



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

**CARACTERIZAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL E
VOLUMÉTRICA SOMÁTICA DOS NEURÔNIOS DO
SUBNÚCLEO PÓSTERO-DORSAL DA AMÍGDALA
MEDIAL DE RATOS ADULTOS**

Erica do Espírito Santo Hermel

Porto Alegre

2005



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

**CARACTERIZAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL E VOLUMÉTRICA SOMÁTICA DOS
NEURÔNIOS DO SUBNÚCLEO PÓSTERO-DORSAL DA AMÍGDALA MEDIAL DE
RATOS ADULTOS**

Erica do Espírito Santo Hermel

Orientadora: Profa. Dra. Matilde Achaval Elena

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

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

Porto Alegre

2005

“Há quem passe pelo bosque
e só veja lenha para a fogueira”.

Leon Tolstoi

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Matilde Achaval Elena, minha total gratidão pela constante ajuda e incentivo e pela oportunidade e orientação em um período tão importante para minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Alberto Antonio Rasia Filho pela oportunidade e orientação.

À Prof. Dra. Maria Cristina Faccioni-Heuser pelo apoio, pelas sugestões e pela amizade.

Aos meus colegas do laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS Paula Rigon, Flávia Martinez, Juliana de Castilhos, Jocemar Ilha, Simone Marcuzzo, Maria Izabel Ugalde, Aline Dall'Oglio, Claudia Puperi, Günther Gelhen, Léder Leal Xavier, Leonardo Tartaruga, Nice Artemi, Claudia Forti, Gisele Lovatel, Regis Mestriner, Rafaela Araujo, Eudira da Silva e Antonio G. Severino pelas sugestões, colaboração e, principalmente, amizade.

Às técnicas do Centro de Microscopia Eletrônica (UFRGS) Moema Queirós e Christiane Queirós Lopes pela assistência técnica.

A todos as amigas que foram criadas durante todos esses anos de convivência na universidade, entre as quais, Cármen Marilei Gomes, Ana Lúcia Ceconello, Anelise Todeschini, Elisa Winkelmann, Karen Rigotti, Alessandra Swarowsky, Fabiana Rigon, Eliane Winkelmann, Aline Pagnussat, Isabel Fossati, Gabriela Pereira, Márcia Breigeiron e Giordano Viola.

A minha família pela dedicação.

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

Ao PPG Neurociências e seus professores pela oportunidade e ensinamentos.

Ao CNPq e à CAPES pelas bolsas e financiamento de minha tese.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| ABREVIATURAS..... | IX |
| LISTA DE FIGURAS..... | X |
| LISTA DE TABELAS..... | XIII |
| RESUMO..... | XIV |
| ABSTRACT..... | XVI |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 Amígdala..... | 2 |
| 1.1.1 Funções da amígdala..... | 3 |
| 1.1.2 Amígdala medial..... | 5 |
| 1.1.2.1 Localização e divisão da amígdala medial..... | 5 |
| 1.1.2.2 Citoarquitetura da amígdala medial..... | 6 |
| 1.1.2.3 Neurotransmissores da amígdala medial..... | 13 |
| 1.1.2.4 Aferências e eferências da amígdala medial..... | 14 |
| 1.1.2.5 Hormônios gonadais: dimorfismo sexual e ciclo estral..... | 19 |
| 1.1.2.6 Funções do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial..... | 22 |
| 1.2 Morfologia e fisiologia neuronal..... | 25 |
| 2. OBJETIVOS..... | 29 |
| 3. MATERIAL e MÉTODOS..... | 31 |
| 3.1 Animais..... | 32 |
| 3.2 Avaliação do ciclo estral..... | 32 |
| 3.3 Experimento 1: Características ultra-estruturais dos neurônios e contatos sinápticos na amígdala medial pósterodorsal de ratos machos adultos..... | 33 |
| 3.3.1 Microscopia eletrônica..... | 33 |
| 3.3.2 Análise morfométrica dos botões sinápticos..... | 34 |
| 3.4. Experimento 2: Influência do sexo e do ciclo estral no volume somático neuronal no subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial de ratos adultos..... | 36 |
| 4. RESULTADOS..... | 38 |
| 4.1 Experimento 1: Características ultra-estruturais dos neurônios e contatos sinápticos na amígdala medial pósterodorsal de ratos machos adultos..... | 39 |
| 4.2 Experimento 2: Influência do sexo e do ciclo estral no volume somático neuronal no subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial de ratos adultos..... | 67 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 84 |

6. PERSPECTIVAS.....86
7. REFERÊNCIAS.....88

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| ANP | Polipeptídeo natriurético atrial |
| BNST | Núcleo próprio da estria terminal |
| CCK | Colecistoquinina |
| CGRP | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina |
| CRH | Hormônio liberador de corticotropina |
| CRP | Peptídeo liberador de gastrina/bombesina |
| DCV | Vesícula com centro denso |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| GAD | Glutamato decarboxilase |
| GFAP | Proteína ácida fibrilar glial |
| GnRH | Hormônio liberador de donatotrofinas |
| MeA | Núcleo medial da amígdala |
| MeAD | Subnúcleo ântero-dorsal da amígdala medial |
| MeAV | Subnúcleo ântero-ventral da amígdala medial |
| MePD | Subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial |
| MePD _i | Porção intermediária do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial |
| MePD _l | Porção lateral do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial |
| MePD _m | Porção medial do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial |
| MePV | Subnúcleo ântero-dorsal da amígdala medial |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| REL | Retículo endoplasmático liso |
| SNC | Sistema nervoso central |
| VIP | Peptídeo intestinal vasoativo |

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1 Diagrama da amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais, conforme descrito por Alheid e colaboradores (1995) e modificado de Rasia-Filho e colaboradores (2000).....4
- Figura 2 Representação esquemática do MeA de rato com seus quatro subnúcleos: ântero-dorsal (azul), ântero-ventral (verde), pósterodorsal (vermelho) e pósteroventral (amarelo). O asterisco localiza o trato óptico e os números à direita correspondem à distância posterior ao bregma. Modificada de Paxinos e Watson (1997).....7
- Figura 3 Fotomicrografias de neurônios impregnados pela técnica de Golgi modificada e com morfologia estrelada (A) ou bipenachada (B) do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial de rata adulta. S, soma. Barra: 20 µm. (conforme DE CASTILHOS, 2005).....10
- Figura 4 Desenhos feitos a partir de imagens de microscopia óptica de neurônios impregnados pela técnica de Golgi modificada e com morfologia estrelada ou bipenachada da amígdala medial de rata adulta. Barras: 20 µm. (conforme RIGOTI, 2002).....11
- Figura 5 Fotomicrografias do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial (MePD) de rato macho adulto, mostrando as três camadas celulares medial (MePDm), intermediária (MePDi) e lateral (MePDI), de A para D com aumento dos detalhes. Coloração de Nissl. Opt: trato óptico, st: estria terminal, Mol: camada molecular correspondente à eferência do núcleo próprio da via olfativa acessória, MePV: subnúcleo pósteroventral da amígdala medial. Barras: 500 µm (A), 250 µm (B), 100 µm (C) e 50 µm (D).....12
- Figura 6 Representação esquemática das diferentes morfologias dos espinhos dendríticos (modificado de PETERS; KAISERMAN-ABRAMOF, 1970).....27

MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 7 Fotomicrografias demonstrando a clássica citologia vaginal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral. Diestro: predominância de leucócitos; Proestro: predominância de células epiteliais nucleadas; Estro: predominância de células queratinizadas; Metaestro: presença de todos os tipos celulares anteriores. Barra: 20 µm.....33

ARTIGO 1

- Figura 1 Photomicrographs of the rat posterodorsal medial amygdala. Analysed area localised in the boxed area in B. Nissl staining. Opt, optic tract; st, stria terminalis; MePD, posterodorsal medial amygdala; MePV, posteroventral medial amygdala; D, dorsal; V, ventral; M, medial; L, lateral. Bars: 500 μ m (A) e 250 μ m (B).....61
- Figura 2 Electron micrographs showing MePD neuronal somata and some dendritic processes. A. Note a stellate neurone (S) with two dendritic processes (d) and other neuronal perikarya (N), exhibiting large round nuclei (Nuc) with homogeneously dispersed heterochromatin and nuclear membrane invaginations (arrows). In the neuropil, dendritic processes (d) and few thin myelinated fibres (double-arrows) are also observed. Bar: 5 μ m. B. Higher magnification of the superior boxed area in A. The distal dendritic portion (d) showing microtubules (Mt), elongated mitochondrion (m) and the origin of a stubby-like spine (sp). In this spine, note smooth endoplasmic reticulum (arrow) at the basal portion and actin filaments (asterisk) in its distal portion. Bar: 500 nm. C. Higher magnification of the inferior boxed area in A. The proximal dendritic portion (d) showing elongated mitochondria (m), microtubules (Mt), lysosomes (Lys), rough endoplasmic reticulum (asterisk) and stubby spines (arrows). Observe a thin myelinated fibres (double-arrows) and thick dendritic processes (d) in the neuropil. Bar: 2.5 μ m.....62
- Figura 3 Electron micrographs showing MePD neurones and glial cells. A. Neuronal perikaryon displaying a thin rim of cytoplasm, a large pale nucleus (Nuc) and a single spherical peripheral nucleolus (ncl). Note Nissl bodies (NB), ribosomes (R), lysosome (Lys), Golgi complex (G), mitochondria (m), smooth (arrows) and rough (double-arrows) endoplasmic reticula in the cytoplasm. Bar: 1 μ m. B. Higher magnification of the boxed area in A. Note elongated mitochondrion (m), Golgi complex (G), smooth endoplasmic reticulum (arrows) and a spine (sp) with two symmetrical synapses (S) in the neuronal soma, and a capillary (Ca) in the neuropil. Bar: 200 nm. C. Neuronal soma (N) surrounded by glial cells (GC). Bar: 2 μ m.....63
- Figura 4 Electron micrographs of the MePD neuropil illustrating different types of synapses. A. The synaptic bouton contains round electron-lucent vesicles (asterisk). Note the asymmetrical postsynaptic density (arrowheads), smooth endoplasmic reticulum (arrow) and a mitochondrion (m) in the dendritic process (d). Bar: 200 nm. B. Asymmetrical axodendritic synapsis. Note round electron-lucent vesicles in the axonal terminal (asterisk) and an accumulation of dense material in the inner surface of the postsynaptic membrane which displayed thin filaments (arrowheads) extending into the cytoplasm of the dendritic process (d). Bar: 200 nm. C. Proximal dendritic portion showing three synaptic boutons containing electron-lucent vesicles (S). In the cytoplasm are a few cisternae of rough (RER) and smooth (arrows) endoplasmic reticula, clusters of free ribosomes (R), lysosome (Lys) and mitochondria (m). Note the pale neuronal nucleus (Nuc) with a peripheral nucleolus (ncl) and stacks of the Golgi cisternae (G) near the nucleus. Bar:

500 nm. D. Symmetrical axodendritic synapses. The superior synaptic bouton contains pleomorphic electron-lucent vesicles (asterisk) and the inferior synaptic bouton contains both pleomorphic electron-lucent (asterisk) and dense-cored (arrows) vesicles. Note the pre- and postsynaptic electron-dense material symmetrically distributed (arrowheads); dendritic process (d). Bar: 200 nm. E. An axon terminal containing one dense-cored (arrow) and many electron-lucent (asterisk) vesicles contacting two dendritic process (d1, d2). Note the perforated density (arrowheads) in the synapse on the dendritic process (d2). F. Symmetrical axosomatic synapsis (S); neuronal nucleus (Nuc). Bar: 500 nm.....64

- Figura 5 Electron micrographs of rat MePD dendritic spines displaying thin (A-C), mushroom-like (D-F) and stubby (G-I) morphologies. Note actin filaments (asterisk), dendritic processes (d), microtubules (Mt), mitochondria (m), postsynaptic densities (arrowheads), smooth endoplasmic reticulum (arrows), spine apparatus (sa) and synapses (S). Bars: 500 nm (A-D,G-I), 400 nm (E), 250 nm (F).....65

ARTIGO 2

- Figura 1 Schematic representation and photomicrograph of semithin section of the rat posterodorsal medial amygdala. The analysed areas were localised in the boxed area, as presented in both figures. Toluidine blue staining. Opt, optic tract; st, stria terminalis; MePD, posterodorsal medial amygdala; MePV, posteroventral medial amygdala (adapted from Paxinos and Watson, 1998). Bar: 100 μ m.....81
- Figura 2 Light micrographs of serial semithin sections showing a neuronal soma (*) cut at different levels in the posterodorsal subnucleus of the medial amygdala of diestrus female rat. The numbering of each micrograph indicates the corresponding section in the series (1-12). Staining: toluidine blue. Bar: 5 μ m.....82
- Figura 3 Mean (\pm standard deviation) neuronal somatic volume in the left and right posterodorsal subnucleus of the medial amygdala of male, diestrus, proestrus and estrus female rats. * P=0.007 and ** P=0.029, both compared to male rats.....83

LISTA DE TABELAS**INTRODUÇÃO**

- Tabela 1 Aferências intra- e extra-amigdalianas para os diferentes subnúcleos da amígdala medial, conforme Pitkänen (2000).....16
- Tabela 2 Tabela 2. Eferências intra- e extra-amigdalianas dos diferentes subnúcleos da amígdala medial de ratos, segundo Canteras e colaboradores (1995).....17

ARTIGO 1

- Tabela 1 Distribution of synapses occurring onto dendritic shafts and spines, somata and axons in the posterodorsal medial amygdala of male rat. A. Total and percentual values of excitatory and inhibitory synapses occurring onto dendritic shafts and spines, somata and axons. B. Total and percentual values of excitatory and inhibitory synapses with or without dense-cored vesicles (DCV) occurring onto dendritic shafts and spines, somata and axons.....66

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram descrever a ultra-estrutura neuronal (n=8) e analisar a distribuição dos terminais sinápticos (n=1) no subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial (MePD) de ratos Wistar adultos usando microscopia eletrônica de transmissão e mensurar o volume somático dos neurônios da MePD de ratos (n=5) e ratas em diestro, em proestro e em estro (n=4-5) para revelar diferenças sexuais, do ciclo estral e uma possível lateralidade nesse parâmetro morfológico usando a técnica de reconstrução seriada. Todos os animais foram perfundidos por via transcardíaca e seus encéfalos foram removidos, pós-fixados e processados para microscopia eletrônica. No primeiro experimento, secções ultrafinas (70 nm) foram analisadas e a ultra-estrutura da MePD descrita. No segundo, a estimativa do volume somático neuronal médio da MePD esquerda e direita foi realizada usando-se o método de Cavalieri associado à técnica de contagem de pontos e os dados foram comparados entre os grupos por uma ANOVA de duas vias e o teste *post-hoc* de Bonferroni. No neurópilo da MePD de machos, dendritos com ou sem espinhos, feixes de axônios não-mielinizados, processos axonais únicos, poucos axônios mielinizados, processos gliais e vasos sanguíneos foram identificados. Sinapses axo-dendríticas foram as mais frequentemente observadas (58,3%) e foram principalmente excitatórias. Suas regiões pré-sinápticas continham vesículas elétron-lúcidas sozinhas ou mescladas com poucas vesículas de centro denso (DCV). Os dendritos muitas vezes receberam várias sinapses sobre um mesmo ramo, mas terminais axonais contatando mais de uma estrutura pós-sináptica também foram observados. Os espinhos dendríticos apresentaram diferentes morfologias e geralmente recebiam um único contato sináptico excitatório (33,3%). Sinapses axosomáticas (7,3%) excitatórias e inibitórias e sinapses axo-axônicas excitatórias (1%) também foram identificadas. Na MePD, o volume somático neuronal médio apresentou uma diferença estatística entre os grupos estudados

(machos e fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral) [$F(3,37)=5,805$; $P=0,003$], mas nenhum efeito da lateralidade [$F(3,37)=0,246$; $P=0,863$] ou interação entre ambos [$F(3,37)=0,246$; $P=0,863$]. Os machos (média \pm desvio-padrão, $2038,03 \pm 543,92$ e $2113,14 \pm 339,87 \mu\text{m}^3$, para a MePD esquerda e direita, respectivamente) apresentaram maior volume somático neuronal médio do que fêmeas em proestro ($1521,10 \pm 136,82$ e $1447,71 \pm 120,78 \mu\text{m}^3$; $P=0,007$) e em estro ($1680,67 \pm 272,38$ e $1551,77 \pm 174,40 \mu\text{m}^3$; $P=0,035$), mas não do que fêmeas em diestro ($2028,02 \pm 459,07$ e $1852,87 \pm 385,31 \mu\text{m}^3$; $P > 0,05$). Enfim, os presentes resultados demonstram que: 1) as características nucleares e citoplasmáticas dos neurônios da MePD são similares às aquelas de outras áreas encefálicas; 2) a maioria das sinapses sobre os neurônios da MePD são excitatórias, ocorrendo principalmente sobre ramos e espinhos dendríticos; 3) os espinhos dendríticos da MePD recebem somente um contato sináptico excitatório; 4) terminais sinápticos contendo somente DCV não foram identificados, no entanto, essas vesículas apareceram mescladas às mais numerosas vesículas elétron-lúcidas em todas as regiões dos neurônios da MePD; 5) o volume somático neuronal da MePD é outro parâmetro sexualmente dimórfico; 6) separar as diferentes fases do ciclo estral é de suma importância para revelar a presença dos efeitos dos hormônios gonadais nos neurônios da MePD de ratos; e 7) o volume somático neuronal não se modifica ao longo do ciclo estral, apesar de uma tendência ser observada entre as fêmeas em diestro e proestro. Portanto, o presente trabalho provém novos achados que são relevantes para o estudo da organização celular e sináptica da MePD, que poderiam ser associados a outros dados morfológicos de modo a aumentar nossa compreensão a respeito da atividade funcional dessa área em ratos adultos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to describe the ultrastructure of neurones (n=8) and to analyse the synaptic terminal distribution (n=1) in the posterodorsal subnucleus of the medial amygdala (MePD) of adult male rats using transmission electron microscopy and measure the volume of neurones from the MePD of adult male (n=5) and diestrus, proestrus and estrus female (n=4-5) rats to reveal sex differences, estrous cycle variations and a possible laterality in this morphological parameter. All animals were transcardially perfused and your brains were removed, postfixed and processed for electron microscopy. In the first experiment, ultrathin sections (70 nm) were analysed and MePD ultrastructure was described. In the second experiment, the estimation of neuronal soma volume of both sides of MePD was realized using the Cavalieri method associated to the technique of point counting. Data were compared between groups by a two-way ANOVA and the Bonferroni *post-hoc* test. In the male rat MePD neuropil, it was possible to identify many spiny and aspiny dendrites, unmyelinated axonal bundles, single axonal processes, few myelinated axons, glial processes and blood vessels. Axodendritic synapses were most frequently observed (58.3%) and were mainly excitatory types. Their presynaptic region electron-lucid vesicles that were both alone or with dense-cored vesicles. The dendrites often received many synapses on a single shaft, and axon terminals were seen to display synaptic contacts with more postsynaptic structures. Though the dendritic spines showed different morphologies, they usually had a single excitatory synaptic contact on their heads (33.3%). Inhibitory and excitatory axosomatic synapses (7.3%) and excitatory axoaxonic synapses (1%) were also identified. On the other hand, in the MePD, mean neuronal somatic volume was showed a statistical difference among experimental groups (males and females across estrous cycle) [F(3,37)=5.805; P=0.003], but not laterality [F(3,37)=0.246; P=0.863] or interaction of them [F(3,37)=0.246; P=0.863].

Males (mean \pm standard deviation, 2038.03 ± 543.92 and $2113.14 \pm 339.87 \mu\text{m}^3$, for the left and right MePD, respectively) showed larger mean neuronal somatic volume compared to that of proestrus (1521.10 ± 136.82 and $1447.71 \pm 120.78 \mu\text{m}^3$, $P=0.007$) and estrus (1680.67 ± 272.38 and $1551.77 \pm 174.40 \mu\text{m}^3$, $P=0.035$), but not that of diestrus (2028.02 ± 459.07 and $1852.87 \pm 385.31 \mu\text{m}^3$, $P > 0.05$) females. The present results showed: 1) The general cytoplasmic and nuclear characteristics of the MePD neurones were similar to those of other areas of the rat brain; 2) most synapses MePD neurons are excitatory, mainly occurring onto dendritic shafts and spines; 3) a single excitatory synaptic contact occurs onto MePD dendritic spines; 4) synaptic terminals displaying only DCV were not identified; nevertheless these vesicles appeared among the round and flattened ones on all neuronal regions; 5) neuronal somatic volume is another sexually dimorphic parameter in this brain area; 6) to set apart the different stages of the estrous cycle to reveal the presence of gonadal hormones effects in the rat MePD neurones; e 7) neuronal somatic volume did not modify across estrous cycle, although a tendency have occurred between diestrus and proestrus females. Thus, the present report provides new findings relevant to the study of the MePD cellular organisation and should be associated with other morphological data in order to reveal the functional activity of this area in male rats.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Amígdala

A amígdala é composta por muitos núcleos interconectados e localizados na região subcortical do lobo temporal (JOHNSTON, 1922; ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995; PITKÄNEN; SAVANDER; LeDOUX, 1997; SWANSON; PETROVICH, 1998; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004).

Uma das primeiras classificações da amígdala, baseada em estudos do prosencéfalo de diferentes classes de vertebrados, foi dada por Johnston em 1922, que a subdividiu em dois grupos: um grupo de núcleos filogeneticamente mais antigos associados com o sistema olfativo (núcleos medial – MeA , central e cortical, além do núcleo do trato olfativo lateral) e um grupo filogeneticamente mais recente (núcleos lateral e basal). Já Krettek e Price (1978) dividiram a amígdala em núcleos profundos (núcleos lateral, basolateral, basomedial e central), estruturas corticais conectadas com a amígdala (MeA, área amígdalo-hipocampal, núcleos corticais anterior e posterior, córtex periamigdalóide e núcleo do trato olfativo lateral) e outros agrupamentos celulares conectados com a amígdala (núcleo próprio do trato olfativo acessório, grupos neuronais intercalados e parte intra-amigdalóide do núcleo próprio da estria terminal – BNST). Além disso, para Swanson e Petrovich (1998) a amígdala não compõe uma unidade anatômica ou funcional única, formando, de fato, diferentes sistemas funcionais. Eles consideraram a amígdala como sendo um grupo de células que parecem ser partes diferenciadas do córtex cerebral tradicional, do claustró e do estriado, e pertencendo a quatro sistemas funcionais: vegetativo (núcleo central), cortical frontotemporal (núcleos basolateral anterior e lateral), olfativo acessório (MeA) e olfativo principal (demais núcleos da amígdala).

Entretanto, há mais consenso em aceitar que, de acordo com suas características citoarquitetônicas, imunoistoquímicas e hodológicas, a amígdala seja dividida em quatro regiões principais (Figura 1): (1) amígdala expandida, onde se encontra o MeA, por exemplo;

(2) amígdala superficial com características corticais; (3) áreas de transição; e (4) núcleos não classificados (ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995; SWANSON; PETROVICH, 1998; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004). Os limites anatômicos precisos e a classificação de suas subdivisões permanecem ainda controversos (SWANSON; PETROVICH, 1998).

1.1.1 Funções da amígdala

Os núcleos da amígdala têm funções relevantes nas atividades comportamentais, vegetativas e endócrinas do animal com seu ambiente, tais como a percepção, a modulação e a integração das respostas a estímulos em que o medo e a ansiedade estejam envolvidos, a memória com conteúdo emocional, a atenção, as respostas neuroendócrinas a um evento estressor e a uma série de comportamentos sociais como o reprodutivo, o maternal e o defensivo (LEDOUX, 1992; MCGAUGH et al., 1992; CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; PITKÄNEN; SAVANDER; LeDOUX, 1997; SWANSON; PETROVICH, 1998; DAVIS, 2000; PITKÄNEN, 2000; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 2000; SHEEHAN et al., 2000; 2001; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004). Para participar dessas atividades, as diversas partes da amígdala recebem vários tipos de informações interoceptivas e exteroceptivas, modificando sua própria atividade ao analisar a informação recebida e estimulando diversas regiões do sistema nervoso central (SNC) para que se inicie a resposta ao estímulo inicial (QUIRK; REPA; LeDOUX, 1995; KNUEPFER et al., 1995; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 2000).

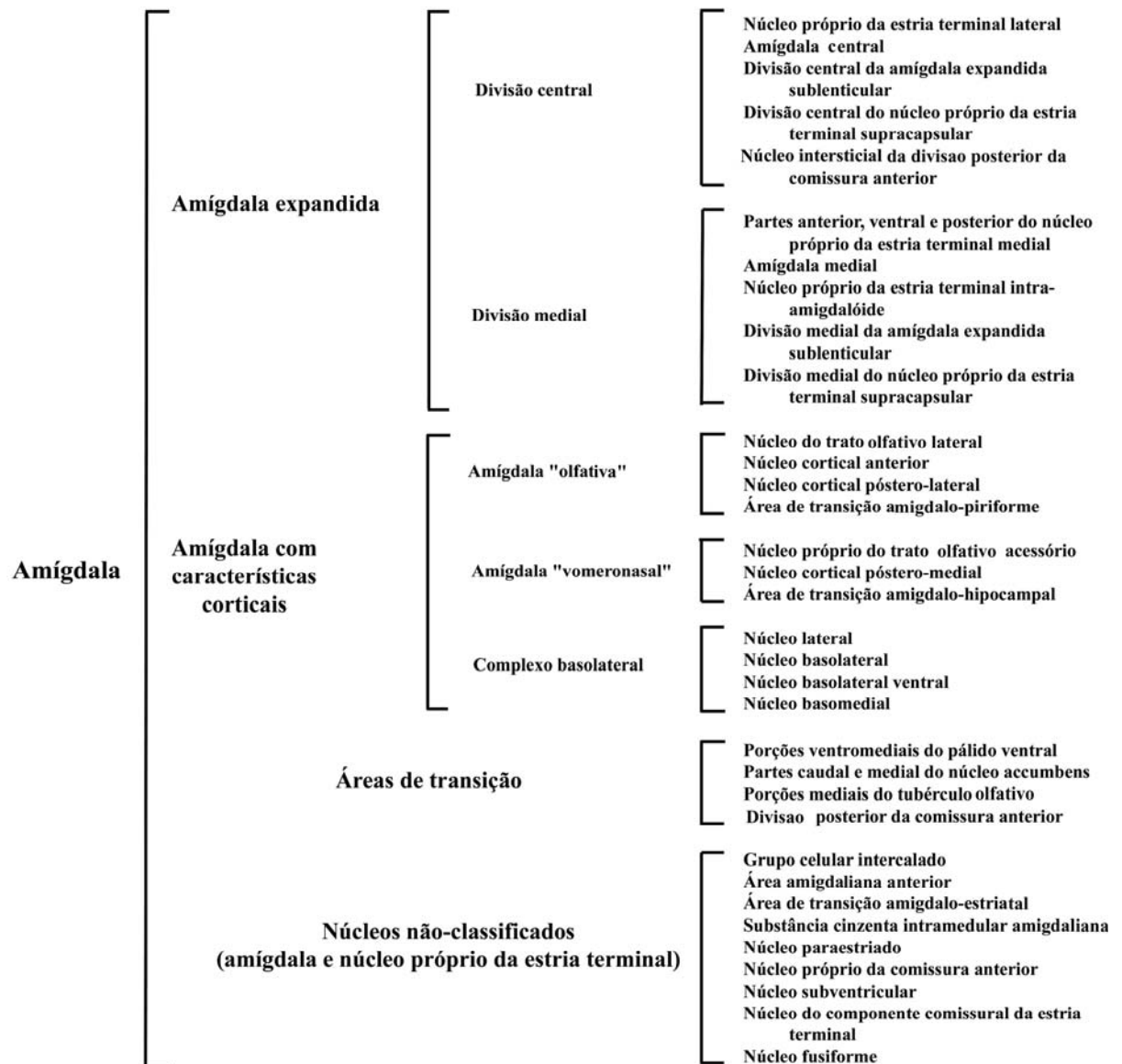


Figura 1. Diagrama da amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais, conforme descrito por Alheid e colaboradores (1995) e modificado de Rasia-Filho e colaboradores (2000).

1.1.2 Amígdala medial: localização e divisão

Em ratos, o MeA é considerado uma parte da "amígdala expandida", integra vias sexualmente dimórficas, incluindo o sistema vomeronasal, e projeta-se para núcleos hipotalâmicos com idênticas características (ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995; CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; SEGOVIA; GUILLAMÓN, 1993; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001; SIMERLY, 2002; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004).

Em ratos, o MeA é um dos núcleos superficiais da amígdala ocupando sua porção rostromedial e é formado por uma coluna proeminente de células que surgem em justaposição à superfície lateral de fibras que ascendem o trato óptico (Figura 2). Rostralmente, ele localiza-se medialmente e posteriormente ao núcleo do trato olfativo, estendendo-se caudalmente até o surgimento da porção temporal do ventrículo lateral. Neste nível, está situado dorsomedialmente ao pólo cefálico da área de transição amígdalo-hipocampal. Ao longo de toda sua extensão, o MeA encontra-se lateralmente e em íntimo contato com a região ventrolateral do trato óptico. Seu limite rostral com a amígdala anterior e lateralmente com as camadas profundas do núcleo cortical anterior não estão claramente definidos (ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995). Dorsolateralmente, o MeA é separada da porção central da amígdala central por uma região pobre em células que é substituída mais ventralmente e caudalmente pelo BNST. Caudalmente, o grupo de núcleos intercalados da amígdala separa o MeA da amígdala basolateral e, em posição dorsal, grupos de fibras nervosas que ascendem dentro da estria terminal estão interpostos entre o MeA e outros núcleos da amígdala (BRODAL, 1947; ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995; PAXINOS; WATSON, 1998; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004).

O MeA tem sido subdividido e nomeado de diversas formas. Pitkänen (2000) o subdivide em três subnúcleos: rostral, central (partes dorsal e ventral) e caudal, enquanto Canteras e colaboradores (1995) e De Olmos e colaboradores (2004) subdividem-no em quatro subnúcleos: ântero-dorsal (MeAD), ântero-ventral (MeAV), pósterodorsal (MePD) e póstero-ventral (MePV), conforme pode-se observar na Figura 2.

1.1.3 Citoarquitetura da amígdala medial

A morfologia dos neurônios do MeA de gatos (TÖMBÖL; SZAFRANSKA-KOSMOL, 1972), de camundongos (VALVERDE, 1962) e de ratos (DE OLMOS; ALHEID; BELTRAMINO, 1985; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999; RIGOTI, 2002; RASIA-FILHO et al., 2004; DE CASTILHOS, 2005) tem sido estudada com o método de Golgi (RAMON Y CAJAL, 1909; SCHEIBEL; SCHEIBEL, 1978; PANNESE, 1996). Nesses trabalhos, semelhanças histológicas entre as células nervosas multipolares do MeA de diferentes espécies animais puderam ser observadas.

Freqüentemente, esses neurônios apresentam tamanho pequeno à médio, mas células maiores também podem ser encontradas em direção à porção rostro-caudal do MeA (GOMEZ; NEWMAN, 1991; MCDONALD, 1992; ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999; RIGOTI, 2002; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004). A forma de seus corpos celulares pode ser oval, arredondada, alongada, estrelada, triangular, ou piriforme, apresentando dendritos de comprimento variável, pouco ramificados, retílineos ou sinuosos (RIGOTI, 2002).

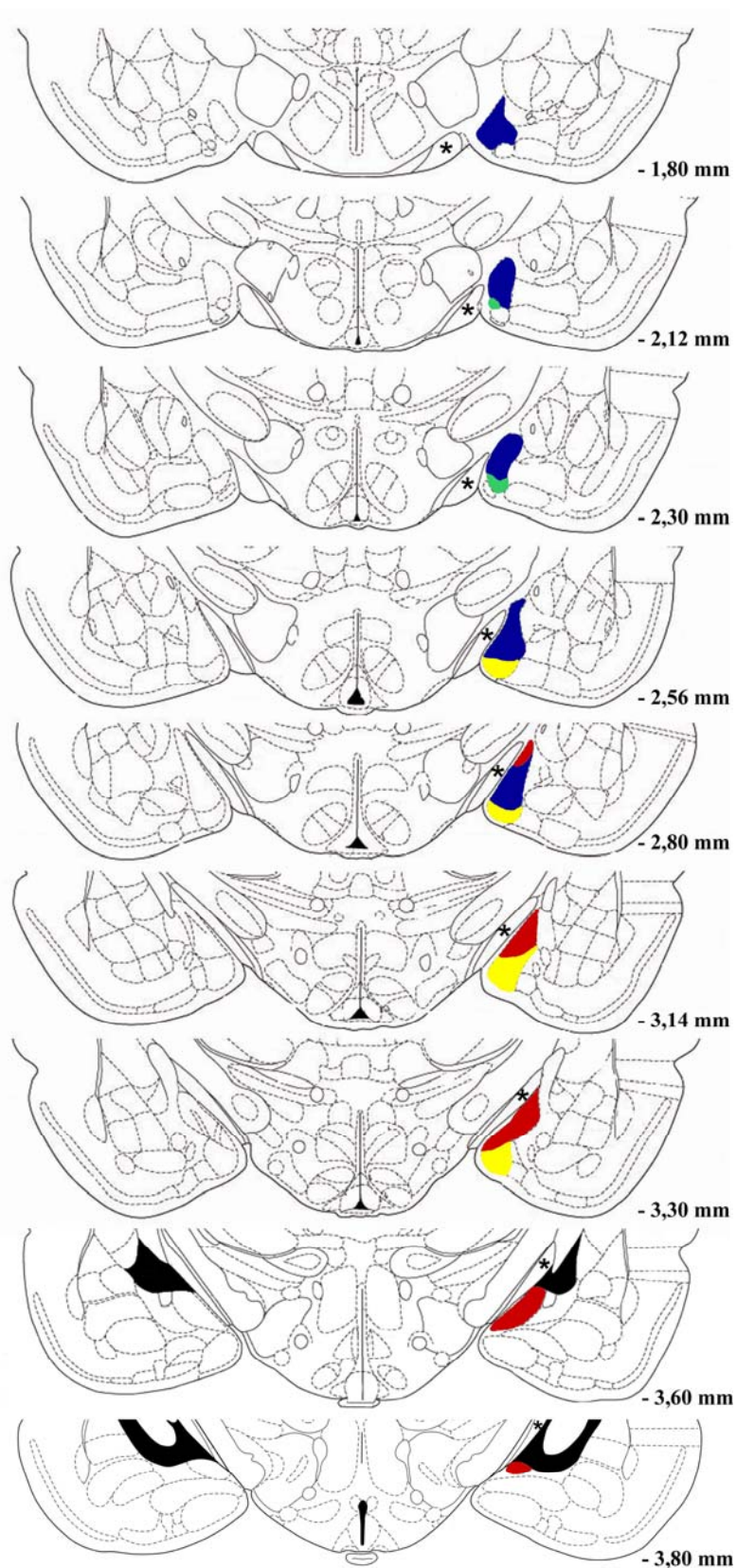


Figura 2. Representação esquemática do MeA de rato com seus quatro subnúcleos: ântero-dorsal (azul), ântero-ventral (verde), póstero-dorsal (vermelho) e póstero-ventral (amarelo). O asterisco localiza o trato óptico e os números à direita correspondem à distância posterior ao bregma. Modificada de Paxinos e Watson (1997).

Os axônios dos neurônios dos subnúcleos do MeA dirigem-se, medialmente, ao núcleo basal ou à estria terminal (TÖMBÖL; SZAFRANSKA-KOSMAL, 1972; KAMAL; TÖMBÖL, 1975). Eles seguem um curso sinuoso e originam ramos colaterais com poucas ramificações, que são distribuídos nas proximidades de seus corpos celulares (VALVERDE, 1962; KAMAL; TÖMBÖL, 1975).

Quando os neurônios apresentaram espinhos, esses consistiam de formas variadas e estavam mais concentrados nos dendritos e menos nos somas celulares (MCDONALD, 1992; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999; RIGOTI, 2002; RASIA-FILHO et al., 2004).

De acordo com o número de processos dendríticos estendendo-se do soma neuronal, esses neurônios multipolares puderam ser classificados como bipenachados, apresentando dois ramos dendríticos primários, ou em estrelados, apresentando três ou mais destes ramos (FERNANDEZ-GALAZ et al., 1997; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999).

Com mais detalhes, as células bipenachadas (Figuras 3 e 4) possuem somas ovais, fusiformes, arredondados ou alongados. Deles originam-se dois ramos dendríticos primários de comprimento variado em cada extremo do corpo celular, que se dirigem ventralmente e dorsalmente no interior dos subnúcleos do MeA ao qual pertencem. Tais dendritos, quando curtos, quase sempre ramificam-se próximo ao soma em dois dendritos secundários longos, sendo que muitos deles mantêm a mesma orientação do dendrito de origem. É comum encontrar os dendritos ventrais, tanto os primários quanto os secundários, descendo obliquamente em direção ao trato óptico ou paralelamente a ele em direção à superfície pial. Além disso, também são observados dendritos secundários e terciários difusamente distribuídos (RIGOTI, 2002).

As células estreladas (Figuras 3 e 4) geralmente apresentam três ou quatro dendritos primários de diferentes comprimentos. Esses dendritos dispõem-se radialmente no interior dos

subnúcleos do MeA, mas podem seguir ventralmente e, nesse trajeto, colocam-se obliquamente ao trato óptico, dirigindo-se ao mesmo, ou posicionam-se de forma paralela a este, dirigindo-se até a superfície pial. Frequentemente, os dendritos secundários e terciários seguem de forma perpendicular em direção ao trato óptico (RIGOTI, 2002).

Na MePD, os neurônios agrupam-se formando três colunas orientadas paralelamente à superfície medial do núcleo (Figura 5). A primeira é uma coluna medial ou superficial (MePDm) constituída por muitos neurônios de tamanho pequeno a médio densamente agrupados. A segunda, aparentemente com menos células, é a coluna intermediária (MePDi) que possui neurônios de tamanho médio e forma uma matriz que separa e orienta as outras duas colunas. A terceira coluna é a mais profunda e lateral (MePDI) com neurônios de tamanho médio, também densamente agrupados, mas não tanto quanto os neurônios da coluna medial. A porção celular dos subnúcleos do MeA é rodeada em seus lados ventral e medial por uma camada molecular, que se torna estreita dorso-rostralmente até que desaparece completamente ao nível da MeAD e que corresponde aos axônios que compõem a eferência do núcleo próprio da via olfativa acessória (SCALIA; WINANS, 1975; ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995; PAXINOS; WATSON, 1997; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004).

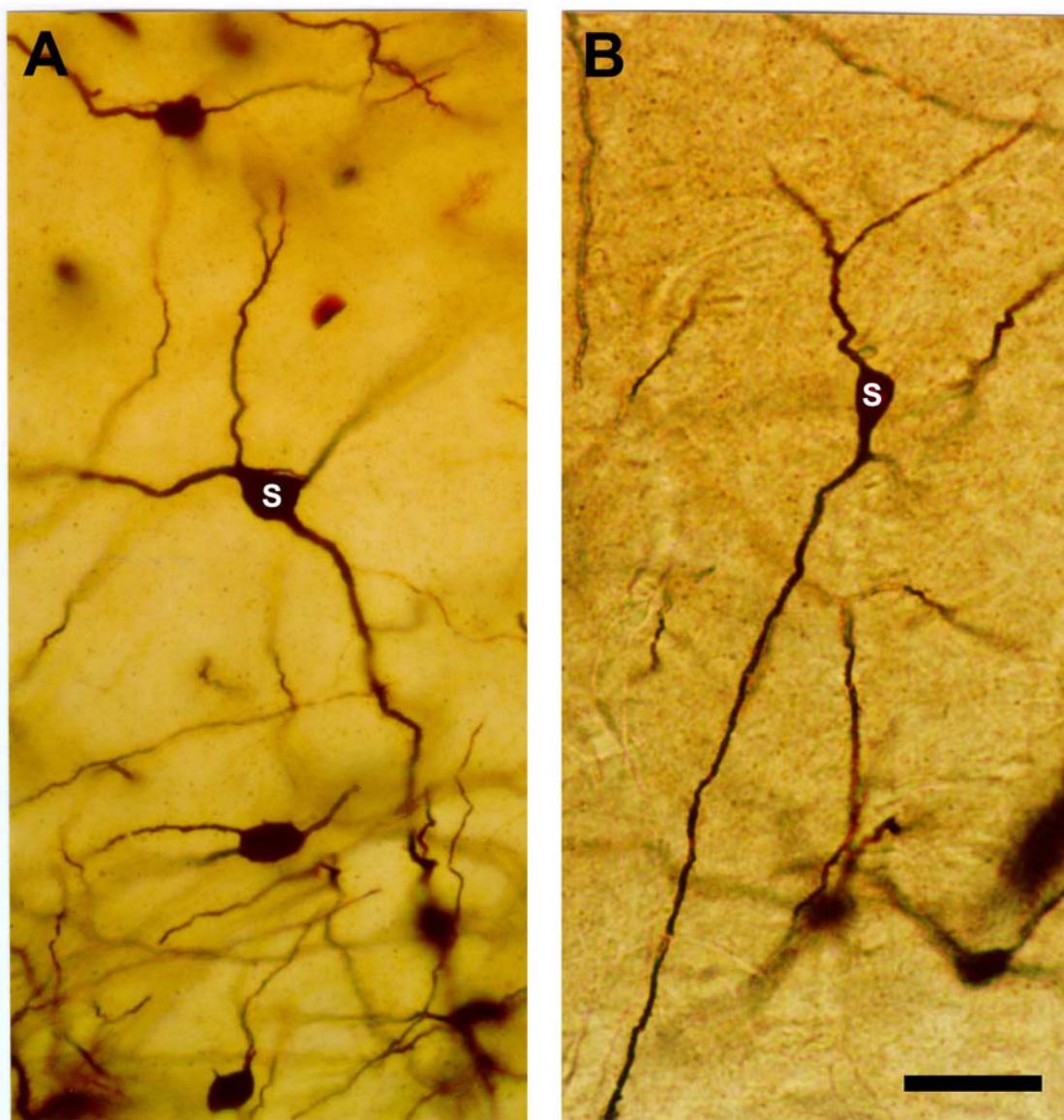


Figura 3. Fotomicrografias de neurônios impregnados pela técnica de Golgi modificada e com morfologia estrelada (A) ou bipenachada (B) do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial de rata adulta. S, soma. Barra: 20 μ m. (conforme DE CASTILHOS, 2005).

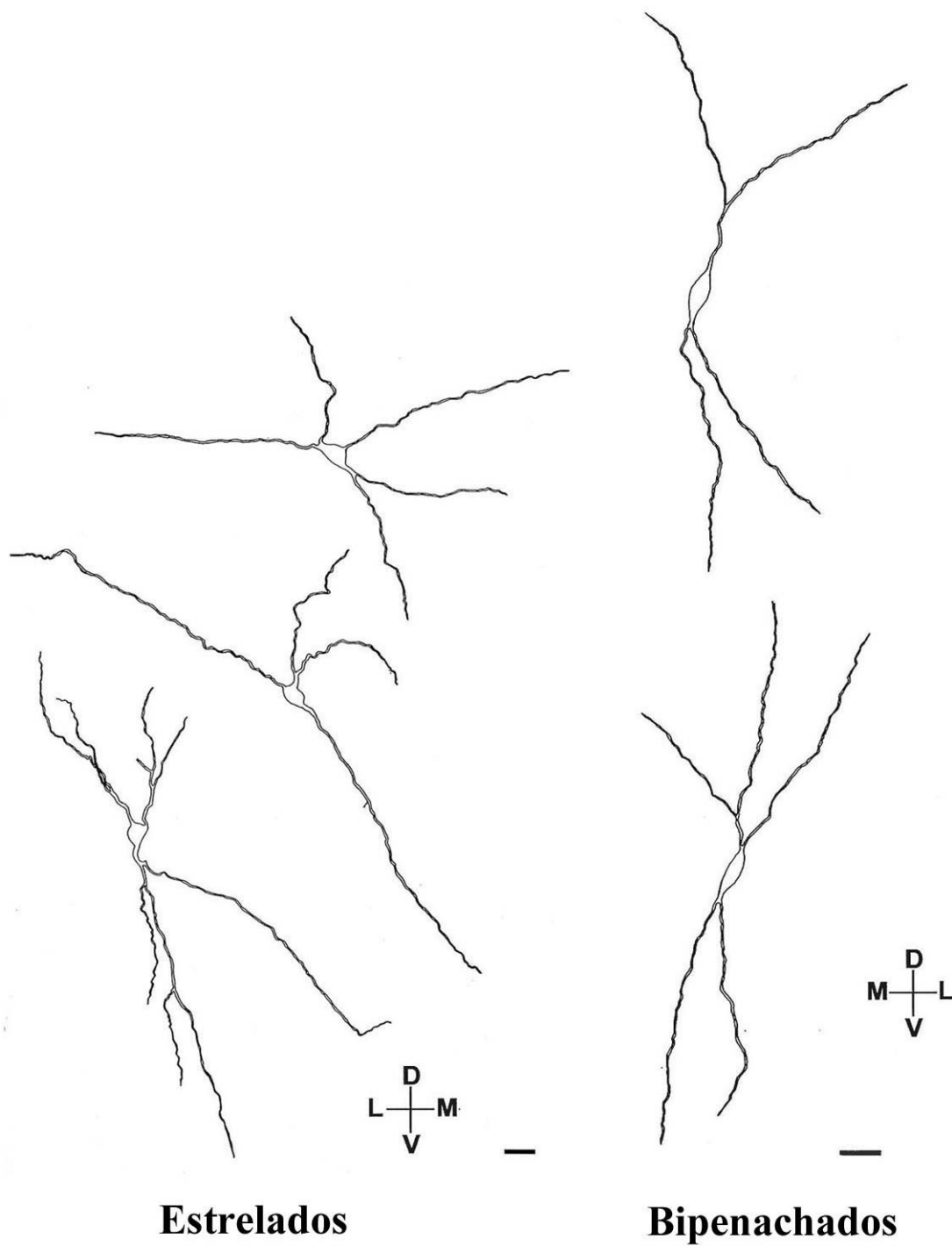


Figura 4. Desenhos feitos a partir de imagens de microscopia óptica de neurônios impregnados pela técnica de Golgi modificada e com morfologia estrelada ou bipenachada da amígdala medial de rata adulta. Barras: 20 μ m. (conforme RIGOTI, 2002).

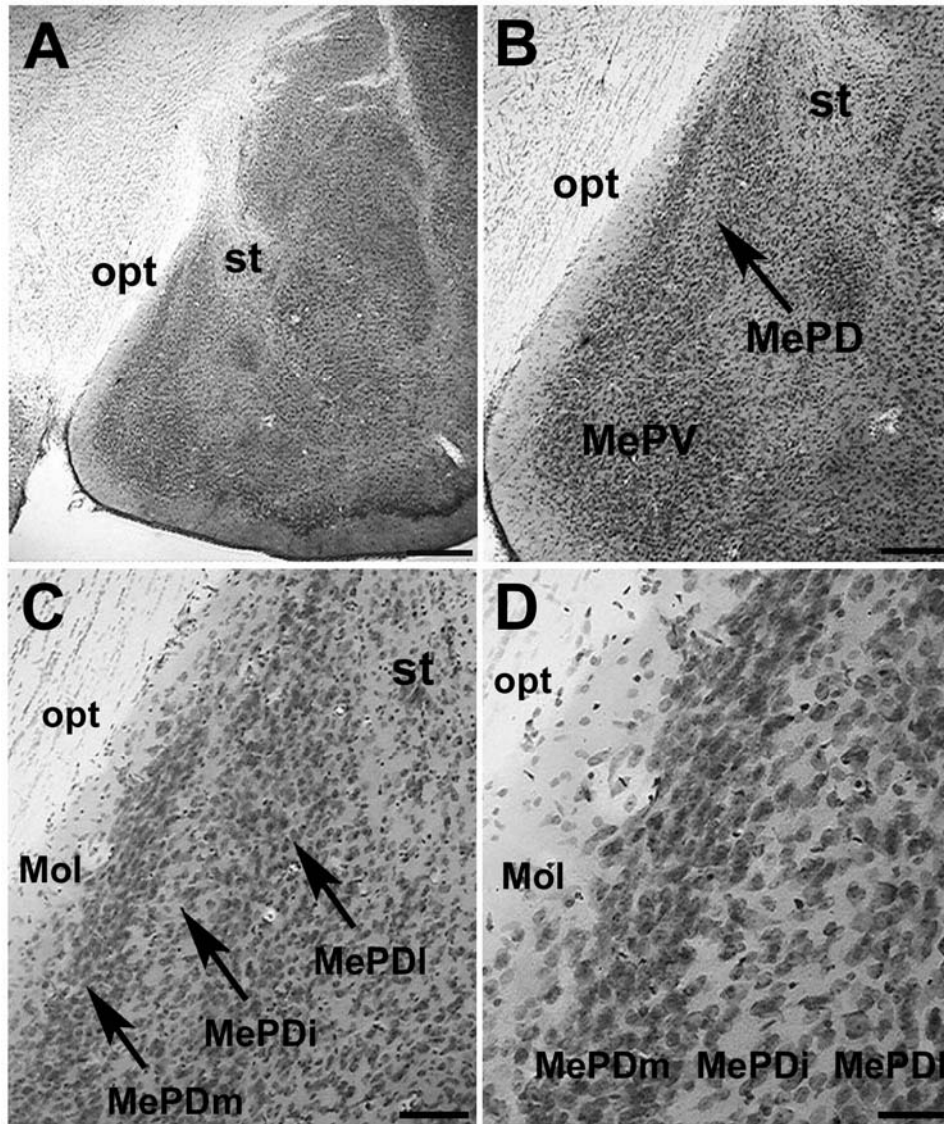


Figura 5. Fotomicrografias do subnúcleo póstero-dorsal da amígdala medial (MePD) de rato adulto mostrando as três camadas celulares, medial (MePDm), intermediária (MePDi) e lateral (MePDI), de A para D com aumento dos detalhes. Coloração de Nissl. Opt: trato óptico, st: estria terminal, Mol: camada molecular correspondente à eferência do núcleo próprio da via olfativa acessória, MePV: subnúcleo póstero-ventral da amígdala medial. Barras: 500 μm (A), 250 μm (B), 100 μm (C) e 50 μm (D).

1.1.4 Neurotransmissores na amígdala medial

Vários neurotransmissores foram encontrados no MeA. Neurônios imunorreativos ao glutamato foram detectados no MeA de gerbilos (SIMMONS; YAHR, 2003), embora o conteúdo de glutamato e aspartato nesse núcleo fosse menor do que em outros núcleos da amígdala (OTTERSEN; STORM-MATHISEN, 1986; GLOOR, 1997). Alguns estudos também mostraram a presença de imunoreatividade ao ácido gama-aminobutírico (GABA) no MeA de gatos (PARÉ; SMITH, 1993), de gerbilos (SIMMONS; YAHR, 2003), de hamsters (WESTBERRY, 2003) e de ratos (NITECKA; BEN-ARI, 1987; STEFANOVA, 1998; STEFANOVA; OVTSCHAROFF, 2000). A imunoistoquímica para o GABA e a hibridização *in situ* para a enzima glutamato descarboxilase (GAD) revelaram uma faixa densa de neurônios que se estendem ventralmente e ininterruptamente através dos núcleos caudado, putâmen, central e medial da amígdala terminando ao longo da extremidade ventromedial do hemisfério cerebral (SWANSON; PETROVICH, 1998). Ademais, há circuitaria GABAérgica amigdaliana local nos subnúcleos do MeA (McDONALD, 1992; WONG; CHEN; MOSS, 1993). Isto fez sugerir que projeções extrínsecas da amígdala posterior (central e medial) pudessem ser predominantemente GABAérgicas, enquanto da amígdala anterior (basolateral e cortical) poderiam ser predominantemente glutamatérgicas (SWANSON; PETROVICH, 1998), embora haja muita controvérsia quanto a esta generalização proposta.

Vários estudos realizados no MeA de ratos, de gatos e de hamsters também têm demonstrado a presença de corpos celulares e/ou fibras nervosas imunorreativos a diferentes neuropeptídeos, tais como: angiotensina II, colecistoquinina (CCK), galanina, hormônio liberador de corticotropina (CRH), hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), neuropeptídeo Y, neurotensina, opióides, ocitocina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP),

peptídeo liberador da gastrina/bombesina (GRP); peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), polipeptídeo natriurético atrial (ANP), somatostatina, substância P e vasopressina (SWANSON et al., 1983; FRANKFURT et al., 1985; LIND; SWANSON; GANTEN, 1985; GUSTAFSON; CARD; MOORE, 1986; McDONALD, 1987; ORO; SIMERLY; SWANSON, 1988; McDONALD, 1989; MICEVYCH; MATT; GO, 1988; De VRIES, 1995; VEINANTE; FREUND-MERCIER, 1997; MARCOS et al., 1999; RUTKOSKI et al., 2002; e, para uma revisão, ver GLOOR, 1997; DE OLMOS et al., 2004). Além disso, o MeA também apresenta fibras nervosas imunorreativas à serotonina em hamsters (GRIMES; MELLONI, 2002) e neurônios imunorreativos ao receptor 5HT_{2B} (DUXON et al., 1997) e RNAm para os receptores 5HT_{1A} e 5HT_{2A} (ÖSTERLUND; HURD, 1998; ZHANG; BARKER; RUBINOW, 1999) em ratos. Os papéis fisiológicos de alguns desses neurotransmissores no MeA ainda não foram esclarecidos.

1.1.5 Aferências e eferências da amígdala medial

Os subnúcleos do MeA apresentam numerosas conexões intra- e extra-amigdalianas com diferentes estruturas do SNC (Tabelas 1 e 2), o que parece dar a condição de modular diversos comportamentos e ajustes vegetativos (ALHEID; DE OLMOS; BELTRAMINO, 1995; CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; McDONALD et al., 1999; PITKÄNEN, 2000; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004). As conexões e a distribuição de neurotransmissores e receptores para hormônios gonadais sugerem que o MeA tem duas divisões principais: uma ventral, que inclui a MeAD, a MeAV e a MePV, e uma dorsal, que inclui a MePD (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995).

O MeA recebe uma série de aferências de várias regiões do SNC (Tabela 1), sendo que a MePD encontra-se largamente interconectada com a MeAD, a MeAV e a MePV

(CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995). A MePD também possui um grande número de conexões intra-amigdalíacas, sendo muitas delas recíprocas, entre as quais estão as divisões magnocelular e parvocelular do núcleo basal acessório, as divisões medial e ventrolateral do núcleo lateral, os núcleos cortical anterior e posterior e as divisões medial e lateral da área amígdalo-hipocámpal. Além disso, a MePD também recebe densas projeções do sistema olfativo (bulbo olfativo acessório), de núcleos corticais (córtex infralímbico, área pré-límbica e ínsula agranular ventral), da formação hipocámpal (córtex entorrinal e partes proximal e distal do *subiculum* temporal), de núcleos hipotalâmicos (área pré-óptica medial, regiões dorsal e medial ao núcleo paraventricular, núcleos ventromedial, pré-mamilar ventral e dorsal, arqueado, lateral), de núcleos talâmicos (núcleos paraventricular, parataenial, parafascicular, basal do complexo ventromedial e divisão medial do complexo geniculado medial), do tronco encefálico, da divisão medial do BNST e do núcleo da divisão horizontal da faixa diagonal de Broca, entre outras (OTTERSEN; BEN-ARI, 1979; OTTERSEN, 1980; McDONALD, 1998; 1999; PITKÄNEN, 2000; DE OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004).

O MePD também envia uma série de eferências a diversas regiões encefálicas (Tabela 2), entre as quais estão aquelas para os núcleos cortical posterior, o BNST (divisões ântero-dorsal e posterior principal), a *substância inominata* e alguns núcleos hipotalâmicos como o posterior, o anterior, o periventricular ântero-ventral, o pré-óptico medial e o pré-mamilar ventral (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; PITKÄNEN, 2000; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001).

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

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

Tabela 2. Eferências intra- e extra-amigdalianas dos diferentes subnúcleos da amígdala medial de ratos, segundo Canteras e colaboradores (1995).

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

Tabela 2. (Continuação)

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

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

1.1.6 Hormônios gonadais: dimorfismo sexual e ciclo estral

Os hormônios gonadais têm um importante papel no desenvolvimento de estruturas nervosas sexualmente dimórficas, que, por sua vez, modulam a fisiologia do comportamento reprodutivo que é tipicamente demonstrado por machos e fêmeas (KELLY, 1991). Além de efeitos organizacionais no desenvolvimento do animal no SNC e periférico, os hormônios gonadais controlam a função reprodutiva adulta (RASIA-FILHO et al. 1991).

Receptores para hormônios gonadais foram localizados no MeA de ratos (SHERIDAN, 1979; SIMERLY et al., 1990; LI; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997; SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997; ÖSTERLUND et al., 1998) em quantidade comparável ao observado no hipotálamo (SIMERLY et al., 1990; SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997). Receptores para andrógenos estão mais concentrados na MePD e na MePV (SIMERLY et al., 1990; GRECÓ et al., 1998). Receptores de tipos α e β para estrógeno foram detectados mais freqüentemente na MePD (LI; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997; SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997; ÖSTERLUND et al., 1998). A aromatase, enzima que transforma testosterona em estradiol, também está presente no MeA (SHINODA; NAGANO; OSAWA, 1994; WAGNER; MORRELL, 1996). Neste núcleo é relevante que entre 80 e 90% dos neurônios que apresentam receptores para estrógeno também possuem para andrógenos (GRECÓ et al., 1998). O papel fisiológico desses receptores parece estar relacionado com o aumento das atividades dos neurônios dos subnúcleos do MeA, já que a implantação de estradiol na região posterior do MeA de ratos castrados em idade adulta foi capaz de aumentar a atividade copulatória desses animais (RASIA-FILHO et al., 1991). Faltam, no entanto, mais dados para tornar este ponto aclarado.

Características sexualmente dimórficas têm sido observadas em alguns parâmetros morfológicos dos subnúcleos do MeA. Mizukami e colaboradores (1983) demonstraram que,

em ratos, o volume do MeA é maior em machos do que em fêmeas. Além disso, a castração diminuiu o volume do MeA em ratos adultos (MALSBUY; McKAY, 1994) e modificou a morfologia dendrítica dos neurônios nesta região de hamsters machos adultos (GOMEZ; NEWMAN, 1991). Recentemente, Stefanova e Ovtcharoff (2000) observaram, que aos 20 dias de idade, ratos apresentaram maior volume e densidade neuronal no MeA de forma geral do que fêmeas na mesma idade, e que essas diferenças sexuais são mantidas no animal adulto. Adicionalmente, a castração de machos recém-nascidos, ou na puberdade, ou ainda, o tratamento nos primeiros 10 dias de vida com um antagonista do estrogênio, ou com um inibidor da aromatase, resultaram em uma diminuição do volume e da densidade neuronal desse núcleo quando comparado aos machos adultos intactos.

Características sexualmente dimórficas também foram encontradas no sistema vomeronasal, no núcleo cortical pósteromedial da amígdala, no BNST, na área pré-óptica medial e no hipotálamo ventromedial, todos interconectados com o MeA, sugerindo haver uma circuitaria neural distinta envolvendo essas regiões em cada sexo (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; WOOD; NEWMAN, 1995; GUILLAMÓN; SEGOVIA, 1997).

Os subnúcleos do MeA também apresentam diferenças sexuais em relação à expressão de alguns neuropeptídeos. Por exemplo, os machos apresentam uma maior expressão de alguns peptídeos como o CCK (MICEVYCH; MATT; GO, 1988; SIMERLY, 1990), a substância P (FRANKFURT et al., 1985; MICEVYCH; MATT; GO, 1988), a vasopressina (DE VRIES, 1995) e a leucina-encefalina (STEFANOVA; OVTCHAROFF, 2000) do que as fêmeas. Em ratos, os machos também apresentam mais RNAm para o GAD no MeA do que as fêmeas (SEARLES et al., 2000), mas as fêmeas têm um maior número de neurônios expressando GABA do que os machos (STEFANOVA, 1998; STEFANOVA; OVTCHAROFF, 2000). Além disso, a castração de machos recém-nascidos, ou na

puberdade, ou ainda, o tratamento nos primeiros 10 dias de vida com um antagonista do estrogênio, ou com um inibidor da aromatase, resultaram ambos em um aumento da densidade de neurônios imunorreativos ao GABA no MeA, quando comparados aos machos adultos intactos (STEFANOVA; OVTSCHAROFF, 2000).

Especificamente para a MePD, tema desta tese, machos apresentam tal subnúcleo com maior volume total (HINES; ALLEN; GORSKI, 1992; KERCHNER et al., 1995; COOKE; TABIBNIA; BREEDLOVE, 1999) e mais espinhos dendríticos (RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999; RASIA-FILHO et al., 2004) do que fêmeas. Essas diferenças sexuais também foram detectadas na expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), onde as fêmeas apresentaram uma maior imunoreatividade a esse constituinte do citoesqueleto dos astrócitos do que os machos (RASIA-FILHO et al., 2002) .

Muito do conhecimento que há sobre o controle do ciclo ovariano de vários mamíferos que possuem ovulação espontânea é baseado em estudos sobre o controle do ciclo estral da rata. Esse ciclo é composto por quatro fases – diestro, proestro, estro e metaestro – que, além de expressarem mudanças no epitélio vaginal como a presença de células epiteliais nucleadas, leucócitos e células queratinizadas em cada período, exibem variações nas concentrações de gonadotrofinas e conseqüentemente de esteróides gonadais (MATTHEWS; KENYON, 1984).

O ciclo estral mostra um meio natural e repetitivo para estudar as variações dos hormônios esteróides e suas ações fisiológicas. Durante o ciclo estral, o número de espinhos dendríticos em neurônios no hipocampo de ratas se modifica dramaticamente (GOULD et al., 1990). Ou seja, a densidade de espinhos dendríticos nas células piramidais da região CA1 do hipocampo aumenta gradualmente quando os níveis de estradiol aumentam durante o diestro, alcançando o pico no proestro e, então, diminuem rapidamente no estro (WOOLLEY; McEWEN, 1993). Por outro lado, ratas em proestro apresentam um menor número de espinhos dendríticos nos primeiros micrômetros dendríticos de neurônios na MePD e na

MePV do que fêmeas em diestro (RASIA-FILHO et al., 2004). Não obstante, outro achado se obteve com ratas ovariectomizadas e injetadas com benzoato de estradiol ou benzoato de estradiol e progesterona, às quais apresentaram mais espinhos dendríticos na MePD do que as ratas ovariectomizadas tratadas somente com veículo oleoso (DE CASTILHOS, 2005).

Alguns dos neurotransmissores presentes no MeA também mostraram uma variação ao longo do ciclo estral, estando relacionados com as alterações nos níveis de estrógeno circulante. Por exemplo, a densidade de células imunorreativas à CCK, que se localizam preferencialmente na MePD, é maior durante o proestro, quando o estradiol circulante é máximo, e menor durante o diestro, quando os níveis de estradiol circulante estão baixos (ORO; SIMERLY; SWANSON, 1988; SIMERLY, 1990). O papel desse hormônio gonadal na regulação dessas células foi demonstrado adicionalmente pela observação de que ratas ovariectomizadas apresentaram um declínio no número de células que expressavam CCK, sendo esse resultado revertido após tratamento com estrógeno (ORO; SIMERLY; SWANSON, 1988; SIMERLY, 1990).

1.1.7 Funções do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial

Os subnúcleos do MeA têm um importante papel na modulação de diversos comportamentos e respostas neuroendócrinas em ratos. Por exemplo e de forma resumida, sugeriu-se que a MePD pode influenciar basicamente a regulação neuroendócrina hipotalâmica, enquanto a MeAD, a MeAV e a MePV poderiam estar primariamente relacionadas com a modulação hipotalâmica dos comportamentos reprodutivo e defensivo (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; SIMERLY, 2004). Especificamente, a MePD modula alguns comportamentos como o maternal (LONSTEIN et al. 2000; SHEEHAN et al. 2000; 2001), o defensivo (DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001) e os sexuais de

machos (RASIA-FILHO et al. 1991; SWANN; FIBER, 1997; WOOD; NEWMAN, 1995) e de fêmeas (MASCÓ; CARRER, 1980).

Possivelmente ocorra o processamento de estímulos olfativos de acordo com a demanda proporcionada pela tarefa e os estágios da aprendizagem, já que pode ser observado nos subnúcleos do MeA durante a exploração genital inicial das fêmeas pelos machos aumento da expressão da proteína c-fos ao longo de diferentes estágios da discriminação do aprendizado olfativo (HINES; ALLEN; GORSKI, 1992; McGAUGH, 1992; HESS et al., 1997). Ademais, o comportamento maternal também depende de sinais olfativos que ativam o MeA durante a interação da mãe com os filhotes, uma vez que esses sinais olfativos gerados pelos filhotes induzem a ativação da proteína c-fos nesta região e provocam aversão e redução do contato com eles, além da inibição da resposta maternal em ratas virgens (FLEMING; VACCARINO; LUEBKE, 1980; NUMAN; NUMAN; ENGLISH, 1993; LONSTEIN et al., 2000). A estimulação elétrica da MeA promoveu neofobia aos filhotes, inibindo o comportamento maternal em ratas virgens e redução da latência para o surgimento deste comportamento em ratas com experiência maternal (MORGAN et al., 1999). Lesões eletrolíticas no MeA facilitaram o comportamento maternal em ratas virgens devido a uma redução das respostas neofóbicas das ratas em relação aos filhotes, o que possibilitaria uma maior exposição delas aos mesmos e o subsequente desenvolvimento do comportamento maternal (FLEMING; VACCARINO; LUEBKE, 1980). Adicionalmente, as lesões provocadas por injeções com aminoácidos excitotóxicos na MeA também facilitaram o comportamento maternal em ratas virgens, sendo essa facilitação dependente dos hormônios gonadais, visto que era abolida após ovariectomia (NUMAN; NUMAN; ENGLISH, 1993).

De fato, estudos recentes, utilizando imunistoquímica para detectar a proteína c-fos, revelaram que os subnúcleos da MeA integram um conjunto de estruturas relacionadas com a inibição do comportamento maternal em ratas que se dá por projeções diretas ou indiretas

para os núcleos hipotalâmicos ventromedial e anterior (SHEEHAN et al., 2000; SHEEHAN et al., 2001).

O processamento de informações olfativas pelo MeA também está relacionado com a regulação de outros comportamentos, como o defensivo e o agressivo, tanto em ratos como em gatos (SLODDART-APTER; MacDONNELL, 1980; KOOLHAAS; SCHUURMAN; WIEPKEMA, 1980; BLOCH; GORSKI, 1988; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001). Por exemplo, ratos expostos ao odor de um predador, como o de um gato, apresentaram ativação da MePD (DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001). Além disso, ratos que foram submetidos a lesão eletrolítica bilateral ampla do MeA apresentaram diminuição do comportamento agressivo quando comparados aos controles ao serem colocados em uma caixa para disputa de território (VOCHTELOO; KOOLHAAS, 1987).

A modulação de comportamentos reprodutivos de machos e de fêmeas pelos subnúcleos do MeA também ocorre a partir da percepção de estímulos olfativos (LEHMAN; WINANS, 1982; KLING; BROTHERS, 1992; KONDO, 1992; WONG; CHEN; MOSS., 1993; KONDO; ARAI, 1995; DOMÍNGUEZ; HULL, 2001). No MeA, principalmente na MeAD e na MePD, processam-se informações olfativas oriundas do órgão vomeronasal e do bulbo olfativo, que são enviadas para áreas motoras e neuroendócrinas do telencéfalo basal, para a área pré-óptica medial, para outros núcleos hipotalâmicos e, também, para o tronco encefálico (LEHMAN; WINANS, 1982; CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; KONDO; ARAI, 1995; WOOD, 1997; DOMÍNGUEZ; HULL, 2001; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001). Fêmeas em proestro apresentam mais células imunorreativas à proteína c-fos na MePD após contato sexual (ROWE; ERSKINE, 1993) e, lesões na porção anterior do MeA ou na MePD reduziram a ocorrência de comportamento sexual em ratas (MASCÓ; CARRER, 1980; LEHMAN; WINANS, 1982), já a estimulação dessas áreas promoveram o efeito oposto (MASCÓ; CARRER, 1980).

Em ratos, o MeA também facilita as respostas aos estímulos sexuais em machos, pois lesões amplas nesta área diminuem a ocorrência de ejaculações prejudicando o comportamento sexual (HARRIS; SACHS, 1975; KONDO, 1992; MEISEL; SACHS, 1994; NEWMAN, 1999). Mais especificamente, lesões na MePD em machos reduziram a ereção peniana desencadeada pelo odor de uma fêmea em estro, a investigação genital feita pelos machos nas fêmeas e aumentaram as latências para ejaculação e intromissões precedendo a primeira ejaculação (COOLEN; PETERS; VEENING, 1997; NEWMAN, 1999; KONDO; TOMIHARA; SAKUMA, 1999; DOMÍNGUEZ; HULL, 2001).

1.2 Morfologia e fisiologia neuronal

Os somas ou corpos celulares são a parte do neurônio que contêm as organelas responsáveis pela manutenção da célula, entre as quais encontram-se o núcleo, os retículos endoplasmáticos rugoso (RER) e liso (REL), os ribossomos, o complexo de Golgi e as mitocôndrias (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991). O tamanho do soma neuronal é um fator determinante para várias propriedades fisiológicas dos neurônios (HENNEMAN, 1957; HENNEMAN; SOMJEN; CARPENTER, 1965a; 1965b). Como a área da superfície neuronal varia exponencialmente com o diâmetro celular, diferenças relativamente pequenas no diâmetro do soma, em relação ao diâmetro do axônio, poderiam estar associadas com diferenças funcionalmente importantes na excitabilidade neuronal. Além disso, o diâmetro somático está positivamente correlacionado com o diâmetro do axônio, tanto que diferenças no diâmetro somático poderiam estar associadas com diferenças na velocidade de condução axonal (HENNEMAN; SOMJEN; CARPENTER, 1965b).

Os dendritos são considerados o principal sítio receptivo do neurônio, apresentam formas e tamanhos variados, são formados em diferentes períodos durante o desenvolvimento

e continuam a se desenvolver após o nascimento de acordo com o estabelecimento dos circuitos neurais (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991; VAN PELT; DITYATEV; UYLINGS, 1997). Além disso, eles apresentam uma função estrutural relacionada com a seleção e o estabelecimento de conexões sinápticas, desempenhando um papel na integração de sinais elétricos (JONES; COWAN, 1983; WOOLF; SHEPHERD; GREER, 1991; PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991; SHEPHERD, 1999a,b; SEGAL; ANDERSEN, 2000) e o padrão de excitabilidade dendrítica modifica-se com a sua variação morfológica e de acordo com a distribuição espacial de seus canais iônicos (HÄUSSER; SPRUSTON; STUART, 2000).

Os espinhos são protusões que surgem nos somas celulares e, principalmente, nos ramos dendríticos de neurônios, aumentando substancialmente a superfície receptiva da arborização dendrítica, recebendo os contatos sinápticos de outros neurônios (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991). Narkiewicz e colaboradores (1978) observaram que na MeA de gatos um espinho geralmente é inervado por um axônio eferente que forma uma sinapse assimétrica que parece ser excitatória. Além disso, foi relatado que a maior parte das sinapses do MeA do rato ocorrem sobre espinhos dendríticos (ICHIKAWA, 1987). Os espinhos exibem morfologias variadas e são comumente classificados, de acordo com os tamanhos relativos da cabeça e do pescoço, em três categorias (Figura 6): espinhos “mushroom”, ou espinhos em forma de cogumelo, com uma cabeça grande e um pescoço fino e curto; espinhos “thin”, ou espinhos delgados e que têm uma cabeça pequena e um pescoço fino; e espinhos do tipo “stubby” que não possuem pescoço, estando sua cabeça diretamente ligada ao dendrito (PETERS; KAISERMAN-ABRAMOF, 1970). A cabeça do espinho geralmente contém algumas estruturas especializadas, como microfilamentos de actina, REL e, nos espinhos maiores, o “aparelho do espinho”, que consiste de dois ou mais discos de REL separados por um material elétron-denso (GRAY; GUILLERY; 1963; PETERS; KAISERMAN-

ABRAMOF, 1970; MATUS et al., 1982; PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991; SPACEK; HARRIS, 1997; CAPANI et al., 2001).

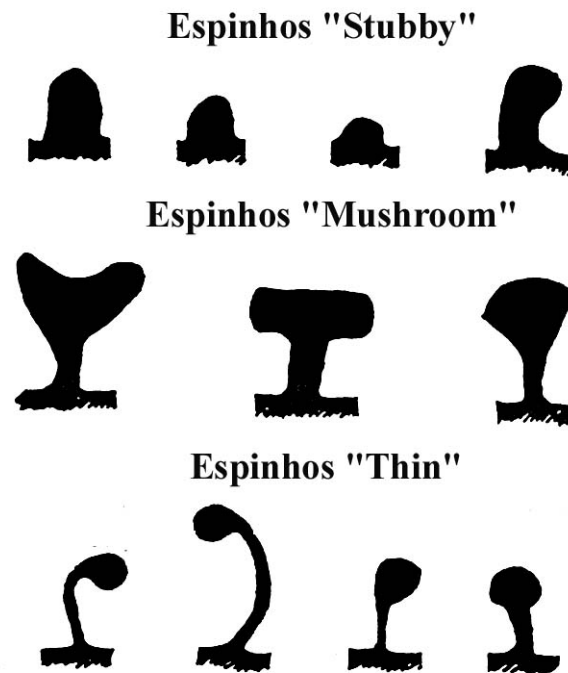


Figura 6. Representação esquemática das diferentes morfologias dos espinhos dendríticos (modificado de PETERS; KAISERMAN-ABRAMOF, 1970).

O espinho é uma estrutura especializada para a transmissão sináptica, pois receptores para diversos transmissores estão restritos à sua superfície e concentrados próximo aos elementos pré-sinápticos (NUSSER et al., 1998). O padrão de espaçamento e a forma dos espinhos dendríticos poderiam contribuir para a transformação dos sinais químicos sinápticos em modificações da voltagem neuronal (PERKEL; PERKEL, 1985) e também serem relevantes para a indução e a duração da atividade potencializada de longa duração (HARRIS;

KATER, 1994; COLLIN; MIYAGUCHI; SEGAL, 1997), amplificando o potencial de membrana e associando potenciais pós-sinápticos entre espinhos vizinhos para coativá-los (HARRIS; KATER, 1994). Adicionalmente, alterações no diâmetro do pescoço do espinho parecem modular a corrente iônica sináptica (WOOLF; SHEPHERD; GREER, 1991). Já espinhos com cabeças maiores são aparentemente mais estáveis, expressam um maior número de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA e contribuem mais para o estabelecimento de conexões sinápticas com maior repercussão funcional do que os espinhos com cabeças menores (KASAI et al., 2003), embora os dados disponíveis sobre essa relação morfofuncional permaneçam ainda controversos (NIMCHINSKY; SABATINI; SVOBODA, 2002). Os espinhos também servem para estabelecer uma compartimentalização bioquímica e estocar cálcio intracelularmente, o que poderia prevenir o aumento da concentração desse íon a um nível patológico durante a transmissão sináptica normal (HARRIS; KATER, 1994; SEGAL, 1995; KORKOTIAN; SEGAL, 1998).

2. OBJETIVOS

Os neurônios podem estar sob ação modulatória exercida por hormônios sexuais. Modificações morfológicas podem ocorrer em diferentes regiões encefálicas durante o período de desenvolvimento pré- e pós-natal, incluindo os adultos, e podem influenciar o padrão de alguns comportamentos característicos de machos ou de fêmeas nos diferentes estágios reprodutivos. A observação de diferenças relacionadas ao sexo, ao ciclo estral e à influência dos hormônios gonadais na expressão de alguns neurotransmissores, na densidade de espinhos dendríticos e no volume da MePD do rato pressupõe que a organização estrutural da MePD varia em função dos níveis circulantes dos hormônios gonadais. Assim, considerando-se que o conhecimento morfométrico preciso das populações neuronais da MePD é de fundamental relevância para uma melhor compreensão de seu papel funcional e que a caracterização ultra-estrutural dos neurônios e dos contatos sinápticos nesse subnúcleo ainda não foi relatada na literatura, o presente trabalho tem como objetivos:

- 1) Descrever a ultra-estrutura dos neurônios e dos contatos sinápticos na MePD de ratos machos adultos utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão;
- 2) Estudar as distribuições de cada tipo de sinapse e de suas vesículas na MePD do rato macho utilizando uma análise semi-quantitativa das vesículas sinápticas em eletromicrografias em aumentada magnificação;
- 3) Mensurar o volume somático neuronal na MePD de ratos machos e fêmeas em diestro, proestro e estro adultos utilizando-se o método de Cavalieri associado à técnica de contagem de pontos.

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos (3 meses de idade, machos e fêmeas), provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todos os animais foram mantidos sob temperatura ambiente em torno de 22 °C, um ciclo claro-escuro de 12:12 horas e com água e comida *ad libitum*.

Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais estudados e seu sofrimento. Além disso, todos os ratos foram manipulados de acordo com as leis internacionais de cuidados éticos e uso de animais de laboratório (Conselho Diretivo da Comunidade Européia de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC) e as normas brasileiras para o uso ético de animais.

3.2 Avaliação do ciclo estral

O estudo da citologia vaginal foi realizado nas ratas por duas semanas antes do experimento para determinar a regularidade do ciclo estral. Para isso foi utilizada uma pipeta de tamanho adequado preenchida com solução salina. Após a coleta, o “esfregaço vaginal” foi colocado sobre uma lâmina histológica e observado ao microscópio óptico para a identificação dos tipos celulares característicos de cada fase (Figura 7, apenas para ilustração). As ratas que não apresentavam dois ciclos estrais normais consecutivos não foram utilizadas nesse estudo.

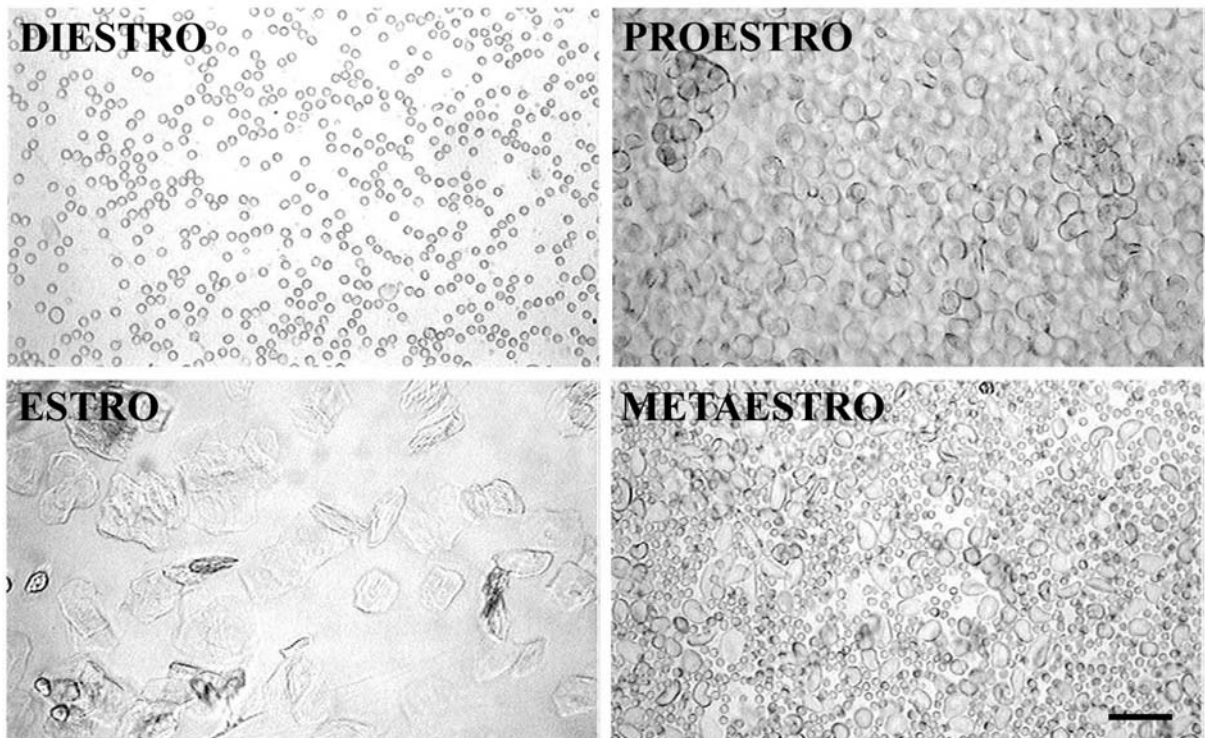


Figura 7. Fotomicrografias demonstrando a clássica citologia vaginal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral. Diestro: predominância de leucócitos; Proestro: predominância de células epiteliais nucleadas; Estro: predominância de células queratinizadas; Metaestro: presença de todos os tipos celulares anteriores. Barra: 20 μ m.

3.3 Experimento 1: Características ultra-estruturais dos neurônios e contatos sinápticos na amígdala medial pósterio-dorsal de ratos machos adultos

3.3.1 Microscopia eletrônica

Os animais (n= 8) foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/Kg, i.p.; Cristalia, Brasil), injetados com 1000 UI de heparina (Cristalia, Brasil) no ventrículo cardíaco esquerdo e perfundidos com o auxílio de uma bomba peristáltica (Control Company, Brasil, 20 ml/min) com 200 ml de solução salina, seguida por 100 ml de paraformaldeído 4 % (Reagen, Brasil) e glutaraldeído 0,5 % (Sigma, EUA) diluídos em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4. Os encéfalos foram removidos, seccionados coronalmente em vibrátomo (100 μ m; Leica, Alemanha) e as áreas contendo a MePD foram selecionadas e identificadas segundo o atlas para encéfalo de

rato de Paxinos e Watson (1998). Esta correspondia aos valores de 3,14 a 3,30 mm posteriormente à linha bregmática, como demonstrado na Figura 2. A seguir foram pós-fixadas na mesma solução durante a noite.

As secções foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS, 3 x 30 min), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (Sigma, EUA) por 1 h, novamente lavadas em PBS (3 x 15 min) e desidratadas em uma série com concentrações crescentes de álcool e posterior inclusão em Araldite, seguindo o seguinte protocolo: álcool 50% 2 x 5 min; álcool 70% 2 x 10 min; álcool 96% 2 x 20 min; álcool 100% 2 x 20 min; óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences, EUA) durante 5 min; mistura 1:1 Durcupan ACM-Fluka (Suíça) e óxido de propileno durante 10 min; Durcupan a vácuo durante 24 h a temperatura ambiente e na estufa por 48 hs a 60°C (RODRIGO et al., 1996).

Secções semifinas (1µm) foram obtidas com um ultramicrotomo (MT 6000-XL, RMC, Tucson, EUA) usando-se navalhas de vidro e analisadas ao microscópio óptico após coloração com azul de toluidina 1% diluída em tetraborato de sódio 1% (MERCK, Alemanha). A MePD foi identificada, seccionada, colada com resina em outro bloco e mantida por 48 h a 60°C para repolimerização. Após, secções ultrafinas (70-80 nm) foram obtidas no mesmo ultramicrotomo e montadas em grades de cobre. Posteriormente, elas foram contrastadas com acetato de uranila 2% (MERCK, Alemanha) por 30 min e citrato de chumbo 1% (MERCK, Alemanha) por 20 min (REYNOLDS, 1963), observadas e fotografadas no microscópio eletrônico JEM 1200 EX II (Centro de Microscopia Eletrônica, UFRGS).

3.3.2 Análise morfológica dos botões sinápticos

Uma secção ultrafina da MePD, que cobriu completamente 1 mesh de uma grade de cobre (200 mesh) com uma área de 15,625 µm², de um animal foi analisada. Usando o mesmo procedimento para microscopia eletrônica acima, 49 eletromicrografias (20.000x) foram

coletadas seriadamente dessa região, como segue: a primeira eletromicrografia foi obtida do canto superior direito e então a secção foi deslocada para a esquerda. Esse deslocamento no eixo Y corresponde a 10 na escala do painel de controle. Posteriormente, 7 eletromicrografias foram obtidas nesse parâmetro. Finalizada essa linha, a secção era retornada ao lado esquerdo e deslocada para baixo na mesma escala pelo eixo X e outras 7 eletromicrografias eram adquiridas. Esse procedimento foi repetido até o canto inferior direito ser atingido. As imagens negativas foram escaneadas (AGFA scanner, Alemanha) e então magnificadas (35.000x) e impressas com o auxílio de um computador. Em cada imagem, os botões sinápticos foram identificados se os terminais sinápticos tinham as seguintes características: vesículas sinápticas, aposição de membranas e densidade sináptica (MATSUDA; KOBAYASHI; ISHIZUKA, 2004). No entanto, se uma dessas características estava ausente, a estrutura era excluída da análise. É muito importante levar em consideração que das 49 eletromicrografias somente 96 terminais axônicos formaram sinapses identificáveis, um dado similar aquele obtido do núcleo da amígdala basal (BRINLEY-REED; MASCAGNI; McDONALD, 1995). Portanto, 96 terminais sinápticos foram analisados em uma área de $15,62 \mu\text{m}^2$ da MePD. Os terminais sinápticos foram classificados como excitatórios ou contendo vesículas eletron-lúcidas redondas se mais de 80% do número total de vesículas eram redondas. Se mais de 20% das vesículas em um terminal sináptico eram achatadas, ele era classificado como inibitório ou contendo vesículas eletron-lúcidas achatadas. As vesículas eletron-lúcidas achatadas foram identificadas quando seu maior diâmetro era duas vezes o diâmetro menor (UCHIZONO, 1965; MATSUDA; KOBAYASHI; ISHIZUHA, 2004). Por outro lado, entre as vesículas eletron-lúcidas redondas e achatadas muitas vezes vesículas com centro denso (DCV) foram observadas. Portanto, os terminais com vesículas eletron-lúcidas redondas ou achatadas foram também classificados como contendo ou não DCV. Adicionalmente, os botões sinápticos foram classificados de acordo com a estrutura pós-

sináptica que contatavam ramos ou espinhos dendríticos, somas celulares e axônios. Nessas imagens, os espinhos dendríticos ocasionalmente eram contínuos com o dendrito que os originaram. Portanto, os espinhos dendríticos foram identificados quando exibiam uma rede de finas fibrilas entrelaçadas, algumas vezes contendo cisternas de retículo endoplasmático liso ou aparelho espinhoso (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1991).

3.4 Experimento 2: Influência do sexo e do ciclo estral no volume somático neuronal no subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial de ratos adultos

Os animais (5 machos, 5 fêmeas em diestro, 4 fêmeas em proestro e 5 fêmeas em estro) foram perfundidos no período da manhã e seus encéfalos processados da mesma forma como no Experimento 1. Para a mensuração do volume somático neuronal foi utilizada a técnica de reconstrução de secções seriadas (CRUZ-ORIVE; WEIBEL 1990; LEDDA et al., 2000). Secções semifinas seriadas (1 μ m) foram obtidas com um ultramicrotomo usando-se uma navalha de vidro e analisadas ao microscópio óptico após coloração com azul de toluidina 1% diluída em tetraborato de sódio 1%.

Imagens contendo a MePD foram obtidas e digitalizadas usando-se um microscópio Nikon Eclipse E-600 (x 1000 e amplificadas mais 100% para análise) acoplados a uma câmera CCD Pro-Series “High Performance” com o auxílio do programa “Image Pro Plus Software 4.1” (Media Cybernetics, EUA). Um mínimo de 12 secções e 42 áreas/ponto por soma neuronal foram analisadas. A MePD direita e esquerda foram analisadas separadamente (10 neurônios foram mensurados em cada hemisfério, somando um total de 20 neurônios para cada animal de cada um dos grupos experimentais). Somente os corpos celulares contidos completamente na série de secções foram utilizados na avaliação quantitativa. A estimativa do volume somático neuronal da MePD direita e esquerda de todos os animais foi obtida com o método de Cavalieri

associado com a técnica de contagem de pontos. O valor médio do volume somático neuronal foi calculado com a equação:

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

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

Os dados foram comparados quanto ao efeito da lateralidade e entre os grupos com a análise da variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni (ZAR, 1999). O nível estatístico foi estabelecido a $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Características ultra-estruturais dos neurônios e contatos sinápticos na amígdala medial póstero-dorsal de ratos machos adultos.

Este trabalho foi submetido à revista “Journal of Anatomy” e no momento encontra-se em revisão.

ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF NEURONES AND SYNAPTIC CONTACTS IN THE POSTERODORSAL MEDIAL AMYGDALA OF ADULT MALE RATS

E.E.S. Hermel^{1,2}, M.C. Faccioni-Heuser^{1,2,3}, S. Marcuzzo¹; A.A. Rasia-Filho^{1,4,5}, M. Achaval^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³Centro de Microscopia Eletrônica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, RS, Brazil

Correspondence address M. Achaval

Laboratório de Histofisiologia Comparada

Departamento de Ciências Morfológicas

ICBS, UFRGS

Sarmento Leite 500

90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Fax +55-51-33163092

e-mail: 00003522@ufrgs.br

Running title: Ultrastructure of the posterodorsal medial amygdala

Abstract

The aim of the present study was to describe the ultrastructure of neurones (n=8) and to analyse the synaptic terminal distribution (n=1) in the posterodorsal subnucleus of the medial amygdala (MePD) of adult male rats. Using transmission electron microscopy, it was possible to identify many spiny and aspiny dendrites, unmyelinated axonal bundles, single axonal processes, few myelinated axons, blood vessels and glial processes in the neuropil. Though the dendritic spines showed different morphologies, they usually had a single excitatory synaptic contact (33.3%) with round electron-lucid vesicles alone or with dense-cored vesicles (DCV) on their heads. Axodendritic synapses were most frequently observed (58.3%) and were both inhibitory and excitatory types. Their presynaptic region contained either round or flattened vesicles that were both alone or with DCV. The dendrites often received many synapses on a single shaft, and axon terminals were seen to display synaptic contacts with one or more postsynaptic structures. Inhibitory and excitatory axosomatic synapses (7.3%) and excitatory axoaxonic synapses (1%) were also identified. The present report provides new findings relevant to the study of the MePD cellular organisation and should be associated with other morphological data in order to reveal the functional activity of this area in male rats.

Key words: amygdaloid complex, neurone, spines, synapse, electronic microscopy

Introduction

The amygdala, which is not an elementary functional unit, is composed of several interconnected nuclei with intra- and extra-amygdaloid connections that play a role in the modulation and integration of the behavioural, vegetative, and endocrine activities of the animal with its environment (LeDoux, 1992; Davis, 1992; Alheid et al. 1995; Pitkänen et al. 1997; Swanson & Petrovich 1998; Rasia-Filho et al. 2000; Pitkänen, 2000; Petrovich et al. 2001).

In rats, the medial amygdala (MeA) is considered a part of the extended amygdala (Alheid et al. 1995) and integrates sexually dimorphic pathways with the vomeronasal system and hypothalamic nuclei (Segovia & Guillamón, 1993; Petrovich et al., 2001). The MeA has been divided in four subnuclei: anterodorsal, anteroventral, posterodorsal, and posteroventral (Alheid et al., 1995; Canteras et al. 1995). The posterodorsal medial amygdala (MePD) is involved in the modulation of male and female sexual behaviour (Erskine, 1993; Coolen et al. 1996; Pfaus & Heeb, 1997; Newman, 1999), hypothalamic neuroendocrine regulation (Simerly, 2004), and maternal behaviour (Lonstein et al. 2000; Sheehan et al. 2000).

Almost all reports dealing with the neuronal morphology of the MeA used light microscopy (Valverde, 1967; de Olmos et al. 1985; McDonald, 1992; Rasia-Filho et al. 1999; Rasia-Filho et al. 2004). The MePD has been described as having stellate and bitufted multipolar neurones, with ovoid, fusiform, round, or piriform cell bodies. These are small- and medium-sized, with sparsely branched dendritic trees. Dendrites are rectilinear or sinuous, aspiny or showing pleomorphic spines, with parallel, perpendicular or oblique orientations in relation to the optic tract (de Olmos et al. 1985; Rasia-Filho et al. 1999). On the other hand, ultrastructural studies of the MePD are scarce. One previous study using electron microscopy described the local synaptic morphology in the whole MeA of cats (Narkiewicz et al. 1978). In this study the presence of symmetrical and asymmetrical synaptic

contacts on dendritic shafts and spines was reported. The synaptic boutons were often large and occasionally very elongated, containing flattened or round vesicles, and usually a single spine was innervated by a single axon (Narkiewicz et al. 1978). Another study showed sex differences and the influence of the gonadal hormones on synaptic connections in the entire rat MeA (Nishizuka & Arai, 1981), but neither differentiated the types of synaptic vesicles nor the synaptic boutons (excitatory or inhibitory). Because these studies did not separate the data from the different rat MeA subnuclei, the objective of the present study was to use electron microscopy in order to examine the ultrastructural characteristics of neurones and their synaptic contacts in the MePD of adult male rats. In addition, to study the distribution of each type of synapse and its vesicles in this same subnucleus using a semi-quantitative analyses of the synaptic vesicles in electron micrographs at higher magnification. By describing the cellular organisation of this area, it is intended to gather basic data that can add to the understanding of the functional organisation of the MePD.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats (four months old, N=8) from a local breeding colony (ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) were housed under standard laboratory conditions with food and water available *ad libitum* and maintained under a 12:12 light-dark cycle (lights on at 09:30 h). All efforts were made to minimise the number of animals studied and their suffering. In addition, all rats were manipulated according to international laws for the ethical care and use of laboratory animals (European Communities Council Directive of 24 November 1986, 86/609/EEC) and to Brazilian guidelines on the ethical use of animals.

Electron microscopy procedure

All animals were anaesthetised with sodium thiopental (50 mg/Kg, i.p.; Cristalia, Brazil) in the morning of the first day of the experiment and then transcardially perfused with 0.9% saline solution, and 0.5% glutaraldehyde (Sigma Chemicals Co., USA) and 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in 0.1M phosphate buffer (PB) pH 7.4, at room temperature. Brains were sectioned (100 μm) using a vibratome (Leica, Germany), the sections were postfixed overnight in the same fixative solution, washed in PB saline (PBS) and postfixed in 1% OsO_4 (Sigma Chemicals Co., USA) in PB pH 7.4 for 1h, at room temperature. Sections were then washed with PBS and dehydrated in a graded series of alcohol and propylene oxide (Electron Microscopy Sciences, USA), embedded in resin (Durcupan, ACM-Fluka, Switzerland), left in a vacuum for 24 h, and, afterwards, put onto slides with resin and polymerised for 48 h at 60°C. Brain slices provided a small piece of tissue containing the MePD, 3.3 mm posterior to the bregma (Paxinos & Watson, 1998), that was removed from the slide and glued onto resin blocks and polymerised once again for 48 h at 60°C. Semithin sections (1 μm) were obtained using an ultramicrotome (MT 6000-XL, RMC, Tucson, USA) and stained with 1% toluidine blue diluted in 1% sodium tetraborate (Rodrigo et al. 1996). Ultrathin sections (70-85 nm), containing the MePD (Fig. 1), were obtained with an ultramicrotome (Leica Ultracut UCT 2.0, Austria) and mounted on copper grids (200 mesh). In accordance with Reynolds (1963), these sections were stained with 1% uranyl acetate (Merck, Germany) followed by 1% lead citrate (Merck, Germany) and examined using an electron microscope (JEM 1200 EXII, Japan).

Morphometric analysis of synaptic boutons

An ultrathin section of the MePD of one animal that completely covered 1 mesh of a cooper grid (200 mesh) with an area of 15,625 μm^2 was analysed. Using the same electron

microscope as above, 49 electron micrographs (20,000x) were collected serially from this region, as follows: the first electron micrograph was obtained from the upper right corner and then, the section was displaced to the left. This displacement in the Y-axis corresponds to 10 on the scale from the control panel. Afterwards, seven electron micrographs were obtained in this parameter. Finishing this line, the section was returned to the left side and displaced down in the same scale to X-axis and seven more electron micrographs were taken. This procedure was repeated until the lower right corner was reached. The negative images were scanned (Agfa scanner, Germany) and then magnified (35,000x) and copied using a personal computer. In each image, the synaptic boutons were identified if the profiles had the following features: synaptic vesicles, membrane apposition and synaptic density (Matsuda et al. 2004). Nevertheless, if one of these characteristics was absent, the structure was excluded from the analysis. It is very important to take into account that over 49 electron micrographs of the MePD only 96 axon terminals formed identifiable synapses, the data are similar to those obtained from the magnocellular basal amygdaloid nucleus (Brinley-Reed et al. 1995). Thus, 96 synaptic terminals were analysed in an area of $15.62 \mu\text{m}^2$ of the MePD. Synaptic terminals were classified as excitatory or round electron-lucent boutons if more than 80% of the total vesicles were round. If more than 20% of the electron-lucid vesicles on a synaptic terminal were flattened, it was classified as inhibitory. The flattened vesicles were identified when the longer diameter was than twice that of the shortest diameter (Uchizono, 1965; Matsuda et al. 2004). On the other hand, among the round and flattened electron-lucent synaptic vesicles dense-cored vesicles (DCV) often appeared. Thus, we also classified the round and flattened synaptic terminals with DCV or without them. Additionally, the synaptic boutons were found in post synaptic contact with dendritic shaft, dendritic spine, neuronal body or axon. In thin sections, the dendritic spines were occasionally seen to be continuous with the parent dendrite. Thus, the dendritic spines were identified when they exhibited a

mesh of fine interwoven thin filaments, sometimes containing cisternae of smooth endoplasmic reticulum or spine apparatus (Peters et al. 1991).

Results

Ultrastructural features of neurones and synaptic contacts

Neurones from the MePD had a thin rim of cytoplasm and a large round pale nucleus occupying the centre of the soma. The nucleus presented superficial or deep indentations of the nuclear membrane that sometimes extended to its centre. Homogeneously dispersed heterochromatin and a single spherical peripheral nucleolus composed of dense granules and fine filaments were also observed (Figs. 2 and 3). The neuronal cytoplasm exhibited randomly distributed, rounded and elongated mitochondria, and developed cisternae of rough endoplasmic reticulum (RER), either dispersed in the cytoplasm or emerging from the nuclear membrane. Ribosomes were found adhered to the outer surfaces of RER cisternae, forming Nissl bodies, either isolated or forming polysomes. Cisternae of the Golgi complex formed stacks associated with sparse vesicles in the cytoplasm near to the nucleus or at the base of the dendrites. Lysosomes, cisternae of smooth endoplasmic reticulum (SER), intermediate filaments, and microtubules were also identified (Fig. 3).

In the neuropil of the MePD there were few myelinated axons with a thin myelin ensheathment, numerous unmyelinated axonal bundles or single axons, synaptic contacts, blood vessels, glial processes as well as spiny and aspiny dendrites (Figs. 2, 3 and 4).

Proximal dendrites contained the same elements as the neuronal perikaryon (Figs. 2C and 4C). In the distal dendritic portions, it was possible to observe few cisternae of SER, elongated mitochondria with parallel, longitudinal orientation and numerous regularly arranged, parallel microtubules along the length of the branches. The dendritic shafts

presented different thicknesses, had rectilinear or irregular contours and spines emerging along their surface, but aspiny dendrites were also observed (Figs. 2, 4 and 5).

Spines displayed a variety of shapes and were mainly found protruding from dendrites (Figs. 2 and 5), although some were also observed in the neuronal perikarya (Fig. 3). Dendritic spine morphologies were classified according to Peters and Kaiserman-Abramof (1970). That is, most dendritic spines consisted of a short or long thin stalk with a small head, which sometimes was absent, referred to as “thin” spine (Fig. 5A-C); a “mushroom”-like shape with a short thick stalk and a large head (Fig. 5D-F); or, simply short or stubby protrusions, without a clearly definable stalk or head (Fig. 5G-I). Stalks and heads of spines exhibited marked dense material and elongated, flattened SER cisternae (Fig. 5D, H) that were in continuity with the SER of the dendrite. SER in large and mushroom-shaped spines constituted the spine apparatus (Fig. 5E, F), with a variable cluster of flattened cisternae arranged parallel to each other and in continuity with the SER cisternae in the dendritic shafts. Usually this apparatus was located in the head and along the stalk of each spine, with its longer axis oriented parallel to the length of the spine (Fig. 5E, F). Filaments that resemble actin were also observed in the spine heads (Fig. 5E). Prominent postsynaptic densities (PSDs) were mainly observed in the spine heads (Fig. 5A, F, H). Spine volume tended to be proportional to the areas of the PSD. These PSDs formed dense macular plaques in small spines but showed a perforated aspect in the large and mushroom-shaped spines (Fig. 5E).

Somatic spines (Fig. 3B) appeared to be similar to dendritic spines but exhibited simpler shapes, usually with a thin stalk and a small head, and their cytoplasm did not contain spine apparatus. Mushroom-like spines were not identified in the soma.

Axodendritic synaptic contacts were the most common type identified in the neuropil and displayed both symmetrical and asymmetrical arrangements (Fig. 4). The asymmetrical type was characterised by an accumulation of dense material on the inner face of the postsynaptic

membrane, sometimes showing thin filaments extending into its cytoplasm (Fig. 4A, B). This PSD was found to be continuous or perforated. For the symmetrical type, the PSD constituted a thin layer, approximately equal to the dense material observed on the inner face of the presynaptic membrane, whose aspect was not well defined (Fig. 4D). The presynaptic terminals showed round or flattened electron-lucent vesicles and, occasionally, large DCV intermingled among the more numerous electron-lucent ones (Fig. 4). The dendrites often received many synapses upon a single shaft (Fig. 4C), and axon terminals were observed to form synaptic contacts with one or more postsynaptic structures (Fig. 4E). Dendritic spines usually received one asymmetrical synapsis (Fig. 5) with electron-lucent round vesicles both alone or sometimes with large DCV intermingled among the more numerous ones, whereas somatic spines received one or two axon terminals forming symmetrical inhibitory synapses (Fig. 3B). The synaptic contacts usually occurred on the top and along the head of spines (Fig. 5). As a rule, the surface of the head of the spine on the site of the synapsis had a flattened aspect. In the synaptic junction, a prominent PSD was frequently continuous, although the opposite was observed in larger spines (Fig. 5E). Axosomatic synapses showed round or flattened electron-lucent vesicles and sometimes with large DCV intermingled among the more numerous ones in the presynaptic element (Fig. 5F) and axoaxonic synapses were also identified.

Morphometric analysis of synaptic boutons

Numerous serial electron microscopic images exhibited synaptic terminals. From the total of synaptic boutons analysed (96), 84 (87.5%) appeared to be excitatory and 12 (12.5%) ones inhibitory. Regarding the neuronal regions of contact, 47 synaptic boutons (58.3%) were found in contact with dendritic shafts, 32 (33.3%) were in contact with dendritic spines, 7 (7.3%) were in the neuronal somata and just 1 (1%) was in contact with an axon. Table 1

shows the proportion of excitatory and inhibitory synapses on each neuronal region and the proportion of synaptic boutons with or without DCV in the same neuronal region.

Discussion

The general cytoplasmic and nuclear characteristics of the MePD neurones were similar to those of other areas of the rat brain (Peters et al. 1991). The present study, using electron micrographs to quantify the distribution of the different types of synaptic boutons, has shown terminals with round electron-lucent synaptic vesicles related to the four studied neuronal regions, however, most of them contact with dendritic shafts and spines, while the synaptic boutons with flattened electron-lucent vesicles are only distributed on dendritic shafts and neuronal bodies. Moreover, synaptic terminals displaying only DCV were not identified; nevertheless these vesicles appeared among the round and flattened ones on all neuronal regions. Dendrites were characterised by the presence of dendritic spines with single excitatory asymmetrical synaptic boutons, containing round electron-lucent vesicles either alone or in some cases intermingled with large DCV usually terminating at the head. On the other hand, the synapses located on the dendritic shafts were both symmetrical and asymmetrical in form, as yet described for cat MeA (Narkiewicz et al.1978). Nevertheless new findings have added to the results previously obtained in the MeA of rats and cats and are relevant for the understanding of the cellular and synaptic organisation of this structure (Narkiewicz et al.1978; Nishizuka & Arai, 1981).

The neurones of the MePD are involved in sexual behaviour, for which they receive excitatory and inhibitory inputs from several brain sources (de Olmos et al., 2004). Axon terminals containing round electron-lucent vesicles in asymmetrical synapses were observed in the rat MePD and represented 87.5% of the total number of synaptic boutons analysed. They were located on dendritic shafts and spines, cell bodies and axons. The ultrastructural

findings regarding synaptic appearance on dendritic spines in the MePD suggest that they might play an important excitatory role in this region (Gray, 1959). Round electron-lucent vesicles have been described as containing excitatory transmitters, and axon terminals in asymmetrical synaptic contacts on dendritic shafts and spines have also been shown to contain excitatory transmitters such as glutamate (Peters et al. 1991). Glutamate-immunoreactive cells were detected in the MeA of male gerbils (Simmons & Yahr, 2003), although the content of glutamate and aspartate in this nucleus is lower than in other amygdaloid nuclei (Ottersen & Storm-Mathisen, 1986; Gloor, 1997), and, in addition, the MePD receives synaptic afferents, that seem to be glutamatergic (McDonald et al. 1999), from cortical areas such as the infralimbic cortex, prelimbic area and ventral agranular insula (Pitkänen, 2000). Additionally, the ventral subiculum projects lightly to the MeA (Canteras and Swanson, 1992; Petrovich et al. 2001). Also, some excitatory synapses contact with the neuronal somata, showing a possible role of the glutamate on this region in the neurotransmission.

On the other hand, axon terminals containing flattened electron-lucent vesicles in symmetrical synapses were also observed in the rat MePD and represented 12.5% of the total of synaptic boutons analysed. They were always located on dendritic shafts, cell bodies and somatic spines. According to Peters and colleagues (1991), these axon terminals might contain GABA. Previous studies showed the presence of GABAergic immunoreactivity in the MeA of cats (Paré & Smith, 1993), gerbils (Simmons & Yahr, 2003) and rats (Nitecka & Ben-Ari, 1987; Stefanova, 1998; Stefanova & Ovtcharoff, 2000). It might also be suggested that some of these axon terminals forming symmetrical synapses in the rat MePD may have a possible inhibitory activity on dendritic shafts and on the neuronal somata. Moreover, it is interesting to note that GABA is more abundant in the neuropil than in the perikarya in the MeA (Nitecka & Ben-Ari, 1987). Besides, MeA seem to be the main target of GABAergic

fibres to the amygdala that may cause, at least in part, from the GABAergic neurones in the basal dorsal nucleus of the amygdala (Nitecka & Frotscher, 1989).

Axon terminals in the MePD also displayed few DCV intermingled with several electron-lucent vesicles. Various studies have shown different neuropeptides in the MeA, sometimes mainly in the MePD, such as substance P, cholecystokinin, vasopressin, somatostatin, oxytocin, neuropeptide Y, opioids, angiotensin II, galanin, corticotropin-releasing hormone, and gonadotrophin-releasing hormone (Frankfurt et al. 1985; Micevych et al. 1988; De Vries, 1995; Veinante & Freund-Mercier, 1997; Wilson et al. 2002; and, for a review, see Gloor, 1997, and de Olmos et al. 2004). The physiological roles of all these transmitters within the MePD are unclear. It is interesting to note that oxytocin binding sites are preferentially located in the medial and lateral layers and moderately in the MePD intermediate layer (Veinante & Freund-Mercier, 1997). Oxytocin in the MeA of the mice facilitated social memory acquisition (Ferguson et al. 2001). In relation to other neuropeptides, emotional stress induces substance P release in the rat MeA (Ebner et al. 2004) and angiotensin II administration into the MeA inhibited sexual behaviour in male rats (Breigeiron et al. 2002). In the MePD, delta-opioid receptors are associated with axon terminals that form pericellular baskets around cell bodies suggesting that they may be critical for modulating the influence of other neurotransmitter systems within this brain area, particularly in males (Wilson et al. 2002). On the other hand, the involvement of MeAD/ bed nucleus of stria terminalis (BSNT) and MePD/BSNT bidirectional circuits (Coolen & Wood, 1998) on the regulation of the social behaviour as well as in male mating behaviour and various form of aggression is well known. The latter circuit (rat and hamster) is characterized by numerous substance P neurones and other cellular groups with enkephalinergic neurones (Newman, 1999). It is important to take into account that in a detailed study of tyrosine hydroxylase immunoreactive afferent and their targets in the rat amygdala, that only scarce immunoreactive plexus in MeA were

identified (Asan, 1997). Further studies are needed to reveal the possible associations between vesicular transmitter contents and intra-amygdaloid or extra-amygdaloid fibre plexus within and to the extended amygdala (for example, see de Olmos et al. 2004).

As with dendritic spines in the rat cerebral cortex (Peters & Kaiserman-Abramof, 1970) and hippocampus (Sorra & Harris, 2000), MePD spines displayed different morphologies. Dendritic spines in the MePD showed prominent PSDs that were proportional to their volumes, and large mushroom-like spines displayed perforated PSDs, as in other brain areas. Peters and Kaiserman-Abramof (1969) showed that these perforated PSDs constitute a single dense plaque that can present one or more perforations. Recent studies have also shown that PSD dimensions are proportional to spine volume and to the number of presynaptic vesicles (Spacek & Harris, 1997; Harris et al. 1992). Moreover, PSD size and shape may change with modifications in the level of synaptic activity (Harris & Stevens, 1989) and this would suggest that they represent more stable synaptic contacts (Kasai et al. 2003). The MePD dendritic spines also showed SER cisternae, in continuity with the SER of dendrites that, in larger and mushroom-like spines, formed the spine apparatus. These structures probably modulate calcium concentration, acting as a biochemical compartment in spines (Spacek & Harris, 1997; Sabatini et al. 2001; Reid, 2002). Moreover, the different morphological aspects of the spines would contribute for the transcription of synaptic chemical signals into neuronal voltage modifications (Perkel & Perkel, 1985). Changes in the structure of head or stalk of the dendritic spines can directly influence synapses acting upon these structures. Woolf and colleagues (1991) showed that changes in the stalk diameter modulate synaptic ionic current and, according to Korkotian and Segal (2000), longer spines are more independent of the parent dendrite than short ones that may be functionally linked. Spines with large heads (stubby and mushroom-like shapes) apparently are more stable, express large numbers of AMPA-type glutamate receptors, and contribute to strong synaptic connections. Spines with

small heads, like the thin ones, would be morphologically unstable and contribute to weak or silent synaptic connections (Kasai et al. 2003), although the data available on this morphological and functional relationship remains controversial (for a review see Nimchinsky et al. 2002).

Finally, studies employing other research methods, such as immunohistochemistry or Golgi-impregnation for electronic microscopy, would complement the present findings. For example, immunohistochemical studies would be important to reveal the neurochemical content of the synaptic vesicles presently described. The number of open questions raised here highlights the need for further research on the MePD, its morphology and function.

Acknowledgements

The authors are indebted to Gisele Lovatel, Maria Izabel Ugalde da Rocha, Moema Queiros and Christiane Queiros Lopes for their technical assistance. This work was supported by Brazilian funding agencies CNPq and CAPES.

References

- Alheid GF, de Olmos JS, Beltramino CA** (1995) Amygdala and extended amygdala. In: *The Rat Nervous System* (ed. Paxinos G), pp. 495-578. San Diego: Academic Press.
- Asan E** (1997) Ultrastructural features of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive afferents and their targets in the rat amygdala. *Cell Tiss. Res.* **288** 449-469.
- Breigeiron M, Morris M, Lucion AB, Sanvitto, GL** (2002) Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Horm. Behav.* **41**, 267-274.
- Brinley-Reed M, Mascagni F, McDonald AJ** (1995) Synaptology of prefrontal cortical projections to the basolateral amygdala: an electron microscopic study in rat. *Neurosc. Lett.* **202**, 45-48.
- Canteras NS, & Swanson LW** (1992) Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: A PHAL anterograde track-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* **324**, 180-194.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1995) Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *J. Comp. Neurol.* **360**, 213-245.

Coolen LM, Peters HJPW, Veening JG (1996) Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res.* **738**, 67-82.

Coolen LM, Wood RI (1998) Bidirectional connections of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster brain: simultaneous anterograde and retrograde tract tracing. *J. Comp. Neurol.* **399**, 189-209.

Davis M (1992) The role of the amygdala in conditioned fear. In: *The amygdala* (ed. Aggleton JP), pp. 255-306. New York: Wiley-Liss.

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

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

De Vries GJ (1995) Studying neurotransmitter systems to understand the development and function of sex differences in the brain: the case of vasopressin. In: *Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones* (eds. Micevych PF, Hammer Jr RP), pp.254-278. New York: Cambridge University Press.

Ebner K, Rupniak NM, Saria A, Singewald N (2004) Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. *PNAS* **101**, 4280-4285.

Erskine MS (1993) Mating-induced increases in fos protein in preoptic area and medial amygdala of cycling female rats. *Brain Res. Bull.* **32**, 447-451.

Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ (2001) Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J. Neurosci.* **21**, 8278-8285.

Frankfurt M, Siegel RA, Sim I, Wuttke W (1985) Cholecystokinin and substance P concentrations in discrete areas of the rat brain: sex differences. *Brain Res.* **358**, 53-58.

Gloor P (1997) The amygdaloid system. In: *The temporal lobe and limbic system* (ed. Gloor P), pp.591-721. New York: Oxford University Press.

Gray EG (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: An electron microscope study. *J. Anat.* **93**, 420-433.

Harris KM, Jensen FE, Tsao B (1992) Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J. Neurosci.* **12**, 2685-2705.

Harris KM, Stevens JK (1989) Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neurosci.* **9**, 2987-2997.

Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H (2003) Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* **26**, 360-368.

Korkotian E, Segal M (2000) Structure-function relations in dendritic spines: is size important? *Hippocampus* **10**, 587-595.

LeDoux JE (1992) Emotion and amygdala. In: *The amygdala* (ed. Aggleton JP), pp.339-351. New York: Wiley-Liss.

Lonstein JS, Grecó B, De Vries GJ, Stern JM, Blaustein JD (2000) Maternal behavior stimulates c-fos activity within estrogen receptor alpha-containing neurons in lactating rats. *Neuroendocrinology* **72**, 91-101.

Matsuda S, Kobayashi Y, Ishizuka N (2004) A quantitative analysis of the laminar distribution of synaptic boutons in field CA3 of the rat hippocampus. *Neurosci. Res.* **49**, 241-251.

McDonald AJ (1992) Cell types and intrinsic connections of the amygdala. In: *The amygdala* (ed. Aggleton JP), pp. 67-96. New York: Wiley-Liss.

McDonald AJ, Shammah-Lagnado SJ, Shi C, Davis M (1999) Cortical afferents to the extended amygdala. *Ann. NY Acad. Sci.* **877**, 309-338.

Micevych PF, Matt DW, Go VLW (1988) Concentrations of cholecystokinin, substance P, and bombesin in discrete regions of male and female rat brain: sex differences and estrogen effects. *Exp. Neurol.* **100**, 416-425.

Narkiewicz O, Juraniec J, Wrzolkowa T (1978) The distribution of axon terminals with flattened vesicles in the nuclei of the amygdaloid body of the cat. *J. Hirnforsch.* **19**, 133-143.

Newman SW (1999) The medial extend amygdala in male reproductive behavior: a node in the mammalian social behavior network. *Ann. NY Acad. Sci.* **877**, 242-257.

Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 313-353.

Nishizuka M, Arai Y (1981) Sexual dimorphism in synaptic organization in the amygdala and its dependence on neonatal hormone environment. *Brain Res.* **212**, 31-38.

Nitecka L, Ben-Ari Y (1987) Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *J. Comp. Neurol.* **266**, 45-55.

Nitecka L, Frotscher M (1989) Organization and synaptic interconnections of GABAergic and cholinergic elements in the rat amygdaloid nuclei: single- and double-immunolabeling studies. *J. Comp. Neurol.* **279**, 470-488.

- Ottersen OP, Storm-Mathisen J** (1986) Excitatory amino acid pathways in the brain. In: *Excitatory Amino Acids and Epilepsy* (eds. Schwartz R, Ben-Ari Y), pp. 263-284. New York/London: Plenum Press.
- Paré D, Smith Y** (1993) Distribution of GABA immunoreactivity in the amygdaloid complex of the cat. *Neuroscience* **57**, 1061-1076.
- Paxinos G, Watson C** (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Perkel DH, Perkel DJ** (1985) Dendritic spines: role of active membrane in modulating synaptic efficacy. *Brain Res.* **325**, 331-335.
- Peters A, Kaiserman-Abramof IR** (1970) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* **127**, 321-356.
- Peters A, Kaiserman-Abramof IR** (1969) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The synapses upon dendritic spines. *Z. Zellforsch.* **100**, 487-506.
- Peters A, Palay SL, Webster de F** (1991) *The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and their Supporting Cells. 2nd edition*, Oxford University Press, New York.
- Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW** (2001) Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res. Rev.* **38**, 247-289.
- Pfaus JG, Heeb MM** (1997) Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Res. Bull.* **44**, 397-407.
- Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE** (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: An emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.* **20**, 517-523.
- Pitkänen A** (2000) Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: *The amygdala* (ed. Aggleton JP), pp. 31-115. Oxford: Oxford University Press.
- Rasia-Filho AA, Londero RG, Achaval M** (1999) Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of the rats. *Brain Res. Bull.* **48**, 173-183.
- Rasia-Filho AA, Londero RG, Achaval M** (2000) On some functional activities of the amygdala: an overview. *J. Psychiatry Neurosci.* **25**, 14-23.
- Rasia-Filho AA, Fabian C, Rigoti K, Achaval M** (2004) Influence of sex, estrous cycle and motherhood in dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi methods. *Neuroscience* **126**, 839-847.
- Reid CA** (2002) The role of dendritic spines: comparing the complex with the simples. *Eur. J. Pharmacol.* **447**, 173-176.

- Reynolds ES** (1963) The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208-212.
- Rodrigo J, Peinado MA, Sánchez, ES, Pedrosa JA, Bentura ML, Esteban FJ, et al** (1996) Técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la microscopía electrónica. In: *Inmunocitoquímica y Técnicas Relacionadas* (eds. Peinado MA, Pedrosa JA & Rodrigo J), pp. 177-201. Jaén: Universidad.
- Sabatini BL, Maravall M, Svoboda K** (2001) Ca²⁺ signaling in spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 349-356.
- Scalia F, Winans SS** (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.* **161**, 31-55.
- Segovia S, Guillamón A** (1993) Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res. Rev.* **18**, 51-74.
- Sheehan T, Cirrito J, Numan MJ, Numan M** (2000) Using c-fos immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Behav. Neurosci.* **114**, 337-352.
- Simerly RB** (2004) Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: *The Rat Nervous System* (ed. Paxinos G), pp. 335-368. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Simmons DA, Yahr P** (2003) GABA and glutamate in mating-activated cells in the preoptic area and medial amygdala of male gerbils. *J. Comp. Neurol.* **459**, 290-300.
- Sorra KE, Harris KM** (2000) Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* **10**, 501-511.
- Spacek J, Harris KM** (1997) Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J. Neurosci.* **17**, 190-203.
- Stefanova N** (1998) γ -Aminobutyric acid-immunoreactivity neurons in the amygdala of the rat – sex differences and effect of early postnatal castration. *Neurosci. Lett.* **255**: 175-177.
- Stefanova N, Ovtscharoff W** (2000) Sexual dimorphism of the bed nucleus of the stria terminalis and the amygdala. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **158**: 1-78.
- Swanson LW, Petrovich GD** (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci.* **21**, 323-331.
- Uchizono K** (1965) Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous of the cat. *Nature* **207**, 642-643.
- Valverde F** (1967) Intrinsic organization of the amygdaloid complex. A Golgi study in the mouse. *Trab. Inst. Cajal Invest. Biol.* **54**: 291-314.

Veinante P, Freund-Mercier M-J (1997) Distribution of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the rat extended amygdala: a histoautoradiographic study. *J. Comp. Neurol.* **383**, 305-325.

Wilson MA, Mascagni F, McDonald AJ (2002) Sex differences in delta opioid receptor immunoreactivity in rat medial amygdala. *Neurosc. Lett.* **2002**, 160-164.

Woolf TB, Shepherd GM, Greer CA (1991) Local information processing in dendritic trees: Subsets of spines in granule cells of the mammalian olfactory bulb. *J. Neurosci.* **11**, 1837-1854.

Figure legends

Figure 1. Photomicrographs of the rat posterodorsal medial amygdala. Analysed area localised in the boxed area in B. Nissl staining. Opt, optic tract; st, stria terminalis; MePD, posterodorsal medial amygdala; MePV, posteroventral medial amygdala; D, dorsal; V, ventral; M, medial; L, lateral. Bars: 500 μm (A) e 250 μm (B).

Figure 2. Electron micrographs showing MePD neuronal somata and some dendritic processes. A. Note a stellate neurone (S) with two dendritic processes (d) and other neuronal perikarya (N), exhibiting large round nuclei (Nuc) with homogeneously dispersed heterochromatin and nuclear membrane invaginations (arrows). In the neuropil, dendritic processes (d) and few thin myelinated fibres (double-arrows) are also observed. Bar: 5 μm . B. Higher magnification of the superior boxed area in A. The distal dendritic portion (d) showing microtubules (Mt), elongated mitochondrion (m) and the origin of a stubby-like spine (sp). In this spine, note smooth endoplasmic reticulum (arrow) at the basal portion and actin filaments (asterisk) in its distal portion. Bar: 500 nm. C. Higher magnification of the inferior boxed area in A. The proximal dendritic portion (d) showing elongated mitochondria (m), microtubules (Mt), lysosomes (Lys), rough endoplasmic reticulum (asterisk) and stubby spines (arrows). Observe a thin myelinated fibres (double-arrows) and thick dendritic processes (d) in the neuropil. Bar: 2.5 μm .

Figure 3. Electron micrographs showing MePD neurones and glial cells. A. Neuronal perikaryon displaying a thin rim of cytoplasm, a large pale nucleus (Nuc) and a single spherical peripheral nucleolus (ncl). Note Nissl bodies (NB), ribosomes (R), lysosome (Lys), Golgi complex (G), mitochondria (m), smooth (arrows) and rough (double-arrows) endoplasmic reticula in the cytoplasm. Bar: 1 μm . B. Higher magnification of the boxed area in A. Note elongated mitochondrion (m), Golgi complex (G), smooth endoplasmic reticulum (arrows) and a spine (sp) with two symmetrical synapses (S) in the neuronal soma, and a capillary (Ca) in the neuropil. Bar: 200 nm. C. Neuronal soma (N) surrounded by glial cells (GC). Bar: 2 μm .

Figure 4. Electron micrographs of the MePD neuropil illustrating different types of synapses. A. The synaptic bouton contains round electron-lucent vesicles (asterisk). Note the asymmetrical postsynaptic density (arrowheads), smooth endoplasmic reticulum (arrow) and a

mitochondrion (m) in the dendritic process (d). Bar: 200 nm. B. Asymmetrical axodendritic synapsis. Note round electron-lucent vesicles in the axonal terminal (asterisk) and an accumulation of dense material in the inner surface of the postsynaptic membrane which displayed thin filaments (arrowheads) extending into the cytoplasm of the dendritic process (d). Bar: 200 nm. C. Proximal dendritic portion showing three synaptic boutons containing electron-lucent vesicles (S). In the cytoplasm are a few cisternae of rough (RER) and smooth (arrows) endoplasmic reticula, clusters of free ribosomes (R), lysosome (Lys) and mitochondria (m). Note the pale neuronal nucleus (Nuc) with a peripheral nucleolus (ncl) and stacks of the Golgi cisternae (G) near the nucleus. Bar: 500 nm. D. Symmetrical axodendritic synapses. The superior synaptic bouton contains pleomorphic electron-lucent vesicles (asterisk) and the inferior synaptic bouton contains both pleomorphic electron-lucent (asterisk) and dense-cored (arrows) vesicles. Note the pre- and postsynaptic electron-dense material symmetrically distributed (arrowheads); dendritic process (d). Bar: 200 nm. E. An axon terminal containing one dense-cored (arrow) and many electron-lucent (asterisk) vesicles contacting two dendritic process (d1, d2). Note the perforated density (arrowheads) in the synapse on the dendritic process (d2). F. Symmetrical axosomatic synapsis (S); neuronal nucleus (Nuc). Bar: 500 nm.

Figure 5. Electron micrographs of rat MePD dendritic spines displaying thin (A-C), mushroom-like (D-F) and stubby (G-I) morphologies. Note actin filaments (asterisk), dendritic processes (d), microtubules (Mt), mitochondria (m), postsynaptic densities (arrowheads), smooth endoplasmic reticulum (arrows), spine apparatus (sa) and synapses (S). Bars: 500 nm (A-D,G-I), 400 nm (E), 250 nm (F).

Table 1. Distribution of synapses occurring onto dendritic shafts and spines, somata and axons in the posterodorsal medial amygdala of male rat. A. Total and percentual values of excitatory and inhibitory synapses occurring onto dendritic shafts and spines, somata and axons. B. Total and percentual values of excitatory and inhibitory synapses with or without dense-cored vesicles (DCV) occurring onto dendritic shafts and spines, somata and axons.

Figure 1

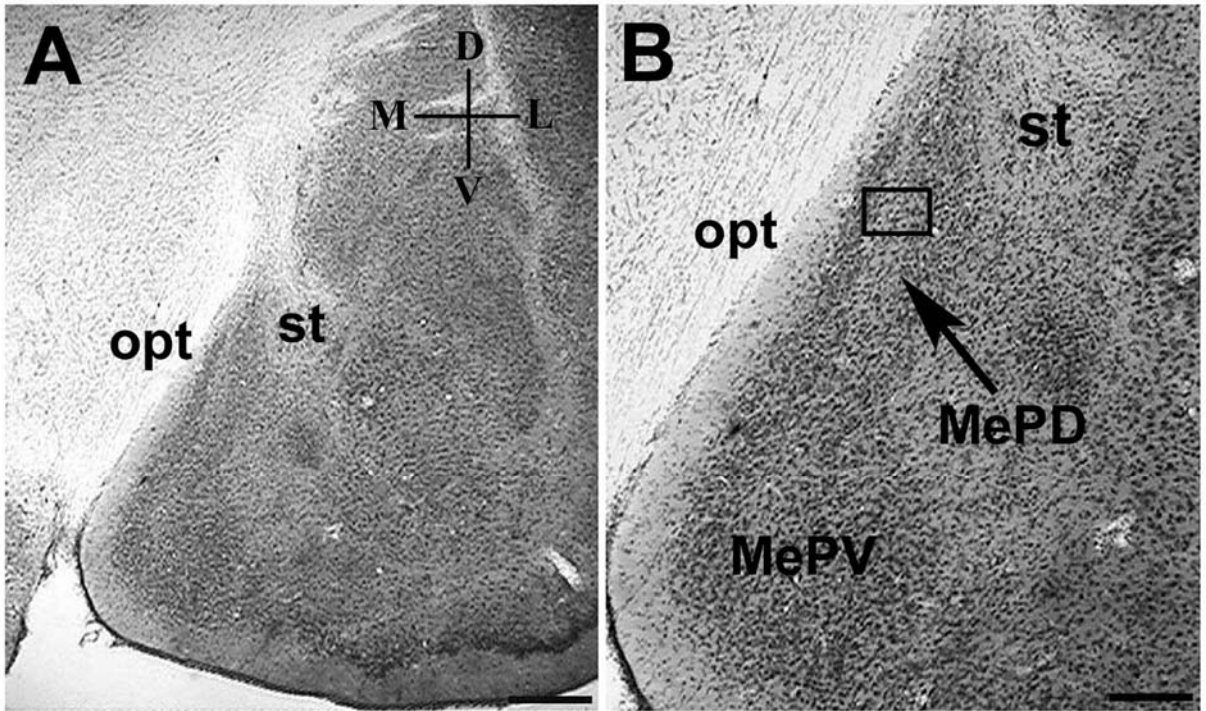


Figure 2

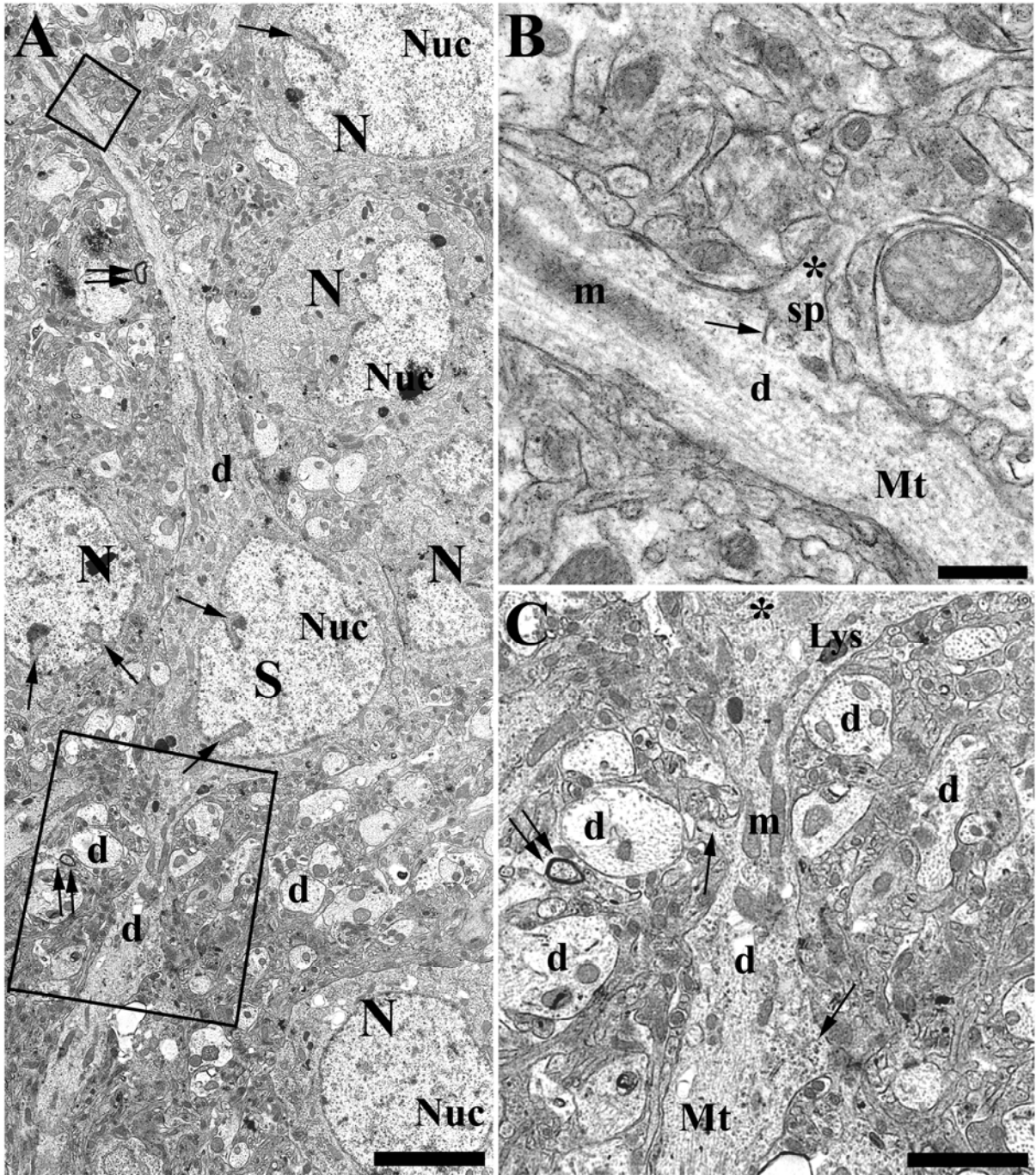


Figure 3

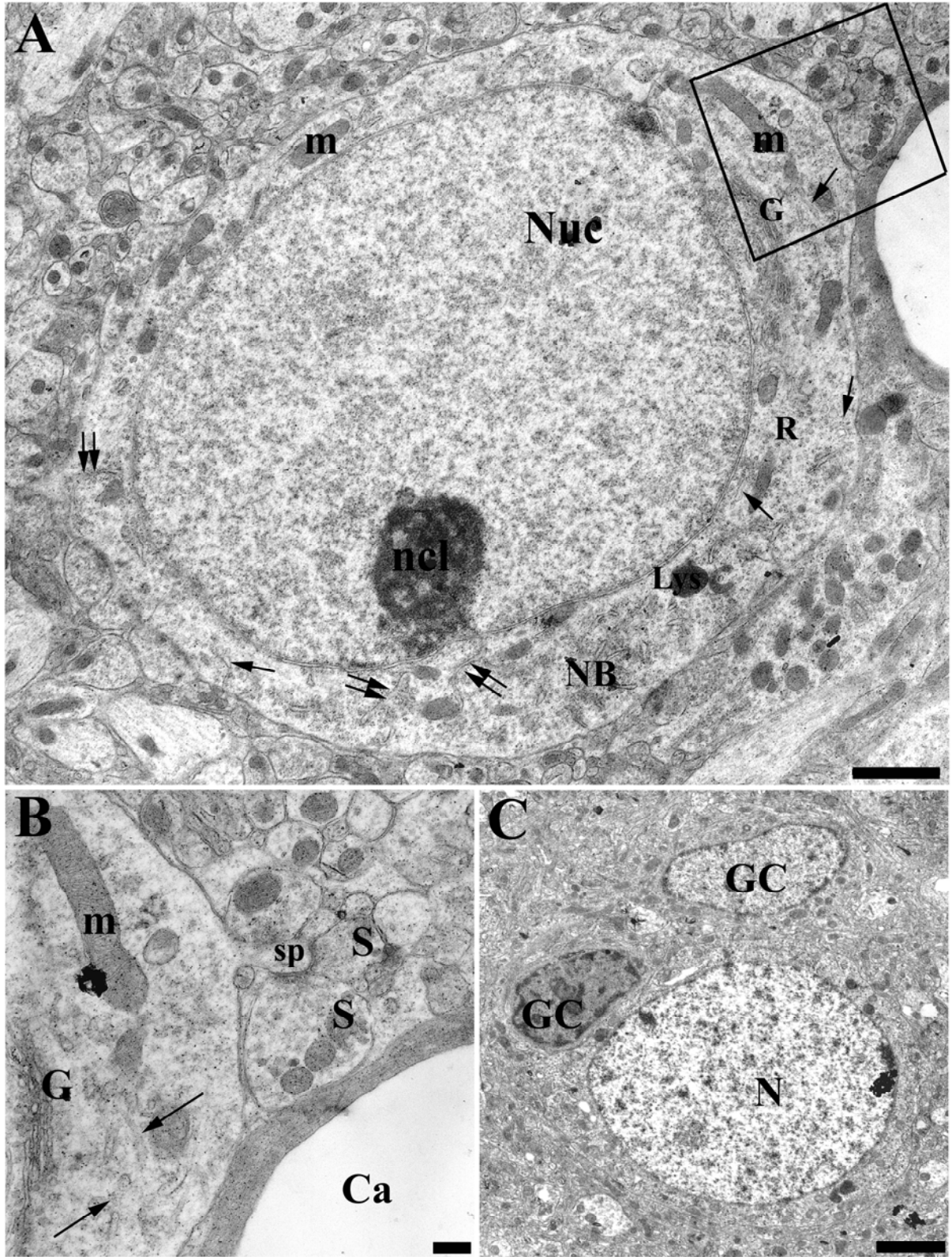


Figure 4

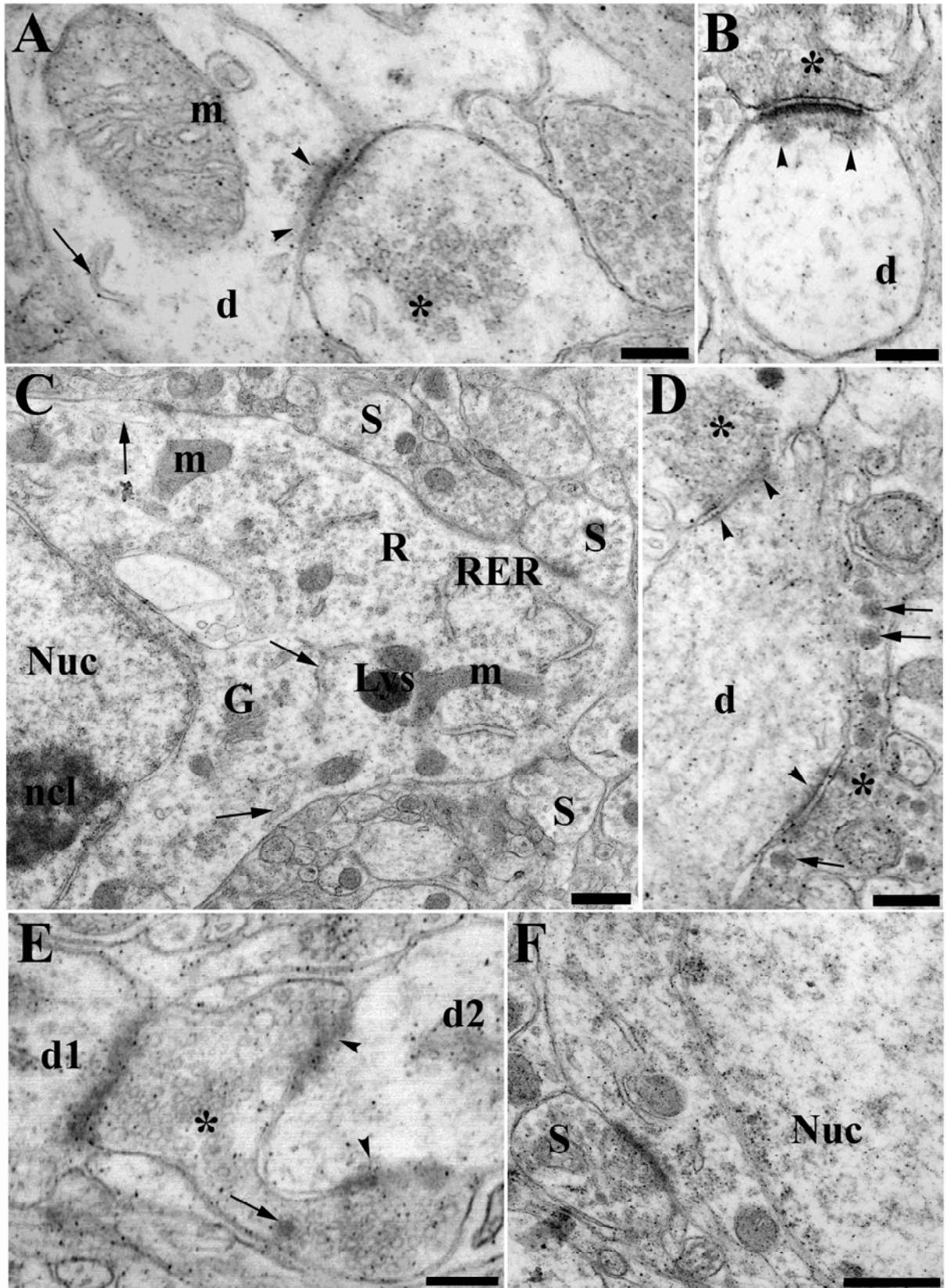


Figure 5

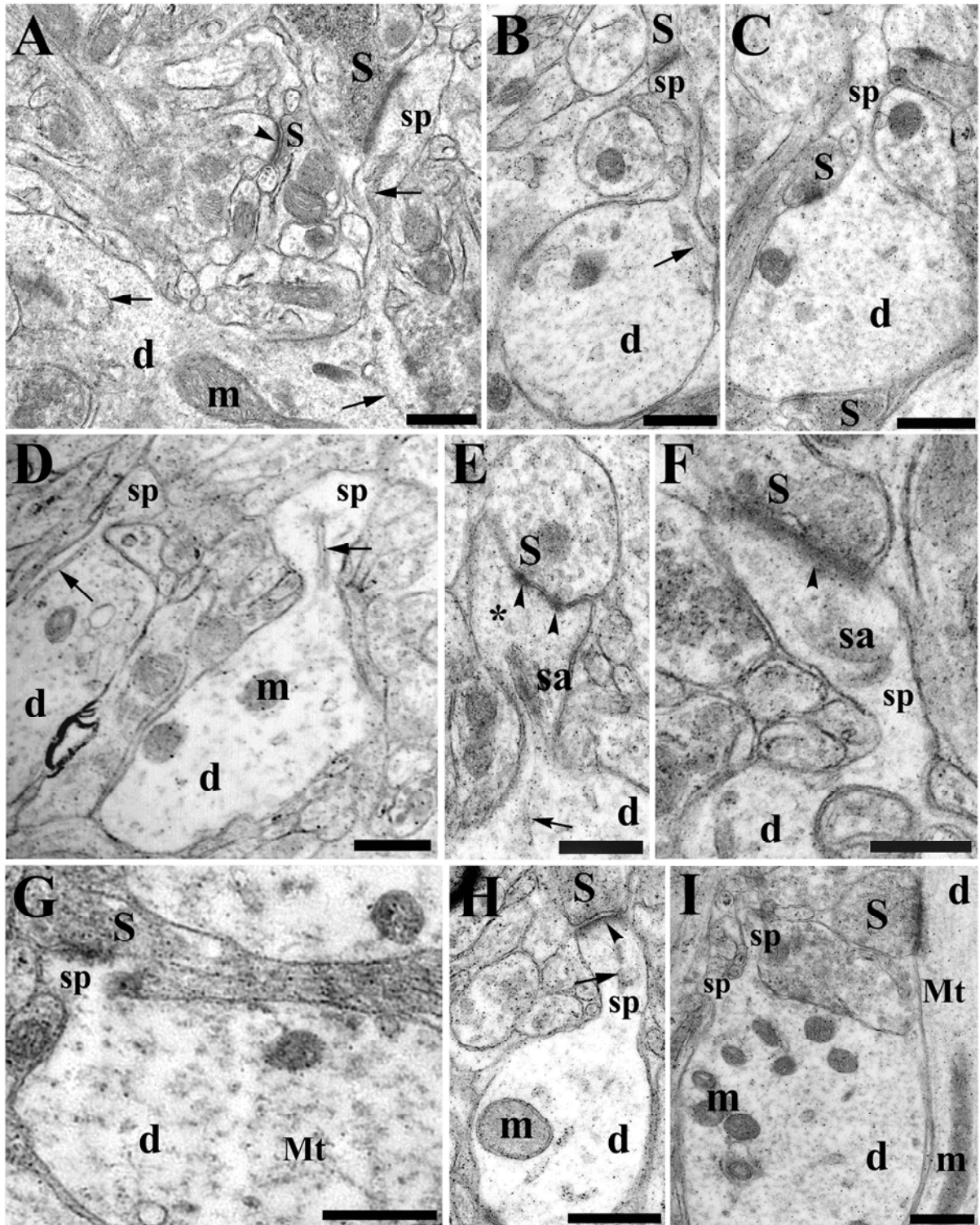


Table 1

A.

| | Total of synapses (96) | Excitatory (84) | Inhibitory (12) |
|-------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| Dendritic shafts | 56 (58.3%) | 47 (83.9%) | 9 (16.1%) |
| Dendritic spines | 32 (33.3%) | 32 (100%) | 0 |
| Somata | 7 (7.3%) | 4 (57.1%) | 3 (42.8%) |
| Axons | 1 (1%) | 1 (100%) | 0 |

B.

| | Excitatory | | Inhibitory | |
|-------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | no DCV | with DCV | no DCV | with DCV |
| Dendritic shafts | 41 (87.2%) | 6 (12.7%) | 7 (77.7%) | 2 (22.2%) |
| Dendritic spines | 28 (87.5%) | 4 (12.5%) | 0 | 0 |
| Somata | 3 (75%) | 1 (25%) | 2 (66.6%) | 1 (33.3%) |
| Axons | 1 (100%) | 0 | 0 | 0 |

4.2 Experimento 2: Influência do sexo e do ciclo estral no volume somático neuronal no subnúcleo pósterodorsal de ratos adultos.

Erica E.S. Hermel, Jocemar Ilha, Léder L. Xavier, Alberto A. Rasia-Filho, Matilde Achaval

INFLUENCE OF SEX AND ESTROUS CYCLE ON THE NEURONAL SOMATIC VOLUME OF THE POSTERODORSAL MEDIAL AMYGDALA OF RATS

E. E. S. Hermel, J. Ilha, A. A. Rasia-Filho, M. Achaval
Programa de Pós-Graduação em Neurociências, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

L. L. Xavier
Departamento de Ciências Fisiológicas, Pontifícia Universidade Católica-RS, Porto Alegre, RS, Brazil

A. A. Rasia-Filho
Departamento de Ciências Fisiológicas, FFFCMPA, Porto Alegre, and UNISINOS, São Leopoldo, RS, Brazil

M. Achaval (Communicating author)
Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Sarmiento Leite 500, cep: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil
E-mail: 00003522@ufrgs.br
Tel.: +55-51-33163624
Fax.: +55-51-33163092/33163148

Abstract

The aim of the present study was to measure the volume of neurones from the posterodorsal subnucleus of the medial amygdala (MePD) of adult male (n= 5) and diestrus, proestrus and estrus female (n= 4-5 in each group) rats to reveal sex differences, estrous cycle variations and a possible laterality in this morphological parameter. The brains of adult Wistar rats were sectioned (1 μm), stained with 1% toluidine blue and images containing both left and right MePD were captured for further analysis. The estimation of neuronal soma volume of both sides of MePD was realized using the Cavalieri method and the technique of point counting. Data were compared between groups by a two-way ANOVA and the Bonferroni *post-hoc* test. In the MePD, mean neuronal somatic volume showed a statistical difference among groups [F(3,37)=5.805; P=0.003], but neither an effect of laterality [F(3,37)=0.246; P=0.863] nor an interaction between them [F(3,37)=0.246; P=0.863]. Males (mean \pm standard deviation, 2038.03 \pm 543.92 and 2113.14 \pm 339.87 μm^3 , for the left and right MePD, respectively) showed larger mean neuronal somatic volume compared to that of females in proestrus (1521.10 \pm 136.82 and 1447.71 \pm 120.78 μm^3 , P=0.007) and estrus (1680.67 \pm 272.38 and 1551.77 \pm 174.40 μm^3 , P=0.035), but not to diestrus (2028.02 \pm 459.07 and 1852.87 \pm 385.31 μm^3 , P > 0.05) ones. It is suggested that neuronal somatic volume is another sexually dimorphic parameter in this brain area, for which it is relevant to set apart the different phases of the estrous cycle to reveal the presence of gonadal hormones effects in the rat MePD neurones.

Key words: amygdaloid complex, sexual dimorphism, estrous cycle, serial-section reconstruction, Cavalieri method

Introduction

The rat medial amygdala (MeA) is considered a part of the extended amygdala (de Olmos et al. 2004) and integrates sexually dimorphic pathways from the vomeronasal system with some specific hypothalamic nuclei (Segovia and Guillamón 1993; Canteras et al. 1995). The MeA is subdivided in four subnuclei (Canteras et al. 1995; de Olmos et al. 2004): anterodorsal (MeAD), anteroventral (MeAV), posterodorsal (MePD) and posteroventral (MePV) ones. The MePD is involved with hypothalamic neuroendocrine regulation (Canteras et al. 1995; Simerly 2004), the modulation of male and female sexual behaviour (Erskine 1993; Pfau and Heeb 1997; Newman 1999), and maternal behaviour (Lonstein et al. 2000; Sheehan et al. 2000).

It is well established that gonadal hormones play an important role in the organisation and modulation of neuron-glia morphological characteristics and functions (Kawata 1995). The MePD contains receptors for testosterone and both α and β receptors for estrogens (Simerly et al. 1990; Yokosuka et al. 1997; Shughrue et al. 1997) and displays neurochemical modifications related to sex and estrous cycle in rats (Oro et al. 1988; Myceovich et al. 1988; Simerly 1990; Wang and De Vries 1995). Previous studies showed that the structure of the MePD is different between sexes (Hines et al. 1992; Kerchner et al. 1995; Cooke et al. 1999; Rasia-Filho et al. 2002; 2004), for example, its volume is 65-85% greater in male rats compared to females (Hines et al. 1992; Kerchner et al. 1994; Cooke et al. 1999). Furthermore, males display more dendritic spines in the MePD than proestrus, estrus and metaestrus females, that in turn, have less dendritic spines than diestrus females in this same subnucleus (Rasia-Filho et al. 2004).

Sex, phase of the estrous cycle and levels of gonadal hormones in circulation are important factors in determining the neuronal somatic size (Isgor and Sengelaub 1998; Cooke et al. 1999; 2003; Keyser-Marcus et al. 2001; Madeira et al. 2001). For example, although

males and proestrus females did not show differences between themselves, both of them display larger neuronal somatic cross-sectional areas in the hypothalamic ventromedial nucleus than metaestrus female rats (Madeira et al. 2001). Males also have a larger somatic cross-sectional area in the hippocampal CA1 and CA3 pyramidal cells (Isgor and Sengelaub 1998) than females. The same occurred in the MePD (Cooke et al. 1999), where, in addition, the somatic cross-sectional area has been shown to be significantly reduced in MePD neurones after castration of males, an effect prevented by testosterone, oestrogen or dihydrotestosterone replacement treatment (Cooke et al. 1999; 2003). Furthermore, some sexually dimorphic somatic features can only be revealed at specific phases of the cycle (Madeira et al. 2001; Rasia-Filho et al. 2004; Sá and Madeira 2005). For example, the male-female differences are notorious in the rough endoplasmic reticulum volume when females are on metaestrus and in the Golgi apparatus volume when they are on proestrus (Sá and Madeira 2005).

Previous studies that described sexual dimorphism in the MePD focused in the nuclear volume, dendritic spine density, some neurotransmitter and neuropeptides and glial fibrillar acid protein immunoreactivity (Oro et al. 1988; Mycevich et al. 1988; Simerly 1990; Hines et al. 1992; Kerchner et al. 1995; Wang and De Vries 1995; Rasia-Filho et al. 2002; 2004). Whereas the MePD neuronal somatic cross-sectional area of male and female rats were already studied (Cooke et al. 1999), neither the neuronal somatic volume nor the phases of the estrous cycle were considered in this previous work. Thus, comparisons of MePD neuronal somatic volume in male and possible variations in female rats across the estrous cycle have not yet been reported. Because a precise morphometrical knowledge about the MePD neurones is crucial to provide best comprehension of functional roles, the aims of the present study were to estimate the MePD neuronal somatic volume of male and diestrus, proestrus

and estrus female rats using serial-section reconstruction (according to Cruz-Orive and Weibel 1990; Ledda et al. 2000).

Materials and Methods

Male (n=5) and diestrus (n=5), proestrus (n=4) or estrus (n=5) female Wistar rats (4 months-old) from a local breeding colony (ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) were housed under standard laboratory conditions with food and water available *ad libitum* and maintained under a 12:12 light-dark cycle (lights on at 09:30 h). All efforts were made to minimise the number of animals studied and their suffering. In addition, all rats were manipulated according to international laws for the ethical care and use of laboratory animals (European Communities Council Directive of 24 November 1986, 86/609/EEC) and to local guidelines on the ethical use of animals.

Vaginal smears were taken from virgin female rats during two weeks before the beginning of the experiment to determine the regularity of estrous cycle. In the morning of each estrous phase, animals were anaesthetised with sodium thiopental (50 mg/Kg, i.p.; Cristalia, Brazil) and injected with 1000 IU heparin in the left cardiac ventricle (Cristalia, Brazil). Males were submitted to the same procedure. Animals were transcardially perfused through the left ventricle using a peristaltic pump (Control Company, Brazil, 20 ml/min) with 200 ml of saline solution, followed by 0.5% glutaraldehyde (Sigma Chemicals Co., USA) and 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4, PB) at room temperature. Brains were sectioned (100 μ m) using a vibratome (Leica, Germany) and the sections were postfixed overnight in the same fixative solution, washed in PB saline (PBS) and postfixed in 1% OsO₄ (Sigma Chemicals Co., USA) in PB for 1h at room temperature. Sections were washed with PBS and dehydrated in a graded series of alcohol and propylene oxide (Electron Microscopy Sciences, USA), embedded in resin (Durcupan, ACM-Fluka,

Switzerland), remained in vacuum for 24 h, and, afterwards, were put onto slides with resin and polymerised for 48 h at 60°C. Brain slices provided small pieces of tissue containing both left and right MePD, 3.3 mm posterior to the bregma (Paxinos and Watson 1998), that were removed from the slides, and glued onto resin blocks and polymerised once again for 48 h at 60°C. Serial semithin sections (1 µm) were obtained using an ultramicrotome (MT 6000-XL, RMC, Tucson, USA), stained with 1% toluidine blue diluted in 1% sodium tetraborate and images were captured and digitalized (Fig. 1) using a Nikon Eclipse E-600 microscope (initially 1000x and further amplified 100% for analysis) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and Image Pro Plus Software 4.1 (Media Cybernetics, USA). A minimum of 12 sections and 42 areas/point per neuronal soma were analysed. Both left and right MePD were analysed separately and 10 neurones per hemisphere (the mean value from all 10 neurones was considered as a single value for each hemisphere) were measured from each animal in each experimental group. Only the cell bodies that could be reliably and completely found along the series of sections (Fig. 2) were used for the quantitative evaluation (according to Cruz-Orive and Weibel 1990; Ledda et al. 2000). The estimation of neuronal somatic volume from the left and the right MePD was achieved using the Cavalieri method in association with the point counting technique. The mean value of neuronal somatic volume was calculated with the equation:

$$V = \Sigma P \cdot a/p \cdot T$$

where: V= volume, ΣP = total of counted areas/point, a/p = area/point (16.41 µm²), T= thickness of section (1 µm). Data were compared between groups by a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the *post-hoc* test of Bonferroni. The statistical significant level was set as $p < 0.05$ (Zar, 1999).

Results

The statistical analysis for laterality, experimental groups and their interactions did not detect a significant effect on mean somatic volume of MePD neurones for laterality [$F(1,37)=0.448$; $P=0.508$] or for hemispheres and experimental groups interaction [$F(3,37)=0.246$; $P=0.863$], but did reveal a significant difference for the comparison among the experimental groups [$F(3,37)=5.805$; $P=0.003$]. In the MePD, males (mean \pm standard deviation, 2038.03 ± 543.92 and $2113.14 \pm 339.87 \mu\text{m}^3$, for the left and right MePD, respectively) showed larger mean neuronal somatic volume compared to that of females in proestrus (1521.10 ± 136.82 and $1447.71 \pm 120.78 \mu\text{m}^3$, $P=0.007$) and estrus (1680.67 ± 272.38 and $1551.77 \pm 174.40 \mu\text{m}^3$, $P=0.035$), but not to diestrus (2028.02 ± 459.07 and $1852.87 \pm 385.31 \mu\text{m}^3$, $P > 0.05$) ones. Although mean somatic volume of the MePD neurones of the females across the estrous cycle showed no differences among themselves, a tendency could be observed between proestrus and diestrus females for this latter group present higher values ($P=0.056$).

Discussion

Whereas no effect of the estrous cycle phase on mean somatic volume of the MePD neurones in the female rats was detected, an important sex difference was found in this parameter among males, proestrus and estrus females (males higher than females). The same did not occur for males and diestrus females. The absence of differences between male and diestrus female rats in a two-dimensional neuronal somatic size measurement were previously observed in Golgi-impregnated neurones from the posterior MeA, that included both MePD and MePV (Rasia-Filho et al. 1999). Moreover, in a broad sense, it is interesting to note the present results are also in accordance with the variation of the number of dendritic spines detected in the rat MePD, since males showed more dendritic spines in this subnucleus than

proestrus and estrus females, but did not differ to diestrus females (Rasia-Filho et al. 2004). Therefore, to study individually each phase of the estrous cycle is crucial to reveal the presence of a sexual dimorphism in the rat MePD neuronal somatic volume.

Sexual dimorphism in the neuronal somatic morphology was also detected in other brain regions. The neuronal cross-sectional areas in the medial preoptic area and sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (Madeira et al. 1999), as well as in the CA1 and the CA3 hippocampal regions (Isgor and Sengelaub, 1998), were larger in male than in female rats. The same did not occur for the suprachiasmatic nucleus (Madeira et al. 1995). However, in all of these studies, it was not considered separately the phase of the estrous cycle. When studied with such detail, both males and proestrus females, that did not differ from each other, displayed larger neuronal cross-sectional areas in the hypothalamic ventromedial nucleus compared to metaestrus female rats (Madeira et al. 2001).

Although a previous study analysing only the neuronal area in thickened sections (40 μm) had detected laterality in the male rat MePD neurones (Cooke et al. 2003), our results did not show neither males nor females MePD neurones laterality. That is, Cooke and cols measured somatic area using the external perimeter taken from a single image where it could be detected a cellular nucleolus. Because neurons in the MePD can have distinct somatic morphologies and that, also, can be orientated differently within this subnucleus, the procedure employed by these authors is more prone to misleading results. Otherwise, in the present report, the complete somatic morphology of each neuron was studied in serial semithin sections.

Different brain regions appear to be differently influenced by gonadal hormones. In the MePD, both androgen and oestrogen have trophic effects on local neurones (Cooke et al. 1999; 2003). For example, ovariectomized adult female rats treated with testosterone had MePD neuronal cross-sectional area enhanced, eliminating a previously detected sexual

difference (Cooke et al. 1999). Indeed, gonadal hormones manipulations also affected somatic morphology in the medial preoptic area, since ovariectomized or diestrus adult female rats did not differ from each other in the neuronal somatic size, but ovariectomized females treated with oestrogen and progesterone displayed neuronal somatic size larger than both groups (Keyser-Marcus et al. 2001). In the CA1 hippocampal region, when prenatally treated with testosterone propionate or estradiol benzoate, adult female rats displayed neuronal cross-sectional somatic areas similar to those of males and larger when compared to no-treated females, but no effect of dihydrotestosterone propionate treatment was observed on this parameter (Isgor and Sengelaub, 1998). In addition, in this same study, in the CA3 hippocampal region, adult females when prenatally treated with testosterone propionate or dihydrotestosterone propionate also displayed neuronal cross-sectional somatic areas similar to those of males and larger when compared to no-treated females, but no effect of estradiol benzoate treatment was detected. Whether sex steroids can lead to the same drastic effects in MePD neuronal volume in castrated new-born or adult males and females is still an open issue for further research.

Additionally, the hormonally-dependent intracellular reorganisation that occurs in males and females needs to be clarified. Androgens seem to be involved in the regulation of structural proteins expression, such as actin and tubulin (Matsumoto, 1997). Both testosterone and estradiol regulate microtubule dynamics and cytoskeleton function (Kipp and Ramirez, 2003). In this sense, testosterone can stimulate polymerisation and enhance microtubule assembly, and inhibiting the microtubule depolymerisation process, whereas estradiol can be able to promote an opposite effect (Kipp and Ramirez, 2003). It could be hypothesised that testosterone in males might be responsible for larger MePD neuronal somatic volume through actions on microtubule assembly, while estradiol might be inhibiting it in proestrus females. This smaller microtubules assembly might also explain the smaller number of MePD dendritic

spines seen in the proestrus compared to both males and diestrus female rats (Rasia-Filho et al. 2004).

Thus, it is suggested that neuronal somatic volume is another sexually dimorphic parameter in this brain area, for which it is relevant to set apart the different phases of the estrous cycle to reveal the presence of gonadal hormones effects in the rat MePD neurones. Moreover, contrary to previous results, no effect of laterality would be found here when using another methodological approach, i. e., the Cavalieri method.

Acknowledgements

This work was supported by Brazilian funding agencies CNPq and CAPES.

References

- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1995) Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 360: 213-245
- Cooke BM, Breedlove SM, Jordan CL (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: 336-346
- Cooke BM, Tabibnia G, Breedlove SM (1999) A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. *Proc Natl Acad Sci* 96: 7538-7540
- Cruz-Orive LM, Weibel ER (1990) Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am. J. Physiol.* 4: 136-149
- de Olmos J, Beltramino CA, Alheid GF (2004) Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. In: Paxinos G (ed) *The Rat Nervous System*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 509-603
- Erskine MS (1993) Mating-induced increases in fos protein in preoptic area and medial amygdala of cycling female rats. *Brain Res Bull* 32: 447-451
- Hines M, Allen LS, Gorski RG (1992) Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res* 579: 321-326
- Isgor C, Sengelaub DR (1998) Prenatal gonadal steroids affect adult spatial behavior, CA1 and CA3 pyramidal cell morphology in rats. *Horm Behav* 34: 183-198
- Kawata M (1995) Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in

the nervous system. *Neurosc Res* 24: 1-46

Kerchner M, Malsbury CW, Ward OB, Ward IL (1995) Sexually dimorphic areas in the rat medial amygdala: resistance to the desmasculinizing effect of prenatal stress. *Brain Res* 672: 251-260

Keyser-Marcus L, Stafisso-Sandoz G, Gerecke K, Jasnow A, Nightingale L, Lambert KG, Gatewood J, Kinsley CH (2001) Alterations of medial preoptic area neurons following pregnancy and pregnancy-like steroidal treatment in the rat. *Brain Res Bull* 55: 737-745

Kipp JL, Ramirez VD (2003) Estradiol and testosterone have opposite effects on microtubule polymerization. *Neuroendocrinology* 77: 258-272

Ledda M, Barni L, Altieri L, Pannese E (2000) Decrease in the nucleo-cytoplasmic volume ratio of rabbit spinal ganglion neurons with age. *Neurosc Lett* 286: 171-174

Lonstein JS, Grecó B, De Vries GJ, Stern JM, Blaustein JD (2000) Maternal behavior stimulates c-fos activity within estrogen receptor alpha-containing neurons in lactating rats. *Neuroendocrinology* 72: 91-101

Madeira MD, Ferreira-Silva L, Paula-Barbosa M (2001) Influence of sex and estrous cycle on the sexual dimorphisms of the hypothalamic ventromedial nucleus: stereological evaluation and Golgi study. *J Comp Neurol* 432: 329-345

Madeira MD, Leal S, Paula-Barbosa MM (1999) Stereological evaluation and Golgi study of the sexual dimorphisms in the volume, cell numbers, and cell size in the medial preoptic nucleus of the rat. *J Neurocytol* 28: 131-148

Madeira MD, Sousa N, Santer RM, Paula-Barbosa MM, Gundersen HJG (1995) Age and sex do not affect the volume, cell numbers, or cell size of the suprachiasmatic nucleus of the rat: an unbiased stereological study. *J Comp Neurol* 361: 585-601

Matsumoto A (1997) Hormonally induced neuronal plasticity in the adult motoneurons. *Brain Res Bull* 44: 539-547

Mycevych PF, Matt DW, Go VLW (1988) Concentrations of cholecystinin, substance P, and bombesin in discrete regions of male and female rat brain: sex differences and estrogen effects. *Exp Neurol* 100: 416-425

Newman SW (1999) The medial extend amygdala in male reproductive behavior: a node in the mammalian social behavior network. *Ann NY Acad Sci* 877: 242-257

Oro AE, Simerly RB, Swanson LW (1988) Estrous cycle variations in levels of cholecystinin immunoreactivity within cells of three interconnected sexually dimorphic forebrain nuclei. *Neuroendocrinology* 47: 225-235

Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego

Pfaus JG, Heeb MM (1997) Implications of immediate-early gene induction in the brain

following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Res Bull* 44: 397-407

Rasia-Filho AA, Fabian C, Rigoti K, Achaval M (2004) Influence of sex, estrous cycle and motherhood in dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi methods. *Neuroscience* 126: 839-847

Rasia-Filho AA, Londero RG, Achaval M (1999) Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of the rats. *Brain Res Bull* 48: 173-183

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

Sá SI, Madeira MD (2005) Neuronal organelles and nuclear pores of hypothalamic ventromedial neurons are sexually dimorphic and change during the estrus cycle in the rat. *Neuroscience* 133: 919-924

Segovia S, Guillamón A (1993) Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res Rev* 18: 51-74

Sheehan T, Cirrito J, Numan MJ, Numan M (2000) Using c-fos immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Behav Neurosci* 114: 337-352

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

Simerly RB (2004) Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: Paxinos G (ed) *The Rat Nervous System*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 335-368

Simerly RB (1990) Hormonal control of neuropeptide gene expression in sexually dimorphic olfactory pathways. *TINS* 13: 104-110

Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW (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

Wang Z, De Vries GJ (1995) Androgen and estrogen effects on vasopressin messenger RNA expression in the medial amygdaloid nucleus in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 7: 827-831

Yokosuka M, Okamura H, Hayashi S (1997) Postnatal development and sex difference in neurons containing estrogen receptor- α immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon, and the amygdala in the rat. *J Comp Neurol* 389: 81-93

Zar JH (1999) *Biostatistical analysis* Prentice Hall, Upper Saddle NJ, 1999.

Figure 1. Schematic representation and photomicrograph of semithin section of the rat posterodorsal medial amygdala. The analysed areas were localised in the boxed area, as presented in both figures. Toluidine blue staining. Opt, optic tract; st, stria terminalis; MePD, posterodorsal medial amygdala; MePV, posteroventral medial amygdala (adapted from Paxinos and Watson, 1998). Bar: 100 μ m.

Figure 2. Light micrographs of serial semithin sections showing a neuronal soma (*) cut at different levels in the posterodorsal subnucleus of the medial amygdala of diestrus female rat. The numbering of each micrograph indicates the corresponding section in the series (1-12). Staining: toluidine blue. Bar: 5 μ m.

Figure 3. Mean (\pm standard deviation) neuronal somatic volume in the left and right posterodorsal subnucleus of the medial amygdala of male, diestrus, proestrus and estrus female rats. * $P=0.007$ and ** $P=0.029$, both compared to male rats.

Figure 1

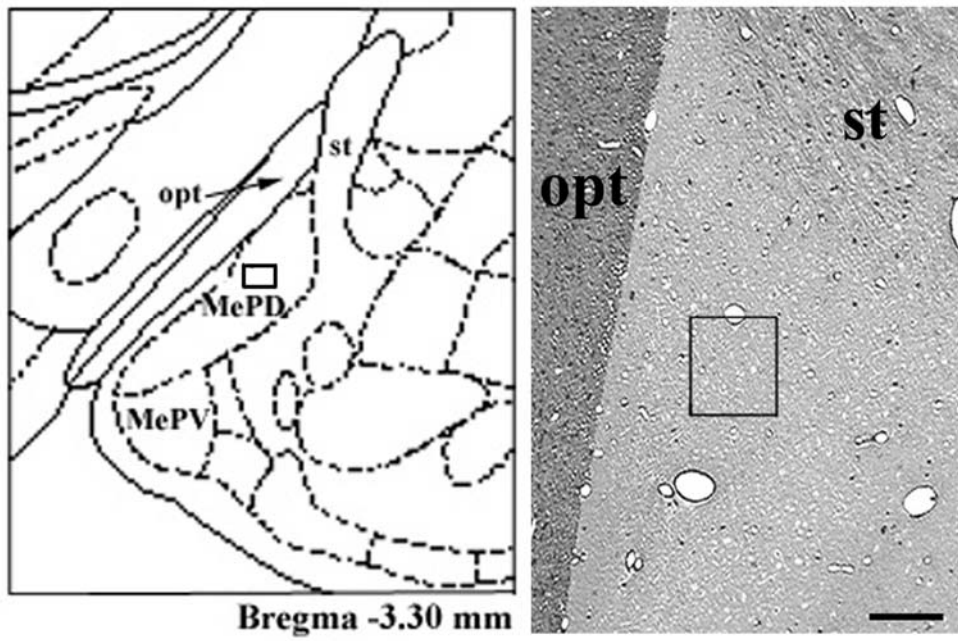


Figure 2

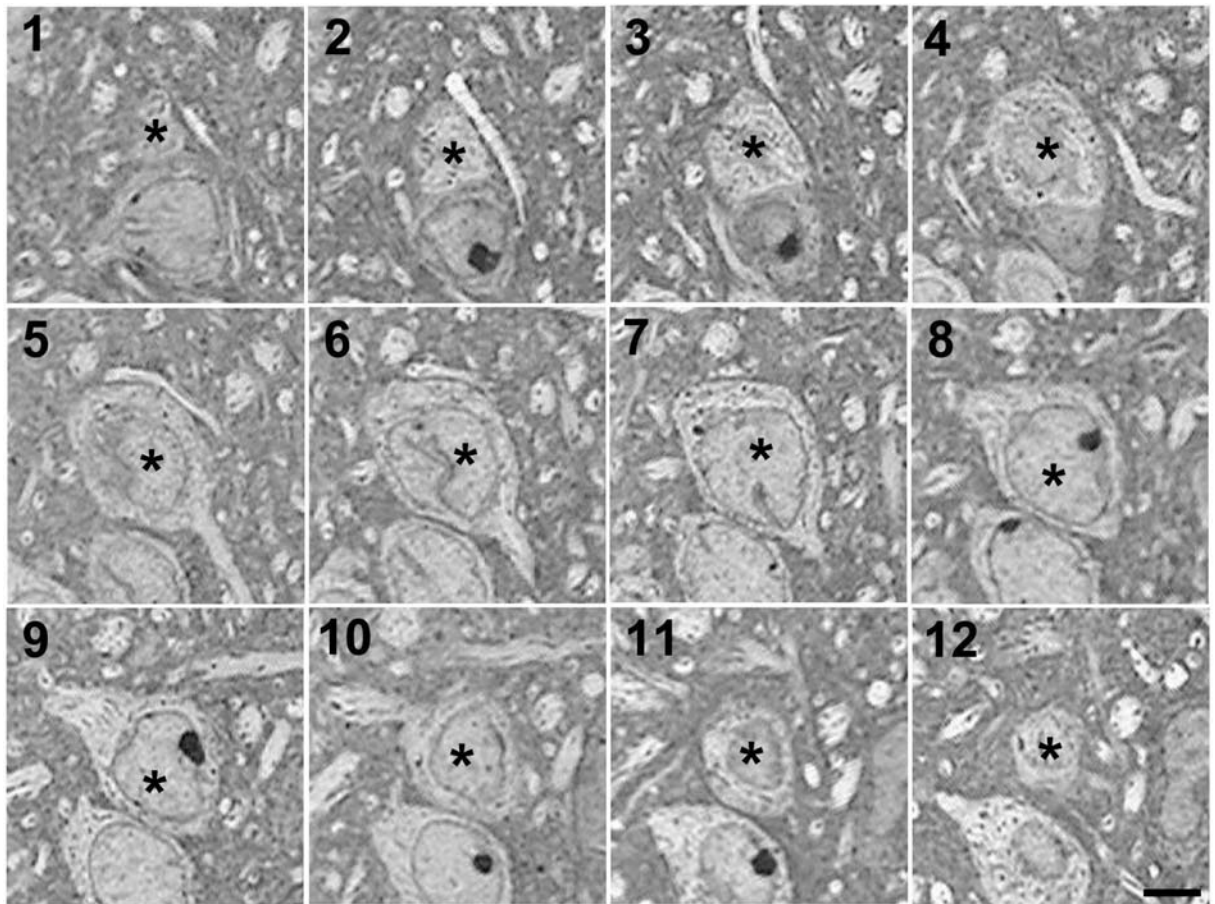
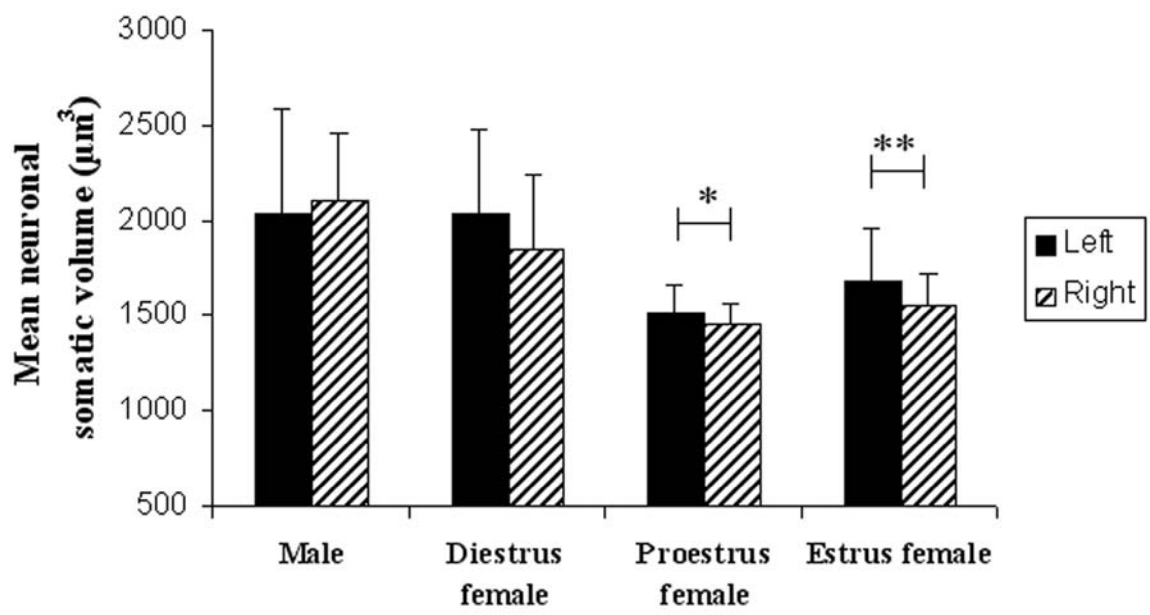


Figure 3



5. CONCLUSÕES

- 1) As características nucleares e citoplasmáticas dos neurônios da MePD de ratos adultos são similares às daquelas de outras áreas encefálicas;
- 2) A maioria das sinapses observadas na MePD foram excitatórias ocorrendo principalmente sobre ramos e espinhos dendríticos, sugerindo uma importante modulação glutamatérgica na atividade funcional dessa área em ratos adultos;
- 3) Como previamente descrito, os espinhos dendríticos apresentaram somente um contato sináptico excitatório;
- 4) Apesar de diversos trabalhos demonstrarem a presença de um grande número de peptídeos em somas e fibras neuronais da MeA do rato, o presente estudo mostrou que as vesículas com centro denso foram ocasionalmente observadas na MePD do rato e sempre em terminais sinápticos contendo numerosas vesículas elétron-lúcidas;
- 5) O volume somático neuronal é outro parâmetro sexualmente dimórfico na MePD, sendo maior em machos do que em fêmeas em proestro e estro, mas não entre machos e fêmeas em diestro. Além disso, o volume somático neuronal não se modifica ao longo do ciclo estral, apesar de uma tendência ser observada entre as fêmeas em proestro e diestro, sendo maior nestas últimas;
- 6) Portanto, separar os diferentes estágios do ciclo estral é de suma importância para revelar a presença dos efeitos dos hormônios gonadais nos neurônios da MePD de ratos.

6. PERSPECTIVAS

1. Descrever a ultra-estrutura da MePD de fêmeas ao longo do ciclo estral e analisar a distribuição dos contatos sinápticos sobre ramos e espinhos dendríticos, somas neuronais e axônios comparando-se machos e fêmeas ao longo do ciclo estral utilizando microscopia eletrônica de transmissão;

2. Como a MePD é constituída por dois tipos neuronais, bifenachados e estrelados, outra perspectiva seria estudar a distribuição dos contatos sinápticos sobre ramos e espinhos dendríticos, somas neuronais e axônios de machos e fêmeas ao longo do ciclo estral nesses dois tipos neuronais separadamente utilizando-se para isso microscopia eletrônica de transmissão associada ao método de Golgi. No momento, este trabalho está em fase de execução tendo sido iniciado no ano passado durante um estágio realizado sob orientação do Prof. Dr. Alfonso Fairén no Instituto de Neurociências da Universidad Miguel Hernandez, Alicante, Espanha. No entanto, ainda não obtivemos resultados.

3. Com a técnica de imunistoquímica associada à microscopia óptica e eletrônica, detectar quais neurotransmissores estão presentes nas aferências sinápticas nos neurônios da MePD observadas no presente estudo;

4. Averiguar um possível efeito da manipulação dos hormônios gonadais sobre o volume somático neuronal da MePD de ratos machos e fêmeas gonadectomizados e submetidos à terapia hormonal substitutiva.

7. REFERÊNCIAS

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

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

BRINLEY-REED, M.; MASCAGNI, F. MCDONALD, A. J. Synaptology of prefrontal cortical projections to the basolateral amygdala: an electron microscopic study in rat. *Neuroscience Letters*, v. 202, p. 45-48, 1995.

BRODAL, A. The amygdaloid nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, v.87, p. 1-17, 1947.

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

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

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

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

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

CRUZ-ORIVE, L. M.; WEIBEL, E. R. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *American Journal of Physiology*, v. 4, p. 136-149, 1990.

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

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

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

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

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

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

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

DUXON, M. S.; FLANIGAN, T. P.; REAVLEY, A. C.; BAXTER, G. S.; BLACKBURN, T. P.; FONE, K. C. F. Evidence for expression of the 5-hydroxytryptamine-2B receptor protein in the rat central nervous system. *Neuroscience*, v. 76, p. 323-329, 1997.

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

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

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

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

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

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

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

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

GRIMES, J. M.; MELLONI JR; R. H. Serotonin modulates offensive attack in adolescent anabolic steroid-treated hamsters. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 73, p. 713-721, 2002.

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

GUSTAFSON, E. L.; CARD, J. P.; MOORE, R. Y. Neuropeptide Y localization in the rat amygdaloid complex. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 251, p. 349-362, 1986.

HARRIS, K. M.; KATER, S. B. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annual Reviews Neuroscience*, v. 17, p. 341-371, 1994.

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

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

HENNEMAN, E. Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science*, v. 126, p. 1345-1347, 1957.

HENNEMAN, E.; SOMJEN, G.; CARPENTER, D.O. Excitability and inhibitory of motoneurons of different sizes. *Journal of Neurophysiology*, v. 28, p. 599-620, 1965a.

_____. Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 28, p. 560-580, 1965b.

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

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

ICHIKAWA, M. synaptic reorganization in the medial amygdaloid nucleus after lesion of the accessory olfactory bulb of adult rat: II. New synapse formation in the medial amygdaloid nucleus by fibers from the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Research*, v.420, p. 253-258, 1987.

JOHNSTON, D.; MAGEE, J. C.; COLBERT, C. M.; CHRISTIE, B. R. Active properties of neuronal dendrites. *Annual Reviews Neuroscience*, v. 19, p. 165-186, 1996.

JOHNSTON, J. B. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *Neurological Studies from the University of Minnesota*, v. 24, p. 337-481, 1922.

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

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

KASAI, H.; MATSUZAKI, M.; NOGUCHI, J.; YASUMATSU, N.; NAKAHARA, H. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends in Neuroscience*, v. 26, p. 360-368, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LEDDA, M.; BARNI, L.; ALTIERI, L.; PANNESE, E. Decrease in the nucleo-cytoplasmic volume ratio of rabbit spinal ganglion neurons with age. *Neuroscience Letters*, v. 286, p. 171-174, 2000.

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

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

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

LIND, R.W.; SWANSON, L.W.; GANTEN, D. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. *Neuroendocrinology*, v. 40, p. 2-24, 1985.

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

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

MARCOS, P.; COVENÁS, R.; NARVÁEZ, J. A; DIAZ-CABIALE, Z.; AGUIRRE, J. A; TRAMU, G.; GONZÁLEZ-BARÓN, S. Immunohistochemical mapping of enkephalins, NPY, CGRP, and GRP in the cat amygdala. *Peptides*, v. 20, p. 635-644, 1999.

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

MATSUDA, S.; KOBAYASHI, Y.; ISHIZUKA, N. A quantitative analysis of the laminar distribution of synaptic boutons in field CA3 of the rat hippocampus. *Neuroscience Research*, v. 49, 241-251, 2004.

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

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

McDONALD, A. J. Cell types and intrinsic connections of the amygdala. In: AGGLETON, J.P. *The amygdala*. New York: Wiley-Liss, 1992. p. 67-96.

_____. Coexistence of somatostatin with neuropeptide y, but not with cholecystokinin or vasoactive intestinal peptide, in neurons of the rat amygdala. *Brain research*, v. 500, p. 37-45, 1989.

_____. Somatostatinergic projections from the amygdala to the bed nucleus of the stria terminalis and medial preoptic-hypothalamic region. *Neuroscience Letters*, v. 75, p. 271-277, 1987.

_____. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*, v. 55, p. 257-332, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NITECKA, L., FROTSCHER, M. Organization and synaptic interconnections of GABAergic and Cholinergic elements in the rat amygdaloid nuclei: single- and double-immunolabeling studies. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 279, p. 470-488, 1989.

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

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

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

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

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

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

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

Plenum Press, 1986. p. 263-284.

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

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

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

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

PERKEL, D.H., PERKEL, D.J. Dendritic spines: role of active membrane in modulating synaptic efficacy. *Brain Research*, v. 325, p. 331-335, 1985.

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

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

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

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

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

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

RAMON Y CAJAL, S. *Histologie du Système Nerveux de L'homme et des vertabrés*. Paris: A. Maloine, 1909.

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

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

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

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

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

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 17, p. 208-212, 1963.

RIGOTI, K. M. *Análise morfológica neuronal e da densidade de espinhos dendríticos da amígdala medial de ratas durante o ciclo estral*. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Neurociências), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

RODRIGO, J.; PEINADO, M. A.; SÁNCHEZ, E. S., PEDROSA, J. A.; BENTURA, M. L., ESTEBAN, F. J. et al. Técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la microscopía electrónica. In: PEINADO, M.A.; PEDROSA, J.A.; RODRIGO, J. *Inmunocitoquímica y Técnicas Relacionadas*. Jaén: Universidad, 1996. p. 177-201.

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

RUTKOSKI, N. J.; LERANT, A. A.; NOLTE, C. M.; WESTBERRY, J.; LEVENSON, W. Regulation of neuropeptide Y in the rat amygdala following unilateral olfactory bulbectomy. *Brain Research*, v. 951, p. 69-76, 2002.

SCALIA, F.; WINANS, S.S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory

olfactory bulb in mammals. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 161, p. 31-55, 1975.

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

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

SEGAL, M. Dendritic spines for neuroprotection: A hypothesis. *Trends in Neuroscience*, v. 18, p. 468-471, 1995.

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

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

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

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

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

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

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

SHINODA, K.; NAGANO, M.; OSAWA, Y. Neuronal aromatase expression in preoptic, striatal, and amygdaloid regions during late prenatal and early postnatal development in the rat.

The Journal of Comparative Neurology, v. 343, p. 113-129, 1994.

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

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

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

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

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

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

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

SPACEK, J.; HARRIS, K. M. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *Journal of Neuroscience*, v. 17, p. 190-203, 1997.

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

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

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

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

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

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

UCHIZONO, K. Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous of the cat. *Nature*, v. 207, p. 642-643, 1965.

VALVERDE, F. Intrinsic organization of the amygdaloid complex. A Golgi study in the mouse. *Trabajos del Instituto Cajal de Investigaciones Biologicas*, v. 54, p. 291-314, 1967.

VAN PELT, J.; DITYATEV, A. E.; UYLINGS, H. B. Natural variability in the number of dendritic segments: Model-based inferences about branching during neurite outgrowth. *The Journal of Comparative and Neurology*, v. 387, p. 325-340, 1997.

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

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

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

WESTBERRY, J. M. *Categorization of pheromonal chemosignals by medial amygdala*. 2003. Tese (Doctor in Philosophy). Department of Biological Science of the Florida State University College of Arts and Sciences, 2003.

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

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

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

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

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

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

ZHANG, L.; MA, W.; BARKER, J. L.; RUBINOW, D. R. Sex differences in expression of serotonin receptors (subtypes 1A and 2A) in rat brain: a possible role of testosterone. *Neuroscience*, v. 94, p. 251-259, 1999.