

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

Francine de Souza Dalpian

**INFLUÊNCIA DO DIMORFISMO SEXUAL, DO CICLO ESTRAL E DA
LATERALIZAÇÃO HEMISFÉRICA NAS PROPRIEDADES INTRÍNSECAS E
SINÁPTICAS DOS NEURÔNIOS DO SUBNÚCLEO PÓSTERO-DORSAL DA
AMÍGDALA MEDIAL DE RATOS**

Porto Alegre

2019

Francine de Souza Dalpian

**INFLUÊNCIA DO DIMORFISMO SEXUAL, DO CICLO ESTRAL E DA
LATERALIZAÇÃO HEMISFÉRICA NAS PROPRIEDADES INTRÍNSECAS E
SINÁPTICAS DOS NEURÔNIOS DO SUBNÚCLEO PÓSTERO-DORSAL DA
AMÍGDALA MEDIAL DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Alberto A. Rasia-Filho
Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria Elisa Calcagnotto

Porto Alegre
2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a minha amada família. Vocês são a alegria e a razão da minha vida. Dedico todas minhas conquistas a vocês.

Aos meus pais, Carlos Alberto Dalpian e Nelci da Rosa Souza Dalpian, pelo incentivo, pela compreensão, pelo apoio e, principalmente, pelos valores ensinados e pelo amor recebido. Eu não seria nada sem vocês na minha vida.

À minha irmã Bianca, pelo companheirismo, pela amizade, pelas risadas, e pelo amor incondicional. Você é a minha outra metade. E às minhas irmãs caninas Stéfani, Pepita, Penélope e Kim por trazerem alegria e diversão para nossa família, por me ensinarem a respeitar os animais e perceber a importância de vocês na minha vida.

Ao meu cunhado Daniel, agradeço pelas conversas, pelos jantares e pelas risadas.

À minha nova família, Juan Francisco Morales, agradeço pela paciência, pelo apoio, pelo companheirismo, pelo amor e pelo carinho. Te quero.

Às minhas filhas caninas, Bluma e Penny, obrigada por terem me escolhido e por me ensinarem o significado do amor puro e sincero. Obrigada pelos lambeijos diários e por serem minhas fiéis e amorosas companheiras.

À minha querida orientadora e amiga, Maria Elisa Calcagnotto, pelo exemplo pessoal e científico. Minha total gratidão pela confiança, pelo incentivo, pelos conselhos, pelas palavras de afeto nos momentos difíceis, pelas risadas e pela disponibilidade incondicional demonstrada em todas as fases que levaram à concretização desse trabalho. Agradeço também pela oportunidade de conviver esse período contigo e de compartilhar o amor pela ciência.

Ao meu querido orientador de longa data, Alberto A. Rasia-Filho, pela oportunidade, confiança, paciência, conselhos, e grande amizade. Você foi muito importante para o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Agradeço também pelos churrascos, jantares e risadas que tornaram essa trajetória mais leve.

À Dra. Melina Pires da Silva, pelas discussões dos protocolos experimentais, mas principalmente pela amizade.

Ao Prof. Dr. Jorge E. Moreira, colaborador científico da FMRP-USP, pela amizade, exemplo, e generosidade. Agradeço pela oportunidade e contribuição à minha formação científica e acadêmica. Saudades do nosso convívio.

Ao Prof. Dr. Alejandro F. Schinder, meu orientador no Laboratorio de Plasticidad Neuronal – Instituto Leloir – Buenos Aires, pela grande oportunidade, pelas ótimas contribuições e prazerosas discussões científicas.

Amigos e colegas de laboratório da UFRGS: Joseane, Mayara, Mariana, Gabriela, Querusche, Letícia M., Letícia C., Gabriel, Natividade, Carine, Ana Paula, Joelma, Grace e Luz Helena. Agradeço pelas contribuições e pela agradável convivência nesse período.

Amigos e colegas de laboratório do Instituto LELOIR de Buenos Aires: Karina, Ayelén, Paula, Matías, Mariela, Damiana, Daniela, Emílio e Diego. O tempo e a distância não permitem que a gente se encontre como gostaríamos, mas o pensamento e as lembranças ficarão para sempre.

Aos demais amigos: Gabriela, Andressa, Diego, Sabrina, Eduardo, Janaína, Suélen, Aline, Ana Paula, Cláudia Helena, Gabrielle, Heloísa, Patrícia, e Bruna. Agradeço o apoio, conversas e momentos inesquecíveis.

Aos animais utilizados neste trabalho que deram suas vidas em troca do conhecimento.

Às fontes financiadoras, UFRGS, CAPES e CNPq, que tornaram possível a execução desse projeto.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Amígdala	15
1.2. Amígdala Medial.....	18
1.2.1 Localização, divisão e citoarquitetura.....	23
1.2.2 Propriedades eletrofisiológicas dos neurônios da amígdala medial.....	29
1.2.3 Conexões da amígdala medial.....	30
1.3 Ação dos hormônios gonadais no subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial.....	39
1.4 Lateralização hemisférica no subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial ...	44
2. JUSTIFICATIVA.....	47
3. OBJETIVOS.....	48
3.1 Objetivos Gerais.....	48
3.2 Objetivos Específicos	48
4. MÉTODOS E RESULTADOS	49
4.1 Artigo Científico.....	49
5. DISCUSSÃO	98
5.1 Subpopulações neuronais do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial.....	98

5.2 Transmissão sináptica no subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial.....	101
5.3 Hipóteses sobre os circuitos neuronais relacionados com a modulação das aferências sinápticas do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial.....	106
6. CONCLUSÃO	110
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXO	133

ABREVIATURAS

ACe	Amígdala central
AMbl	Amígdala basolateral
AMe	Amígdala medial
AOB	Bulbo olfatório acessório
Arc	Núcleo arqueado
AVPV	Núcleo periventricular ântero-ventral
BST	Núcleo próprio da estria terminal
EPSC	Correntes excitatórias pós-sinápticas
ERs	Receptores para estrogênio
ER- α	Receptor do tipo α para estrogênio
ER- β	Receptor do tipo β para estrogênio
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAD65	Descarboxilase do ácido glutâmico 65
GAD67	Descarboxilase do ácido glutâmico 67
GFP	Proteína fluorescente verde
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
I_h	Corrente ativada por hiperpolarização
IPSC	Correntes inibitórias pós-sinápticas
Lhx	Fatores de transcrição da família homeodomínio LIM
MeAD	Subnúcleo ântero-dorsal da amígdala medial
MeAV	Subnúcleo ântero-ventral da amígdala medial
MePD	Subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial
MePDi	Porção intermediária do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial
MePDI	Porção lateral do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial
MePDM	Porção medial do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial
MePV	Subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial
MGEcv	Eminência gangliônica medial
MPOA	Área pré-óptica medial do hipotálamo
PA	Potencial de ação

PMV	Núcleo pré-mamilar ventral
POA	Área pré-óptica
PVH	Região hipotalâmica paraventricular
RMf	Ressonância magnética funcional
sAHP	Hiperpolarização pós-potencial lenta
SN	Sistema nervoso
ST	Estria terminal
TO	Trato óptico
vGlut2	Transportador vesicular de glutamato – tipo 2
VMN	Núcleo hipotalâmico ventromedial
VMNvl	Porção ventrolateral do núcleo hipotalâmico ventromedial

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Classificação dos núcleos que compõem a amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais.....17
- Figura 2.** Subpopulações neuronais da AMe e suas distintas origens histogenéticas.....22
- Figura 3.** Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato.....24
- Figura 4.** Imagem por detecção de contraste por interferência diferencial de luz infravermelha (IR-DIC) do MePD de rato.....25
- Figura 5.** Fotomicrografias de neurônios impregnados pela técnica de Golgi.....26
- Figura 6.** Neurônios e ramos dendríticos do MePD de ratos adultos machos e fêmeas ao longo do ciclo estral reconstruídos por microscopia confocal após a aplicação de cristais sonicados de Dil.....28
- Figura 7.** Esquema representativo das principais aferências neurais que chegam à AMe e que envolvem estímulos dos feromônios.....32
- Figura 8.** Modelo proposto de circuitos neuronais modulados pelas aferências sinápticas no MePD109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aferências intra-amigdalianas e extra-amigdalianas para os subnúcleos da amígdala medial de ratos.....33

Tabela 2: Eferências intra e extra-amigdalianas dos diferentes subnúcleos da amígdala medial de ratos.....36

RESUMO

O subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial (MePD) de ratos é uma região sensível aos hormônios gonadais que modula a ocorrência de comportamentos sociais pela transmissão de informação quimiossensorial para núcleos hipotalâmicos. Isto está relacionado com a ocorrência do dimorfismo sexual e da ação dos esteroides sexuais evidenciados por diferenças morfológicas e funcionais nos neurônios dessa região. Além disso, o processamento e a plasticidade sináptica apresentam lateralização entre os hemisférios cerebrais no MePD. No entanto, ainda é pouco conhecida a diversidade dos tipos celulares e sua respectiva conectividade funcional. O objetivo desse trabalho foi determinar o efeito do dimorfismo sexual, do ciclo estral e da lateralização hemisférica nas propriedades intrínsecas e nas aferências sinápticas dos neurônios do MePD de ratos Wistar adultos machos e fêmeas nas fases de diestro, proestro e estro. Registros eletrofisiológicos por *patch-clamp* no modo *whole-cell* foram realizados para caracterizar a atividade e integração neuronal e técnica de fluorescência foi utilizada para caracterizar a morfologia dos neurônios preenchidos com biocitina durante os respectivos registros eletrofisiológicos. Os resultados demonstram (1) a presença de duas subpopulações de neurônios multipolares e com espinhos dendríticos no MePD de ratos machos e fêmeas. Esses neurônios foram classificados em dois tipos. Neurônios Classe I, que apresentaram disparos de potenciais de ação (PA) irregulares com adaptação, e predominância de forma “bipenachada”, ou seja, com corpo celular dando origem a dois dendritos primários que se ramificam a seguir. Neurônios Classe II, que apresentaram apenas um ou dois disparos de PA com adaptação completa, e predominância de forma estrelada, ou seja, com corpo celular dando origem a três ou mais dendritos primários que se ramificam a seguir. (2) Os neurônios da Classe I apresentaram efeito da lateralização hemisférica, do sexo e do ciclo estral evidenciado pelo aumento da frequência de disparos de PA no MePD do hemisfério esquerdo nos machos em comparação com as fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral. (3) Os neurônios da Classe II apresentaram uma hiperpolarização pós-potencial lenta (sAHP) mais longa do que os neurônios da Classe I e,

conseqüentemente, adaptação completa dos disparos de PA. (4) Além disso, as aferências excitatórias e inibitórias nos neurônios do MePD foram determinadas pelo sexo, pelo ciclo estral e pela lateralização hemisférica. Em machos, a frequência das respostas sinápticas excitatórias no MePD do hemisfério esquerdo foi maior do que nas fêmeas nas três fases do ciclo estral. Em fêmeas, a transmissão sináptica inibitória predominou durante a fase do proestro em ambos os hemisférios cerebrais, e a magnitude das respostas excitatórias diminuiu nesse período. Em suma, este trabalho mostra características de morfologia e propriedades intrínsecas dos neurônios do MePD de ratos adultos e de suas aferências sinápticas que são modulados pelo sexo, que exibem uma notável plasticidade sináptica ao longo do ciclo estral e que são influenciados pela lateralização hemisférica. Esses dados morfofuncionais do MePD identificam seus tipos neuronais que estão integrados em circuitos que modulam o comportamento reprodutivo em ratos.

Palavras-chave: subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial, dimorfismo sexual, lateralização hemisférica, transmissão sináptica, propriedades intrínsecas, morfologia neuronal

ABSTRACT

The posterodorsal medial amygdala (MePD) is a sex-steroid-sensitive area that modulates different social behavior by relaying chemosensorial information to hypothalamic nuclei. This relates to the occurrence of a local sexual dimorphism and the effects of sex steroids evidenced by structural and functional differences in prepubertal and adult male and female rats. Furthermore, some aspects of the synaptic processing and plasticity in the MePD are lateralized in rats. However, little is known about cell type diversity and their functional connectivity. The aim of this work was to evaluate the important influence of sexual dimorphism, estrous cycle and lateralization on their intrinsic properties and synaptic inputs on the MePD of adult male and cycling female rats. To address the objectives we used whole-cell patch-clamp and fluorescence techniques to characterize the neuronal functional and morphological features of the recorded cells labelled with biocytin. The results demonstrate (1) the presence of two coexisting subpopulations of spiny neurons in the MePD of adult male and female Wistar rats. These neurons were classified in two types. Class I neurons, exhibiting irregular spikes with frequency adaptation, were predominantly bitufted-shaped cells characterized by two primary dendrites that give off successive branches. Class II neurons, exhibiting one to two action potential (AP) with full spike-frequency adaptation, were predominantly stellate-shaped cells characterized by three or more primary dendrites that radiate in all directions. (2) Class I neurons were affected by hemisphere lateralization, sex and estrous cycle as evidenced by the higher firing frequency of left MePD neurons in males when compared to cycling females. (3) Class II neurons had longer sAHP time course than Class I neurons and, consequently, tend to fire one or two AP and present full spike-frequency adaptation. (4) Furthermore, excitatory and inhibitory inputs onto MePD cells were determined by sex, estrous cycle, and hemispheric laterality. There is an overall increment in the excitatory input onto MePD neurons of males compared to cycling females and, between estrous phases, in diestrus compared to proestrus or estrus. On the other hand, there is an increase in the inhibitory input onto MePD neurons of females in proestrus compared to males and females in diestrus or estrus.

Taking together, these data provide a description of morphology, intrinsic properties, and synaptic input of MePD neurons of adult rats, which are determined by sex, exhibit a notable synaptic plasticity along the estrous cycle, and are affected by brain laterality. These novel data identify the neuronal types of MePD that are integrated in circuits that modulate the social behaviors in this subcortical area relevant for reproduction in rats.

Key words: posterodorsal medial amygdala, sexual dimorphism, hemispheric lateralization, synaptic transmission, intrinsic properties, neuronal morphology

1. INTRODUÇÃO

1.1 Amígdala

A amígdala, ou complexo amigdaliano¹, constitui-se de núcleos e subnúcleos localizados no lobo temporal anterior, lateral ao hipotálamo e ventral ao estriado no prosencéfalo basal de mamíferos (Alheid *et al.*, 1995; Canteras *et al.*, 1995; Everitt, 1995; Swanson e Petrovich, 1998; de Olmos *et al.*, 2004). Em ratos, localiza-se anteriormente ao hipocampo, ventral e lateral ao trato óptico (TO) ao longo de toda sua extensão rostro-caudal (de Olmos *et al.*, 2004; Rasia-Filho *et al.*, 2012a). Embora historicamente tenha sido considerada como uma estrutura unitária, a amígdala, no entanto, não é homogênea nem anatomicamente e nem funcionalmente (Swanson e Petrovich, 1998), ademais de se estender além de seus limites anatômicos (Johnston, 1923; Alheid *et al.*, 1995; Swanson e Petrovich, 1998; de Olmos *et al.*, 2004). Os componentes amigdalianos formam uma complexa rede estrutural inter-relacionada e multifuncional para modulação de comportamentos sociais e ajustes homeostáticos, como os reflexos cardiovasculares (Dumont *et al.*, 2002; Kubo *et al.*, 2004; Marcuzzo *et al.*, 2007; Quagliotto *et al.*, 2008; Quagliotto *et al.*, 2012; Chiou *et al.*, 2014; Quagliotto *et al.*, 2015). Para tanto, os núcleos amigdalianos recebem aferências tanto interoceptivas (advindos dos nervos pélvico, podendo, vago e glossofaríngeo) quanto exteroceptivas (por exemplo, estímulos olfativos, auditivos e visuais), que acabam por modificar sua própria atividade e estimular diversas regiões do sistema nervoso (SN) central para que inicie uma resposta ao estímulo percebido (LeDoux, 1992; Sah *et al.*, 2003; Sah e Westbrook, 2008; Keshavarzi *et al.*, 2015; Kikusui *et al.*, 2018).

Funcionalmente, a amígdala é considerada um componente importante de duas redes neurais distintas (García-López *et al.*, 2008). Uma composta principalmente de estruturas subcorticais, que regula atividades simpática/parassimpática e endócrinas por meio de projeções para o hipotálamo e tronco encefálico, e que participa na modulação de comportamentos tais como o

¹ Embora a terminologia anatômica nomeie esta estrutura como “corpo amigdalóide”, por definição encontrada em dicionário da língua portuguesa, “amigdaliano” refere-se a algo relativo ou pertencente à amígdala, enquanto “amigdalóide” é semelhante à amígdala (Rasia-Filho; Hilbig, 2005).

defensivo e reprodutivo (Swanson, 2000; García-López *et al.*, 2008; Rasia-Filho *et al.*, 2012a; Bergan *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017; Adekunbi *et al.*, 2018). A outra composta de conexões com o córtex cerebral, envolvida na elaboração de emoções e na tomada de decisões de acordo com o contexto e momento percebido pelo animal e suas memórias (Swanson, 2000; Stefanacci e Amaral, 2002; de Gelder, 2006; García-López *et al.*, 2008; Rasia-Filho *et al.*, 2012b; Noack *et al.*, 2015; Becker *et al.*, 2017; Burgos-Robles *et al.*, 2017; Grewe *et al.*, 2017).

Outros estudos citoarquitetônicos, hodológicos e funcionais da divisão da amígdala de ratos apresentam-na dividida em quatro regiões, a saber: 1) amígdala “expandida”, denominada assim por se estender além de seus limites anatômicos, sendo formada pela amígdala medial (AMe) e amígdala central (ACe); 2) amígdala com características corticais, subdividida em porção basolateral (AMbl) e em porções que se ligam às vias olfativas e vomeronasal; 3) área de transição, localizada entre a porção ventral dos núcleos da base e a amígdala “expandida”; e 4) núcleos ainda não classificados, constituídos por um grande grupo de células dispersas na substância branca e no interior do núcleo próprio da estria terminal (BST; Alheid *et al.*, 1995; Canteras *et al.*, 1995; Heimer *et al.*, 1997; Alheid, 2003; de Olmos *et al.*, 2004; Quagliotto, 2006; Figura 1). Os limites anatômicos precisos da amígdala e a classificação plena de todas as suas subdivisões permanecem, no entanto, ainda controversos (Swanson e Petrovich, 1998; de Olmos *et al.*, 2004).

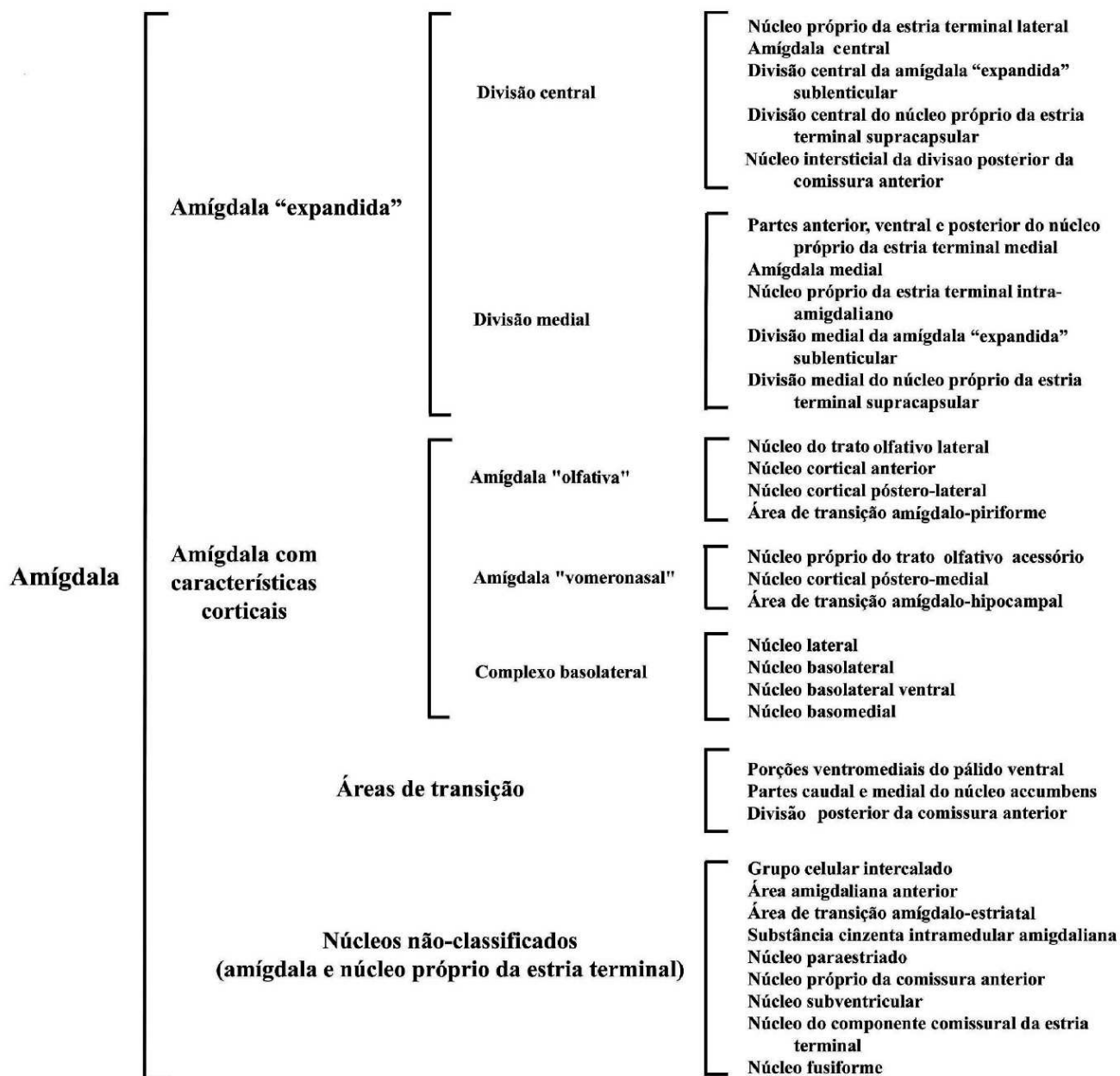


Figura 1: Classificação dos núcleos que compõem a amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais. Baseado em Alheid *et al.* (1995), modificado por Rasia-Filho *et al.* (2000). Reproduzido com autorização de Dall'Oglio (2007).

1.2. Amígdala Medial

A AMe é um dos componentes da denominada “amígdala expandida” e um dos núcleos superficiais amigdalianos (Alheid *et al.*, 1995; Alheid, 2003; de Olmos *et al.*, 2004). A neurogênese da AMe inicia-se por volta do 16º dia gestacional, e ocorre anteriormente nas áreas ventral e anterior e posteriormente na região pósterodorsal, o que pode estar relacionado com o início da chegada de informações olfativas nessa região (Mizukami *et al.*, 1983).

A AMe contribui para a regulação das atividades comportamentais, simpática/parassimpática e endócrinas fundamentais para a relação do animal com o seu ambiente (Swanson e Petrovich, 1998; Swanson, 2000; Neckel *et al.*, 2012; Rasia-Filho *et al.*, 2012a; Quagliotto *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Lischinsky *et al.*, 2017; Frankiensztajn *et al.*, 2018). Com isso, a AMe participa (1) na modulação e na integração de informações olfativas, vomeronasais e genitosensoriais (Guillamón e Segovia, 1997; Pfau e Heeb, 1997; Dielenberg e McGregor, 2001; Meredith e Westberry, 2004; Pro-Sistiaga *et al.*, 2007; Cádiz-Moretti *et al.*, 2014; Keshavarzi *et al.*, 2015), (2) na ansiedade, no medo inato e condicionado (Adamec e Morgan, 1994; Duncan *et al.*, 1996; Adekunbi *et al.*, 2018; Lopes *et al.*, 2018), (3) no processamento emocional, nas respostas neuroendócrinas a estímulos estressores (Dayas *et al.*, 1999; Dayas *et al.*, 2001; Marcuzzo *et al.*, 2007; Singewald *et al.*, 2008; Masini *et al.*, 2009; Shemesh *et al.*, 2016), (4) nos ajustes cardiovasculares relacionados à gênese e à modulação de comportamentos sociais (Quagliotto *et al.*, 2008; Davern e Head, 2011; Quagliotto *et al.*, 2012; de Almeida *et al.*, 2015), (5) na atividade sexual de machos e fêmeas e no comportamento maternal (Fleming *et al.*, 1980; Coolen *et al.*, 1997; Newman, 1999; Sheehan *et al.*, 2001; Pardo-Bellver *et al.*, 2012; Rasia-Filho *et al.*, 2012a; Cádiz-Moretti *et al.*, 2014; Gresham *et al.*, 2016; McCarthy *et al.*, 2017), (6) nos comportamentos agressivo e defensivo (Newman, 1999; Rasia-Filho *et al.*, 2012b; Ruiz-Reig *et al.*, 2018), e (7) na interação social (Stetzik *et al.*, 2018).

Na AMe de camundongos, essas funções são controladas por subpopulações neuronais de origem histogênética diferente e o seu desenvolvimento embrionário indica que é formada por células que estão distribuídas esparsamente em forma de

“mosaico” oriundas do pálido ventral (García-López *et al.*, 2008), da porção caudo-ventral da eminência gangliônica medial (MGEcv; Remedios *et al.*, 2004; García-López *et al.*, 2008; Carney *et al.*, 2010; Bupesh *et al.*, 2011; Puelles *et al.*, 2016; Ruiz-Reig *et al.*, 2018), da porção comissural da área pré-óptica (POA; García-López *et al.*, 2008; Abellán e Medina, 2009; Hirata *et al.*, 2009; Carney *et al.*, 2010; Bupesh *et al.*, 2011; Lischinsky *et al.*, 2017), da região hipotalâmica paraventricular (PVH; García-López *et al.*, 2008; García-Moreno *et al.*, 2010; Bupesh *et al.*, 2011), do pálido caudo-ventral (Ruiz-Reig *et al.*, 2018) e da eminência talâmica (Puelles *et al.*, 2000; Abellán e Medina, 2009; Ruiz-Reig *et al.*, 2018).

De fato, esses neurônios são geneticamente distintos, os quais expressam diferentes fatores de transcrição como, por exemplo, os da família homeodomínio LIM (Lhx): Lhx6, Lhx9 e Lhx5 (Choi *et al.*, 2005). Os fatores de transcrição Lhx desempenham múltiplos papéis no desenvolvimento de estruturas complexas, pois participam de interações regulatórias que permitem uma diversidade de funções (Remedios *et al.*, 2004). Especificamente, essas moléculas desempenham um papel crucial na regulação do desenvolvimento e da diferenciação da AMe (Remedios *et al.*, 2004). De forma interessante, a expressão diferenciada desses genes é considerada um importante mecanismo regulatório para determinar a subdivisão desse núcleo amigdaliano, ou seja, as porções anterior e posterior da AMe expressam diferentes combinações dos fatores de transcrição Lhx (Remedios *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005). Além disso, sabe-se que o fator de transcrição Lhx6 está envolvido na formação de uma via neural relacionada com o controle das funções reprodutivas e do comportamento sexual (Choi *et al.*, 2005). Esta via neural é constituída de neurônios GABAérgicos tanto da porção posterior da AMe quanto da porção posterior do BST e suas projeções para os seguintes núcleos hipotalâmicos: núcleo pré-mamilar ventral (PMV), área pré-óptica medial (MPOA) e a parte ventrolateral do núcleo ventromedial (VMNvl; Figura 2). Esses neurônios são particularmente originados da MGEcv que expressam calbindina (García-López *et al.*, 2008; Bupesh *et al.*, 2011) e somatostatina (García-López *et al.*, 2008; Carney *et al.*, 2010; Puelles *et al.*, 2016) e estão relacionados com o comportamento reprodutivo (Bupesh *et al.*, 2011; Ruiz-Reig *et al.*, 2018).

Além disso, os neurônios da porção anterior da AMe originados da POA expressam o fator de transcrição de gene homeobox Dbx1 (do inglês: *developing brain homeobox 1*) e o fator de transcrição Foxp2, membro da grande família FOX (do inglês: *forkhead*), que são regulados de forma distinta em resposta aos estímulos comportamentais inatos específicos de acordo com o sexo (Lischinsky *et al.*, 2017). Enquanto os estímulos de acasalamento ativam neurônios GABAérgicos que expressam o fator de transcrição Dbx1 em camundongos machos e fêmeas, aqueles que expressam o fator de transcrição Foxp2 são ativados apenas em machos, devido ao dimorfismo sexual da AMe (Lischinsky *et al.*, 2017). Desta forma, segundo a expressão desses fatores, a AMe tem diferentes tipos neuronais, com características morfofuncionais particulares, indicando o mecanismo pelo qual os comportamentos inatos poderiam ser processados pelas distintas subpopulações neuronais dessa região.

A AMe, principalmente a porção anterior, também é composta por neurônios glutamatérgicos originados da PVH que expressam o fator de transcrição Lhx5 e o fator de transcrição homeodomínio do gene Otp (do inglês: *orthopedia*; Choi *et al.*, 2005; García-Moreno *et al.*, 2010). A expressão de Otp é necessária para o adequado desenvolvimento dessa região, pois é um dos fatores de transcrição que regula a migração dessas células até atingirem o seu local de destino (García-Moreno *et al.*, 2010). Ademais, a expressão de Otp também regula por via direta ou, indiretamente, a expressão do Lhx5. Este é expresso em neurônios da AMe que se projetam majoritariamente para núcleos hipotalâmicos relacionados com o comportamento defensivo (Swanson, 2000; Choi *et al.*, 2005; Rasia-Filho *et al.*, 2012a).

Estudo mais recente de Ruiz-Reig *et al.* (2018) descreve uma nova subpopulação de neurônios glutamatérgicos que expressam o fator de transcrição Ebf3 membro da família EBF (do inglês: *early B-cell factor*) e o fator de transcrição membro da família T-box denominado Tbr1 (do inglês: *brain-specific T-box transcription factor*), localizados nos bordos da porção anterior da AMe. Esses neurônios são originados do pálido caudo-ventral, mas a conectividade e as propriedades eletrofisiológicas dessa subpopulação neuronal ainda são desconhecidas (Ruiz-Reig *et al.*, 2018).

Em conjunto, esses estudos indicam que a AMe expressa genes oriundos de ambas as subdivisões telencéflicas denominadas pálio e subpálio (Puelles *et al.*, 2000; García-Moreno *et al.*, 2010; Ruiz-Reig *et al.*, 2018). Além disso, a expressão de alguns genes diencefálicos como, por exemplo, o gene *Otp*, sugere que a AMe possua uma origem prosencefálica dupla (García-López *et al.*, 2008; García-Moreno *et al.*, 2010). Essa diversidade neural implica em mecanismos complexos de regulação dos circuitos neurais envolvidos nesta região para modular os comportamentos sociais de roedores (Ruiz-Reig *et al.*, 2018).

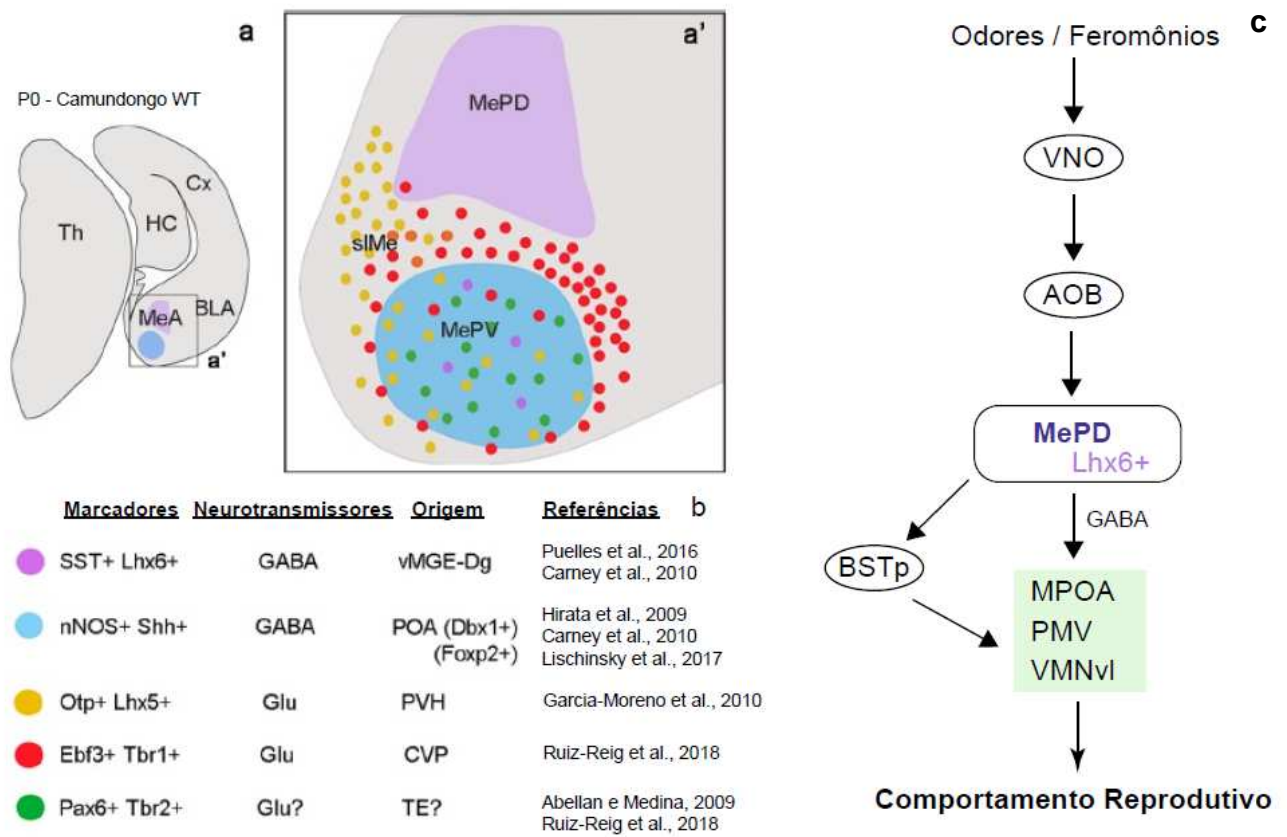


Figura 2: Subpopulações neuronais da AMe e suas distintas origens histogenéticas. (A) Representação esquemática de corte coronal do encéfalo de camundongo em P0. (A') Destaque para as diferentes subpopulações neuronais presentes nas porções anterior e posterior da AMe. A área em lilás representa os neurônios SST⁺ Lhx6⁺ localizados principalmente na porção posterior da AMe. Enquanto que a área em azul representa os neurônios nNOS⁺ Shh⁺ predominantes na porção anterior da AMe. (B) Resumo das subpopulações neuronais da AMe de acordo com a sua origem, seus neurotransmissores, e seus marcadores em que cada estudo referenciado. (C) Diagrama representativo do processamento de estímulos quimiossensoriais pela transmissão de informação vomeronasal para subpopulação específica de neurônios Lhx6⁺ da porção posterior da AMe e, suas eferências hipotalâmicas e para o BSTp para regulação do comportamento reprodutivo. AOB, bulbo olfatório acessório; BSTp, Núcleo próprio da estria terminal posterior; BLA, amígdala basolateral; CVP, pálido caudo-ventral; Cx, córtex; HC, hipocampo; MeA, amígdala medial; MePD, subnúcleo póstero-dorsal da amígdala medial; MPOA, área pré-óptica medial do hipotálamo; PMV, núcleo pré-mamilar ventral; POA, Área pré-óptica; PVH, região hipotalâmica paraventricular; Th, tálamo; TE, eminência talâmica; VMNvl, porção ventrolateral do núcleo hipotalâmico ventromedial; vMGE, eminência gangliônica medial; VNO, órgão vomeronasal. Mais informações sobre as subdivisões da AMe são fornecidas no texto a seguir dessa imagem. Figura adaptada de Choi *et al.* (2005) e Ruiz-Reig *et al.* (2018).

1.2.1 Localização, divisão e citoarquitetura

Em maiores detalhes, a AMe de ratos localiza-se rostromedialmente na porção superficial do complexo amigdaliano (Alheid *et al.*, 1995). É uma estrutura heterogênea formada por uma coluna proeminente de células que surgem em justaposição à superfície lateral do TO e, mais caudalmente, em posição ventral em relação ao BST (Alheid *et al.*, 1995; de Olmos *et al.*, 2004). A AMe encontra-se em posição medial e posterior ao núcleo do trato olfatório e, como limite posterior, está aproximadamente onde surgem as porções temporais dos ventrículos laterais (de Olmos *et al.*, 1985; Alheid *et al.*, 1995; Canteras *et al.*, 1995; de Olmos *et al.*, 2004). Dorso-lateralmente, a AMe é separada da porção medial da ACe por uma região pobre em células, a qual é substituída mais ventralmente e caudalmente pelo BST. Caudalmente e na posição dorsal, grupos de fibras que ascendem ou descendem dentro do BST são interpostos entre a AMe e outros núcleos amigdalianos (Alheid *et al.*, 1995; Paxinos e Watson, 1998; de Olmos *et al.*, 2004).

Adicionalmente, de acordo com de Olmos *et al.*, 1985; Alheid *et al.*, 1995; Canteras *et al.*, 1995, a AMe é subdividida em quatro subnúcleos: subnúcleo ântero-dorsal da amígdala medial (MeAD), subnúcleo ântero-ventral da amígdala medial (MeAV), subnúcleo pósterio-ventral da amígdala medial (MePV) e subnúcleo pósterio-dorsal da amígdala medial (MePD) o que veio a ser ratificado posteriormente por outros autores (Paxinos e Watson, 1998; Newman, 1999; Petrovich *et al.*, 2001; de Olmos *et al.*, 2004; Dall'Oglio *et al.*, 2008a; Figura 3).

O MePD, objeto de estudo desse trabalho, localiza-se lateralmente ao TO e ventralmente à estria terminal (ST) na parte mais posterior e dorsal da AMe (Figura 4). Ademais, o MePD separa-se do TO por uma camada com escassos corpos celulares, a qual se torna estreita em direção rostral e dorsal até desaparecer completamente próximo ao MeAD (de Olmos *et al.*, 1985; de Olmos *et al.*, 2004). Esta região preferentemente deve ser considerada como o local de passagem de axônios advindos do núcleo próprio da via olfatória acessória para transmissão da informação vomeronasal, e não como uma camada pertencente ao MePD (Scalia e Winans, 1975; de Olmos *et al.*, 2004; Pro-Sistiaga *et al.*, 2007).

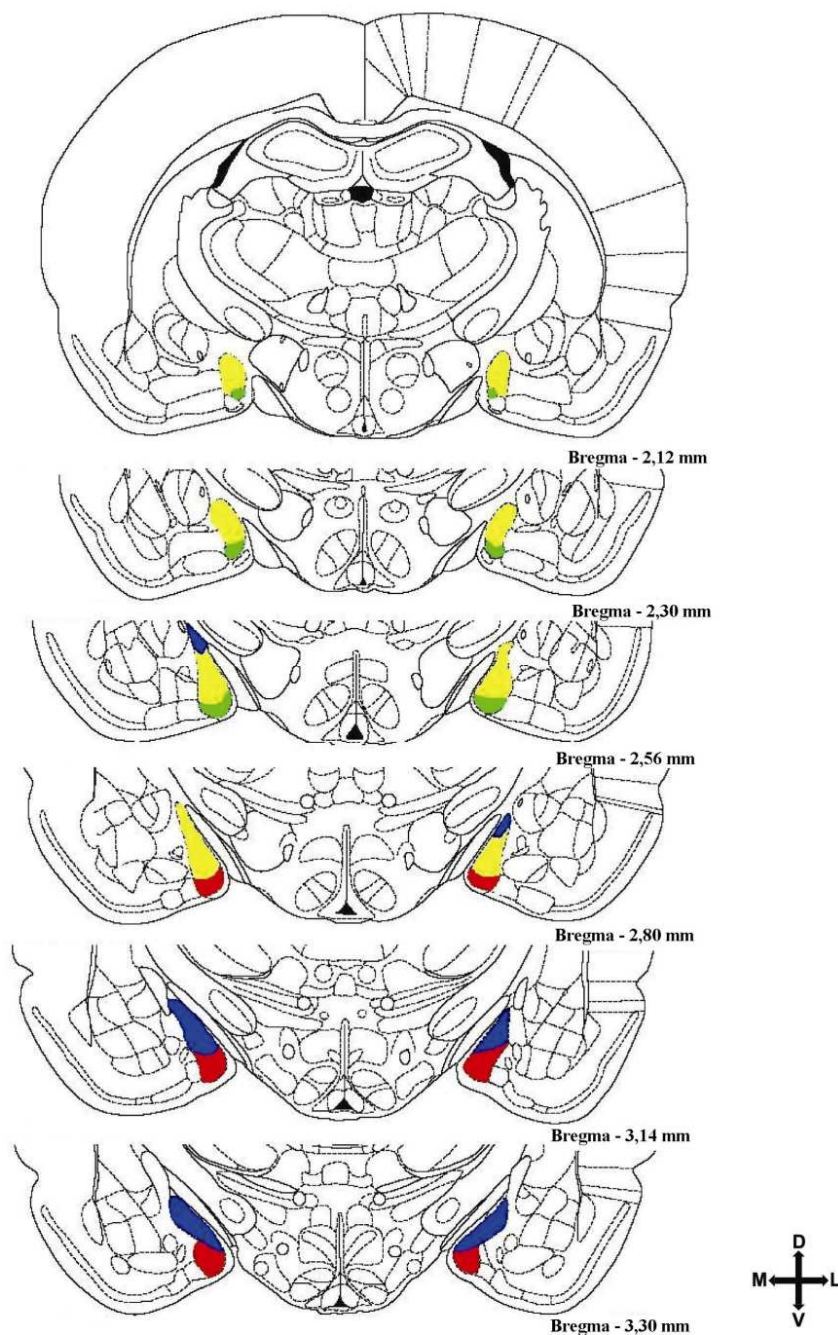


Figura 3: Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato. Pode-se observar os quatro subnúcleos da AMe: MeAD (em amarelo), MeAV (em verde), MePV (em vermelho) e MePD (em azul). Os valores em mm colocados no lado direito das imagens referem-se à distância posterior ao bregma. As coordenadas espaciais referem-se ao hemisfério direito e são dorsal (D), ventral (V), medial (M) e lateral (L). Figuras adaptadas do atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998) e conforme apresentado originalmente por Quagliotto (2006).

O MePD pode ainda ser subdividido de acordo com a disposição das suas células que se orientam em três colunas paralelas à superfície lateral da estrutura, a saber: uma primeira coluna superficial ou coluna medial (MePDm), formada por uma região de células densas medialmente que se estende superficialmente e profundamente, separada por uma segunda coluna formada por uma região intermediária de células esparsas (MePDi), e uma terceira coluna de células, menos organizada, orientada paralelamente e mais lateralmente (MePDi; de Olmos *et al.*, 2004).

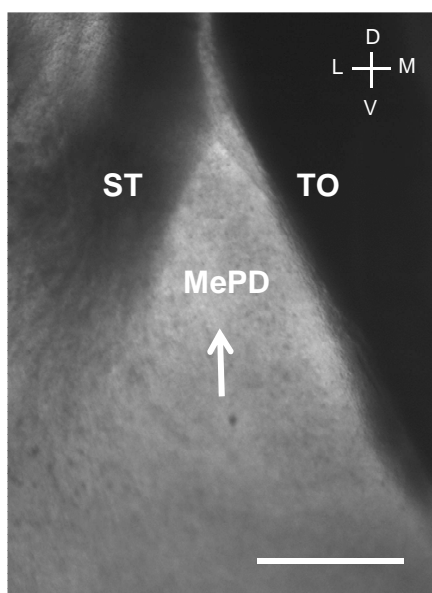


Figura 4: Imagem por detecção de contraste por interferência diferencial de luz infravermelha (IR-DIC) do MePD de rato. A seta destaca a região do MePD preferencialmente estudada nesse trabalho. MePD, subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial; TO, trato óptico; ST, estria terminal; D, dorsal; V, ventral; M, medial; L, lateral. Escala = 800 μ m

O MePD, assim como os demais subnúcleos da AMe de ratos, apresenta uma homogeneidade quanto aos tipos morfológicos de neurônios locais (Rasia-Filho *et al.*, 1999; Rasia-Filho *et al.*, 2004; de Castilhos *et al.*, 2006; Dall'Oglio *et al.*, 2008a; b; Brusco *et al.*, 2010; Keshavarzi *et al.*, 2014). Trata-se de neurônios multipolares que, quando impregnados pela técnica de Golgi, apresentam-se com tamanho pequeno (corpos celulares com 8-10 μ m de diâmetro) a médio (corpos celulares com 10-15 μ m

de diâmetro; McDonald, 1992; Rasia-Filho *et al.*, 1999). Seus corpos celulares podem ser ovais, arredondados ou fusiformes (McDonald, 1992; Alheid *et al.*, 1995; Rasia-Filho *et al.*, 1999). Pelo aspecto dendrítico, esses são neurônios multipolares (Ramón y Cajal, 1995; Rasia-Filho *et al.*, 1999; Figura 5) do tipo “bitufted” (“bipenachados”, como tentativa de aproximação do termo à língua portuguesa; Figura 5A) caracterizados por apresentarem dois ramos dendríticos primários, e do tipo estrelado (Figura 5B), com três ou mais ramos dendríticos primários (Rasia-Filho *et al.*, 1999; Marcuzzo *et al.*, 2007; Dall'Oglio *et al.*, 2008b; Rasia-Filho *et al.*, 2012a).

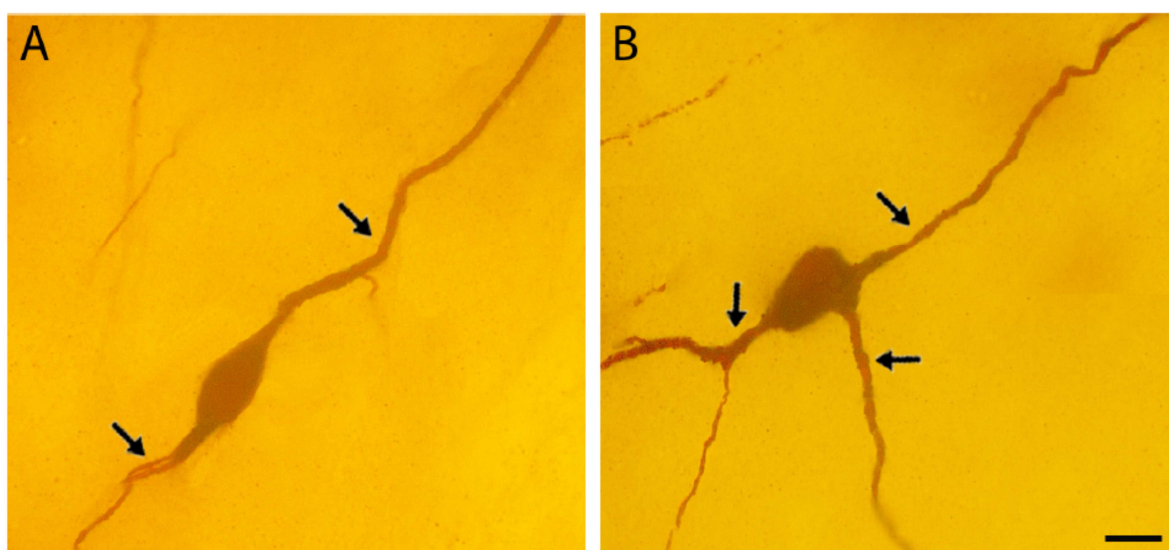


Figura 5. Fotomicrografias de neurônios impregnados pela técnica de Golgi. Neurônios com morfologia “bipenachada” (A) ou estrelada (B) da amígdala medial de rato. As setas representam os ramos dendríticos primários. Barra: 5 μ m. Conforme apresentado originalmente em Brusco (2012).

Em relação ao MePD, a maioria dos seus neurônios possui espinhos dendríticos de formas variadas e dispostos de forma aparentemente homogênea ao longo de cada dendrito, porém igualmente em alguns somas celulares e cones axonais (McDonald, 1992; Rasia-Filho *et al.*, 1999; Rasia-Filho *et al.*, 2004; Hermel *et al.*, 2006a; Brusco *et al.*, 2010; Zancan *et al.*, 2015). Entretanto, outros escassos neurônios apresentam-se sem espinhos nesta região. Nesses casos, porém, algumas

proeminências dendríticas são identificadas, o que coloca em dúvida a presença ou não de espinhos do tipo achatado nesses ramos irregulares (Rasia-Filho *et al.*, 2009).

Os dendritos do MePD apresentam uma quantidade moderada de espinhos e a distribuição dos espinhos parece ser relativamente homogênea ao longo do comprimento dendrítico (Marcuzzo *et al.*, 2007; Brusco *et al.*, 2010). As características dos espinhos podem variar de acordo com o sexo do animal e a fase do ciclo estral (Rasia-Filho *et al.*, 2004; Rasia-Filho *et al.*, 2012a; Zancan *et al.*, 2018; Figura 6). Em roedores, o diestro é o período do ciclo estral em que inicia a elevação dos níveis de estrogênio e progesterona em circulação e que corresponde ao período pré-ovulatório. No proestro ocorre o pico de estrogênio e progesterona em circulação, enquanto que no estro os níveis plasmáticos hormonais diminuem rapidamente e são os mais baixos se comparados com o diestro e o proestro (Welschen *et al.*, 1975; Marcondes *et al.*, 2002; Singletary *et al.*, 2005; Levine, 2015). Analisando-se os neurônios “bipenachados” e estrelados locais pelo emprego da microscopia confocal, a densidade de espinhos dendríticos em ramos com orientação medial de neurônios do MePD de ratos machos adultos foi de $1,15 \pm 0,67$ espinhos/ μm dendrítico. Nesses os espinhos dendríticos mais abundantes são os do tipo fino, correspondendo a 53% de todos os espinhos estudados, seguidos dos espinhos com formato de cogumelo (22,5%), achatados e espessos (21,5%), ramificados e filopódios (3%; Brusco *et al.*, 2010). Não há, no entanto, diferença na densidade de espinhos nos primeiros 40 μm dendríticos nem entre as colunas celulares medial e lateral do MePD (de Castilhos *et al.*, 2006) nem entre o MePD dos hemisférios direito e esquerdo (Arpini *et al.*, 2010).

Pela análise ultraestrutural dos neurônios do MePD, sinapses axo-dendríticas no tronco dos dendritos são as mais frequentemente observadas e, pelo aspecto morfológico, parecem ser principalmente excitatórias (Hermel *et al.*, 2006a; Brusco *et al.*, 2014). Embora na maior parte das vezes os espinhos dendríticos apresentam um único contato sináptico assimétrico excitatório, dados ultraestruturais mais recentes revelaram a presença de espinhos multissinápticos e de sinapse simétrica inibitória sobre espinhos dendríticos do MePD (Brusco *et al.*, 2014).

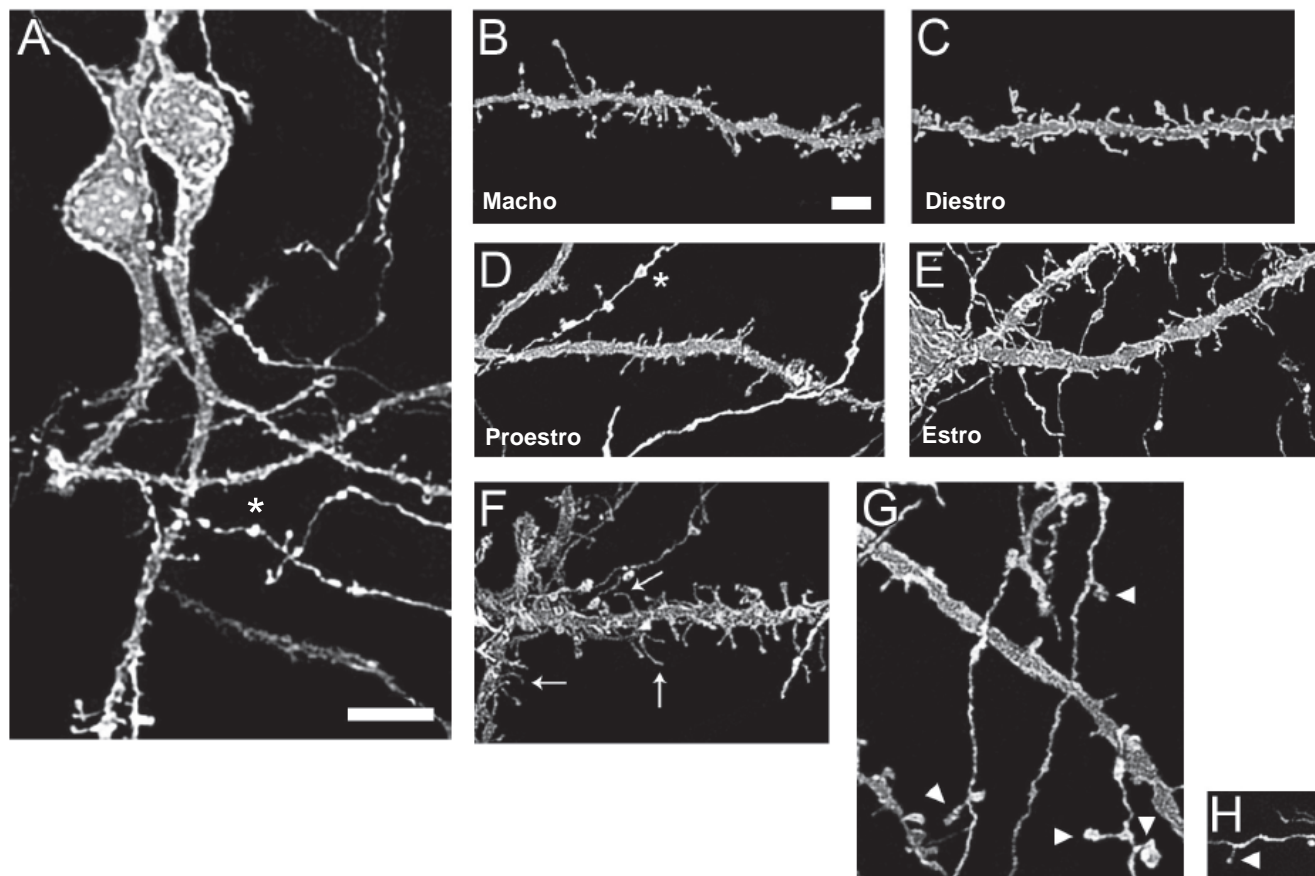


Figura 6: Neurônios e ramos dendríticos do MePD de ratos adultos machos e fêmeas ao longo do ciclo estral reconstruídos por microscopia confocal após a aplicação de cristais sonicados de Dil. (A) Dois neurônios “bipenachados” Barra = 10 µm. (B-E) Ramos em maior aumento para destaque dos espinhos dendríticos e varicosidades axonais (asterisco). (F) Destaque para filopódios (setas). (G-H) Protrusões axonais de diferentes formatos (cabeça de seta). Barra = 4 µm. Figura adaptada de Rasia-Filho *et al.* (2012a).

1.2.2 Propriedades eletrofisiológicas da amígdala medial

As propriedades eletrofisiológicas dos neurônios da AMe, sem considerar suas subdivisões anatômicas, foram estudadas pela técnica de *current-clamp* (modo *whole-cell*) em fatias cerebrais de camundongos (Niimi *et al.*, 2012). Os neurônios foram classificados, baseado no padrão de disparos de potenciais de ação (PA) em resposta a pulsos de corrente despolarizantes, em três tipos: neurônios com disparos de PA regulares (tipo I), neurônios que reduzem a frequência de PA (tipo II) e neurônios com adaptação completa (tipo III). O neurônio tipo I foi o mais comum (56%), seguido pelos tipos II (32%) e III (12%; Niimi *et al.*, 2012).

Em relação à transmissão sináptica, o uso de traçador anterógrado e a imunomarcagem para o transportador vesicular de glutamato – tipo 2 (vGlut2) e para as enzimas descarboxilase do ácido glutâmico 65 e 67 (GAD65 e GAD67) permitiu identificar que os neurônios da AMe que se projetam para o núcleo hipotalâmico ventromedial (VMN) são principalmente glutamatérgicos (Bian *et al.*, 2008). Há também neurônios GABAérgicos da região posterior da AMe que se projetam para o VMN (Bian *et al.*, 2008). Tais neurônios do MePD como do MePV que se projetam para o VMN são homogêneos tanto em relação às suas propriedades de membrana quanto às suas características morfológicas (Bian *et al.*, 2008). Essas células apresentaram correntes de cálcio de baixo limiar (tipo T) e SAG ativada por corrente hiperpolarizante (I_h) e alta resistência de entrada ($489 \pm 28 \text{ M}\Omega$; média \pm erro padrão da média, valores entre 247-780 $\text{M}\Omega$; Bian *et al.*, 2008).

Há três tipos neuronais na AMe, que foram identificados em fatias coronais de cérebro de camundongos adultos que expressavam seletivamente a proteína fluorescente verde (GFP) e GAD67 (Bian, 2013). Os neurônios, em sua maioria (73%), apresentaram potenciais mediados por corrente de cálcio de baixo limiar (tipo T) e foram classificados como neurônios de projeção do tipo I. Pelo aspecto morfológico, esses neurônios foram classificados em “bipenachados” ou estrelados, com espinhos dendríticos de formas variadas ou ausentes. Já os neurônios incapazes de gerar potenciais mediados por corrente de cálcio de baixo limiar (tipo T) foram divididos em outros dois tipos. Os neurônios do tipo II (11%) apresentaram SAG

ativada por corrente hiperpolarizante e uma alta resistência de entrada ($>400\text{ M}\Omega$). Os axônios desses neurônios formavam grandes colaterais e projetavam-se para outros núcleos da amígdala. Os neurônios do tipo III (16%), por sua vez, não apresentaram SAG ativada por corrente hiperpolarizante proeminente e tinham baixa resistência de entrada ($<400\text{ M}\Omega$). Além disso, esses neurônios eram do tipo estrelado e sem espinhos dendríticos, sendo classificados como interneurônios locais (Bian, 2013).

No entanto, como a AMe é uma estrutura heterogênea, faz-se necessário estudar suas regiões anterior e posterior separadamente a fim de serem avaliadas particularidades sutis, tanto morfológicas quanto funcionais, entre os subnúcleos dessa região (Newman, 1999; Rasia-Filho *et al.*, 1999; Rasia-Filho *et al.*, 2004; Rasia-Filho *et al.*, 2012a). Esta heterogeneidade pode afetar a interpretação dos dados experimentais obtidos a partir da AMe como um todo, que devem ser considerados, neste caso, como a “resultante” de todas as contribuições dos subnúcleos que compõem esta região (Rasia-Filho *et al.*, 2012a). Neste sentido, por exemplo, estudo recente em camundongos adultos classificou os neurônios especificamente do MePV com base em suas propriedades eletrofisiológicas e na expressão de GABA. Assim, foi possível dividir essas células do MePV em três tipos de neurônios GABAérgicos (Tipos 1-3) e dois tipos de neurônios não-GABAérgicos (Tipos I e II; Keshavarzi *et al.*, 2014).

Desta forma, embora as propriedades eletrofisiológicas dos neurônios da AMe tenham sido descritas previamente em camundongos (Bian *et al.*, 2008; Bian, 2013; Keshavarzi *et al.*, 2014), tais dados eletrofisiológicos não foram estudados em neurônios específicos do MePD de ratos adultos, quer seja em machos ou fêmeas.

1.2.3 Conexões da amígdala medial

De acordo com suas conexões, a AMe poderia estar organizada em uma região anterior ou rostral, da qual fariam parte o MeAD, o MeAV e o MePV, e uma região posterior ou caudal, da qual faria parte o MePD, embora grandemente interconectada com os demais subnúcleos (Canteras *et al.*, 1995).

A AMe de ratos possui uma ampla rede de conexões neurais entre os seus subnúcleos, com outros núcleos da amígdala e também com núcleos extra-amigdalianos (Alheid *et al.*, 1995; Canteras *et al.*, 1995; Pitkänen *et al.*, 1997; Newman, 1999; Pardo-Bellver *et al.*, 2012; Rasia-Filho *et al.*, 2012b; Keshavarzi *et al.*, 2014; Keshavarzi *et al.*, 2015).

As suas principais aferências estão listadas na Tabela 1, sendo que a maioria das aferências neuronais diretas que chegam à AMe são provenientes do bulbo olfatório acessório (AOB; Bian *et al.*, 2008; Martel e Baum, 2009; Bergan *et al.*, 2014), que envolve estímulos dos feromônios, os quais atuam inicialmente no órgão vomeronasal (Alheid *et al.*, 1995; Guillamón e Segovia, 1997; Pro-Sistiaga *et al.*, 2007; Pardo-Bellver *et al.*, 2012; Kikusui *et al.*, 2018; Figura 7). Outras regiões são inervadas diretamente pelo AOB que, por sua vez, projetam-se para a AMe (Scalia e Winans, 1975; Guillamón e Segovia, 1997; Pardo-Bellver *et al.*, 2012). Essas regiões incluem a amígdala cortical póstero-medial (Ottersen, 1982; Canteras *et al.*, 1992) e o BST (Swanson e Cowan, 1979; Ottersen, 1980; Guillamón e Segovia, 1997; Simerly, 2002; Cooke, 2006). Alguns autores demonstraram que a AMe também recebe aferências diretas do bulbo olfatório principal, embora em menor proporção, sendo assim considerada uma região de convergência das vias oriundas do órgão vomeronasal e do epitélio olfativo (Kang *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2011; Yang e Shah, 2014). Além disso, a AMe recebe projeções de outras porções encefálicas como o córtex parietal, córtex frontal (principalmente infralímbico), formação hipocampal (parte distal e proximal do *subiculum*) e tálamo (McDonald, 1998; Cádiz-Moretti *et al.*, 2014). Outras aferências são provenientes de vários núcleos do hipotálamo envolvidos com a modulação da atividade neuroendócrina e da emissão de vários comportamentos, tais como o PMV, VMN, MPOA etc. (Alheid *et al.*, 1995; Canteras *et al.*, 1995; McDonald, 1998; Pitkänen, 2000; Bian *et al.*, 2008; Cádiz-Moretti *et al.*, 2014).

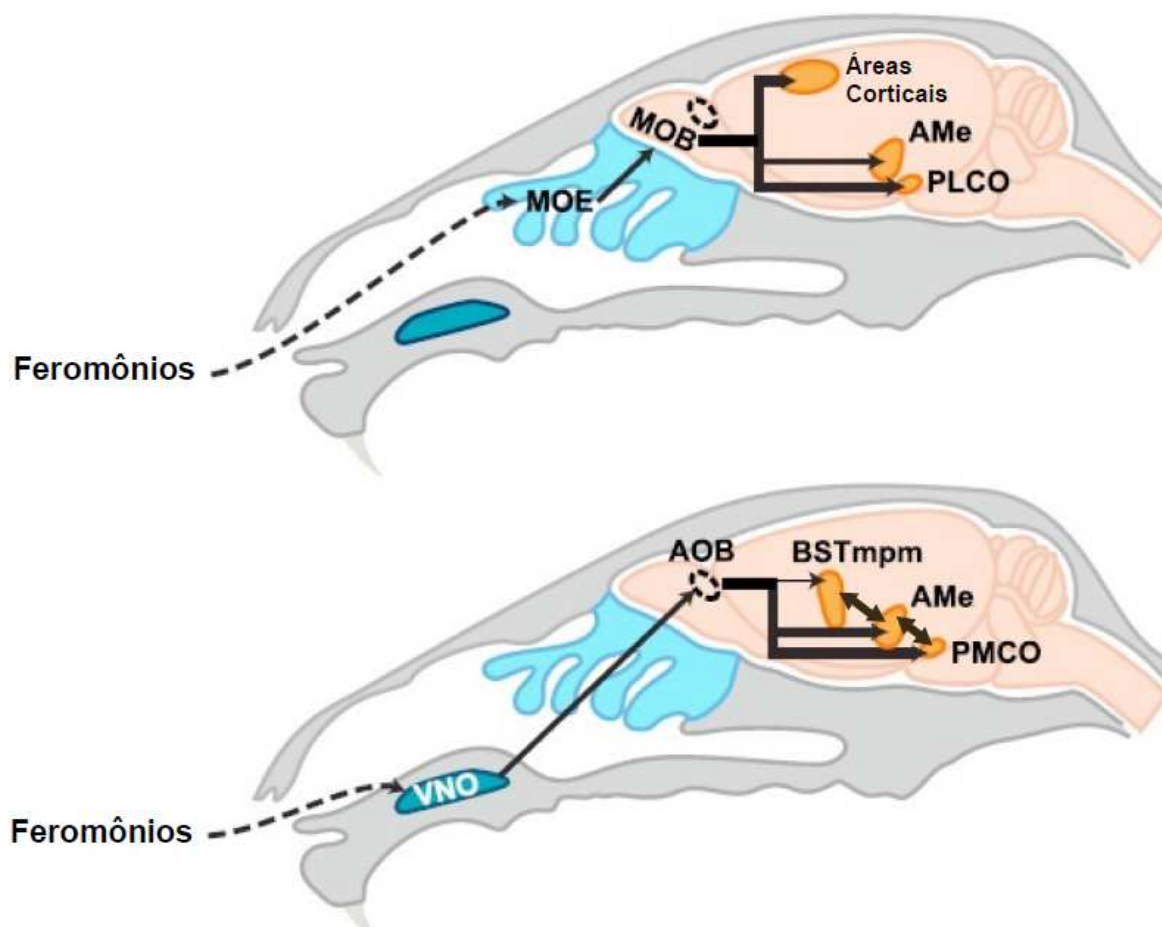


Figura 7: Esquema representativo das principais aferências neurais que chegam à AMe e que envolvem estímulos dos feromônios. AMe, amígdala medial; AOB, bulbo olfatório acessório; BST, núcleo próprio da estria terminal; MOB, bulbo olfatório principal; MOE, epitélio olfativo principal; PLCO, amígdala cortical póstero-lateral; PMCO, amígdala cortical póstero-medial; VNO, órgão vomeronasal. Figura adaptada de Yang e Shah (2014).

Tabela 1: Aferências intra-amigdalianas e extra-amigdalianas para os subnúcleos da amígdala medial de ratos. Conforme McDonald (1998), Pitkänen (2000) e adaptado de Hermel (2005).

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

As eferências (Tabela 2) dos subnúcleos da AMe, muitas delas recíprocas, são direcionadas para regiões dentro da própria amígdala, como é o caso do núcleo central e cortical. Além disso, os neurônios da AMe projetam-se em direção a regiões fora da amígdala tais como AOB, órgão vomeronasal, formação hipocampal

(ventralmente), estriado e globo pálido ventral, BST, tálamo na porção medial, substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo, núcleos da rafe mesencefálicos, e diversos núcleos hipotalâmicos (Alheid *et al.*, 1995; Canteras *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 2005). A maioria dos axônios de projeção extra-amigdalianos deixam os subnúcleos da AMe via BST ou pela “ansa peduncularis” (via amígdalo-fugal) indo, a seguir, em direção a regiões telecefálicas ou diencefálicas (Swanson e Cowan, 1979; Canteras *et al.*, 1992; Paredes *et al.*, 2000; de Olmos *et al.*, 2004; Pereno *et al.*, 2012).

No entanto, cada um dos subnúcleos da AMe tem suas próprias conexões características. Especificamente, o MePD de roedores possui aferências, dentre as quais as extra-amigdalianas mais estudadas são: (1) as hipotalâmicas (da área hipotalâmica anterior, MPOA, núcleo arqueado (Arc), núcleos dorsomedial, posterior, lateral, PMV, supra-óptico, tuberal e VMN), (2) as do córtex cerebral (da área pré-límbica, córtex entorrinal, infralímbico e perirrinal dorsal), (3) as da área septal e as aferências talâmicas (do núcleo medial, parafascicular e posterior, por exemplo), (4) as do tronco encefálico (núcleo dorsal da rafe e núcleo parabraquial) e (5) as da via olfativa (do córtex piriforme, bulbo olfatório acessório e núcleo endopiriforme; McDonald, 1998; Pitkänen, 2000; Cádiz-Moretti *et al.*, 2014). Além disso, existem também as aferências intra-amigdalianas onde se destacam as da área de transição amígdalo-hipocampal e dos núcleos basal e acessório e as dos núcleos corticais anterior, posterior, lateral e medial (McDonald, 1998; Cádiz-Moretti *et al.*, 2014).

Notavelmente, o MePD é influenciado por informações vomeronasais provenientes do AOB que chegam primeiramente no MeAD (Bressler e Baum, 1996; Guillamón e Segovia, 1997; McDonald, 1998; Meredith e Westberry, 2004; Blake e Meredith, 2010; 2011). Esta, por sua vez, identifica a relevância social do estímulo olfativo e, via núcleos “intercalados” da amígdala, determina se o MePD será ou não estimulado (Bressler e Baum, 1996; Guillamón e Segovia, 1997; McDonald, 1998; Meredith e Westberry, 2004; Blake e Meredith, 2010; 2011). Após, tanto o MeAD quanto o MePD conjugam informações olfativas provenientes do órgão vomeronasal e do bulbo olfatório, que afetam a atividade de áreas motoras e neuroendócrinas do hipotálamo assim como do tronco encefálico (Canteras *et al.*, 1995; Kondo *et al.*,

1998; Dominguez e Hull, 2001; Petrovich *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2008; Dhungel *et al.*, 2011).

O MePD utiliza-se do BST como via eferente preponderante indo, a seguir, em direção a regiões telencefálicas ou diencefálicas (Canteras *et al.*, 1992; Paredes *et al.*, 2000; de Olmos *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005; Pardo-Bellver *et al.*, 2012; Pereno *et al.*, 2012). Em relação às eferências do MePD, as mais estudadas e significativas são: (1) para os núcleos hipotalâmicos periventricular ântero-ventral (AVPV), PMV e MPOA; (2) as corticais (principalmente para a área entorrinal lateral, área de transição pós-piriforme, área CA1 hipocampal e subículo); (3) as do tronco encefálico (para a área tegmental dorsal e substância cinzenta periaqueductal); e para outras regiões, como, por exemplo, para o (4) BST (parte ântero-dorsal e posterior principal). Existem também as eferências intra-amigdalianas onde, dentre outras, destacam-se aquelas para os núcleos central, cortical póstero-lateral e póstero-medial (Canteras *et al.*, 1995; Petrovich *et al.*, 2001).

Tabela 2: Eferências intra e extra-amigdalianas dos diferentes subnúcleos da amígdala medial de ratos. Segundo Canteras *et al.* (1995), e conforme Hermel (2005).

PROJEÇÕES:		MeAD	MePD	MePV
INTRANUCLEARES:				
Núcleo medial	ântero-dorsal		++	+++
	ântero-ventral	+++	++	+++
	pósterio-dorsal	++		++
	pósterio-ventral	+++	++	
INTRA-AMIGDALÓIDES:				
Área amígdalo-piriforme		+++	+	+++
Área amígdaloide anterior		+++	+	+++
Núcleo basolateral	anterior	+	-	+
	posterior	+	+	+
Núcleo basomedial	anterior	+++	+	+++
	posterior	+++	+	+++
Núcleo central	medial	++	+	+
	central	+++	++	++
	lateral	+	-	+
Núcleo cortical	anterior	+++	+	++
	pósterio-lateral	++	+++	++
	pósterio-medial	++	+++	++
Núcleo lateral		++	+	++
Núcleo posterior		++	++	+++
Núcleo próprio do trato olfatório acessório		+++	+	+++
CORTICAIS:				
Área de transição pós-piriforme		+++	++	+
Área insular agranular		+	-	+
Área piriforme		++	+	+
Área entorrinal	lateral	+++	++	++
	medial	+	+	+
	ventromedial	+	+	-
Área infralímbica		+	+	+
Área pré-límbica		+	-	+
Bulbo olfatório acessório - camada mitral		+++	-	-
CA1 hipocampal		+	+	+
Claustro		+	-	+
Estriado		++	-	+
Núcleo do trato olfatório lateral		+	-	+
Núcleo endopiriforme	dorsal	+	+	+
	ventral	++	+	++
Núcleo olfatório anterior	dorsal	+	-	-
	externo	+	-	-
	lateral	+	-	-
	medial	+	-	-
	pósterio-ventral	++	-	-
<i>Parasubiculum</i>		+	-	+
<i>Subiculum</i>		+	+	+

Tabela 2. (Continuação)

PROJEÇÕES:		MeAD	MePD	MePV
CORTICAIS (continuação):				
<i>Tênia tecta</i>	dorsal	+	-	-
	ventral	+	-	+
Tubérculo olfatório		++	-	+
HIPOTALÂMICAS:				
Nível pré-óptico:				
Área pré-óptica lateral		+	-	-
Área pré-óptica medial		+++	-	+++
Núcleo periventricular ântero-ventral		+	+++	-
Núcleo pré-óptico medial	medial	+++	+++	+
	central	+	+++	+
	lateral	+++	++	+
Nível hipotalâmico anterior:				
Núcleo anterior	anterior	+	+	+++
	central	++	++	+++
	dorsal	++	-	+
	posterior	++	++	+++
Núcleo paraventricular	magnocelular anterior	+	-	-
	magnocelular pósteromedial	+	-	-
	parvocelular anterior	++	-	-
	parvocelular dorsal	+	-	-
	parvocelular dorsomedial	+	-	-
	periventricular	+	-	-
Núcleo periventricular	anterior	+	-	++
	intermediário	++	+	+++
	pré-óptico	+	-	++
Núcleo supraquiasmático		++	-	+++
Zona subparaventricular		+++	-	+++
Nível tuberal:				
Área hipotalâmica anterior		++	-	+
Núcleo arqueado		++	+	+
Núcleo dorsomedial	anterior	++	+	+
	posterior	+	+	+
	ventral	+	+	+
Núcleo ventromedial	anterior	+++	-	+++
	central	+++	+	+++
	dorsomedial	+++	-	+++
	ventrolateral	+++	+	+
Nível mamilar:				
Núcleo mamilar medial		+	+	+
Núcleo periventricular posterior		+++	+	+
Núcleo posterior		+++	+++	+++
Núcleo supra-mamilar		+	+	+
Núcleo pré-mamilar ventral		+++	+++	+++

Tabela 2. (Continuação)

PROJEÇÕES:		MeAD	MePD	MePV	
TALÂMICAS:					
Habênula lateral		+	-	-	
Núcleo dorsomedial	medial	++	-	-	
	central	-	-	-	
	lateral	-	-	-	
Núcleo paratenial		+	-	-	
Núcleo <i>reuniens</i> medial		+++	-	++	
Núcleo subparafascicular	magnocelular	-	-	-	
	parvocelular	+	-	-	
TRONCO ENCEFÁLICO:					
Área tegmental ventral		+	+	+	
Núcleos da rafe	dorsal	+++	-	+	
	interfascicular	+	-	+	
	rostral linear	+	-	+	
	central linear	+	-	+	
Substância cinzenta periaqueductal		+	+	+	
OUTRAS:					
<i>Núcleo accumbens</i>		+	-	-	
Núcleo próprio da estria terminal					
Anterior	ântero-dorsal	+++	+++	+++	
	ântero-lateral	++	+	++	
	ântero-ventral	+++	+	+	
	dorsolateral	++	+	++	
	dorsomedial	+++	+	+++	
	fusiforme	+	-	-	
	justacapsular	+	-	-	
	magnocelular	++	-	++	
	oval	+	+	+	
	romboide	++	-	+	
	subcomissural	++	+	+	
	Posterior	interfascicular	+++	+	+++
		principal	+	+++	+
transverso		+++	+	+++	
Núcleo septal lateral	dorsal	+	-	-	
	intermediário	+++	+	+	
	ventral	+++	+	+	
Núcleo septal medial		+	+	+	
Núcleo septofimbrial		+	+	+	
<i>Substancia inominata</i>		+++	+++	+++	
Zona incerta		++	-	+	

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

A maioria dos neurônios de projeção do MePD é inibitória (Swanson e Petrovich, 1998; Polston *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005), que atua para desinibir e orquestrar funções hipotalâmicas complexas, como o comportamento sexual (de Castilhos *et al.*, 2008; Rasia-Filho *et al.*, 2012a,b; Fujiwara *et al.*, 2016; Frankiensztajn *et al.*, 2018). De fato, a maioria dos neurônios do MePD é GABAérgica (Ben-Ari *et al.*, 1976; Polston *et al.*, 2004; Hirata *et al.*, 2009; Carney *et al.*, 2010; Ruiz-Reig *et al.*, 2018) e, nesse sentido, o MePD de camundongos constitui-se de 80% de neurônios que expressam o fator de transcrição Lhx6 (Choi *et al.*, 2005). Esses neurônios GABAérgicos que expressam calbindina são particularmente originados da MGEcv e relacionados com o comportamento reprodutivo (Bupesh *et al.*, 2011).

Assim, o MePD recebe aferências intra-amgdalianas e extra-amgdalianas que, por sua vez, modulam as suas eferências a vários núcleos hipotalâmicos que integram informações olfativas e a regulação da atividade neuroendócrina para controlar a ocorrência do comportamento sexual de machos e fêmeas. No entanto, as propriedades dos estímulos aferentes que atuam sobre o MePD e que regulam a conectividade das diferentes populações de neurônios locais são ainda pouco conhecidas.

1.3 Ação dos hormônios gonadais no subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial

O MePD é uma região particularmente sensível à ação dos hormônios gonadais dada a alta expressão de receptores para esses esteroides e diferenças estruturais e neuroquímicas entre os sexos (Nishizuka e Arai, 1981; Rasia-Filho *et al.*, 2004; Cooke e Woolley, 2005; Rasia-Filho *et al.*, 2012a,b; Lima *et al.*, 2018). De fato, o MePD apresenta uma alta concentração de receptores para testosterona e receptores de tipo α e β para estrogênio (ER- α e ER- β), além de receptores para progesterona (Simerly *et al.*, 1990; Gréco *et al.*, 1996; Shughrue *et al.*, 1997; Gréco *et al.*, 2001; de Vries e Simerly, 2002; Gréco *et al.*, 2003; Frankiensztajn *et al.*, 2018). Ademais, a aromatase, enzima que transforma testosterona em estradiol, também é

encontrada no MePD (Shinoda *et al.*, 1994; Wagner e Morrell, 1996; Stanic *et al.*, 2014; Unger *et al.*, 2015).

O MePD pode ter sua estrutura e função modulada pelos hormônios gonadais durante o desenvolvimento, na puberdade e na idade adulta (Nishizuka e Arai, 1981; Rasia-Filho *et al.*, 2004; Cooke e Woolley, 2005; Bergan *et al.*, 2014; Zancan *et al.*, 2018). As ações dos hormônios gonadais podem ser classificadas como rápidas, quando envolvem atividades relacionadas à abertura direta de canais iônicos, que facilita a exocitose dos hormônios e neurotransmissores. Já os efeitos intermediários envolvem a ativação da sinalização pelos segundos mensageiros na célula-alvo, que resulta na fosforilação de enzimas, de proteínas componentes de canais iônicos e de receptores ou proteínas estruturais que podem durar de minutos a horas. Por último, os efeitos mais lentos são aqueles que regulam a expressão gênica e a síntese de proteínas, que resulta no remodelamento estrutural dos tecidos-alvos desses hormônios (McEwen, 2012).

Em ratos machos e fêmeas, respectivamente, o MePD está relacionado com a ocorrência de atividade copulatória e de ejaculação (Coolen *et al.*, 1996; de Castilhos *et al.*, 2006; Hari Dass e Vyas, 2014; Veening e Coolen, 2014) ou na percepção da estimulação vaginocervical (Pfaus e Heeb, 1997; Lehmann e Erskine, 2005; Lehmann *et al.*, 2005; Oberlander e Erskine, 2008). Em machos, é interessante notar que os ratos com lesão no MePD apresentaram uma redução do comportamento de cópula e perda da ereção peniana quando expostos ao odor de uma fêmea em estro (Kondo, 1992; Kondo *et al.*, 1998; Kondo e Sachs, 2002). Porém, a atividade sexual copulatória aumenta após a microinjeção unilateral ou bilateral com testosterona no MePD de hamsters adultos castrados (Coolen e Wood, 1999). Os estímulos dos feromônios aumentam o número de células imunorreativas para receptores androgênicos nos neurônios do MePD de hamsters machos (Blake e Meredith, 2011). Neurônios do MePD positivos para receptores para estrogênio (ERs) expressam o gene de resposta imediata *c-fos* após a percepção de estímulo olfativo e da atividade copulatória (Gréco *et al.*, 1996; Coolen *et al.*, 1997; Gréco *et al.*, 2003). Ademais, o aumento da densidade de ER- α no MePD de ratos machos também está associado com a ejaculação e a saciedade sexual (Phillips-Farfán *et al.*, 2007). Em fêmeas,

existe uma alta concentração de ER- α e ER- β no MePD de ratas (Simerly *et al.*, 1990; Shughrue *et al.*, 1997; Gréco *et al.*, 1998; Gréco *et al.*, 2001; Gréco *et al.*, 2003; Phillips-Farfan *et al.*, 2007). Além disso, a expressão do mRNA para ER- β no MePD é proporcional ao nível de progesterona em circulação (Isgor *et al.*, 2002). O MePD apresenta a maior parte dos neurônios (61.6%) marcados com *fos* que também expressam ERs (Tetel *et al.*, 1994), sugerindo que a informação sensorial e hormonal relevante para reprodução nas fêmeas pode ser integrada por populações neuronais do MePD (Gréco *et al.*, 2003). De fato, o MePD também modula a secreção neuroendócrina hipotalâmica e a ovulação (Kalra e McCann, 1975; Beltramino e Taleisnik, 1978; Carney *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011). Esta modulação envolve o processamento de estímulos dos feromônios relevantes para a secreção neuroendócrina do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo PMV (Cavalcante *et al.*, 2006) e pelo AVPV (de Vries e Simerly, 2002) e a liberação de prolactina pelo Arc (Gu e Simerly, 1997).

Como mencionado, o MePD é composto em grande parte por neurônios GABAérgicos (Hirata *et al.*, 2009; Carney *et al.*, 2010; Ruiz-Reig *et al.*, 2018). Diversos estudos têm apontado uma íntima relação entre a neurotransmissão GABAérgica e a atividade estrogênica (Woolley e McEwen, 1993; Guerra-Araiza *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2012; Cheong *et al.*, 2015). Sabe-se que ratas fêmeas, após a exposição ao odor de machos, apresentam neurônios marcados com *fos* que também são GABAérgicos e expressam calretinina no MePD (Pereno *et al.*, 2011). Sendo assim, a excitabilidade neuronal dessa região pode ser controlada por neurônios GABAérgicos, indicando um importante papel dos neurônios inibitórios na modulação da chegada de estímulos do sistema vomeronasal, principalmente em fêmeas. Além disso, ratos expressam mais GAD65 do que fêmeas em todas as fases do ciclo estral e fêmeas em estro apresentam maior nível do mRNA para GAD65 e GAD67 do que fêmeas em diestro ou proestro (Brusco, 2012).

Como consequência, a atuação dos hormônios gonadais também pode alterar as regiões aferentes para o MePD e, desta forma, modificar sítios sinápticos importantes como os espinhos dendríticos, por exemplo (Brusco *et al.*, 2014). O padrão de desenvolvimento, forma e função dos espinhos dendríticos modifica de

forma marcante a excitabilidade neuronal (Coolen *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 2001; Segal, 2005; McKinney, 2010; Segal, 2010; Niimi *et al.*, 2012; Rochefort e Konnerth, 2012). Ademais, os espinhos dendríticos proximais estão localizados estrategicamente para afetar a voltagem do soma neuronal, a geração de PA e as eferências para diferentes redes neurais (Rasia-Filho *et al.*, 2004; Sanes e Jessell, 2013; Dalpian *et al.*, 2015; Zancan *et al.*, 2015).

Neste sentido, a castração de ratos Sprague Dawley pré-puberes reduz o número de espinhos dendríticos sem afetar o comprimento e ramificação dendrítica de neurônios do MePD (Cooke e Woolley, 2009), enquanto a exposição de ratos Long Evans à testosterona por 4 semanas aumenta em 67% a densidade de espinhos dendríticos em ramos dendríticos distais (Cunningham *et al.*, 2007). Em ratos Wistar adultos, a castração reduziu a densidade de espinhos dendríticos proximais coincidindo no tempo com a redução do comportamento sexual desses animais (de Castilhos *et al.*, 2008). Ademais, a reposição hormonal afeta igualmente a densidade de espinhos dendríticos no MePD de ratas. Ou seja, a terapia substitutiva com estradiol e progesterona, uma semana depois a castração, aumenta o número de espinhos dendríticos em relação às ratas controle não tratadas (de Castilhos *et al.*, 2008).

Avançando os achados sobre a quantidade de espinhos dendríticos no MePD e sua modulação pelos hormônios gonadais em machos e fêmeas, descobriu-se que a densidade de espinhos dendríticos no MePD de ratos é maior em machos do que em fêmeas virgens em proestro, estro e metaestro ou em fêmeas que passaram pela experiência da maternidade e se encontram em diestro, sugerindo que a variação cíclica dos esteroides sexuais modifica o número de locais pós-sinápticos de processamento da informação em animais adultos (Rasia-Filho *et al.*, 2004; Rasia-Filho *et al.*, 2009; Rasia-Filho *et al.*, 2012a,b).

Os hormônios gonadais podem também alterar a morfologia dos neurônios do MePD. O volume do MePD de ratos machos é maior, aproximadamente 85%, do que nas fêmeas (Hines *et al.*, 1992). E, baseado em dados de estudos prévios (Rasia-Filho *et al.*, 1999; Rasia-Filho *et al.*, 2002; Rasia-Filho *et al.*, 2004; Hermel *et al.*, 2006b; Martinez *et al.*, 2006; Dall'Oglio *et al.*, 2008a), a ação dos hormônios gonadais

em ratos adultos pode afetar marcadamente o volume do soma neuronal e a estrutura do neurópilo do MePD (composto por ramos dendríticos, espinhos dendríticos, conexões sinápticas e células gliais) tanto em machos quanto em fêmeas. Embora a quantidade de ramos dendríticos seja a mesma em neurônios de machos e fêmeas em diestro, o padrão de orientação espacial dendrítico é diferente entre os sexos (Dall'Oglio *et al.*, 2008b). Machos apresentaram dendritos com orientação preferencialmente medial e dorsolateral, enquanto as fêmeas, por sua vez, mais dorsal e ventromedial (Dall'Oglio *et al.*, 2008b). Isto se deve, provavelmente, ao fato de existir uma diferença nas aferências do MePD entre os sexos. Ou seja, o processamento da informação aferente mediada pelos esteroides sexuais contribui para a plasticidade neuro-gliial nesta região (Cahill, 2006). Por exemplo, dados de estudo ultraestrutural revelaram que após lesões na amígdala cortical de ratos, o número de sinapses localizadas nos ramos dendríticos da camada molecular da AMe diminui significativamente em machos, mas não em fêmeas (Nishizuka e Arai, 1983).

As diferentes vias que projetam para o MePD são integradas espacial e temporalmente no circuito neural para processar a ação mais apropriada de acordo com o contexto do animal (Rasia-Filho *et al.*, 2012b). Por exemplo, as conexões sinápticas dos neurônios do AOB com o MePD (Bressler e Baum, 1996; Guillamón e Segovia, 1997; Meredith e Westberry, 2004; Cádiz-Moretti *et al.*, 2014; Kikusui *et al.*, 2018) são sugestivas de um circuito gonadal que integra informações quimiosensoriais para modular atividades em ambos os sexos (Newman, 2002; Kikusui *et al.*, 2018). Além disso, acredita-se que em ratos a ativação do MePD durante o acasalamento e sua ação sobre núcleos hipotalâmicos desinibiria áreas cerebrais envolvidas com a atividade sexual (Choi *et al.*, 2005).

Tais dados indicam que o MePD forma uma interface que integra informações quimiosensoriais e neuroendócrinas e modifica dinamicamente sua atividade intrínseca para modular a ocorrência de comportamentos sociais (Wood e Newman, 1995; Guillamón e Segovia, 1997; Rasia-Filho *et al.*, 2004; Stetzik *et al.*, 2018). No entanto, faz-se necessário esclarecer o que ocorre com a integração sináptica e a funcionalidade dos neurônios do MePD de machos e fêmeas durante a variação do nível dos hormônios gonadais na idade adulta para aprimorar a compreensão da

regulação de aspectos específicos de cada comportamento em particular modulados por esta região.

1.4 Lateralização hemisférica no subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial

Apesar de não conhecermos o significado adaptativo da lateralização hemisférica em núcleos relacionados com a função neuroendócrina, evidências sugerem que esse mecanismo é dependente da idade e do sexo (Gerendai *et al.*, 1995; Cooke e Woolley, 2005; Cooke, 2006; Brusco *et al.*, 2014). Em ratos, a AMe do hemisfério direito dominaria o controle da esteroidogênese e a secreção de gonadotrofinas em machos e fêmeas (Gerendai *et al.*, 1995; Sanchez e Dominguez, 1995). Adicionalmente, a microinjeção de 8-OHDPAT, agonista dos receptores 5-HT_{1A}, no MePD do hemisfério direito diminui as latências para intromissão e ejaculação em ratos que resulta na facilitação do comportamento sexual masculino (de Castilhos *et al.*, 2006). De fato, além do dimorfismo sexual, o MePD de roedores é influenciado pela lateralização hemisférica (Cooke e Woolley, 2005; Morris *et al.*, 2008; Arpini *et al.*, 2010; Brusco *et al.*, 2014; Pfau *et al.*, 2016). Em ratos, o volume total do MePD dos machos é maior do que o das fêmeas (Hines *et al.*, 1992; Morris *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2008) devido ao maior número de corpos neuronais e células da glia (Morris *et al.*, 2008). Entretanto, o volume total do MePD é assimétrico em machos, sendo maior no hemisfério direito do que no esquerdo (Cooke *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2005), sendo que em ambos os sexos o MePD contém maior número de neurônios no hemisfério esquerdo em relação ao direito (Morris *et al.*, 2008). Não há, no entanto, diferença na densidade de espinhos nos primeiros 40 µm dendríticos dos neurônios do MePD entre os hemisférios direito e esquerdo (Arpini *et al.*, 2010). O número e a complexidade morfológica dos astrócitos também são parâmetros lateralizados entre os sexos em ratos (Johnson *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2012). O MePD do hemisfério direito dos machos possui maior número de astrócitos do que das fêmeas. Em contraste, o MePD do hemisfério esquerdo tanto de machos quanto de fêmeas possui astrócitos mais complexos do que os encontrados no hemisfério direito, sendo que os machos possuem astrócitos

mais complexos do que as fêmeas nesse hemisfério (Johnson *et al.*, 2008). Ademais, análises da ultraestrutura do MePD também demonstraram diferenças entre os hemisférios cerebrais (Brusco, 2012; Brusco *et al.*, 2014). O número total de vesículas sinápticas, de vesículas revestidas com clatrina e de vesículas ancoradas/ μm^2 do terminal pré-sináptico foi maior no MePD do hemisfério direito do que no hemisfério esquerdo de fêmeas em diestro, proestro e, sugerindo uma taxa mais elevada de liberação de neurotransmissores no MePD do hemisfério direito das fêmeas (Brusco *et al.*, 2014). Avaliação das sinapses excitatórias nos neurônios do MePD sugerem diferenças entre ratos Sprague-Dawley pré-púberes machos e fêmeas quanto à ambos os hemisférios cerebrais (Cooke e Woolley, 2005). Por exemplo, o número de sinapses excitatórias é sexualmente dimórfico do lado esquerdo (80% maior em machos do que em fêmeas), não mostrando variação do lado direito e não havendo diferenças sexuais quanto aos potenciais pós-sinápticos inibitórios (Cooke e Woolley, 2005).

Os efeitos da lateralização hemisférica causados pelos hormônios gonadais podem se estabelecer devido às diferenças na exposição hormonal entre os hemisférios e/ou pela diferença na sensibilidade aos hormônios (Brusco *et al.*, 2014). Estudos recentes demonstraram que a aromatase é expressa em populações neuronais específicas do MePD que contribuem para o dimorfismo sexual dessa região e a regulação de comportamentos sociais específicos de machos e fêmeas (Yang e Shah, 2014; Unger *et al.*, 2015; Lischinsky *et al.*, 2017). Essa enzima tem alta atividade durante o período crítico neonatal de maturação do SN (Shinoda *et al.*, 1994), e apresenta lateralização hemisférica na AMe de ratos jovens (von Ziegler e Lichtensteiger, 1992). Assim, a atividade da aromatase é considerada assimétrica durante o desenvolvimento da AMe, sendo maior na AMe do hemisfério esquerdo do que no direito no 22º dia gestacional; maior na AMe direita no 6º dia pós-natal (P6) e equivalente entre os hemisférios em P15. Esta assimetria pode estar relacionada com diferenças na produção ou na ação do estrogênio entre os hemisférios nessa região.

Essa considerável lateralização e sua interação com o dimorfismo sexual no MePD de ratos desperta interesse em identificar como cada hemisfério cerebral funciona de maneira específica e dependente do sexo para modular o comportamento

reprodutivo nesses animais (Cahill *et al.*, 2004; Pfau *et al.*, 2016), o que também será tema da presente tese.

2. JUSTIFICATIVA

O MePD de ratos é uma área sexualmente dimórfica que modula a secreção neuroendócrina hipotalâmica e a emissão de comportamentos sociais. Apesar de diversos estudos terem sido realizados com a finalidade de entender as bases neurobiológicas relacionadas a essas funções, muitas questões ainda não foram respondidas. Até o momento, segundo características morfológicas gerais, não é possível diferenciar as particularidades funcionais das subpopulações de neurônios do MePD. Portanto, é de grande interesse estudar as características funcionais e a integração sináptica das diferentes subpopulações do MePD para obter informações sobre o papel integrado do MePD dentro de circuitos envolvidos com a modulação de diferentes comportamentos sociais em roedores. Além disso, torna-se imperativo esclarecer como as alterações cíclicas dos hormônios gonadais podem alterar as propriedades intrínsecas e a integração sináptica dos neurônios do MePD e se estas são diferentes entre os hemisférios cerebrais. Isso é absolutamente relevante para estabelecer as bases morfológicas e funcionais da ação dos hormônios gonadais no MePD, conjugar ideias da circuitaria neural e do papel funcional dos neurônios do MePD, além de permitir uma melhor compreensão das diferenças das respostas neuroendócrinas e comportamentais de machos e fêmeas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

A proposta da presente tese foi investigar as características funcionais intrínsecas e sinápticas dos neurônios do MePD dos hemisférios direito e esquerdo de ratos Wistar machos e fêmeas ao longo do ciclo estral, a fim de obter dados relevantes e complementares para o entendimento da organização, do dimorfismo sexual, da lateralização hemisférica e da plasticidade neural dessa região.

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliar o efeito da lateralização hemisférica, do dimorfismo sexual e do ciclo estral nas propriedades intrínsecas dos neurônios do MePD pela caracterização das propriedades de membrana desses neurônios nos hemisférios direito e esquerdo de ratos machos e fêmeas nas fases de diestro, proestro e estro.
- 2- Avaliar o efeito da lateralização hemisférica, do dimorfismo sexual e do ciclo estral nas aferências sinápticas do MePD pelo estudo das correntes pós-sinápticas inibitórias e excitatórias nesses neurônios dos hemisférios direito e esquerdo de ratos machos e fêmeas nas fases de diestro, proestro e estro.

4. MÉTODOS E RESULTADOS

4.1 Artigo Científico

Artigo submetido para revista *Journal of Cell Science* em 12 de novembro de 2018.

Research Article

Sexual dimorphism, estrous cycle and laterality determine intrinsic properties and synaptic inputs of different medial amygdala neurons

Francine S. Dalpian, Alberto A. Rasia-Filho, Maria Elisa Calcagnotto



Assunto JOCES/2018/227793 Acknowledgement of Manuscript Submission
Remetente <jcs@biologists.com>
Para <elisa.calcagnotto@ufrgs.br>
Cópia <francinedalpian@gmail.com>, <aarf@ufcspa.edu.br>
Data 2018-11-12 23:06

MS ID#: JOCES/2018/227793
MS TITLE: Sexual dimorphism, estrous cycle and laterality determine intrinsic properties and synaptic inputs of different medial amygdala neurons
AUTHORS: Francine Dalpian, Alberto Antonio Rasia Filho, and Maria Elisa Calcagnotto

Dear Dr. Calcagnotto

This is an automatic message acknowledging your online submission to Journal of Cell Science.

Thank you for your submission. We will be in touch as soon as we have some news.

We take the security of your personal data very seriously. Your details are now stored with our trusted partner BenchPress. We will correspond with you at various stages in the handling of your submitted manuscript and will retain your data in our archive of documents relating to these transactions.
We may also contact you infrequently when we make changes to the journals processes and policies only if we genuinely believe they will be of interest and relevance to you as a recent (and hopefully future) author or to make you aware of opportunities to contribute to a special issue in your field. If any author would prefer not to receive these emails (via our trusted partner MailChimp), just let us know.
We will not send you marketing emails unless you specifically opt in to receive them via our email preference centre (<http://eepurl.com/c7ULfj>) and we will never sell your data on to third parties. Please see our Privacy policy for more details (<http://www.biologists.com/privacy-policy/>).

Best wishes,

The Editorial Office

Journal of Cell Science
The Company of Biologists Ltd
Bidder Building
Station Road
Histon, Cambridge, CB24 9LF
Phone:44 (0)1223 632867
Fax:44 (0)1223 632869
jcs@biologists.com

The information contained in this message and any attachment is confidential, legally privileged and is intended for the addressee only. Any dissemination, distribution, copying, disclosure or use of this message/attachment or its contents is strictly prohibited and may be unlawful. No contract is intended or implied, unless confirmed by hard copy. If you have received this message in error, please inform the sender and delete it from your mailbox or any other storage mechanism.

The Company Of Biologists Ltd cannot accept liability for any statements made which are clearly the senders' own and not expressly made on behalf of the Company of Biologists Limited or one of their agents.

[Dr Maria Calcagnotto \(Author\)](#) [Queue Summary](#) [Reviewer Area](#)

Under Review - Check Status

The manuscript below has entered the review process. Click on the links below the manuscript metadata to perform actions.

[Dryad Deposit](#)

JOCES/2018/227793

Sexual dimorphism, estrous cycle and laterality determine intrinsic properties and synaptic inputs of different medial amygdala neurons

Francine Dalpian , Alberto Antonio Rasia Filho , and Maria Elisa Calcagnotto 

Status: Under Review

Date Received: 12 Nov 2018

Editor: Giampietro Schiavo

Article Type: Research Article

Corresponding Author: Maria Elisa Calcagnotto

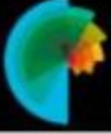
Keywords: intrinsic properties; posterodorsal medial amygdala; sex difference; synaptic transmission; whole-cell patch-clamp recordings

Supplemental Files: 0

[\[Contact Editorial Staff\]](#) [\[PDF version of your paper\]](#) [\[HTML References\]](#)

[Journal of Cell Science](#) [Journal Site](#) [Contact Us](#) [Terms of Use](#)
[Privacy Statement](#)

© 2018 The Company of
 Biologists Ltd


The Company of
Biologists
Journal of
Cell Science

[Dr Maria Elisa Calcagnotto \(Author\)](#)
 [Queue Summary](#)
 [Reviewer Area](#)

Under Review - Check Status




The manuscript below has entered the review process. Click on the links below the manuscript metadata to perform actions.

REVISION

[Dryad Deposit](#)

JOCES/2018/227793

Sexual dimorphism, estrous cycle and laterality determine intrinsic and synaptic properties of medial amygdala neurons

Francine Dalpian , Alberto Antonio Rasia-Filho , and Maria Elisa Calcagnotto 

Status: Under Review

Date Received: 15 Feb 2019

Editor: Giampietro Schiavo

Previous manuscript ID: JOCES/2018/227793


Article Type: Research Article

Corresponding Author: Maria Elisa Calcagnotto

Keywords: hemispheric lateralization; intrinsic properties; posterodorsal medial amygdala; sex difference; synaptic transmission

Supplemental Files: 2

[\[Contact Editorial Staff\]](#) [\[PDF version of your paper\]](#) [\[HTML References\]](#) [\[Download Supplemental Files\]](#) [\[First Submission Reviews\]](#) [\[First Submission Dec](#)



Research Article

Sexual dimorphism, estrous cycle and laterality determine intrinsic and synaptic properties of medial amygdala neurons

Francine Dalpian¹, Alberto A. Rasia-Filho^{1,2}, Maria Elisa Calcagnotto^{1,3*}

¹Graduate Program in Neuroscience, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90170-050, RS, Brazil

²Department of Basic Sciences/Physiology, Federal University of Health Sciences, Porto Alegre, 90170-050, RS, Brazil

³Neurophysiology and Neurochemistry of Neuronal Excitability and Synaptic Plasticity Laboratory, Department of Biochemistry, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90035-003, RS, Brazil

Short Title: Features of medial amygdala neurons

Number of figures: 5

Number of tables: 3

***Corresponding author:**

Maria Elisa Calcagnotto, MD, PhD

Address: Biochemistry Department, ICBS/UFRGS, R. Ramiro Barcelos 2600 Anexo 21111, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil.

Phone: +55 51 33085570

E-mail: elisa.calcagnotto@ufrgs.br

Summary Statement

This article highlights that the intrinsic properties and synaptic inputs of the MePD neurons are modulated by sex, estrous cycle, and hemispheric lateralization.

Abstract

The posterodorsal medial amygdala (MePD) is a sex-steroid-sensitive area that modulates different social behavior by relaying chemosensorial information to hypothalamic nuclei. However, little is known about cell type diversity and their functional connectivity. Here, we have characterized neurons and synaptic inputs in the right and left MePD of adult male and cycling female (in diestrus, proestrus or estrus) rats. Based on their electrophysiological properties and morphology, we found two coexisting subpopulations of spiny neurons that are sexually dimorphic. They were classified as Class I (predominantly bitufted-shaped neurons showing irregular spikes with frequency adaptation) or Class II (predominantly stellate-shaped neurons showing full spike-frequency adaptation). Furthermore, excitatory and inhibitory inputs onto MePD cells were modulated by sex, estrous cycle, and hemispheric lateralization. In the left MePD, there was an overall increase in the excitatory input onto neurons of males compared to cycling females. On the other hand, in proestrus, the MePD neurons received mainly inhibitory inputs. Therefore, our findings indicate the existence of hemispheric lateralization, estrous cycle and sexual dimorphism influences at cellular and synaptic level in the adult rat MePD.

Key words: posterodorsal medial amygdala, sex difference, hemispheric lateralization, synaptic transmission, intrinsic properties

Abbreviations

AOB	Accessory olfactory bulbs
AP	Action potential
AVPV	Hypothalamic anteroventral periventricular nucleus
BNST	Bed nucleus of the stria terminalis
C _m	Membrane capacitance
D-AP5	D-(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid
DNQX	6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione
fAHP	Fast afterhyperpolarization
HW	Half-width
MeA	Medial amygdala
MePD	Posterodorsal medial amygdala
mEPSC	Miniature excitatory postsynaptic currents
mIPSC	Miniature inhibitory postsynaptic currents
MPOA	Medial preoptic area
nACSF	Normal recording cerebrospinal fluid
PBS	Phosphate buffer solution
R _{in}	Input resistance
RT	Room temperature
sACSF	Slicing artificial cerebrospinal fluid
SAG	Rebound depolarization amplitude at hyperpolarized currents
sAHP	Slow afterhyperpolarization
sEPSC	Spontaneous excitatory postsynaptic currents
SFA	Spike frequency adaptation
sIPSC	Spontaneous inhibitory postsynaptic currents
TTX	Tetrodotoxin
V _{rest}	Resting membrane potential
τ	Membrane time constant

Introduction

The posterodorsal subdivision of the medial nucleus of the amygdala (MePD) expresses high levels of androgen, progesterone, and both estrogen α - and β -receptors (Gréco *et al.*, 1998; de Vries and Simerly, 2002; Frankiensztajn *et al.*, 2018). This relates to the occurrence of a local sexual dimorphism and the effects of sex steroids evidenced by structural and functional differences in prepubertal and adult male and female rats (Cooke and Woolley, 2005; Cooke and Woolley, 2009; Morris *et al.*, 2008; Rasia-Filho *et al.*, 2004; Zancan *et al.*, 2015; Zancan *et al.*, 2017; Zancan *et al.*, 2018). The MePD modulates the display of reproductive behavior in both sexes (Adekunbi *et al.*, 2018), mainly intromission and ejaculation in males (Coolen and Wood, 1999; Coolen *et al.*, 1997; Newman, 1999; Rasia-Filho *et al.*, 2012a) or the timely GnRH secretion for ovulation (Polston *et al.*, 2001; Simerly, 2004) and the display of sexual behavior in females (Pfaus and Heeb, 1997; Polston *et al.*, 2001).

The MePD neurons receive direct and indirect projections from the main and accessory olfactory bulbs (AOB) (Pro-Sistiaga *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2009, 2011; Pereno *et al.*, 2011). Then, they send out projections to (1) the hypothalamic anteroventral periventricular nucleus (AVPV) (de Vries and Simerly, 2002); (2) the medial preoptic area (MPOA); (3) the ventral premammillary nucleus and a lesser extent, to the ventrolateral part of the ventromedial nucleus, some of them via the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) (Cavalcante *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2001; Pardo-Bellver *et al.*, 2012; Petrovich *et al.*, 2001). Most outputs from the MePD are considered inhibitory (Choi *et al.*, 2005; Swanson and Petrovich, 1998), which serve to disinhibit and orchestrate the complex hypothalamic function (de Castilhos *et al.*, 2008; Rasia-Filho *et al.*, 2012a; Rasia-Filho *et al.*, 2012b). In fact, the medial amygdala (MeA) is largely composed of GABAergic neurons (Carney *et al.*, 2010; Ruiz-Reig *et al.*, 2018). In particular, 80% of the MePD neurons are GABAergic Lhx6 transcription factor expressing-cells in mice (Choi *et al.*, 2005).

As other components of the extended amygdala, the mouse MeA develops from cell clusters coming from the caudoventral pallidal subdivision, the ventral pallium, the commissural preoptic area, and the supraoptoparaventricular domain of the hypothalamus (Bupesh *et al.*, 2011; García-López *et al.*, 2008; Ruiz-Reig *et al.*, 2018). Nevertheless, two

types of subcortical multipolar neurons have been described in the rat MePD using the Golgi method. They were classified as bitufted or stellate cells, with two or more than two primary dendrites emerging from an ovoid to round cell body, respectively (Dall'Oglio et al., 2008; Rasia-Filho et al., 2004; Rasia-Filho et al., 2012a; Rasia-Filho et al., 2012b). This cellular homogeneity might explain the low variability in the data obtained for the quantification of soma size, soma volume, and dendritic spine density of Golgi-impregnated neurons from the MePD of male rats (Rasia-Filho *et al.*, 2012b, 2012a; Zancan *et al.*, 2017, 2018).

On the other hand, males and females differ in several aspects making the rat MePD an interesting area to study neural gonadal steroid actions, as occurs for the MPOA and other sex-steroid sensitive interconnected areas (Garelick and Swann, 2014). For example, neurons in males have both a higher cell body volume (Hermel *et al.*, 2006b) and a higher density of proximal dendritic spines than females in proestrus or estrus, but not in diestrus (Rasia-Filho *et al.*, 2004, 2012a). Dendritic spines are multifunctional integrative postsynaptic units that receive inputs typically from excitatory synapses (Spruston *et al.*, 2013; Yuste, 2013). Ultrastructural studies further revealed that proestrus females have the highest density of somatic spines (Zancan *et al.*, 2015) and more inhibitory synapses on dendritic shafts in the right MePD than in the left MePD (Brusco *et al.*, 2014). In addition, some aspects of the synaptic processing and plasticity in the MePD are lateralized in rats (Brusco et al., 2014; Hirsch et al., 2018). That is, the frequencies of both spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSC) and miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC) are significantly higher in the left MePD of prepubertal males when compared to females (Cooke and Woolley, 2005). Males also have 80% more excitatory synapses per MePD neuron than females in the left hemisphere (Cooke and Woolley, 2005).

Therefore, the adult MePD serves as an interface for the integration of environmental chemosensory inputs, circulating levels of gonadal hormones, and the activity of the social behavior neural network (Choi et al., 2005; Newman, 1999; Petrulis, 2013; Rasia-Filho et al., 2012b; Rasia-Filho et al., 2012a). A better understanding of information processing in the MePD requires detailed characterization of the functional properties and connectivity of its neurons. Although electrophysiological properties of MeA neurons have been described from different divisions in mice (Bian, 2013; Bian et al., 2008; Keshavarzi et al., 2014), no such

electrophysiological data are currently available for the MePD neurons in adult males and along the estrous cycle of female rats.

Here, we characterized two different types of coexisting neurons and demonstrated the important influence of sexual dimorphism, estrus cycle and lateralization on their intrinsic properties and synaptic inputs in the MePD of adult male and cycling female rats.

Results

First, we evaluated intrinsic membrane properties and the morphology of MePD neurons and investigated whether the sexual dimorphism and hemispheric lateralization could influence these cell features.

Intrinsic membrane properties of MePD neurons

The intrinsic membrane properties were analyzed from a total of 244 MePD neurons recorded randomly from each hemisphere in males and in females along the three phases of the estrous cycle (Fig. 1A-D).

Two coexisting subpopulations of MePD neurons were identified based on the distinct responses to both depolarizing and hyperpolarizing current injections and different firing patterns. These neurons were named as Class I (43 % of the recording cells) or Class II (57 % of the recording cells) neurons. The electrophysiological properties of these two classes of neurons were measured by depolarizing (100 pA) or hyperpolarizing (-100 pA) current steps (Table 1) and depicted below.

Class I neurons exhibit irregular spikes with frequency adaptation

MePD Class I neurons characteristically exhibited a reduction in firing rate to a stimulus of constant intensity (Fig. 2A). Data were obtained from the MePD of males (21 neurons) and females in diestrus (23 neurons), proestrus (33 neurons) or estrus (28 neurons).

Class I neurons typically had an average V_{rest} of -50.78 ± 0.68 mV, R_{in} of 419.48 ± 8.24 M Ω , τ of 23.30 ± 0.8 ms, C_m of 59.56 ± 1.06 pF, and SFA ratio of 5.69 ± 0.51 . No statistically significant difference was found for these parameters between sex and cerebral hemisphere ($F_{3,95} = 0.93$, $p = 0.42$; $F_{3,95} = 1.09$, $p = 0.35$; $F_{3,95} = 0.73$, $p = 0.53$; $F_{3,95} = 0.48$, $p = 0.69$, $F_{3,95} =$

0.56, $p = 0.64$, respectively; Table 1). These neurons also had a small hyperpolarization-activated voltage SAG (Table 1), and about 49% of these cells displayed rebound spikes after the hyperpolarizing current steps (Fig. 2A). Furthermore, under depolarizing current steps from 20 pA to 100 pA, these neurons exhibited irregular spike trains with frequency adaptation (Fig. 2A). The firing frequency at 100 pA/1000 ms depolarizing current step was higher in the left MePD cells of males when compared to females in diestrus, proestrus or estrus ($F_{3,95} = 4.65$, $p < 0.05$; Bonferroni *post hoc* test, $p < 0.05$ in all cases; Table 1). The same pattern was observed at 60 and 80 pA/1000 ms depolarizing current step and reflects a true difference in excitability of these cells modulated by sex. The AP of Class I neurons had an average sAHP time course and amplitude of 17.4 ± 0.01 ms and 12.48 ± 0.71 mV and fAHP time course and amplitude of 3.2 ± 0.01 ms and 21.15 ± 1.07 mV. Values were not different between sex and cerebral hemisphere ($F_{3,95} = 0.624$, $p = 0.60$; and $F_{3,95} = 0.41$, $p = 0.74$; $F_{3,95} = 1.04$, $p = 0.37$ and $F_{3,95} = 1.05$, $p = 0.37$, respectively; Table 1). The AP threshold, AP amplitude and HW were 29.11 ± 2.34 mV, 69.27 ± 1.69 mV and 2.79 ± 0.07 ms, respectively (Table 1).

Class II neurons exhibit full spike-frequency adaptation

MePD Class II neurons fired at most one or two AP followed by full adaptation in response to a stimulus of constant intensity with no SFA ratio (Fig. 2B). Data were obtained from the MePD of males (32 neurons) and females in diestrus (36 neurons), proestrus (31 neurons) or estrus (40 neurons).

Class II neurons typically had an average V_{rest} of -49.83 ± 0.46 mV, R_{in} of 423.46 ± 5.70 M Ω , τ of 23.87 ± 0.88 ms, and C_m of 59.36 ± 1.66 pF. No statistically significant differences were observed for these parameters between sex and cerebral hemisphere ($F_{3,131} = 0.38$, $p = 0.76$; $F_{3,131} = 0.78$, $p = 0.50$; $F_{3,131} = 0.55$, $p = 0.64$; $F_{3,131} = 2.01$, $p = 0.11$, respectively; Table 1). Class II neurons had small hyperpolarization-activated voltage SAG (Table 1). The rebound spikes after the hyperpolarizing current step were observed in about 83% of the cells (Fig. 2B). Under depolarizing current steps from 20 pA to 100 pA, neurons exhibited one or two AP with full spike frequency adaptation (Fig. 2B).

The AP of Class II neurons had a significantly larger sAHP time course when compared to Class I neurons ($t_{138} = 4.35$, $p < 0.05$; Table 1 and Figure 2B'). However, the average of fAHP time course (4.3 ± 0.01 ms) and amplitude (20.56 ± 0.87 mV) were similar to Class I

neurons ($t_{138} = 0.91$, $p > 0.05$ and $t_{138} = 1.06$, $p > 0.05$, respectively; Table 1). Finally, the AP threshold, AP amplitude and HW were similar to Class I neurons (Table 1). Thus, the sAHP and the AP frequency adaptation are the main parameters that differentiate the two classes of neurons registered.

That is, we described the electrophysiological features of the two coexisting cell subpopulations in the MePD. Only Class I neurons have intrinsic properties influence by sex differences and hemispheric lateralization, leading to an increased firing frequency in left MePD neurons of males when compare to the cycling females.

Morphological characteristics of MePD neurons

The biocytin-filled neurons in males (11 neurons), diestrus (11 neurons), proestrus (8 neurons), or estrus females (8 neurons) had clear morphological characteristics of two different MePD subpopulations of cells. Based on the cell body shape and the number of primary dendrites, they were classified as bitufted or stellate cells, consistent with previous Golgi studies in adult Wistar rats (Dall'Oglio et al., 2008; de Castilhos et al., 2008; Marcuzzo et al., 2007; Rasia-Filho et al., 1999; Rasia-Filho et al., 2004).

Based on the intrinsic membrane properties, 18 neurons visualized under confocal microscopy were classified as Class I and 20 as Class II. Interestingly, most Class I neurons were bitufted cells (16 out of 18 neurons; Fig. 2E), with two primary dendrites arising from opposite poles of a fusiform cell body (Fig. 2C). Most Class II neurons were stellate cells (17 out of 20 neurons; Fig. 2F), with three or more primary dendrites and variable cell body shapes (Fig. 2D). Both cell types had dendritic spines with various shapes and homogeneous distribution from proximal to distal branches (Fig. 2C',D'). Morphological features of the two cell subpopulations described here were not affected by brain hemisphere, i.e., Class I and II neurons were observed equally in both MePD sides.

Afterwards, we further investigated whether the sexual dimorphism and hemispheric lateralization could influence the excitatory and inhibitory synaptic transmission onto MePD neurons.

Sex differences and lateralization on the excitatory input to MePD neurons

Neurons were randomly recorded, independent of the neuronal subpopulation, from the right and left MePD in males (22 and 28 neurons) and females in diestrus (24 and 22 neurons), proestrus (27 and 31 neurons) or estrus (22 and 27 neurons), respectively. Fig. 3A,B show the location and distribution of the recorded neurons in the MePD of all studied groups.

Representative traces of sEPSC and mEPSC for males and cycling females are shown in Fig. 3C-F. Notably, the amplitude of sEPSC in the MePD cells was significantly smaller in the right and left hemispheres of females in proestrus and estrus when compared to males and females in diestrus ($F_{3,98} = 58.57$, $p < 0.05$; Bonferroni *post hoc* test $p < 0.001$ in all cases; Table 2). Cumulative probability plots and Kolmogorov-Smirnov statistical analysis further confirmed the reduction in the sEPSC amplitude in the MePD neurons from females in both proestrus and estrus ($p < 0.001$; Fig. 3G,I). In addition, the sEPSC frequency in MePD neurons was higher in males in the left MePD when compared to females in the three phases of the estrous cycle ($F_{3,98} = 6.75$, $p < 0.05$; Bonferroni *post hoc* test, $p < 0.05$ in all cases; Table 2). Cumulative probability plots and Kolmogorov-Smirnov statistical analysis further confirmed the higher sEPSC frequency in neurons from males than in cycling females in the left MePD ($p < 0.001$; Fig. 3H,J). No statistically significant difference in the sEPSC frequency was found in right MePD neurons between groups ($F_{3,98} = 0.23$, $p = 0.87$).

In contrast to sEPSC, no statistically significant differences between groups or brain hemisphere were found for the mEPSC amplitude ($F_{3,98} = 1.14$, $p = 0.06$) or frequency ($F_{3,98} = 1.11$, $p = 0.13$) in the MePD neurons (Table 2). Cumulative probability plots and Kolmogorov-Smirnov statistical analysis further confirmed these results ($p > 0.05$ in all cases; Fig. 3K-N). The comparative plots of sEPSC and mEPSC amplitude and frequency are shown in Fig. 3O-R.

The sEPSC decay time constant in MePD cells from males and females in diestrus were longer than females in proestrus or estrus ($F_{3,98} = 66.96$, $p < 0.05$; Bonferroni *post hoc* test, $p = 0.004$ and $p = 0.01$, respectively), with no effect of hemispheric lateralization ($F_{3,98} = 3.48$, $p = 0.06$) (Table 2 and Fig. 4A,I). Furthermore, the sEPSC rise time 10-90% in the left MePD neurons from males was significantly longer than females along the three phases of the estrous cycle ($F_{3,98} = 9.51$, $p < 0.05$; Bonferroni *post hoc* test, $p < 0.05$ in all cases; Table 2 and Fig. 4B,I). No such difference was found in the right MePD ($F_{3,98} = 1.08$, $p = 0.35$). Different from sEPSC, no statistically significant differences between groups or brain hemisphere were found

for the mEPSC decay time constant ($F_{3,98} = 1.23$, $p = 0.10$) or rise time 10-90% ($F_{3,98} = 1.55$, $p = 0.20$) in the MePD neurons (Table 2 and Fig. 4C,D,J).

Altogether, these data indicate that MePD neurons of males receive more excitatory synaptic input than females in diestrus, proestrus and estrus, depending on the brain hemisphere; and females in diestrus receive a higher magnitude of excitatory synaptic inputs compared to females in proestrus or estrus.

Sex differences and lateralization on the inhibitory input to MePD neurons

Neurons were recorded randomly, independent of the neuronal subpopulation, from the right and left MePD in males (21 and 20 neurons) and females in diestrus (23 and 22 neurons), proestrus (24 and 26 neurons) or estrus (22 and 24 neurons), respectively. Fig. 5A,B show the location and distribution of the recorded neurons in the MePD of all studied groups.

First, we compared the kinetic properties of sIPSC and mIPSC onto MePD neurons. The sIPSC decay time constant ($F_{3,83} = 1.10$, $p = 0.35$) and the rise time 10-90% ($F_{3,83} = 0.50$, $p = 0.68$; Table 3 and Fig. 4E,F,K) in MePD cells were similar in all groups. On the other hand, both the mIPSC decay time constant and the rise time 10-90% in the MePD cells from females in proestrus were shorter than in males and females in diestrus or estrus ($F_{3,83} = 16.18$, $p < 0.05$; and $F_{3,83} = 13.81$; $p < 0.05$, respectively; Bonferroni *post hoc* test $p < 0.001$ in all cases). No statistically significant effect of hemispheric lateralization was observed ($F_{3,83} = 0.14$, $p = 0.70$; and $F_{3,83} = 2.98$; $p = 0.06$, respectively) (Table 3 and Fig. 4G,H,L).

Representative traces of sIPSC and mIPSC for males and cycling females are shown in Fig. 5C-F. The sIPSC amplitude in the MePD cells was significantly smaller in males and in females in diestrus and estrus when compared to females in proestrus ($F_{3,83} = 128.24$, $p < 0.05$; Bonferroni *post hoc* test $p < 0.001$ in all cases), with no statistically significant effect of hemispheric lateralization ($F_{3,83} = 2.70$, $p = 0.10$; Table 3). Cumulative probability plots and Kolmogorov-Smirnov statistical analysis further confirmed these results ($p < 0.001$; Fig. 5G,I). In addition, the sIPSC frequency in the MePD neurons from the right hemisphere was significantly lower in males when compared to females in the three phases of the estrous cycle ($F_{3,83} = 6.61$, $p < 0.05$; Bonferroni *post hoc* test $p < 0.001$ in all cases; Table 3). In contrast to the right MePD, the average sIPSC frequency in the left MePD neurons was lower in females in estrus and diestrus when compared to males and females in proestrus ($F_{3,83} = 14.30$, $p < 0.05$;

Bonferroni *post hoc* test $p < 0.001$ in all cases; Table 3). Cumulative probability plots and Kolmogorov-Smirnov statistical analysis further confirmed these data ($p < 0.001$; Fig. 5H,J).

No statistically significant differences were found in the mIPSC amplitude ($F_{3,83} = 1.86$, $p = 0.06$; Table 3) or frequency ($F_{3,83} = 1.51$, $p = 0.06$; Table 3) in the MePD neurons between groups. Cumulative probability plots and Kolmogorov-Smirnov statistical analysis further confirmed these results ($p > 0.05$; Fig. 5K-N). The comparative plots of sIPSC and mIPSC amplitude and frequency are shown in Fig. 5O-R.

Altogether, these data indicate that the MePD neurons in males receive less inhibitory synaptic input than females, depending on the brain hemisphere, whereas females in proestrus receive a higher magnitude of inhibitory input compared to males and females in diestrus or estrus.

Discussion

Our results demonstrate (1) the presence of two coexisting subpopulations of spiny neurons in the MePD of adult male and female Wistar rats. These neurons were identified as Class I, predominantly bitufted-shaped cells exhibiting irregular spikes with frequency adaptation, and Class II neurons, predominantly stellate-shaped cells exhibiting one to two AP with full spike-frequency adaptation. (2) Both MePD neuronal subpopulations had electrophysiological features affected by sex and estrous cycle. The Class I neurons was also affected by hemispheric lateralization as evidenced by the higher firing frequency of left MePD neurons in males than in cycling females. (3) Furthermore, excitatory and inhibitory inputs onto MePD cells were modulated by sex, estrous cycle, and hemispheric lateralization. There is an overall increment in the excitatory input onto MePD neurons of males compared to cycling females and, between estrous phases, in diestrus compared to proestrus or estrus. On the other hand, there is an increase in the inhibitory input onto MePD neurons of females in proestrus compared to males and females in diestrus or estrus. These results depend on the hemisphere, with some findings observed in both sides or rather in just one of them. Taking together, these novel data indicate that the coexisting subpopulations of MePD neurons have electrophysiological properties that are sexually dimorphic, modulated by changes in the ovarian gonadal steroid circulating levels, and the excitatory and inhibitory synaptic inputs are

different between sexes and brain hemispheres in this subcortical area relevant for reproduction.

Two coexisting subpopulations of spiny neurons in the rat MePD

We identified MePD neurons in adult male and female rats with two main differences in spike frequency patterns during depolarizing current steps. That is, Class I neurons exhibited irregular spikes with frequency adaptation and Class II had full spike-frequency adaptation. Class II neurons had longer sAHP time course than Class I neurons and, consequently, tend to fire one or two AP and present full spike-frequency adaptation. The spike frequency adaptation could be the reflex of the intrinsic neuronal membrane properties or a result from synaptic input to the cell (Peron and Gabbiani, 2009). Since the sAHP is one of the membrane properties that can influence spike frequency and is considered an index of neuronal excitability (Sah, 1996), a potential mechanism responsible for sAHP differences could be related to variability in expression and distribution of functional sAHP channels in these two classes of cells. However, there is no evidence to support that the functional sAHP channels are uniformly distributed over the membrane of MePD neurons. In addition, the sAHP can shape temporal integration of synaptic inputs by shunting excitatory postsynaptic potentials (Sah and Bekkers, 1996). This shunting mechanism could be attributed to the Ca^{+2} influx through the NMDA receptors and voltage-gated Ca^{+2} channels that would activate sAHP channels, hyperpolarizing the membrane potential that facilitates the voltage-dependent Mg^{+2} re-block of the NMDA receptors, consequently reducing temporal summation during a period of intense synaptic events (Wu et al., 2004). Therefore, we cannot rule out the influence of different patterns of synaptic stimuli on these neuronal responses. Indeed, we observed that Class I neurons from the left MePD exhibited higher firing rate in males compared to females. Interestingly, the frequency of sEPSC onto neurons from the left MePD was also higher in males compared to females. Our results could contribute for future studies to investigate whether the increased excitatory synaptic tone onto the MePD of males could lead the significant increase in firing rate in Class I neurons, since the passive membrane properties of these cells were similar for both sex (Table1). In addition, both classes of neurons were found in the four experimental groups, i.e., males and females along the three phases of the estrous cycle. These data suggest that the identification of two subpopulations of MePD neurons

represent a constitutive feature of the MePD rather than just a finding related to a functional characteristic restricted to one sex.

Both classes of MePD neurons had hyperpolarization activated depolarizing SAG and the rebound depolarization following hyperpolarizing pulses. These two features were reported previously for the MeA neurons of mice (Bian, 2013; Carney et al., 2010; Keshavarzi et al., 2014). Class I and Class II neurons typically had a high R_{in} and hyperpolarization-activated voltage SAG, suggestive of the presence of I_h current in these cells (Bian et al., 2008; Keshavarzi et al., 2014). In addition, the rebound depolarization can provide to the cells the capacity to regulate their firing pattern by generating spike bursts, which increase the rate and duration of spike output, and by regulating the first spike latency and precision (Kepecs and Lisman, 2003; Molineux et al., 2008; Sangrey and Jaeger, 2010). The biophysical mechanisms of spike generation enable individual neurons to encode different inputs into distinct spike patterns (Kepecs and Lisman, 2003), shaping the information transferred between pre- and postsynaptic neurons. A period of inhibitory input, at one or multiple sites, results in a postsynaptic firing that most often occurs through a rebound depolarization (Engbers et al., 2011; Pedroarena, 2010; Sangrey and Jaeger, 2010). The neuronal firing pattern will depend on the magnitude of the preceding period of inhibition (Sangrey and Jaeger, 2010). The ion channel mechanisms underlying the neural coding through rebound responses is not fully identified and the role of rebound depolarization in the MePD neurons in rats and mice remains unclear at this point.

There are some membrane properties of MePD neurons of rats that differ from mice. First, most Class I and II MePD neurons exhibited V_{rest} near -50 mV and the input resistance of approximately 420 M Ω in both males and female Wistar rats. On the other hand, MePD neurons from male mice exhibited $V_{rest} \sim 70$ mV and ~ 700 M Ω or 260 M Ω when recorded at the same experimental condition (Bian, 2013). These differences could be attributed to neurotransmitter release, receptor expression or intrinsic membrane properties of different neuronal subpopulations between species (Pardo-Bellver et al., 2012). Second, we did not find cells with characteristics of GABAergic interneurons in the MePD of rats whereas a previous study of MeA neurons of GAD67-GFP mice demonstrated the presence of this neuronal type in the most medial part of the MeA (Bian, 2013). This medial area includes the cell sparse region where axons of the vomeronasal pathway pass through close to the optic tract and was formerly

named as “molecular layer” in rats (Nishizuka and Arai, 1983a; Nishizuka and Arai, 1983b). Here, we recorded cells from MePD avoiding the ultimate borders of this subnucleus (de Olmos *et al.*, 2004). Third, the two subpopulations of adult rat MePD neurons were multipolar spiny cells, confirming previous morphological data (Cooke *et al.*, 2007; Dall’Oglio *et al.*, 2008; Marcuzzo *et al.*, 2007; Rasia-Filho *et al.*, 1999; Rasia-Filho *et al.*, 2004; Zancan *et al.*, 2017; Zancan *et al.*, 2018). Different from the MeA of mice, we have not observed pyramidal (Niimi *et al.*, 2012) or pyramidal-like neurons (Bian, 2013) in the MePD of rats (Marcuzzo *et al.*, 2007). Our sampled biocytin-filled neurons do not have morphological features consisting of a triangular cell body shape, two basal dendrites, and an evident apical dendrite (DeFelipe and Fariñas, 1992) nor electrophysiological characteristics of regular spiking or intrinsic bursting pyramidal cells (Le Bé *et al.*, 2007; McCormick *et al.*, 1985). On the contrary, most of Class I neurons were predominantly bitufted-shaped cells while Class II neurons were predominantly stellated-shaped cells.

Nevertheless, previous reports indicate that the rat and mice MePD neurons can be inhibitory cells (Choi *et al.*, 2005; Swanson and Petrovich, 1998) expressing calbindin, nitric oxide synthase, Forkhead box transcription factor or somatostatin (Mugnaini and Oertel, 1985; Carney *et al.*, 2010; Ruiz-Reig *et al.*, 2018). These neurons have distinct characteristics from most of the posteroventral subdivision of the MeA, which express vGlut2 and are glutamatergic excitatory projection neurons (Bian *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2005; Keshavarzi *et al.*, 2015; Ruiz-Reig *et al.*, 2018). Although it is currently not clear whether Class I or Class II MePD neurons are used for a specific functional role in the rat social behavior network, it is conceivable to propose that their dendritic structure can provide different biophysical and integrative properties for synaptic inputs (Dall’Oglio *et al.*, 2008). Further studies can benefit from the present data to demonstrate the impact of the olfactory/vomer nasal afferences on different dendritic locations as well as on differently shaped spines on the firing activity of these coexisting MePD cells in both sexes.

Sexual dimorphism, estrous cycle, and hemispheric lateralization influence synaptic transmission in the MePD

At adulthood, males and females in diestrus have more proximal dendritic spines than females in proestrus and estrus (Rasia-Filho *et al.*, 2004). Interestingly, we found that the

MePD neurons of males and females in diestrus receive higher magnitude of excitatory synaptic inputs compared to proestrus and estrus in both hemispheres. On the other hand, the density of dendritic spines decreases at the peak of circulating estrogen and progesterone during the proestrus (Rasia-Filho et al., 2004; Rasia-Filho et al., 2012a; Rasia-Filho et al., 2012b). Estrogen reduces the axonal excitability that reaches the MeA of female rats (Yoshida et al., 1994). As spines are mostly postsynaptic sites, it is highly likely that part of the incoming information to the MePD converge and act upon dendritic spines in a quantitatively different manner depending on the sex and the hormonal status of the animal (Brusco et al., 2014; Rasia-Filho et al., 2004).

Furthermore, sex differences in excitatory inputs to MePD neurons could be due to distinct sources and number of afferent pathways coming to this subnucleus and/or direct effects of different levels of androgen and estradiol/progesterone (Cooke et al., 2007; Rasia-Filho et al., 2004). In this regard, glutamatergic inputs to MePD neurons coming from AOB mitral cells (Quaglino et al., 1999; Scalia and Winans, 1975) and from cortical amygdala (Mugnaini and Oertel, 1985) are higher in males than in females (Pérez-Laso et al., 1997; Vinader-Caerols et al., 1998). We also demonstrated that sexual dimorphism affects significantly the sEPSC kinetics of MePD neurons, such as the decay and rise time. That is, the excitatory responses of MePD neurons were slower in males than females. Sex steroid-mediated signaling influence the synaptic transmission strength and kinetics (Hansberg-Pastor et al., 2015; Sellers et al., 2015), likely modulating the afferent information to the MePD neurons (Ervin et al., 2015). Different locations and subtle alterations in the glutamate receptor subunits or in the kinetics of the glutamate transporters might change sEPSC kinetics (Wall et al., 2002). Dendritic spines in the MePD are immunoreactive to glutamate receptors AMPA and NMDA (Dalpian et al., 2015). Thus, it likely that dendritic spines participate in the differences of excitatory inputs recorded in the adult male MePD. These data reinforce the plastic changes and remodeling of dendritic spines and synaptic processing in the MePD after puberty in rats (Cooke and Woolley, 2009; Zancan et al., 2018).

On the other hand, the mEPSC on MePD neurons of prepubertal rats has a higher frequency on the left, but not on the right, hemisphere in males when compared to females (Cooke and Woolley, 2005). We did not find sex or hemispheric lateralization effects on mEPSC properties at adulthood. Since spontaneous synaptic currents represent the synaptic

function in neural network and miniature synaptic currents reflect quantal transmitter release (Tian et al., 2012), our results suggest the existence of differences at the circuit-level rather than changes to receptors or release machinery at excitatory synapses (Yamasaki et al., 2006). In fact, there are growing evidences that spontaneous and miniature neurotransmitter releases are controlled by different intrapresynaptic mechanisms (Wakita et al., 2015). Therefore, local excitatory neurotransmitter release or synaptic strength on each site seems to be unaltered in the adult MePD.

According to our findings, the stronger excitatory input onto MePD neurons in males and females in diestrus will modulate the neural coding and information output, but that will depend on the spatial-temporal strength of the inhibitory input onto MePD neurons. We found that in males, the MePD neurons exhibited a lower sIPSC frequency in the right hemisphere compared to females in diestrus and estrus, while the inhibition prevails during proestrus. In addition, in proestrus, the MePD neurons receive more inhibitory inputs at the same time that the magnitude of excitatory inputs reduces. The amplitude of sIPSC on MePD neurons was significant smaller in males and in females along the diestrus and estrus phases when compared to the proestrus phase in both hemispheres. Different from sIPSC, we did not find sex or hemispheric lateralization effects on mIPSC amplitude or frequency in the MePD neurons, again suggesting differences at the circuit-level similar to excitatory inputs. However, faster decay and rise time of the mIPSC were observed on neurons in the MePD of females in proestrus. These changes in kinetics suggest an increase of inhibitory synapses close to the soma or a loss of more distal inhibitory synapses (Kobayashi and Buckmaster, 2003; Shao and Dudek, 2005). The MePD of both hemispheres in adult male and female rats receive inhibitory inputs at multisynaptic contacts (Brusco et al., 2014). Inhibitory synapses, when targeting dendrites, tend to generate IPSC with distinct kinetics and dynamics than perisomatic IPSC. That is, the dendritic IPSC usually have a slower decay and rise time than the perisomatic IPSC (Ropert et al., 1990). The faster kinetics of mIPSC on MePD neurons of females in proestrus found here may also result from a shift in the GABA_A receptor subunits, changes in GABA transporters kinetics (Calcagnotto et al., 2002) or synaptic compartmentalization along the neuronal membrane (Kobayashi and Buckmaster, 2003). Supporting these possibilities, proestrus females have more somatic spines (Zancan et al., 2015), which are assumed to be

inhibitory (adapting data reviewed by (Kubota et al., 2016), and more direct dendritic shaft synapses with symmetric GABA-immunoreactive terminals in the MePD (Brusco et al., 2014).

Previous studies had demonstrated that morphology and function of MePD is lateralized (Arpini et al., 2010; Brusco et al., 2014; Cooke et al., 2007). Here we have found that the hemispheric lateralization influenced the excitatory with no effect over the inhibitory inputs. That is, the left MePD neurons had a higher frequency of sEPSC in adult males when compared to cycling females as we have mentioned above. One possible reason is that the left MeA would be specialized for chemosensory and/or steroid negative feedback regulation of neuroendocrine secretion (Cooke and Woolley, 2005).

Our electrophysiological data provide additional data to investigate the role of excitatory and inhibitory inputs to the right and left MePD of sexually mature, adult rats. The association between neuronal morphology, intrinsic properties, gonadal hormones modulation of synaptic processing, and connectivity will be relevant to understand the complex spatiotemporal synaptic elaboration within the circuitries that modulate chemosensory processing, emotion, and behavior display in male and female rats. Interestingly, sex-related hemispheric lateralization of human amygdala volume and function also exist in humans (Cahill, 2006; Kim et al., 2012). Human MeA neurons also exhibit complex dendritic spines and evidence for an elaborated connectivity, including multisynaptic spines contacting both excitatory and inhibitory terminals (Zancan et al., 2015).

Working hypothesis for sex and cycle estrous-related differences in synaptic inputs to MePD neurons

In males, the MePD activation during mating most likely disinhibits brain areas involved in sexual behavior and induces the sequential occurrence of perception of female odors, intromission, ejaculation, and sexual satiety (Coolen *et al.*, 1997; Rasia-Filho *et al.*, 2012*b*, 2012*a*; Petrulis, 2013). Here, we demonstrated that the two classes of MePD inhibitory neurons in males received predominant excitatory inputs. Previous studies had shown that the MePD neurons project to BNST, the main efferent pathway in males (de Olmos et al., 2004; Choi et al., 2005; Pardo-Bellver et al., 2012) that contains mostly GABAergic cells (Poulin et al., 2009; Yamamoto et al., 2018) and send projections to the hypothalamus (Dong et al., 2001). Therefore, the MePD neurons could disinhibit the neuroendocrine and behavioral cell

columns of the hypothalamus via an indirect pathway, by inhibiting the BNST GABAergic cells.

In females, a dynamic elaboration of synaptic processing occurs in the MePD along the estrous cycle (Oro *et al.*, 1988; Lehmann and Erskine, 2005; de Castilhos *et al.*, 2008; Zancan *et al.*, 2015). Since our result demonstrated that the inhibitory inputs are predominant onto inhibitory MePD neurons in the proestrus phase, we hypothesize that the morphological and functional organization of MePD neurons result in disinhibition of hypothalamic circuits via a direct pathway, leading to neuroendocrine secretion, ovulation, and sexual receptivity (Carney *et al.*, 2010; Simerly, 2004). On the other hand, during diestrus phase, the resultant excitation of inhibitory MePD neurons could induce the inhibition of hypothalamic neurons.

Taken altogether, we hypothesized that the efferent information of MePD would be sent to the hypothalamus by distinct pathways in a sex-dependent manner, probably via an indirect pathway in males and a direct pathway in females.

In conclusion, the adult rat shows sexual dimorphism, estrous cycle, and hemispheric lateralization features that determine synaptic inputs and electrophysiological features of two coexisting subpopulations of bitufted and stellate neurons in the MePD of males and cycling females. Our data indicate the influence of sexual dimorphism, estrous cycle and hemispheric lateralization at cellular and synaptic level in the adult rat MePD.

Methods

Ethical Approval

All efforts were made to minimize the number of animals studied and their suffering. All animal procedures were conducted in accordance with the international laws and guidelines for the care and use of laboratory animals (European Communities Council Directive of 24 November 1986, 86/609/EEC; NIH Publication No. 85–23, revised 1985, USA) and were approved by local Animal Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil (CEUA-UFRGS protocol no. 28885).

Animals

Adult Wistar rats (3 months old) were sourced from Central Institute for Experimental Animals (CREAL-UFRGS). Rats were housed in groups (up to 3 animals per standard cage of 41 x 34 x 16 cm) under standard laboratory conditions with free access to food and water, room temperature (RT) around 21°C, and light/dark cycle of 12 hours (lights on at 6:00). Virgin male (N = 33 and female (N = 105) animals were used. Daily vaginal smears were obtained during the morning along 2 consecutive weeks prior to the beginning of the experiment. The regularity of the estrous cycle was determined according to cytological criteria (Rasia-Filho et al., 2004). Only normally cycling females were included and studied in the diestrus, proestrus, and estrus phases (Zancan et al., 2015).

Slice preparation

Acute brain slices were prepared for physiological recordings as described previously (Cobos *et al.*, 2005; Vendramin Pasquetti *et al.*, 2017). Males and females were anesthetized with ketamine and xylazine (80 mg/kg and 10 mg/kg, i.p., respectively) and were quickly decapitated. The brains were rapidly removed and placed into ice-cold oxygenated slicing artificial CSF (sACSF) containing (in mM) 220 sucrose, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 1 CaCl₂, and 10 dextrose (295–305 mOsm, pH 7.4). The MePD was identified in coronal slices from 3.0 to 3.60 mm posterior to the bregma, taking the optic tract and the stria terminalis as anatomical references (Paxinos and Watson, 1998). Serial sections (300 µm thick) were cut using a vibrating microtome (VTS-1000; Leica, Germany) at 4°C oxygenated sACSF. The slices from the left and right hemispheres were separated and immediately transferred to a chamber to remain immersed in oxygenated normal recording ACSF (nACSF) consisting of (in mM): 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 1 CaCl₂, and 10 dextrose (295–305 mOsm, pH 7.4) (Cobos *et al.*, 2005; Vendramin Pasquetti *et al.*, 2017). The slices were bubbled with 95% O₂ / 5% CO₂ and maintained at 37°C for 45 min and, afterwards, at RT.

Electrophysiology

Each slice containing the MePD of either left or right hemispheres was moved to a recording chamber perfused at room temperature, oxygenated nACSF at a rate of 3 ml/min.

Whole-cell recordings were obtained from visually identified neurons in the MePD, using an infrared differential interference contrast (IR-DIC) video-microscopy system with a microscope (BX51WI, Olympus). To be considered, neurons must be located within the MePD, from its intermediate to lateral columns, avoiding ultimate medial, lateral and inferior borders (de Olmos et al., 2004). The medial “molecular layer,” which is a cell sparse region close to the optic tract, mainly formed by axons from the accessory olfactory pathway (Pro-Sistiaga et al., 2007; Scalia and Winans, 1975), was excluded from the recordings.

Patch electrodes (3–7 M Ω) were pulled from borosilicate glass capillary tubing (TW150-3, World Precision Instruments) using a computer-controlled micropipette puller (P-1000, Sutter Instrument) and fire polished.

Synaptic currents onto MePD neurons were recorded in whole-cell voltage-clamp and the series resistance and whole cell capacitance were continually monitored and compensated throughout the course of the experiment. Recordings were rejected if values of whole-cell access resistance changed by > 25% (or exceeded 20 M Ω). The sEPSC were recorded at -70 mV with an internal solution containing (in mM): 135 CsCl₂, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 NaATP, and 0.2 NaGTP (285–290 mOsm, pH 7.2). To isolate glutamatergic currents, slices were perfused with nACSF containing (-)-bicuculline methiodide (10 μ M; Sigma-Aldrich, 14343), a GABA_A receptor antagonist. The spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSC) were recorded at 0 mV with an internal solution containing (in mM) 117.5 Cs-Gluconate, 11 CsCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 11 EGTA, 2 Na₂ATP, 0.5 Na₂GTP, and 1.25 QX-314 (285–290 mOsm, pH 7.2). To isolate GABAergic currents, slices were further perfused with nACSF containing 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX, 20 μ M; Sigma-Aldrich, D0540) and D-(–)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (D-AP5, 50 μ M; Sigma-Aldrich, A5282), the non-NMDA and NMDA receptors antagonists, respectively. Both mEPSC and miniature IPSC (mIPSC) were recorded in nACSF containing the appropriate receptor antagonist plus tetrodotoxin (TTX, 1 μ M; Cayman Chemical, 14964). Intrinsic membrane properties were recorded in whole-cell current-clamp mode in other sets of cells from males and cycling females with an intracellular patch pipette solution containing (in mM) 120 K-gluconate, 10 KCl, 1 MgCl₂, 0.025 CaCl₂, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 2 Na₂-ATP, 0.2 Na₂-GTP, and 0.1 biocytin (0.25%; Sigma-Aldrich, B4261) (285–290 mOsm, pH 7.2). Firing properties were obtained ~3 min after obtaining whole-cell configuration. Membrane potential was adjusted to -65 mV by

passing a constant holding current, and 500 ms and 1000 ms current step injections were delivered in 20 pA increments at the range of -100 to +100 pA.

Voltage and current were recorded with a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices) and monitored with an oscilloscope and the pClamp 10.3 software (Molecular Devices). Whole-cell voltage-clamp data were low-pass filtered at 1 kHz and digitally sampled at 20 kHz using a Digidata 1440A (Molecular Devices).

Biocytin filling and morphological analysis

Neurons from both, left and right MePD of male and cycling females, were visualized using IR-DIC video-microscopy system and filled with biocytin during current-clamp recording to correlated the cell morphology, well described previously (Arpini et al., 2010; Brusco et al., 2010; Brusco et al., 2014; Dall'Oglio et al., 2008; de Castilhos et al., 2008; Hermel et al., 2006a; Hermel et al., 2006b; Rasia-Filho et al., 2004; Rasia-Filho et al., 2012b), with the intrinsic properties. At the end of each recording session, each slice with biocytin-filled neurons was fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4 °C. After a 3 x 10 min washes with 0.1 M phosphate buffer solution (PBS, pH 7.4), the slices were blocked in PBS containing 2% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100 for 1 hour at RT. Afterwards, the slices were incubated with streptavidin-conjugated AlexaFluor-488 (1:500; Thermo Fisher Scientific, S11223) (Morales et al., 2013) for 4 hours at RT. Each brain slice was mounted in slides with Fluoromount (Sigma-Aldrich, F4680) and coverslip and kept in the dark at 4-8 °C. About 24 h later, neurons were imaged using a confocal laser-scanning microscope (FV1000 Spectral, Olympus) with a planapochromatic 63×/1.4 water-immersion objective lens. Spectral detectors were adjusted to capture emission from lasers wavelength of 488 nm. The z-stack acquisition was performed at 0.1 µm using a resolution of 1024 x 1024 pixels with 4 times zooming (Brusco et al., 2010). For each slice, the biocytin-positive neuron was identified and z projections were collected sequentially to reconstruct and study the cellular morphology (da Silva et al., 2015). These images were three-dimensionally reconstructed using the Photoshop CS3 software (Adobe Systems).

Data Analysis

At least 100 individual events were manually selected for each cell to analyze the synaptic currents (EPSC or IPSC) (Cobos et al., 2005; Cubelos et al., 2010; Vendramin Pasquetti et al., 2017). The EPSC and IPSC frequency, amplitude, rise-time 10-90%, and decay-time constant were measured using Mini Analysis 6.0.7 (Synaptosoft Software).

Neurons were classified according to their specific intrinsic membrane properties. For this purpose, the following electrophysiological parameters were measured and compared between cell types: resting membrane potential (V_{rest}); input resistance (R_{in}); membrane time constant (τ); membrane capacitance (C_m); action potential (AP) threshold, amplitude, half-width (HW), and frequency; and fast and slow afterhyperpolarization (fAHP and sAHP, respectively). The fAHP and sAHP were measured on the first AP from multiple AP evoked by 1000 ms depolarization step. We also measured the rebound depolarization amplitude at hyperpolarized currents (SAG), and the spike frequency adaptation (SFA). The SAG amplitude was calculated from the voltage responses obtained after injecting a hyperpolarizing current (-100 pA along 1 s) between the potential at SAG peak and the potential at the steady state (Vandecasteele et al., 2011). The SFA was calculated using the formula: $SFA\ ratio = F_{init}/F_{final}$, where F_{init} is the initial instantaneous spike frequency (1/first interspike interval) and F_{final} is the instantaneous frequency calculated from the last interspike interval (1/last interspike interval) (Vandecasteele et al., 2011). These intrinsic membrane properties were analyzed using pClamp 10.3 software (Molecular Devices).

Results are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). The statistical tests were performed using the SPSS 22.0 program (IBM Software). Two-way analysis of variance (ANOVA) were used to analyze the results between different cells followed by the Bonferroni *post hoc* test. The independent variables sex (males and females in each estrous cycle phase) and cerebral hemisphere were used for the analysis of synaptic properties and intrinsic membrane properties of each cell type. The two-tailed Student's t-test was used to analyze the intrinsic membrane properties between different cell types. The Kolmogorov–Smirnov (KS) test was used to compare the cumulative distributions of amplitude and inter-event interval of postsynaptic currents between groups. Statistically significant differences were considered at $p < 0.05$.

Additional information**Data Availability**

All relevant data are available from the authors on reasonable request.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author Contributions

F.S.D.: conception and design of the work, acquisition and analysis of data, interpretation of results and wrote the paper.

A.A.R.F.: conception of the work, interpretation of results, wrote the paper and funding.

M.E.C.: conception and design of the work, acquisition and analysis of data, interpretation of results, wrote the paper and funding.

All authors approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

Grants from the Brazilian Agencies CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) to FSD, CNPq (Brazilian Ministry of Science Technology and Innovation) “RRID”:SCR_002876 no. 481992/2010-3 and 306594/2016-1 to AAR-F and no. 465671/2014-4 to MEC.

The authors thank to those colleagues from the Center of Microscopy and Microanalysis of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CMM-UFRGS) for skillful technical support.

References

- Adekunbi, D. A., Li, X. F., Lass, G., Shetty, K., Adegoke, O. A., Yeo, S. H., Colledge, W. H., Lightman, S. L. and O'Byrne, K. T.** (2018). Kisspeptin neurones in the posterodorsal medial amygdala modulate sexual partner preference and anxiety in male mice. *J. Neuroendocrinol.* **30**, 1-9.
- Arpini, M., Menezes, I. C., Dall'Oglio, A. and Rasia-Filho, A. A.** (2010). The density of Golgi-impregnated dendritic spines from adult rat posterodorsal medial amygdala neurons displays no evidence of hemispheric or dorsal/ventral differences. *Neurosci. Lett.* **469**, 209–13.
- Bian, X.** (2013). Physiological and morphological characterization of GABAergic neurons in the medial amygdala. *Brain Res.* **1509**, 8–19.
- Bian, X., Yanagawa, Y., Chen, W. R. and Luo, M.** (2008). Cortical-like functional organization of the pheromone-processing circuits in the medial amygdala. *J Neurophysiol* **99**, 77–86.
- Brusco, J., Dall'Oglio, A., Rocha, L. B., Rossi, M. A., Moreira, J. E. and Rasia-Filho, A. A.** (2010). Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial amygdala. *Neurosci. Lett.* **483**, 152–6.
- Brusco, J., Merlo, S., Ikeda, É. T., Petralia, R. S., Kachar, B., Rasia-Filho, A. A. and Moreira, J. E.** (2014). Inhibitory and multisynaptic spines, and hemispherical synaptic specialization in the posterodorsal medial amygdala of male and female rats. *J. Comp. Neurol.* **522**, 2075–88.
- Bupesh, M., Legaz, I., Abellán, A. and Medina, L.** (2011). Multiple telencephalic and extratelencephalic embryonic domains contribute neurons to the medial extended amygdala. *J. Comp. Neurol.* **519**, 1505–1525.
- Cahill, L.** (2006). Why sex matters for neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 477–484.
- Calcagnotto, M. E., Paredes, M. F. and Baraban, S. C.** (2002). Heterotopic neurons with altered inhibitory synaptic function in an animal model of malformation-associated epilepsy. *J. Neurosci.* **22**, 7596–605.
- Carney, R. S. E., Mangin, J.-M., Hayes, L., Mansfield, K., Sousa, V. H., Fishell, G., Machold, R. P., Ahn, S., Gallo, V. and Corbin, J. G.** (2010). Sonic hedgehog

expressing and responding cells generate neuronal diversity in the medial amygdala Sonic hedgehog expressing and responding cells generate neuronal diversity in the medial amygdala. *Neural Dev.* **14**.

- Cavalcante, J. C., Sita, L. V., Mascaro, M. B., Bittencourt, J. C. and Elias, C. F.** (2006). Distribution of urocortin 3 neurons innervating the ventral premammillary nucleus in the rat brain. *Brain Res.* **1089**, 116–25.
- Choi, G. B., Dong, H. W., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Swanson, L. W. and Anderson, D. J.** (2005). Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron* **46**, 647–660.
- Cobos, I., Calcagnotto, M. E., Vilaythong, A. J., Thwin, M. T., Noebels, J. L., Baraban, S. C. and Rubenstein, J. L. R.** (2005). Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat. Neurosci.* **8**, 1059–68.
- Cooke, B. M. and Woolley, C. S.** (2005). Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *J. Neurosci.* **25**, 10759–67.
- Cooke, B. M. and Woolley, C. S.** (2009). Effects of prepubertal gonadectomy on a male-typical behavior and excitatory synaptic transmission in the amygdala. *Dev. Neurobiol.* **69**, 141–52.
- Cooke, B. M., Stokas, M. R. and Woolley, C. S.** (2007). Morphological sex differences and laterality in the prepubertal medial amygdala. *J. Comp. Neurol.* **501**, 904–15.
- Coolen, L. M. and Wood, R. I.** (1999). Testosterone stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala in the control of male hamster sexual behavior: Redundancy without amplification. *Behav. Brain Res.* **98**, 143–153.
- Coolen, L. M., Peters, H. J. P. W. and Veening, J. G.** (1997). Distribution of Fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain. *Neuroscience* **77**, 1151–1161.
- Cubelos, B., Sebastián-Serrano, A., Beccari, L., Calcagnotto, M. E., Cisneros, E., Kim, S., Dopazo, A., Alvarez-Dolado, M., Redondo, J. M., Bovolenta, P., et al.** (2010). Cux1 and Cux2 regulate dendritic branching, spine morphology, and synapses of the upper layer neurons of the cortex. *Neuron* **66**, 523–535.
- da Silva, M. P., Merino, R. M., Mecawi, A. S., Moraes, D. J. and Varanda, W. A.** (2015).

In vitro differentiation between oxytocin- and vasopressin-secreting magnocellular neurons requires more than one experimental criterion. *Mol. Cell. Endocrinol.* **400**, 102–111.

Dall'Oglio, A., Gehlen, G., Achaval, M. and Rasia-Filho, A. A. (2008). Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: Further data based on the Golgi method. *Neurosci. Lett.* **430**, 151–156.

Dalpian, F., Brusco, J., Calcagnotto, M. E., Moreira, J. E. and Rasia-Filho, A. A. (2015). Distribution of glutamate receptors in the posterodorsal medial amygdala of adult male rats. *Histol. Histopathol.* **30**, 1303–11.

de Castilhos, J., Forti, C. D., Achaval, M. and Rasia-Filho, A. A. (2008). Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: A Golgi study. *Brain Res.* **1240**, 73–81.

de Olmos, J., Beltramino, C.A., Alheid, G. F. (2004). Amygdala and extended amygdala of the rat: cytoarchitectonical, fibroarchitectonical and chemoarchitectonical survey. In *The Rat Nervous System* (ed. G. Paxinos), pp. 509–603. Amsterdam: Elsevier Academic Press.

de Vries, G. J. and Simerly, R. B. (2002). Anatomy, Development, and Function of Sexually Dimorphic Neural Circuits in the Mammalian Brain. In *Hormones, Brain and Behavior* (ed. D.W. Pfaff, A.P. Arnold, A.M. Etgen, Fahrbach, S.E., Rubin, R. T.), pp. 137–191. San Diego: Academic Press.

DeFelipe, J. and Fariñas, I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog. Neurobiol.* **39**, 563–607.

Dong, H. W., Petrovich, G. D. and Swanson, L. W. (2001). Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res. Rev.* **38**, 192–246.

Engbers, J. D. T., Anderson, D., Tadayonnejad, R., Mehaffey, W. H., Molineux, M. L. and Turner, R. W. (2011). Distinct roles for I(T) and I(H) in controlling the frequency and timing of rebound spike responses. *J. Physiol.* **589**, 5391–413.

Ervin, K. S. J., Lymer, J. M., Matta, R., Clipperton-Allen, A. E., Kavaliers, M. and Choleris, E. (2015). Estrogen involvement in social behavior in rodents: Rapid and long-term actions. *Horm. Behav.* **74**, 53–76.

Feldman, M. L. (1984). Morphology of the neocortical pyramidal neuron. In *Cerebral Cortex*

(ed. A. Peters and E. G. Jones), pp. 123–200. New York: Plenum.

- Frankiensztajn, L. M., Gur-Pollack, R. and Wagner, S.** (2018). A combinatorial modulation of synaptic plasticity in the rat medial amygdala by oxytocin, urocortin3 and estrogen. *Psychoneuroendocrinology*. **92**, 95-102.
- García-López, M., Abellán, A., Legaz, I., Rubenstein, J. L. R., Puellas, L. and Medina, L.** (2008). Histogenetic compartments of the mouse centromedial and extended amygdala based on gene expression patterns during development. *J. Comp. Neurol.* **506**, 46–74.
- Garelick, T. and Swann, J.** (2014). Testosterone regulates the density of dendritic spines in the male preoptic area. *Horm. Behav.* **65**, 249–253.
- Gréco, B., Edwards, D. A., Michael, R. P. and Clancy, A. N.** (1998). Androgen receptors and estrogen receptors are colocalized in male rat hypothalamic and limbic neurons that express Fos immunoreactivity induced by mating. *Neuroendocrinology* **67**, 18–28.
- Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Piña-Medina, A. G. and Camacho-Arroyo, I.** (2015). Sex hormones regulate cytoskeletal proteins involved in brain plasticity. *Front. Psychiatry* **6**,.
- Hermel, E. E. S., Faccioni-Heuser, M. C., Marcuzzo, S., Rasia-Filho, A. A. and Achaval, M.** (2006a). Ultrastructural features of neurons and synaptic contacts in the posterodorsal medial amygdala of adult male rats. *J. Anat.* **208**, 565–575.
- Hermel, E. E. S., Ilha, J., Xavier, L. L., Rasia-Filho, A. A. and Achaval, M.** (2006b). Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. *Neurosci. Lett.* **405**, 153–8.
- Hirsch, M. M., Brusco, J., Vaccaro, T., Margis, R., Moreira, J. E., Gottfried, C. and Rasia-Filho, A. A.** (2018). Sex Differences and Estrous Cycle Changes in Synaptic Plasticity-related microRNA in the Rat Medial Amygdala. *Neuroscience* **379**, 405–414.
- Kang, N., Baum, M. J. and Cherry, J. A.** (2009). A direct main olfactory bulb projection to the “vomeronasal” amygdala in female mice selectively responds to volatile pheromones from males. *Eur. J. Neurosci.* **29**, 624–34.
- Kang, N., McCarthy, E. A., Cherry, J. A. and Baum, M. J.** (2011). A sex comparison of the anatomy and function of the main olfactory bulb-medial amygdala projection in mice. *Neuroscience* **172**, 196–204.
- Kepecs, A. and Lisman, J.** (2003). Information encoding and computation with spikes and

- bursts. *Netw. Comput. Neural Syst.* **14**, 103–118.
- Keshavarzi, S., Sullivan, R. K. P., Ianno, D. J. and Sah, P.** (2014). Functional Properties and Projections of Neurons in the Medial Amygdala. *J. Neurosci.* **34**, 8699–8715.
- Keshavarzi, S., Power, J. M., Albers, E. H. H., Sullivan, R. K. S. and Sah, P.** (2015). Dendritic Organization of Olfactory Inputs to Medial Amygdala Neurons. *J. Neurosci.* **35**, 13020–8.
- Kim, H. J., Kim, N., Kim, S., Hong, S., Park, K., Lim, S., Park, J.-M., Na, B., Chae, Y., Lee, J., et al.** (2012). Sex differences in amygdala subregions: evidence from subregional shape analysis. *Neuroimage* **60**, 2054–61.
- Kobayashi, M. and Buckmaster, P. S.** (2003). Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* **23**, 2440–52.
- Kubota, Y., Karube, F., Nomura, M. and Kawaguchi, Y.** (2016). The Diversity of Cortical Inhibitory Synapses. *Front. Neural Circuits* **10**, 27.
- Le Bé, J.-V., Silberberg, G., Wang, Y. and Markram, H.** (2007). Morphological, electrophysiological, and synaptic properties of corticocallosal pyramidal cells in the neonatal rat neocortex. *Cereb. Cortex* **17**, 2204–13.
- Lehmann, M. L. and Erskine, M. S.** (2005). Glutamatergic stimulation of the medial amygdala induces steroid dependent c-fos expression within forebrain nuclei responsive to mating stimulation. *Neuroscience* **136**, 55–64.
- Marcuzzo, S., Dall’Oglio, A., Ribeiro, M. F. M., Achaval, M. and Rasia-Filho, A. A.** (2007). Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. *Neurosci. Lett.* **424**, 16–21.
- McCormick, D. A., Connors, B. W., Lighthall, J. W. and Prince, D. A.** (1985). Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J. Neurophysiol.* **54**, 782–806.
- Molineux, M. L., Mehaffey, W. H., Tadayonnejad, R., Anderson, D., Tennent, A. F. and Turner, R. W.** (2008). Ionic Factors Governing Rebound Burst Phenotype in Rat Deep Cerebellar Neurons. *J. Neurophysiol.* **100**, 2684–2701.
- Moraes, D.J., da Silva, M.P., Bonagamba, L.G., Mecawi, A.S., Zoccal, D.B., Antunes-Rodrigues, J., Varanda, W.A., Machado, B.H.** (2013). Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by the respiratory

- network in rats. *J Neurosci.* **33**, 19223-37.
- Morris, J. A., Jordan, C. L., King, Z. A., Northcutt, K. V. and Breedlove, S. M.** (2008). Sexual dimorphism and steroid responsiveness of the posterodorsal medial amygdala in adult mice. *Brain Res.* **1190**, 115–121.
- Mugnaini E., Oertel, W. H.** (1985). An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. In *Handbook of chemical neuroanatomy* (ed. A. Bjorklund and T. Hokfelt), pp. 436–595. Amsterdam: Elsevier.
- Newman, S.** (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. *Ann NY Acad Sci* **877**, 242–257.
- Niimi, K., Horie, S., Yokosuka, M., Kawakami-Mori, F., Tanaka, K., Fukayama, H. and Sahara, Y.** (2012). Heterogeneous electrophysiological and morphological properties of neurons in the mouse medial amygdala in vitro. *Brain Res.* **1480**, 41–52.
- Nishizuka, M. and Arai, Y.** (1983a). Regional difference in sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *Exp. brain Res.* **49**, 462–5.
- Nishizuka, M. and Arai, Y.** (1983b). Male-female differences in the intra-amygdaloid input to the medial amygdala. *Exp. brain Res.* **52**, 328–32.
- Oro, A. E., Simerly, R. B. and Swanson, L. W.** (1988). Estrous cycle variations in levels of cholecystokinin immunoreactivity within cells of three interconnected sexually dimorphic forebrain nuclei. Evidence for a regulatory role for estrogen. *Neuroendocrinology* **47**, 225–35.
- Pardo-Bellver, C., Cádiz-Moretti, B., Novejarque, A., Martínez-García, F. and Lanuza, E.** (2012). Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice. *Front. Neuroanat.* **6**, 1–26.
- Paxinos, G., Watson, C.** (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pedroarena, C. M.** (2010). Mechanisms supporting transfer of inhibitory signals into the spike output of spontaneously firing cerebellar nuclear neurons in vitro. *Cerebellum* **9**, 67–76.
- Pereno, G. L., Balaszczuk, V. and Beltramino, C. A.** (2011). Detection of conspecific pheromones elicits fos expression in GABA and calcium-binding cells of the rat vomeronasal system-medial extended amygdala. *J. Physiol. Biochem.* **67**, 71–85.

- Pérez-Laso, C., Segovia, S., Collado, P., Rodríguez-Zafra, M., Del Abril, A. and Guillamón, A.** (1997). Estradiol masculinizes the number of accessory olfactory bulb mitral cells in the rat. *Brain Res. Bull.* **42**, 227–30.
- Peron, S. P. and Gabbiani, F.** (2009). Responses of spike-frequency adaptation in shaping neural response to dynamic stimuli. *Biol. Cybern.* **100**, 505–520.
- Petrovich, G. D., Canteras, N. S. and Swanson, L. W.** (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res. Rev.* **38**, 247–289.
- Petrulis, A.** (2013). Chemosignals, hormones and mammalian reproduction. *Horm. Behav.* **63**, 723–741.
- Pfaus, J. G. and Heeb, M. M.** (1997). Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Res. Bull.* **44**, 397–407.
- Polston, E. K., Heitz, M., Barnes, W., Cardamone, K. and Erskine, M. S.** (2001). NMDA-mediated activation of the medial amygdala initiates a downstream neuroendocrine memory responsible for pseudopregnancy in the female rat. *J. Neurosci.* **21**, 4104–4110.
- Poulin, J.-F., Arbour, D., Laforest, S. and Drolet, G.** (2009). Neuroanatomical characterization of endogenous opioids in the bed nucleus of the stria terminalis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **33**, 1356–65.
- Pro-Sistiaga, P., Mohedano-Moriano, A., Ubeda-Bañon, I., Del Mar Arroyo-Jimenez, M., Marcos, P., Artacho-Pérula, E., Crespo, C., Insausti, R. and Martinez-Marcos, A.** (2007). Convergence of olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon. *J. Comp. Neurol.* **504**, 346–62.
- Quaglino, E., Giustetto, M., Panzanelli, P., Cantino, D., Fasolo, A. and Sassoè-Pognetto, M.** (1999). Immunocytochemical localization of glutamate and gamma-aminobutyric acid in the accessory olfactory bulb of the rat. *J. Comp. Neurol.* **408**, 61–72.
- Rasia-Filho, A. A., Londero, R. G. and Achaval, M.** (1999). Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. *Brain Res. Bull.* **48**, 173–83.
- Rasia-Filho, A. A., Fabian, C., Rigoti, K. M. and Achaval, M.** (2004). Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala

revealed by the Golgi method. *Neuroscience* **126**, 839–847.

- Rasia-Filho, A. A., Haas, D., de Oliveira, A. P., de Castilhos, J., Frey, R., Stein, D., Lazzari, V. M., Back, F., Pires, G. N., Pavesi, E., et al.** (2012a). Morphological and Functional Features of the Sex Steroid-Responsive Posterodorsal Medial Amygdala of Adult Rats. *Mini-Reviews Med. Chem.* **12**, 1090–1106.
- Rasia-Filho, A. A., Dalpian, F., Menezes, I. C., Brusco, J., Moreira, J. E. and Cohen, R. S.** (2012b). Dendritic spines of the medial amygdala: plasticity, density, shape, and subcellular modulation by sex steroids. *Histol. Histopathol.* **27**, 985–1011.
- Ropert, N., Miles, R. and Korn, H.** (1990). Characteristics of miniature inhibitory postsynaptic currents in CA1 pyramidal neurones of rat hippocampus. *J. Physiol.* **428**, 707–22.
- Ruiz-Reig, N., Andres, B., Lamonerie, T., Theil, T., Fairen, A. and Studer, M.** (2018). The caudo-ventral pallium is a novel pallial domain expressing Gdf10 and generating Ebf3-positive neurons of the medial amygdala. *Brain Struct Funct* **223**, 3279–3295.
- Sah, P.** (1996). Ca(2+)-activated K⁺ currents in neurones: Types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci.* **19**, 150–154.
- Sah, P. and Bekkers, J.M.** (1996). Apical dendritic location of slow afterhyperpolarization current in hippocampal pyramidal neurons: implications for the integration of long-term potentiation. *J. Neurosci.* **16**, 4537–4542.
- Sangrey, T. and Jaeger, D.** (2010). Analysis of distinct short and prolonged components in rebound spiking of deep cerebellar nucleus neurons. *Eur. J. Neurosci.* **32**, 1646–1657.
- Scalia, F. and Winans, S. S.** (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.* **161**, 31–55.
- Sellers, K., Raval, P. and Srivastava, D. P.** (2015). Molecular signature of rapid estrogen regulation of synaptic connectivity and cognition. *Front. Neuroendocrinol.* **36**, 72–89.
- Shao, L.-R. and Dudek, F. E.** (2005). Changes in mIPSCs and sIPSCs after kainate treatment: evidence for loss of inhibitory input to dentate granule cells and possible compensatory responses. *J. Neurophysiol.* **94**, 952–60.
- Simerly, R. B.** (2004). Anatomical substrates of hypothalamic integration. In *The rat nervous system* (ed. G. Paxinos), pp. 335–368. San Diego: Academic Press.
- Spruston, N., Häusser, M. and Stuart, G.** (2013). Information Processing in Dendrites and

- Spines. In *Fundamental Neuroscience* (ed. L. Squire, D. Berg, F. E. Bloom, S. du Lac, A. Ghosh and N. C. Spitzer), pp. 231-260. San Diego: Academic Press.
- Swanson, L. W. and Petrovich, G. D.** (1998). What is the amygdala? *Trends Neurosci.* **21**, 323–31.
- Tian, Y., Lei, T., Yang, Z., Zhang, T.** (2012). Urethane suppresses hippocampal CA1 neuron excitability via changes in presynaptic glutamate release and in potassium channel activity. *Brain Res Bull.* **87**:420-6.
- Vandecasteele, M., Deniau, J. M. and Venance, L.** (2011). Spike frequency adaptation is developmentally regulated in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons. *Neuroscience* **192**, 1–10.
- Vendramin Pasquetti, M., Meier, L., Loureiro, S., Ganzella, M., Junges, B., Barbieri Caus, L., Umpierrez Amaral, A., Koeller, D. M., Goodman, S., Woontner, M., et al.** (2017). Impairment of GABAergic system contributes to epileptogenesis in glutaric acidemia type I. *Epilepsia* **58**, 1771–1781.
- Vinader-Caerols, C., Collado, P., Segovia, S. and Guillamón, A.** (1998). Sex differences in the posteromedial cortical nucleus of the amygdala in the rat. *Neuroreport* **9**, 2653–6.
- Wall, M. J., Robert, A., Howe, J. R. and Usowicz, M. M.** (2002). The speeding of EPSC kinetics during maturation of a central synapse. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 785–797.
- Wakita, M., Kotani, N., Yamaga, T., Akaike, N.** (2015). Nitrous oxide directly inhibits action potential-dependent neurotransmission from single presynaptic boutons adhering to rat hippocampal CA3 neurons. *Brain Res Bull.* **118**, 34-45.
- Wu, W.W., Chan, C.S. and Disterhoft, J.F.** (2004). Slow afterhyperpolarization governs the development of NMDA receptor-dependent afterdepolarization in CA1 pyramidal neurons during synaptic stimulation. *J. Neurophysiol.* **92**, 2346-56.
- Yamamoto, R., Ahmed, N., Ito, T., Gungor, N. Z. and Pare, D.** (2018). Optogenetic Study of Anterior BNST and Basomedial Amygdala Projections to the Ventromedial Hypothalamus. *eNeuro* **5**, 1-12.
- Yamasaki, M., Hashimoto, K., and Kano, M.** (2006). Miniature synaptic events elicited by presynaptic Ca²⁺ rise are selectively suppressed by cannabinoid receptor activation in cerebellar purkinje cells. *J. Neurosci.* **26**, 86-95.
- Yoshida, M., Suga, S. and Sakuma, Y.** (1994). Estrogen reduces the excitability of the female

rat medial amygdala afferents from the medial preoptic area but not those from the lateral septum. *Exp. brain Res.* **101**, 1–7.

Yuste, R. (2013). Electrical compartmentalization in dendritic spines. *Annu Rev Neurosci.* **36**, 429-49.

Zancan, M., Dall'Oglio, A., Sarzenski, T. M., Maher, M. I., Garcia-Segura, L. M. and Rasia-Filho, A. A. (2015). Glial and axonal perikaryal coverage and somatic spines in the posterodorsal medial amygdala of male and cycling female rats. *J. Comp. Neurol.* **523**, 2127–2137.

Zancan, M., Dall'Oglio, A., Quagliotto, E. and Rasia-Filho, A. A. (2017). Castration alters the number and structure of dendritic spines in the male posterodorsal medial amygdala. *Eur. J. Neurosci.* **45**, 572–580.

Zancan, M., da Cunha, R. S. R., Schroeder, F., Xavier, L. L. and Rasia-Filho, A. A. (2018). Remodeling of the number and structure of dendritic spines in the medial amygdala: From prepubertal sexual dimorphism to puberty and effect of sexual experience in male rats. *Eur. J. Neurosci.* **48**, 1851-1865.

Table 1. Electrophysiological properties of MePD neurons

CH	Sex/ Estrous Phase	Cells N	Vrest (mV)	R input (MΩ)	Tau (ms)	Cm (pF)	AP threshold (mV)	AP amplitude (mV)	AP frequency (Hz)	AP half-width (ms)	SAG Amplitude (mV)	ISI Δ (ms)	fAHP (s)	sAHP ^d (s)	fAHP (mV)	sAHP (mV)
Adapting Neurons (Class I Neuron)																
D	Male	13	-51.08 ± 1.55	436.00 ± 26.67	23.57 ± 1.25	61.61 ± 2.50	30.76 ± 3.75	69.65 ± 2.27	14.60 ± 0.59	2.72 ± 0.12	3.72 ± 0.28	6.26 ± 1.12	0.005 ± 0.01	0.020 ± 0.17	19.46 ± 1.59	13.77 ± 0.99
	Diestrus	8	-49.66 ± 2.19	403.33 ± 36.11	24.30 ± 1.99	62.41 ± 3.68	26.66 ± 5.53	65.30 ± 3.21	14.00 ± 0.76	2.91 ± 0.17	3.13 ± 0.32	6.02 ± 1.65	0.003 ± 0.01	0.015 ± 0.08	18.59 ± 2.00	12.08 ± 1.46
	Proestrus	12	-52.91 ± 1.55	379.58 ± 25.53	20.83 ± 1.40	59.32 ± 2.60	31.66 ± 3.91	68.65 ± 2.27	12.72 ± 0.56	2.68 ± 0.12	3.92 ± 0.27	6.26 ± 1.16	0.003 ± 0.01	0.021 ± 0.12	23.98 ± 1.45	13.36 ± 1.03
	Estrus	10	-47.40 ± 1.70	405.30 ± 27.97	23.17 ± 1.54	59.35 ± 3.00	30.00 ± 4.28	65.38 ± 2.49	12.40 ± 0.59	2.66 ± 0.13	3.05 ± 0.32	5.22 ± 0.83	0.003 ± 0.01	0.016 ± 0.11	18.79 ± 1.59	13.04 ± 1.13
E	Male	8	-52.25 ± 1.90	441.00 ± 33.43	22.94 ± 1.72	53.78 ± 3.19	30.00 ± 4.79	71.50 ± 2.78	17.01 ± 0.66 ^{a,b,c}	2.86 ± 0.16	2.87 ± 0.37	6.96 ± 1.43	0.003 ± 0.01	0.019 ± 0.12	24.15 ± 1.78	11.52 ± 1.27
	Diestrus	15	47.06 ± 1.38	405.73 ± 22.84	23.38 ± 1.25	59.91 ± 2.33	29.33 ± 3.49	68.01 ± 2.10	12.93 ± 0.48	2.99 ± 0.11	3.33 ± 0.24	5.40 ± 1.04	0.004 ± 0.01	0.017 ± 0.07	18.08 ± 1.34	12.14 ± 0.92
	Proestrus	21	-51.71 ± 1.17	451.28 ± 19.30	23.59 ± 1.06	56.86 ± 1.96	26.67 ± 2.95	69.43 ± 1.71	11.71 ± 0.41	2.73 ± 0.09	3.85 ± 0.24	5.12 ± 0.88	0.003 ± 0.01	0.020 ± 0.12	23.07 ± 1.09	13.37 ± 0.78
	Estrus	18	-48.94 ± 1.30	401.05 ± 21.45	23.88 ± 1.14	62.18 ± 2.12	30.10 ± 3.19	72.50 ± 1.86	12.66 ± 0.44	2.70 ± 0.10	3.11 ± 0.21	5.29 ± 0.62	0.004 ± 0.01	0.014 ± 0.12	21.81 ± 1.18	12.52 ± 0.84
Fully Accommodating Neurons (Class II Neuron)																
D	Male	14	-49.64 ± 1.43	409.76 ± 24.53	24.57 ± 1.30	62.36 ± 2.41	28.57 ± 3.62	74.72 ± 2.27	1.42 ± 0.50	2.66 ± 0.11	3.06 ± 0.26	-	0.005 ± 0.01	0.033 ± 0.11	20.62 ± 1.39	12.19 ± 0.88
	Diestrus	24	49.91 ± 1.09	443.41 ± 18.05	26.31 ± 0.99	61.63 ± 1.84	27.50 ± 2.75	77.17 ± 1.60	1.41 ± 0.38	2.97 ± 0.08	3.54 ± 0.19	-	0.004 ± 0.01	0.042 ± 0.11	18.78 ± 1.02	13.76 ± 1.22
	Proestrus	19	-48.47 ± 1.23	413.73 ± 20.29	25.11 ± 1.11	64.84 ± 2.07	27.36 ± 3.10	80.01 ± 1.85	1.42 ± 0.43	2.70 ± 0.09	3.79 ± 0.23	-	0.004 ± 0.01	0.029 ± 0.08	24.45 ± 1.16	14.67 ± 1.13
	Estrus	22	-47.86 ± 1.14	421.00 ± 19.30	23.80 ± 1.06	59.46 ± 1.92	30.01 ± 2.88	72.24 ± 1.68	1.63 ± 0.40	2.81 ± 0.09	3.57 ± 0.22	-	0.004 ± 0.01	0.036 ± 0.13	19.29 ± 1.09	12.98 ± 1.09
E	Male	18	-48.72 ± 1.26	462.88 ± 21.45	22.32 ± 1.14	56.29 ± 2.12	28.88 ± 3.19	75.33 ± 1.85	1.55 ± 0.44	2.70 ± 0.10	3.75 ± 0.25	-	0.005 ± 0.01	0.039 ± 0.12	22.93 ± 1.18	11.98 ± 1.04
	Diestrus	12	-49.33 ± 1.55	402.16 ± 25.53	24.65 ± 1.40	59.46 ± 2.60	29.97 ± 3.91	75.96 ± 2.27	1.16 ± 0.54	2.67 ± 0.12	3.11 ± 0.32	-	0.004 ± 0.01	0.041 ± 0.13	18.11 ± 1.45	12.09 ± 1.02
	Proestrus	12	-47.20 ± 1.70	411.90 ± 26.67	21.09 ± 1.40	53.33 ± 2.60	25.00 ± 3.91	72.45 ± 2.27	1.50 ± 0.52	2.98 ± 0.12	3.44 ± 0.28	-	0.004 ± 0.01	0.029 ± 0.07	18.67 ± 1.51	11.02 ± 1.44
	Estrus	18	-48.38 ± 1.26	447.77 ± 20.85	24.10 ± 1.14	55.02 ± 2.12	31.11 ± 3.19	73.67 ± 1.91	1.11 ± 0.44	2.88 ± 0.10	3.70 ± 0.26	-	0.004 ± 0.01	0.037 ± 0.11	21.18 ± 1.18	11.68 ± 1.32

Data are mean ± SEM. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test were used for statistical comparison. ^a p < 0.05 compared male with proestrus; ^b p < 0.05 compared male with estrus; ^c p < 0.05 compared male with diestrus. Two-tailed Student's t-test was used for statistical comparison. ^d p < 0.05 compared Class I and Class II neurons. CH, Cerebral Hemisphere. Statistical significance was defined as p < 0.05.

Table 2. Kinetics of sEPSC and mEPSC in the MePD neurons

Cerebral Hemisphere	Sex / Estrous Phase	Cells N	sEPSC and mEPSC parameters			
			Frequency, Hz	Amplitude, pA	10-90% Rise Time, ms	Decay Time Constant, ms
sEPSC						
R	Male	12	1.53 ± 0.27	39.54 ± 3.11 ^{a,b}	2.84 ± 0.21	5.82 ± 0.39 ^{a,b,c}
	Diestrus	10	1.70 ± 0.27	34.60 ± 3.11 ^{e,f}	2.54 ± 0.21	3.86 ± 0.39 ^{c,e,f}
	Proestrus	14	1.41 ± 0.23	15.00 ± 2.63	2.32 ± 0.18	2.20 ± 0.33
	Estrus	13	1.62 ± 0.24	13.51 ± 2.73	2.51 ± 0.19	2.35 ± 0.35
L	Male	19	2.46 ± 0.23 ^{a,b,c}	42.59 ± 2.63 ^{a,b}	3.58 ± 0.18 ^{a,b,c}	7.25 ± 0.33 ^{a,b,c}
	Diestrus	13	1.45 ± 0.24	36.82 ± 2.73 ^{e,f}	2.34 ± 0.19	4.25 ± 0.34 ^{c,e,f}
	Proestrus	16	1.34 ± 0.22	12.98 ± 2.46	2.30 ± 0.17	2.17 ± 0.30
	Estrus	16	1.55 ± 0.22	12.36 ± 2.46	2.12 ± 0.17	2.39 ± 0.30
mEPSC						
R	Male	10	0.49 ± 0.04	9.40 ± 0.47	2.36 ± 0.19	1.70 ± 0.27
	Diestrus	14	0.58 ± 0.03	8.19 ± 0.38	2.04 ± 0.15	2.30 ± 0.22
	Proestrus	13	0.50 ± 0.03	8.16 ± 0.39	2.06 ± 0.16	1.54 ± 0.23
	Estrus	9	0.55 ± 0.04	8.11 ± 0.47	2.21 ± 0.19	2.25 ± 0.27
L	Male	9	0.65 ± 0.04	9.35 ± 0.47	2.63 ± 0.19	1.78 ± 0.27
	Diestrus	9	0.63 ± 0.04	8.75 ± 0.50	2.35 ± 0.20	2.66 ± 0.29
	Proestrus	15	0.55 ± 0.03	8.70 ± 0.36	2.23 ± 0.14	1.82 ± 0.21
	Estrus	11	0.51 ± 0.03	7.87 ± 0.42	2.48 ± 0.17	1.89 ± 0.25

Data are mean ± SEM. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test was used for statistical comparison. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$ compared male with proestrus; ^b $p < 0.05$ compared male with estrus; ^c $p < 0.05$ compared male with diestrus; ^e $p < 0.05$ compared diestrus with proestrus; ^f $p < 0.05$ compared diestrus with estrus.

Table 3. Kinetics of sIPSC and mIPSC in the MePD neurons

Cerebral Hemisphere	Sex / Estrous Phase	Cells N	sIPSC and mIPSC parameters			
			Frequency, Hz	Amplitude, pA	10-90% Rise Time, ms	Decay Time Constant, ms
sIPSC						
R	Male	10	1.01 ± 0.17 ^{a,b,c}	14.74 ± 1.03	2.76 ± 0.30	5.71 ± 0.59
	Diestrus	13	1.63 ± 0.14	17.33 ± 0.86	2.76 ± 0.25	6.12 ± 0.49
	Proestrus	10	2.06 ± 0.16	31.79 ± 0.98 ^{a,d,e}	2.97 ± 0.30	4.63 ± 0.56
	Estrus	11	1.68 ± 0.15	16.09 ± 0.93	2.90 ± 0.29	5.74 ± 0.56
L	Male	10	1.69 ± 0.17 ^{b,c}	15.79 ± 1.03	3.42 ± 0.32	5.49 ± 0.59
	Diestrus	12	0.92 ± 0.14	15.07 ± 0.89	2.94 ± 0.28	5.58 ± 0.51
	Proestrus	14	1.97 ± 0.13 ^{d,e}	29.40 ± 0.82 ^{a,d,e}	3.23 ± 0.24	5.26 ± 0.47
	Estrus	13	0.99 ± 0.14	16.69 ± 0.86	3.41 ± 0.25	5.30 ± 0.49
mIPSC						
R	Male	11	0.47 ± 0.03	10.39 ± 0.83	4.16 ± 0.23	3.76 ± 0.23
	Diestrus	10	0.43 ± 0.03	11.44 ± 0.83	4.08 ± 0.23	3.98 ± 0.23
	Proestrus	14	0.50 ± 0.03	9.85 ± 0.70	3.08 ± 0.19 ^{a,d,e}	2.67 ± 0.20 ^{a,d,e}
	Estrus	11	0.41 ± 0.03	10.94 ± 0.79	4.22 ± 0.21	4.32 ± 0.22
L	Male	10	0.54 ± 0.03	10.42 ± 0.83	4.39 ± 0.23	4.44 ± 0.23
	Diestrus	10	0.48 ± 0.03	10.76 ± 0.83	4.05 ± 0.23	4.02 ± 0.23
	Proestrus	12	0.56 ± 0.03	9.70 ± 0.75	3.07 ± 0.21 ^{a,d,e}	3.07 ± 0.21 ^{a,d,e}
	Estrus	11	0.44 ± 0.03	10.34 ± 0.79	4.06 ± 0.21	3.99 ± 0.22

Data are mean ± SEM. Two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test was used for statistical comparison. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$ compared male with proestrus; ^b $p < 0.05$ compared male with estrus; ^c $p < 0.05$ compared male with diestrus; ^d $p < 0.05$ compared proestrus with estrus; ^e $p < 0.05$ compared diestrus with proestrus.

Figure 1. Distribution of two neuronal subpopulations in MePD

(A-D) Schematic distribution of recorded Class I and Class II neurons in the left and right MePD of male and cycling female rats. Scale bar = 1 mm.

Figure 1

MePD

- Class I neuron
- Class II neuron

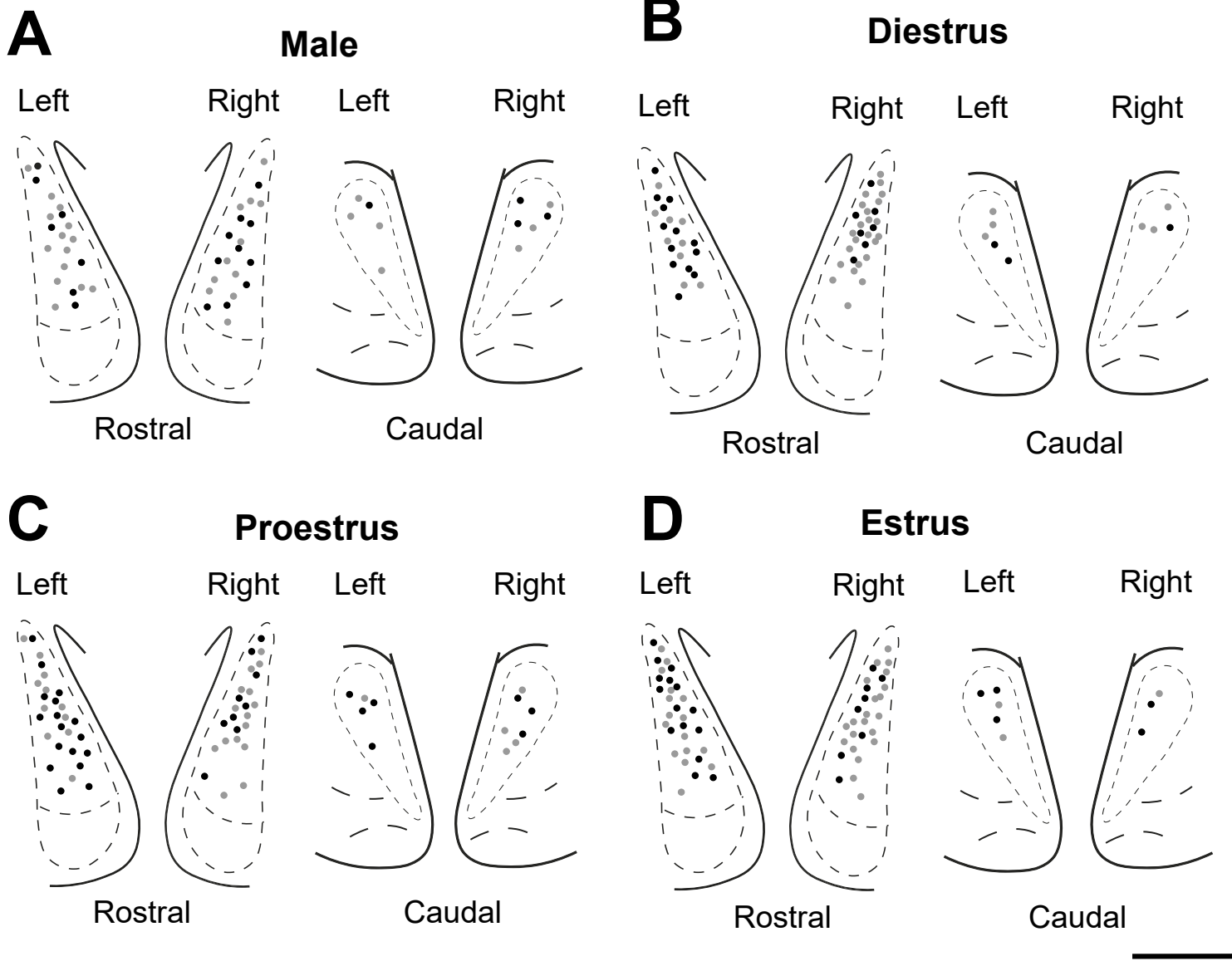


Figure 2. Electrophysiological characterization of two distinct classes of neurons in the MePD

(A and B) Firing properties of (A) Class I irregular spiking cells with frequency adaptation and (B) Class II irregular spiking cells with one to two AP with full spike-frequency adaptation. Spiking due to 1 s depolarizing and hyperpolarizing current steps (+100, +20 and -100 pA) showing the depolarization step corresponding to the AP threshold (red traces), the and maximal firing rate (grey traces) and hyperpolarization step (black traces) to test for the presence of SAG current and rebound firing. Sample sizes (presented as neurons) were 53 (males), 59 (diestrus), 64 (proestrus) and 68 (estrus).

(B') Inset shows the sAHP in Class I neurons (black) and Class II neurons (grey). Note that Class II neurons, with full spike-frequency adaptation, had a significantly larger sAHP time course when compared to Class I neurons.

(C and D) Three-dimensional reconstructed images of a biocytin-filled (C) Class I bitufted-shaped MePD neuron and (D) Class II stellate-shaped MePD neuron, showing pleomorphic spines (arrows). Scale bar = 20 μm .

(C' and D') High-magnification photomicrographs (insets) of spiny dendrites (arrows) imaged by confocal microscopy. Scale bar = 5 μm .

(E and F) Histograms showing the number of bitufted and stellate-shaped cells with characteristics of (E) Class I and (F) Class II MePD neuron in males and cycling females. Sample sizes (presented as neurons) were 11 (males), 11 (diestrus), 8 (proestrus) and 8 (estrus).

Figure 2

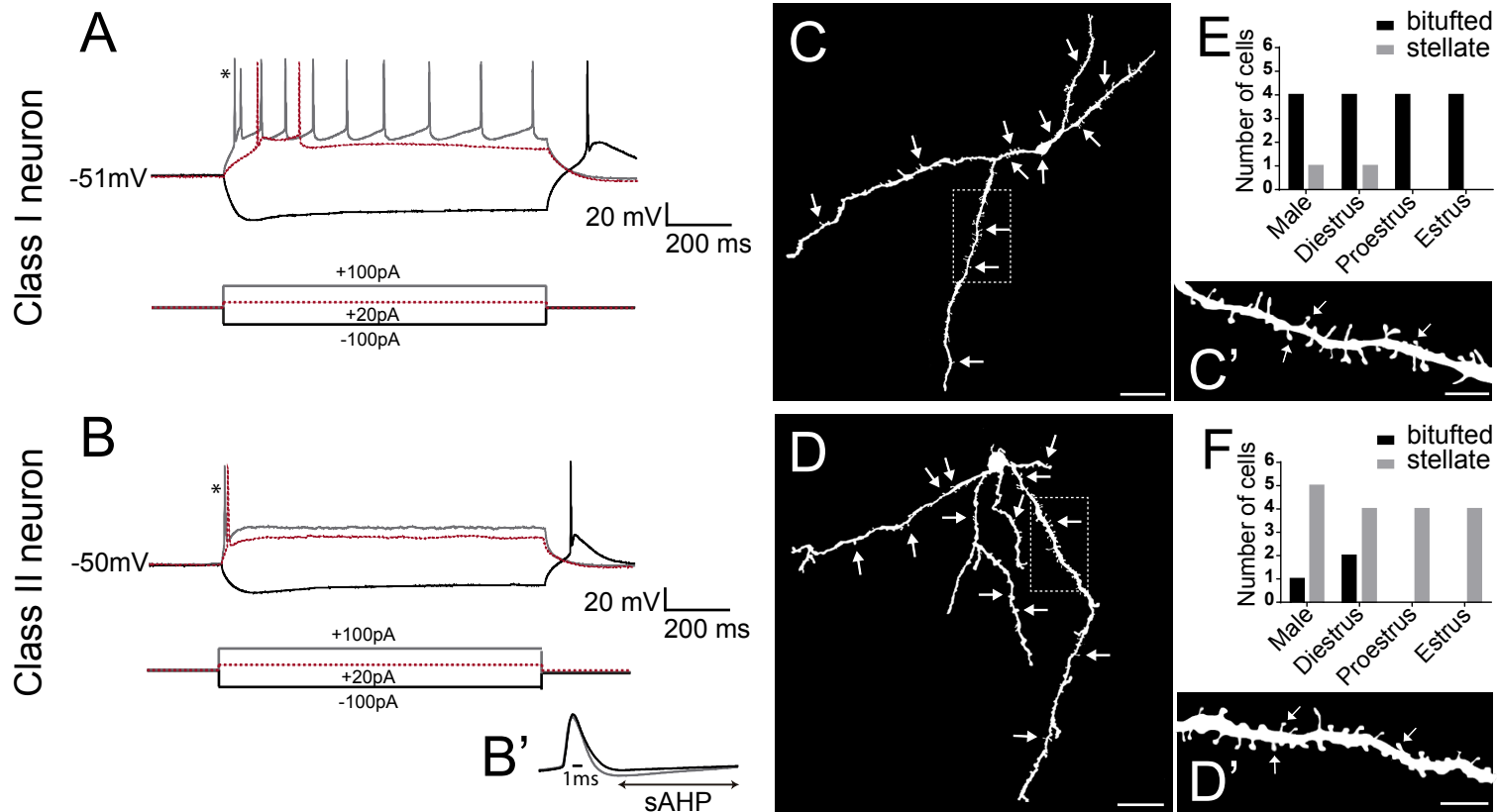


Figure 3. Sexual dimorphism and hemispheric lateralization affect excitatory synaptic activity in MePD neurons

(A) Diagram of the ventral (left) and dorsal (right) aspect of a coronal section of rat brain showing the posterodorsal medial amygdala (MePD) close to the optic tract (opt) and the stria terminalis (st), adapted from Paxinos and Watson (1998). Spatial coordinates correspond to: D, dorsal; L, lateral; M, medial; V, ventral. Scale bar = 1 mm.

(B) Schematic distribution of recorded cells in the left and right MePD of male and females in diestrus, proestrus or estrus. Scale bar = 1 mm.

(C-F) Representative traces of sEPSC and mEPSC from MePD neurons of male and cycling females in diestrus, proestrus or estrus of both hemispheres.

(G and I) Cumulative probability and average plots of sEPSC amplitude of (G) left and (I) right MePD neurons showing higher values for male and females in diestrus (KS test, $p < 0.001$), with no lateralization.

(H and J) Cumulative probability plots of sEPSC inter-event interval and average plots of sEPSC frequency of (H) left and (J) right MePD neurons showing higher frequency on the left side of males when compared to cycling females (KS test, $p < 0.001$).

(K-N) Cumulative probability distribution of mEPSC amplitude and inter-event intervals and average plots of amplitude and frequency from MePD neurons in males and cycling females showing no effects of sex or lateralization (KS test, $p > 0.05$).

(O-R) Average of sEPSC and mEPSC amplitudes (O and Q) and frequencies (P and R) of left and right MePD neurons from male and cycling females.

Sample sizes from the right and left MePD (presented as neurons) were 22 and 28 (males), 24 and 22 (diestrus), 27 and 31 (proestrus) and 22 and 27 (estrus).

Error bars are SEM. * $p < 0.05$; two-way ANOVA followed by Bonferroni test.

Figure 3

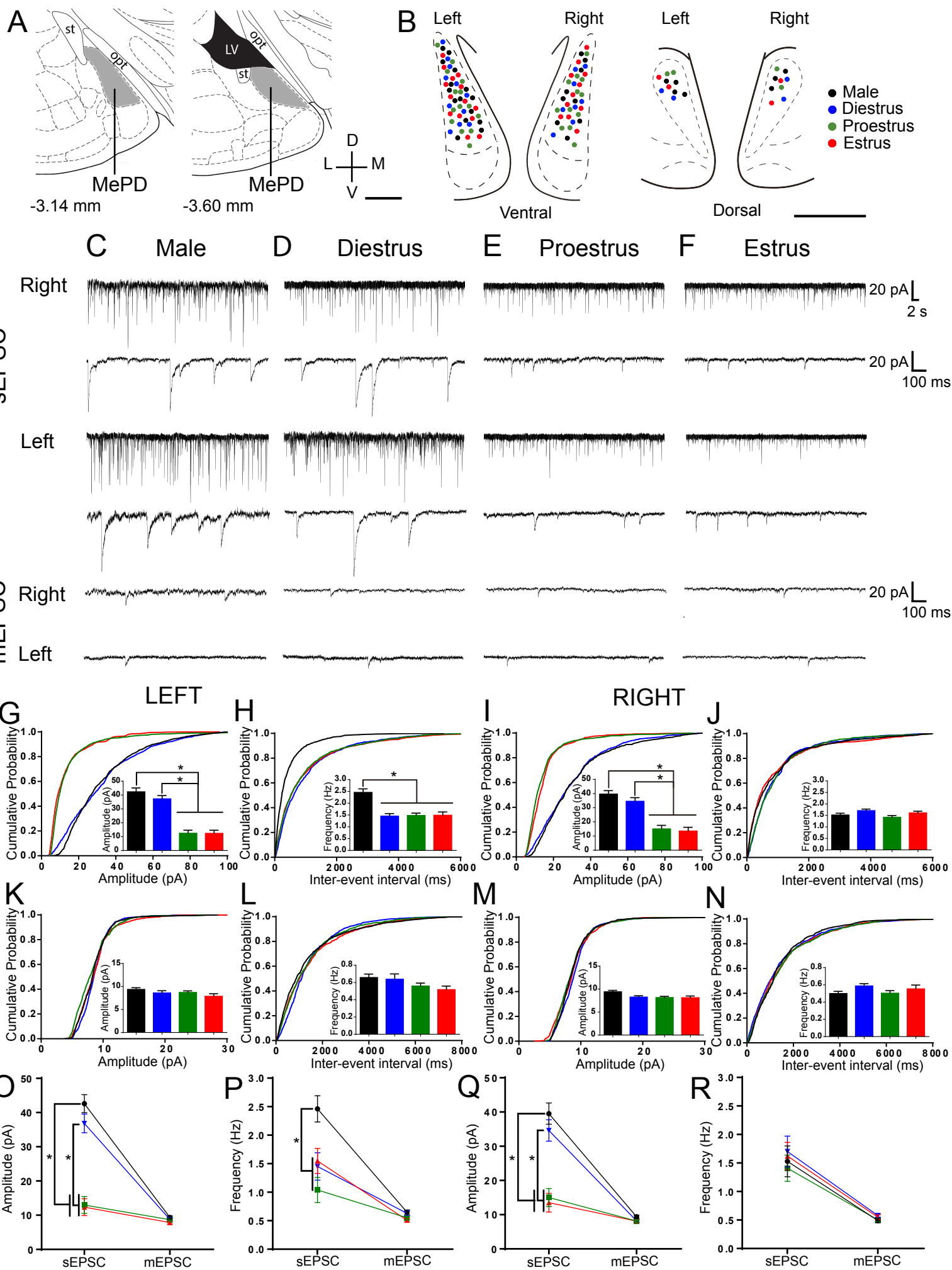


Figure 4. Sexual dimorphism and hemispheric lateralization affect EPSC and IPSC kinetics

(A) Average plots of sEPSC decay-time constant showing slower kinetics in MePD neurons of males and females in diestrus than females in proestrus or estrus ($p < 0.05$) with no effect of hemispheric lateralization.

(B) Average plots of sEPSC rise time 10-90% showing slower kinetics in the left MePD neurons of males when compared to females along the three phases of the estrous cycle ($p < 0.05$).

(C-D) Average plots of mEPSC decay-time constant and rise-time 10-90% of MePD neurons showing no effect of sex or hemispheric lateralization ($p > 0.05$).

(E-F) Average plots of sIPSC decay time constant and the rise time 10-90% of MePD neurons were similar in all groups ($p > 0.05$).

(G-H) Average plots of mIPSC decay time constant and rise time 10-90% showing faster kinetics in MePD neurons of females in proestrus than males and females in diestrus or estrus ($p < 0.05$) with no effect of hemispheric lateralization ($p > 0.05$).

(I-L) Superimposed EPSC and IPSC traces normalized to peak amplitude. Data plot (\pm SEM); * $p < 0.05$; two-way ANOVA followed by Bonferroni test. Sample size is described on Tables 2 and 3.

Figure 4



Figure 5. Sexual dimorphism and hemispheric lateralization affect inhibitory synaptic activity in MePD neurons

A) Diagram of the ventral (left) and dorsal (right) aspect of a coronal section of rat brain showing the posterodorsal medial amygdala (MePD) close to the optic tract (opt) and the stria terminalis (st), adapted from Paxinos and Watson (1998). Spatial coordinates correspond to: D, dorsal; L, lateral; M, medial; V, ventral. Scale bar = 1 mm.

(B) Schematic distribution of recorded cells in the left and right MePD of male and females in diestrus, proestrus or estrus. Scale bar = 1 mm.

(C-F) Representative traces of sIPSC and mIPSC from MePD neurons of male and cycling females in diestrus, proestrus or estrus of both hemispheres.

(G and I) Cumulative probability and average plots of sIPSC amplitude of (G) left and (I) right MePD neurons showing higher values for females in proestrus (KS test, $p < 0.001$), with no lateralization.

(H and J) Cumulative probability plots of sIPSC inter-event interval and average plots of sIPSC frequency of (H) left and (J) right MePD neurons showing lower frequency on the left side of females in estrus and diestrus when compared to other groups, and lower IPSC frequency on the right side of males (KS test, $p < 0.001$).

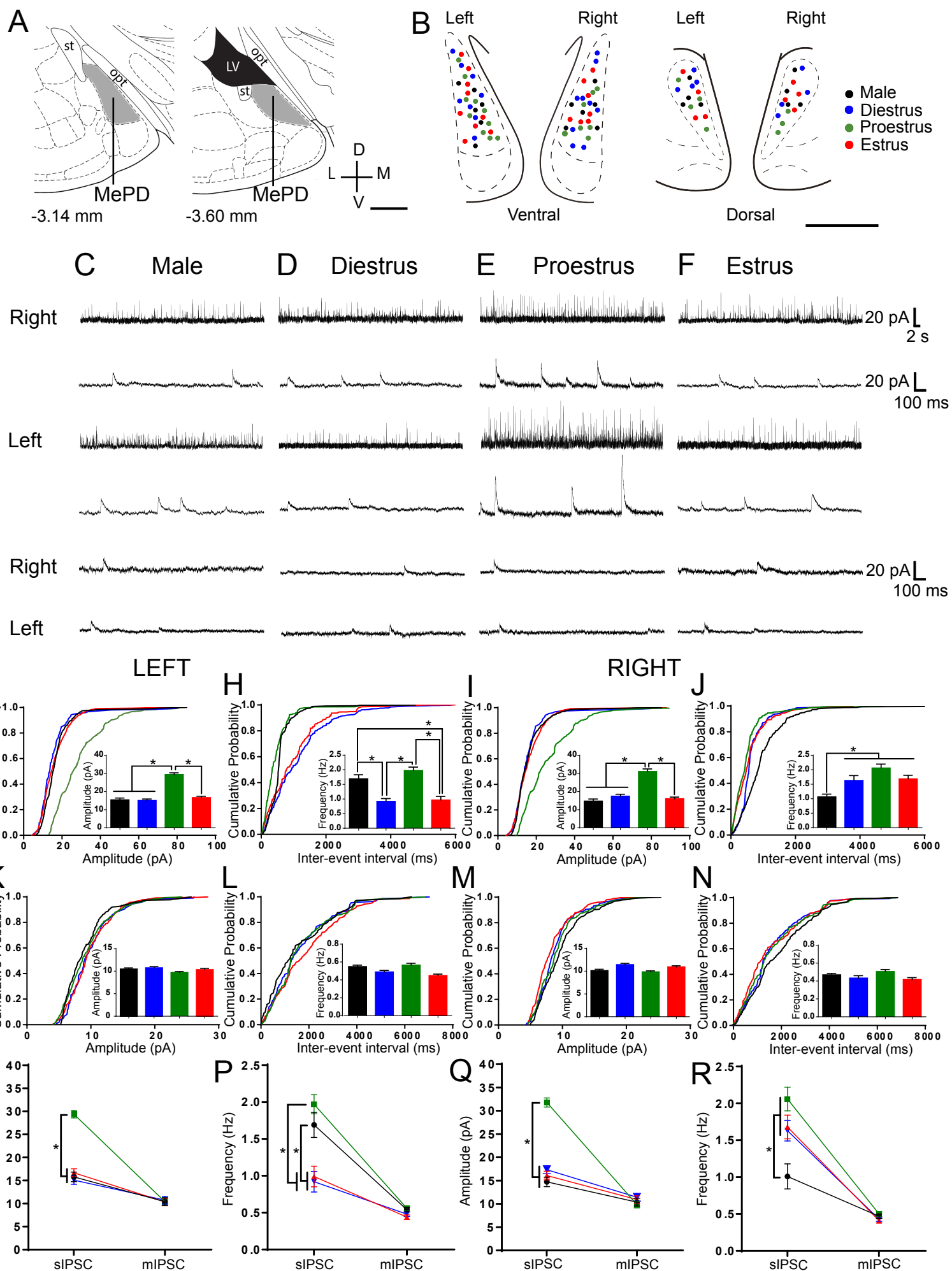
(K-N) Cumulative probability distribution of mIPSC amplitude and inter-event intervals and average plots of amplitude and frequency from MePD neurons in males and cycling females showing no effects of sex or lateralization (KS test, $p > 0.05$).

(O-R) Average of sIPSC and mIPSC amplitudes (O and Q) and frequencies (P and R) of left and right MePD neurons from male and cycling.

Sample sizes from the right and left MePD (presented as neurons) were 21 and 20 (males), 23 and 22 (diestrus), 24 and 26 (proestrus) and 22 and 24 (estrus).

Error bars are SEM. * $p < 0.05$; two-way ANOVA followed by Bonferroni test.

Figure 5



5. DISCUSSÃO

A presente tese demonstra a caracterização eletrofisiológica de duas classes de neurônios e o padrão das respostas excitatórias e inibitórias no MePD de ratos machos e fêmeas adultos, demonstrando existência de efeito do sexo, das fases do ciclo estral e da lateralização hemisférica na integração sináptica desse subnúcleo e em suas possíveis implicações funcionais, como será descrito a seguir.

5.1 Subpopulações neuronais do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial

A morfologia dos neurônios do MePD tem sido extensivamente estudada a partir de diferentes abordagens que evidenciaram uma morfologia neuronal relativamente simples e muito similar entre distintas espécies de mamíferos como gatos, camundongos e ratos (Hall, 1972; de Olmos *et al.*, 1985; Price, 1987; McDonald, 1992; Rasia-Filho *et al.*, 1999; Rasia-Filho *et al.*, 2004; de Castilhos *et al.*, 2006; Niimi *et al.*, 2012; Bian, 2013). A partir desse trabalho, nossos resultados permitem correlacionar forma e propriedades intrínsecas dos neurônios do MePD a saber, Classe I, com disparos irregulares e que reduzem a frequência de PA mediante corrente despolarizante predominantemente de forma “bipenachada” e Classe II, com adaptação completa dos disparos de PA, predominantemente de forma estrelada. Ambas as classes de neurônios do MePD foram encontradas igualmente em todos os grupos experimentais, quer sejam machos ou fêmeas em diestro, proestro e estro, quer seja no hemisfério direito ou esquerdo. Portanto, a identificação de duas subpopulações de neurônios no MePD representa uma característica constitutiva dessa região, e não apenas um achado relacionado a uma característica funcional restrita a um único sexo ou hemisfério.

A adaptação da frequência de disparos observada nas duas classes de neurônios encontradas pode estar relacionada tanto às propriedades intrínsecas da membrana neuronal como à resultante das aferências sinápticas na célula (Peron e Gabbiani, 2009). Ademais, os neurônios da Classe II apresentaram uma hiperpolarização pós-potencial lenta (sAHP; do inglês: *slow after hyperpolarization*

potential) mais longa do que os neurônios da Classe I e, conseqüentemente, tendem a disparar apenas um ou dois PA e apresentar adaptação completa. Isto porque o sAHP é uma das propriedades intrínsecas de membrana que pode influenciar a frequência de disparos de PA, e é considerado um índice de excitabilidade neuronal (Sah, 1996). Diferentes padrões de estímulos sinápticos podem influenciar nas respostas neuronais (Blume *et al.*, 2017). De fato, observamos que os neurônios da Classe I do MePD do hemisfério esquerdo exibiram uma maior frequência de disparos de PA nos machos em comparação com as fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral. A frequência das correntes excitatórias pós-sinápticas espontâneas (sEPSC) nos neurônios do MePD do hemisfério esquerdo também foi maior nos machos do que nas fêmeas. Outros estudos são necessários, associando outras técnicas, como a optogenética ou a marcação neuronal anterógrado/retrógrada, para investigar se o aumento das aferências excitatórias sobre os neurônios do MePD de machos poderia ser o responsável por esse aumento da taxa de disparo de PA nos neurônios da Classe I, visto que nossos resultados sugerem que as propriedades intrínsecas de membrana dessas células são similares em ambos os sexos. Adicionalmente, seria interessante estudar se as diferenças na frequência e no padrão de disparos desses neurônios poderiam estar envolvidas com a regulação do comportamento reprodutivo entre os sexos como acontece no Arc, na região periventricular rostral do terceiro ventrículo (Pielecka-Fortuna *et al.*, 2008; de Croft *et al.*, 2012) e na AMbl (Blume *et al.*, 2017).

Encontramos também que ambas as classes de neurônios do MePD apresentaram uma alta resistência de entrada e SAG ativada por I_h , sugestivas da presença da corrente I_h nestas células (Bian *et al.*, 2008; Keshavarzi *et al.*, 2014), além da despolarização rebote (do inglês: *rebound depolarization*) mediante pulsos de corrente hiperpolarizante. Essas características também foram encontradas previamente em neurônios da AMe de camundongos (Carney *et al.*, 2010; Bian, 2013; Keshavarzi *et al.*, 2014; Lischinsky *et al.*, 2017). Ademais, a presença da despolarização rebote permite à célula regular seu padrão de disparo de PA diminuindo a latência ao primeiro pico (Kepecs e Lisman, 2003; Molineux *et al.*, 2008; Sangrey e Jaeger, 2010).

Os mecanismos biofísicos de geração de PA permitem que os neurônios codifiquem individualmente diferentes aferências em padrões de disparos distintos (Kepecs e Lisman, 2003), modulando a informação transferida entre os neurônios pré e pós-sinápticos (Engbers *et al.*, 2011). Por exemplo, após períodos prolongados de aferências inibitórias ocorre um breve aumento da excitabilidade neuronal por plasticidade homeostática, que pode resultar em na geração de PA pós-sinápticos, geralmente, pela despolarização rebote (Pedroarena, 2010; Sangrey e Jaeger, 2010; Engbers *et al.*, 2011). Da mesma forma, o padrão de disparo neuronal pode depender da magnitude desse período inibitório precedente (Sangrey e Jaeger, 2010). No futuro, seria interessante estudarmos a implicação funcional da presença de despolarização rebote nesta região como, por exemplo, já é conhecido o seu papel na indução da secreção do GnRH pelos neurônios do AVPV (Zhang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

Diferenças entre espécies, ou até mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie quando comparamos machos e fêmeas ao longo do ciclo estral, refletem as influências neuromodulatórias no desenvolvimento e na função dos circuitos neurais que medeiam os comportamentos sociais (Chang *et al.*, 2013; Hirsch *et al.*, 2018; Ruiz-Reig *et al.*, 2018). Estudos prévios indicam que o MePD de ratos e camundongos é composto por neurônios que expressam calbindina, óxido nítrico sintase ou somatostatina (Mugnaini e Oertel, 1985; García-López *et al.*, 2008; Carney *et al.*, 2010; Puelles *et al.*, 2016; Lischinsky *et al.*, 2017; Ruiz-Reig *et al.*, 2018), sendo provavelmente formado por neurônios GABAérgicos (Swanson e Petrovich, 1998; Choi *et al.*, 2005; Lischinsky *et al.*, 2017). Desta forma, estes neurônios têm características distintas da maioria dos do MePV, os quais expressam vGlut2 e são classificados como neurônios glutamatérgicos de projeção (Choi *et al.*, 2005; Bian *et al.*, 2008; Keshavarzi *et al.*, 2015). De fato, com base na caracterização morfológica e eletrofisiológica das subpopulações neuronais estudadas pode-se concluir que ambas possuem perfis característicos de neurônios inibitórios (Llinás, 1988; Calcagnotto, 2016; Liguz-Leczna *et al.*, 2016; Lischinsky *et al.*, 2017). Experimentos adicionais são necessários para determinar quais neurotransmissores e moduladores são liberados pelas duas classes neuronais do MePD, mesmo que possuam

características de neurônios inibitórios e possivelmente sejam GABAérgicos. Da mesma forma, é importante determinar quais são as aferências sinápticas específicas, tanto inibitórias como excitatórias para os neurônios do MePD. Com isso se pode avançar os conhecimentos a respeito da organização sináptica e a repercussão na circuitaria neuronal com a qual o MePD está associado.

5.2 Transmissão sináptica no subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial

No MePD, os neurônios multipolares “bipenachados” e estrelados não diferem na densidade de espinhos dendríticos proximais (de Castilhos *et al.*, 2006). Contudo, a densidade de espinhos dendríticos no MePD é sexualmente dimórfica (Rasia-Filho *et al.*, 2004; de Castilhos *et al.*, 2008; Rasia-Filho *et al.*, 2012a). Na idade adulta, a densidade de espinhos dendríticos no MePD de ratos machos e fêmeas em diestro é maior do que em fêmeas em proestro e estro (Rasia-Filho *et al.*, 2004). Os espinhos dendríticos do MePD apresentam receptores glutamatérgicos do tipo AMPA e do tipo NMDA (Dalpian *et al.*, 2015), o que indica estarem relacionados com a modulação das aferências excitatórias para essa área. De forma muito interessante, aqui encontramos que os neurônios do MePD de ratos machos e fêmeas em diestro recebem maior magnitude de aferências sinápticas excitatórias do que fêmeas em proestro e estro em ambos os hemisférios cerebrais. A densidade de espinhos dendríticos diminui quando há um aumento no nível circulante de estrogênio e progesterona durante o proestro (Rasia-Filho *et al.*, 2004, 2012a,b), ao mesmo tempo que estrogênio reduz a excitabilidade axonal que atinge a AMe de ratas (Yoshida *et al.*, 1994). Esses achados reiteram a proposição de que a formação, remodelamento e plasticidade dos espinhos dendríticos e do processamento sináptico ocorre no MePD de ratos após a puberdade (Cooke e Woolley, 2009; Zancan *et al.*, 2018), sugerindo que a variação dos esteroides ovarianos modifique o número de locais pós-sinápticos de processamento da informação em animais adultos, diferenciando machos e fêmeas quanto ao seu padrão de conectividade e determinando plasticidade adicional às fêmeas ao longo do ciclo estral. Além disso, as diferenças nas aferências excitatórias para os neurônios do MePD de ambos os sexos podem

estar associadas às distintas regiões de aferência com este subnúcleo e/ou aos efeitos da variação nos níveis androgênicos e estrogênicos (Rasia-Filho *et al.*, 2004; Cooke *et al.*, 2007). Por exemplo, as aferências glutamatérgicas provenientes do AOB (Scalia e Winans, 1975; Quaglino *et al.*, 1999; Bergan *et al.*, 2014; Lischinsky *et al.*, 2017) e da amígdala cortical (Mugnaini e Oertel, 1985; Canteras *et al.*, 1992; Yang e Shah, 2014) que chegam no MePD são mais numerosas em machos do que em fêmeas (Pérez-Laso *et al.*, 1997; Vinader-Caerols *et al.*, 1998).

Identificou-se também que o dimorfismo sexual afeta significativamente a cinética das sEPSC dos neurônios do MePD. Isto é, as respostas excitatórias neuronais no MePD são mais lentas em machos do que em fêmeas. A sinalização mediada por esteroides sexuais influencia a cinética e a força da transmissão sináptica (Hansberg-Pastor *et al.*, 2015; Sellers *et al.*, 2015), provavelmente, pela modulação da informação aferente aos neurônios do MePD (Ervin *et al.*, 2015). A cinética das sEPSC pode variar conforme a localização sináptica ou extra sináptica e a composição das subunidades do receptor de glutamato, pela cinética dos transportadores de glutamato neuronais pré-sinápticos (Wall *et al.*, 2002) e astrocitários (Haydon, 2001; Heller e Rusakov, 2017). Embora as correntes excitatórias pós-sinápticas miniatura (mEPSC) nos neurônios do MePD de ratos Sprague-Dawley pré-púberes sejam diferentes em ambos os hemisférios cerebrais quando comparados machos e fêmeas (Cooke e Woolley, 2005), nesse trabalho não encontramos efeito da lateralização hemisférica ou do dimorfismo sexual sobre as propriedades das mEPSC em animais adultos. Desta forma, podemos sugerir que a liberação local de neurotransmissores excitatórios e/ou a força sináptica em cada local parecem estar inalterados no MePD de ratos adultos.

Destacamos ainda a importância das aferências sinápticas inibitórias para a modulação da circuitaria local. De acordo com os nossos resultados, sugerimos que o aumento da aferência sináptica excitatória sobre os neurônios do MePD de machos e fêmeas em diestro é capaz de regular a codificação neural e as informações eferentes, porém essa modulação também depende da força espaço-temporal das aferências inibitórias sobre o MePD. Adicionalmente, verificamos os efeitos da lateralização hemisférica dependente da liberação de hormônios gonadais e do sexo

na maioria das aferências neuronais inibitórias que chegam no MePD. Por exemplo, no hemisfério direito, verificamos que a frequência de correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSC) foi menor nos machos do que nas fêmeas em diestro e estro, enquanto a inibição predomina nas fêmeas durante a fase do proestro em no MePD de ambos os hemisférios cerebrais. Assim, além dos neurônios locais receberem aferências inibitórias mais rápidas durante a fase do proestro, demonstramos que a magnitude das aferências excitatórias também diminui nesse período.

As sinapses inibitórias, quando localizadas no tronco dendrítico, tendem a gerar correntes inibitórias pós-sinápticas miniatura (mIPSC) com cinética distinta das sinapses perissomáticas (Kobayashi e Buckmaster, 2003; Shao e Dudek, 2005). Ou seja, a mIPSC nos dendritos costuma ter uma cinética mais lenta do que a registrada próximo ao soma neuronal (Ropert *et al.*, 1990). Neste contexto, embora não tenham sido encontradas diferenças nas propriedades cinéticas das respostas espontâneas inibitórias, as correntes inibitórias pós-sinápticas miniatura (mIPSC) apresentaram uma cinética mais rápida nos neurônios das fêmeas em proestro. A partir desse resultado, podemos sugerir que, nesta fase do ciclo estral das fêmeas, ocorre um aumento da convergência de sinapses inibitórias próximas ao soma neuronal e/ou uma diminuição da convergência de sinapses inibitórias distais (Kobayashi e Buckmaster, 2003; Shao e Dudek, 2005).

Esta cinética rápida observada nas mIPSC dos neurônios do MePD de fêmeas em proestro também pode ser explicada tanto pelas alterações nas subunidades do receptor GABA_A ou na cinética dos transportadores de GABA pré-sinápticos ou astrocitários (Calcagnotto *et al.*, 2002), como pela compartimentalização sináptica ao longo da membrana neuronal (Kobayashi e Buckmaster, 2003). De acordo com essas possibilidades, as fêmeas em proestro têm maior quantidade de espinhos somáticos (Zancan *et al.*, 2015), que são considerados inibitórios (como revisado em Kubota *et al.*, 2016), e mais sinapses inibitórias em ramos dendríticos no MePD (Brusco *et al.*, 2014).

Por fim, as características morfológicas e eletrofisiológicas dos neurônios do MePD de ratos também são influenciadas pela lateralização hemisférica (Cooke e

Woolley, 2005; Cooke *et al.*, 2007; Arpini *et al.*, 2010; Brusco *et al.*, 2014). No entanto ainda é necessário determinar a relação causal entre lateralização hemisférica e diferenças de propriedades intrínsecas e sinápticas dos neurônios do MePD.

Dados ultraestruturais revelaram que os terminais sinápticos sobre dendritos ou espinhos dendríticos do MePD do hemisfério direito de fêmeas em diestro, proestro e estro possui maior quantidade de vesículas sinápticas totais e vesículas sinápticas ancoradas do que o hemisfério esquerdo desses mesmos animais e do que os hemisférios direito e esquerdo de machos (Brusco *et al.*, 2014). Esses dados sugerem que o MePD do hemisfério direito de fêmeas apresente maior atividade sináptica e liberação de neurotransmissores do que o MePD do hemisfério esquerdo (Brusco *et al.*, 2014). Na fase do proestro, os ramos dendríticos no MePD do hemisfério direito recebem mais contatos inibitórios e menos contatos excitatórios do que os do hemisfério esquerdo (Brusco *et al.*, 2014).

Por conseguinte, os efeitos da lateralização hemisférica para as ações dos esteroides sexuais podem ser devido a diferenças hemisféricas na esteroidogênese, na exposição hormonal pela presença da aromatase, por exemplo, e/ou pela diferença na sensibilidade a tais hormônios em diferentes épocas de vida (von Ziegler e Lichtensteiger, 1992; Gerendai *et al.*, 1995; Sanchez e Dominguez, 1995; Cooke e Woolley, 2005; Cooke, 2006; Cooke *et al.*, 2007; Bergan *et al.*, 2014; Zancan *et al.*, 2018). A assimetria observada na atividade da aromatase durante o desenvolvimento da AMe poderia resultar em diferenças entre os sexos em relação ao número de neurônios, dendritos ou sinapses no MePD (Cooke *et al.*, 2007). Como descrito anteriormente, a AMe do hemisfério direito estaria mais envolvida com o controle da esteroidogênese e secreção de gonadotrofinas tanto em machos quanto em fêmeas (Gerendai *et al.*, 1995; Sanchez e Dominguez, 1995), e a AMe do hemisfério esquerdo estaria mais envolvida com a regulação quimiossensorial e/ou com a regulação de retroalimentação negativa dos esteroides sobre a secreção neuroendócrina (Cooke e Woolley, 2005).

Os neurônios do MePD do hemisfério esquerdo apresentaram maior frequência de sEPSC nos machos do que as fêmeas ao longo do ciclo estral. Neste sentido, é interessante ressaltar que achados prévios demonstraram uma correlação positiva

entre o aumento de sinapses excitatórias e o número de espinhos dendríticos no MePD (Cooke e Woolley, 2009). Sendo assim, nossos achados eletrofisiológicos fornecem novas informações relevantes para estudos futuros sobre o papel funcional das aferências excitatórias e inibitórias na estrutura dos neurônios do MePD em ambos os hemisférios cerebrais de ratos adultos.

É notável que efeitos da lateralização hemisférica dependendo do sexo também está descrita em seres humanos quanto à função e ao volume da amígdala (Cahill, 2006; Kim *et al.*, 2012). Os neurônios da AMe de humanos também apresentam espinhos dendríticos complexos, incluindo espinhos multissinápticos recebendo mais de um contato sináptico tanto excitatório como inibitório, sugestivos de uma alta complexidade do processamento sináptico local (Dall'Oglio *et al.*, 2013; Dall'Oglio *et al.*, 2015).

Alterações observadas na atividade da amígdala direita em relação à esquerda sugere a existência de diferenças no processamento da informação de acordo com o hemisfério nesta região (Wisniewski, 1998; Baas *et al.*, 2004; Cahill *et al.*, 2004; Cahill, 2006; Lisofsky *et al.*, 2015). De um modo geral, homens tendem a apresentar assimetria mais acentuada com predominância do hemisfério direito quando comparados com mulheres; mulheres apresentam lateralização mais difusa com predominância do hemisfério esquerdo quando comparadas com homens (Wisniewski, 1998; Lisofsky *et al.*, 2015; Filkowski *et al.*, 2017). Por exemplo, este protótipo pode ser percebido durante tarefa de reconhecimento de emoções faciais (Schneider *et al.*, 2011) ou durante teste de memória que desperta estímulos emocionais (Cahill *et al.*, 2004).

Essas diferenças podem ser relevantes para o comportamento sexual e para a evolução da espécie tanto em vertebrados quanto em invertebrados (Andrew *et al.*, 2009; Bickart *et al.*, 2011; Smaers *et al.*, 2012; Lisofsky *et al.*, 2015). Neste sentido, estudos de ressonância magnética funcional (RMf) examinaram assimetrias funcionais e lateralização hemisférica em função das fases do ciclo menstrual de mulheres (Dietrich *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2003; Weis *et al.*, 2008; Weis *et al.*, 2011). O impacto específico do estrogênio e da progesterona na lateralização hemisférica ainda não está claro, embora vários estudos comportamentais tenham

tentado examinar os efeitos da lateralização nas diferentes fases do ciclo de mulheres (para uma abordagem mais detalhada, ver Hausmann e Bayer 2010).

5.3 Hipóteses sobre os circuitos neuronais relacionados com a modulação das aferências sinápticas do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial

O MePD recebe aferências neuronais de distintas regiões relacionadas com (1) o processamento e a integração dos estímulos olfativos e vomeronasais; (2) os efeitos moduladores dos hormônios gonadais; e (3) exibição de comportamentos reprodutivos com relevância para perpetuação da espécie, que são orquestrados de forma distinta em ratos machos e fêmeas (Newman, 1999; Simerly, 2004; de Castilhos *et al.*, 2008; Rasia-Filho *et al.*, 2012a; Zancan *et al.*, 2015; Frankiensztajn *et al.*, 2018; Kikusui *et al.*, 2018). Para tanto, a maior parte dos neurônios do MePD projetam-se para o VMN, PMV e MPOA (Choi *et al.*, 2005; Pardo-Bellver *et al.*, 2012) por via direta ou, indiretamente, via BST (Dong *et al.*, 2001) ou via hipocampo/septo (Petrovich *et al.*, 2001). A parte posterior do BST recebe aferências a partir do MePD (Dong *et al.*, 2001; Petrovich *et al.*, 2001; de Olmos *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005; Cooke, 2006). A maioria destas aferências é composta de neurônios GABAérgicos e de uma minoria de neurônios glutamatérgicos (Polston *et al.*, 2004; Poulin *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2018). Os neurônios do BST, por sua vez, projetam-se para as colunas de células neurosecretoras do hipotálamo (Dong e Swanson, 2004; 2006). Por via direta ou multissináptica diretamente nas áreas hipotalâmicas inervadas, originam-se respostas amplas neuroendócrina, comportamental e para ovulação relacionadas com a estimulação elétrica da AMe (Polston *et al.*, 2004).

Em machos, a ativação do MePD durante o acasalamento provavelmente desinibe as áreas cerebrais envolvidas no comportamento sexual e induz a ocorrência sequencial de percepção de odores femininos, intromissão peniana, ejaculação e saciedade sexual (Coolen *et al.*, 1997; Rasia-Filho *et al.*, 2012a,b; Petrulis, 2013). Demonstramos que as aferências excitatórias nos neurônios inibitórios do MePD de machos estão consideravelmente aumentadas. Estudos prévios indicam que os neurônios do MePD de machos projetam-se para o BST como

uma via eferente preponderante (de Olmos et al., 2004; Choi et al., 2005; Pardo-Bellver et al., 2012). Os neurônios GABAérgicos do BST, por sua vez, projetam-se para os núcleos hipotalâmicos (Dong et al., 2001). Portanto, os neurônios do MePD poderiam desinibir atividade dos neurônios hipotalâmicos por uma via indireta, pela inibição dos neurônios GABAérgicos do BST (Figura 8A).

Em fêmeas, o MePD modula a secreção neuroendócrina hipotalâmica, ovulação e receptividade sexual (Simerly, 2004; Carney *et al.*, 2010). Aliado às demandas decorrentes dos circuitos neurais onde se encontra o MePD, esta é uma clara indicação de que os hormônios sexuais provavelmente são os principais elementos moduladores do processamento sináptico dinâmico que ocorre ao longo do ciclo estral. Desta forma pode-se inferir que existe uma forma de controle para modular o processamento das aferências sinápticas que chegam ao MePD nas fêmeas, de acordo com os níveis dos hormônios ovarianos (Oro *et al.*, 1988; Lehmann e Erskine, 2005; de Castilhos *et al.*, 2008; Brusco *et al.*, 2014; Zancan *et al.*, 2015). Com base nisso, sugere-se que a organização dendrítica e funcional dos neurônios do MePD poderiam alterar o impacto inibitório de suas projeções aos circuitos hipotalâmicos durante a fase do proestro. Nesta fase, as aferências inibitórias estão consideravelmente aumentadas no MePD. Portanto, tendo em vista que as eferências do MePD são predominantemente inibitórias, isso poderia resultar no aumento do estímulo ou da desinibição da atividade dos neurônios hipotalâmicos por via direta (Figura 8B). Como, por exemplo, (1) da MPOA relacionada com comportamentos pró-receptivos (Hoshina *et al.*, 1994; Spiteri *et al.*, 2012); (2) do VMN relacionado com o reflexo de lordose (Musatov *et al.*, 2006); (3) de AVPV (Simerly, 2004; Wang *et al.*, 2016) e PMV (Cavalcante *et al.*, 2014) relacionados com a secreção de GnRH (Cavalcante *et al.*, 2006); e (4) do AVPV para o Arc, de forma indireta, para liberação de prolactina (Gu e Simerly, 1997; Rasia-Filho *et al.*, 2012a,b). Assim, quando o período do proestro termina ao longo de cada ciclo de 4-5 dias, os neurônios do MePD podem começar a reestabelecer as características morfofuncionais da fase do diestro que resulta em implicações no controle inibitório da liberação de GnRH e da receptividade sexual (Rasia-Filho *et al.*, 2004; de Castilhos *et al.*, 2008; Spiteri *et al.*, 2012; Donato *et al.*, 2013).

Nossos dados experimentais nos permitem concluir que os efeitos do dimorfismo sexual, do ciclo estral e da lateralização hemisférica determinam a funcionalidade das subpopulações de neurônios multipolares do MePD de ratos adultos. Sendo assim, o presente estudo confirma a existência da plasticidade e a diversidade morfológica dos neurônios dessa região, que dependente da ação contínua ou da secreção cíclica e dinâmica dos hormônios gonadais em circulação, pelas mudanças funcionais no processamento sináptico e sua implicação na circuitaria neuronal associada. Deste modo, essa diversidade morfofuncional do MePD pode ser considerada um substrato neural para a modulação de circuitos neurais complexos que regulam os comportamentos sociais, mormente o reprodutivo em ratos.

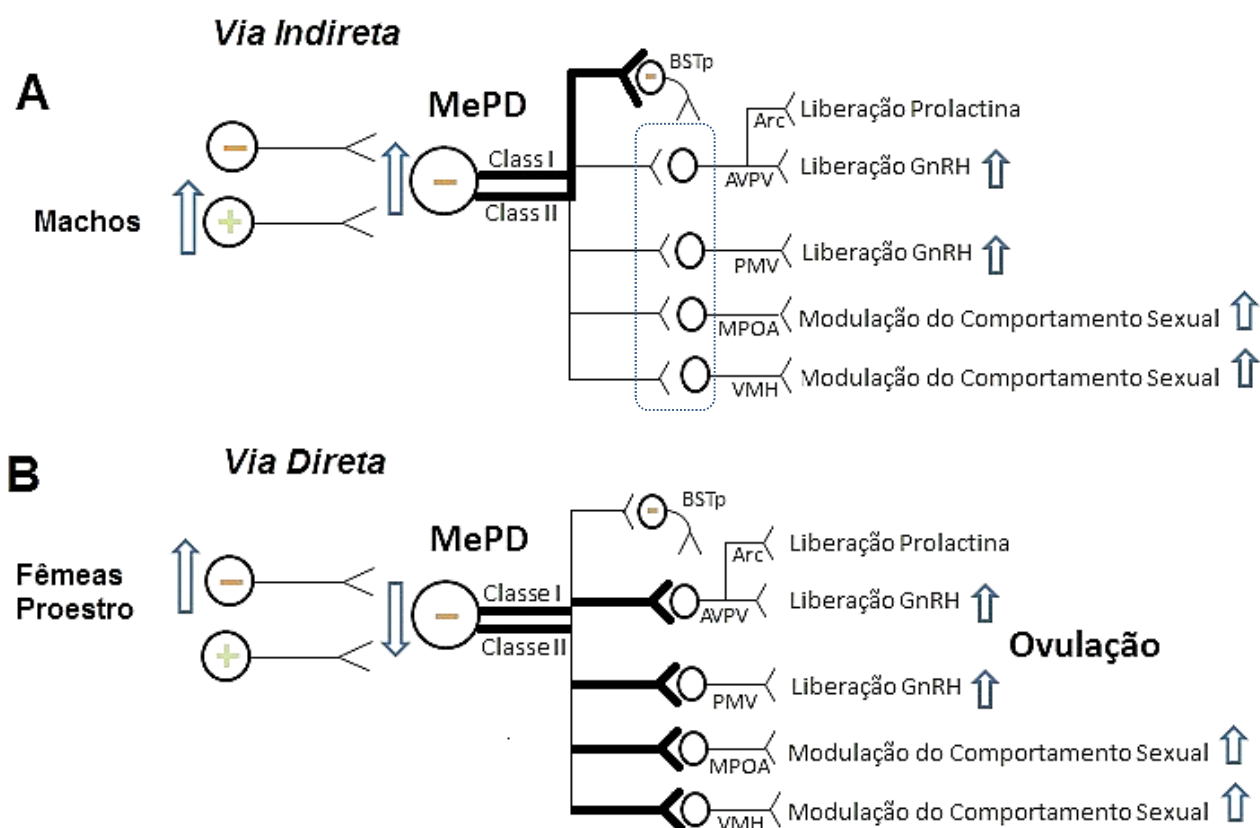


Figura 8: Modelo proposto de circuitos neurais modulados pelas aferências sinápticas no MePD. (A) Em machos, o aumento das aferências excitatórias nos neurônios inibitórios do MePD resulta em uma maior inibição dos neurônios GABAérgicos do BST que diminui a inibição sobre a atividade dos neurônios hipotalâmicos (desinibição por via indireta). **(B)** Em fêmeas, o aumento das aferências inibitórias nos neurônios do MePD resulta no aumento do estímulo da atividade dos neurônios hipotalâmicos (desinibição por via direta). A espessura das linhas representa a densidade das projeções. Arc, núcleo arqueado; AVPV, núcleo periventricular ântero-ventral; BST, núcleo próprio da estria terminal; MePD, subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial; MPOA, área pré-óptica medial do hipotálamo; PMV, núcleo pré-mamilar ventral; VMH, núcleo hipotalâmico ventromedial.

6. CONCLUSÃO

Em suma, nossos dados nos permitem concluir que:

- O MePD de ratos possui dois tipos de neurônios classificados por suas propriedades eletrofisiológicas intrínsecas de membrana capazes de responder de forma distinta aos estímulos aferentes e integrar a circuitaria local para processar a resposta comportamental mais apropriada de acordo com o contexto do animal.
- Ambas as classes de neurônios foram encontradas no MePD de ambos os hemisférios de machos e fêmeas ao longo do ciclo estral o que representa uma característica constitutiva dessa região, e não apenas um achado relacionado a uma característica funcional restrita a um único sexo ou hemisfério.
- O sexo, o ciclo estral e a lateralização hemisférica determinam as aferências sinápticas que chegam ao MePD. Essa atividade sináptica pode ser importante para a modulação das eferências do MePD para as regiões alvo como, por exemplo, núcleos hipotalâmicos relacionados com o controle da liberação hormonal e do comportamento sexual.
- De acordo com a circuitaria aferente do MePD caracterizada neste estudo, sugerimos a hipótese de que a informação eferente dessa região é transmitida para núcleos hipotalâmicos por vias distintas de acordo com o sexo, sendo, provavelmente, por via direta em fêmeas e indireta em machos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abellán, A. e Medina, L. (2009). Subdivisions and derivatives of the chicken subpallium based on expression of LIM and other regulatory genes and markers of neuron subpopulations during development. *J Comp Neurol* **515**, 465-501.

Adamec, R. E. e Morgan, H. D. (1994). The effect of kindling of different nuclei in the left and right amygdala on anxiety in the rat. *Physiol Behav* **55**, 1-12.

Adekunbi, D. A., Li, X. F., Lass, G., Shetty, K., Adegoke, O. A., Yeo, S. H., Colledge, W. H., Lightman, S. L., O'Byrne, K. T. (2018). Kisspeptin neurones in the posterodorsal medial amygdala modulate sexual partner preference and anxiety in male mice. *J Neuroendocrinol* **30**, 1-9.

Alheid, G. F. (2003). Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci* **985**, 185-205.

Alheid, G. F., de Olmos, J. S., Beltramino, C. A. (1995). Amygdala and extended amygdala. In *The Rat Nervous System*. (ed. G. Paxinos), pp. 495-498. San Diego: Academic Press.

Andrew, R. J., Osorio, D., Budaev, S. (2009). Light during embryonic development modulates patterns of lateralization strongly and similarly in both zebrafish and chick. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 983-9.

Arpini, M., Menezes, I. C., Dall'Oglio, A., Rasia-Filho, A. A. (2010). The density of Golgi-impregnated dendritic spines from adult rat posterodorsal medial amygdala neurons displays no evidence of hemispheric or dorsal/ventral differences. *Neurosci Lett* **469**, 209-13.

Baas, D., Aleman, A., Kahn, R. S. (2004). Lateralization of amygdala activation: a systematic review of functional neuroimaging studies. *Brain Res Brain Res Rev* **45**, 96-103.

Becker, R. O., Rasia-Filho, A. A., Giovenardi, M. (2017). Selective deletion of the oxytocin gene remodels the number and shape of dendritic spines in the medial amygdala of males with and without sexual experience. *Neurosci Lett* **660**, 155-159.

Beltramino, C. e Taleisnik, S. (1978). Facilitatory and inhibitory effects of electrochemical stimulation of the amygdala on the release of luteinizing hormone. *Brain Res* **144**, 95-107.

Ben-Ari, Y., Kanazawa, I., Zigmond, R. E. (1976). Regional distribution of glutamate decarboxylase and gaba within the amygdaloid complex and stria terminalis system of the rat. *J Neurochem* **26**, 1279-83.

Bergan, J. F., Ben-Shaul, Y., Dulac, C. (2014). Sex-specific processing of social cues in the medial amygdala. *Elife* **3**, 1-22.

Bian, X. (2013). Physiological and morphological characterization of GABAergic neurons in the medial amygdala. *Brain Res* **1509**, 8-19.

Bian, X., Yanagawa, Y., Chen, W. R., Luo, M. (2008). Cortical-like functional organization of the pheromone-processing circuits in the medial amygdala. *J Neurophysiol* **99**, 77-86.

Bickart, K. C., Wright, C. I., Dautoff, R. J., Dickerson, B. C., Barrett, L. F. (2011). Amygdala volume and social network size in humans. *Nat Neurosci* **14**, 163-4.

Blake, C. B. e Meredith, M. (2010). Selective enhancement of main olfactory input to the medial amygdala by GnRH. *Brain Res* **1317**, 46-59.

Blake, C. B. e Meredith, M. (2011). Change in number and activation of androgen receptor-immunoreactive cells in the medial amygdala in response to chemosensory input. *Neuroscience* **190**, 228-38.

Blume, S. R., Freedberg, M., Vantrease, J. E., Chan, R., Padival, M., Record, M. J., DeJoseph, M. R., Urban, J. H., Rosenkranz, J. A. (2017). Sex- and Estrus-Dependent Differences in Rat Basolateral Amygdala. *J Neurosci* **37**, 10567-10586.

Bressler, S. C. e Baum, M. J. (1996). Sex comparison of neuronal Fos immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. *Neuroscience* **71**, 1063-72.

Brusco, J. (2012). Amígdala medial de ratos ao longo do ciclo estral: espinhos dendríticos, ultraestrutura sináptica, expressão gênica e lateralidade. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Brusco, J., Dall'Oglio, A., Rocha, L. B., Rossi, M. A., Moreira, J. E., Rasia-Filho, A. A. (2010). Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial amygdala. *Neurosci Lett* **483**, 152-6.

Brusco, J., Merlo, S., Ikeda, E. T., Petralia, R. S., Kachar, B., Rasia-Filho, A. A., Moreira, J. E. (2014). Inhibitory and multisynaptic spines, and hemispherical synaptic specialization in the posterodorsal medial amygdala of male and female rats. *J Comp Neurol* **522**, 2075-88.

Bupesh, M., Legaz, I., Abellan, A., Medina, L. (2011). Multiple telencephalic and extratelencephalic embryonic domains contribute neurons to the medial extended amygdala. *J Comp Neurol* **519**, 1505-25.

Burgos-Robles, A., Kimchi, E. Y., Izadmehr, E. M., Porzenheim, M. J., Ramos-Guasp, W. A., Nieh, E. H., Felix-Ortiz, A. C., Namburi, P., Leppla, C. A., Presbrey, K. N. et al. (2017). Amygdala inputs to prefrontal cortex guide behavior amid conflicting cues of reward and punishment. *Nat Neurosci* **20**, 824-835.

Cádiz-Moretti, B., Otero-Garcia, M., Martinez-Garcia, F., Lanuza, E. (2014). Afferent projections to the different medial amygdala subdivisions: a retrograde tracing study in the mouse. *Brain Struct Funct* **221**, 1033-65.

Cahill, L. (2006). Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci* **7**, 477-84.

Cahill, L., Uncapher, M., Kilpatrick, L., Alkire, M. T., Turner, J. (2004). Sex-related hemispheric lateralization of amygdala function in emotionally influenced memory: an fMRI investigation. *Learn Mem* **11**, 261-6.

Calcagnotto, M. E. (2016). Interneurons: role in maintaining and restoring synaptic plasticity. *Front Psychiatry* **7**, 86.

Calcagnotto, M. E., Paredes, M. F., Baraban, S. C. (2002). Heterotopic neurons with altered inhibitory synaptic function in an animal model of malformation-associated epilepsy. *J Neurosci* **22**, 7596-605.

Canteras, N. S., Simerly, R. B., Swanson, L. W. (1992). Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J Comp Neurol* **324**, 143-79.

Canteras, N. S., Simerly, R. B., Swanson, L. W. (1995). Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* **360**, 213-45.

Carney, R. S., Mangin, J. M., Hayes, L., Mansfield, K., Sousa, V. H., Fishell, G., Machold, R. P., Ahn, S., Gallo, V., Corbin, J. G. (2010). Sonic hedgehog expressing and responding cells generate neuronal diversity in the medial amygdala. *Neural Dev* **5**, 14.

Cavalcante, J. C., Bittencourt, J. C., Elias, C. F. (2014). Distribution of the neuronal inputs to the ventral preammillary nucleus of male and female rats. *Brain Res* **1582**, 77-90.

Cavalcante, J. C., Sita, L. V., Mascaró, M. B., Bittencourt, J. C., Elias, C. F. (2006). Distribution of urocortin 3 neurons innervating the ventral preammillary nucleus in the rat brain. *Brain Res* **1089**, 116-25.

Chang, S. W., Brent, L. J., Adams, G. K., Klein, J. T., Pearson, J. M., Watson, K. K., Platt, M. L. (2013). Neuroethology of primate social behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110 Suppl 2**, 10387-94.

- Petrulis, A.** (2013). Chemosignals, hormones and mammalian reproduction. *Horm Behav* **63**, 723-41.
- Pfau, D. R., Hobbs, N. J., Breedlove, S. M., Jordan, C. L.** (2016). Sex and laterality differences in medial amygdala neurons and astrocytes of adult mice. *J Comp Neurol* **524**, 2492-502.
- Pfaus, J. G. e Heeb, M. M.** (1997). Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Res Bull* **44**, 397-407.
- Phillips-Farfán, B. V., Lemus, A. E., Fernandez-Guasti, A.** (2007). Increased estrogen receptor alpha immunoreactivity in the forebrain of sexually satiated rats. *Horm Behav* **51**, 328-34.
- Pielecka-Fortuna, J., Chu, Z., Moenter, S. M.** (2008). Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology* **149**, 1979-86.
- Pitkänen, A.** (2000). Connectivity of the rat amygdaloid complex. In *The amygdala: a functional analysis.*, (ed. J. P. Aggleton), pp. 31-115. Oxford: Oxford University Press.
- Pitkänen, A., Savander, V., LeDoux, J. E.** (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* **20**, 517-23.
- Polston, E. K., Gu, G., Simerly, R. B.** (2004). Neurons in the principal nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis provide a sexually dimorphic GABAergic input to the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience* **123**, 793-803.
- Poulin, J. F., Arbour, D., Laforest, S., Drolet, G.** (2009). Neuroanatomical characterization of endogenous opioids in the bed nucleus of the stria terminalis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**, 1356-65.
- Price, C.** (1987). The limbic region II: the amygdaloid complex. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy.*, (eds A. Bjorklund, T. Hokfelt and L. W. Swanson), pp. 279-388. Amsterdam: Elsevier.
- Pro-Sistiaga, P., Mohedano-Moriano, A., Ubeda-Banon, I., Del Mar Arroyo-Jimenez, M., Marcos, P., Artacho-Perula, E., Crespo, C., Insausti, R., Martinez-Marcos, A.** (2007). Convergence of olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon. *J Comp Neurol* **504**, 346-62.
- Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S., Rubenstein, J. L.** (2000). Pallial and subpallial derivatives in the

- Cheong, R. Y., Czieselsky, K., Porteous, R., Herbison, A. E.** (2015). Expression of ESR1 in glutamatergic and GABAergic neurons is essential for normal puberty onset, estrogen feedback, and fertility in female mice. *J Neurosci* **35**, 14533-43.
- Chiou, R. J., Kuo, C. C., Yen, C. T.** (2014). Comparisons of terminal densities of cardiovascular function-related projections from the amygdala subnuclei. *Auton Neurosci* **181**, 21-30.
- Choi, G. B., Dong, H. W., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Swanson, L. W., Anderson, D. J.** (2005). Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron* **46**, 647-60.
- Cooke, B. M.** (2006). Steroid-dependent plasticity in the medial amygdala. *Neuroscience* **138**, 997-1005.
- Cooke, B. M., Breedlove, S. M., Jordan, C. L.** (2003). Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. *Horm Behav* **43**, 336-46.
- Cooke, B. M., Stokas, M. R., Woolley, C. S.** (2007). Morphological sex differences and laterality in the prepubertal medial amygdala. *J Comp Neurol* **501**, 904-15.
- Cooke, B. M. e Woolley, C. S.** (2005). Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *J Neurosci* **25**, 10759-67.
- Cooke, B. M. e Woolley, C. S.** (2009). Effects of prepubertal gonadectomy on a male-typical behavior and excitatory synaptic transmission in the amygdala. *Dev Neurobiol* **69**, 141-52.
- Coolen, L. M., Peters, H. J., Veening, J. G.** (1996). Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res* **738**, 67-82.
- Coolen, L. M., Peters, H. J., Veening, J. G.** (1997). Distribution of Fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain. *Neuroscience* **77**, 1151-61.
- Coolen, L. M. e Wood, R. I.** (1999). Testosterone stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala in the control of male hamster sexual behavior: redundancy without amplification. *Behav Brain Res* **98**, 143-53.
- Cunningham, R. L., Claiborne, B. J., McGinnis, M. Y.** (2007). Pubertal exposure to anabolic androgenic steroids increases spine densities on neurons in the limbic system of male rats. *Neuroscience* **150**, 609-15.

Dall'Oglio, A. (2007). Morfologia dendrítica de neurônios do núcleo medial da amígdala de ratos: um estudo pela técnica de Golgi. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Dall'Oglio, A., Dutra, A. C., Moreira, J. E., Rasia-Filho, A. A. (2015). The human medial amygdala: structure, diversity, and complexity of dendritic spines. *J Anat* **227**, 440-59.

Dall'Oglio, A., Gehlen, G., Achaval, M., Rasia-Filho, A. A. (2008a). Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the "ventral" medial amygdala subnuclei of adult male and female rats. *Neurosci Lett* **439**, 287-92.

Dall'Oglio, A., Gehlen, G., Achaval, M., Rasia-Filho, A. A. (2008b). Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: further data based on the Golgi method. *Neurosci Lett* **430**, 151-6.

Dall'Oglio, A., Xavier, L. L., Hilbig, A., Ferme, D., Moreira, J. E., Achaval, M., Rasia-Filho, A. A. (2013). Cellular components of the human medial amygdaloid nucleus. *J Comp Neurol* **521**, 589-611.

Dalpian, F., Brusco, J., Calcagnotto, M. E., Moreira, J. E., Rasia-Filho, A. A. (2015). Distribution of glutamate receptors in the posterodorsal medial amygdala of adult male rats. *Histol Histopathol* **30**, 1303-11.

Davern, P. J. e Head, G. A. (2011). Role of the medial amygdala in mediating responses to aversive stimuli leading to hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **38**, 136-43.

Dayas, C. V., Buller, K. M., Crane, J. W., Xu, Y., Day, T. A. (2001). Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci* **14**, 1143-52.

Dayas, C. V., Buller, K. M., Day, T. A. (1999). Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur J Neurosci* **11**, 2312-22.

de Almeida, D. O., Ferreira, H. S., Pereira, L. B., Fregoneze, J. B. (2015). Hypertensive response to stress: the role of histaminergic H1 and H2 receptors in the medial amygdala. *Physiol Behav* **144**, 95-102.

de Castilhos, J., Forti, C. D., Achaval, M., Rasia-Filho, A. A. (2008). Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: a Golgi study. *Brain Res* **1240**, 73-81.

de Castilhos, J., Marcuzzo, S., Forti, C. D., Frey, R. M., Stein, D., Achaval, M., Rasia-Filho, A. A. (2006). Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. *Brain Res Bull* **69**, 131-9.

de Croft, S., Piet, R., Mayer, C., Mai, O., Boehm, U., Herbison, A. E. (2012). Spontaneous kisspeptin neuron firing in the adult mouse reveals marked sex and brain region differences but no support for a direct role in negative feedback. *Endocrinology* **153**, 5384-93.

de Gelder, B. (2006). Towards the neurobiology of emotional body language. *Nat Rev Neurosci* **7**, 242-9.

de Olmos, J., Alheid, G., Beltramino, C. (1985). Amygdala. In *The Rat Nervous System*, (ed. G. Paxinos), pp. 223-234. Sydney: Academic Press.

de Olmos, J., Beltramino, C., Alheid, G. (2004). Amygdala and extended amygdala of the rat: cytoarchitectonical, fibroarchitectonical and chemoarchitectonical survey. In *The Rat Nervous System*, (ed. G. Paxinos), pp. 509-603. Amsterdam: Elsevier Academic Press.

de Vries, G. e Simerly, R. B. (2002). Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. In *Hormones, Brain and Behavior*, (eds D. W. Pfaff , A. P. Arnold, A. M. Etgen, S. E. Fahrback and R. Rubin), pp. 137-191. San Diego: Academic Press.

Dhungel, S., Urakawa, S., Kondo, Y., Sakuma, Y. (2011). Olfactory preference in the male rat depends on multiple chemosensory inputs converging on the preoptic area. *Horm Behav* **59**, 193-9.

Dielenberg, R. A. e McGregor, I. S. (2001). Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci Biobehav Rev* **25**, 597-609.

Dietrich, T., Krings, T., Neulen, J., Willmes, K., Erberich, S., Thron, A., Sturm, W. (2001). Effects of blood estrogen level on cortical activation patterns during cognitive activation as measured by functional MRI. *Neuroimage* **13**, 425-32.

Dominguez, J. M. e Hull, E. M. (2001). Stimulation of the medial amygdala enhances medial preoptic dopamine release: implications for male rat sexual behavior. *Brain Res* **917**, 225-9.

Donato, J., Jr., Lee, C., Ratra, D. V., Franci, C. R., Canteras, N. S., Elias, C. F. (2013). Lesions of the ventral premammillary nucleus disrupt the dynamic changes in Kiss1 and GnRH expression characteristic of the proestrus-estrus transition. *Neuroscience* **241**, 67-79.

Dong, H. W., Petrovich, G. D., Swanson, L. W. (2001). Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Brain Res Rev* **38**, 192-246.

Dong, H. W. e Swanson, L. W. (2004). Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. *J Comp Neurol* **471**, 396-433.

Dong, H. W. e Swanson, L. W. (2006). Projections from bed nuclei of the stria terminalis, dorsomedial nucleus: implications for cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and drinking responses. *J Comp Neurol* **494**, 75-107.

Dumont, E. C., Martina, M., Samson, R. D., Drolet, G., Paré, D. (2002). Physiological properties of central amygdala neurons: species differences. *Eur J Neurosci* **15**, 545-52.

Duncan, G. E., Knapp, D. J., Breese, G. R. (1996). Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res* **713**, 79-91.

Engbers, J. D., Anderson, D., Tadayonnejad, R., Mehaffey, W. H., Molineux, M. L., Turner, R. W. (2011). Distinct roles for I_T and I_H in controlling the frequency and timing of rebound spike responses. *J Physiol* **589**, 5391-413.

Ervin, K. S., Lymer, J. M., Matta, R., Clipperton-Allen, A. E., Kavaliers, M., Choleris, E. (2015). Estrogen involvement in social behavior in rodents: Rapid and long-term actions. *Horm Behav* **74**, 53-76.

Everitt, B. (1995). Limbic lobe and olfactory pathways. In *Gray's Anatomy*, (eds M. M. Berry, L. H. Bannister and S. M. Standring), pp. 1115-1141. London: Churchill Livingstone.

Fernández, G., Weis, S., Stoffel-Wagner, B., Tendolkar, I., Reuber, M., Beyenburg, S., Klaver, P., Fell, J., de Greiff, A., Ruhlmann, J. et al. (2003). Menstrual cycle-dependent neural plasticity in the adult human brain is hormone, task, and region specific. *J Neurosci* **23**, 3790-5.

Filkowski, M. M., Olsen, R. M., Duda, B., Wanger, T. J., Sabatinelli, D. (2017). Sex differences in emotional perception: meta analysis of divergent activation. *Neuroimage* **147**, 925-933.

Fleming, A. S., Vaccarino, F., Luebke, C. (1980). Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat. *Physiol Behav* **25**, 731-43.

Frankiensztajn, L. M., Gur-Pollack, R., Wagner, S. (2018). A combinatorial modulation of synaptic plasticity in the rat medial amygdala by oxytocin, urocortin3 and estrogen. *Psychoneuroendocrinology* **92**, 95-102.

Fujiwara, M., Nitta, A., Chiba, A. (2016). Regulation of sexual odor preference by sex steroids in the posterodorsal medial amygdala in female rats. *Horm Behav* **82**, 46-55.

García-López, M., Abellan, A., Legaz, I., Rubenstein, J. L., Puellas, L., Medina, L. (2008). Histogenetic compartments of the mouse centromedial and extended amygdala based on gene expression patterns during development. *J Comp Neurol* **506**, 46-74.

García-Moreno, F., Pedraza, M., Di Giovannantonio, L. G., Di Salvio, M., Lopez-Mascaraque, L., Simeone, A., De Carlos, J. A. (2010). A neuronal migratory pathway crossing from diencephalon to telencephalon populates amygdala nuclei. *Nat Neurosci* **13**, 680-9.

Gerendai, I., Csaba, Z., Voko, Z., Csernus, V. (1995). Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**, 299-305.

Gréco, B., Allegretto, E. A., Tetel, M. J., Blaustein, J. D. (2001). Coexpression of ER β with ER α and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology* **142**, 5172-81.

Gréco, B., Blasberg, M. E., Kosinski, E. C., Blaustein, J. D. (2003). Response of ER α -IR and ER β -IR cells in the forebrain of female rats to mating stimuli. *Horm Behav* **43**, 444-53.

Gréco, B., Edwards, D. A., Michael, R. P., Clancy, A. N. (1996). Androgen receptor immunoreactivity and mating-induced Fos expression in forebrain and midbrain structures in the male rat. *Neuroscience* **75**, 161-71.

Gréco, B., Edwards, D. A., Michael, R. P., Clancy, A. N. (1998). Androgen receptors and estrogen receptors are colocalized in male rat hypothalamic and limbic neurons that express Fos immunoreactivity induced by mating. *Neuroendocrinology* **67**, 18-28.

Gresham, R., Li, S., Adekunbi, D. A., Hu, M., Li, X. F., O'Byrne, K. T. (2016). Kisspeptin in the medial amygdala and sexual behavior in male rats. *Neurosci Lett* **627**, 13-7.

Grewe, B. F., Grundemann, J., Kitch, L. J., Lecoq, J. A., Parker, J. G., Marshall, J. D., Larkin, M. C., Jercog, P. E., Grenier, F., Li, J. Z. et al. (2017). Neural ensemble dynamics underlying a long-term associative memory. *Nature* **543**, 670-675.

Gu, G. B. e Simerly, R. B. (1997). Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *J Comp Neurol* **384**, 142-64.

Guerra-Araiza, C., Miranda-Martinez, A., Neri-Gomez, T., Camacho-Arroyo, I. (2008). Sex steroids effects on the content of GAD, TH, GABA_A, and glutamate receptors in the olfactory bulb of the male rat. *Neurochem Res* **33**, 1568-73.

- Guillamón, A. e Segovia, S.** (1997). Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res Bull* **44**, 377-82.
- Hall, E.** (1972). Some aspects of the structural organization of the amygdala. In *The Neurobiology of the Amygdala*, (ed. B. E. Eletheriou), pp. 95-121. New York: Plenum Press.
- Hansberg-Pastor, V., Gonzalez-Arenas, A., Pina-Medina, A. G., Camacho-Arroyo, I.** (2015). Sex hormones regulate cytoskeletal proteins involved in brain plasticity. *Front Psychiatry* **6**, 165.
- Hari Dass, S. A. e Vyas, A.** (2014). Copulation or sensory cues from the female augment Fos expression in arginine vasopressin neurons of the posterodorsal medial amygdala of male rats. *Front Zool* **11**, 42.
- Hausmann, M. e Bayer, U.** (2010). Sex hormonal effects on hemispheric asymmetry and interhemispheric interaction. In *The Two Halves of the Brain: Information Processing in the Cerebral Hemispheres.*, (eds K. Hugdahl and R. Westerhausen), pp. 253-283. Cambridge: MIT Press.
- Haydon, P. G.** (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* **2**, 185-93.
- Heimer, L., Harlan, R. E., Alheid, G. F., Garcia, M. M., de Olmos, J.** (1997). Substantia innominata: A notion which impedes clinical-anatomical correlations in neuropsychiatric disorders. *Neuroscience* **76**, 957-1006.
- Heller, J. P. e Rusakov, D. A.** (2017). The nanoworld of the tripartite synapse: insights from super-resolution microscopy. *Front Cell Neurosci* **11**, 374.
- Hermel, E. E.** (2005). Caracterização ultra-estrutural e volumétrica somática dos neurônios do subnúcleo póstero-dorsal da amígdala medial de ratos adultos. Tese (Doutorado em Neurociências) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Hermel, E. E., Faccioni-Heuser, M. C., Marcuzzo, S., Rasia-Filho, A. A., Achaval, M.** (2006a). Ultrastructural features of neurons and synaptic contacts in the posterodorsal medial amygdala of adult male rats. *J Anat* **208**, 565-75.
- Hermel, E. E., Ilha, J., Xavier, L. L., Rasia-Filho, A. A., Achaval, M.** (2006b). Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. *Neurosci Lett* **405**, 153-8.

- Hines, M., Allen, L. S., Gorski, R. A.** (1992). Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res* **579**, 321-6.
- Hirata, T., Li, P., Lanuza, G. M., Cocas, L. A., Huntsman, M. M., Corbin, J. G.** (2009). Identification of distinct telencephalic progenitor pools for neuronal diversity in the amygdala. *Nat Neurosci* **12**, 141-9.
- Hirsch, M. M., Brusco, J., Vaccaro, T., Margis, R., Moreira, J. E., Gottfried, C., Rasia-Filho, A. A.** (2018). Sex differences and estrous cycle changes in synaptic plasticity-related microRNA in the rat medial amygdala. *Neuroscience* **379**, 405-414.
- Hoshina, Y., Takeo, T., Nakano, K., Sato, T., Sakuma, Y.** (1994). Axon-sparing lesion of the preoptic area enhances receptivity and diminishes proceptivity among components of female rat sexual behavior. *Behav Brain Res* **61**, 197-204.
- Isgor, C., Huang, G. C., Akil, H., Watson, S. J.** (2002). Correlation of estrogen beta-receptor messenger RNA with endogenous levels of plasma estradiol and progesterone in the female rat hypothalamus, the bed nucleus of stria terminalis and the medial amygdala. *Brain Res Mol Brain Res* **106**, 30-41.
- Johnson, R. T., Breedlove, S. M., Jordan, C. L.** (2008). Sex differences and laterality in astrocyte number and complexity in the adult rat medial amygdala. *J Comp Neurol* **511**, 599-609.
- Johnson, R. T., Schneider, A., DonCarlos, L. L., Breedlove, S. M., Jordan, C. L.** (2012). Astrocytes in the rat medial amygdala are responsive to adult androgens. *J Comp Neurol* **520**, 2531-44.
- Johnston, J. B.** (1923). Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *The Journal of Comparative Neurology* **35**, 337-481.
- Kalra, P. S. e McCann, S. M.** (1975). The stimulatory effect on gonadotropin release of implants of estradiol or progesterone in certain sites in the central nervous system. *Neuroendocrinology* **19**, 289-302.
- Kang, N., Baum, M. J., Cherry, J. A.** (2009). A direct main olfactory bulb projection to the 'vomeronasal' amygdala in female mice selectively responds to volatile pheromones from males. *Eur J Neurosci* **29**, 624-34.
- Kang, N., McCarthy, E. A., Cherry, J. A., Baum, M. J.** (2011). A sex comparison of the anatomy and function of the main olfactory bulb-medial amygdala projection in mice. *Neuroscience* **172**, 196-204.
- Kepecs, A. e Lisman, J.** (2003). Information encoding and computation with spikes and bursts. *Network* **14**, 103-18.

Keshavarzi, S., Power, J. M., Albers, E. H., Sullivan, R. K., Sah, P. (2015). Dendritic organization of olfactory inputs to medial amygdala neurons. *J Neurosci* **35**, 13020-8.

Keshavarzi, S., Sullivan, R. K., Ianno, D. J., Sah, P. (2014). Functional properties and projections of neurons in the medial amygdala. *J Neurosci* **34**, 8699-715.

Kikusui, T., Kajita, M., Otsuka, N., Hattori, T., Kumazawa, K., Watarai, A., Nagasawa, M., Inutsuka, A., Yamanaka, A., Matsuo, N. et al. (2018). Sex differences in olfactory-induced neural activation of the amygdala. *Behav Brain Res* **346**, 96-104.

Kim, H. J., Kim, N., Kim, S., Hong, S., Park, K., Lim, S., Park, J. M., Na, B., Chae, Y., Lee, J. et al. (2012). Sex differences in amygdala subregions: evidence from subregional shape analysis. *Neuroimage* **60**, 2054-61.

Kobayashi, M. e Buckmaster, P. S. (2003). Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **23**, 2440-52.

Kondo, Y. (1992). Lesions of the medial amygdala produce severe impairment of copulatory behavior in sexually inexperienced male rats. *Physiol Behav* **51**, 939-43.

Kondo, Y. and Sachs, B. D. (2002). Disparate effects of small medial amygdala lesions on noncontact erection, copulation, and partner preference. *Physiol Behav* **76**, 443-7.

Kondo, Y., Sachs, B. D., Sakuma, Y. (1998). Importance of the medial amygdala in rat penile erection evoked by remote stimuli from estrous females. *Behav Brain Res* **91**, 215-22.

Kubo, T., Okatani, H., Nishigori, Y., Hagiwara, Y., Fukumori, R., Goshima, Y. (2004). Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats. *Neurosci Lett* **354**, 84-6.

Kubota, Y., Karube, F., Nomura, M., Kawaguchi, Y. (2016). The diversity of cortical inhibitory synapses. *Front Neural Circuits* **10**, 27.

LeDoux, J. (1992). Emotion and the amygdala. In *The amygdala*, (ed. J. Aggleton), pp. 339-351. New York: Academic Press.

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

Lehmann, M. L., McKellar, H., Erskine, M. S. (2005). Coding for the initiation of pseudopregnancy by temporally patterned activation of amygdalar NMDA receptors. *J Neurosci* **25**, 8696-703.

- Levine, J. E.** (2015). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, (eds T. Plant and A. Zeleznik), pp. 1199-1257: Academic Press.
- Li, Y., Mathis, A., Grewe, B. F., Osterhout, J. A., Ahanonu, B., Schnitzer, M. J., Murthy, V. N., Dulac, C.** (2017). Neuronal representation of social information in the medial amygdala of awake behaving mice. *Cell* **171**, 1176-1190.
- Liguz-Leczna, M., Urban-Ciecko, J., Kossut, M.** (2016). Somatostatin and somatostatin-containing neurons in shaping neuronal activity and plasticity. *Front Neural Circuits* **10**, 1-15.
- Lima, L. B., Haubenthal, F. T., Silveira, M. A., Bohlen, T. M., Metzger, M., Donato, J. Jr., Frazao, R.** (2018). Conspecific odor exposure predominantly activates non-kisspeptin cells in the medial nucleus of the amygdala. *Neurosci Lett* **681**, 12-16.
- Lin, Y., Li, X., Lupi, M., Kinsey-Jones, J. S., Shao, B., Lightman, S. L., O'Byrne, K. T.** (2011). The role of the medial and central amygdala in stress-induced suppression of pulsatile LH secretion in female rats. *Endocrinology* **152**, 545-55.
- Lischinsky, J. E., Sokolowski, K., Li, P., Esumi, S., Kamal, Y., Goodrich, M., Oboti, L., Hammond, T. R., Krishnamoorthy, M., Feldman, D., Huntsman, M., Liu, J., Corbin, J. G.** (2017). Embryonic transcription factor expression in mice predicts medial amygdala neuronal identity and sex-specific responses to innate behavioral cues. *Elife* **6**, 1-24.
- Lisofsky, N., Lindenberger, U., Kuhn, S.** (2015). Amygdala/hippocampal activation during the menstrual cycle: evidence for lateralization of effects across different tasks. *Neuropsychologia* **67**, 55-62.
- Llinás, R. R.** (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* **242**, 1654-64.
- Lopes, D. A., Souza, T. M. O., de Andrade, J. S., Silva, M. F. S., Antunes, H. K. M., Sueur-Maluf, L. L., Cespedes, I. C., Viana, M. B.** (2018). Environmental enrichment decreases avoidance responses in the elevated T-maze and delta FosB immunoreactivity in anxiety-related brain regions. *Behav Brain Res* **344**, 65-72.
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., Tanno, A. P.** (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* **62**, 609-14.
- Marcuzzo, S., Dall'Oglio, A., Ribeiro, M. F., Achaval, M., Rasia-Filho, A. A.** (2007). Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. *Neurosci Lett* **424**, 16-21.

Martel, K. L. e Baum, M. J. (2009). A centrifugal pathway to the mouse accessory olfactory bulb from the medial amygdala conveys gender-specific volatile pheromonal signals. *Eur J Neurosci* **29**, 368-76.

Martinez, F. G., Hermel, E. E., Xavier, L. L., Viola, G. G., Riboldi, J., Rasia-Filho, A. A., Achaval, M. (2006). Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats. *Brain Res* **1108**, 117-26.

Masini, C. V., Sasse, S. K., Garcia, R. J., Nyhuis, T. J., Day, H. E., Campeau, S. (2009). Disruption of neuroendocrine stress responses to acute ferret odor by medial, but not central amygdala lesions in rats. *Brain Res* **1288**, 79-87.

McCarthy, E. A., Maqsudlu, A., Bass, M., Georghiou, S., Cherry, J. A., Baum, M. J. (2017). DREADD-induced silencing of the medial amygdala reduces the preference for male pheromones and the expression of lordosis in estrous female mice. *Eur J Neurosci* **46**, 2035-2046.

McDonald, A. J. (1992). Cell types and intrinsic connections of the amygdala. In *The Amygdala*, (ed. J. P. Aggleton), pp. 67-92. New York: Wiley-Liss.

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

McEwen, B. S. (2012). Endocrine effects on the brain and their relationship to behavior. In *Basic Neurochemistry*, pp. 945-962: Elsevier.

McKinney, R. A. (2010). Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling. *J Physiol* **588**, 107-16.

Meredith, M. e Westberry, J. M. (2004). Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. *J Neurosci* **24**, 5719-25.

Mizukami, S., Nishizuka, M., Arai, Y. (1983). Sexual difference in nuclear volume and its ontogeny in the rat amygdala. *Exp Neurol* **79**, 569-75.

Molineux, M. L., Mehaffey, W. H., Tadayonnejad, R., Anderson, D., Tennent, A. F., Turner, R. W. (2008). Ionic factors governing rebound burst phenotype in rat deep cerebellar neurons. *J Neurophysiol* **100**, 2684-701.

Morris, J. A., Jordan, C. L., Breedlove, S. M. (2004). Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nat Neurosci* **7**, 1034-9.

Morris, J. A., Jordan, C. L., Breedlove, S. M. (2008). Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is independent of circulating androgens and regional volume in adult rats. *J Comp Neurol* **506**, 851-9.

Morris, J. A., Jordan, C. L., Dugger, B. N., Breedlove, S. M. (2005). Partial demasculinization of several brain regions in adult male (XY) rats with a dysfunctional androgen receptor gene. *J Comp Neurol* **487**, 217-26.

Mugnaini, E. e Oertel, W. H. (1985). An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, (ed. A. H. Bjorklund), pp. 436-595. Amsterdam: Elsevier.

Musatov, S., Chen, W., Pfaff, D. W., Kaplitt, M. G., Ogawa, S. (2006). RNAi-mediated silencing of estrogen receptor α in the ventromedial nucleus of hypothalamus abolishes female sexual behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10456-10460.

Neckel, H., Quagliotto, E., Casali, K. R., Montano, N., Dal Lago, P., Rasia-Filho, A. A. (2012). Glutamate and GABA in the medial amygdala induce selective central sympathetic/parasympathetic cardiovascular responses. *Can J Physiol Pharmacol* **90**, 525-36.

Newman, S. W. (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann N Y Acad Sci* **877**, 242-57.

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

Niimi, K., Horie, S., Yokosuka, M., Kawakami-Mori, F., Tanaka, K., Fukayama, H., Sahara, Y. (2012). Heterogeneous electrophysiological and morphological properties of neurons in the mouse medial amygdala in vitro. *Brain Res* **1480**, 41-52.

Nishizuka, M. e Arai, Y. (1981). Sexual dimorphism in synaptic organization in the amygdala and its dependence on neonatal hormone environment. *Brain Res* **212**, 31-8.

Nishizuka, M. e Arai, Y. (1983). Male-female differences in the intra-amygdaloid input to the medial amygdala. *Exp Brain Res* **52**, 328-32.

Noack, J., Murau, R., Engelmann, M. (2015). Consequences of temporary inhibition of the medial amygdala on social recognition memory performance in mice. *Front Neurosci* **9**, 152.

Oberlander, J. G. e Erskine, M. S. (2008). Receipt of vaginal-cervical stimulation modifies synapsin content in limbic areas of the female rat. *Neuroscience* **153**, 581-93.

- Oro, A. E., Simerly, R. B., Swanson, L. W.** (1988). Estrous cycle variations in levels of cholecystokinin immunoreactivity within cells of three interconnected sexually dimorphic forebrain nuclei. Evidence for a regulatory role for estrogen. *Neuroendocrinology* **47**, 225-35.
- Ottersen, O. P.** (1980). Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat: II. Afferents from the hypothalamus and the basal telencephalon. *J Comp Neurol* **194**, 267-89.
- Ottersen, O. P.** (1982). Connections of the amygdala of the rat. IV: corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* **205**, 30-48.
- Pardo-Bellver, C., Cádiz-Moretti, B., Novejarque, A., Martínez-García, F., Lanuza, E.** (2012). Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice. *Front Neuroanat* **6**, 33.
- Paredes, J., Winters, R. W., Schneiderman, N., McCabe, P. M.** (2000). Afferents to the central nucleus of the amygdala and functional subdivisions of the periaqueductal gray: neuroanatomical substrates for affective behavior. *Brain Res* **887**, 157-73.
- Paxinos, G. e Watson, C.** (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pedroarena, C. M.** (2010). Mechanisms supporting transfer of inhibitory signals into the spike output of spontaneously firing cerebellar nuclear neurons in vitro. *Cerebellum* **9**, 67-76.
- Pereno, G. L., Balaszczuk, V., Beltramino, C. A.** (2011). Detection of conspecific pheromones elicits fos expression in GABA and calcium-binding cells of the rat vomeronasal system-medial extended amygdala. *J Physiol Biochem* **67**, 71-85.
- Pereno, G. L., Balaszczuk, V., Beltramino, C. A.** (2012). Effect of sex differences and gonadal hormones on kainic acid-induced neurodegeneration in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Exp Toxicol Pathol* **64**, 283-9.
- Pérez-Laso, C., Segovia, S., Collado, P., Rodríguez-Zafra, M., Del Abril, A., Guillamon, A.** (1997). Estradiol masculinizes the number of accessory olfactory bulb mitral cells in the rat. *Brain Res Bull* **42**, 227-30.
- Peron, S. P. e Gabbiani, F.** (2009). Role of spike-frequency adaptation in shaping neuronal response to dynamic stimuli. *Biol Cybern* **100**, 505-20.
- Petrovich, G. D., Canteras, N. S., Swanson, L. W.** (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Brain Res Rev* **38**, 247-89.

embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol* **424**, 409-38.

Puelles, L., Morales-Delgado, N., Merchan, P., Castro-Robles, B., Martinez-de-la-Torre, M., Diaz, C., Ferran, J. L. (2016). Radial and tangential migration of telencephalic somatostatin neurons originated from the mouse diagonal area. *Brain Struct Funct* **221**, 3027-65.

Quagliano, E., Giustetto, M., Panzanelli, P., Cantino, D., Fasolo, A., Sasso-Pognetto, M. (1999). Immunocytochemical localization of glutamate and gamma-aminobutyric acid in the accessory olfactory bulb of the rat. *J Comp Neurol* **408**, 61-72.

Quagliotto, E. (2006). Efeito da microinjeção de histamina e metil-histamina no núcleo pósterodorsal da amígdala medial sobre o controle da pressão arterial em ratos. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Quagliotto, E., Casali, K. R., Dal Lago, P., Rasia-Filho, A. A. (2015). Neuropeptides in the posterodorsal medial amygdala modulate central cardiovascular reflex responses in awake male rats. *Braz J Med Biol Res* **48**, 128-39.

Quagliotto, E., Casali, K. R., Dal Lago, P., Rasia-Filho, A. A. (2012). Neurotransmitter and neuropeptidergic modulation of cardiovascular responses evoked by the posterodorsal medial amygdala of adult male rats. In *Amygdala: Structure, Functions and Disorders*, (ed. D. Yilmazer-Hanke). Hauppauge: Nova Science Publishers.

Quagliotto, E., Neckel, H., Riveiro, D. F., Casali, K. R., Mostarda, C., Irigoyen, M. C., Dal Lago, P., Rasia-Filho, A. A. (2008). Histamine in the posterodorsal medial amygdala modulates cardiovascular reflex responses in awake rats. *Neuroscience* **157**, 709-19.

Ramón y Cajal, S. (1995). Neurons: size and general morphology. In *Histology of the Nervous System.*, (eds N. Swanson and S. W. Swanson), pp. 46-57. New York: Oxford University Press. (traduzido da edição francesa de 1909)

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

Rasia-Filho, A. A., Dalpian, F., Menezes, I. C., Brusco, J., Moreira, J. E., Cohen, R. S. (2012a). Dendritic spines of the medial amygdala: plasticity, density, shape, and subcellular modulation by sex steroids. *Histol Histopathol* **27**, 985-1011.

Rasia-Filho, A. A., Fabian, C., Rigoti, K. M., Achaval, M. (2004). Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience* **126**, 839-47.

Rasia-Filho, A. A., Haas, D., de Oliveira, A. P., de Castilhos, J., Frey, R., Stein, D., Lazzari, V. M., Back, F., Pires, G. N., Pavesi, E. et al. (2012b). Morphological and functional features of the sex steroid-responsive posterodorsal medial amygdala of adult rats. *Mini Rev Med Chem* **12**, 1090-106.

Rasia-Filho, A. A., Londero, R. G. and Achaval, M. (1999). Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. *Brain Res Bull* **48**, 173-83.

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

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

Remedios, R., Subramanian, L., Tole, S. (2004). LIM genes parcellate the embryonic amygdala and regulate its development. *J Neurosci* **24**, 6986-90.

Rocheffort, N. L. e Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Rep* **13**, 699-708.

Ropert, N., Miles, R., Korn, H. (1990). Characteristics of miniature inhibitory postsynaptic currents in CA1 pyramidal neurones of rat hippocampus. *J Physiol* **428**, 707-22.

Ruiz-Reig, N., Andres, B., Lamonerie, T., Theil, T., Fairen, A., Studer, M. (2018). The caudo-ventral pallium is a novel pallial domain expressing Gdf10 and generating Ebf3-positive neurons of the medial amygdala. *Brain Struct Funct* **223**, 3279-3295.

Sah, P. (1996). Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* **19**, 150-154.

Sah, P., Faber, E. S., Lopez De Armentia, M., Power, J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* **83**, 803-34.

Sah, P. e Westbrook, R. F. (2008). Behavioural neuroscience: the circuit of fear. *Nature* **454**, 589-90.

Sanchez, M. A. e Dominguez, R. (1995). Differential effects of unilateral lesions in the medial amygdala on spontaneous and induced ovulation. *Brain Res Bull* **38**, 313-7.

- Sanes, J. R. e Jessell, T. M.** (2013). The formation and regeneration of synapses. In *Principles of Neural Science*, (eds E. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum and A. J. Hudspeth), pp. 1233-1258. New York: McGraw Hill.
- Sangrey, T. e Jaeger, D.** (2010). Analysis of distinct short and prolonged components in rebound spiking of deep cerebellar nucleus neurons. *Eur J Neurosci* **32**, 1646-57.
- Scalia, F. e Winans, S. S.** (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* **161**, 31-55.
- Schneider, S., Peters, J., Bromberg, U., Brassens, S., Menz, M. M., Miedl, S. F., Loth, E., Banaschewski, T., Barbot, A., Barker, G. et al.** (2011). Boys do it the right way: sex-dependent amygdala lateralization during face processing in adolescents. *Neuroimage* **56**, 1847-53.
- Segal, M.** (2005). Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat Rev Neurosci* **6**, 277-84.
- Segal, M.** (2010). Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. *Eur J Neurosci* **31**, 2178-84.
- Sellers, K., Raval, P., Srivastava, D. P.** (2015). Molecular signature of rapid estrogen regulation of synaptic connectivity and cognition. *Front Neuroendocrinol* **36**, 72-89.
- Shao, L. R. e Dudek, F. E.** (2005). Changes in mIPSCs and sIPSCs after kainate treatment: evidence for loss of inhibitory input to dentate granule cells and possible compensatory responses. *J Neurophysiol* **94**, 952-60.
- Sheehan, T., Paul, M., Amaral, E., Numan, M. J., Numan, M.** (2001). Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. *Neuroscience* **106**, 341-56.
- Shemesh, Y., Forkosh, O., Mahn, M., Anpilov, S., Sztainberg, Y., Manashirov, S., Shlapobersky, T., Elliott, E., Tabouy, L., Ezra, G. et al.** (2016). Ucn3 and CRF-R2 in the medial amygdala regulate complex social dynamics. *Nat Neurosci* **19**, 1489-1496.
- Shin, J. W., Geerling, J. C., Loewy, A. D.** (2008). Inputs to the ventrolateral bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* **511**, 628-57.
- Shinoda, K., Nagano, M., Osawa, Y.** (1994). Neuronal aromatase expression in preoptic, strial, and amygdaloid regions during late prenatal and early postnatal development in the rat. *J Comp Neurol* **343**, 113-29.
- Shughrue, P. J., Lane, M. V., Merchenthaler, I.** (1997). Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **388**, 507-25.

- Simerly, R. B.** (2002). Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu Rev Neurosci* **25**, 507-36.
- Simerly, R. B.** (2004). Anatomical substrates of hypothalamic integration. In *The Rat Nervous System*, (ed. G. Paxinos), pp. 335-368: Academic Press.
- Simerly, R. B., Chang, C., Muramatsu, M., Swanson, L. W.** (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* **294**, 76-95.
- Singewald, N., Chicchi, G. G., Thurner, C. C., Tsao, K. L., Spetea, M., Schmidhammer, H., Sreepathi, H. K., Ferraguti, F., Singewald, G. M., Ebner, K.** (2008). Modulation of basal and stress-induced amygdaloid substance P release by the potent and selective NK1 receptor antagonist L-822429. *J Neurochem* **106**, 2476-88.
- Singletary, S. J., Kirsch, A. J., Watson, J., Karim, B. O., Huso, D. L., Hurn, P. D., Murphy, S. J.** (2005). Lack of correlation of vaginal impedance measurements with hormone levels in the rat. *Contemp Top Lab Anim Sci* **44**, 37-42.
- Smaers, J. B., Mulvaney, P. I., Soligo, C., Zilles, K., Amunts, K.** (2012). Sexual dimorphism and laterality in the evolution of the primate prefrontal cortex. *Brain Behav Evol* **79**, 205-12.
- Spiteri, T., Ogawa, S., Musatov, S., Pfaff, D. W., Agmo, A.** (2012). The role of the estrogen receptor alpha in the medial preoptic area in sexual incentive motivation, proceptivity and receptivity, anxiety, and wheel running in female rats. *Behav Brain Res* **230**, 11-20.
- Stanic, D., Dubois, S., Chua, H. K., Tonge, B., Rinehart, N., Horne, M. K., Boon, W. C.** (2014). Characterization of aromatase expression in the adult male and female mouse brain. I. Coexistence with oestrogen receptors α and β , and androgen receptors. *PLoS One* **9**, e90451.
- Stefanacci, L. e Amaral, D. G.** (2002). Some observations on cortical inputs to the macaque monkey amygdala: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol* **451**, 301-23.
- Stetzk, L., Ganshevsky, D., Lende, M. N., Roache, L. E., Musatov, S., Cushing, B. S.** (2018). Inhibiting ER α expression in the medial amygdala increases prosocial behavior in male meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *Behav Brain Res* **351**, 42-48.
- Swanson, L. W.** (2000). Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res* **886**, 113-164.

- Swanson, L. W. e Cowan, W. M.** (1979). The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol* **186**, 621-55.
- Swanson, L. W. e Petrovich, G. D.** (1998). What is the amygdala? *Trends Neurosci* **21**, 323-31.
- Tan, X. J., Dai, Y. B., Wu, W. F., Kim, H. J., Barros, R. P., Richardson, T. I., Yaden, B. C., Warner, M., McKinzie, D. L., Krishnan, V. et al.** (2012). Reduction of dendritic spines and elevation of GABAergic signaling in the brains of mice treated with an estrogen receptor beta ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1708-12.
- Tetel, M. J., Celentano, D. C., Blaustein, J. D.** (1994). Intraneuronal convergence of tactile and hormonal stimuli associated with female reproduction in rats. *J Neuroendocrinol* **6**, 211-6.
- Unger, E. K., Burke, K. J., Jr., Yang, C. F., Bender, K. J., Fuller, P. M., Shah, N. M.** (2015). Medial amygdalar aromatase neurons regulate aggression in both sexes. *Cell Rep* **10**, 453-62.
- Veening, J. G. e Coolen, L. M.** (2014). Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: emphasis on ejaculation-related circuits. *Pharmacol Biochem Behav* **121**, 170-83.
- Vinader-Caerols, C., Collado, P., Segovia, S., Guillamon, A.** (1998). Sex differences in the posteromedial cortical nucleus of the amygdala in the rat. *Neuroreport* **9**, 2653-6.
- von Ziegler, N. I. e Lichtensteiger, W.** (1992). Asymmetry of brain aromatase activity: region- and sex-specific developmental patterns. *Neuroendocrinology* **55**, 512-8.
- Wagner, C. K. e Morrell, J. I.** (1996). 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. *J Comp Neurol* **370**, 71-84.
- Wall, M. J., Robert, A., Howe, J. R., Usowicz, M. M.** (2002). The speeding of EPSC kinetics during maturation of a central synapse. *Eur J Neurosci* **15**, 785-97.
- Wang, L., DeFazio, R. A., Moenter, S. M.** (2016). Excitability and burst generation of AVPV kisspeptin neurons are regulated by the eestrous cycle via multiple conductances modulated by estradiol action. *eNeuro* **3**, 1-20.
- Weis, S., Hausmann, M., Stoffers, B., Sturm, W.** (2011). Dynamic changes in functional cerebral connectivity of spatial cognition during the menstrual cycle. *Hum Brain Mapp* **32**, 1544-56.

- Weis, S., Hausmann, M., Stoffers, B., Vohn, R., Kellermann, T., Sturm, W.** (2008). Estradiol modulates functional brain organization during the menstrual cycle: an analysis of interhemispheric inhibition. *J Neurosci* **28**, 13401-10.
- Welschen, R., Osman, P., Dullaart, J., de Greef, W. J., Uilenbroek, J. T., de Jong, F. H.** (1975). Levels of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol-17 beta and progesterone, and follicular growth in the pseudopregnant rat. *J Endocrinol* **64**, 37-47.
- Wisniewski, A. B.** (1998). Sexually-dimorphic patterns of cortical asymmetry, and the role for sex steroid hormones in determining cortical patterns of lateralization. *Psychoneuroendocrinology* **23**, 519-47.
- Wood, R. I. e Newman, S. W.** (1995). Hormonal influence on neurons of the mating behavior pathway in male hamsters. In *Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones*, (eds P. E. Micevych and R. P. Hammer Jr), pp. 3-39. New York: Cambridge.
- Woolley, C. S. e McEwen, B. S.** (1993). Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neurol* **336**, 293-306.
- Yamamoto, R., Ahmed, N., Ito, T., Gungor, N. Z., Paré, D.** (2018). Optogenetic study of anterior BNST and basomedial amygdala projections to the ventromedial hypothalamus. *eNeuro* **5**.
- Yang, C. F. e Shah, N. M.** (2014). Representing sex in the brain, one module at a time. *Neuron* **82**, 261-78.
- Yoshida, M., Suga, S., Sakuma, Y.** (1994). Estrogen reduces the excitability of the female rat medial amygdala afferents from the medial preoptic area but not those from the lateral septum. *Exp Brain Res* **101**, 1-7.
- Zancan, M., da Cunha, R. S. R., Schroeder, F., Xavier, L. L., Rasia-Filho, A. A.** (2018). Remodeling of the number and structure of dendritic spines in the medial amygdala: From prepubertal sexual dimorphism to puberty and effect of sexual experience in male rats. *Eur J Neurosci* **48**, 1851-1865.
- Zancan, M., Dall'Oglio, A., Sarzenski, T. M., Maher, M. I., Garcia-Segura, L. M., Rasia-Filho, A. A.** (2015). Glial and axonal perikaryal coverage and somatic spines in the posterodorsal medial amygdala of male and cycling female rats. *J Comp Neurol* **523**, 2127-37.
- Zhang, C., Bosch, M. A., Qiu, J., Ronnekleiv, O. K., Kelly, M. J.** (2015). 17 β -estradiol increases persistent Na⁺ current and excitability of AVPV/PeN Kiss1 neurons in female mice. *Mol Endocrinol* **29**, 518-27.

ANEXO

Parecer de aprovação do protocolo experimental pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 28885

Título:

ESTUDO SOBRE A ATIVIDADE ELETROFISIOLÓGICA, A PLASTICIDADE SINÁPTICA E A MORFOLOGIA NEURONAL NA AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-DORSAL DE RATOS E RATAS AO LONGO DO CICLO ESTRAL

Vigência: 01/08/2015 à 31/07/2019

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARIA ELISA CALCAGNOTTO - coordenador desde 01/08/2015
Francine de Souza Dalpian - Aluno de Doutorado desde 01/08/2015
Letícia Meier Pereira - Aluno de Mestrado desde 01/08/2015

Equipe Externa:

Alberto A. Rasia Filho - pesquisador desde 01/08/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 10/08/2015 - Sala 323 - Anexo I do Prédio da Reitoria- Campus Centro da UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 270 ratos Wistar adultos (54 machos (3 meses de idade) e 216 fêmeas em quatro fases do ciclo estral (proestro, diestro, metaestro e estro)). Provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica – UFRGS., de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 9 de Setembro de 2015

CRISTIANE MATTE
Coordenador da comissão de ética