



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

**ESTUDO SOBRE A DENSIDADE DE ESPINHOS  
DENDRÍTICOS DE NEURÔNIOS DA AMÍGDALA  
MEDIAL PÓSTERO-DORSAL DE RATOS: EFEITO  
DA LATERALIDADE ENTRE OS SEXOS E NAS  
REGIÕES DORSAL E VENTRAL EM RATAS**

Michele Arpini

Porto Alegre

2009



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

**ESTUDO SOBRE A DENSIDADE DE ESPINHOS DENDRÍTICOS DE  
NEURÔNIOS DA AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-DORSAL DE RATOS:  
EFEITO DA LATERALIDADE ENTRE OS SEXOS E NAS REGIÕES DORSAL  
E VENTRAL EM RATAS**

Michele Arpini

**Orientador:** Prof. Dr. Alberto A. Rasia Filho

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

Porto Alegre

2009

*Dedico este trabalho a Deus,  
fonte da minha vida e razão do meu  
existir, aos meus pais, Ulisses e  
Silvania, pelo apoio constante e ao meu  
marido Silvano, pelo o amor e  
compreensão.*

*“Porque o Senhor é bom, a sua misericórdia dura para sempre, e, de geração em geração a sua fidelidade.”*  
*Salmo 100 : 5*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPQ, à UFRGS e ao Programa de Pós Graduação em Neurociências pela oportunidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto Antônio Rasia Filho, pela sua paciência, seu carinho e, principalmente, dedicação.

Aos colegas do laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS: Gisele Louvattel, Simone Marcuzzo, Aline Dall'Óglio, Juliana de Castilhos, Esdras Escobar, Arthiese Kolb, Patrícia Feska pelas amizade e momentos de alegria e ajuda durante este mestrado.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia da UFSCPA: Édson Quagliotto, Janaína Brusco, Carol Boettge, Maitê, Ana Paula, Larissa, Lisete pela parceria e amizade. Também aos técnicos de laboratório da UFSCPA, Carmen Rocha, Rosângela Bjerk e Mário, pela ajuda sempre disponível, a vocês muito obrigado!!!

À amiga e colega de laboratório Itiana Castro Menezes, por me ouvir e me animar em momentos difíceis, pelo seu bom humor sempre presente em qualquer situação e, principalmente, pela sua ajuda em todas as etapas dos experimentos.

Aos professores e funcionários do PPG de Neurociências pelas contribuições e amizade.

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELA.....	9
RESUMO.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
1. 1. Amígdala.....	13
1. 2. Núcleo medial da amígdala.....	15
1. 2. 1. Localização, divisão e citoarquitetura.....	15
1. 2.2. Hodologia e funções.....	18
1. 2.3. Receptores para hormônios sexuais.....	21
1. 2.4. Técnica de Golgi e caracterização dos neurônios do MePD.....	24
1. 2.5. Espinhos dendríticos.....	31
2. MATERIAL e MÉTODOS.....	37
2. 1. Animais.....	37
2. 2. Procedimento histológico.....	38
2. 3. Aquisição dos dados.....	40
2. 4. Análise estatística.....	42
3. RESULTADOS.....	43
4. DISCUSSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## ABREVIATURAS

Ace	Núcleo central da amígdala
AMBI	Núcleo basilar lateral da amígdala
Ame	Núcleo medial da amígdala
Er $\alpha$	Receptor do tipo $\alpha$ para estrógeno
Er $\beta$	Receptor do tipo $\beta$ para estrógeno
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
MeAD	Núcleo medial ântero-dorsal da amígdala
MeAV	Núcleo medial ântero-ventral da amígdala
MePD	Núcleo medial pósterodorsal da amígdala
MePD <sub>i</sub>	Porção intermediária do núcleo medial pósterodorsal da amígdala
MePD <sub>l</sub>	Porção lateral do núcleo medial pósterodorsal da amígdala
MePD <sub>m</sub>	Porção medial do núcleo medial pósterodorsal da amígdala
MePV	Núcleo medial pósterodorsal da amígdala
BNST	Núcleo intersticial da estria terminal
NMDA	N-metil-D-aspartato
PSD	Densidade pós-sináptica
REL	Retículo endoplasmático liso
TO	Trato óptico

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Classificação dos núcleos que compõe a amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais, conforme descrito por Alheid et al., (1995) modificado por Rasia-Filho et al. (2000), Marcuzzo (2006) e Dall'Oglio (2007).
- Figura 2 Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar os quatro subnúcleos da AMe: AMeAD (em amarelo), AMeAV (em verde), AMePD (em azul) e AMePV (em vermelho). Os valores em mm colocados no lado direito das imagens referem-se à distância posterior ao bregma. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998), equivale às figuras 26 a 31 deste, iniciando-se na parte superior à inferior da figura, reproduzida de Marcuzzo, 2006.
- Figura 3 Representação esquemática da amígdala póstero-dorsal de rato e sua divisão em região dorsal e ventral (neste caso, dMEApd e vMEApd, respectivamente), conforme descrito originalmente e copiado de Gréco *et al.* (2003).
- Figura 4 Fotomontagem de neurônio de tipo bipenachado do subnúcleo póstero-dorsal do núcleo medial da amígdala de rato adulto. Impregnação pela técnica de Golgi. Escala = 50  $\mu$ m (Dall'Oglio, 2007).
- Figura 5 Fotomontagem de neurônio de tipo estrelado do subnúcleo póstero-dorsal do núcleo medial da amígdala de rato adulto. Impregnação pela técnica de Golgi. Escala = 50  $\mu$ m (Dall'Oglio, 2007).
- Figura 6 Desenho esquemático da ultraestrutura do espinho dendrítico onde se observam a cabeça e o pescoço do espinho que emergem do dendrito adjacente na base da figura. Alguns elementos constituintes da estrutura do espinho estão demonstrados. PSD, densidade pós-sináptica; REL, retículo endoplasmático liso; VE, vesícula endocítica. O aparelho do espinho, filamentos de actina e polirribossomos formam o citoesqueleto do espinho (adaptado de HERING; SHENG, 2001).
- Figura 7 Representação esquemática das diferentes morfologias dos espinhos dendríticos, como se observa à microscopia de luz, surgindo a partir de uma linha de base que representa o tronco dendrítico (adaptado de HERING; SHENG, 2001 e reproduzida de MARCUZZO, 2006).

- Figura 8 Desenhos esquemáticos feitos em câmara clara, acoplada a microscópio óptico dos espinhos dos primeiros 40  $\mu$ m dendríticos de neurônios do lado direito (A) e esquerdo (B), impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial pósterodorsal de ratos machos adultos. Os neurônios provenientes do mesmo subnúcleo e do lado direito (C) e esquerdo (D) de fêmeas em diestro estão mostrados abaixo. Neste caso os neurônios são do tipo bifenachado e a morfologia dos espinhos e dendríticos pode não ser idêntica à real por razões técnicas, mas a quantidade serviu para as determinações da densidade de espinhos dendríticos.
- Figura 9 Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão da densidade de espinhos obtida nos primeiros 40  $\mu$ m dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi da amígdala medial pósterodorsal dos lados direito e esquerdo de ratos machos adultos e de fêmeas em diestro. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.
- Figura 10 Desenhos esquemáticos feitos em câmara clara, acoplada a microscópio óptico, dos espinhos dos primeiros 40  $\mu$ m dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi da região dorsal (A) e ventral (B) da amígdala medial pósterodorsal lado esquerdo de ratas adultas em proestro. Neste caso os neurônios são bifenachados e a morfologia dos espinhos dendríticos pode não ser idêntica à real por razões técnicas, mas a quantidade serviu para as determinações da densidade de espinhos dendríticos.
- Figura 11 Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão da densidade de espinhos obtida nos primeiros 40  $\mu$ m dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi das regiões dorsal e ventral da amígdala medial pósterodorsal esquerda de ratas em proestro. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

## TABELA

- Tabela 1 Aferências intra-amigdalíanas e extra-amigdalíanas para os subnúcleos do núcleo medial da amígdala, conforme McDonald (1998) e Pitkanen (2000) e adaptado por Hermel (2006) e Dall'Oglio (2007).

## RESUMO

O núcleo medial da amígdala é uma estrutura sexualmente dimórfica no encéfalo de ratos e está dividida em quatro subnúcleos, um deles é o póstero-dorsal (MePD). O MePD está sob ação epigenética exercida pelos esteróides sexuais em ambos os sexos e, dada sua hodologia, modula diversos comportamentos sociais como é o caso dos reprodutivos. Os espinhos dendríticos representam locais preferenciais para contato sináptico nos neurônios e a plasticidade neural. Não obstante, não está descrito ainda o efeito da lateralidade hemisférica na densidade de espinhos dendríticos no MePD de ambos os sexos. E nem se há diferenças nos espinhos dendríticos dentro deste subnúcleo nas regiões dorsal e ventral em fêmeas, uma vez que existem diferenças quanto à expressão de receptores para estrogênio nesses locais. O presente trabalho teve por objetivos estudar a densidade de espinhos dendríticos no MePD dos lados direito e esquerdo de machos e fêmeas em diestro, e estudar a densidade de espinhos dendríticos nas regiões dorsal e ventral do MePD de ratas na fase de proestro. Foram utilizados ratos Wistar adultos (n = 6 animais em cada grupo) cujos encéfalos foram processados de acordo com variação da técnica de Golgi. Neurônios bem impregnados pela prata e indubitavelmente presentes no MePD foram selecionados para estudo (n = 48 neurônios para cada variável experimental testada, 8 ramos dendríticos diferentes por área/animal). Os espinhos presentes nos primeiros 40  $\mu\text{m}$  dendríticos foram desenhados com auxílio de uma câmara clara acoplada a microscópio óptico (1000 x). Os dados médios da densidade de espinhos dendríticos dos lados direito e esquerdo do MePD de machos e fêmeas em diestro foram submetidos ao teste da análise da variância de duas vias para medidas repetidas e os valores obtidos nas regiões dorsal e ventral de fêmeas em proestro foram comparados pelo teste “t” de Student pareado (em ambos os casos, o nível de significância estatística foi estabelecido em  $p \leq 0,05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao sexo, à lateralidade ou à interação entre esses fatores entre machos e fêmeas em diestro (valores em torno de 2 espinhos/ $\mu\text{m}$  dendrítico;  $p > 0,2$  em todos os casos). Da mesma forma não houve entre as regiões

dorsal e ventral das fêmeas em proestro (valores em torno de 1,7 espinhos/ $\mu\text{m}$  dendrítico;  $p = 0,1$ ). Os resultados sugerem que, apesar de dados na literatura indicarem diferenças hemisféricas na ocorrência de potenciais pós-sinápticos excitatórios nos neurônios do MePD de ratos pré-púberes machos e fêmeas, não há diferença no número de espinhos nos dendritos proximais que justifiquem tal achado prévio ou, pelo menos, que não são esses os locais preferenciais para gerar tal achado eletrofisiológico. Adicionalmente, apesar de terem sido descritas expressões diferentes para receptores de tipo  $\alpha$  e  $\beta$  nas regiões dorsal e ventral do MePD, isto não gera diferença no número de espinhos dendríticos proximais nessas regiões em fêmeas durante a fase do ciclo ovulatório que apresenta os maiores valores de estradiol em circulação, a saber a fase de proestro. Esses achados complementam os conhecimentos atuais sobre a MePD de ratos e indicam que a densidade de espinhos dendríticos não representa o elemento preferentemente e diretamente correlacionável com outros dados da literatura mencionados, embora seja um local de plasticidade sináptica em outras condições experimentais.

## ABSTRACT

The posterodorsal medial amygdaloid nucleus (MePD) is a sexually dimorphic area in the rat brain and dendritic spines are specialized postsynaptic sites involved with local neural plasticity. Electrophysiological data showed that prepubertal males have more excitatory synapses than females in the left MePD. Besides, dorsal and ventral MePD neurons have a different expression of estrogen receptors in mating-responsive neurons in the adult female rats. Based on  $\beta$  or  $\alpha$  receptors these previous findings, the “single-section” Golgi method was employed in adult rats ( $n = 6$  in each group) to reveal: (1) the effect of hemispheric laterality in the density of dendritic spines in the MePD of males and diestrus females, and (2) the density of dendritic spines in the MePD dorsal and ventral subregions in proestrus females (mean values from  $n = 48$  neurons for each experimental variable, 8 different dendritic branches per area/animal). There were no statistically significant difference for sex, laterality, and the interaction of these factors between males and diestrus females ( $p > 0.2$ ), nor for the dorsal and the ventral MePD dendritic spine density in proestrus females ( $p > 0.1$ ). These findings complement current knowledge about the rat MePD and suggest that the number of proximal dendritic spines is not lateralized at adulthood. In addition, the different expression of estradiol receptors in the dorsal and ventral MePD did not induce a distinct spine number during the peak of circulating ovarian steroids in the proestrus.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Amígdala

A amígdala, ou complexo amigdaliano, é uma estrutura que compreende subnúcleos situados no lobo temporal, lateral ao hipotálamo e ventral ao estriado, no prosencéfalo basal de mamíferos (ALHEID *et al.*, 1995). Em primatas, é caracterizada como uma massa ovóide de substância cinzenta, localizada na porção terminal e rostral da formação hipocampal (ALHEID *et al.*, 1995; de OLMOS, 1999). Em ratos, no entanto, localiza-se anteriormente ao hipocampo ventral e apresenta relação com o hipocampo somente na área de transição mais posterior (de OLMOS *et al.*, 2004).

A amígdala de ratos não é também nem uma unidade anatômica nem funcional (SWANSON e PETROVICH, 1998). Preferentemente, 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 sociais (ALHEID *et al.*, 1995; EVERIT, 1995; SWANSON, PETROVICH, 1998; RASIA-FILHO *et al.*, 2000; de OLMOS *et al.*, 2004). Os núcleos amigdalianos compõem vias preservadas filogeneticamente, como as aferências que recebe do bulbo olfatório principal e acessório e as eferências que envia para vários núcleos e subsistemas funcionais do hipotálamo (PETROVICH *et al.*, 2000 AIZAWA *et al.*, 2004). Isso comprova a importância dos núcleos amigdalianos para a sobrevivência e adaptação do animal em seu ambiente, integrando atividades comportamentais, endócrinas, simpáticas e parassimpáticas, inatas ou aprendidas (RASIA-FILHO *et al.*, 2000).

De fato, foi a partir do trabalho pioneiro de Klüver e Bucy (1939) que se demonstrou que a lesão que envolvia o lobo temporal anterior de macacos fazia com que esses animais apresentassem agnosia visual, tivessem uma tendência a investigar com a boca toda a sorte de objetos colocados a seu alcance, diminuíssem sua agressividade e as manifestações comportamentais relacionadas com medo, além de apresentarem um aumento anormal do comportamento sexual (como revisado em RASIA-FILHO *et al.*, 2000). Dentre as diferentes funções dos núcleos amigdalianos em ratos estão as repostas a estímulos gerados por medo e ansiedade, percepções de estímulos olfatórios e hormonais (como o dos esteróides sexuais e os glicocorticóides), modulação dos comportamentos reprodutivo, maternal e defensivo e participação na aquisição do aprendizado e da memória condicionada (KLING e BROTHERS, 1992; LeDOUX, 1992; EVERIT, 1995; KONDO e ARAI, 1995; WOOD e NEWMAN, 1995; QUIRK *et al.*, 1995; SWANSON e PETROVICH, 1998; DAVIS, 2000; PITKÄNEN, 2000; RASIA-FILHO *et al.*, 2000; 2004; de CASTILHOS *et al.*, 2006). Por isso é muito importante estudar de forma individual e detalhada cada um de seus componentes e, por vezes de seus subcomponentes, os quais formam circuitos específicos para gênese e modulação de respostas neurais envolvidas com comportamentos e ajustes diversos (CANTERAS *et al.*, 1995; NEWMAN, 1999; SHEEMAN *et al.*, 2001; PETROVICH *et al.*, 2001; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; RONDINI *et al.*, 2004; CAVALCANTE *et al.*, 2006).

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); 2) amígdala com características corticais, subdividida em porção basolateral (AMBl) e em porções

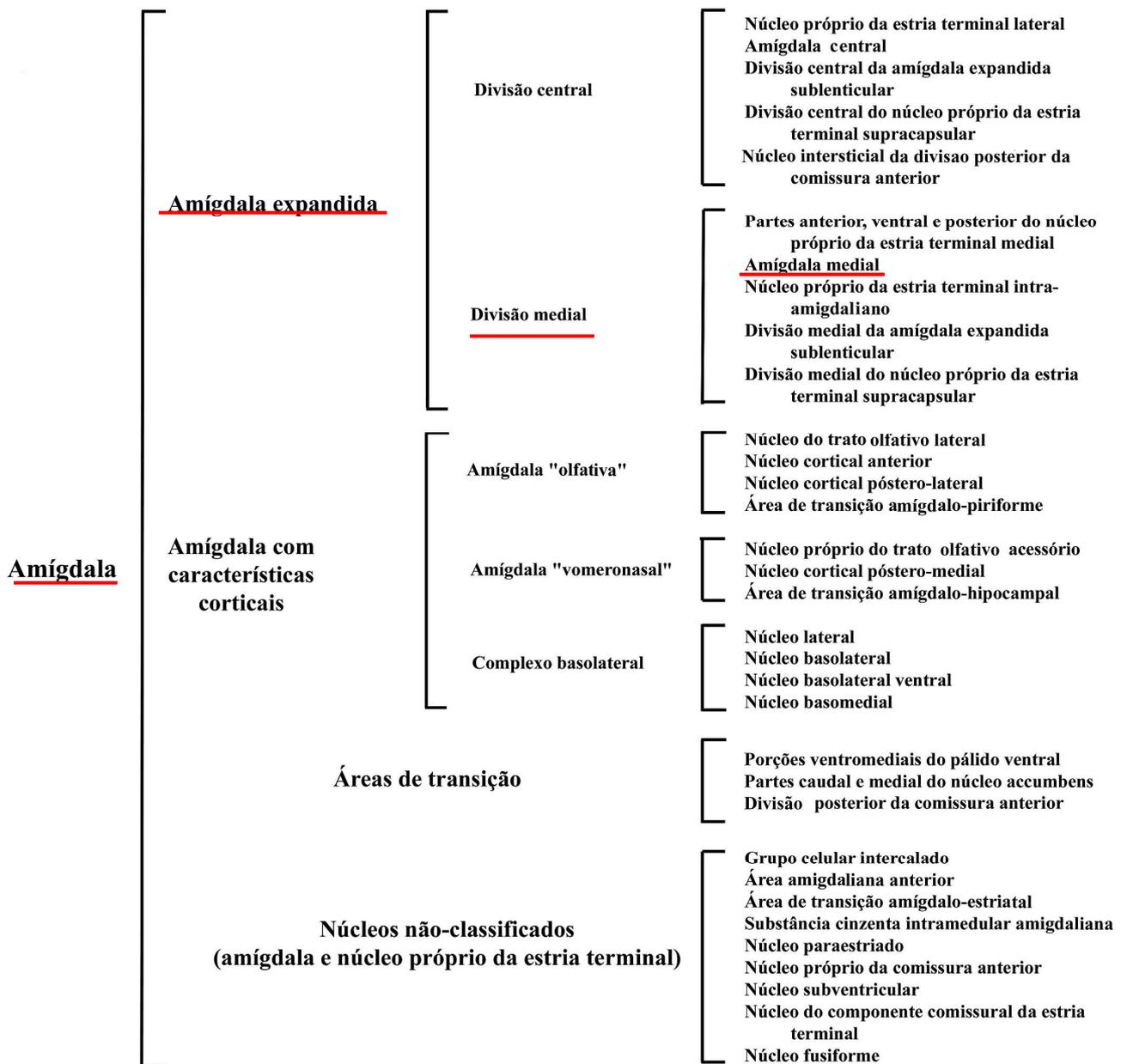
que se ligam às vias olfativas e vomeronasal; 3) áreas de transição localizadas entre a porção ventral dos núcleos da base e a amígdala “expandida” e, 4) núcleos ainda não classificados, constituídos por um grande grupo de células dispersas na substância branca e no interior do núcleo próprio da estria terminal (ALHEID *et al.*, 1995; HEIMER *et al.*, 1997; de OLMOS *et al.*, 2004; Figura 1).

Maior atenção será dada ao AMe e seus subnúcleos, em especial um deles detalhado a seguir, tema desta dissertação e onde foram realizados os experimentos que serão descritos.

## **1.2. Núcleo medial da amígdala**

### **1.2.1. Localização, divisão e citoarquitetura**

O AMe é um dos núcleos superficiais do complexo amigdaliano, ocupando seu aspecto rostromedial. É composto por células justapostas à porção lateral do trato óptico seguindo-o desde a posição rostral até a caudal (ALHEID, *et al.*, 1995). Inicia-se medialmente e posteriormente ao núcleo do trato olfativo e ao núcleo anterior da amígdala, estendendo-se caudalmente até o surgimento da porção temporal do ventrículo lateral, em posição ventral em relação à estria terminal (ALHEID, *et al.*, 1995).



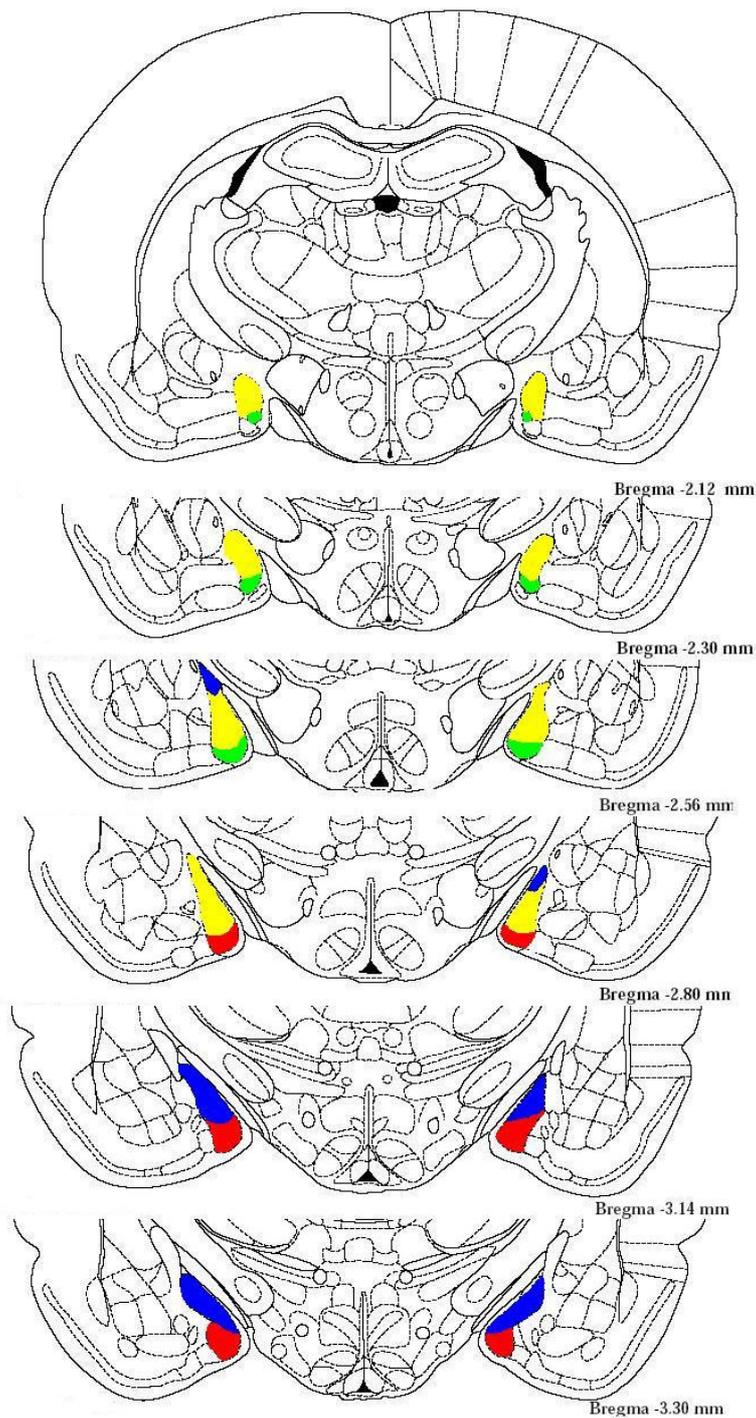
**Figura 1.** Classificação dos núcleos que compõe a amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais, conforme descrito por Alheid et al. (1995) e modificado por Rasia-Filho et al. (2000), Marcuzzo (2006) e Dall'Óglio (2007).

Na literatura, tem-se proposto dividir o AMe em subnúcleos de diferentes modos. Pitkänen (2000) divide-o em três regiões: uma porção rostral, uma porção central e uma porção caudal. Alheid et al. (1995) e de Olmos et al. (2004) dividem-no em quatro subnúcleos: núcleo medial ântero-dorsal (MeAD), núcleo medial ântero-ventral (MeAV), núcleo medial pósterodorsal (MePD) e núcleo medial póstero-ventral (MePV; Figura 2). E em função de suas conexões, o AMe pode estar organizado em uma região anterior ou “ventral”, da qual fazem parte a MeAD, a MeAV e a MeDV e uma região posterior, formada basicamente pela MePD (CANTERAS *et al.*, 1995). Recentes achados permitiram uma reavaliação do termo AMe “ventral”, basicamente impedindo-se de ter esses três subnúcleos classificados como uma entidade (DALL'ÓGLIO *et al.*, 2008b)

O MePD, objeto de estudo deste trabalho, é separado do trato óptico por uma camada com poucos corpos celulares, a qual se torna estreita em direção rostral e dorsal até que desaparece completamente próximo da MeAD (de OLMOS *et al.*, 1985, 2004). Esta região preferentemente deve ser considerada como o local de passagem de axônios advindos do núcleo próprio da via olfativa acessória para transmissão da informação vomeronasal (SCALIA e WINANS, 1975; NISHIZUKA e ARAY, 1983; de OLMOS *et al.*, 2004; PRO-SISTIAGA *et al.*, 2007). Os neurônios do MePD agrupam-se formando três colunas orientadas paralelamente à sua superfície medial denominadas de: 1) medial ou superficial (MePDm), 2) intermediária (MePDi) e 3) lateral (MePDI) (de OLMOS *et al.*, 2004).

### 1.2.2 Hodologia e Funções

As aferências principalmente estudadas para os subnúcleos do MeA estão listadas na Tabela 1. Dentre elas, o MePD de ratos possui aferências que advêm de diferentes regiões do encéfalo (McDONALD, 1998; PITKANEN, 2000). Dentre as aferências mais estudadas, estão as do córtex cerebral (da área pré-límbica, córtex entorrinal, infalímbico e perirrinal dorsal), as hipotalâmicas (da área pré-óptica, por exemplo), as da área septal e as aferências talâmicas, as do tronco encefálico (núcleo dorsal da rafe e núcleo parabraqüial) e as da via olfativa (do córtex piriforme, bulbo olfativo acessório e núcleo endopiriforme). Além dessas, existem também as aferências intra-amigdalíanas onde destacam-se as da área de transição amígdalo-hipocámpal e dos núcleos basal e basal acessório e as dos núcleos corticais anterior, posterior, lateral e medial (McDONALD, 1998). Em relação às aferências do MePD, dentre as mais estudadas e significativas estão as hipotalâmicas (para o núcleo hipotalâmico periventricular ântero-ventral, para a área pré-óptica e para o núcleo pré-mamilar ventral dentre outros), as corticais (para a área entorrinal lateral, área de transição pós-piriforme, área CA1 hipocámpal), as do tronco encefálico (para a área tegmental dorsal e a substância cinzenta periaqueductal) e para outras regiões como, por exemplo, para o núcleo próprio da estria terminal (parte ântero-dorsal e posterior principal) e para a substância inominata, principalmente (CANTERAS *et al.*, 1995; DONG *et al.*, 2001; PETROVICH *et al.*, 2001; CHOI *et al.*, 2005). Ademais, existem também as aferências intraamigdalíanas onde, dentre elas, destacam-se aquelas para os núcleos central, cortical póstero-lateral e póstero-medial (CANTERAS *et al.*, 1995).



**Figura 2.** Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar os quatro subnúcleos da AMe: AMeAD (em amarelo), AMeAV (em verde), AMePD (em azul) e AMePV (em vermelho). Os valores em mm colocados no lado direito das imagens referem-se à distância posterior ao bregma. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998), equivalente às figuras 26 a 31 deste, iniciando-se na parte superior à inferior da figura (reproduzida de Marcuzzo, 2006).

**Tabela 1** – Aferências intra-amigdalianas e extra-amigdalianas para os subnúcleos do núcleo medial da amígdala, conforme McDonald (1998) e Pitkanen (2000) e adaptado por Hermel (2006) e Dall'Oglio (2007).

<b>INTRA-AMIGDALIANAS</b>	<b>CORTICAIS</b>	<b>INTER-AMIGDALIANAS</b> <i>contralaterais</i>
Área amígdalo-hipocampal	Área pré-límbica	Córtex periamigdaliano
Córtex periamigdaliano	Córtex entorrinal	Núcleo basilar acessório
Núcleo basilar	Córtex infralímbico	Núcleo cortical posterior
Núcleo basilar acessório	Córtex perirrinal dorsal	Núcleo do trato olfatório lateral
Núcleo cortical anterior e posterior	Insula agranular posterior Insula agranular ventral	<b>TALÂMICAS</b>
Núcleo lateral	Subículo tempotal distal e proximal	Núcleo centro mediano Núcleo medial
Subnúcleos componentes do núcleo medial	<b>TRONCO ENCEFÁLICO</b>	Núcleo parafascicular Núcleo paratenial
<b>SISTEMA OLFATÓRIO</b>	Núcleo retrobulbar Área tegmentar ventral	Núcleo paraventricular Núcleo posterior
Córtex piriforme	Células adrenérgicas da área postrema (C1) e células noradrenérgicas (A1) no bulbo ventro-lateral	Núcleo de reunião
Bulbo olfatório	Núcleo central superior	Núcleo subparafascicular
Bulbo olfatório acessório	Núcleos dorsais da rafe	Núcleo talâmico póstero-ventral
Bulbo olfatório anterior	Núcleo dorsal do lemnisco lateral	
Núcleo endopiriforme	Núcleo parabraquial	
	Núcleo peripeduncular	
<b>HIPOTALÂMICAS</b>	Núcleo tegmental pedunculopontino	
Área hipotalâmica anterior		
Área pré-óptica medial e lateral		
Área retroquiasmática		
Núcleo arqueado		<b>OUTRAS</b>
Núcleo dorso-medial		Núcleo da banda diagonal de Broca
Núcleo hipotalâmico posterior		Núcleo próprio da estria terminal
Área hipotalâmica lateral		Substância inominada
Núcleo pré-mamilar ventral		
Núcleo supramamilar		
Núcleo supra-óptico		
Núcleo tuberal		
Núcleo ventromedial		
Núcleo túbero-mamilar		

Os subnúcleos do AMe possuem uma ampla rede de conexões neurais entre seus subnúcleos, com outros núcleos da amígdala e também com outros núcleos extra-amigdalianos, como descrito. Seria de se esperar que isso se repercutisse em várias funções a serem executadas por tais subnúcleos. De fato, os subnúcleos do AMe contribuem para a interpretação de informações sensoriais interoceptivas e exteroceptivas (BRESSLER *et al.*, 1996; GUILLAMÓN e SEGOVIA, 1997; DIELEMBERG *et al.*, 2001), para a regulação de comportamentos sociais (BOLHUIS *et al.*, 1984; NEWMAN, 1999), para diferentes etapas da atividade sexual de machos e fêmeas além do comportamento maternal (RASIA-FILHO *et al.*, 1991; COLLEN *et al.*, 1997; NEWMAN, 1999; SHEEHAN *et al.*, 2001), da modulação da memória condicionada e para o aprendizado onde o componente emocional esteja envolvido (CANTERAS *et al.*, 1995; ROOZENDAAL e McGAUGH, 1996; RASIA-FILHO *et al.*, 2000).

### **1.2.3. Receptores para Hormônios Sexuais**

Em mamíferos, as diferenças sexuais epigenéticas na morfologia neuroglial podem resultar das diferentes exposições celulares aos esteróides gonadais (BREEDLOVE *et al.*, 2008). Alterações na estrutura e na função do sistema nervoso são parte das ações que os hormônios sexuais possuem para modulação da atividade neural de ratos adultos (GOMEZ e NEWMAN, 1991; MALSBUY e McKAY, 1994; McEWEN *et al.*, 1999). A ação destes hormônios pode ser classificada em rápida (abertura direta de canais iônicos ou estimulação da exocitose), intermediária (fosforilação de enzimas, de proteínas componentes de canais iônicos e de receptores de proteínas estruturais) ou lenta (quando alteram a expressão gênica e promovem a indução ou repressão de enzimas ou de proteínas receptoras; McEWEN, 2006).

O AMe e seus subnúcleos são áreas sexualmente dimórficas em ratos pois apresentam diferenças morfológicas, neuroquímicas e nas conexões de seus neurônios quando se comparam machos e fêmeas (como revisado em RASIA-FILHO *et al.*, 2009). Outras regiões do sistema nervoso apresentam estas diferenças como, por exemplo, o núcleo ventromedial do hipotálamo 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 e SEGAL, 1996). A densidade de espinhos dendríticos em neurônios do VMN apresenta uma notável plasticidade ao longo do ciclo estral, sendo que nas fases de diestro e proestro a densidade de espinhos é menor do que nas demais fases (FRANKFURT *et al.*, 1990).

Assim, e neste contexto, variações morfológicas mediadas por hormônios gonadais também foram verificadas nos neurônios dos subnúcleos do AMe de ratos, onde foi observado que o volume de alguns subnúcleos, o número de espinhos dendríticos e a quantidade de receptores nicotínicos para acetilcolina são maiores em machos do que em fêmeas (NISHIZUKA; ARAI, 1981; ARIMATSU *et al.*, 1981; HINES *et al.*, 1992; RASIA-FILHO *et al.*, 1999, 2004). A princípio, parecia ser o neurópilo o maior local de mudanças morfológicas mediada pelos esteróides sexuais nos neurônios do AMe (RASIA-FILHO *et al.*, 1999), pois a castração também diminuiu o comprimento dendrítico total e o percentual de neurônio com ramos terciários em hamsters machos (GOMEZ e NEWMAN, 1991). Igualmente, a marcação imunoistoquímica para a proteína ácida fibrilar glial astrocitário (GFAP) foi diferente entre os sexos (maior em fêmeas, RASIA-FILHO *et al.*, 2002). Em fêmeas intactas, a imunorreatividade para GFAP foi mais alta na fase de proestro no MePD do que no MeAD ou no MePV (MARTINEZ *et al.*, 2006). A presença de receptores para opióides

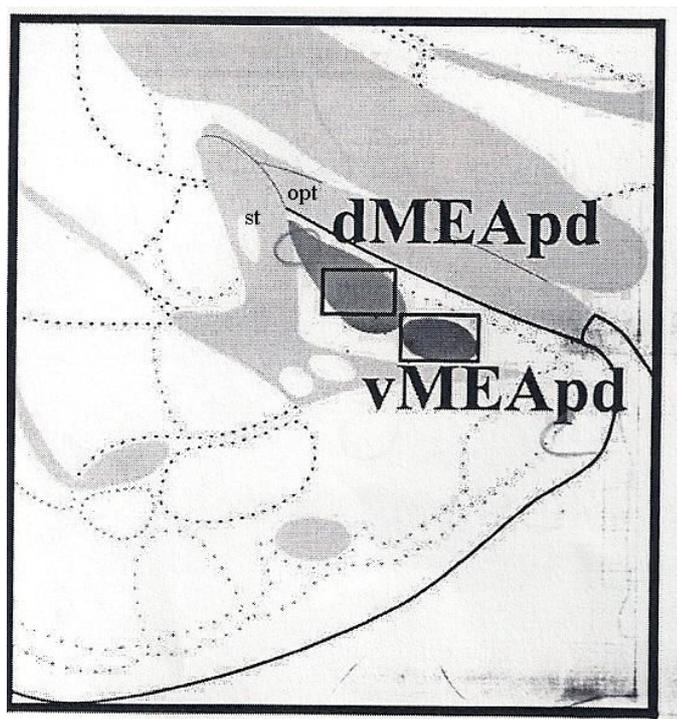
(WILSON *et al.*, 2002) e a ligação de alfa-bungarotoxina em dendritos (ARIMATSU *et al.*, 1981) também são afetados pela ação dos hormônios gonadais no AMe. O conteúdo de alguns neuropeptídeos nos subnúcleos do MeA também parece ser distinto entre os dois sexos. Machos possuem maior quantidade de células contendo colecistoquinina, vasopressina e substância P do que fêmeas (SIMERLY, 1990; MALSBUY e McKAY, 1994; DeVRIES e SIMERLY, 2002).

Há notável quantidade de receptores para esteróides sexuais e conexões sinápticas recíprocas bem documentadas entre todas as regiões do Me (SIMERLY *et al.*, 1990; WOOD e NEWMAN, 1995; LI *et al.*, 1997; SHUGHRUE *et al.*, 1997; PITKÄNEN, 2000). Neurônios com receptores para andrógenos estão presentes em todos os seus subnúcleos, porém sua concentração maior é observada da parte média à posterior do AMe, onde se encontra o MePD (SHERIDAN, 1979). Aromatase, a enzima que converte testosterona em estradiol, também foi encontrada nas áreas anterior e posterior da AMe (WAGNER e MORRELL, 1996). A atividade da aromatase no MePD foi significativamente mais alta em machos do que em fêmeas (ROSELLI *et al.*, 1985). Neurônios com receptores dos tipos  $\alpha$  e  $\beta$  para estrógenos (ER $\alpha$  e ER $\beta$  respectivamente) e progesterona são encontrados preferencialmente no MePD (SIMERLY *et al.*, 1990; LI *et al.*, 1997; GRÉCO *et al.*, 1998, 2001, 2003) com quantidades similares a diferentes núcleos do hipotálamo (SIMERLY *et al.*, 1990). Gréco *et al.*, (2003) demonstraram que existem ER $\alpha$  e ER $\beta$  com concentração diferente nas regiões dorsal e ventral do MePD de fêmeas. Este é um dado relevante para a presente dissertação, pois ambas as regiões apresentam os dois tipos de receptores, mas a imunomarcagem para os ER $\alpha$  é maior na parte dorsal do MePD, enquanto maior imunomarcagem para ER $\beta$  é maior na parte ventral do MePD de ratas (GRÉCO *et al.*, 2003; Figura 3). Os neurônios que expressam esses receptores são capazes também de

apresentar a proteína fos em maior quantidade após a ocorrência de cópula em fêmeas, sugerindo uma interrelação funcional para esses receptores e sua atividade em circuitos neurais integrados para o comportamento reprodutivo (GRÉCO *et al.*, 2003; RASIA-FILHO *et al.*, 2004). Os hormônios gonadais podem igualmente alterar a atividade dos neurônios do MePD de machos e sua consequência funcional. Por exemplo, a implantação de estradiol em ratos machos castrados em idade adulta é capaz de aumentar a atividade copulatória desses animais (RASIA-FILHO *et al.*, 1991).

#### **1. 2.4. Técnica de Golgi e caracterização dos neurônios do MePD**

Em 1873, Camillo Golgi descreveu uma técnica de impregnação celular pela prata que foi de importância fundamental para o entendimento da estrutura do tecido nervoso e de sua organização básica. Com a técnica de Golgi pode-se ter a visualização da célula nervosa inteira, a qual adquiria uma coloração negra que contrastava com o restante do tecido em cor amarelo-parda. Somente uma pequena proporção de células nervosas (1-10%) presentes no tecido é impregnada pela prata e de uma maneira ainda tida como aleatória. Ademais, nem todas as regiões do sistema nervoso de diferentes espécies impregnam-se igualmente e, conforme avança a idade do animal, torna-se muito mais difícil obter bons resultados (RAMÓN Y CAJAL, 1909; VALVERDE, 1962; PETERS e KAISERMAN-ABRAMOF, 1970; SCHEIBEL; SCHEIBEL, 1978; WOOLLEY e McEWEN, 1993; PANNESE, 1996; RASIA-FILHO *et al.*, 1999; DALL'ÓGLIO *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Representação esquemática da amígdala póstero-dorsal de rato e sua divisão em região dorsal e ventral (neste caso, dMEApd e vMEApd em retângulos acima e abaixo na figura, respectivamente), conforme descrito originalmente e copiado de Gréco *et al.* (2003). opt = trato óptico, st = estria terminal

A técnica de Golgi oferece a vantagem de mostrar células mais isoladas para estudo e a desvantagem de que, por seu caráter imprevisível, nunca se tem segurança quando algum tipo de neurônio ficará visível completamente. Quando isto ocorre, os neurônios podem ter seus componentes (corpo celular, dendritos, espinhos e axônio) passíveis de identificação e mensuração (RASIA-FILHO *et al.*, 1999; 2004; DALL'OGGIO *et al.*, 2008a,b). O método de Golgi tem amplo uso e pode ser aplicado em várias espécies animais, em situações normais ou quando os animais são submetidos aos mais diversos procedimentos experimentais (DALL'OGGIO *et al.*, 2007). Por exemplo, foi utilizada para demonstrar as alterações na quantidade de espinhos dendríticos no hipocampo de ratas adultas ao longo do ciclo estral (WOOLLEY; McEWEN, 1993), para avaliar a densidade de espinhos dendríticos dos neurônios piramidais no córtex pré-frontal e no hipocampo de ratos em isolamento social após o desmame (SILVA-GOMEZ, 2003), e para analisar a reorganização dendrítica dos neurônios piramidais do córtex pré-frontal de ratos após administração crônica de corticosterona (WELLMAN, 2001). Também foi empregada para avaliar a morfologia dos neurônios piramidais do córtex de ratos submetidos a diferentes modelos de isquemia (GONZALEZ; KOLB, 2003) ou, em seres humanos, para revelar as mudanças morfológicas nos dendritos da camada V dos neurônios piramidais do córtex pré-frontal de pacientes com esquizofrenia (BLACK *et al.*, 2004).

Essa técnica também tem sido utilizada para analisar os espinhos dendríticos em estudos como o estresse de contenção (MITRA *et al.*, 2005; MARCUZZO *et al.*, 2007), o ambiente enriquecido (LEGGIO *et al.*, 2005) e o envelhecimento (STEMMELIN *et al.*, 2003; KOLB *et al.*, 2003) em várias regiões do encéfalo de ratos. Como os espinhos são considerados indicadores de atividade sináptica de um neurônio (PETERS *et al.*, 1991; SHEPHERD, 1996; 1999) e sua distribuição, forma e tamanho estão diretamente

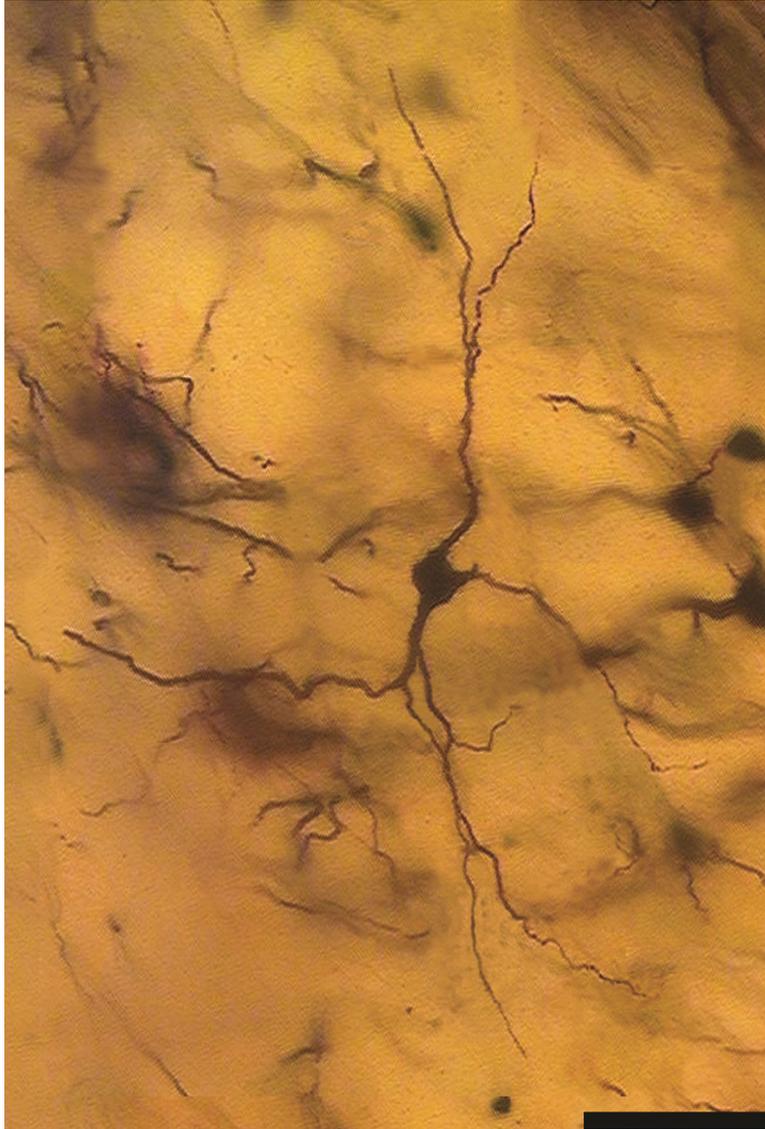
relacionadas com a função do neurônio (WOOLF *et al.*, 1991), o estudo da densidade de espinhos no MePD poderia ajudar a elucidar a atividade celular local e sua plasticidade. Isto será comentado no próximo item.

A morfologia dos neurônios dos subnúcleos do AMe de gatos (TÖMBÖL; SZAFRANSKAKOSMOL, 1972), de camundongos (VALVERDE, 1962) e de ratos (de OLMOS *et al.*, 1985; RASIA-FILHO *et al.*, 1999, 2004; DE CASTILHOS *et al.*, 2006; MARCUZZO *et al.*, 2006; DALL'ÓGLIO *et al.*, 2008a;b) tem sido estudada utilizando o método de Golgi. Nesses trabalhos, semelhanças histológicas nas diferentes espécies animais puderam ser observadas. Em ratos, esses neurônios caracteristicamente apresentam tamanho pequeno ou médio (em torno de 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio), embora células maiores também possam ser encontradas em direção à porção rostral no MeAD (de OLMOS *et al.*, 1985; RASIA-FILHO *et al.*, 1999). Os neurônios do MePDm estão densamente agrupados e apresentam tamanho pequeno a médio. O MePDi aparentemente possui menos células, neurônios de tamanho médio, e forma uma matriz que separa e orienta as outras duas colunas. A última parte, o MePDI, apresenta-se com neurônios de tamanho médio, também densamente agrupados, mas não tanto quanto os neurônios da MePDm (de OLMOS *et al.*, 2004).

Os neurônios da MePD são multipolares e foram classificados como bipenachados ou estrelados, conforme o número de ramificações dendríticas primárias originadas do soma celular (RASIA-FILHO *et al.*, 1999; 2004). Isto é, os de tipo bipenachados apresentam dois ramos dendríticos primários surgindo do soma (Figura 4) enquanto os estrelados possuem mais de dois dendritos partindo do soma (Figura 5). A ramificação dendrítica desses neurônios é esparsa, irradiando-se em várias direções e com diferentes comprimentos.



**Figura 4.** Fotomontagem de neurônio de tipo bipenachado do subnúcleo pósterodorsal do núcleo medial da amígdala de rato adulto. Impregnação pela técnica de Golgi. Escala = 50  $\mu\text{m}$  (Dall'Óglio, 2007).



**Figura 5.** Fotomontagem de neurônio de tipo estrelado do subnúcleo póstero-dorsal do núcleo medial da amígdala de rato adulto. Impregnação pela técnica de Golgi. Escala = 50  $\mu\text{m}$  (Dall'Óglio, 2007).

Os espinhos dendríticos são pleomórficos e são encontrados ao longo dos dendritos, mas também foram visualizados no soma e, algumas vezes, no segmento inicial de axônios (RASIA-FILHO *et al.*, 1999; DE CASTILHOS *et al.*, 2006; HERMEL, *et al.*, 2006). Os axônios dos subnúcleos da região posterior da AMe (AMePD e AMePV) preferentemente dirigem-se medialmente ao núcleo basal ou à porção principal do BNST, enquanto os da AMeAD compõe parte da *ansa peduncularis*, também chamada de via amígdalo-fugal ventral (KAMAL; TÖMBÖL, 1975; COOKE; SIMERLY, 2005).

Quanto à análise ultraestrutural desses neurônios (HERMEL *et al.*, 2006), encontrou-se que no MePD as sinapses axo-dendríticas são as mais freqüentemente observadas e parecem ser principalmente excitatórias. Suas regiões pré-sinápticas apresentam vesículas elétron-lúcidas sozinhas ou mescladas com poucas vesículas de centro denso. Os dendritos recebem várias sinapses sobre o mesmo ramo. Os espinhos dendríticos apresentam diferentes morfologias e geralmente são alvo de um único contato sináptico, aparentemente excitatório. Em concordância com isso, em ratos pré-púberes, registros eletrofisiológicos associados com microscopia eletrônica da MePD recentemente demonstraram a ocorrência de potenciais excitatórios pós-sinápticos muito mais provavelmente devido a múltiplos locais de contato sináptico, do que maior probabilidade de liberação de neurotransmissores (COOKE e WOOLLEY, 2005, 2009). Notavelmente, foi descrito um efeito de lateralidade hemisférica nesses resultados. Machos apresentaram maior quantidade de potenciais do lado esquerdo quando comparados a fêmeas. Ou seja, esses resultados indicam que o estudo da atividade sináptica, para o que os espinhos dendríticos são elementos relevantes, deveria tomar em conta a possibilidade de existir diferenças entre o MePD do lado esquerdo e o do lado direito em machos e fêmeas pré-púberes.

### 1.2.5. Espinhos Dendríticos

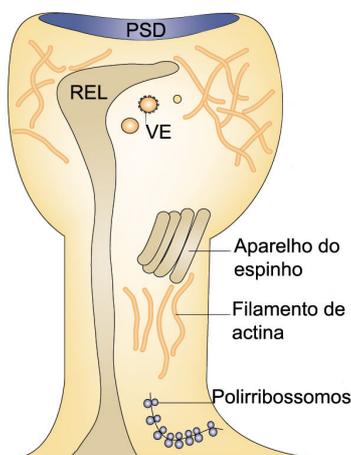
O termo espinho foi introduzido há mais de 100 anos por Santiago Ramón y Cajal (1909) quando demonstrou que a superfície das células de Purkinje no cerebelo apresentava pequenas “protusões” que cobriam os dendritos e que esses locais poderiam ser pontos do dendrito onde a corrente elétrica era recebida no neurônio. Muitos anos mais tarde, os esforços de pesquisadores usando técnicas mais avançadas provaram que a hipótese de Ramón y Cajal estava correta (GRAY, 1959). Hoje é bem estabelecido que muitas sinapses excitatórias são formadas entre terminais axonais e os espinhos dendríticos e que estes podem servir como um quarto elemento morfofuncional relevante para a atividade celular (PETERS *et al.*, 1991; YUSTE; MAJEWSKA, 2001; ETHELL; PASQUALE, 2005; HAYASHI; MAJEWSKA, 2005).

Como revisado e descrito por Marcuzzo (2007), um espinho característico tem a forma determinada pela presença de uma “cabeça” (volume de aproximadamente 0,001 a 1  $\mu\text{m}^3$ ) conectada ao neurônio por um “pescoço” (diâmetro menor que 0,1  $\mu\text{m}$ ; HARRIS; KATER, 1994). São encontrados em várias populações neuronais, em praticamente todos os vertebrados e em alguns invertebrados estudados até o momento (NIMCHINSKY *et al.*, 2002). Sua função específica é a transmissão sináptica e geralmente é um elemento pós-sináptico (ETHELL; PASQUALE, 2005; TADA; SHENG, 2006). Os receptores para neurotransmissores são restritos à superfície do espinho e confinados em aposição ao elemento pré-sináptico (NUSSER *et al.* 1998; POPOV *et al.*, 2005). Essa zona no espinho é indicada pela densidade pós-sináptica (PSD), uma zona de material elétron-denso que consiste de receptores, canais e sistemas de sinalização intracelulares envolvidos na transmissão sináptica e ao acoplamento da atividade sináptica à bioquímica pós-sináptica (NIMCHINSKY *et al.*, 2002).

Geralmente, a cabeça do espinho contém a PSD e algumas estruturas especializadas, como os microfilamentos de actina (PETERS *et al.* 1991). Embora mitocôndrias e microtúbulos estejam ausentes, os espinhos contêm retículo endoplasmático liso (REL) que pode formar uma estrutura chamada “aparelho do espinho” (PETERS *et al.* 1991). Acredita-se que a função do “aparelho do espinho” seja a manutenção da concentração de cálcio intracelular em níveis não patológicos, o que está associado a processo de neuroproteção (BURGOYNE *et al.* 1983). Os polirribossomos e os elementos da via lisossomal-endossomal estão também presentes em alguns espinhos dendríticos, perto de sua base, sugerindo que pode ocorrer síntese protéica local bem como existir proteínas para degradação de elementos citoplasmáticos ou de membrana celular (STEWART; SCHUMAN, 2001; Figura 6).

Os canais iônicos na PSD convertem os sinais químicos dos neurotransmissores em fluxo iônico através da membrana celular, o que gera modificação da voltagem local e outras respostas pós-sinápticas descritas comumente (NIMCHINSKY *et al.*, 2002). A forma dos espinhos pode afetar a transdução deste sinal por proporcionar um grau variável de compartimentalização bioquímica (ETHELL, PASQUALE, 2005). Por exemplo, o pescoço estreito do espinho pode prevenir o aumento do cálcio citoplasmático, ou alternativamente, se houver menor resistência, possibilitar que a concentração de cálcio seja rapidamente dissipada dentro do dendrito e se difunda para os espinhos próximos (SVOBODA *et al.*, 1996). Isto pode facilitar a modificação de corrente elétrica local, auxiliando na ocorrência de atividade potencializada à longo prazo (ETHEL; PASQUALE, 2005). Os espinhos também podem funcionar como compartimentos elétricos, onde a geometria do pescoço do espinho atua como um elemento de resistência à passagem de corrente elétrica para o dendrito. Assim, o pescoço do espinho pode causar uma diferença de potencial elétrico

localmente, podendo ativar canais iônicos dependentes de voltagem ou impor uma diferença de capacitância com toda a árvore dendrítica, de acordo com as propriedades ativa ou passiva existentes no local (NIMCHINSKY *et al.*, 2002).

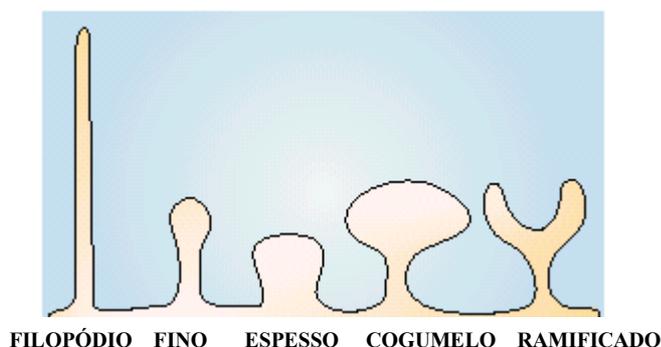


**Figura 6.** Desenho esquemático da ultraestrutura do espinho dendrítico onde se observam a cabeça e o pescoço do espinho que emergem do dendrito adjacente na base da figura. Alguns elementos constituintes da estrutura do espinho estão demonstrados. PSD, densidade pós-sináptica; REL, retículo endoplasmático liso; VE, vesícula endocítica. O aparelho do espinho, filamentos de actina, e polirribossomos formam o citoesqueleto do espinho (adaptado de HERING; SHENG, 2001).

Os espinhos podem sofrer modificações em sua morfologia e esse processo reflete o rearranjo rápido do citoesqueleto de actina em seu interior, o que pode levar à mudança no tamanho e no número de espinhos (OERTNER; MATUS, 2005; TADA; SHENG, 2006). Em geral, os espinhos são classificados de acordo com sua morfologia com a seguinte nomenclatura: “filopódio”, que não apresenta uma cabeça definida e é fino e comprido, acredita-se que seja a forma precursora dos espinhos; “fino”, o qual apresenta pescoço fino e pode não ter uma cabeça bem definida; “espesso”, que não apresenta pescoço diferenciado, e se mostra como uma elevação a partir do contorno dendrítico; em forma de “cogumelo”, como se desprende da sua nomenclatura e que parece ser o espinho mais estável (em termos de mudanças numéricas e contatos sinápticos duradouros); e, “ramificado”, onde um pescoço pode dar origem a mais de

uma cabeça de espinho (PETERS, KAISERMAN-ABRAMOF, 1970; PETERS *et al.*, 1991; HERING; SHENG, 2001; GONZÁLEZ-BURGOS, 2004; Figura 7).

Essas diferentes formas parecem ser reguladas por uma via que é dependente da atividade sináptica local, envolvendo o influxo de cálcio através dos receptores de glutamato e dos canais de cálcio dependentes de voltagem (ETHEL; PASQUALE, 2005). A ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA em neurônios em cultura causa um aumento rápido e transitório no tamanho de espinhos pré-existentes e a formação gradual de novos espinhos (LIN, *et al.*, 2004; MATUS, 2005). Espinhos com cabeças maiores são mais estáveis, expressam um número maior de receptores do tipo AMPA e contribuem para atividades sinápticas mais intensas. Ao contrário, os espinhos com cabeças pequenas são “móveis” e instáveis e contribuem para conexões sinápticas que podem ser inclusive de tipo “silenciosas” (KASAI *et al.*, 2003; ver NIMCHINSKY *et al.*, 2002).



**Figura 7.** Representação esquemática das diferentes morfologias dos espinhos dendríticos, como se observa à microscopia de luz, surgindo a partir de uma linha de base que representa o tronco dendrítico (adaptado de HERING; SHENG, 2001 e reproduzida de MARCUZZO, 2006).

O estudo dos espinhos dendríticos configura-se numa área muito importante para o entendimento das bases celulares de funcionamento do sistema nervoso. A determinação do número de espinhos por segmento dendrítico (e, daqui, sua densidade

por um dendrítico) tem servido para estimar a maior ou menor ocorrência de sinapses (WOOLEY; McEWEN, 1993; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; HERMEL *et al.*, 2006; de CASTILHOS, 2006; MARCUZZO, 2006).

Neste sentido, há dois grandes tópicos ainda inéditos e que foram comentados em artigos recentes referente aos espinhos dendríticos no MePD de ratos (GRÉCO *et al.*, 2003; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; COOKE e WOLLEY, 2005; MORRIS *et al.*, 2008; COOKE e WOLLEY, 2009). Primeiro, tem sido descritas diferenças eletrofisiológicas relacionadas com potenciais pós-sinápticos excitatórios entre ratos pré-puberes machos e fêmeas (COOKE e WOLLEY, 2005; 2009). Machos apresentam mais desta atividade no lado esquerdo do que fêmeas, possivelmente envolvendo uma quantidade de espinhos dendríticos em maior número no MePD esquerdo. Para responder esta questão, o primeiro experimento descrito nessa dissertação compara a densidade de espinhos dendríticos do MePD de machos e fêmeas diestro (quando os níveis de estradiol e progesterona em circulação não são máximos, conforme Rasia-Filho *et al.*, 2004), testando o efeito da lateralidade hemisférica neste parâmetro. O segundo tópico diz respeito à distribuição heterogênea dos receptores para estrogênio dos tipos  $\alpha$  e  $\beta$  nas regiões dorsal e ventral do MePD de ratas em proestro (GRÉCO *et al.*, 2003). Como não se sabe ainda se esta diferença na quantidade desses receptores impõe alterações na densidade de espinhos dendríticos em fêmeas, foram estudadas fêmeas na fase de proestro (quando há maiores níveis de estradiol produzido pelos ovários em circulação ao longo do ciclo estral). As regiões dorsal e ventral do MePD de fêmeas em proestro foram identificadas de acordo com sua posição anatômica neste subnúcleo e de acordo com Gréco *et al.* (2003).

Baseado no exposto, os objetivos específicos deste trabalho são dois:

- 1) Estudar a densidade de espinhos dendríticos no MePD dos lados direito e esquerdo de ratos adultos, machos e fêmeas em diestro;
- 2) Estudar a densidade de espinhos dendríticos nas regiões dorsal e ventral do MePD de ratas na fase de proestro.

## 2. MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 Animais

Foram estudados ratos Wistar machos (n=6) e fêmeas (n=12), com 3-5 meses de idade, mantidos em grupos (no máximo 4 por caixa padrão de biotério) com livre acesso à água e comida. A temperatura ambiente foi mantida em torno de 20°C em ciclo claro/escuro de 12 h cada (luzes acesas às 7 h). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais empregados ou seu sofrimento ao longo dos experimentos. Para isso, todos os animais foram manipulados de acordo com as leis internacionais de cuidado e ética com animais em laboratório (Diretrizes da Comunidade Européia de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC) e pelas normas brasileiras de ética para experimentação animal (projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFCSPA, cadastro 274/07 ).

As fêmeas foram estudadas em duas fases ao longo do ciclo estral. Para tanto, as ratas foram acompanhadas por 2 semanas antes do início do experimento, avaliando-se a citologia vaginal para se ter certeza da normalidade na variação do ciclo ovariano. Somente após isso, as fêmeas foram selecionadas para serem estudadas pela técnica de Golgi e foram sacrificadas na tarde das fases de diestro ou proestro.

O número de animais para cada grupo foi baseado em estudos prévios que permitiram detectar dados estatisticamente comparáveis com base nesse tamanho amostral (de CASTILHOS *et al.*, 2006; RASIA-FILHO *et al.*, 2004). Para este estudo também foram utilizadas lâminas (já existentes no Laboratório de Fisiologia da

UFCSPA) obtidas de ratos Wistar machos, entre 3 e 5 meses de idade e obtidos nas mesmas condições padrão de biotério, e que foram utilizados no trabalho intitulado “Estudo sobre a arborização dendrítica de neurônios das sub-regiões ântero-dorsal e pósterio-ventral da amígdala medial de ratos machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral” tendo como autores Alberto Antônio Rasia Filho (pesquisador responsável) e Aline Dall’Óglio (projeto igualmente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFCSPA em 09/03/2006 com número 069/05).

## **2.2 Procedimento Histológico**

Para este estudo, os animais foram divididos em 3 grupos experimentais, um de machos e dois para fêmeas em diestro e em proestro. O primeiro experimento envolveu machos e fêmeas em diestro para estudar o efeito do sexo, da lateralidade e da interação entre esses fatores na densidade de espinhos dendríticos no MePD. No segundo experimento, as fêmeas em proestro foram utilizadas para se estudar a densidade de espinhos dendríticos nas regiões dorsal e ventral do MePD.

A técnica de Golgi foi realizada de acordo com as descrições de Gabbott e Somogyi (1984) e Rasia-Filho *et al.* (1999; 2004). Para a realização desta técnica os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina por via intraperitoneal (80 mg/kg e 10 mg/kg, ip, respectivamente). Receberam 1000 UI de heparina (Cristália, Brasil) e foram perfundidas por via transcardíaca esquerda com paraformaldeído a 4% e ácido pícrico a 1,5% diluídos em tampão fosfato 0,1 M e pH= 7,4. A perfusão do encéfalo foi realizada utilizando-se uma bomba peristáltica (Control Company, Estados Unidos) e, após, os encéfalos foram retirados e pós-fixados na mesma solução fixadora por 24

horas. Posteriormente, foram seccionados em vibrátomo (Leica, Alemanha) obtendo-se cortes coronais de 200 µm de espessura. Utilizou-se como referencial anatômico para localizar o MePD o atlas das coordenadas estereotáxicas do encéfalo do rato elaborado por Paxinos e Watson (1998; Figura 2) mais as descrições clássicas de sua localização no telencéfalo basal (CANTERAS *et al.*, 1995; de OLMOS *et al.*, 2004). O hemisfério direito de cada animal foi marcado com uma cunha na parte cortical superior para identificação e posterior reconhecimento deste lado. Como será descrito a seguir na seção dos Resultados, não houve efeito da lateralidade na densidade de espinhos dendríticos entre machos e fêmeas em diestro. Por esta razão, para o segundo experimento, utilizou-se somente o MePD do lado esquerdo para coleta de dados das fêmeas em proestro. O lado esquerdo corresponde às figuras apresentadas por Gréco e colaboradores (2003) e se correlaciona com o principal local de dimorfismo sexual nas respostas eletrofisiológicas do MePD de ratos pré-púberes (COOKE e WOOLLEY, 2005; 2009).

Logo a seguir os cortes contendo o MePD foram imersos em solução de dicromato de potássio a 3% (Merck, Alemanha) dissolvido em água bidestilada e sem íons por 24 horas e ao abrigo da luz. Após, as secções foram lavadas em água destilada, colocadas entre lamínulas e submersas em nitrato de prata a 1,5% (Merck, Alemanha) também dissolvido em água bidestilada e sem íons, resguardados da luz por no mínimo 48 horas. Os cortes foram lavados em água destilada, desidratados em soluções crescentes de álcool, diafanizados com xilol, montados em lâminas histológicas e cobertos com bálsamo do Canadá e lamínula. Todos os grupos foram submetidos às mesmas condições experimentais acima descritas.

### 2.3 Aquisição de dados

As secções contendo o MePD foram projetadas e comparadas com desenhos esquemáticos de cortes coronais do encéfalo de rato, correspondendo àquelas localizadas 3,14 a 3,30 mm posterior à sutura bregmática (PAXINOS; WATSON, 1998; Figura 2). Os locais onde puderam ser identificados neurônios na MePD foram selecionados para estudo em microscópio de luz (Olympus BX-41, Japão). Os cortes do encéfalo que apresentaram aproximadamente o mesmo tamanho foram usados para análise, sendo descartados aqueles que pareciam “retraídos” demasiadamente devido ao procedimento histológico e que poderiam gerar resultados incorretos.

Os neurônios foram selecionados para estudo quando os seguintes critérios de inclusão estavam plenamente obedecidos: a) localizaram-se indubitavelmente na região desejada, isto é, na MePD, mas relativamente afastados de seus bordos limítrofes, como precaução para não se coletar dados de outras áreas vizinhas à área de interesse; b) terem, no mínimo, seus primeiros 40  $\mu\text{m}$  bem impregnados; c) terem espinhos claramente distinguíveis do “fundo” dos cortes e dos precipitados inespecíficos de prata no neurópilo; e, d) estar relativamente isolados das demais células vizinhas (RASIA-FILHO *et al.*, 1999; 2004). Após isto, os dendritos e os espinhos foram desenhados com auxílio de câmara clara acoplada a microscópio óptico e em aumento de 2000 X. A densidade de espinhos foi calculada como sendo a relação do número total de espinhos divididos pelo comprimento dendrítico estudado, o qual foi mensurado utilizando-se programa de análise de imagens (Image Pro-Plus 4.1, Media Cybernetica, EUA). Os valores foram expressos como número de espinho/ $\mu\text{m}$  dendrítico, donde sua densidade foi calculada e, a seguir, comparada de acordo com os protocolos experimentais mencionados (de CASTILHOS *et al.*, 2006; 2008; MARCUZZO *et al.*, 2007). Em

estudo prévio com machos adultos não-manipulados verificou-se que há uma similaridade na densidade de espinhos dendríticos proximais de neurônios do tipo bipenachado e estrelados no MePD (DE CASTILHOS *et al.*, 2006). Com base nisso, nos presentes experimentos dados advindos de ambos os tipos celulares foram considerados para os valores que compuseram cada um dos grupos experimentais. De uma forma geral, mais neurônios bipenachados compuseram aleatoriamente o presente estudo. Dentre os neurônios multipolares inequivocamente classificáveis, houve um percentual médio para machos no lado direito de 67% de neurônios do tipo bipenachados e 16% do tipo estrelados, lado esquerdo 80% de neurônios do tipo bipenachados e 20% do tipo estrelados. Nas fêmeas em diestro no lado direito o percentual médio foi 88% de bipenachados e 12% do tipo estrelados e no lado esquerdo 79% bipenachados e 21% estrelados. Nas fêmeas em proestro o percentual médio na região dorsal foi de 69% bipenachados e 31% estrelados e na região ventral foi de 85% bipenachados e 15% estrelados.

De cada hemisfério e de cada animal experimental obtiveram-se 8 medidas da densidade de espinhos dendríticos, sendo cada uma de um neurônio diferente do outro, no primeiro experimento com machos e fêmeas em diestro para testar efeito de lateralidade e sexo. No segundo, foram obtidas as mesmas medidas mas das regiões dorsal e ventral de fêmeas em proestro. Dado o pico hormonal nesta fase do ciclo estral e o objetivo de estudar a possível variação na densidade de espinhos dendríticos em regiões cujos neurônios tem predominância de  $Er\alpha$  ou  $ER\beta$ , respectivamente um total de 48 medidas foram obtidas em cada momento experimental, a saber: 1) no MePD do lado direito e no MePD do lado esquerdo de ratos machos e fêmeas em diestro; e, 2) na parte dorsal e na parte ventral do MePD de fêmeas em. Desses valores originais foram calculados os dados médios de cada animal (de cada lado ou de cada região) para

posteriores comparações estatísticas (MARCUIZZO *et al.*, 2007; de CASTILHOS *et al.*, 2008).

#### **2.4 Análise Estatística**

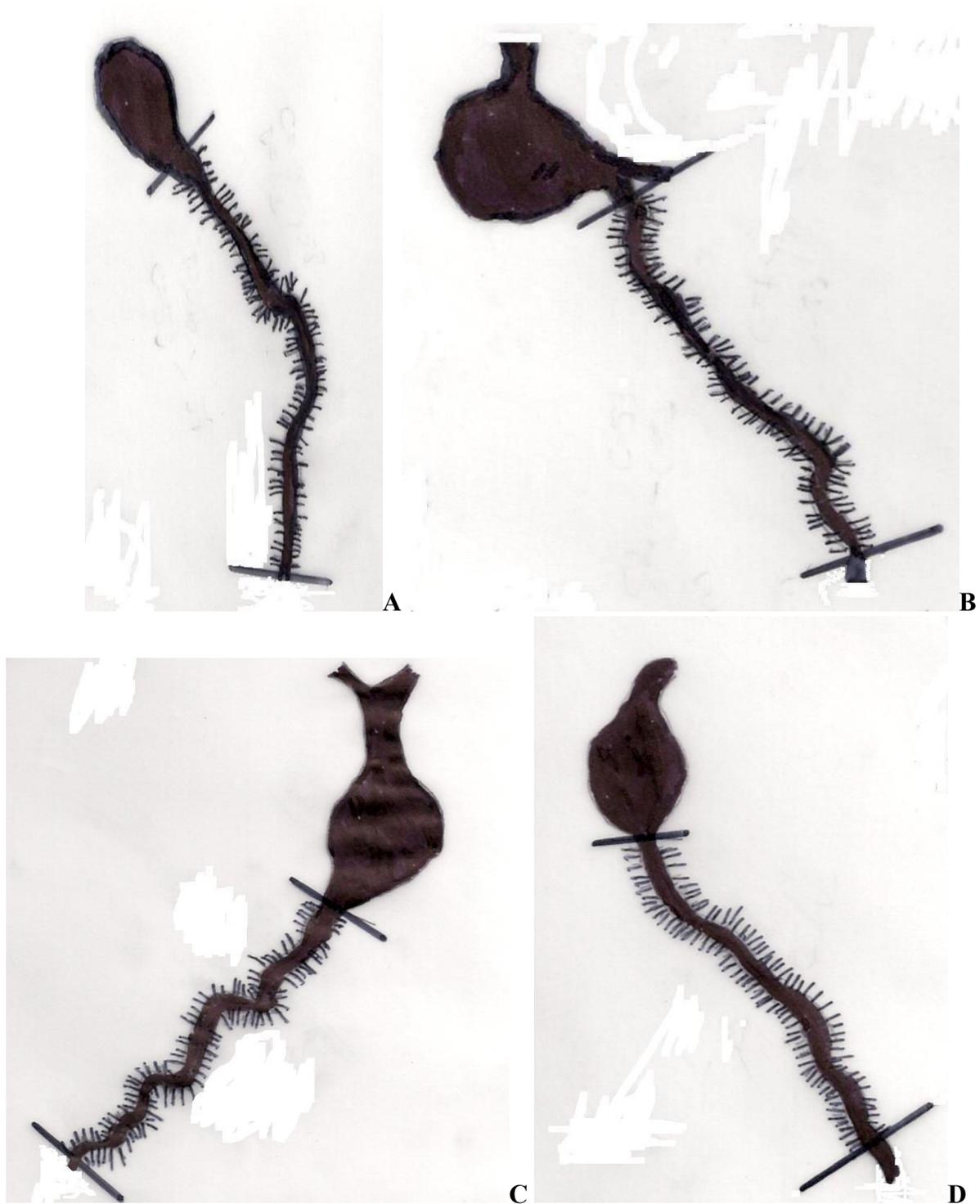
Os dados da densidade de espinhos dendríticos dos grupos experimentais foram comparados utilizando-se: a) os valores dos lados direito e esquerdo no MePD de machos e de fêmeas na fase de diestro pelo teste da análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas e seguida pelo teste *post hoc* de Tukey; e, b) valores das partes dorsal e ventral no MePD das fêmeas em proestro pelo teste “t” de Student para amostras pareadas. Em ambos os casos o nível de significância estatística foi estabelecido em  $p \leq 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

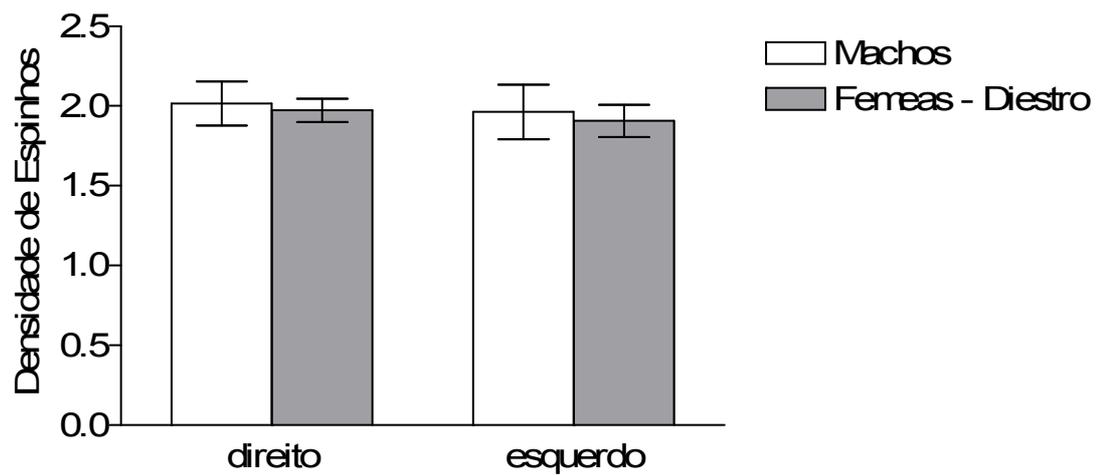
Neurônios com espinhos dendríticos visíveis e passíveis de quantificação, de acordo com os critérios de inclusão, foram encontrados em todos os grupos experimentais. Igualmente foram observados neurônios do tipo “bitufado” e “estrelados” (como os observados nas Figuras 4 e 5) e os espinhos nesses neurônios também apresentaram-se com característica pleomórfica.

Os dados de densidade dos espinhos dendríticos dos lados direito e esquerdo do MePD de machos e fêmeas em diestro não apresentaram diferenças estatisticamente significativa quanto ao sexo dos indivíduos [  $F(1,10) = 0,84$ ;  $p = 0,38$ ], quanto à lateralidade [  $F(1,10) = 1,44$ ;  $p = 0,25$ ] nem na interação entre os fatores sexo e lateralidade [  $F(1,10) = 0,01$ ;  $p = 0,89$ ]. Os valores referentes à média ( $\pm$  desvio padrão) da densidade de espinhos dendríticos desses grupos estão apresentados na Figuras 8 e 9.

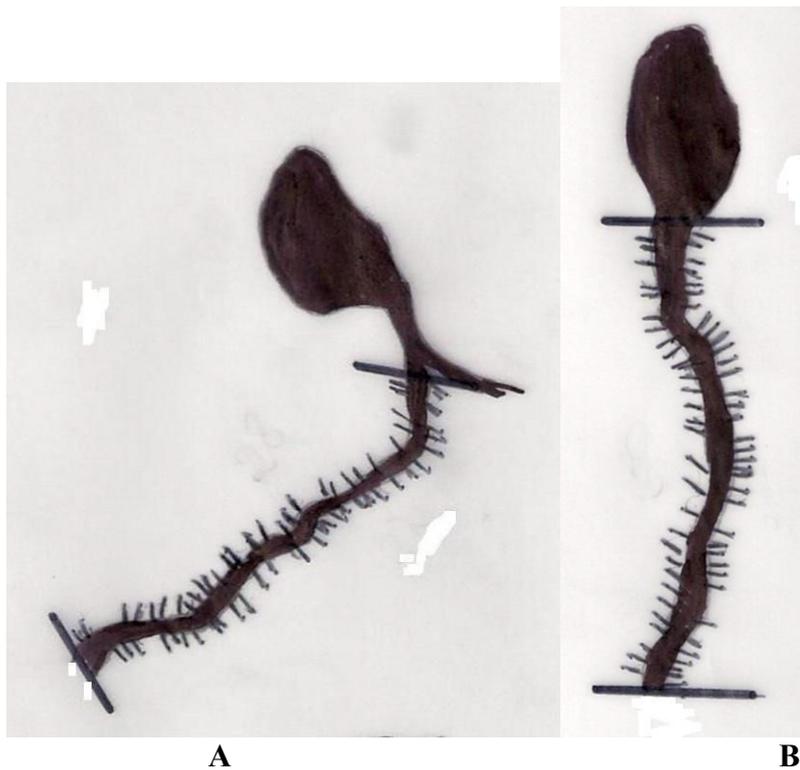
A comparação entre a densidade de espinhos dendríticos das regiões dorsal e ventral do MePD do lado esquerdo de ratas em proestro não apresentou diferenças estatisticamente significativa quando comparados os dados entre si ( $p = 0,11$ ). Os valores referentes à média ( $\pm$  desvio padrão) da densidade de espinhos dendríticos deste grupo específico estão apresentados na Figuras 10 e 11.



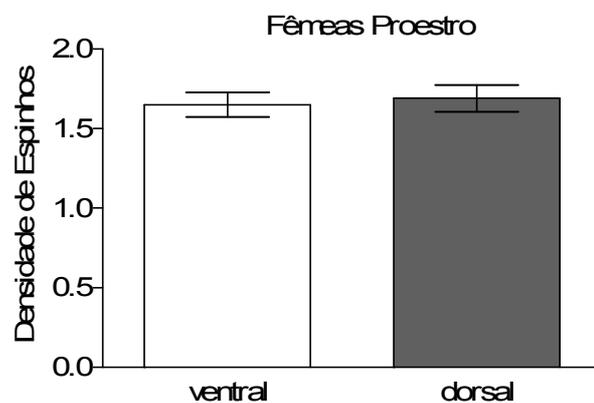
**Figura 8.** Desenhos esquemáticos feitos em câmara clara, acoplada a microscópio óptico, dos espinhos dos primeiros 40  $\mu\text{m}$  dendríticos de neurônios do lado direito (A) e esquerdo (B), impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial pósterio-dorsal de ratos machos adultos. Os neurônios provenientes do mesmo subnúcleo e do lado direito (C) e esquerdo (D) de fêmeas em diestro estão mostrados abaixo. Neste caso os neurônios são do tipo bipenachado e a morfologia dos espinhos dendríticos pode não ser idêntica à real por razões técnicas, mas a quantidade serviu para as determinações da densidade de espinhos dendríticos.



**Figura 9.** Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão da densidade de espinhos obtida nos primeiros 40  $\mu\text{m}$  dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi da amígdala medial pósterio-dorsal dos lados direito e esquerdo de ratos machos adultos e de fêmeas em diestro. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.



**Figura 10.** Desenhos esquemáticos feitos em câmara clara, acoplada a microscópio óptico, dos espinhos dos primeiros 40  $\mu\text{m}$  dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi da região dorsal (A) e ventral (B) da amígdala medial póstero-dorsal lado esquerdo de ratas adultas em proestro. Neste caso os neurônios são do tipo bipenachado e a morfologia dos espinhos dendríticos pode não ser idêntica à real por razões técnicas, mas a quantidade serviu para as determinações da densidade de espinhos dendríticos.



**Figura 11.** Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão da densidade de espinhos obtida nos primeiros 40  $\mu\text{m}$  dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi das regiões dorsal e ventral da amígdala medial pósterodorsal esquerda de ratas em proestro. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

#### 4. DISCUSSÃO

Tendo por base os conhecimentos que geraram esta dissertação e as perguntas fisiológicas que se queriam responder, algumas observações são relevantes de serem feitas. Em primeiro lugar, os espinhos colocados nos primeiros micrômetros dendríticos estão em localização estratégica para afetar a influência que aferências sinápticas têm sobre a atividade biofísica do corpo celular e da possibilidade de geração de potenciais de ação propagáveis a partir deste (DE CASTILHOS *et al.*, 2006). Por isso maior atenção foi destinada a este local dentro toda a árvore dendrítica. Em ratos machos adultos, a testosterona também pode aumentar a densidade de espinhos em ramos dendríticos mais distais observados por microscopia confocal (CUNNINGHAM *et al.*, 2007). Em seguida, constata-se que a densidade de espinhos dendríticos relatada no presente trabalho está absolutamente de acordo com dados publicados previamente para ratos adultos machos, fêmeas em diestro e fêmeas em proestro (RASIA-FILHO *et al.*, 2004). Neste artigo, os valores médios aproximados para a densidade de espinhos por um dendrítico foi de 2,2 para machos; de 2,1 para fêmeas diestro; e, de 1,5 para fêmeas em proestro. Esses valores corresponderam a dados obtidos em ambos os hemisférios cerebrais conjuntamente, embora a variabilidade nos resultados tenha sido bastante pequena. Isto sugere que a densidade de espinhos dendríticos no MePD de ratos é basicamente homogênea considerando-se ou não a lateralidade como fator interveniente a ser testado. E, novamente, os valores obtidos para machos e fêmeas em diestro, aparentemente, correspondem aos maiores valores, quando se observam comparativamente os de fêmeas em proestro. Entre esses dois primeiros grupos não há uma diferença estatisticamente significante relacionada a um dimorfismo sexual. Isto

igualmente concorda com Rasia-Filho *et al.* (2004) onde se demonstrou que uma diferença na densidade de espinhos dendríticos entre os sexos só é possível de ser observada quando outras fases do ciclo estral são estudadas, a seguir do diestro.

Da mesma forma, uma observação mais detalhada do trabalho de Cooke e Wolley (2005) indica que não há diferença nos registros eletrofisiológicos de potenciais elétricos pós-sinápticos excitatórios entre os lados direito e esquerdo nos grupos de machos e fêmeas pré-puberes estudados separadamente, mas sim uma diferença entre os sexos somente no MePD do lado esquerdo quando os grupos são comparados entre si. Os presentes resultados poderiam sugerir que a atividade excitatória pós-sináptica, se relacionável com o número de espinhos dendríticos no MePD, concorda com o achado de que machos e fêmeas não apresentam uma diferença estatisticamente significativa na densidade desses espinhos quanto o efeito a ser testado é o de lateralidade. Novamente, o achado de idêntico número de espinhos por micrometro dendrítico entre machos e fêmeas em diestro está de acordo com achados anteriores também empregando a técnica de Golgi (Rasia-Filho *et al.*, 2004). Com isso também poder-se-ia sugerir que as diferenças eletrofisiológicas entre machos e fêmeas pré-puberes, acaso se mantivessem em idade adulta, poderiam ser mais devido a sinapses excitatórias feitas em troncos dendríticos do que nos espinhos dendríticos *per se*. Tal sugestão é plausível quando se toma em conta dados ultraestruturais do MePD de ratos adultos onde quantidade significativa de sinapses assimétricas/excitatórias foi encontrada diretamente em oposição à membrana dendrítica e em maior número do que aquelas sinapses direcionadas aos espinhos (HERMEL *et al.*, 2006). Adicionalmente, abre-se outra possibilidade de raciocínio quando se cogita a possibilidade de que o advento da puberdade pode modificar a quantidade de espinhos dendríticos e modificar a ocorrência dos potenciais excitatórios pós-sinápticos registrados em animais pré-

púberes (COOKE e WOOLLEY, 2005). Já está descrito na literatura que a passagem pela puberdade reduz a árvore dendrítica de neurônios do MePD de hamsters (ZEHR *et al.*, 2006), o que poderia afetar igualmente a densidade de espinhos dendríticos. Claramente novos experimentos eletrofisiológicos são necessários para confirmar se os mesmos resultados obtidos com ratos antes da puberdade se mantêm após esta etapa e, com base nisso, correlacionar com os dados atuais sobre o número de espinhos dendríticos em ambos os sexos e hemisférios cerebrais.

Por sua vez, e aparentemente, a densidade de espinhos dendríticos nas fêmeas em proestro está em valor aparente menor do que o encontrado em fêmeas em diestro. Diferença estatisticamente significativa neste parâmetro foi relatada para fêmeas ao longo do ciclo estral, havendo maiores valores para fêmeas em diestro e menores nas fases de proestro, estro e metaestro no MePD de ambos os hemisférios cerebrais (RASIA-FILHO *et al.*, 2004). Fêmeas em proestro e estro apresentaram-se com menor densidade de espinhos dendríticos ao longo do ciclo estral, ao mesmo tempo em que ocorre um decréscimo do número de sinapses no MePD de ratas (RASIA-FILHO *et al.*, 2004; OBERLANDER e ERSKINE, 2008). De fato, na transição de diestro para proestro ocorre uma redução da densidade de espinhos dendríticos de aproximadamente 35% no MePD de ratas (RASIA-FILHO *et al.*, 2004), o que não parece ser tão exuberante quando observados os valores médios aqui obtidos. Mas, conjuntamente, todos esses dados apontam no mesmo sentido de que há uma diminuição no número de espinhos dendríticos quando a fêmea avança da fase de diestro e progride para proestro, estro e metaestro. Tal fenômeno é mais complexo e basicamente é o oposto do que se encontra no núcleo ventromedial do hipotálamo ou nas regiões do estrato lacunosomolecular ou do radiado da porção CA1 hipocampal (McEWEN, 2006; BRUSCO *et al.*, 2008).

O presente trabalho estudou os valores de densidade de espinhos dendríticos no MePD esquerdo e obteve valores próximos àqueles relatados quando os dados dos dois hemisférios foram somados e estudados em conjunto (RASIA-FILHO *et al.*, 2004). Não obstante, como o lado esquerdo do MePD mostrou ser o local com maior possibilidade da ação gênica determinar um dimorfismo sexual na resposta eletrofisiológica que poderia envolver os espinhos dendríticos (COOKE e WOOLLEY, 2005, 2009), este lado foi selecionado também para o estudo da ação epigenética dos hormônios ovarianos no número de espinhos dendríticos. O MePD apresenta a maior concentração de receptores  $\sigma$  e  $\beta$  nas regiões dorsal e ventral (SIMORLY *et al.*, 1990; SHUGHRU *et al.*, 1997; GRÉCO *et al.*, 1998, 2001, 2003). Seria esperado que, dada a distribuição heterogênea de receptores do tipo  $\sigma$  e  $\beta$  para estradiol nas regiões dorsal/ventral do MePD de fêmeas (GRÉCO *et al.*, 2003), houvesse igualmente nesses locais uma modulação que pudesse ser diferente por causa dos tipos de receptores envolvidos preferentemente no número de espinhos dendríticos. Ou seja, estava presente neste raciocínio a possibilidade de que os receptores de  $\alpha$ , com maior quantidade/ação na parte dorsal do MePD, e os receptores de tipo  $\beta$ , com maior na quantidade/ação na parte dorsal do MePD de ratas (GRÉCO *et al.*, 2003), pudessem ter uma repercussão diferente nos neurônios desses locais levando a modificações na quantidade dos espinhos dendríticos proximais. Com isso também o momento da tarde da fase de proestro, a qual corresponde ao momento cíclico de maior quantidade de estradiol e progesterona em circulação, e que foi o momento que as fêmeas foram sacrificadas, poderia servir como um modelo natural da ação dos hormônios ovarianos nos neurônios do MePD. Não se encontrou, porém, uma diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores da densidade de espinhos dendríticos da região dorsal e ventral do lado esquerdo do MePD de ratas na tarde do proestro.

Mais do que uma discussão aprofundada sobre o papel fisiológico dos diferentes tipos de receptor para estradiol em outros tecidos que não o nervoso, que não é o escopo da presente dissertação, uma análise detalhada dos resultados de Gréco *et al.* (2003) demonstra que não há uma exclusividade para os receptores do tipo  $\sigma$  para estradiol na região dorsal de MePD nem há exclusividade para os receptores do tipo  $\beta$  para estradiol na região ventral deste subnúcleo. Então, é possível cogitar que ambos os receptores podem estar modulando para menos a densidade de espinhos dendríticos no MePD durante o proestro, ou, alternativamente, que existam subpopulações de neurônios com respostas geradas por esses receptores que presentemente não são distinguíveis pela técnica de Golgi. De fato, nenhuma característica morfológica geral permite identificar e selecionar neurônios pertencentes a subpopulações dentro do MePD com projeções ou funções específicas (NABEKURA *et al.*, 1986; CHOI *et al.*, 2005; BIAN *et al.*, 2008).

Por fim, com base nessa discussão, os resultados obtidos com esta dissertação sugerem que, apesar de dados na literatura indicarem diferenças hemisféricas na ocorrência de potenciais pós-sinápticos excitatórios nos neurônios do MePD de ratos pré-púberes machos e fêmeas, não há diferença no número de espinhos nos dendritos proximais que justifiquem tal achado prévio ou, pelo menos, que não são esses os locais preferenciais para gerar tal achado eletrofisiológico. Adicionalmente, apesar de terem sido descritas expressões diferentes para receptores de tipo  $\alpha$  e  $\beta$  nas regiões dorsal e ventral do MePD, isto não gera diferença no número de espinhos dendríticos proximais nessas regiões em fêmeas durante a fase do ciclo ovulatório que apresenta os maiores valores de estradiol em circulação. Esses achados complementam os conhecimentos atuais sobre a MePD de ratos e indicam que a densidade de espinhos dendríticos não representa o elemento preferentemente e diretamente correlacionável com outros dados

da literatura mencionados, embora seja um local de plasticidade sináptica em outras condições experimentais. Futuros experimentos podem direcionar alguns temas que surgiram com os dados atuais. Por exemplo, abre-se a perspectiva para estudar a morfologia dos espinhos nas mesmas condições experimentais aqui descritas, o registro eletrofisiológico de neurônios dos lados direito e esquerdo do MePD de animais adultos quer sejam machos e fêmeas ao longo de seu ciclo estral, da correlação entre a densidade de espinhos dendríticos e neurônios que especificamente apresentam receptores para hormônios gonadais e/ou que estejam relacionados com vias eferentes para núcleos hipotalâmicos e que modulam a secreção neuroendócrina ou a emissão comportamental. Esses são alguns tópicos relevantes e correlacionáveis que serão beneficiados desta construção conjunta de conhecimentos que se tem feito nos últimos anos em relação à base celular de organização e funcionamento do MePD de ratos (RASIA-FILHO *et al.*, 2009).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZAWA, H., SATO, Y., MAEKAWA, M., FUJISAWA, H., HIRATA, T., YUASA, S. Development of the amygdalohypothalamic projection in the mouse embryonic forebrain. **Anatomy and Embriology**, 2005, p.249-264, 2004.

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. 495-498, 1995.

ARIMATSU, Y., SETO, A., AMANO, T. Sexual dimorphism in  $\alpha$ -bungarotoxin binding capacity in the mouse amygdala. **Brain Research**, v. 213, p. 432-437, 1981.

BIAN, X., YANAGAWA, Y., CHEN, W.R. LUO, M. Cortical like functional organization of the pheromone processing circuits in the medial amygdala. **Journal Neurophysiology**, v. 99, p.77-86, 2008.

BREEDLOVE, S.M.; JORDAN, C.L.; JOHNSON, R.T. Sex differences and laterality in astrocyte number and complexity in the adult rat medial amygdala. **The Journal of Comparative Neurology**, 5, p.599-609, 2008.

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

BLACK, J. E.; KODISH, I. M.; GROSSMAN, A. W.; KLINTSOVA, A. Y.; ORLOVSKA, Y. A. D.; VOSTRIKOV, V.; URANOVA, N.; GREENOUGH, W. T. Pathology of layer V pyramidal neurons in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. **The American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 4, p. 742-744, 2004.

BURGOYNE, R. D.; GRAY, E. G., BARRON, J. Cytochemical localization of calcium in the dendritic spine apparatus of the rat cerebral cortex and at synaptic sites in the cerebellar cortex. **Journal of Anatomy**, v. 136, p. 634-635, 1983.

BRESSLER, S.C.; BAUM, M.J. Sex comparison of neuronal Fos immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. **Neuroscience**, v.71, p. 1063-1072, 1996.

BRUSCO, J., WITTMAN, R., DE AZEVEDO, M.S., LUCION, A.B., FRANCI, C.R., GIOVENARDI, M., RASIA-FILHO, A.A. Plasma hormonal profiles and dendritic spine density and morphology in the hippocampal CA1 stratum radiatum evidenced by light microscopy, of virgin and postpartum female rats. **Neuroscience Letter**, v.438, p. 346-350.

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

CAVALCANTE, J.C., SITA, L.V., MASCARO, M.B. BITTENCOURT, J.C. ELIAS, C.F. Distribution of urocortin 3 neurons innervating the ventral premammillary nucleus in the rat brain. **Brain Research**, v.1089, p.116-125, 2006

CHOI, G.B., DONG, H.W., MURPHY, A.J., VALENZUELA, D.M., YANCOPOULOS, G.D., SWANSON, L.W., ANDERSON, D.J. Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. **Neuron**, v.46, p. 647-660, 2005.

COOKE, B. M.; SIMERLY, R. B. Ontogeny of bidirectional connections between the medial nucleus of the amygdala and the principal bed nucleus of the stria terminalis in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 489, p. 42-58, 2005.

COOKE, B. M.; WOOLLEY, C. S.; Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 46, p. 10759-67, 2005.

COOKE, B.M., WOOLLEY, C.S. Effects of prepubertal gonadectomy on a male typical behavior and excitatory synaptic transmission in the amygdala. **Development Neurobiology**, v. 69, p. 141-152, 2009.

DALL'OGGIO, A. Morfologia dendrítica de neurônios do núcleo medial da amígdala de ratos: um estudo pela técnica de Golgi. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas: Neurociências), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DALL'ÓGLIO, A., GEHLEN, G., ACHAVAL, M., RASIA-FILHO, A.A. Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: Further data base don the Golgi method. **Neuroscience Letters**, v.430, p. 151-156, 2008a.

DALL'ÓGLIO, A., GEHLEN, G., ACHAVAL, M., RASIA-FILHO, A.A. Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the “ventral” medial amygdala subnuclei of adult male and female rats: Further data base don the Golgi method. **Neuroscience Letters**, v. 439, p. 287-292, 2008b.

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

de CASTILHOS, J.; MARCUZZO, S.; FORTI, C. D.; FREY, R. M.; STEIN, D., ACHAVAL, M.; RASIA-FILHO, A. A. Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: Dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. **Brain Research Bulletin**, v. 69, n. 2, p. 131-139, 2006.

de CASTILHOS, J., FORTI, C.D., ACHAVAL, M., RASIA, A.A. Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: a Golgi study. **Brain Research**, v.13, 1240, 73-81, 2008.

de OLMOS, J. S.; ALHEID, G. F.; BELTRAMINO, C. A. Amygdala. In: PAXINOS, G. **The Rat Nervous System**, Sydney: Academic Press, 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. **The Rat Nervous System**, Amsterdam: Elsevier Academic Press, p. 509-603, 2004.

DEVRIES, G.J., SIMERLY, R.B. Anatomy, development and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. In: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbah SE, Rubin RT, editors. **Hormones, Brain and Behavior**. San Diego: Academic Press, 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.

DONG, H.W., PETROVICH, G., SWANSON, L.W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. **Brain Research**. v.38, p. 192-246, 2001.

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

ETHELL, I. M.; PASQUALE, E. B. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. **Progress in Neurobiology**, v. 75, p.161–205, 2005.

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.

FRANKFURT, .M., GOULD, E., WOOLLEY, C.S., McEWEN, B.S. Gonadal steroids modify dendritic spine density in ventromedial hypothalamic neurons: A Golgi study in the adult rat. **Neuroendocrinology**, v.51, 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.

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

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

GRÉCO, 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, p.5172-5181, 2001.

GRÉCO, B., BLASBERG, M.E., KOSINSKI, E.C. BLAUSTEIN, J.D. Response of ER $\alpha$ -IR and ER $\beta$ -IR cells in the forebrain of female rats to mating stimuli. **Hormone Behaviour**. v.43, p.444-453, 2003.

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.

GONZALEZ, C. L.; KOLB, B. A comparison of different models of stroke on behavior and brain morphology. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 1950-62, 2003.

GONZÁLEZ-BURGOS, I.; ALEJANDRE-GÓMEZ, M.; CERVANTES, M. Spine-type densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats. **Neuroscience Letters**, v. 379, p. 52-54, 2005.

GRAY, E.G. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. **Nature**, v. 183, p. 1592–1593, 1959.

HARRIS, K. M.; KATER, S. B. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. **Annual Review Neuroscience**, v. 17, p. 341–71, 1994.

HAYASHI, Y.; MAJEWSKA, A. K. Dendritic spine geometry: functional implication and regulation. **Neuron**, v. 46, p. 529-532, 2005.

HEIMER, L.; HARLAN, R. E.; ALHEID, G. F.; GARCIA, M. M.; de OLMOS, J. Substantia innominata: a notion which impedes clinical-anatomical correlations in neuropsychiatric disorders. **Neuroscience**, v. 76, p. 957-1006, 1997.

HERING, H.; SHENG, M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 880-888, 2001.

HERMEL, E.; MARCUZZO, S.; HEUSER, M. C. F.; RASIA-FILHO, A. A.; ACHAVAL, M. Ultrastructural features of neurones and synaptic contacts in the posterodorsal medial amygdala of adult male rats. **Journal of Anatomy**, v. 2008, p. 565-575, 2006.

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

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

KASAI, H.; MATSUZAKI, M.; NOGUCHI, J.; YASUMATSU, N.; NAKAHARA, H. Structure–stability–function relationships of dendritic spines. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 7, 2003.

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.

KOLB, B.; GIBB, R.; GORNY, G. Experience-dependent changes in dendritic arbor and spine density in neocortex vary qualitatively with age and sex. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 1, n. 79, p. 1–10, 2003.

KONDO, Y.; ARAI, Y. Funcional 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.

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

LEGGIO M. G.; MANDOLESI, L.; FEDERICO, F.; SPIRITO, F.; RICCI, B.; GELFO, F.; PETROSINI, L. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. **Behavioral Brain Research**, v. 163, p. 78–90, 2005.

LI, S., GIVALOIS, L., PELLETIER, G. Dehydroepiandrosterone administration reverses the inhibitory influence of aging on gonadotrophin-releasing hormone gene expression in the male and female rat brain. **Endocrine**, v. 6, p.265-270, 1997.

LIN, H.; HUGANIR, R; LIAO, D. Temporal dynamics of NMDA receptor-induced changes in spine morphology and AMPA receptor recruitment to spines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, p. 501–511, 2004.

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

MARCUZZO, S., Estudo sobre a densidade de espinhos dendríticos de neurônios da amígdala medial póstero-dorsal de ratos em diferentes condições experimentais. **Dissertação**. (Mestrado em Ciências Biológicas: Neurociências), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MARCUZZO S; DALL'ÓGLIO, A.; RIBEIRO, M.F., ACHAVAL, M., RASIA-FILHO, A.A. Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. **Neuroscience Letter**. v.424, p.16-21, 2007.

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

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

MATUS, A. Growth of dendritic spines: a continuing story. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 15, p. 67-72, 2005.

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

McEWEN, B. S. Stress and hippocampal plasticity. **Annual Review of Neuroscience**, v. 22, p. 105-122, 1999.

McEWEN, B. S. Endocrine effects on the brain and their relationship to behavior. In: SIEGEL, G.; ALBERTS, R. W.; BRADY, S.; PRICE, D. **Basic Neurochemistry**, Academic Press, p. 843-858, 2006.

MITRA, R.; JADHAV, S.; McEWEN, B. S.; VYAS, A.; CHATTARJI, S. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 102, n. 26, 9371–9376, 2005.

MORRIS, J.A., JORDAN, C.L., BREEDLOVE, S.M. Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is independent of circulating androgens and regional volume in adult rats. **Journal Comparative Neurology**, v.506, p.851-859, 2008.

MURPHY, D.D., SEGAL, M. Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v.94, p.1482-1487, 1997.

NABEKURA, J., OOMURA, Y., MINAMI, T., MIZUNO, Y. FUKUDA, A. Mechanism of the rapid effect of 17 $\alpha$  –estradiol on medial amygdala neurons. **Science**, v.233, p.226-228, 1986.

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.

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. Sexual dimorphism in synaptic organization in the amygdala and its dependence on neonatal hormone environment. **Brain Research**, v.212, p.31-38, 1981.

NISHIZUKA, M.; ARAI, Y. Male-female differences in the intra-amygdaloid input to the medial amygdala. **Experimental Brain Research**, v. 52, p. 328-332, 1983.

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. 545-549, 1998.

OBERLANDER, J.G., ERSKINE, M.S. Receipt of vaginal cervical stimulation modifies synapsin content in limbic areas of the female rat. **Neuroscience**, v.153, p.581-593, 2008.

OERTNER, T.; MATUS, A. Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. **Cell Calcium**, v. 37, p. 477-482, 2005.

PANNESE, E. The black reaction. **Brain Research Bulletin**, v. 41, n. 6, p. 343-349, 1996.

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

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

PETERS, A.; PALAY, S. L.; WEBSTER, H. D. Dendrites. In: **The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and Their Supporting Cells**, New York: Oxford University Press, p. 70-100, 1991.

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.

POPOV, V. I.; DEEV, A. A.; KLIMENKO, O. A.; KRAEV, I. V.; KUZ'MINYKH, S. B.; MEDVEDEV, N. I.; PATRUSHEV, I. V.; POPOV, R. V.; ROGACHEVSKII, V. V.; KHUTSIYAN, S. A.; STEWART, M. G.; FESENKO, E. E. Three-dimensional reconstruction of synapses and dendritic spines in the rat and ground squirrel hippocampus: new structural-functional paradigms for synaptic function. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 35, n. 4, 2005.

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

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.

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.

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

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

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. Funcional activities of the amygdala: an overview. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 25, n. 1, p.14-23, 2000.

RASIA-FILHO, A. A.; XAVIER, L.; SANTOS, P.; GEHLEN, G.; ACHAVAL, M. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats. **Brain Research Bulletin**, v. 58, n. 1, p. 67-75, 2002.

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

RASIA-FILHO, A.A.; BRUSCO, J., MOREIRA, J.E. Spine plasticity in the rat medial amygdala. In: **Dendritic spines: Biochemistry, Modeling and Properties**. Louis R. Baylog, 2009.

RONDINI, T. A.; BADDINI, S. P.; SOUSA, L. F.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons project to areas expressing gonadotropin releasing hormone immunoreactivity and to the anteroventral periventricular nucleus in male and female rats. **Neuroscience**, v. 125, p. 735-748, 2004

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

ROSELLI, C.E., HORTON, L.E., RESKO, J.A. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. **Endocrinology**, v.117, p. 2471-2477, 1985.

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

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.

SCALIA, F.; WINANDS, S. S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. **Journal of Comparative Neurology**, v. 61, 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.

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. The dendritic spine: a multifunctional integrative unit. **Journal Neurophysiology**, v.75, 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, p.130-136, 1979.

SIDDIQUI, A.; SHAH, B.H. Neonatal androgen manipulation differentially affects the development of monoamine systems in rat cerebral cortex, amygdala and hypothalamus. **Brain Research**, v. 2, p.247-252, 1997.

SILVA-GOMEZ, A. B.; ROJAS, D.; JUAREZ, I.; FLORES, G. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. **Brain Research**, v. 983, p. 128-36, 2003.

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

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

STEWART, O.; SCHUMAN, E. M. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 299–325, 2001.

STEMMELIN, J.; CASSEL, J. C.; KELCHE, C. Morphological alterations in the occipital cortex of aged rats with impaired memory: A Golgi–Cox study. **Experimental Brain Research**, v.151, p. 380–386, 2003.

SVOBODA, K.; TANK, D.W.; DENK, W. Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts. **Science**, v. 272, p. 716–719, 1996.

TADA, T.; SHENG, M. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. **Current Opinion in Neurobiology** , v. 16, p. 1-7, 2006.

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

VALVERDE, F. Intrinsic organization of the amygdaloid complex. A Golgi study in the mouse. **Trabajos del Instituto Cajal de Investigaciones Biológicas**, v. 54, p. 291-314, 1962.

WAGNER, C.K., MORRELL, J.I. Distribution and steroid hormone regulation of aromatase mRNA expression in the forebrain of adult male and female rats: A cellular level analysis using in situ hybridization. **Journal Comparative Neurology**. v.370, p. 71-84, 1996.

WELLMAN, C. L. Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. **Journal of Neurobiology**, n. 49, v. 3, p. 245-53, 2001.

WILSON, M.A., MASCAGNI, F., McDONALD, A.J. Sex differences in delta opioid receptor immunoreactivity in rat medial amygdala. **Neuroscience Letters**. v.328, p.160-164, 2002.

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 Neuroscience**, v.11, p.1837-1854, 1991.

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.

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. **Journal of Comparative Neurology**, v. 336, n. 2, p. 293-306, 1993.

YUSTE, R.; MAJEWSKA, A. On the function of dendritic spines. **The Neuroscientist**, v.7, n. 5, p. 387-395, 2001.

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.

ZHAO, L., CHEN, S., MING WANG, J., BRINTON, R.D.  $17\beta$  – Estradiol induces  $Ca^{2+}$  influx, dendritic and nuclear  $Ca^{2+}$  rise and subsequent cyclic AMP response element binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism. **Neuroscience**, v.132, p.299-311, 2005.

ZHER, J.L., TODD, B.J., SCHULZ, K.M., McCARTHY, M.M., SISCK, C.L. Dendritic pruning of the medial amygdala during pubertal development of the male Syrian hamster. **Journal Neurobiology**, P.578-90, 2006.