitatória e produzem impedância no dendrito de origem (JASLOVE, 1992; KOCH; ZADOR, 1993; HARRIS; KATER, 1994; SHEPHERD, 1996; VOLFOVSKY et al., 1999; JONTES; SMITH, 2000). Dado que os espinhos dendríticos são considerados alvos

sinápticos, representando papel pré-sináptico e pós-sináptico tanto em sinapses excitatórias quanto inibitórias (GAMBLE; KOCH, 1987; HARRIS; KATER, 1994; SHEPHERD, 1999), aumentando a área total de superfície de contato dendrítico (WOOLF et al., 1991; KOCH; ZADOR, 1993) e, conseqüentemente, a capacitância da membrana (JASLOVE, 1992; SHEPHERD, 1996), entende-se que maior densidade dessas estruturas equivale a maior densidade sináptica sobre um neurônio alvo (SEGAL; ANDERSEN, 2000). Esta idéia é reforçada pela afirmativa de que cada espinho representa, via de regra, uma sinapse na maioria dos neurônios estudados até o momento (SHEPHERD, 1996; NIMCHINSKY et al., 2002), o que vale para a AMe de gatos também (NARKIEWICZ et al., 1978). Com base nisso, supõe-se que o número de sinapses vai estar aumentado na AMePD no grupo que recebeu estradiol e progesterona, por apresentarem uma maior densidade de espinhos dendríticos em relação a todos os outros grupos estudados. Estudos com microscopia eletrônica são mandatários para a confirmação dessa hipótese. Além disso, os espinhos dendríticos estão relacionados ao processamento temporal de informações aferentes multimodais (KOCH; ZADOR, 1993; COLLIN et al., 1997; TROMALD; HULLENBERG, 1997; JONTES; SMITH, 2000). A existência de uma maior quantidade de espinhos pode igualmente sugerir que está a ocorrer uma maior elaboração de tais informações na AMePD, principalmente no grupo de animais que recebeu estradiol e progesterona como terapia substitutiva, embora ainda precise ser avaliado quanto desses espinhos estão “ativos” ou representam sítios para sinapses “silenciosas”.

Embora haja pistas para investigações futuras, o mecanismo pelo qual o estradiol induz a formação de novos espinhos não é totalmente claro. O aparecimento de novos espinhos foi estudado em células piramidais da região CA1 do hipocampo *in vitro* e *in*

vivo (WOOLLEY et al., 1997). A ação neurotrófica estrogênica direta e/ou indireta é percebida na variação da densidade desses espinhos durante o ciclo estral de ratas, onde a alta densidade desses elementos dendríticos coincide com os altos níveis de estrógeno e progesterona circulantes (WOOLLEY et al., 1990). A administração de estradiol em ratas ovariectomizadas reverte a diminuição significativa na densidade de espinhos nos neurônios dessa mesma região (WOOLLEY; McEWEN, 1993). O mesmo ocorreu para o VMN (FRANKFURT et al., 1990). No presente estudo, verificou-se que há aumento na densidade de espinhos dendríticos nos neurônios da AMePD, tanto no grupo que recebeu BE quando comparado ao grupo controle, quanto no grupo que recebeu BE e P quando comparados aos grupos controle e grupo BE. Estes dados são coincidentes aos encontrados no hipocampo, onde houve maior densidade de espinhos quando estrógenos foram administrados após a ovariectomia (WOOLLEY et al., 1990) e também com os dados obtidos no VMN, onde os espinhos se encontravam em maior densidade no pró-estro (FRANKFURT et al., 1990), quando estradiol e progesterona estão com seus níveis mais elevados (NELSON, 1995). Diferem, no entanto, dos dados encontrados previamente na AMePD onde os espinhos dendríticos encontravam-se em menor densidade na fase de pró-estro e maior na fase de diestro (quando os estrogênios circulantes começam a se elevar e o nível de progesterona é baixo; RASIA-FILHO et al., 2004). Não há explicação definitiva para isto até o momento, mas uma das possibilidades que merece ser investigada com maiores detalhes é se a ação de receptores do tipo α e β para estradiol se modifica após a ovariectomia e a terapia hormonal substitutiva na AMePD, o que poderia vir a gerar resultados morfológicos diferentes da situação fisiológica habitual que são os ciclos estrais de 4 – 5 dias em ratas adultas.

Estudo radioimunológico para detectar estradiol sérico após administração de BE indicou que o estradiol circulante alcança níveis suprafisiológicos após a primeira injeção e é rapidamente metabolizado para um nível fisiológico após 24 h. Após a segunda injeção de BE, o estradiol atinge novamente níveis suprafisiológicos, mas o metabolismo subsequente é menos rápido e os níveis fisiológicos não são alcançados até cerca de 24 a 48 h mais tarde (WOOLLEY; McEWEN, 1993). Isto é muito importante nas discussões sobre terapia hormonal substitutiva e ciclo estral normal. Além disso, sabe-se que receptores α e β para estradiol (ER α e ER β) e para progesterona (PR) apresentam número e possivelmente magnitude de ação diferentes após tratamento com BE. Por exemplo, na AMePD, fêmeas ovariectomizadas e injetadas com estradiol apresentaram diminuição na imunoreatividade de ER α para estradiol 48 h após o tratamento com este hormônio, provavelmente por “down-regulation”. Os ER β para o estradiol não sofreram modificação. E os PR não alteraram seu número nesta mesma circunstância, mas o tratamento com estradiol aumentou a intensidade da reação imunoistoquímica local (GRÉCO et al., 2001).

Por outro lado, nos últimos anos, estudos sobre o papel da atividade neural na regulação da conectividade sináptica e forma neuronal foram focalizados no receptor NMDA para o glutamato, que é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos. Tal receptor está relacionado com a possibilidade de induzir LTP, o mecanismo que se acredita possa ser um dos substratos biológicos para a teoria da estabilização sináptica postulada por Hebb em 1949 (vide BLISS; LOMO, 1973). Existem vários estudos indicando que eventos mediados por receptores glutamatérgicos estão criticamente envolvidos na alteração do número e na estrutura dos espinhos em neurônios piramidais da área CA1 do hipocampo (WOOLLEY, 1998; KIROV;

HARRIS, 1999; KORKOTIAN, 1999; ROSE; KONNERTH, 2001). Por exemplo, Gould e colaboradores (1990) descobriram que o tratamento com estradiol aumentou a densidade de espinhos nos dendritos apicais e basais de células piramidais da área CA1 do hipocampo em ratas ovariectomizadas. A seguir, alguns experimentos demonstraram que antagonistas de receptores do tipo NMDA (e não os do tipo AMPA ou cainato) previnem o aumento na densidade de espinhos dendríticos em CA1 em resposta à reposição de estradiol nessas ratas (WOOLLEY; McEWEN, 1994). Sendo assim, a flutuação na densidade de espinhos dendríticos ao longo do ciclo estral e/ou após ovariectomia em resposta a mudanças nos níveis de estradiol seria mediada, ao menos em parte, por ativação de receptores NMDA. No presente estudo verificou-se que a densidade de espinhos dendríticos diminui quando estradiol é administrado concomitantemente com LY235959. Estes dados vão ao encontro da literatura onde a densidade de espinhos dendríticos na região CA1 do hipocampo diminui com o tratamento com antagonistas do receptor NMDA glutamatérgico, bloqueando os efeitos do estradiol (WOOLLEY; McEWEN, 1994). Este tipo de resultado sugere que a ação dos esteróides sexuais poderia ser também indireta nas áreas estudadas. Ou seja, outras regiões sensíveis à ação dos hormônios ovarianos estariam sendo ativadas e, por conexão sináptica glutamatérgica, estariam transmitindo informação à região CA1 e à AMePD. Poderia, assim, serem conjugadas as ações diretas (via receptores α e β para estradiol e receptores para progesterona) com atividades mediadas e iniciadas pelo receptor pós-sináptico do tipo NMDA nas vias neurais aferentes.

Esta correlação dos espinhos dendríticos com a atividade glutamatérgica passa a ser relevante ao se considerar que tanto a morfologia dos espinhos quanto a sua densidade irão implicar em alterações funcionais mediadas por eles (TROMALD;

HULLENBERG, 1997). O espinho apresenta bulbo ou cabeça e pescoço algumas com forma mutável (RAMÓN y CAJAL, 1909; SEGAL; ANDERSEN, 2000) e modificações destes dois elementos podem influenciar diretamente a ação da sinapse desencadeada nesse espinho. Por exemplo, variações do diâmetro do pescoço modulam a corrente sináptica (WOOLF et al., 1991) e variações nas dimensões do pescoço produzem variações na impedância de vários espinhos (TROMALD; HULLENBERG, 1997). Espinhos curtos são mais estreitamente unidos e refletem mais intensamente mudanças na concentração de Ca^{++} do dendrito de origem, enquanto espinhos com pescoço longo regulam sua concentração de Ca^{++} independentemente de seu dendrito de origem (SEGAL; ANDERSEN, 2000). A resistência de entrada no ramo dendrítico aumenta com a distância do soma e a resistência do pescoço dos espinhos também deve aumentar com a distância do soma (HARRIS; STEVENS, 1989; WOOLF et al., 1991; HARRIS; KATER, 1994). A descrição precisa da morfologia dos espinhos da AMePD e sua modulação pelos esteróides sexuais femininos e pelo glutamato somente pode ser feita com futuros estudos com microscopia eletrônica. Mais adiante, também será muito relevante investigar quais componentes intracelulares podem estar envolvidos na reestruturação morfológica rápida dos espinhos. São candidatas para isso a actina e a β -tubulina (NIMCHINSKY et al., 2002). Além disso, dois componentes protéicos da densidade pós-sináptica (PSD), as proteínas “Shank” e “Homer” possuem a função de promover a organização estrutural e molecular dos espinhos dendríticos (MATUS, 2000; YUSTE; BONHOEFFER, 2001). A proteína “Shank”, por exemplo, consiste de múltiplos locais para interação protéica, incluindo vários domínios diferentes entre si (NAISBITT et al., 1999; EHLERS, 1999). Esses vários domínios de interação se ligam a “parceiros” específicos na PSD e que se ligam também a receptores NMDA, receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGLURs) na membrana plasmática,

receptores de inositol trifosfato (IP₃Rs) no REL e na actina do citoesqueleto, todos contribuindo para a maturação e especificação estrutural dos espinhos dendríticos (EHLERS, 1999; SALA et al., 2001). Em neurônios jovens, a proteína “Shank” estimula a conversão de espinhos em forma de filopódio em espinhos com forma de “cogumelo” (SALA et al., 2001). Esta morfologia dos espinhos poderia sugerir serem eles mais estáveis ou não. Embora ainda precise maiores comprovações, aqueles com aspecto de “cogumelo” poderiam estar mais estabilizados por conterem em seu interior o aparato do espinho e em sua base polirribossomos, que as demais formas (NIMCHINSKY et al., 2002).

No presente trabalho foram estudadas as densidades de espinhos nos primeiros 40 μm dendríticos de diferentes grupos experimentais. Esta maior quantidade de espinhos próximos ao soma se reflete na funcionalidade dos mesmos, uma vez que os mais proximais requerem mudanças maiores de condutância para moderadas despolarizações, que também aumentam lentamente à medida que se propagam para espinhos vizinhos. Os espinhos proximais não respondem ao aumento da condutância do dendrito de origem até que grandes mudanças sejam aplicadas, apresentam menor resistência de entrada no ramo dendrítico e a resistência do pescoço dendrítico também é menor, quando comparada à dos espinhos distais (WOOLF et al., 1991). As conseqüências funcionais das alterações morfológicas descobertas e apresentadas na presente dissertação precisam ser avaliadas por testes eletrofisiológicos, imunoistoquímicos (para identificação do tipo de transmissor químico nesses espinhos) e comportamentais. Com essa correlação entre morfologia e fisiologia, poder-se-ia igualmente indicar que as funções mediadas pela AMe possam mudar ao longo de poucos dias, uma vez que seu elemento de conectividade sináptica (espinho) sofre

alterações quantitativas durante o ciclo estral e também depois de ovariectomia e terapia hormonal substitutiva. Em fêmeas, diferenças nas densidades de espinhos dendríticos podem sugerir que as variações cíclicas dos esteróides ovarianos atuando nas subregiões da AMe (principalmente na AMePD) podem representar um mecanismo celular para alterar a coordenação e o impacto dos hormônios sexuais circulantes nas vias neurais que regulam as atividades dos neurônios GnRH e do comportamento reprodutivo em resposta a sinais ambientais internos e externos.

Por fim, fica claro o número de questões para novas investigações que se abrem com os presentes e prévios resultados correlatos. Isto, francamente, não é à toa porque há inúmeras questões incógnitas, por razões históricas e do próprio conhecimento humano, envolvendo os subnúcleos da AMe. Embora seja desejável o estabelecimento de um elo entre funções e núcleos amigdalóides específicos, ainda não existe uma idéia completa sobre todos os papéis funcionais da AMe relacionados com seus subnúcleos. Algumas das razões dessa dificuldade para se comparar resultados experimentais de diferentes trabalhos é a quantidade de pesquisa feita sobre isto e a heterogeneidade das metodologias utilizadas, as fibras de passagem destruídas por lesões eletrolíticas, a injeção não controlada de substâncias nos núcleos amigdalóides ou extra-amigdalóides, danos ao tecido neural em regiões adjacentes a amígdala e mecanismos de plasticidade neural que podem alterar deficiências funcionais após lesões amigdalares (RASIA-FILHO et al., 2000). Dessa maneira, algumas vezes, comparações diretas entre estudos não podem ser feitos de uma forma inequívoca. Os presentes dados servem, no entanto, para alicerçar novos conhecimentos sobre a modificação morfológica neuronal mediada pelos hormônios gonadais femininos, a plasticidade neural da AMePD de ratas e sua

correlação com a transmissão glutamatérgica em estrutura absolutamente relevante para a fisiologia da reprodução em fêmeas.

CONCLUSÃO

A densidade de espinhos dendríticos na AMePD é afetada pelos hormônios gonadais, sendo que há variações na densidade destes elementos sinápticos em todos os grupos estudados. Os resultados indicaram que as ratas que foram ovariectomizadas e tratadas com O, BE e BE+P apresentaram uma diferença estatisticamente significativa entre si. Os grupos BE e BE+P apresentaram maior densidade de espinhos dendríticos na AMePD quando comparados ao grupo controle injetado com óleo. Adicionalmente, nos grupos BE+S e BE+LY235959, a densidade de espinhos dendríticos diminuiu no grupo que recebeu o antagonista dos receptores do tipo NMDA. Há evidências de que a progesterona potencializa o efeito do estradiol e este parece exercer seu efeito, pelo menos em parte, via receptores do tipo NMDA. Esses resultados contribuem para o entendimento da plasticidade morfológica e sináptica na AMePD, a qual parece ser mediada pelos esteróides sexuais e em área do sistema nervoso relacionada com a modulação de comportamento reprodutivo feminino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R. E. The effects of corticotrophin releasing factor (CRF) and handling stress on the behavior in the elevated plus-maze test of anxiety. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, p. 157-186, 1991.

AGGLETON, J.P.; BLINDT, M.S. Effects of Amygdaloid and Amygdaloid-Hipocampal Lesions on Object Recognition and Spatial Working Memory in Rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, n. 5, p. 962-974, 1989.

ALHEID, G. F.; de OLMOS, J. S.; BELTRAMINO, C. A. Amygdala and extended amygdala. In: PAXINOS, G. **The Rat Nervous System**. San Diego, Academic Press. p. 495-598, 1995.

ALHEID, G. F.; HEIMER, L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. **Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 1-39, 1988.

ALLEN, J. P.; ALLEN, C. F. Role of amygdaloid complexes in the stress-induced release of ACTH in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 15, n. 3-4, p. 220-230, 1974.

ARIMATSU, Y.; SETO, A.; AMANO, T. Sexual dimorphism in α -bungarotoxin binding capacity in the mouse amygdala. **Brain Research**, v. 213, n. 2, p. 432-437, 1981.

ARNOLD, A. P.; BREEDLOVE, S. M. Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. **Hormones and Behavior**, v. 19, n. 4, p. 469-468, 1985.

ARNOLD, A. P.; JORDAN, A. P. Hormonal reorganization of neural circuits. In: **Frontiers in Neuroendocrinology**, New York, Raven Press, v. 10, 1988.

ASMUS, S.E.; KINCAID, A. E.; NEWMAN, S. W. A species-specific population of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the medial amygdaloid nucleus of the Syrian hamster. **Brain Research**, v. 575, n. 2, p. 199-207, 1992.

BAWDEN, H.; RACINE, R. Effects of bilateral kindling or subthreshold stimulation of the amygdala or septum on muricide, ranacide, intraspecific aggression and passive avoidance in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 22, p. 115-123, 1979.

BAYER, S. A. Quantitative 3H-thymidine radiographic analyses of neurogenesis in the rat amygdala. **Journal of Comparative Neurology**, v. 194, n. 4, p. 845-875, 1980.

BEAR, M. F.; KLEINSCHMIDT, A.; GU, Q.; SINGER, W. Disruption of experience dependent synaptic modifications in the striate cortex by infusion of an NMDA receptor antagonist. **Journal of Neuroscience**, v. 10, p.909-925, 1990.

BLISS, T.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **Journal of Physiology**, v. 232, p. 331-356, 1973.

BRADLEY, M. C.; YABIBNIA, G.; BREEDLOVE, S. M. A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. **Neurobiology**, v. 96, p. 7538-7540, 1999.

BLOCH, C. H.; GORSKI, R. A. Estrogen/Progesterone treatment in adulthood affects the size of several components of the medial preoptic area in the male rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 275, n. 4, p. 613-622, 1988.

BOHUS, B.; de KLOET, E. R. Adrenal steroids and extinction behavior: Antagonism by progesterone, deoxycorticosterone and dexamethasone of a specific effect of corticosterone. **Life Science**, v. 28, n. 4, p. 433-440, 1991.

BOLHUIS, J. R. The corticomedial amygdala and learning in an agonistic situation in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 32, p. 575-579, 1984.

BRADLEY, M. C.; YABIBNA, G. BREEDLOVE, S. M. A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. **Neurobiology**, v. 96, p. 7538-7540, 1999.

CALIZO, L. H.; FLANAGAN-CATO, L. M. Estrogen selectively regulates spine density within the dendritic arbor of rat ventromedial hypothalamic neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 1589-1596, 2000.

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. **Journal of Comparative Neurology**, v. 360, p. 213-245, 1995.

CAPANI, F.; MARTONE, M. E.; DEERINK T. J.; ELISMAN, M. H. Selective localization of high concentrations of F-actin in subpopulations of dendritic spines in rat central nervous system: a three-dimensional electron microscopic study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 435, p. 156-170, 2001.

CLINE, H.T.; DEBSKI, E. A.; CONSTANTINE-PATON, M. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist desegregates eye-specific stripes. **Proceedings in National Academy of Sciences of the USA**, v. 84, p. 4342-4345, 1987.

COLLIN, C.; MIYAGUCHI, K.; SEGAL, M. Dendritic spine density and LTP induction in cultured hippocampal slices. **Journal of Neurophysiology**, v. 77, n. 3, p. 1614-1623, 1997.

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.

COOLEN, L. M.; OLIVIER, H.; PETERS, H. J. P. W.; VEENING, J. G. Demonstration of ejaculation-induced neural activity in the male rat brain using 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT. **Physiology and Behavior**, v. 62, n. 4, p. 881-891, 1997.

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

CUELLO, A. C.; KANAZAWA, I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. **Journal of Comparative Neurology**, v. 178, n. 1, p. 129-156, 1978.

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

DAYAS, C.V.; BULLER, K. M.; DAY, T. A. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: Evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 2312-2322, 1999.

de KLOET, E. R. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. In: **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 12, p. 95-164, 1991.

de KLOET, E. R.; de KOCK, S.; SCHILD, V.; VELDHUIS, H. D. Antigluocorticoid RU38486 attenuates retention of a behavior and desinhibits the hypothalamic-pituitary-adrenal axis at different sites. **Neuroendocrinology**, v. 47, n. 2, p. 109-115, 1988.

de OLMOS, J. S.; ALHEID, G. F.; BELTRAMINO, C. A. Amygdala. In: PAXINOS, G. (ed). **The Rat Nervous System**, Australia, p. 223-234, 1985.

de OLMOS, J. S.; HEIMER, R. L. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 877, p. 1-32, 1999.

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

de VRIES GJ. Studying neurotransmitter systems to understand the development and function of sex differences in the brain: the case of vasopressin. In: MICEVYCH, P.F.; HAMMER, J. R. **Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones**, New York: Cambridge University Press, p.254-278, 1995.

De VRIES, G. J.; SIMERLY, R. B. Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. In: PFAFF, D.W.; ARNALD, A. P.; ETGEN, A. M.; FAHRBACH, S. E.; RUBIN, R. T. **Hormones, brain and behavior**. San Diego: Academic Press, p. 137-191, 2002.

DIELENBERG, R. A.; HUNT, G. R.; MCGREGOR, L. S. When a Rat Smells a Cat: The distribution of FOS immunoreactivity in the rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**, v. 104, n. 4, p. 1085-1097, 2001.

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

ECKERSELL, C. B.; MICEVICH, P. E. Opiate receptors modulate estrogen-induced cholecystokinin and tachykinin but not enkephalin messenger RNA levels in the limbic system and hypothalamus. **Neuroscience**, v. 80, n. 2, p. 473-485, 1997.

EHLERS, M. D. Synapse structure: glutamate receptors connected by the shanks. **Current Biology**, v. 98 , p. R848-R850, 1999.

ETGEN, A. M.; CHU, H. P.; FIBER, J. M.; KARKANIAS, G. B.; MORALES, J. M. Hormonal integration of neurochemical and sensory signals governing female reproductive behavior. **Behavioral Brain Research**, v. 105, n. 1, p. 93-103, 1999.

EVERITT, B. Limbic lobe and olfactory pathways. In: BERRY, M. M.; BANNISTER, L. H.; STANDRING, S. M. **Gray's Anatomy**. London, Churchill Livingstone., p.1115-1141, 1995.

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

FLEMING, A. S.; KORSMIT, M.; DELLER, M. Rats pups are potent reinforcers of the maternal animal: effects of experience, parity, hormones and dopamine function. **Psychobiology**, v. 22, p. 44-53, 1994.

FRANKFURT, M.; GOULD, E.; WOOLLEY, C.; McEWEN, B. S. Gonadal steroids modify dendritic spine density in ventromedial hypothalamic neurons: a Golgi study in adult rat. **Neuroendocrinology**, v. 51, n. 5, p 530-535, 1990.

GABBOTT, P. L.; SOMOGYI, J. The "single" section Golgi-impregnation procedure: methodological description. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, n. 4, p. 221-230, 1984.

GAMBLE, E.; KOCH, C. The dynamics of free calcium in dendritic spines in response to repetitive synaptic input. **Science**, v. 236, n. 4806, p. 1311-1315, 1987.

GARCIA-SEGURA, L. M.; NAFTOLIN, F.; HUTCHISON, J. B.; AZCOITIA, I.; CHOWEN, J. A. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *Journal of Neurobiology*, v. 15, n. 40 (4), p. 574-584, 1999.

GLOOR P. The amygdaloid system. In: GLOOR, P. **The temporal lobe and limbic system**, New York: Oxford University Press, p. 591-721, 1997.

GOLD, J. I.; BEAR, M. F. a model of dendritic spine Ca^{2+} concentration exploring possible bases for a sliding synaptic modification threshold. **Proceedings in National Academy of Sciences of the USA**, v. 91, n. 9, p. 3941-3945, 1994.

GOMEZ, D.M.; NEWMAN, S. W. Medial nucleus of the amygdala in the adult Syrian hamster: A quantitative golgi analysis of gonadal hormones regulation of neuronal morphology. **The Anatomical Record.**, v. 231, p. 498-509, 1991.

GOULD, E.; WOOLLEY, C. S.; FRANKFURT, M.; McEWEN, B. S. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. **Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 1286-1291, 1990.

GOULD, E.; WOOLLEY, C. S.; McEWEN, B. S. The hippocampal formation: morphological changes induced by thyroid, gonadal and adrenal hormones. **Psychoneuroendocrinology**, v. 16, p. 69-86, 1991.

GRECÓ, B.; ALLEGRETTO, E. A.; TETEL, M. J.; BLAUSTEIN, J. D. Coexpression of $ER\beta$ with $ER\alpha$ and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5172-5181, 2001.

GRECÓ, B.; EDWARDS, D. A.; MICHAEL, R. P.; CLANCY, N. A. Androgen receptors and estrogen receptors are colocalized in male rat hypothalamic and limbic neurons that express Fos immunoreactivity induced by mating. **Neuroendocrinology**, v. 67, n. 1, p. 18-28, 1998.

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.

GRAY, E. G.; GUILLERY, R. W. A note on the dendritic spine apparatus. **Journal of Anatomy**, v. 97, p. 389-392, 1963.

GUILLAMÓN, A.; SEGOVIA, S. Sex Differences in the Vomeronasal System. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 4, p. 377-382, 1997.

GUTHRIE, P. B.; SEGAL, M.; KATER, S. B. Independent regulation of calcium revealed by imaging dendritic spines. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 76-80, 1991.

HAGIHARA, K.; HIRATA, S.; OSADA, T.; HIRAY, M.; KATO, J. Distribution of cells containing progesterone receptor mRNA in the female rat di- and telencephalon: an in situ hybridization study. **Brain Research Molecular Brain Research**, v. 14, n. 3, p. 239-249, 1992.

HALL, E. Some aspects of the structural organization of the amygdale. In: ELETHERIOU B. E. **The Neurobiology of the Amygdala**. Plenum Press, New York, p. 95-121, 1972.

HARRIS, L. M.; KATER, S. B. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 17, p. 314-371, 1994.

HARRIS, K. M. Calcium from internal stores modifies dendritic spine shape. **Proceedings in National Academy of Sciences of the USA**, v. 96, p. 12213-12215, 1999.

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, n. 8, p. 2982-2997, 1989.

HARLAN, R. E.; GARCIA, M. M.; KRAUSE, J. E. Cellular localization of substance P and neurokinin A-encoding preprotachykinin mRNA in the female rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 287, p. 179-212, 1989.

HÄUSSER, M.; SPRUSTON, N.; STUART, G. J. Diversity and dynamics of dendritic signaling. **Science**, v. 290, p. 739-744, 2000.

HESS, U.S.; GALL, C. M.; LYNCH, G.; GRANGER, R. Differential patterns of c-fos mRNA expression in amygdala during successive stages of odor discrimination learning. **Learning and Memory**, v. 4, n. 3, p. 262-283, 1997.

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

HOLT, A. G. Immunocytochemical identification of met- and leu-enkephalin positive neurons within mating and agonistic relevant brain nuclei of male Syrian hamster: modulation by gonadal steroids and social behaviors. **PhD Thesis. University of Michigan**. Ann. Arbor. Michigan. 1997.

HORNER, C. H. Plasticity of the dendritic spine. **Progress in Neurobiology**, v. 41, p. 281-321, 1993.

HOSLI, E.; JURASIN, K.; RUHL, W.; LUTHY, R.; HOSLI, L. Colocalization of androgen, estrogen and cholinergic receptors on cultured astrocytes of rat central nervous system. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 11-19, 2001.

JASLOVE, S. W. The integrative properties of spiny distal dendrites. **Neuroscience**, v. 47, n. 3, p. 495-519, 1992.

JONES, E. G.; COWAN, W. M. The nervous tissue. In: WEISS, L. **Histology, Cell and Tissue Biology**. New York, Elsevier, p. 282-370, 1983.

JONTES, J. D.; SMITH, S. J. Filopodia, spines and the generation of synaptic diversity. **Neuron**, v. 27, p. 11-14, 2000.

KALRA, P. S.; McCANN, S. M. The stimulatory effect on gonadotropin release of implants of estradiol or progesterone in certain sites in the central nervous system. **Neuroendocrinology**, v. 19, n. 4, p.289-302, 1975.

KAMAL, A. M.; TÖMBÖL, T. Golgi studies on the amygdaloid nuclei of the cat. **Journal Hirnforschung**, v. 16, p. 175-201, 1975.

KANDEL, E. R.; SIEGELBAUM, S. A. Synaptic Integration. In: KANDEL, E.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of Neural Science**. New York: McGraw-Hill, p 207-228, 2000.

KATO, J. Progesterone receptor in brain and hypophysis. In: D. W. PFAFF. **Current Topics in Neuroendocrinology, Vol. V.** Springer Verlag, Berlin, p. 31-81, 1985.

KLINTSOVA, A.; LEVY, W. B.; DESMOND, N. L. Astrocytic volume fluctuates in the hippocampal CA1 region across the estrous cycle. **Brain Research**, v. 690, p. 269-274.

KIRKPATRICK, B.; CARTER, C. S.; NEWMAN, S. W.; INSEL, T.R. Axon sparing lesions of the medial nucleus of the amygdala decrease affiliative behaviors in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*); behavioral and anatomical specificity. **Behavioral Neuroscience**, v. 108, p. 501-513, 1994a.

KIRKPATRICK, B.; KIM, J. W.; INSEL, T.R. Limbic system fos expression associated with paternal behavior. **Brain Research**, v. 658, p. 112-118, 1994b.

KIROV, S. A.; HARRIS, K. M. Dendrites are more spiny on mature hippocampal neurons when synapses are inactivated. **Nature Neuroscience**, v. 2, p. 878-883, 1999.

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

KOCK, C.; ZADOR, A. The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. **Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 2, p. 413-422, 1993.

KOOLHAAS, J. M.; SCHUURMAN, T.; WIEPKEMA, P. R. The organization of intraspecific agonistic behavior in the rat. **Progresses in Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 247-268, 1980.

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

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

KONDO, Y.; TOMIHARA, K.; SAKUMA, Y. Sensory requirements for noncontact penile erection in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 113, n. 5, p. 1062-70, 1999.

KORKOTIAN, E.S. M. Bidirectional regulation of dendritic spine dimensions by glutamate receptors. **Neuroreport**, v. 10, p. 2875-2877, 1999.

KORKOTIAN, E.; SEGAL, M. Fast confocal imaging of calcium released from stores in dendritic spines. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 2076-2084, 1998.

KORKOTIAN, E.; SEGAL, M. Release of calcium stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. **Proceedings in National Academy of Sciences of the USA**, v. 96, p. 12068-12072, 1999.

LAM, T. T.; LERANTH, C. Gonadal hormones act extrinsic to the hippocampus to influence the density of hippocampal astroglial processes. **Neuroscience**, v. 116, n. 2, p. 491-498, 2003.

LAU, K. C.; SO, S. F.; TAY, D. APV prevents the elimination of transient dendritic spines on a population of retinal ganglion cells. **Brain Research**, v. 595, p. 171-174, 1992.

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

LEHMAN, M. N.; WINANS, S. S. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior. Autoradiographic and behavioral analyses. **Brain Research**, v. 240, n. 1, p. 27-41, 1982.

LI, X.; SCHWARTZ, P. E.; RISSMON, E. F. Distribution of estrogen receptor- β -like immunoreactivity in rat forebrain. **Neuroendocrinology**, v. 66, n. 2, p. 63-67, 1997.

LIND, R. W.; GANTEN, D. Angiotensin. In: BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T.; KUHAR, M. J. **Handbook of Chemical Neuroanatomy: Neuropeptides in the CNS**. Vol. 9, Part II. Elsevier, Amsterdam, 1990.

LU, V. N.; HATTORI, Y.; MORIWAKI, A.; HAYASHI, Y.; HORI, Y. Inhibition of neurons in the rat medial amygdaloid nucleus in vitro by somatostatin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, p. 670-674, 1995.

LUQUIN, A. B.; NAFTOLIN, F.; GARCIA-SEGURA, L. M. Natural fluctuation and gonadal hormone regulation of astrocyte immunoreactivity in dentate gyrus. **Journal of Neurobiology**, v. 27, n. 7, p. 913-924, 1993.

LYNCH, G.; LARSON, J.; KELSO, S.; BARRIONUEVO, G.; SCHOTTLER, F. Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. **Nature**, v. 305, n. 5936, p. 719-721, 1983.

MALENKA, R. C.; KAUER, J. A.; ZUCKER, R. S.; NICOLL, R.A. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. **Science**, v. 242, n. 4875, p. 81-84, 1988.

MALS BURY, 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.

MATSUMOTO, A. Sex steroid induction of synaptic reorganization in adult neuroendocrine brain. **Reviews of Neuroscience**, v. 3, p. 287, 1992.

MATUS, A. Actin-based plasticity in dendritic spines. **Science**, v.290, p. 754-758, 2000.

MATUS, A.; ACKERMANN, M.; PEHLING, G.; BYERS, H. R.; FUJIWARA, K. High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. **Proceedings in National Academy of Sciences of the USA**, v. 79, n. 23, p. 7590-7594, 1982.

McDONALD. A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Neurobiololy**, v. 55, n. 3, p. 257-332, 1998.

McDONALD. A. J. Cell types and intrinsic connections of the amygdala. In: AGGLETON, J. P. **The Amygdala**. New York, Wiley-Liss., p. 67-92, 1992.

McDONALD. A. J.; SHAMMAH-LAGNADO, S. J.; SHI, C.; DAVIS, M. Cortical afferents to the extended amygdala. **Annals of New York Academy of Science**, v. 877, p. 309-338, 1999.

McEWEN, B. S. Endocrine effects on the brain and their relationship to behavior. In: **Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects**. Phyladelphia, Lippincott-Raven Publishers, p. 1007-1026, 1990.

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

McEWEN, B. S.; TAPANAT, P.; WEILAND, N. G. Inhibition of dendritic spine induction on hippocampal CA1 pyramidal neurons by a nonsteroidal estrogen antagonist in female rats. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1044-1047, 1999.

McEWEN, B. S.; WOOLLEY, C.S. Estradiol and progesterone regulate neuronal structure and synaptic connectivity in adult as well as developing brain. **Experimental Gerontology**, v. 29 (3/4), p. 431-436, 1994.

McGAUGH, J. L.; Involvement of the amygdala in neuromodulatory influences on memory storage. In: AGGLETON, J. P. (Ed.). **The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction**. Wiley-Liss, New York, p. 431-451, 1992.

McLEAN, M. J.; AITKEN, D.H.; DHATAGNAR, S.; SAPOLSKY, R. M. Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. **Neurobiology of Aging**, v. 12, n. 1, p. 31-38, 1991.

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

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

MILHOUSE, O. E.; de OLMOS, J. Aspects of the neuronal organization of the amygdala. In: BEM-ARI, Y. **The Amygdala Complex**. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biochemical Press, p. 33-43, 1981.

MITCHELL, J. B.; MEANEY, M. J. Effects of corticosterone on response consolidation and retrieval in the forced swim test. **Behavioral Neuroscience**, v. 105, n. 6, p. 798-803, 1991.

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

MIYATA, S.; ITOL, T.; ISHIYAMA, M.; NAKASHIMA, T.; KIYOHARA, T. Temporal changes of c-fos expression in oxytocinergic magnocellular neuroendocrine cells of the rat hypothalamus with restraint stress. **Brain Research Bulletin**, v. 37, n. 4, p. 391-395, 1995.

MORGAN, H. D.; WATCHUS, J. A.; MILGRAM, N. W.; FLEMING, A. S. The long lasting effects of electrical stimulation of the medial preoptic area and the medial amygdala on maternal behavior in female rats. **Brain Research**, v. 99, p. 63-73, 1999.

MUKHINA, L.; LEONTOVICH, T. A. Neuronal structure of some amygdaloid nuclei in dogs. **Arkev Anatomii Gistologii Embriologii (Moscow)**, v. 59, p. 62-70, 1970.

MURDACH, F. E.; GORSKI, J. The role of ligand in estrogen receptor regulation of gene expression. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 78, p. C103-C108, 1991.

MURPHY, D. D.; SEGAL, M. Regulation of dendrite spines density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 13, p. 4059-4068, 1996.

NAISBITT, S.; KIM, E.; TU, J.C.; XIAO, B.; SALA, C.; VALTSCHANOFF, J.; WEINBERG, R. J.; WORLEY, P. F.; SHENG, M. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. **Neuron**, v. 23, p. 569-582, 1999.

NARKIEWICZ, O.; JURANIEC, J.; WRZOLKOWA, T. The distribution of axon terminals with flattened vesicles in the nuclei of the amygdaloid body of the cat. **Journal fur Hirnforschung**, v. 19, p. 133-143, 1978.

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

NEWCOMER, J. W.; CARFT, S.; HERSHY, T.; ASKINS, K.; BARDGETT, M. E. Glucocorticoid-induced impairment in declarative memory performance in adult humans. **Journal of Neuroscience**, v.14, p. 2047-2053, 1994.

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

NIMCHINSKY, E. A.; SABATINI, B. L.; SVOBODA, K. Structure and function of dendritic spines. **Annual Reviews of Physiology**, v. 64, p. 313-353, 2002.

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

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

NISHIZUKA, M.; ARAI, Y. Synapse formation in response to estrogen in the medial amygdala developing in the eye. **Proceedings in National Academy of Sciences of the USA**, v. 79, n. 11, p. 7024-7026, 1982.

NISHIZUKA, M.; ARAI, Y. Intrinsic connections in the medial amygdala as revealed by complete deafferentation. **Neuroscience Letters**, v. 35, p. 247-251, 1983.

NITECKA, L.; BEN-ARI, Y. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. **Journal of Comparative Neurology**, v. 266, p. 45-55, 1987.

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

NUSSER, Z.; LUJAN, R.; LAUBE, G.; ROBERTS, J. D.; MOLNAR, E.; SOMOGYI, P. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. **Neuron**, v. 21, n. 3, p. 545-559, 1998.

OBERTO, A.; PANZICA, G. C.; ALTRUDA, F.; EVA, C. GABAergic and NPY-Y network in the medial amygdala: a neuroanatomical basis for their functional interaction. **Neuropharmacology**, n. 41, p. 639-642, 2001.

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

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

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain Stereotaxic Coordinates**. San Diego, Academic Press, 1998.

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

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

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

PFAUS, J. G.; HEEB, M.M. Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 4, p. 397-407, 1997.

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

PRICE, C. **The Limbic Region II: the amygdaloid complex**. In: BJÖKLUND, A; HÖKFELT, T. and SWANSON, L. W. **Handbook of Chemical Neuroanatomy**, Elsevier, Amsterdam, v. 5, p. 1029-1039, 1995.

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

RABACCHI, S.; BAILLY, Y.; DELHAYE-BOUCHAUD, N; MARIANI, J. Involvement of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. **Science**, 256, p. 1823-1825, 1992.

RAMÓN y CAJAL, S. Neurons: size and general morphology. In: SWANSON, N.; SWANSON, S. W. **Histology of the Nervous System**, New York: Oxford University Press, p. 46-57, 1995. (traduzido da edição francesa de 1909)

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

RASIA-FILHO, A. A.; LONDERO, R. G.; ACHAVAL, M. Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. **Brain Research Bulletin**, v. 48, p. 173-183, 1999.

RASIA-FILHO, A. A.; LONDERO, R. G.; ACHAVAL, M. Functional activities of the amygdala: an overview. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 14-23, 2000.

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

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

ROCHA, M.; FURTADO, D. A.; MENEZES, J. R. L.; HEDIN-PEREIRA, C. Form and function: a neuronal dialog. **Brain and Mind**, v. 4, p. 3-25, 2003.

ROMANO, G. J.; KRUST, A.; PFAFF, D. W. Expression and estrogen regulation of progesterone receptor mRNA in neurons of the mediobasal hypothalamus: an in situ hybridization study. **Molecular Endocrinology**, v. 3, n. 8, p. 1295-1300, 1989.

ROOZENDAAL, B.; McGAUGH, J. L. Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 65, p. 1-8, 1996.

ROSE, C. R.; KONNERTH, A. NMDA receptor-mediated Na^+ signals in spines and dendrites. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 4207-4214, 2001.

SALA, C.; PIECH, V.; WILSON, N. R.; PASSAFARO, M.; LIU, G.; SHENG, M. Regulation of dendritic spines morphology and synaptic function by Shank and Homer. **Neuron**, v. 31, p. 115-130, 2001.

SAR, M. Distribution of progestin-concentrating cells in rat brain: colocalization of [3H]ORG.2058, a synthetic progestin, and antibodies to tyrosine hydroxylase in hypothalamus by combined autoradiography and immunocytochemistry. **Endocrinology**, v. 123, n. 2, p. 1110-1118, 1988.

SAR, M.; STUMPF, W. E. Autoradiographic localization of radioactivity in the rat brain after the injection of 1,2-3H-testosterone. **Endocrinology**, v. 92, p. 251-256, 1973.

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

SCHEIBEL, M. E.; SCHEIBEL, A. B. The methods of Golgi. In: ROBERTSON, R. T. **Neuroanatomical Research Techniques**, New York: Academic Press, p. 89-114, 1978.

SEGAL, M. Imaging of calcium variations in living dendritic spines of cultured rat hippocampal neurons. **Journal of Physiology**, v. 486, p. 283-295, 1995a.

SEGAL, M. Dendritic spines for neuroprotection: a hypothesis. **Trends in Neuroscience**, v. 11, p. 468-471, 1995b.

SEGAL, M.; ANDERSEN, P. Dendritic spines shaped by synaptic activity. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, p. 582-586, 2000.

SEGAL, M.; MURPHY, D. Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates. **Hormones and Behavior**, v. 40, n. 2, p. 156-159, 2001.

SHAIKH, M. B.; STEINBERG, A.; SIEGEL, A. Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive range behavior in the cat. **Brain Research**, v. 265, p. 283-294, 1993.

SHEEHAN, T. P.; CIRRITO, J.; NUMAN, M. J.; NUMAN, M. Using c-fos immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, n. 2, p. 337-352, 2000.

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

SHEPHERD, G. M. Information processing in dendrites. In: ZIGMOND, J. M.; BLOOM, F. E.; LANDIS, S. C.; ROBERTS, J. L. **Fundamental Neuroscience**. Academic Press. San Diego, California, p. 363-388, 1999.

SHEPHERD, G. M. Electrotonic properties of axons and dendrites. In: ZIGMOND, J. M.; BLOOM, F. E.; LANDIS, S. C.; ROBERTS, J. L. **Fundamental Neuroscience**. Academic Press. San Diego, California, p. 107-127, 1999.

SHEPHERD, G. M. The dendritic spine: a multifunctional integrative unit. **Journal of Neurophysiology**, v. 75, n. 6, p. 2197-2210, 1996.

SHERIDAN, P. J. The nucleus interstitialis stria terminalis and the nucleus amygdaloideus medialis: prime targets for androgen in the rat forebrain. **Endocrinology**, v. 104, n. 1, p. 130-136, 1979.

SHINDOU, T.; WATANABE, S.; YAMAMOTO, K.; NAKANISHI, H. NMDA receptor-dependent formation of long-term potentiation in the rat medial amygdala neuron in an in vitro slice preparation. **Brain Research Bulletin**, v. 31, p. 667-672, 1993.

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

SIEGEL, A.; BRUTUS, M. Neural substrates of aggression and rage in the cat. In: EPSTEIN, A. N.; MORRISON, A. R. **Progress in Psychobiology and Physiological Psychology**, 14 th Ed. Academic Press, San Diego, CA., p. 135-233, 1990.

SIEGEL, A.; BRUTUS, M.; SHAIKH, M. B. Effects of amygdaloid seizures upon aggressive behavior elicited from the hypothalamus of the cat. In: OOMURA, Y. **Emotions: Neuronal and Chemical Control**, p. 219-230, 1986.

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

SIMERLY, R. B. Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. **Behavioral Brain Research**, v. 92, p. 195-203, 1998.

SIMMONS, D. A.; YAHR, P. GABA and glutamate in mating-activated cells in the preoptic area and medial amygdala of male gerbils. **Journal of Comparative Neurology**, v. 459, p. 290-300, 2003.

SINGH, V. B.; KALIMI, M.; PHAW, T. H.; BOADLE-BIBER, M. C. Intracranial dehydroepiandrosterone blocks the activation of tryptophan hydroxylase in response to acute sound stress. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 5, p. 176-181, 1994.

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

SHEPHERD, G. M. The dendritic spine: a multifunctional integrative unit. **Journal of Neurophysiology**, v. 75, n.6, p. 2197-2210, 1996

SKOFF, R. P.; HAMBURGER, V. Fine structure of dendritic and axonal growth cones in embryonic chick spinal cord. **Journal of Comparative Neurology**, v.15, n. 153 (2), p. 107-147, 1974.

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.

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

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

SWANN, J. M.; NEWMAN, S. W. Testosterone regulates substance P within neurons of the medial nucleus of the amygdala, the bed nucleus of stria terminalis and medial preoptic area of the male golden hamster. **Brain Research**, v. 590, p. 18-28, 1992.

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

TAKAHASHI, L. K.; GLADSTONE, C. D. Medial amygdaloid lesions and the regulation of sociosexual behavioral patterns across the estrous cycle in female golden hamsters. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, n. 2, p. 268-275, 1988.

TÖMBÖL, T.; SZAFRANSKA-KOSMOL, A. A Golgi study of the amygdaloid complex in the cat. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 32, p. 835-848, 1972.

TORAN-ALLERAND, C. D. On the genesis of sexual differentiation of the central nervous system: morphogenetic consequences of steroid exposure and possible role of alpha-fetoprotein. **Progress in Brain Research**, v. 61, p. 63-98, 1984.

TROMALD, M.; HULLENBERG, G. Dimensions and density of dendritic spines from rat dentate granule cells based on reconstructions from serial electron micrographs. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 377, p. 15-28, 1997.

VALVERDE, F. Intrinsic organization of the amygdaloid complex. A Golgi study in the mouse. **Trabalho do Instituto Cajal de Investigação Biológica (Madrid)**, v. 54, p. 291-314, 1962.

VEINANTE, P.; FREUND-MERCIER, M-J. Distribution of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the rat extended amygdala: a histoautoradiographic study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 383, p. 305-325, 1997.

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

VOLFOVSKY, N.; PARNAS, H.; SEGAL, M.; KORKOTIAN, E. Geometry of dendritic spines affects calcium dynamics in hippocampal neurons: theory and experiments. **Journal of Neurophysiology**, v. 82, p. 450-462, 1999.

WATANABE, Y.; IKEGAYA, Y.; SAITO, H.; ABE, K. Roles of GABA, NMDA and muscarinic receptors in induction of long-term potentiation in the medial and lateral amygdala in vitro. **Neuroscience Research**, v. 21, p. 317-322, 1995.

WESTBERRY, J. M. Categorization of pheromonal chemosignals by medial amygdala. Tese de doutorado. The Florida State University College of Arts and Sciences, 2003.

WESTRUM, L. E.; JONES, D. H.; GRAY, E. G.; BARRON, J. Microtubules, dendritic spines and spine apparatuses. **Cell Tissue Research**, v. 208, n. 2, p. 171-181, 1980.

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

WOOD, R. L.; NEWMAN, S. W. Hormonal influence on neurons of the mating behavior pathway in male hamster. In: MICIVYCH, P. E. & HAMMER Jr, R. P. **Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones**. New York, Cambridge, p. 3-39, 1995.

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

WOOLF, T. B.; SHEPHERD, G. M.; GREER, C. A. Local information processing in dendritic trees: subsets of spines in granule cells of the mammalian olfactory bulb. **Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 1837-1854, 1991.

WOOLLEY, C. S. Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. **Hormones and Behavior**, v. 34, p. 140-148, 1998.

WOOLLEY, C. S.; GOULD, E.; FRANKFURT, M.; McEWEN, B. S. Exposure to excess glucocorticoids alters morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. **Brain Research**, v. 531, p. 225-231, 1990.

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.

WOOLLEY, C. S.; McEWEN, B. S. Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 12, p. 7680-7687, 1994.

WOOLLEY, C. S.; McEWEN, B. S. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 336, p. 292-306, 1993.

WOOLLEY, C. S.; WEILAND, N. G.; McEWEN, B. S.; SCWARTZKROIN, P. A. Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 5, p. 1848-1859, 1997.

YU, H. The amygdaloid complex in the rat, masters thesis. University of Ottawa, Ottawa, 1969.

YUSTE, R.; BONHOEFFER, T. Morphologic changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. **Annual Reviews of Neuroscience**, v.24, p. 1071-1089, 2001.