

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

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA ÁREA PRÉ-ÓPTICA MEDIAL,
NÚCLEO PERIVENTRICULAR ANTEROVENTRAL E AMÍGDALA MEDIAL
PÓSTERO-DORSAL INDUZIDAS PELA MANIPULAÇÃO NEONATAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TATIANE SABRIELA CAGOL CAMOZZATO

Porto Alegre - RS

2006

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

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA ÁREA PRÉ-ÓPTICA MEDIAL,
NÚCLEO PERIVENTRICULAR ANTEROVENTRAL E AMÍGDALA MEDIAL
PÓSTERO-DORSAL INDUZIDAS PELA MANIPULAÇÃO NEONATAL**

Aluna: Tatiane Sabriela Cagol Camozzato

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre - RS

2006

“Ao meu esposo Flávio, por tudo....”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion pela orientação, incentivo e pelo exemplo de professor e pesquisador que és. Obrigada!

Aos colegas e amigos de laboratório: Anelise Todeschini, Charlis Raineiki, Fernando Benetti, Profa. Dra. Márcia Breigeiron, Profa. Dra. Cármen Gomes, Fabiana de Souza, Rosana Frey, Camila Padilha, Ana Raquel Kakow, Natália Uriarte, Caroline Perinazzo da Veiga, Ana Lúcia Ceconelo, Márcia Azevedo e Márcio Donadio.

À Gabriela Sentena Severino pelo apoio durante o estágio. Que foi o meu primeiro contato com a pesquisa.

Ao Sandro Miguel pela dedicação em todos os momentos e pela motivação na iniciação científica.

À amiga Rosane Aparecida Ribeiro por todos os trabalhos realizados em conjunto, mas principalmente pelo apoio nas horas mais difíceis do mestrado.

À minha irmã Diuliane que conviveu comigo nesses dois anos e me apoiou em todos os momentos.

À madrinha e amiga Profa. Dra. Elisa Wilkelmann-Duarte pela paciência em atender todas as minhas ligações após um dia de trabalho extenuante e pelo material cedido.

Ao meu esposo Flávio pelo confiança, amor. Mas principalmente por ter aceito a distância física entre nós por dois anos. Priorizando sempre a minha formação.

À CAPES, CNPq e Fapesp pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
INTRODUÇÃO.....	1
1. MANIPULAÇÃO NEONATAL	2
2. ESTRESSE	5
3. PERÍODO HIPORRESPONSIVO AO ESTRESSE	6
4. AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-DORSAL (MEPD).....	8
5. ÁREA PRÉ-ÓPTICA MEDIAL (MPOA).....	13
6. NÚCLEO PERIVENTRICULAR ANTEROVENTRAL (AVPV)	18
7. ESTIMATIVA IMPARCIAL DA DENSIDADE NUMÉRICA.....	22
OBJETIVOS.....	24
1. OBJETIVO GERAL.....	25
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
MATERIAIS E MÉTODOS	26
1. ANIMAIS	27
2. GRUPOS.....	27
3. MANIPULAÇÃO NEONATAL	28

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	29
5. PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO	29
6. EXPERIMENTO I.....	30
6.1 CÁLCULO DA DENSIDADE NUMÉRICA DE CÉLULAS (N _v) POR VOLUME DO DISECTOR (mm ³)	30
6.2. CÁLCULO DO VOLUME DAS ESTRUTURAS ANALISADAS	32
6.3. ESTIMATIVA DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS.....	33
6.4. MEDIDA DO SOMA DE NEURÔNIOS.....	33
7. EXPERIMENTO II	34
7.1. CÁLCULO DA DENSIDADE DE CÉLULAS (mm ²).....	34
7.2 MEDIDA DO SOMA DE NEURÔNIOS.....	35
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
RESULTADOS	36
1. DENSIDADE NUMÉRICA DA MEPD	37
1.1 VOLUME DA MEPD.....	37
1.2 NÚMERO TOTAL DE NEURÔNIOS DA MEPD	38
1.3 DIÂMETRO DO SOMA DE NEURÔNIOS DA MEPD	38
2. DENSIDADE NUMÉRICA DO AVPV	43
2.1 VOLUME DO NÚCLEO AVPV.....	43
2.2 NÚMERO TOTAL ESTIMADO DE NEURÔNIOS DO AVPV	43
2.3 DIÂMETRO DO SOMA DE NEURÔNIOS DA AVPV	44
3. DENSIDADE DE CÉLULAS DA MPOA	49

3.1 DIÂMETRO DO SOMA DE NEURÔNIOS DA MPOA	49
DISCUSSÃO.....	53
CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1:** Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo de rato, onde pode-se observar o subnúcleo da AMe; a MePD em vermelho, onde foram realizadas as análises deste trabalho. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1998), equivale às figuras 28 a 33 deste atlas.....12
- Figura 2:** Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo de rato onde pode-se observar a área pré-óptica medial, em vermelho, onde foram realizadas as análises deste trabalho. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1998), equivale às figuras 28 a 24 deste atlas.....17
- Figura 3:** Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo de rato onde pode-se observar o núcleo periventricular anteroventral, em vermelho, onde foram realizadas as análises deste trabalho. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1998), equivale às figuras 18 a 20 deste atlas.....22
- Figura 4:** Como foram divididos os grupos.....28
- Figura 5:** Como foi realizada a manipulação neonatal.....29

Figura 6: O efeito da manipulação neonatal na densidade numérica (número de neurônios por mm^3) de neurônios da amígdala medial pósterodorsal (MePD) de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade. Foram utilizados um $n=6$ animais por grupo. A densidade numérica é expressa como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.....40

Figura 7: O efeito da manipulação neonatal no volume da amígdala medial pósterodorsal (MePD) de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade. Foram utilizados um $n=6$ animais por grupo. O volume é expresso como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.....41

Figura 8: O efeito da manipulação neonatal no número total estimado de neurônios da amígdala medial pósterodorsal (MePD) de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade. Foram utilizados um $n=6$ animais por grupo. O número total de neurônios é expresso como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.....42

Figura 9: O efeito da manipulação neonatal na densidade numérica (número de neurônios por mm^3) do núcleo periventricular anteroventral (AVPV) de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade. Foram utilizados um $n=6$ animais por grupo. A densidade numérica é expressa como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.....46

Figura 10: O efeito da manipulação neonatal no volume do periventricular anteroventral (AVPV), de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade. Foram utilizados um $n=6$ animais por grupo. O volume é expressa como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.....47

Figura 11: O efeito da manipulação neonatal no número total estimado de neurônios do núcleo periventricular anteroventral (AVPV) de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade. Foram utilizados um $n=6$ animais por grupo. O número total de neurônios é expresso como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.....48

Figura 12: O efeito da manipulação neonatal na densidade numérica da área pré-óptica medial (MPOA) de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade. Foram utilizados um n=6 animais por grupo. O número total de neurônios é expresso como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.....51

Figura 13: Figura mostra a MPOA em um aumento de 10X, mostrando alguns pontos de referência utilizados como quiasma óptico, supraquiasmático e terceiro ventrículo. E inferiormente está a mesma área com um aumento de 40x e, era dessa forma, que nós realizávamos as contagens. Também é possível visualizar as linhas de inclusão e exclusão. É possível ver as diferenças no número de neurônios encontradas nesse trabalho.....53

Figura 14: mostrando as projeções da amígdala medial pósterodorsal para o núcleo periventricular anteroventral (duas áreas que apresentam receptor de estradiol ER= receptor de estradiol) e desta para neurônios LHRH da MPOA.....63

Tabela 1: Efeito da manipulação neonatal no diâmetro em micrômetros(μm) do soma de neurônios da amígdala medial pósterodorsal (MePD) de fêmeas aos 11 e 90 dias de idade. Foram utilizados um n=6 animais por grupo. Observou-se um efeito grupo

[F(1,20)=5,37 P<0,05], onde o diâmetro do soma dos neurônios do grupo manipulado é significativamente menor do que o não-manipulado.....43

Tabela 2: Efeito da manipulação neonatal no diâmetro em micrômetros(μm) do soma de neurônios do núcleo periventricular anteroventral (AVPV) de fêmeas aos 11 e 90 dias de idade. Foram utilizados um n=6 animais por grupo. O efeito grupo [F(1,20)=3,66 P=0,06] aproximou-se da significância, onde o diâmetro do soma dos neurônios do grupo manipulado seria significativamente menor do que o não-manipulado.....49

Tabela 3: Efeito da manipulação neonatal no diâmetro em micrômetros (μm). O corpo celular de neurônios da área pré-óptica-medial (MPOA) de fêmeas aos 11 e 90 dias de idade. Foram utilizados um n=6 animais por grupo. Observou-se um efeito grupo [F(1,20)=21,54 P<0,05] onde o diâmetro do soma dos neurônios do grupo manipulado é significativamente menor do que o não-manipulado.....52

LISTA DE ABREVIATURAS

HPA - eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HPG - eixo hipotálamo-hipófise-gônadas

MPOA - área pré-óptica medial

AMPO - núcleo pré-óptico medial anterior

AVPV - núcleo periventricular anteroventral

MePD - amígdala medial pósterio-dorsal

Nv - densidade numérica

M - manipulado

NM - não manipulado

LC - Locus Coeruleus

PVN - núcleo paraventricular

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

ER α - receptor alfa de estradiol

ER β - receptor beta de estradiol

LHRH - hormônio liberador do hormônio luteinizante

SNC - sistema nervoso central

NA - noradrenalina

RNA_m - ácido ribonucléico mensageiro

EPM - erro padrão da média

E₂ - estradiol

RESUMO

A manipulação neonatal imprime alterações no desenvolvimento neuroendócrino, morfológico e comportamental de ratos. A área pré-óptica medial (MPOA) contém neurônios produtores do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) que estão intimamente relacionados com a reprodução. Os núcleos periventricular anteroventral (AVPV) e a amígdala medial pósterodorsal (MePD) são áreas do sistema nervoso central (SNC) que apresentam receptores de estrógeno, portanto poderiam estar atuando no feedback das gonadotrofinas.

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da manipulação neonatal sobre o volume do núcleo, a densidade de células, o diâmetro do corpo celular de neurônios e o número total estimado de neurônios da MePD e AVPV dos lados direito e esquerdo, em ratas aos 11 e 90 dias de idade. Na MPOA, foram avaliadas a densidade de células e o diâmetro do corpo celular de neurônios.

A MPOA apresentou uma redução da densidade numérica de 50% em ratas manipuladas de 11 dias e 50% em ratas manipuladas aos 90 dias de idade. A manipulação neonatal provocou alterações nos parâmetros analisados nas três áreas estudadas, quando comparadas aos grupos não manipulados. Na MePD a redução foi 63% e de 47% respectivamente aos 11 e aos 90 dias de idade. No AVPV a redução foi de 44% e de 54% aos 11 e 90 dias de idade.

As dimensões lineares do soma dos neurônios da MePD e MPOA apresentaram uma redução de tal forma que o diâmetro dos neurônios no grupo manipulado foi

significativamente menor do que o grupo não manipulado. Mas as dimensões lineares dos neurônios do AVPV não apresentaram alterações significativas.

A manipulação neonatal por uma causa ainda desconhecida induz a alterações estáveis na MPOA, MePD e AVPV. A diminuição do número de neurônios nessas estruturas pode explicar a redução da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) em ratas adultas, manipuladas no período neonatal.

INTRODUÇÃO

1. Manipulação neonatal

No período neonatal (duas primeiras semanas pós-parto em ratos), o sistema nervoso encontra-se em franco processo de diferenciação e desenvolvimento. O meio ambiente que cerca o indivíduo durante esse período pode afetar o desenvolvimento de estruturas neurais que estão envolvidas com a resposta ao estresse (Meaney et al., 1996).

A manipulação neonatal é um modelo experimental que tem por objetivo avaliar como uma interferência ambiental nos primeiros dias pós-parto pode alterar os mecanismos neurais que controlam os comportamentos e as respostas neuroendócrinas ao estresse. Este procedimento consiste em manipular os filhotes durante duas semanas, geralmente por alguns minutos. Essa manipulação neonatal, que é aparentemente inofensiva, altera a diferenciação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) promovendo mudanças nos padrões comportamentais e de resposta ao estresse em animais adultos (Meaney et al., 1993; Núñez et al., 1996; Meaney et al., 1996; Meerlo et al., 1999; Liu et al., 2000; Levine, 2001).

Em roedores observa-se uma diminuição da responsividade do eixo HPA ao estresse em animais adultos (Levine, 1993; Meaney et al., 1996; Liu et al., 2000). Estes efeitos são mediados pelas alterações da expressão de receptores para glicocorticóides em regiões do sistema nervoso central envolvidos na regulação do feedback negativo. Este procedimento durante o período neonatal aumenta a expressão dos receptores para

glicocorticóides no hipocampo e córtex frontal (Plotsky & Meaney, 1993; Meaney et al., 1993; Sapolsky, 1994; Meaney et al., 1996; Liu et al., 2000). Estas diferenças com relação aos receptores para glicocorticóides modificam a sensibilidade do feedback negativo, tornando-o mais sensível nos animais manipulados (Meaney et al., 1996). Postula-se que essa seria a causa das diferenças entre animais estimulados e não estimulados na infância quando submetidos ao estímulo estressor na vida adulta (Meaney et al., 1993; Bhatnagar & Meaney, 1995).

Além das respostas neuroendócrinas ao estresse, sabe-se que a manipulação neonatal altera padrões comportamentais em ratos adultos. Resultados do nosso laboratório demonstraram que a manipulação neonatal provoca aumento do comportamento agressivo maternal, diminuição do comportamento sexual de machos (Padoin et al., 2001) e de fêmeas (Gomes et al., 2001), diminuição da inibição comportamental no campo-aberto na presença de um gato (Charchat et al., 1995).

Além das alterações observadas no eixo HPA, Gomes et al (2005) demonstraram que a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) também pode sofrer alterações em animais que foram manipulados no período neonatal. Fêmeas manipuladas durante este período, além de apresentarem uma diminuição do comportamento sexual, têm ciclos estrais anovulatórios demonstrando uma capacidade reprodutiva reduzida.

Sendo a procriação um processo complexo no qual eventos fisiológicos e comportamentais devem ocorrer de modo sincrônico para haver a produção e liberação de gametas, torna-se necessário à presença de mecanismos neurais e endócrinos íntegros participando deste fenômeno. Se tais mecanismos estiverem abalados, possivelmente

aqueles comportamentos relacionados com a preservação da espécie estarão comprometidos.

Além de alterações na expressão gênica do receptor para glicocorticóides, em animais adultos, a exposição crônica ao estresse ou a elevados níveis de glicocorticóides interrompem o padrão normal de secreção de gonadotrofinas, desincroniza o ciclo estral e diminui a receptividade sexual da rata (Kamel & Kubajak, 1987; Plas-Roser & Arom, 1981; Armstrong, 1986). Sendo assim, o estresse pode inibir a função reprodutiva e esse efeito tem sido observado através da diminuição da secreção de gonadotrofinas. Por exemplo, a exposição ao éter promove um aumento da secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona, mas diminui a concentração de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) em ratas (Tohei et al., 1997). Essas modificações das concentrações plasmáticas indicam que os hormônios hipofisiários podem alterar-se em resposta ao estresse (Armário et al., 1986; Ono et al., 1985).

O hormônio liberador do hormônio adrenocorticotrófico (CRH) tem sido proposto como um mediador dos efeitos anti-reprodutivos provocados pelo estresse através de uma ação no hipotálamo, inibindo a secreção do LHRH (Caraty et al., 1997). O LHRH é um peptídeo chave que controla a secreção de gonadotrofinas, principalmente o LH e portanto, a função gonadal.

Além das alterações hormonais e comportamentais, a manipulação neonatal causa mudanças morfológicas no encéfalo de ratos. Por exemplo: animais submetidos à manipulação neonatal têm uma redução no número de neurônios na região parvocelular

do núcleo paraventricular e supra-óptico do hipotálamo, e um aumento na densidade de neurônios na área CA1 do hipocampo, lado esquerdo (Winkelmann-Duarte, 2004), também uma redução permanente de cerca de 35% do número de células nervosas do Locus Coeruleus (LC) de ratas aos 11, 26, 35 e 90 dias de idade (Lucion et al., 2003). Considerando o efeito plástico que a manipulação neonatal induziu, nesses núcleos, através da redução do número de células, podemos supor que outras estruturas centrais envolvidas no controle da ovulação também poderiam estar sendo afetadas por aquela intervenção no início da vida.

2. Estresse

A homeostase é definida como um estado de equilíbrio dinâmico e complexo necessário para a manutenção da vida. Este equilíbrio é constantemente ameaçado por fatores intrínsecos e extrínsecos, como os estressores. Assim, estresse pode ser definido como um estado de desarmonia da homeostase (Chrousos & Gold, 1992).

Os organismos, quando expostos a situações de ameaça e perigo, respondem com uma série de respostas adaptativas, físicas e mentais que se opõem aos estímulos estressores na tentativa de manter a homeostasia (Chrousos & Gold, 1992; Baternson et al., 2004).

Quando um organismo está submetido a uma situação estressante, a resposta do eixo HPA se faz através dos neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo que sintetizam e secretam o CRH e arginina-vasopressina (AVP), que ao atuarem na

hipófise anterior, promovem a liberação do ACTH e este por sua vez, estimula a secreção de glicocorticóides (corticosterona nos ratos) pelo córtex da adrenal (Francis et al., 1996; Tsigos & Chrousos, 2002).

Além disso, o estresse induz a ativação do sistema autônomo simpático promovendo a descarga periférica de noradrenalina (NA) nos terminais sinápticos e pela camada medular da adrenal, importante para o organismo prover substratos energéticos durante o estresse (Kopin, 1995).

O estresse induz a secreção de NA em todo o cérebro sendo que grande parte desta noradrenalina central secretada em resposta ao estresse origina-se no LC, que é extremamente sensível à maioria dos estímulos estressantes (Melia & Duman, 1991; Tsigos & Chrousos, 2002).

Assim, a ativação de eixo HPA é do sistema neurovegetativo simpático são as principais respostas adaptativas em situações estressantes sendo o CRH e a noradrenalina, respectivamente, os principais componentes das respostas aos estímulos estressantes. (Francis et al., 1996; Tsigos & Chrousos, 2002)

3. Período hiporresponsivo ao estresse

Num animal adulto exposto a estímulos estressores observa-se um aumento de glicocorticóides na circulação sistêmica devido à ativação do eixo HPA. Por outro lado, durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal, quando um estímulo estressante é aplicado no rato, observa-se um pequeno aumento ou mesmo nenhum aumento da

secreção de corticosterona (Walker et al., 1993). Por esta razão este período é denominada de período hiporresponsivo ao estresse (Guillet et al., 1980; Sapolsky & Meaney, 1986; Suchecki et al., 1993; Levine, 1994), época da vida do animal que o eixo HPA está hiporresponsivo. Esta período também é caracterizado por concentrações plasmáticas basais de corticosterona e ACTH muito baixas (Walker et al., 1986; Grino et al., 1989; Levine, 1994).

A causa desta hiporresponsividade foi atribuída a imaturidade do eixo HPA que é responsável pela ausência da resposta ao estresse (Guillet et al., 1980). Assim, somente quando o hipotálamo, a hipófise e o córtex da supra-renal estiverem maduros e funcionalmente conectados, uma resposta ao estresse é observada. Esta imaturidade tem como consequência uma regulação deficiente da síntese e liberação de ACTH e corticosterona e na inabilidade do estresse em promover uma alça de retroalimentação eficiente (Grino et al., 1989; Sakly & Koch, 1983). Uma outra provável causa desta hiporresponsividade é o fato da supra-renal estar relativamente insensível as ACTH, provavelmente, devido as suas baixas concentrações durante esta período da vida do animal (Suchecki et al., 1993).

Durante as duas primeiras semanas de vida, o SNC dos roedores está num período crítico de seu desenvolvimento pois a migração, a diferenciação, o crescimento e a apoptose neurais são máximos (Mistretta & Bradley, 1978). Portanto, a manipulação realizada durante este período crítico de desenvolvimento do SNC altera mecanismos neurais que controlam os comportamentos e as respostas neuroendócrinas.

4. Amígdala medial pósterodorsal (MePD)

A amígdala, ou complexo amigdalóide, constitui-se de núcleos subcorticais que se situam no lobo temporal, lateral ao hipotálamo e ventral ao estriado, no encéfalo de mamíferos. Em primatas, é caracterizada como uma massa ovóide de substância cinzenta, localizada na porção terminal e rostral da formação hipocampal, tendo como limite anterior o corno temporal do ventrículo lateral (Alheid et al., 1995; De Olmos., 1999). Em ratos, é formada por núcleos e subnúcleos que formam uma complexa rede estrutural inter-relacionada e multifuncional, uma vez que está envolvida na modulação de diversos comportamentos e ajustes vegetativos (Alheid et al., 1995; Everitt, 1995; Swanson & Petrovich, 1998; Rasia-Filho et al., 2000; De Olmos et al., 2004).

A amígdala de ratos apresenta-se dividida em quatro regiões, segundo a sua citoarquitetura, hodologia e função, que são: 1) amígdala "expandida", denominada assim por se estender além de seus limites anatômicos, sendo formada pelos núcleos medial (AMe) e central (ACe). A AMe, por sua vez, poderia ser composta por dois circuitos funcionalmente diferentes, associados com as divisões anterior e posterior do núcleo medial, e que diferenciaria também por distintas presenças de neurotransmissores (Newman, 1999); 2) amígdala com características corticais, subdividida em porção basolateral e em porções que se ligam às vias olfativas e vomeronasal; 3) área de transição, localizada entre a porção ventral dos núcleos da base e a amígdala "expandida" e 4) núcleos ainda não classificados, constituídos por um grande grupo de

células dispersas na substância branca e no interior do núcleo próprio a estria terminal (Alheid et al., 1995; De Olmos, 1999).

O modelo atual de estudo da organização da amígdala sugere que ela não é nem unidade funcional, nem estrutural, mas sim é definida como um conjunto heterogêneo de grupos celulares nos hemisférios cerebrais (Swanson & Petrovich, 1998; Petrovich et al., 2001).

Atribui-se à amígdala de ratos diversas funções, tais como: respostas a estímulos gerados por medo e ansiedade, percepções de estímulos olfativos e hormonais, modulação do comportamento reprodutivo e participação na aquisição do aprendizado e da memória condicionada (Rasia-Filho et al., 1991; Kling & Brothers, 1992; LeDoux, 1992; Everitt, 1995; Kondo & Arai, 1995; Wood & Newman, 1995; Quirk et al., 1995; Guillamón & Segovia, 1997; Swanson & Petrovich, 1998; Davis, 2000; Pitkänen et al., 2000). Para participar dessas atividades, ela possui a capacidade de receber informações sensoriais, que acabam por modificar sua atividade e estimular diversas regiões do sistema nervoso central (SNC) em resposta ao estímulo inicial (Kling & Brothers, 1992; LeDoux, 1992; Quirk et al., 1995; Davis, 2000).

Em ratos, alguns subnúcleos da amígdala são sexualmente dimórfico, esse dimorfismo está na dependência da ação dos hormônios gonadais em ambos os sexos (Nishizuka & Arai, 1981; Nishizuka & Arai, 1982; Mizukami et al., 1983; Gomez & Newman, 1991; Rasia-Filho et al., 1991).

A AMe, junto com outras estruturas do SNC, apresenta neurônios com características morfológicas variadas e que apresentam receptores para hormônios

gonadais amplamente distribuído em seus subnúcleos (Sar & Stumpf, 1973; Sheridan, 1979; Simerly et al., 1990; LI et al., 1997; Österlund, 1998). Esses hormônios, devido a sua ampla capacidade de gerar alterações nos circuitos neurais, influenciam a plasticidade do SNC e causam alterações morfológicas nos neurônios e nas células gliais (Nishizuka & Arai, 1982; Arnold; Breedlove, 1985; Arnold; Jordan, 1988; Rasia-Filho et al., 1991).

A MeA é uma estrutura complexa que pode ser dividida com base na sua citoarquitetura, com critério sináptico e funcional em quatro grupos principais: antero-dorsal (MeAD), antero-ventral (MeAV), pósterio-ventral (MePV) e pósterio-dorsal (MePD) (Rasia-Filho, 2004; Olmos et al., 2004; Canteras et al., 1995). E, em função de suas conexões, ela pode estar organizada em um região anterior, da qual fazem parte a MeAD, MeAV e a MePV, e uma região posterior, formada basicamente pela MePD (Canteras et al., 1995).

Baseado nisso, Wood e Newman (1995) propuseram que a região anterior da MeA estaria sendo influenciada principalmente por informações olfativas; e a região posterior, pelos hormônios gonadais, embora essa divisão anátomo-funcional não seja absolutamente rígida (Simerly et al., 1990; LI et al., 1997; Österlund, 1998; Shughrue et al., 1997; Pitkänen, 2000; Wood & Newnam, 1995). Neurônios com receptores dos tipos ER α (receptor beta de estradiol) e ER β (receptor beta de estradiol) para estrógeno são concentrados preferencialmente na MePD (Simerly et al., 1990; LI et al., 1997; Österlund, 1998), sendo que a quantidade de receptores para estrógeno na MePD chega a ser igual à do hipotálamo (Simerly et al., 1990).

O subnúcleo (MePD) caracteriza-se por apresentar denso conjunto de células de tamanho médio, que se distribuem em três colunas orientadas paralelamente em relação a sua superfície medial (Alheid et al., 1995). Essa região expressa grande quantidade de neurônios sintetizadores de angiotensina II, substância P e colecistocinina (Lind & Ganten, 1990; Simerly et al., 1990).

A MePD possui aferências que advêm de diferentes regiões do encéfalo, dentre as mais importantes, estão as hipotalâmicas, do córtex cerebral, talâmicas, tronco encefálico, sistema olfativo e outras regiões, também existe aferências interamigdalóides. Já a MePD tem eferências, dentre as mais importantes e significativas estão as hipotalâmicas (para o núcleo periventricular anteroventral (AVPV), entre outros), corticais, tronco encefálico, também existe eferências intramigdalóide (Canteras et al., 1995).

Ratas submetidas á lesão na MePD, quando colocadas junto a ratos, mostram redução da ocorrência de atividade pré-copulatória (exploração olfativa) e aumento na duração da cópula. Após a cópula, elas buscam menos freqüentemente seus companheiros de acasalamento quando comparadas às ratas submetidas á lesão fictícia (Lehman & Winans, 1982). Ratos com lesão na MePD reduzem o comportamento copulatório e a ereção peniana desencadeada pelo odor da fêmea em estro (Kondo et al., 1999). Por outro lado, a investigação olfativa genital, realizada por machos em fêmeas, e após a ejaculação em ratos induz a um aumento da ativação da proteína Fos na MePD (Coolen et al., 1997).

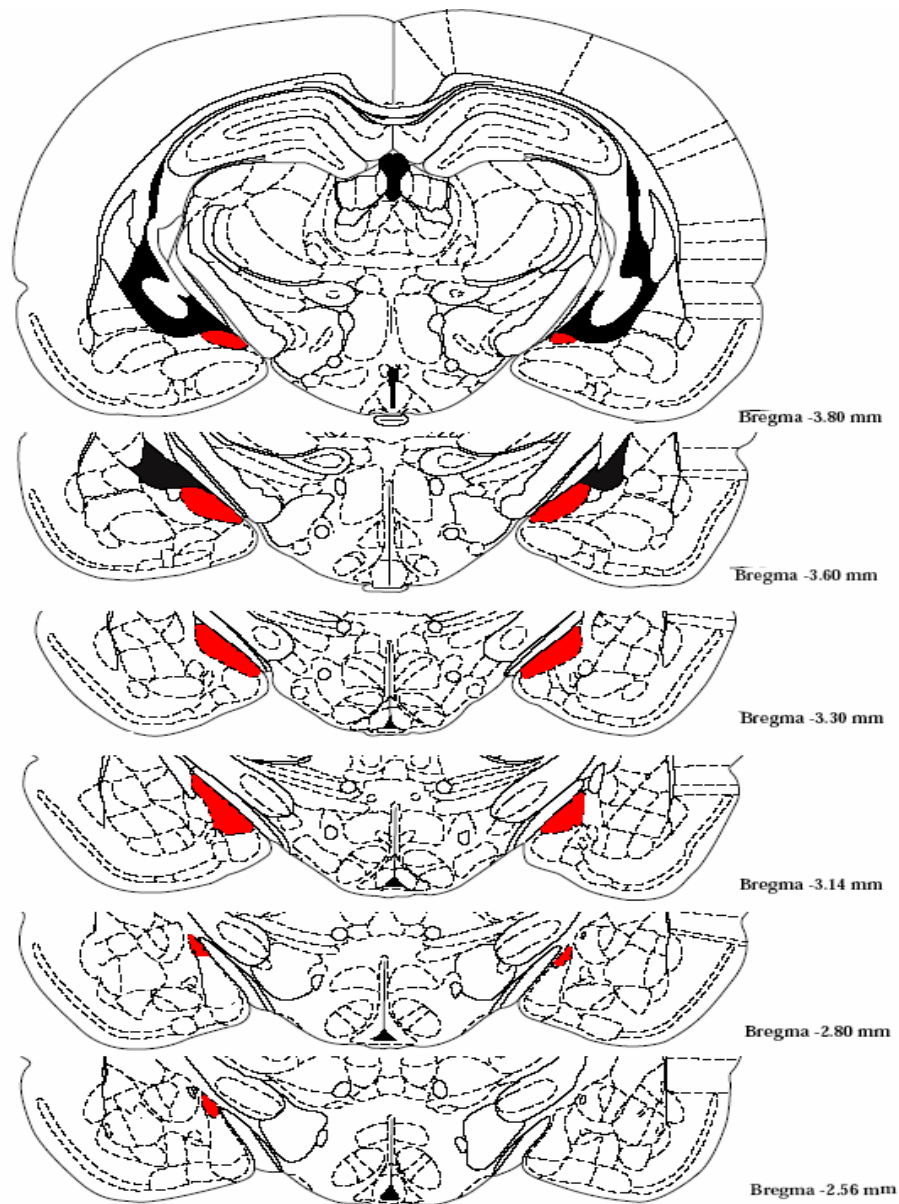


Figura 1: Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo de rato, onde pode-se observar o subnúcleo da AMe, a MePD, em vermelho, onde foram realizadas as análises deste trabalho. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1998), equivale às figuras 28 a 33 deste atlas.

5. Área pré-óptica medial (MPOA)

A área pré-óptica de ratos participa da regulação neuroendócrina e também de comportamentos reprodutivos (Segarra et al., 1998). Essa região é muito complexa e é uma parte diferenciável da zona medial do hipotálamo, os limites morfológicos, citoarquitetura e nomenclatura são controversos. Essa área está dividida em três zonas longitudinais a periventricular, medial e lateral (Simerly, 1995). A área pré-óptica medial (MPOA) tem pelo menos cinco grupos celulares (Simerly, 1995).

O maior núcleo da MPOA é núcleo pré-óptico medial (MPO), que é composto por três subdivisões distintas (Simerly et al., 1984). Além do MPO, a MPOA possui quatro pequenos grupos distintos: o núcleo pré-óptico anteroventral (AVPO), que está na base da área pré-óptica medial, entre o AVPV e o núcleo diagonal da banda de Broca, e é separado de cada núcleo por uma clara demarcação de células esparsas, o núcleo pré-óptico anterodorsal (ADPO), localiza-se na parte dorsal da MPOA e aparece rostralmente nas secções frontais da região pré-óptica, mas caudalmente mescla-se com uma parte indiferenciável da MPOA (Simerly, 1995).

Lateralmente ao ADPO está uma região triangular de baixa densidade celular que contém um componente da estria terminal, essa região foi estudada em detalhes por Raisman e Field (1973), que se referiram com parte estrial da área pré-óptica. Eles identificaram um “núcleo redondo” lateralmente a estria terminal (StA), e esse núcleo é substituído caudalmente por um grupo de células fusiformes e esses dois núcleos são

referidos coletivamente como núcleo paraestrial (PS); (Simerly., et al 1984; Ju & Swanson, 1998), que é notável por projeções diretas para neurônios magnocelulares do núcleo paraventricular (PVN) e também fortes aferências para o AVPV (Simerly & Swanson, 1988).

Outro núcleo da MPOA, é o pré-óptico posterodorsal (PDPO), que é formado por um pequeno grupo de neurônios grandes e fortemente corados que localiza-se caudalmente na região pré-óptica próximo a ponta posterior do PS, e ventrolateralmente à parte magnocelular do PVN (Swanson & Kuypers, 1980).

Lateralmente ao MPO está a MPOA, uma estrutura neural que interpreta e origina impulsos eferentes responsáveis pela liberação fásica do LH (Kalra et al., 1983; Everitt, 1989). Um estímulo elétrico na MPOA provoca ovulação em rata no proestro que havia sido bloqueada por pentobarbital (Kalra et al., 1971; Everitt, 1989), e a separação cirurgica desta região caudalmente do resto do hipotálamo resulta em ciclos anovulatórios (Bogdanove, 1964; Halaz & Gorski, 1967).

A MPOA é formada por neurônios que secretam o LHRH (Barry et al., 1985 & Merchenthaler et al., 1989). Em ratas, o aumento da concentração de LH no plasma é o evento chave para a ovulação (Freeman, 1994). O pico pré-ovulatório de LH depende da secreção do LHRH nos terminais nervosos dentro da eminência mediana (Levine et al, 1991, Ishikawa, 1992). Os neurônios LHRH que projetam-se para a eminência mediana são concentrados na MPOA, essas fibras terminam nos capilares primários da circulação porta hipotálamo-hiposifária (Freeman et al., 1994).

Classicamente, os esteróides ovarianos controlam a secreção do LH e LHRH por retroalimentação positiva e negativa (Neill et al., 1971), mas o mecanismo preciso da ação do estradiol e da progesterona não está completamente estabelecido, pois, neurônios LHRH não apresentam co-localização com estradiol (Shivers et al., 1983) ou com ER α (Herbison & Theodosis, 1995). Por isso, tem sido proposto que a influência do estradiol na secreção do LHRH ocorra por um mecanismo indireto (Helena et al., 2002; Petersen et al., 2003).

Outros estudos demonstraram que neurônios LHRH de roedores expressam ER β (Hrabovsky et al., 2001). No entanto, não existe diferença significativa no número de neurônios imunorreativos à ER β entre machos e fêmeas em diferentes estados hormonais, portanto a expressão ER β não é dependente de esteróides. É possível que esses receptores estejam envolvidos com o mecanismo de retroalimentação negativa, exercendo efeitos opostos aos ER α (Melton, 2000). De acordo com esses resultados, pode-se considerar que a retroalimentação positiva poderia ser exercida por ação indireta do estrógeno, modulando a secreção de neurotransmissor.

Portanto, essa área tem um papel importante no controle neural da reprodução, tanto no controle da secreção das gonadotrofinas pela hipófise (Freeman, 1994) quanto no comportamento sexual (Meisel & Schas, 1994). E a principal fonte de entradas na MPOA é a MeA, que recebe informações do bulbo olfatório e órgão vomeronasal, processa e retransmite para a MPOA e outras áreas (Kostarczyk, 1986; Wood, 1997).

Alguns estímulos estressantes durante a gravidez influenciam a diferenciação sexual do cérebro de ratos machos (Anderson et al., 1986; Rhees & Fleming, 1981;

Ward, 1972; Ward, 1984a; Ward, 1984b). Esses estímulos são capazes de diminuir a atividade de c-fos na MPOA do hipotálamo (Humm et al., 1995) e também reduzem o volume do núcleo sexualmente dimórfico da MPOA (Anderson et al., 1990; Anderson et al., 1986; Fleming et al., 1992; Kerchner & Ward, 1992). Essa mudança parece ser dependente de alterações hormonais induzidas pelo estresse na mãe e ou no feto (Ward, 1980; Ward, 1984).

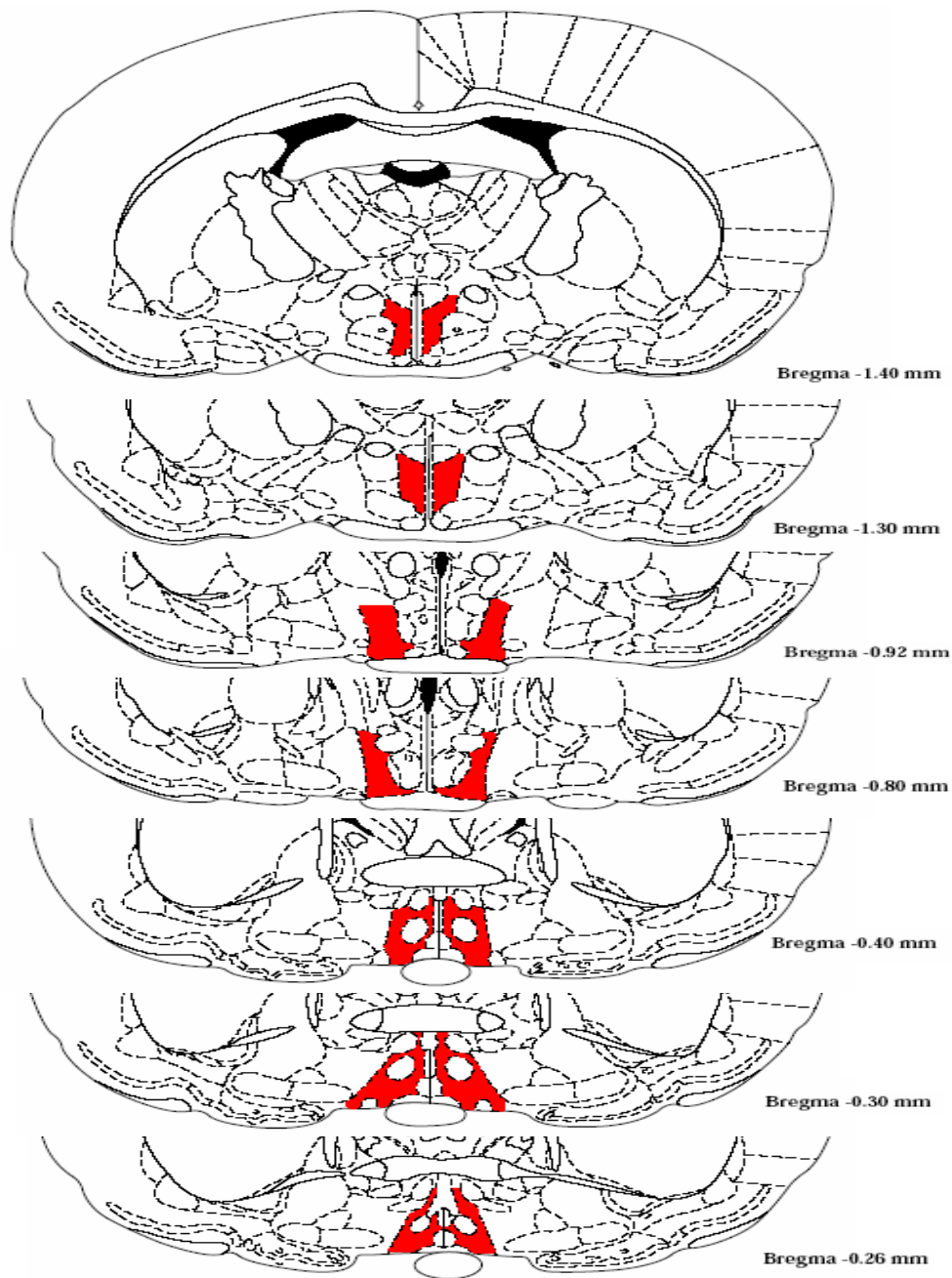


Figura 2: Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo de rato onde pode se observar a área pré-óptica medial, em vermelho, onde foram realizadas as análises deste trabalho. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1998), equivalem às figuras 28 a 24 deste atlas.

6. Núcleo periventricular anteroventral (AVPV)

A área pré-óptica tem um núcleo sexualmente dimórfico em ratos, sendo que o seu volume é maior em fêmeas do que em machos (Arai et al., 1993; Bloch & Gorski, 1988; Wiegand., et al, 1978; Ahmed et al., 1990; Simerly et al., 1985), e nas fêmeas esse núcleo apresenta maior densidade de neurônios (Bleier et al., 1982; Ito et al., 1986). Esse núcleo é chamado de núcleo pré-óptico medial anterior (AMPO) por Paxinos, 1986, mas também por núcleo periventricular anteroventral (AVPV) da área pré-óptica por Orikasa et al., 2002.; Yoshida et al., 1999; Orikasa et al., 2003; Rhess et al., 1999; Petersen et al., 2003; Simerly, 1995; Herbison, 1998; Davis et al., 1996.

O AVPV ocupa a posição ventral na zona periventricular da região pré-óptica e é localizado imediatamente caudal ao órgão vascular da lâmina terminal. A morfologia do AVPV foi descrita primeiramente por Bleier et al., 1979; como um grupo oval de alta densidade, que possui neurônios intensamente corados e é facilmente diferenciado do núcleo pré-óptico periventricular (PePO), que localiza-se imediatamente caudal e dorsal ao AVPV, e é limitado lateralmente por uma região de células esparsas que separa o AVPV do núcleo pré-óptico anteroventral (AVPO). Ventralmente o AVPV é separado do quiasma óptico pelo núcleo supra-quiasmático (Simerly, 1995).

Estudos mostraram que o AVPV tem alta densidade projeções de neurônios de várias áreas do SNC, como áreas hipotalâmicas e MePD. Essas aferências de várias regiões do cérebro são críticas para o pico de LH, e essa área parece ser chave para a integração e transdução de sinais hormonais e ambientais para neurônios LHRH

(Simerly, 1998). O AVPV também recebe projeções do núcleo supra-quiasmático (SCN), onde faz sinapse com neurônios que contêm estrógeno, assim o AVPV recebe sinais circadianos diariamente que são necessários para o pico de LH (Watson et al., 1995; De La Iglesia et al., 1999). O AVPV envia projeções para a área rostral da área pré-óptica (Gu & Simerly, 1999), onde os efeitos dos estrógenos na expressão gênica do LHRH, são dramáticos (Petersen et al., 1995).

O AVPV é uma parte crítica do circuito neural que regula a secreção fásica do LHRH em fêmeas. Apesar de não conter neurônios imunorreativos a LHRH (Barry et al., 1985; Simerly & Swanson 1987), ele apresenta alta densidade de células que concentram estradiol (Bloch et al., 1992) e abundante RNAm de ER α (Simerly et al., 1990; Shughurue et al., 1997) e ER β (Shughurue et al., 1997). Microimplantes de antiestrógeno no AVPV bloqueiam o pico de LH induzido por estrógeno e o aumento da expressão gênica do LHRH visto muitas horas antes do pico do LH (Petersen, 1995). Um grupo de neurônios do AVPV, encontrado somente em fêmeas, é coativado com neurônios LHRH no momento do pico do LH (Le et al., 1999). Os neurônios que concentram estrógeno no AVPV de ratos podem ser responsáveis por superar o efeito repressivo direto do estrógeno na expressão do gene do LHRH (Petersen, 2003).

Os neurônios do AVPV são ativados via um subtipo de receptor do glutamato (Gu et al., 1999) e parecem ter uma regulação específica em fêmeas, para o pico de gonadotrofinas (Simerly, 1998), através de uma inervação direta de neurônios LHRH (Gu & Simerly, 1997). Pequenas lesões restritas ao AVPV bloqueiam a liberação cíclica do hormônio luteinizante, resultando em ciclos anovulatórios, com estro persistente

(Wiegand et al., 1978; Orikasa et al., 2002). E isso ocorre provavelmente por destruir neurônios necessários para a apropriada regulação dos neurônios LHRH (Ronnekleiv & Kelly, 1986). Isso indica que o AVPV é indispensável para a regulação do pico de LH (Orikasa et al., 2003).

O AVPV de ratas apresenta uma alta densidade de neurônios dopaminérgicos e opioidérgicos (Simerly et al., 1985; Simerly, 1989; Watson et al., 1986). No entanto a identidade de neurônios que comunicam sinais do estrógenos para neurônios LHRH ainda não está estabelecida, mas existem vários candidatos como neurônios gabaérgicos, glutamatérgicos e neuropeptidérgicos que no AVPV são alvos dos estrógenos e portanto candidatos para regular o aumento fásico da síntese de LHRH e a indução do pico de LH (Petersen, 2003).

O AVPV é um importante regulador dos eventos que induzem o pico do hormônio luteinizante por estrógeno (Orikasa et al., 2002). O volume deste núcleo é alterado por mudanças hormonais durante o período crítico pré-natal e pós-natal do desenvolvimento do cérebro (Davis et al., 1996). Porém sua função ainda não está completamente esclarecida (Rhees et al., 1999).

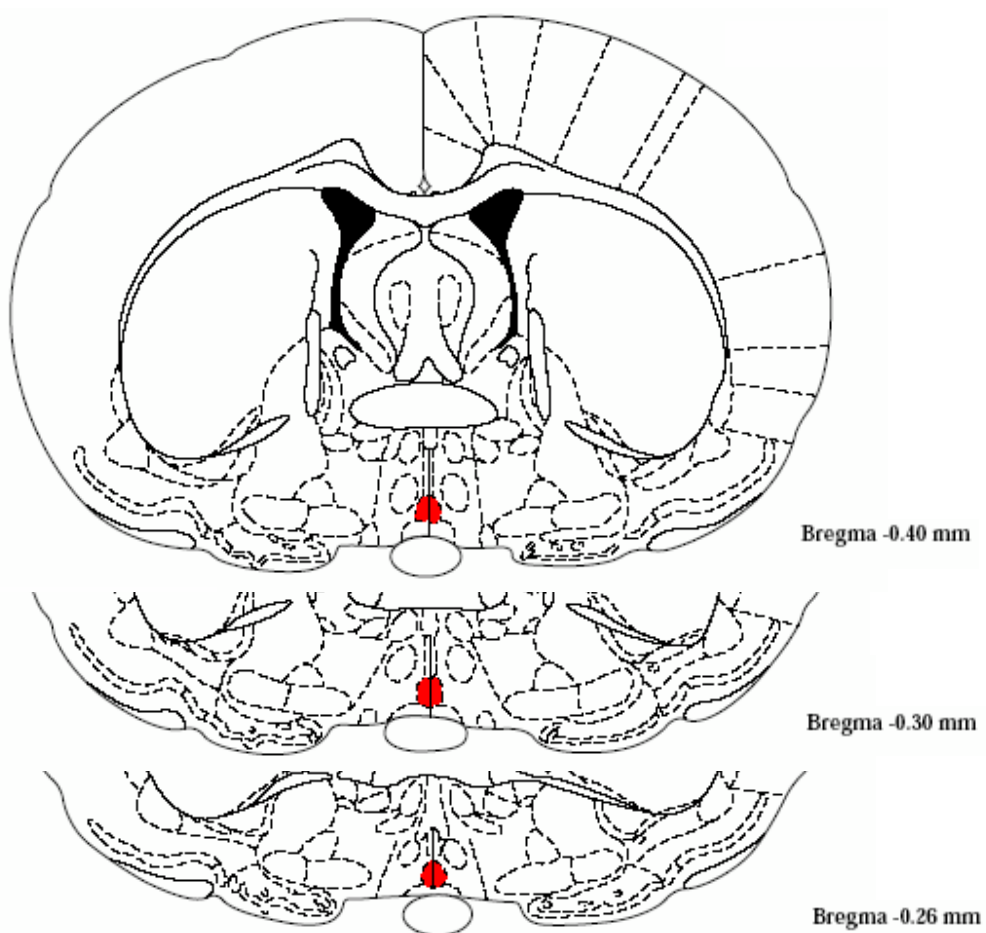


Figura 3: Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo de rato onde pode-se observar o núcleo periventricular anteroventral, em vermelho, onde foram realizadas as análises deste trabalho. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1998), equivale às figuras 18 a 20 deste atlas.

7. Estimativa imparcial da densidade numérica

O método do disector óptico é usado para obter a densidade numérica de diferentes estruturas. O disector óptico é baseado na focalização de células na face superior e inferior de uma mesma secção dentro do corte histológico de maneira independente

O Prof. Hans Gundersen, de Copenhagem, modificou um modelo padrão de microscópio Olympus (BHT) incorporando a este um “microcaptador eletrônico” para saber com acurácia o movimento do parafuso micrométrico, e assim, a medida em micrômetros do deslocamento vertical dentro da espessura do corte histológico. Ao invés da cabeça binocular colocou um sistema de projeção de imagens. Este aparelho também recebeu o nome de Disector e facilita contagem com o método do Disector óptico (Mandarim, 1995). Então a palavra disector óptico pode ser utilizada para denominar o método estereológico assim como o aparelho desenvolvido pelo Prof. Gundersen.

Quando dispomos de um microscópio com o microcaptador eletrônico acoplado é possível usar cortes espessos, já que o aparelho é capaz de informar em qual altura estamos dentro do corte. Portanto é possível realizar vários disectors dentro de apenas um corte histológico, ele permite que se realize uma “viagem” dentro do corte (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

A densidade numérica das células (número de neurônios por mm^3) foi determinada por 10 disectors ópticos (cortes), os quais devem ser escolhidos através de uma amostragem sistemática randômica e uniforme (Cavalieri, 1635; Gundersen &

Jensen, 1987). Por razão de eficiência, o núcleo da célula será considerado a representação de um neurônio. A Q_A (número de neurônios contados na área teste) é o número de núcleos neuronais, observados somente em um foco (no plano superior), quando eles estão totalmente ou parcialmente dentro da estrutura (Schmitz et al., 2005). Então para obter uma contagem imparcial da estrutura utiliza-se uma grade com duas linhas proibidas (exclusão) e duas linhas aceitáveis (inclusão), quando o objeto tocar as linhas proibidas ele não pode ser contado, no entanto quando tocar as linhas aceitáveis ou estiver completamente dentro da área ele será contado (Howard and Reed, 1998).

Como a contagem é realizada dentro de uma área teste conhecida (A_T), então o volume-teste é calculado através da multiplicação da área teste pela espessura ($A_T \cdot e$), e essa contagem dentro desse volume-teste é considerada imparcial (Gundersen et al., 1988a; Mandarin-de-Lacerda and Costa, 1993; Mandarin-de-Lacerda et al., 1995; Burit et al., 1996; Aguila and Mandarin-de-Lacerda, 1999; Mandarin-de-Lacerda and Pereira, 2000; Pessanha and Mandarin-de-Lacerda, 2000; Melo et al., 2002).

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Verificar o efeito da manipulação neonatal no número de células neuronais na área pré-óptica medial, núcleo periventricular anteroventral e amígdala medial pósterodorsal em ratas de 11 dias e 90 dias.

2. Objetivos específicos

Avaliar a densidade numérica da área pré-óptica-medial, núcleo periventricular anteroventral e da amígdala medial pósterodorsal.

Avaliar o volume do núcleo periventricular anteroventral e da amígdala medial pósterodorsal.

Avaliar o número total estimado de células existentes em ambas os núcleos: núcleo periventricular anteroventral e da amígdala medial pósterodorsal.

Avaliar o diâmetro das células neuronais da área pré-óptica-medial, núcleo periventricular anteroventral e da amígdala medial pósterodorsal.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizadas ratas fêmeas Wistar. Os animais foram mantidos sob temperatura ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (12 horas de claro e 12 horas de escuro, com as luzes acessas às 6:00 horas) controlados e com água e comida *ad libitum*. Ratas prenhas foram fornecidas pelo Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS. Após o nascimento os filhotes foram divididos em dois grupos: não-manipuladas e manipuladas. As ratas foram desmamadas aos 21 dias de idade e mantidas em grupos de 4-5 ratas por caixa até o dia do experimento.

2. Grupos

As ratas foram divididas em dois grupos: não-manipuladas e manipuladas.



Figura 4: Esquema do protocolo experimental da manipulação neonatal e da divisão dos grupos.

3. Manipulação neonatal

Este procedimento foi realizado com as mãos do experimentador revestidas com luvas de látex em uma sala ao lado do biotério. O dia do nascimento foi considerado o dia zero, no dia um foi padronizado, aleatoriamente o número de oito filhotes por mãe. As ninhadas não padronizadas permanecerão sem nenhuma interferência até o 10º dia de vida quando foi realizada a troca de serragem.

A manipulação foi realizada do 1º ao 10º dia de vida pós-natal. Este procedimento foi realizado em uma sala ao lado do biotério com a mesma temperatura e fotoperíodo. A mãe foi retirada da caixa e os filhotes são gentilmente manipulados durante 1 minuto em horários aleatórios. Após este período, a mãe foi colocada de volta com a ninhada.

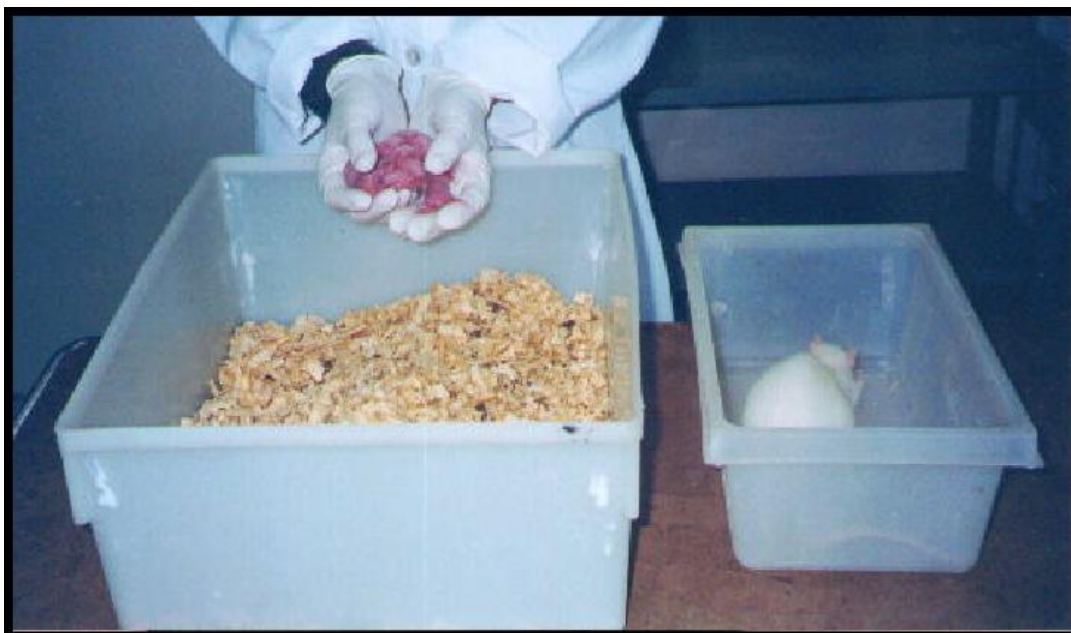


Figura 5: Fotografia da técnica de manipulação neonatal.

4. Procedimento experimental

As fêmeas manipuladas e não-manipuladas foram estudadas em duas idades diferentes: 11 dias (neonatal período) e 90 (adulto). O número de animais de cada grupo experimental foi de 6 animais. As fêmeas adultas foram estudadas em diestro. O ciclo estral foi observado diariamente através do esfregaço vaginal por um período de 15 dias, e somente fêmeas com três ciclos regulares foram estudadas.

Os cérebros das ratas foram perfundidos, fixados, incluídos, cortados e corados com cresil violeta e posteriormente foram analisados através de diferentes técnicas de contagem.

5. Procedimento histológico

As ratas foram anestesiadas com xilasina (0,1ml/g peso corporal, i. m.) e ketamina (0,1ml/g peso corporal, i.m.) e elas foram perfundidas com solução lavadora de tampão fosfatado com heparina (50 ml em de 11-dias e 100 ml em 90-dias ratas), seguido por paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.4) em 4° C em um fluxo avaliado (50 ml em 11-dias e 100 ml em 90-dias).

A velocidade da condução das soluções usadas na perfusão intracardíaca foi de aproximadamente 1 gota por cada 7 segundos para ratas de 11 dias e 1 gota por 5 segundos para ratas de 90 dias. A velocidade de condução das soluções foi diferente porque o encéfalo de ratas de 11 dias parece uma substância gelatinosa. Depois da perfusão, o encéfalo foi extraído do crânio e permaneceu na mesma solução fixadora por

72 h. Depois de fixado, o cérebro foi lavado por 1 h em água corrente e desidratado em diferentes concentrações de álcool (70%, 80%, 90%, 95% e álcool absoluto) e xilol é incluído na posição final com uma resina paraplastic (Histosec - Merk). Foram realizadas secções coronais seriadas do cérebro, com 6 μm espessura cada, foram cortadas com um micrótomo e coletadas em série de fatias. O tecido foi corado com cresil violeta. Depois de corado, as secções foram desidratadas através de séries de álcool, clareado com xilol, e encoberto com Entellan (Merk). As estruturas do sistema nervoso central, área pré-óptica medial, núcleo pré-óptico medial anterior e amígdala medial pósterodorsal, foram identificados de acordo com atlas cérebro de ratos de Paxinos & Watson (1998).

6. Experimento I

6.1 Cálculo da densidade numérica de células (N_v) por volume do disector (mm^3)

Neste experimento usamos a técnica do disector óptico. Para isso utilizamos um microscópio com uma câmara de vídeo acoplado a um monitor de televisão 14 polegadas.

As contagens eram realizadas em secções finas observadas na luz do microscópio, onde focalizávamos as faces superior e inferior, alterando o eixo-z (através

de uma alteração de foco). No presente trabalho a distância entre o plano superior (look up) e o inferior (look down) é a própria espessura do corte ($6\mu\text{m}$).

Por razão de eficiência, o núcleo da célula foi considerado a representação de um neurônio. A Q_A (número dos neurônios contados na área teste) foi o número de núcleos neuronais visto em somente um foco, quando eles estão totalmente ou parcialmente dentro da estrutura (Schmitz et al., 2005). A contagem foi realizada do lado direito e esquerdo em uma área teste de $1024\ \mu\text{m}^2$, para obter uma contagem imparcial da estrutura utilizou-se uma grade com duas linhas proibidas (exclusão) e duas linhas aceitáveis (inclusão), quando o objeto tocar as linhas proibidas ele não pode ser contado, no entanto quando cortar as linhas aceitáveis ou estiver dentro da área completamente ele será contado (Howard and Reed, 1998).

A contagem dos neurônios foi feita ao longo da extensão de todo o núcleo a partir do 3^o corte com intervalo de 10 cortes para a amígdala medial pósterodorsal e 3 cortes para o núcleo periventricular anteroventral, resultando em 60 amostras por grupo.

Como a contagem foi realizada dentro de uma área teste conhecida (A_T), então o volume do disector (V_{Dis}) foi calculado através da multiplicação da área teste pela espessura da microtomia ($A_T \cdot e$), e essa contagem dentro desse volume do disector é considerada imparcial. A densidade numérica de neurônios (N_v) pode ser estimada pela seguinte fórmula: $N_v = Q_A / A_T \cdot e$ ($1/\text{mm}^3$); onde N_v = (densidade numérica de neurônios); Q_A = (número dos neurônios contados na área teste); A_T = (área teste); e = (espessura); (Gundersen et al., 1988a; Mandarin-de-Lacerda and Costa, 1993; Mandarin-de-Lacerda et al., 1995; Burit et al., 1996; Aguila and Mandarin-de-Lacerda,

1999; Mandarim-de-Lacerda and Pereira, 2000; Pessanha and Mandarim-de-Lacerda, 2000; Melo et al., 2002).

6.2. Cálculo do volume das estruturas analisadas

Foi utilizado um microscópio com uma câmara de vídeo acoplado a um computador e o sistema de análise de imagens NIH Image 1.62. A área das secções amostradas foram medidas através do sistema de análise de imagem, com objetiva de 10X. As imagens seriadas foram identificadas, digitalizadas e apresentadas em um monitor de computador.

As bordas dos AVPV e MePD foram traçadas com o uso do mouse do computador. O volume da MPOA não foi estimado devido a indefinição das bordas dessa estrutura, o que impossibilitou a medida da área da MPOA e portanto do volume dessa estrutura.

A estimativa de volume foi obtida através do somatório das áreas da estrutura inerente a cada secção multiplicada pela distância entre as secções, representada por $V = \Sigma A.T$ e apresentado em mm^3 .

$$V = \Sigma A.T$$

V= (Volume); ΣA = (somatório das áreas); T= (distância entre as secções); (Gundersen & Jensen, 1987 ;Cruz-Orive, 1997).

6.3. Estimativa do número total de células

A partir dos dados obtidos na avaliação da densidade numérica (N_v) de células e do volume do núcleo aplica-se outra fórmula e facilmente obtém-se dados referentes à estimativa do número total de neurônios. Obtivemos o número total de neurônios do lado direito e esquerdo dos núcleos analisados.

$$N = V \cdot N_v$$

Onde N =(número total de células); V = (estimativa de volume); N_v = (densidade numérica)(West and Gundersen, 1990).

6.4. Medida do soma de neurônios

Foi utilizado um microscópio com uma câmara de vídeo acoplado a um computador e o sistema de análise de imagens NIH Image 1.62 para medir o maior diâmetro (micrômetros) do corpo da célula. Foram medidos três células de cada corte num intervalo de três cortes para o AVPV e três células num intervalo de dez cortes MePD, após era calculada a média do diâmetro entre as células analisadas.

Todas as medidas foram realizadas com um aumento de 40 vezes e apresentadas em μm .

7. Experimento II

7.1. Cálculo da densidade de células (mm²)

Foi utilizado um microscópio com uma câmara de vídeo acoplado a um computador e um sistema de análise de imagens NIH Image 1.62. Foram contados todos os neurônios da área-pré-óptica-medial (MPOA) do lado direito e esquerdo que apresentavam um núcleo evidente em uma área teste. A área-teste, onde foram contadas as células, corrigindo-se os aumentos do microscópio, foi de 4900 μm^2 . Para obter uma contagem imparcial da estrutura utiliza-se uma grade com duas linhas proibidas (exclusão) e duas linhas aceitáveis (inclusão), quando o objeto tocar as linhas proibidas ele não pode ser contado, no entanto quando cortar as linhas aceitáveis ou estiver dentro da área completamente ele será contado (Howard and Reed, 1998).

A contagem dos neurônios da MPOA foi feita ao longo da extensão de todo o núcleo a partir do 3º corte com intervalo de 10 cortes, o número de cortes analisados foi de 12 a 20 cortes por animal. Essa quantificação foi realizada separadamente por dois experimentadores, com uma objetiva de 40 vezes. Calculando-se a

$$\text{Densidade numérica} = N / A_T \times n \text{ (1/mm}^2\text{)}$$

Onde N= número total de células contadas; A_T = área teste; n= número de cortes analisados.

Visto que não foi possível definir com precisão os limites morfológicos da MPOA, não foi calculado o volume dessa estrutura, e portanto não foi possível estimar o número total de neurônios da MPOA.

7.2 Medida do soma de neurônios

Foi utilizado um microscópio com uma câmara de vídeo acoplado a um computador e o sistema de análise de imagens NIH Image 1.62 para medir o maior diâmetro (micrômetros) do corpo da célula. Foram medidos três células de cada corte num intervalo de dez cortes MPOA, após era calculada a média do diâmetro entre as células analisadas.

Todas as medidas foram realizadas com um aumento de 40 vezes e apresentadas em μm .

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias ($\pm EPM$) da densidade numérica, volume, número total de células e diâmetro neuronal foram comparadas inicialmente através de ANOVA de três vias comparando grupo, idade e lado, seguido de Newman-Keuls (significância aceita para $p \leq 0.05$), os valores do lado esquerdo foram somados com os do lado direito. Realizamos a ANOVA de três vias em todos os resultados obtidos, no entanto, em nenhum dado obtivemos efeito lado, por isso passamos a análise para uma ANOVA de duas vias comparando grupo e idade seguido de Newman-Keuls (significância aceita para $p \leq 0.05$).

RESULTADOS

1. Densidade numérica da MePD

A figura 6 mostra a densidade numérica (número de neurônios por mm^3) na MePD. A ANOVA de 2 vias não apresentou efeito idade [$F(1,20)=0,16$]. No entanto, houve um efeito grupo [$F(1,20)=57,36$ $P<0,05$], como também interação grupo X idade [$F(1,20)=6,22$ $P<0,05$]. A densidade numérica é menor em ratas manipuladas tanto aos 11 quanto aos 90 dias quando comparadas às ratas do grupo não-manipulado. A densidade numérica da MePD nas ratas não-manipuladas aos 11 dias é significativamente maior do que aos 90 dias. No entanto, no grupo manipulado, não se observou uma variação na densidade numérica da MePD nas diferentes idades.

1.1 Volume da MePD

A ANOVA de 2 vias não apresentou efeito na interação grupo X idade [$F(1,20)=0,23$], nem efeito idade [$F(1,20)=0,58$]. Porém, observou-se um efeito grupo [$F(1,20)= 13,23$ $P<0,05$], em que o volume do grupo manipulado é significativamente menor do que o não-manipulado (Figura 7).

1.2 Número total de neurônios da MePD

A ANOVA de 2 vias não apresentou efeito idade [$F(1,20)=1,03$]. Porém, observou-se um efeito grupo [$F(1,20)=41,01$ $P<0,05$], em que o número total de neurônios do grupo manipulado é significativamente menor do que o não-manipulado.

A ANOVA não apresentou uma interação grupo X idade [$F(1,20)=3,47$ $P=0,07$]. No entanto, o $p=0,07$ mostrou-se próximo à significância (Figura 8).

1.3 Diâmetro do soma de neurônios da MePD

A ANOVA de 2 vias não apresentou efeito na interação grupo X idade [$F(1,20)=1,40$], nem efeito idade [$F(1,20)=0,63$]. Porém, observou-se um efeito grupo [$F(1,20)=5,37$ $P<0,05$], em que o diâmetro do soma dos neurônios do grupo manipulado é significativamente menor do que o não-manipulado (Tabela 1).

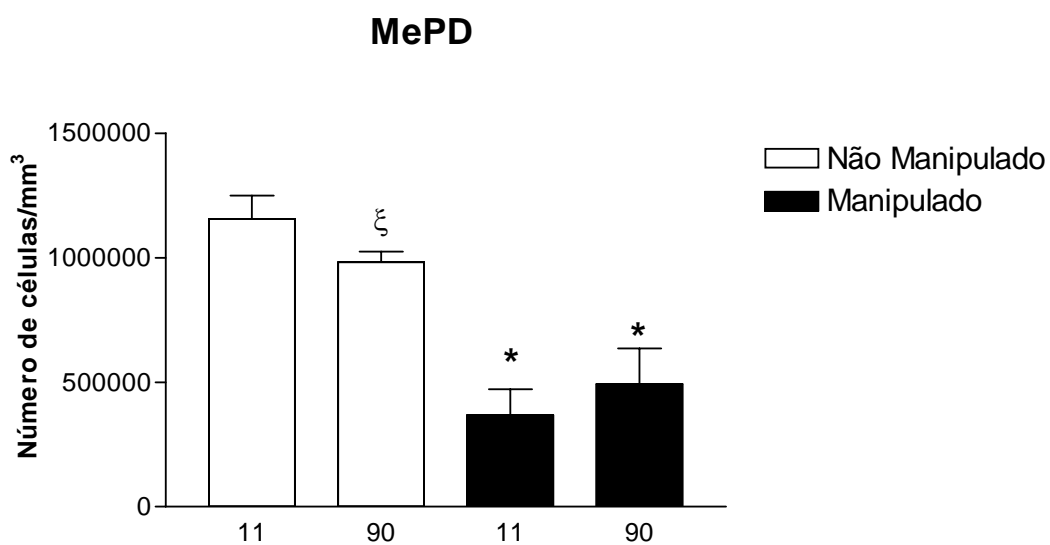


Figura 6: O efeito da manipulação neonatal na densidade numérica (número de neurônios por mm^3) de neurônios da amígdala medial póstero-dorsal (MePD) de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade. Foram utilizados um $n=6$ animais por grupo. A densidade numérica é expressa como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.

ξ = Diferença quanto à idade dentro do mesmo grupo.

* = Diferença quanto ao grupo na mesma idade.

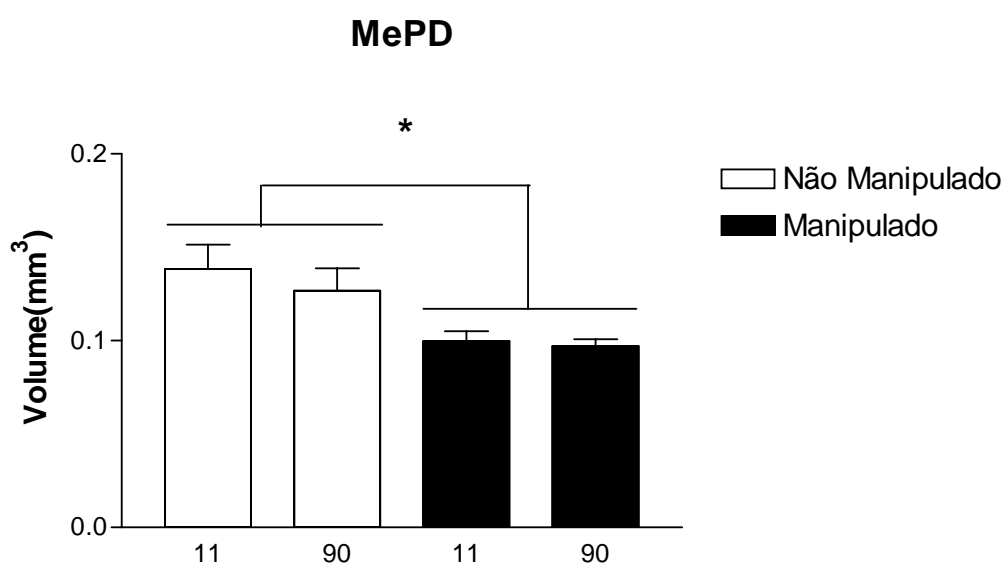


Figura 7: O efeito da manipulação neonatal no volume da amígdala medial pósterodorsal (MePD) de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade. Foram utilizados um n=6 animais por grupo. O volume é expresso como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.

* Representa diferença quanto ao efeito principal grupo (manipulado e não-manipulado).

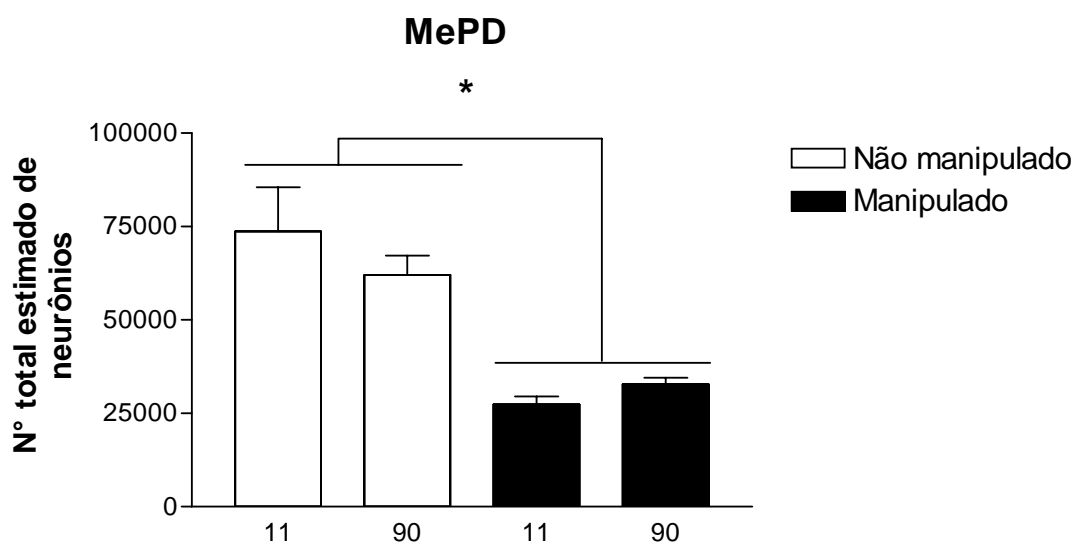


Figura 8: O efeito da manipulação neonatal no número total estimado de neurônios da amígdala medial pósterio-dorsal (MePD) de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade. Foram utilizados um n=6 animais por grupo. O número total de neurônios é expresso como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.

* Representa diferença quanto ao efeito principal grupo (manipulado e não-manipulado)

	11 DIAS	90 DIAS
MANIPULADO	8,14±0,03	8,16±0,05
NÃO-MANIPULADO	8,36±0,06	8,23±0,08

Tabela 1: Efeito da manipulação neonatal no diâmetro em micrômetros(μm) do soma de neurônios da amígdala medial pósterio-dorsal (MePD) de fêmeas aos 11 e 90 dias de idade. Foram utilizados um n=6 animais por grupo. Observou-se um efeito grupo onde o diâmetro do soma dos neurônios do grupo manipulado é significativamente menor do que o não-manipulado.

2. Densidade numérica do AVPV

A figura 9 mostra a densidade numérica (número de neurônios por mm^3) no AVPV. A ANOVA de 2 vias não apresentou efeito na interação grupo X idade [F(1,20)=0,39], nem efeito idade [F(1,20)=3,56]. Porém, observou-se um efeito grupo [F(1,20)=17,27 $P<0,05$], em que a densidade numérica de neurônios do grupo manipulado é significativamente menor do que o não-manipulado.

2.1 Volume do núcleo AVPV

A ANOVA de 2 vias não apresentou efeito na interação grupo X idade [F(1,20)=1,25]. Porém, observou-se um efeito grupo [F(1,20)=22,05 $P<0,05$], em que o volume do núcleo do grupo manipulado é significativamente menor do que o não-manipulado. Também houve um efeito idade [F(1,20)=8,45 $P<0,05$], em que o volume do núcleo aos 90 dias é menor quando comparado com animais de 11 dias de idade, independente do grupo (Figura 10).

2.2 Número total estimado de neurônios do AVPV

A ANOVA de 2 vias não apresentou efeito na interação grupo X idade [F(1,20)=0,04], nem efeito idade [F(1,20)=3,06]. Porém, observou-se um efeito grupo [F(1,20)=32,42 $P<0,05$] em que o número total estimado de neurônios do núcleo

periventricular anteroventral do grupo manipulado é significativamente menor do que o não-manipulado (Figura 11).

2.3 Diâmetro do soma de neurônios da AVPV

A ANOVA de 2 vias não apresentou interação grupo X idade [$F(1,20)=0,00$], nem efeito idade [$F(1,20)=1,54$]. Porém, aproximou-se de um efeito grupo [$F(1,20)=3,66$ $P=0,06$], em que o diâmetro do soma dos neurônios do grupo manipulado seria significativamente menor do que o não-manipulado (Tabela 2).

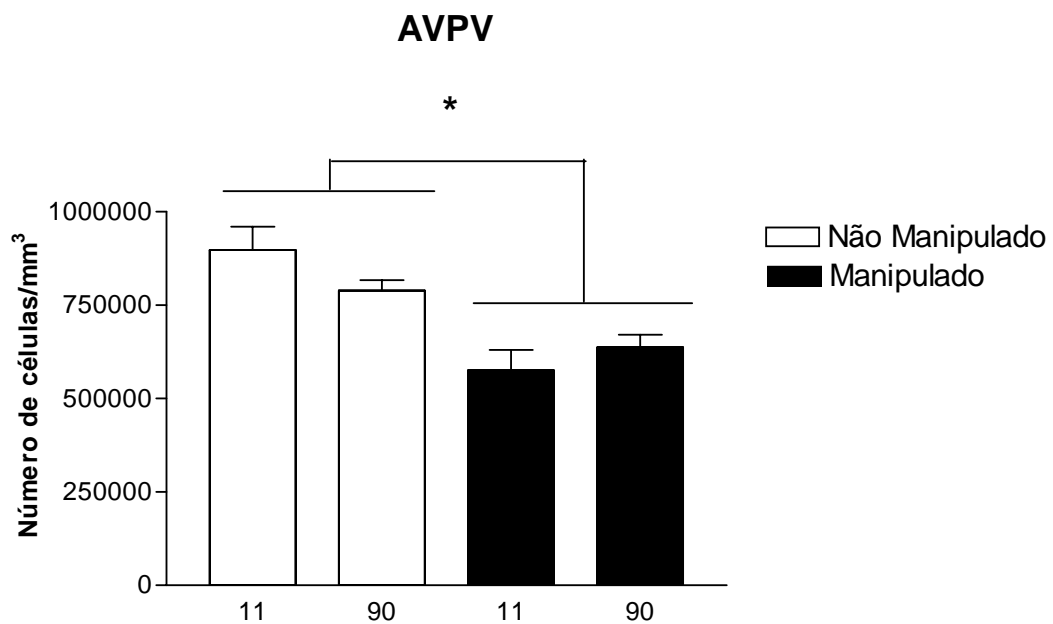


Figura 9: O efeito da manipulação neonatal na densidade numérica (número de neurônios por mm³) do núcleo periventricular anteroventral (AVPV) de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade. Foram utilizados um n=6 animais por grupo. A densidade numérica é expressa como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.

* Representa diferença quanto ao efeito principal grupo (manipulado e não-manipulado)

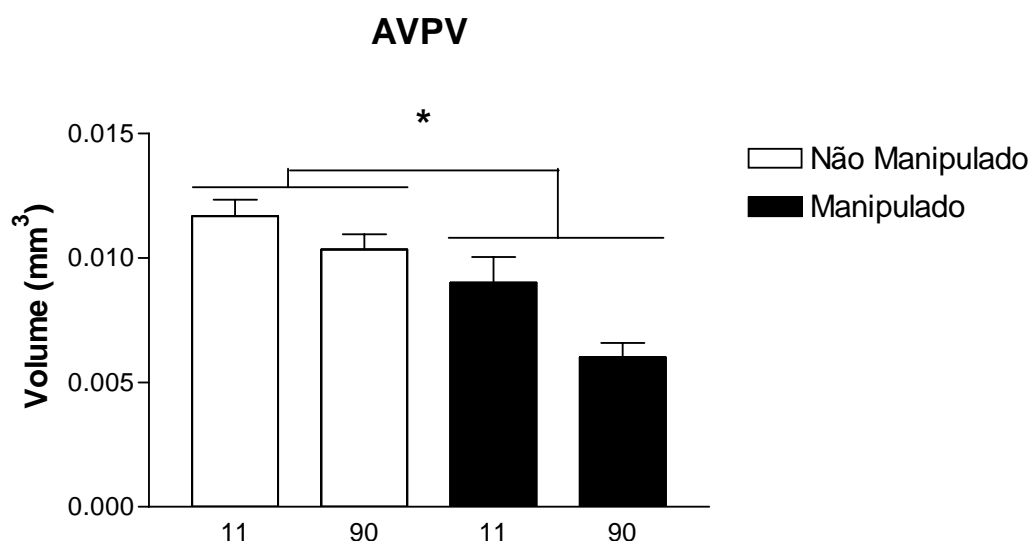


Figura 10: O efeito da manipulação neonatal no volume do periventricular anteroventral (AVPV), de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade. Foram utilizados um n=6 animais por grupo. O volume é expressa como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.

* Representa diferença quanto ao efeito principal grupo (manipulado e não-manipulado).

Também há uma diferença significativa no efeito idade (11 e 90 dias).

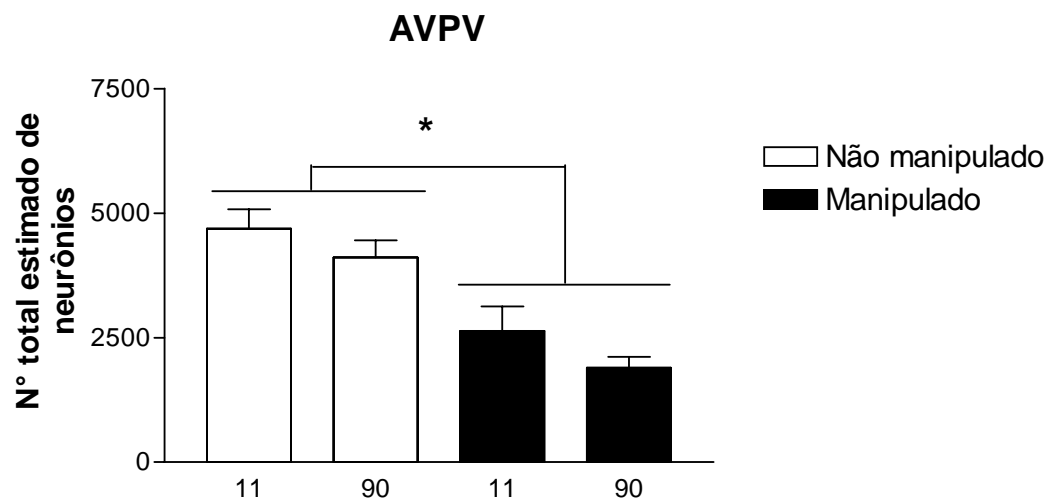


Figura 11: O efeito da manipulação neonatal no número total estimado de neurônios do núcleo periventricular anteroventral (AVPV) de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade.

Foram utilizados um n=6 animais por grupo. O número total de neurônios é expresso como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.

* Representa diferença quanto ao efeito principal grupo (manipulado e não-manipulado)

	11 DIAS	90 DIAS
MANIPULADO	6,74±0,11	7,03±0,10
NÃO-MANIPULADO	7,19±0,32	7,47±0,28

Tabela 2: Efeito da manipulação neonatal no diâmetro em micrômetros(μm) do soma de neurônios do núcleo periventricular anteroventral (AVPV) de fêmeas aos 11 e 90 dias de idade. Foram utilizados um n=6 animais por grupo. O efeito grupo aproximou-se da significância, onde o diâmetro do soma dos neurônios do grupo manipulado seria significativamente menor do que o não-manipulado.

3. Densidade de células da MPOA

A figura 12 mostra a densidade numérica (número de neurônios por mm^2) na MPOA. ANOVA de 2 vias, que não apresentou interação grupo e idade [$F(1,20)=0,79$]. Porém, observou-se um efeito grupo [$F(1,20)=77,31$ $P<0,05$], em que a densidade numérica de neurônios do grupo manipulado é significativamente menor do que o não-manipulado.

Também houve um efeito idade [$F(1,20)=7,30$ $P<0,05$], em que a densidade numérica de neurônios aos 11 dias é menor quando comparado com animais de 90 dias de idade, independente do grupo.

3.1 Diâmetro do soma de neurônios da MPOA

ANOVA de 2 vias não apresentou efeito na interação grupo X idade [$F(1,20)=0,20$], nem efeito idade [$F(1,20)=0,71$]. Porém, observou-se um efeito grupo [$F(1,20)=21,54$, $P<0,05$], em que o diâmetro do soma dos neurônios do grupo manipulado é significativamente menor do que o não-manipulado (Tabela 3).

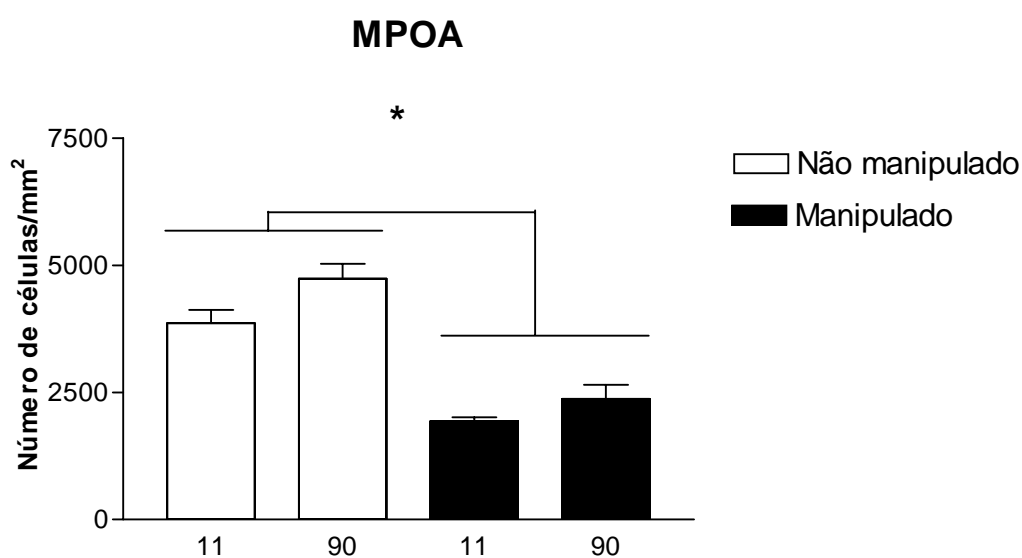


Figura 12: O efeito da manipulação neonatal na densidade numérica da área pré-óptica medial (MPOA) de fêmeas aos 11 dias e 90 dias de idade. Foram utilizados um n=6 animais por grupo. O número total de neurônios é expresso como médias ($\pm EPM$). As fêmeas controles permaneciam sem ser tocadas durante o período neonatal, e as manipuladas eram gentilmente manipuladas por 1 minuto do primeiro ao décimo dia depois do nascimento.

* Representa diferença quanto ao efeito principal grupo (manipulado e não-manipulado). Também há uma diferença significativa no efeito idade (11 e 90 dias).

	11 DIAS	90 DIAS
MANIPULADO	7,17±0,09	7,39±0,11
NÃO-MANIPULADO	8,04±0,24	8,11±0,19

Tabela 3: Efeito da manipulação neonatal no diâmetro em micrômetros (μm) do soma de neurônios da área pré-óptica-medial (MPOA) de fêmeas aos 11 e 90 dias de idade. Foram utilizados um n=6 animais por grupo. Observou-se um efeito grupo onde o diâmetro do soma dos neurônios do grupo manipulado é significativamente menor do que o não-manipulado.

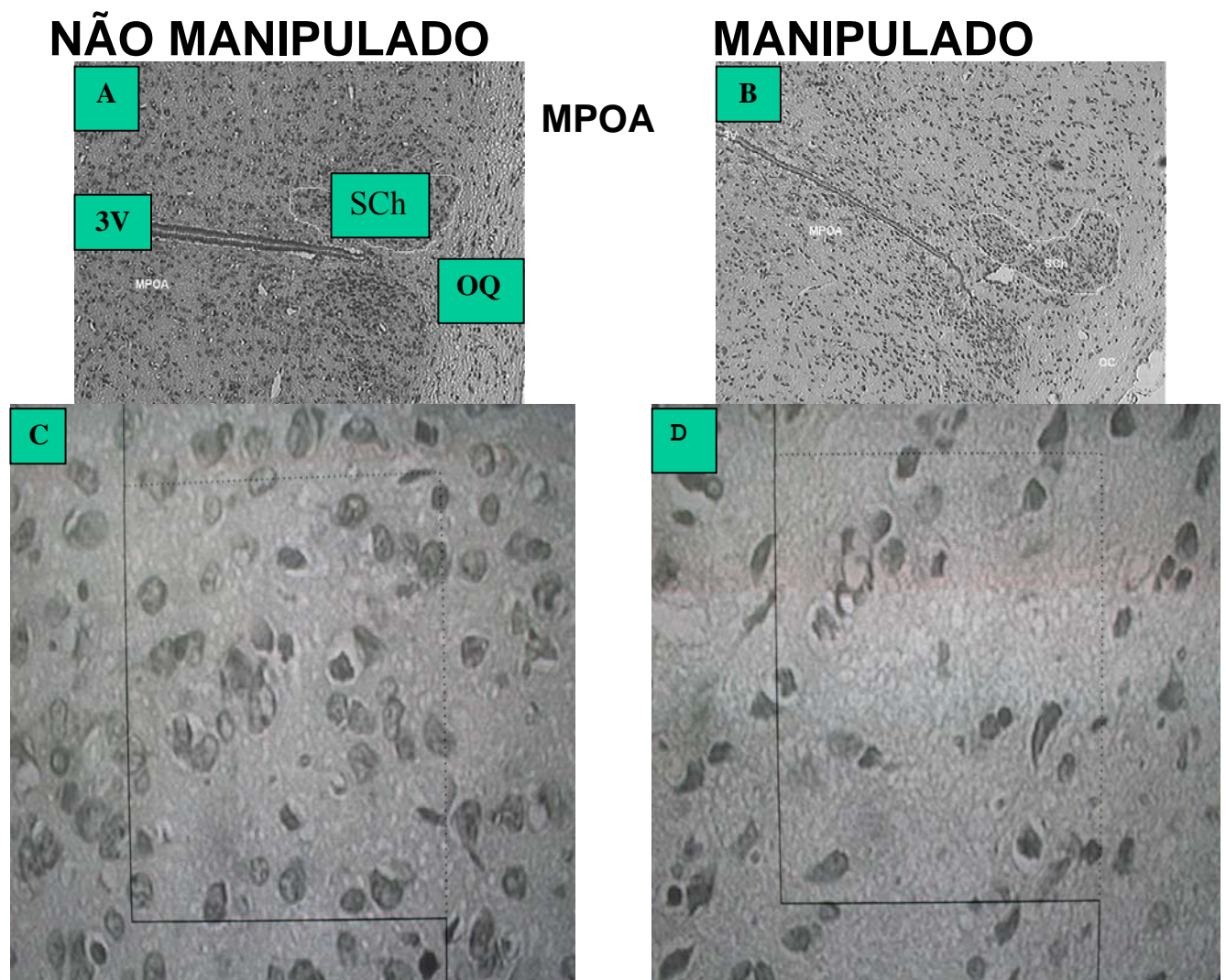


Figura 13: Fotomicrografia de secção da MPOA em um aumento de 10X (A,B) e 40X (C,D). O quiasma óptico(OQ), o núcleo supraquiasmático (SCh) e o terceiro ventrículo (3V) foram utilizados como pontos de referência para a delimitação da área. Em C e D são mostradas as linhas de visualizar as linhas de inclusão e exclusão

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a manipulação neonatal realizada diariamente, durante os primeiros 10 dias de vida, induz à redução da densidade de células e diâmetro do soma neuronal na MPOA. Na MePD e no AVPV ocorre diminuição da densidade e número total de neurônios e redução do volume dos núcleos.

Verificamos que a MPOA apresentou uma redução de 50% na densidade de células de ratas de 11 dias de idade e 50% em ratas de 90 dias, em relação ao grupo não manipulado. A área pré-óptica é uma região sexualmente dimórfica e a morte celular no cérebro de fêmeas pode ser um importante componente relacionado ao estabelecimento do dimorfismo na MPOA (McCarthy et al., 1997). Evidências indicam que na MPOA o número de sinapses (Langub et al., 1994) e a expressão de RNAm do LHRH (Zoeller & Young, 1988) variam conforme a fase do ciclo estral, de forma dependente dos esteróides gonadais. Cabe salientar que as fêmeas adultas, utilizadas em nosso trabalho, foram estudadas na fase de diestro, por esta fase não apresentar diferença significativa dos níveis de estradiol e progesterona entre ratas manipuladas e não-manipuladas (Gomes et al., 2005).

Aparentemente, os efeitos primários da manipulação neonatal sobre no número de células ocorrem durante o período neonatal, pois a redução do número de células é constatada logo após o período de manipulação. Por outro lado, número de neurônios na MPOA de fêmeas apresenta um aumento significativo na densidade numérica dos 11 para os 90 dias de idade tanto no grupo controle quanto no manipulado. Essa proliferação que ocorre na MPOA do período neonatal até a vida adulta é pouco afetada

pelo procedimento da manipulação neonatal, por isso podemos sugerir que a perda celular ocorrida na MPOA seja devida a morte celular e não por supressão da neurogênese.

A redução da densidade numérica de neurônios na MPOA, em ratas manipuladas, verificada em nosso estudo, juntamente com resultados obtidos pelo nosso grupo, de que a manipulação neonatal reduz o número de células do LC (Lucion et al, 2003) contribuem para explicar a redução do comportamento sexual (Padoin et al., 2001) da ovulação (Gomes et al., 1999), e do pico de LH (Gomes et al., 2005).

É necessário ressaltar que foi analisado o diâmetro do soma dos neurônios da MPOA, para avaliar se ocorre um aumento compensatório no soma dos neurônios dessa área, que poderia resultar em um aumento na excitabilidade. Porém, nossos dados mostraram que o soma dos neurônios do grupo manipulado é significativamente menor do que o não manipulado. Assim, há diminuição do número e tamanho das células.

A regulação da secreção fásica do LHRH em ratas, tem a participação efetiva do núcleo AVPV (Davis et al., 1996). A formação de neurônios neste núcleo começa no dia 13 e termina no dia 18 de gestação em ratas (Nishizuka et al., 1993). Mesmo no período pré-natal, é possível encontrar as características da natureza sexualmente dimórfica do AVPV (Arai et al., 1993). Fêmeas tem uma incidência de células picnóticas, que caracteriza a apoptose, durante o período neonatal, porém no dia 13 pós-natal essas ratas não apresentam mais células picnóticas (Murakami & Arai., 1989; Arai et al., 1994). Há estudos que sugerem que os andrógenos facilitam a apoptose no desenvolvimento do AVPV (Nishizuka et al., 1993). Por exemplo, fêmeas Wistar tratadas com testosterona

apresentam duas vezes mais células picnóticas, no sétimo dia quando comparadas com as controles (Murakami & Arai., 1989; Arai et al., 1994). Outros estudos afirmam que o volume do AVPV depende da biossíntese de estrógeno *in situ* (Lephart et al., 2001).

Podemos afirmar que a manipulação neonatal reduz a densidade numérica, volume e número total de neurônios no AVPV, e essa redução é vista aos 11 dias e mantida aos 90 dias de idade, possivelmente por morte celular e ou proliferação, mas os mecanismos exatos que produzem essa diferença no número de células ainda precisam ser elucidado.

Em fêmeas Wistar, não há dados até o momento à respeito da densidade numérica e número total de neurônios do AVPV. Portanto, os nossos resultados são inéditos e contribuem para a elucidação da morfologia desse núcleo. No entanto, existem trabalhos que avaliaram o volume do AVPV e esses mostraram variação nos seus resultados de até 46% (Davis et al., 1996; Rhess et al., 1999; Bloch et al., 1988). Em fêmeas Sprague-Dawley (Prince et al., 1998), o volume é de $15 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ valor similar ao encontrado neste trabalho. Bleir (1982) relata que o AVPV é mais denso em fêmeas do que em machos, mas para esse achado eles realizaram uma comparação visual, em cortes histológicos de fêmeas e machos, portanto não apresentaram valores numéricos da densidade.

Outro núcleo estudado foi a MePD, os hormônios gonadais modulam a morfologia e a atividade da MePD (Gomes & Newman, 1991; Malsbury & McKay, 1994; Gréco et al., 1998) e esse subnúcleo tem sido identificado como o principal subnúcleo sexualmente dimórfico da amígdala medial (Hines et al., 1992; Kerchner et

al., 1995). A MePD tem um maior volume em machos do que em fêmeas (Cooke et al., 1999). E o volume deste núcleo, em ratos adultos é sensível aos níveis circulantes de andrógenos (Cooke et al., 2000). A castração em machos adultos aproxima o volume da MePD ao de fêmeas depois de 30 dias, portanto a castração em machos adultos diminui o volume da MePD e o tratamento com andrógenos aumenta o volume da MePD em fêmeas adultas (Cooke & Wolley, 2005).

Na MePD, as alterações da manipulação neonatal sobre os parâmetros avaliados em nosso estudo, foram mais marcantes que nos outros núcleos analisados, por exemplo: a redução na densidade numérica foi de 68% em ratas de 11 dias e de 50% em ratas aos 90 dias de idade, quando comparada ao grupo não manipulado; o número total de neurônios apresentou 63% de redução em ratas de 11 dias, de 47% em ratas aos 90 dias de idade quando comparada ao grupo não manipulado.

O número total estimado de neurônios em ratas de 90 dias de idade são similares ao estudos Cooke & Wolley (2005) em fêmeas Sprague Dawley de 25-29 dias de idade. No presente estudo, o mesmo procedimento de contagem foi utilizado nos dois grupos M e NM, portanto, a comparação é apropriada para estimar o efeito da manipulação neonatal no desenvolvimento dos núcleos estudados.

Neste trabalho, as medidas morfológicas foram realizadas em ambos os hemisfério, no entanto em nenhum dos resultados houve efeito na lateralidade. Apesar de existirem evidências crescentes que sugerem que a assimetria do cérebro é onipresente em não humanos e que algumas dessas assimetrias são diferentes em machos e fêmeas, e influenciadas por níveis circulantes de hormônios, não encontramos

diferenças significativas na lateralidade dos núcleos analisados. Tendo em vista os resultados obtidos, os dados foram apresentados sem a variável lado. (Diamond, 1985., Lent & Schmidt.; 1993., Stewart & Kolb, 1988).

Os resultados a respeito do volume da MePD, na literatura são muito variados, não havendo concordância entre eles. No entanto os nossos resultados são similares aos estudos de Hines et al., 1992, mas diferem do trabalho de Cooke et al., 1999; Cooke et al., 2005; Kerchmer et al., 1995.

Todos os núcleos estudados nesse trabalho estão relacionados com a reprodução. E está bem estabelecido que, em ratas, a indução da ovulação requer a liberação de gonadotrofinas e prolactina no período pré-ovulatório que depende de uma retroalimentação positiva exercida por estrógenos (Freeman, 1994). No entanto, o controle hormonal por retroalimentação positiva das gonadotrofinas sobre a secreção do LHRH parece não ocorrer diretamente por ação dos esteróides gonadais nos neurônios LHRH porque esses não apresentam receptor para o estradiol, especialmente aqueles localizados na MPOA (Simerly et al., 1998; Petersen et al., 2003). Por outro lado, alta densidade de células imunorreativas a estrógeno e aos seus receptores α e β foram encontradas no AVPV e na MePD (Orikasa et al., 2003; Dominguez et al., 2001).

O AVPV representa uma parte única do circuito sexualmente dimórfico (Simerly et al., 1998); ele tem um papel essencial na retroalimentação positiva das gonadotrofinas, o que é comprovado por meio de lesões específicas neste núcleo, que interferem na secreção fásica do LHRH (Rhees et al., 1999). Por isso, acreditamos que a

redução do número de neurônios no AVPV e MePD contribui para a redução do pico pré-ovulatório de LH observado em ratas manipuladas (Gomes et al., 2005).

Trabalhos prévios mostraram que o AVPV tem alta densidade de projeções de neurônios de várias áreas do SNC, como áreas hipotalâmicas e MePD (Simerly et al., 1998; Dominguez et al, 2001). Além disso, neurônios do AVPV dirigem-se diretamente para neurônios LHRH na região pré-óptica e neurônios dopaminérgicos do núcleo arqueado; essas projeções são mais fortes e mais densas em fêmeas do que em machos (Simerly et al., 1998)

A organização das projeções do AVPV em ratas sugere que a população dimórfica sexualmente de neurônios desse núcleo pode influenciar a secreção do LH e prolactina através de projeções diretas de neurônios LHRH e neurônios dopaminérgicos. As projeções da MePD para o AVPV poderiam estar regulando o pico de LHRH que é crítico para o ciclo reprodutivo (Simerly et al., 1998). Evidências sugerem que neurônios que expressam colecistocinina e a substância P da MePD e projetam-se para o hipotálamo variam sistematicamente durante o ciclo estral (Canteras, 1995).

Os diâmetros dos neurônios do AVPV e da MePD também foram verificados em nosso estudo. O tamanho do soma do neurônio é um fator determinante sobre muitas propriedades fisiológicas dos neurônios (Alexander et al., 2001). A MePD, no grupo manipulado, teve uma redução das dimensões lineares do soma. Já o AVPV, no grupo manipulado, apresentou uma tendência à redução das dimensões lineares do soma. Esses resultados estão de acordo com a provável redução da excitabilidade dos neurônios da MePD sobre o AVPV, deste sobre neurônios LHRH, responsáveis pelo pico do LHRH.

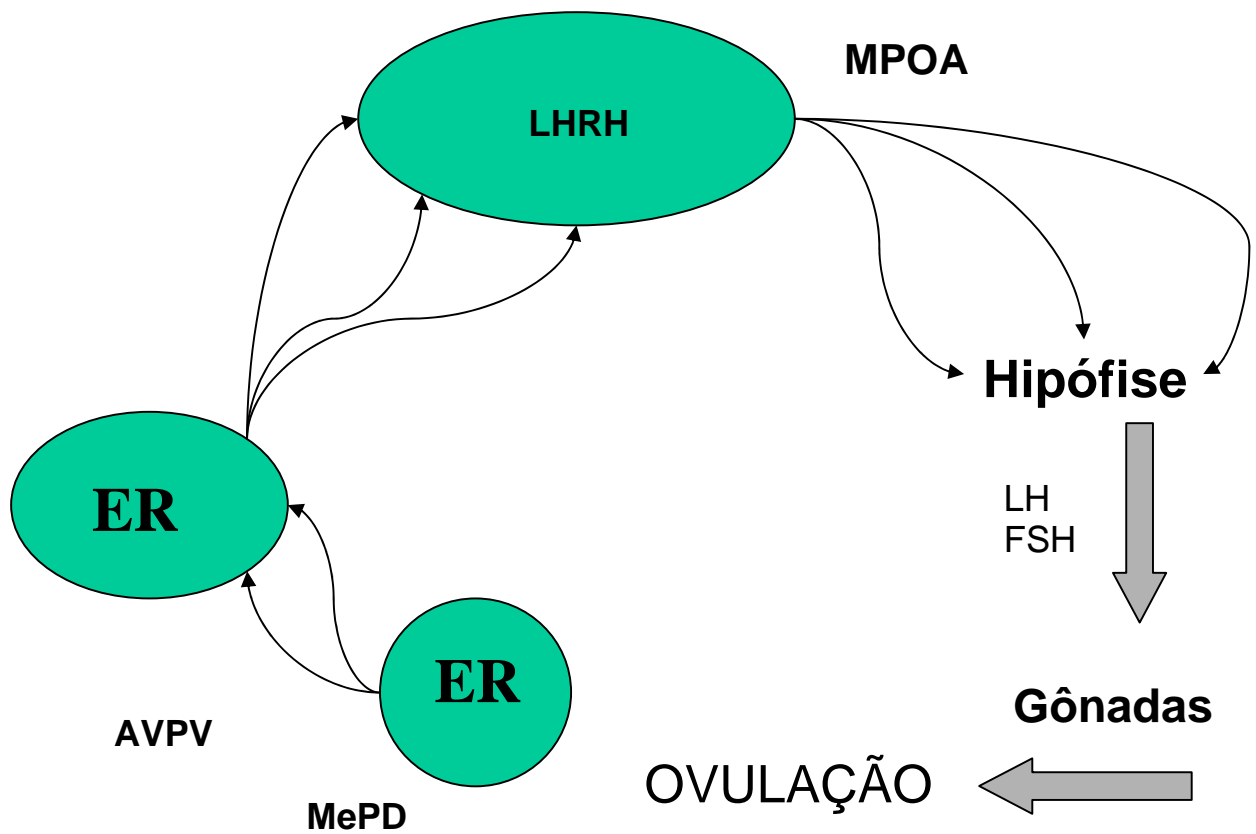


Figura 14: Projeções da amígdala medial pósterio-dorsal para o núcleo periventricular anteroventral (duas áreas que apresentam receptor de estradiol ER= receptor de estradiol) e desta para neurônios LHRH da MPOA.

A manipulação neonatal induz à redução significativa na densidade de neurônios, diâmetro do soma neuronal na MPOA, e diminuição da densidade numérica, volume, e número total de neurônios na MePD e no AVPV, em ratas fêmeas. Também ocorreu uma redução no diâmetro do soma neuronal na MePD e uma tendência a redução no diâmetro do soma neuronal do AVPV. Essas alterações morfológicas causadas nesses núcleos pela manipulação neonatal já podem ser observadas aos 11 dias de idade e se mantêm aos 90 dias de idade. No entanto, os mecanismos que levam a essas alterações morfológicas ainda precisam ser elucidados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILA, M. B.; & MANDARIN-DE-LACERDA, C. A. Numerical density of cardiac myocytes in aged rats fed a cholesterol-rich diet and a canola oil diet (n-3 fatty acid rich). *Virchows Arch*, v. 434, p. 451-454, 1999.

AHMED, II, NICHOLS, S. A.; SHRYNE, J. E. GORSKI, R. A. Effects of age and sex on the volume of the anteroventral periventricular nucleus of the rat brains. *Endocr Soc Abstr*, p. 72:385, 1990.

ALEXANDER, M. B.; ROSE, D. J.; STELLFLUG, N. J. FITZGERALD, A. J.; MOSS, E. G. Low-sexually performing rams but not male-oriented rams can be discriminated by cell size in the amygdala and preoptic area: a morphometric study. *Behavioral Brain Research*, v. 119, p. 15-21, 2001.

ALHEID, G.; DE OLMOS, J.; BELTRAMINO, C, A.; Amygdala and extended amygdala. In: *The rat nervous system* (Paxinos G, ed), p. 405-578, 1999.

ALHEID, G. F.; DE OLMOS, J. S.; BELTRAMINO, C, A.; Amygdala and extended amygdala. In: *PAXINOS, G. The rat nervous system*. San Diego, Academic Press., p. 495-598, 1995.

ANDERSON, R. H.; FLEMING, D. E.; RHEES, R. W.; KINGHORN, E. Relationships between sexual activity, plasma testosterone, and the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in prenatally stressed and non-stressed rats. *Brain Res.*, v. 370, p. 1-10, 1986.

ANSELMO-FRANCI, J. A.; FRANCI, C. R.; KRULICH, L.; ANTUNES-RODRIGUES.; McCANN, S. M.; Locus Coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Brain Research*, v. 767, p. 289-296, 1997.

ARAI, Y.; NISHIZUKA, M.; MURAKAMI, S.; MIYAKAWA, M.; MACHILDA, M.; TAKEUCHI, H.; SUMIDA, H.; Morphological correlates of neural plasticity to gonadal steroids: sexual differentiation of the preoptic area. In: HAUG, M.; WHALEN, R. E.; ARON, C.; OLSEN, K. L.; The development of sex differences and similarities in behavior. *Kluwer, Dordrecht*, p. 311-323, 1993.

ARAI, Y.; MURAKAMI, S.; NISHIZUKA, M. Androgen Enhances neuroanatomical degeneration preoptic area: apoptosis in the anteroventral periventricular nucleus (AVPVN-POA). *Hormones and Behavior* v. 28, p. 313-319, 1994.

ARMARIO, A.; LOPES-CALDERON, A.; JOLIN, T. BALASCH, J. Response of anterior pituitary hormones to chronic stress. The specificity of adaptation. *Neurosci Biobehav rev.*, v. 103, p. 245-250, 1986.

ARMSTRONG, D. T. Environmental stress and ovarian function. *Biol Reprod* 34: T1029-39, 1986.

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

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

BARRY, J.; HOFFMAN, G. E.; WRAY, S.; LHRH-containing systems. In Björklund, A.; Hönkfelt, T. (Eds) *Handbook of chemical Neuroanatomy*, v. 4, p.166-215, 1985.

BATERSON, P.; BARKER, D.; CLUTTON-BROCK, T.; DEB, D.; DUDINE, B.; FOLEY, R. A.; GLUCKAN, P.; GODFREY, K.; KIRKWOOD, T.; LAHR, M. M.; McNAMARA, J.; METCALFE, N.; MONAGHAN, P.; SPENCER, H. G.; SULTAN, S. E. Developmental plasticity and human health. (Hypothesis). *Nature* v. 430, p. 419-421, 2004.

BLEIR, R.; BYNE, W.; SIGGELKOW, I.; Cytoarchitectonic sexual dimorphisms of the medial preoptic and anterior hypothalamic areas in guinea pig, rat, hamster, and mouse. *J. Comp. Neurol.* v. 212, p. 118-130, 1982.

BLEIR, R.; COHN, P.; SIGGELKOW, I. R.; A cytoarchitectonic atlas of the hypothalamus and hypothalamic third ventricle of the rat. In "Handbook of the Hypothalamus", Vol. 1, "Anatomy of the Hypothalamus (P. J. Morgane and J. Panksepp, Eds.) p. 137-220. Dekker, New York, 1979.

BLOCH, G. J.; GORSKI, R. A. Estrogen/progesterone treatment in adulthood affects the size of several components of the medial preoptic area in the male rat. *J Comp Neurol*, v. 275, p. 613-622, 1988.

BLOCH, G. J.; KURTH, S. M.; AKESON, T. E.; MICVYCH, P. E. Estrogen-concentrating cells within cell groups of the medial preoptic area: sex differences and colocalization with galanin-immunoreactive cells. *Brain Research*, v. 595, p. 301-308, 1992.

BHATNGAR, S.; MEANEY, M. J. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non-handled rats. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 7, p. 97-108, 1995.

BOGDANOVE, M. E. The role of the brain in the regulation of pituitary gonadotropin secretion. *Vitam Horm*, v. 22, p. 250-260, 1964.

BURITY, C. H. F.; MANDARIN-DE-LACERDA, C. A.; PISSINATTI, A. Stereology of the myocardium in two species of *Callithrix* (Callitrichidae, primates). *Anat Anz*, v. 178, p. 437-441, 1996.

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. *J Comp Neurol*, v. 360, p. 213-245, 1995.

CANTERAS, N. S. Sistema límbico. In: *Fisiologia*. Ed. AIRES, M.M. *et al.* Guanabara Koogan, RJ. 2d ed., v. 30, p. 218-239, 1999.

CAVALIERI. B. *Geometri Indivisibilibus Continuum*. Typis Clemetis Feronji, Boni. Reprinted (1966) as *Geometria degli Indivisibili*. Unione Tipografico-Editrice Torinese, Torino (1635)

CARATY, A.; MILLER, D.W.; DELALEU, B.; MARTIN, G.B Stimulation of LH secretion in sheep by central administration of corticotrophin-releasing hormone. *J Reprod. Fertil.* v. 111, n. 2, p. 249-257, 1997.

CHARCHAT, H., PADOIN, M.J.; LUCION, A. B. Efeito do estresse crônico neonatal sobre comportamentos de ratos adultos no campo aberto com o gato. X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Resumos...p. 46, 1995.

CHROUSUS, G. P.; & GOLD, P. W. The concepts of stress system disorders- overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*, v. 67, p. 1244-1252, 1992.

COOKE, M. B.; TABIBNIA, G.; BREEDLOVE, M. S. Abrain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgen. *Neurobiology*, v. 13, p. 7538-7540, 1999.

COOKE, M. B.; CHOWANADISAI, W.; BREEDLOVE, M. S. Post-weaning social isolation of male rats reduces the voluem of medial amygdala and leads to deficits in adult sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, v.117, p. 107-113, 2000.

COOKE, M. B.; BREEDLOVE, M. S.; JORDAN, L. C. Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. *Hormones and Behavior*, v. 43, p336-346, 2003.

COOKE, M. B.; & WOOLLEY, S. C. Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *The Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 46, p.10759-10767, 2005.

COOLEN, A. C.; PETERS, H. J. P. W.; VEENING, J. G. Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements os sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res.*, v. 738, p. 67-82, 1996.

COOLEN, A. C.; & KANAZAWA, I. Distribuion of FOS immunoreactivity following mating versus anogenital investigation the male rat brain. *Neuroscience*, v. 77, p. 1151-1161, 1997.

CRUZ-ORIVE, L.M. Particle number can be estimated using a disector of unknown thickness: the selector. *J. Microsc.* v. 125, p. 315-333, 1987.

DAVIS, C. E.; SHRYNE, E. J.; GORSKI, A. R. Structural sexual dimosphisms in the anteroventral periventricular nucleus of the rat hypothalamus are sensitive to gonadal steroids perinatally, but develop peripubertally. *Neuroendocrinology* v. 63, p. 142-148, 1996.

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

De LA IGLESIAS, H. O.; BLAUSTEIN, J. D.; BITTMAN, E. L. Oestrogen receptor alpha- immunoreactive neurons project to the suprachiasmatic nucleus of the female Sirian hamster. *J Neuroendocrinol*, v. 11, p. 481-490, 1999.

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

De OLMOS, J.; BELTRAMINO, C.; ALHEID, G. Amygdala and Extended Amygdala of the rat: a citoarchitectonical, fibroarchitectonical, chemoarchitectonical survey. In: The rat nervous system. Ed. PAXINOS, G., Elsevier Academic Presss, London.,3d ed., v. 19, p. 509-603, 2004.

DIAMOND, M. C. Rat forebrain morphology: right-left, male-female; young-old; enriched-impooverish. In Cerebral Lateralization in Nonhuman Speceis (edited by Glick, S. D.) New York: Academis Press, p. 73-88, 1985.

DOMINGEZ, J.; RIOLO, V. J.; XU, Z.; HULL, M. E. Regulation by the medial amygdala of copulation and medial preoptic dopamine release. The Journal of Neuroscience, v. 21, n. 1, p. 349-355, 2001.

ERSKINE, M. S. Mating-induced increases in fos protein in preoptic area and medial anygdala of cycling female rats. Brain Res. Bull., v. 32, p. 447-451, 1993.

EVERRIT, B. J.; HÖKFELT, T. The coexixtence of neuropeptide Y with other peptides and amines in the central nervous system. In: Mutt V, Fuxe K, Hökfelt T, Lundberg J. eds Neuropeptide Y, New York, p. 61-72, 1989.

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

FLEMING, D. E.; KINGORN, E. W.; RHESS, R. H.; SMYTHE, E. Biological predictors of masculine sexual behavior in prenatally stressed and nonstressed rats. *Bull. Psychon. Soc.*, v, 30, p.513-514, 1992.

FRANCIS, D.; DIORIO, J.; LAPLANTE, P., WEAVER, S.; MEANEY, M.J. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 794, p. 136-152. 1996.

FREEMAN, M. E.; The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In Kobil, E. & Neill, J. D.(Eds), *The Phisyology of Reproduction* Raven Press, New York, p. 613-658, 1994.

FRANTZ, P. J., GOMES, C.M. & LUCION, A.B. Efeito da manipulação neonatal sobre o comportamento sexual de ratas. *X Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Resumos...* p. 225, 1998.

FOOTE, S. L.; BLOOM, E. F.; ASTON-JONES, G. Nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical and phisiological specificity, *Phisiol. Rev.*, v. 63, p. 844-914, 1983.

GOMES, C. M.; FRANTZ P.J, C.; SANVITTO, G, L.; ANSELMO-FRANCI, J, A.; FRANCI, C, R.; LUCION, A, B.; Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Brasilian Journal of Medical and Biology Research*, v. 32, p. 1239-1242, 1999.

GOMES, C. M.; Efeito da manipulação neonatal sobre o sistema reprodutor feminino. Dissertação de Mestrado (Neurociências), Universidade Federal do Rio grande do Sul, 2001

GOMES, C. M.; RAINEKI, C.; RAMOS DE PAULA, P.; ANSELMO-FRANCI, J, A.; FRANCI, C, R.; LUCION, A, B.; SANVITTO, G, L Neonatal handling and reproductive in female rats. *Journal of Endocrinology*, v. 184, p. 435-445, 2005.

GOMES, D. M.; & NEWMAN, S. W.; Medial nucleus of the amygdala in the adult Syrian hamster: A quantitative golgi analis of gonadal hormone regulation of neuronal morphology. *The Anatomic Record*, v. 231, p. 498-509,1991.

GONZÁLES, A.S.; ECHANDÍA, E.L.R.; CABRERA, R.; FÓSCOLO, M.R Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adults rats: II. Effects on estrous cycle in females. *Physiology & Behavior*, v. 86, n. 3, p. 591-595, 1994.

GRINO, M.; YOUNG, W. S. & BURGUNDER, J. M. Ontogeny of expression of the corticotropin-releasing factor gene in the hypothalamic paraventricular nucleus and the proopiomelanocortin gene in the rat pituitary. *Endocrinology*, v. 124, p. 60-88, 1989

GRÉCO, B. EDWARDS, D. A. MICHAEL, R. P. CLANCY, N. A. Androgen receptors and estrogen receptors are colocalized in male rat hypothalamic and limbic neurons that express Fos immunoreactivity induced by mating. *Neuroendocrinology*, v. 67, p18-28, 1998.

GRZANNA, R.; MOLLIVER, M, E; The Locus Coeruleus in the rat: An immunocytochemical delineation. *Neuroscience*, v. 5, p. 21-40, 1980.

GU, G. & SWANSON, L. W. Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *J Comp Neurol*, v. 384, p. 142-164, 1997.

GU, G.; VSROQUEAUX, F.; SIMERLY, R. B. Hormonal regulation of glutamate receptor gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Neurosci*, v. 19, p.3213-22, 1999.

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

GUILLET, R.; SAFFRAN, M.; MICHAELSON. Pituitary-adrenal response in neonatal rats. *Endocrinology*, v. 106, p 991-994, 1980.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B. The efficiency of sistematic samplig in stereology and its prediction. *J. Microsc.* v. 147, p. 229-263,1987.

GUNDERSEN, H. J.; BAGGER, P.; BENDTSEN, T. F. EVANS, S. M.; KOSBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, JR.; PAKKENBERG, B. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological reseach and diagnosis. *Apmis*, v. 96, p. 857-881, 1988.

HALAZ, B. & GORSKI, R. A. Gonadotrophic hormone secretion in female rats after partial or total interruption of neural afferents to the medial basal hypothalamus. *Endocrinology*, v. 80, p.608-622, 1967.

HELENA, V. V. C.; FRANCI, R. C., ANSELMO-FRANCI, A. J. Luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion is under locus coeruleus control in female rats. *Brain Research*, v. 955, p. 245-252, 2002.

HERBISON, A, E. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin releasing hormone requirementes for ovulation in the rat. *Endocrine Reviews.*, v. 19, p. 302-330, 1998.

HERBISON, A. & THEODOSIS, D. T. Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxy-lase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience*, v. 50, p. 283-298, 1992.

HINES, M.; ALLEN, S. L.; GORSKI, A. R. 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.

HOWARD, C. V. & REED, M.G. *Unbiased Stereology*, Bios Scientific Publishers, p. 41-106, 1998.

HRABOVSKY, E.; STEINHAUSER, A.; BARABÁS, K.; SHUGHURE, J. P.; PETERSEN, S, L. MERCHENTHALER.; LIPOSITS. Estrogen receptor- β immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*, v. 142, p. 3261-3264, 2001.

HSU, K. H. & PENG, T. M. Hypothalamic neuron number of old female rats. *Gerontology*, v. 24, p. 434-440, 1978.

HUMM, J. L.; LAMBERT, K. G.; KINSLEY, C. H. Paucity of c-fos expression in the medial preoptic area of prenatally stressed male rats following exposure to sexually receptive females. *Brain Res. Bull.*, v. 37, p. 363-368, 1995.

ISHIKAWA, J.; Luteinizing hormone requirements for ovulation. *Biology of Reproduction*, v. 46, p. 1144-1150, 1992.

ITO, S.; MURAKAMI, K.; ARAI, Y.; Prenatal androgen exposure, preoptic area and reproductive functions in the female rat, *Brain Dev*, v. 8, p. 463-468, 1986.

JU, G.; & SWANSON, L. W.; Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat. I. Cytoarchitecture. *J. Comp. Neurol.*, v. 280, p. 603-621, 1989.

KALRA, P. S.; AJIKA, K.; KRULICH, L.; FAWCETT, C. P. QUIJADA, M.; McCann S. M. Effects of hypothalamic and preoptic electrochemical stimulation on gonadotropin and prolactin release in proestrous rats. *Endocrinology*, v. 88, p. 1150-1158, 1971.

KALRA, P. S.; & KALRA S. P. Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrine Reviews. The Endocrine Society*, v. 4, n. 4, p. 311-351, 1983.

KAMEL, F.; & KUBAJAK, C. L. Modulation of gonadotropin secretion by corticosterone: interaction with gonadal steroids and mechanism of action. *Endocrinology*, v. 121, p. 561-568, 1987.

KERCHNER, M.; & WARD, I. L.; SDN-POA volume in male rats is decreased prenatal stress, but is not related to ejaculatory behavior. *Brain Res. Bull.*, v. 581. p. 244-251, 1992.

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

KISS, J.; KOCSIS, Á.; CSÁKI.; HALÁS.;Z Evidence for vesicular glutamate transporter synapses onto gonadotropin-releasing hormone and other neurons in the rat medial preoptic area. *European Journal of Neuroscience*, v. 18, p. 3267-3278, 2003.

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

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

KONIGSMARK, B. W.; Methods for the counting of neurons. In W. J. H. Nauta & S. O. E. Ebberson(Eds.), Contemporary reseach methods in neuroanatomy (pp.315-341). New York:springer-Verlang.

KOPIN, I. L. Definitions of stress and sympathetic neuronal responses. Annual New York Academy of Sciences, v.771, p.19-30, 1995.

LANGURB, M. C.; MALEY, B. E.; WATSON, R. E. Estrous cycle-associates axosomatic synaptic plasticity upon estrogen receptive neurons in the ra preoptic area, v. 641, p. 303-310, 1994.

Le, W. W. BERGHORN, K. A.; RASSSNICK, S.; HOFFMAN G. E.; Periventricular preoptic area neurons coactivated with luteinizing hormone (LH)-releasing hormone (LHRH) neurons at the time of the LH surge are LHRH afferents. Endocrinology, v. 140, p. 510-519, 1999.

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

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

LENT, S. & SCHMIDT, S. L. The ontogenesis of the forebrain commissures and the determination of brain asymmetries. *Progress in Neurobiology*, v. 40, p. 249-76, 1993.

LEPHART, D. E.; LUND, D. T.; HORVATH, L. T. Brain androgen and progesterone metabolizing enzymes: biosynthesis, distribution and function. *Brain Research Reviews*, v. 37, p. 25-37, 2001.

LEVINE, S. The psychoendocrinology of stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 697, p. 61-69, 1993.

LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 746, p. 275-288, 1994.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology and Behavior*, v. 73, p. 255-260, 2001.

LEVINE, J. E.; CHAPPELL, L. M.; BAUER-DANTOIN, A. C.; BESECHE, L. M.; CONAGHAN, L. A.; LEGAN, S. J.; MEREDITH, J. M.; STROBL, J. H.; VOGELSONG, K. M.; WOLFE, A. M. Neuroendocrine regulation of luteinizing hormone pulse generator in the rat. *Recent Progress in Hormones Research*, v. 47, p. 97-153, 1991.

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

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

LIU, D.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FREEDMAN, A.; SHARMA, S. *et al.* Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, v. 277, p. 1659-1662, 1997.

LIU, D.; CALDJI, C.; PLOTSKY, P. M., MEANEY, M. J. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 12, p. 5-12, 2000.

LUCION, A. B; PEREIRA, F. M; WINKELMAN, E. C; SANVITTO, G. L; ANSELMO-FRANCI, J. A. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behav. Neurosci.*, v. 117, n. 5, p. 894-903, 2003.

MALSBUY, C. W.; & McKAY, K. Neurotrophic effects of testosterone on the medial nucleus of the amygdala in adult male rat. *J Neuroendocrinol*, v. 6, p.57-69,1994.

MANDARIN-DE-LACERDA, C. A. & COSTA, W. S. An update of the stereology of the myocyte of the baboon's heart: analysis of the crista terminalis, interatrial and interventricular septa, and atrioventricular bundle. *Anat Anz*, v. 167, p.57-61, 1993.

MANDARIN-DE-LACERDA, C.A. Métodos Quantitativos em Morfologia , Editora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, p. 98-101, 1995.

MANDARIN-DE-LACERDA, C. A. & PEREIRA, L. M. Numerical density of cardiomyocytes in chronic nitric oxide synthesis inhibition. *Pathobiology*, v. 68, p.36-42, 2000.

MANDARIN-DE-LACERDA, C.A.; Stereological tools in biomedical reseach. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.75, n. 4, p. 469-486, 2003.

McCARTHY, M. M.; BESMER, R. H.; JACOBS, S. C.; KEIDAN, O. M. G.; GIBBS, B. R. Influence of maternal grooming, sex and age on fos immunoreactivity in the preoptic area of neonatal rats: implications for sexual differentiation, v. 19, p. 48-496, 1997.

MEANEY, M.J.; SEEMA, B.; LAROCQUE, S.; MCCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V. & PLOTSKY, P.M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Annals of New York Acadademy of Sciences*, v. 697, p. 70-85, 1993.

MEANEY, M.J.; DIORIO, J.; WIDDOWSON, J.; LaPLANTE, P.; CALDJI, C.; EEKL, J.R.; PLOTSKY, P.M. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Developmental Neuroscience*, v. 18, p. 49-72, 1996.

MEERLO, P.; HORVATH, K.M.; NAGY, G.M.; BOHUS, B. & KOOLHAAS, J.M. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 11, p. 925-933, 1999.

MELTON, L., Sex is all in the brain: report of a Novartis Foundation Symposium on the neuronal and cognitive effects of oestrogens. London, UK, 7-9 September, *Trends Endocrinol. Metab.*, v. 11, p. 69- 71, 2000.

MEISEL, R. L.; & SACHS, B. D.; The physiology of male sexual behavior. In Knobil, e.; Neill, J, D.; (Eds), *The Physiology of Reproduction*, 2 nd end. Raven Press, p. 3-105 , 1994

MELIA, K. R.; & DUMAN, R. S. Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain Noradrenergic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 8382-8386, 1991.

MELO, S. R.; SOUZA, R. R.; MANDARIN-DE-LACERDA, C. A.; Streologic study of the sinoatrial node of rats-age related changes. *Biogerontology*, v. 3, p. 383-390, 2002.

MERCHENTHALER, I.; SÉTÁLÓ, Gy.; CSONTOS, C.; PETRUZ, P.; FLERKO, B.; NEGROVILAR, A.; Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin containing neurones projecting to the median eminence of the rat. *Endocrinology*, v. 125, p. 2812-2821, 1989.

MISTRETTA, Ch. M.; BRADLEY, R. M. Effects of early sensory experience on brain and Behavioral developmental. In: *Studies on the development of behavior and nervous System*. New York: Academic Press, p. 215-246, 1978.

MIZUKAMI, J. B.; MEANEY, M. J. Effects of corticosterone on response consolidation and retrieval in the forced swim test. *Behavioral Neuroscience*, v. 105, n. 65, p. 69-575, 1983.

MURAKAMI, S.; & ARAI, Y.; Neuronal death in the developing sexually dimorphic periventricular nucleus of the preoptic area in the female rat: effect of neonatal androgen treatment. *Neuroscience Letters* v. 102, p. 185-190, 1989.

NEILL, J. D., FREEMAN, M. E., TILISON., A. S. Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. *Endocrinology*, v. 89, p. 1448-1453, 1971.

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

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.

NISHIZUKA, M.; & ARAI, Y. Synapse formation in response to estrogen in the medial amygdala developing in the eye. *Proceedings in National Academy of Sciences of the USA*, v. 70, n. 11, p. 7024-7026, 1982.

NISHIZUKA, M.; SUMIDA, H.; KANO, Y.; ARAI, Y. Formation of neurons in the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus of the preoptic area of the rat:

Effects of prenatal treatment with testosterone oropionate. *J. Neuroendocrinol.*, v. 5, p. 569-573, 1993.

NÚÑEZ, J. F.; FERRÉ, P.; ESCORIHUELA, M.; TOBEÑA, A. FÉRNANDEZ-TERUEL. A. Effects of posnatal handling of rats on emotional, HPA-axis, and prolactin reativity to novelty and conflict. *Physiology and Behavior*, v. 60, n. 5, p. 1355-1359, 1996.

ONO, N.; ALLI, E. T Effect of intravenous and intraventricular injection of antisera directed against corticotropin – releasing factor on the secretion of anterios pituitary hormones. *Proc. nati. acad.sci.*, v. 82, p. 7787-7790,1985.

ORIKASA,C.; KONDO, Y.; HAYASHI, S.; McE WEN, B.; SAKUMA, Y.; Sexually dimorphic expression of estrogen receptor β in the anteroventrl periventricular nucleus of the rat preoptic area: Implication in luteinizing hormone surge. *Phisology*, v. 9, p. 3306-3311, 2002.

ORIKASA, C.; SAKUMA, Y.; Possible involvemet of preoptic estrogen receptor β positive cells in luteinizing hormone surge in the rat . *Domestic Animal Endrocrinology*, v. 25, p. 83-92, 2003.

ÖSTERLUND, M. Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Molecular Brain Research*, v. 54, p.175-180, 1998.

RAISMAN, D.; & FIELD, P. M. Sexual dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Research*, v. 54, p. 1-29, 1973.

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

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

RASIA-FILHO, A. A., FABIAN, C., RIGOTI, 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

RHEES, R. W.; & FLEMING, D. E.; Effects of malnutrition, maternal stress or ACTH injections during pregnancy on sexual behavior of male offspring. *Physiol. Behav.*, v. 27, p. 879-883, 1981.

RHEES, R. W., AL-SALEH N. H., KINGHORN W. E., FLEMING. E. D.; LEPHART, D. E. Relation between sexual behavior and sexually dimorphic structures in the anterior hypothalamus in control and prenatally stressed male rats. *Brain Research Bulletin* v. 50, n. 3, p. 193-199, 1999.

RHEES, R. W., LEPHART, E. D., ELIASON, D. Effects of maternal separation during postnatal development on male sexual behavior and female reproduction function. *Behavioral Brain Research*, v. 123, p.1-10, 2001.

RIVER; VALE W. Influence of corticotrophin-releasing factor on reproductive functions in the rat. *Endocrinology*, v. 114, p. 914-921, 1984.

RONNEKLEIV, O. K. & KELLY, M. J. Luteinizing hormone-releasing hormone neural system during the estrous cycle of the female rat: effects of surgically induced persist estrus. *Neuroendocrinology*, v. 43, p.564-576, 1986,

PADOIN, M. J.; CADORA, L. P.; GOMES, C. M.; BARROS, H. T. M.; LUCION, A. B. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavioral of rats. *Beh. Neurosc.*, v. 115, p. 1332-1340, 2001.

PALKOVITS, M.; BROWNSTEIN, M.; SAAVEDRA, J.; AXELROD, J. Norepinephrine and dopamine content of hypothalamic nuclei of rat. *Brain Res.*, v. 77, p. 137-149, 1974.

PAXINOS, G.; & WATSON, C.; *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Orlando, FL, Academic Press. 1998.

PAXINOS, G.; WATSON, C.; *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Orlando, FL, Academic Press, 1986.

PESSANHA, M. G.; & MANDARIN-DE-LACERDA, C. A. Influence of the chronic nitric oxide synthesis inhibition on cardiomyocytes number. *Vichows Arch*, v. 437, p.667-674, 2000.

PETERSEN, L. S.; McCRONE, S.; KELLER, M.; SHORES S. Effects of estrogen and progesterone on luteinizing hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid levels: considerations of temporal and neuroanatomical variables. *Endocrinology*, v.136, p. 3604-3610, 1995.

PETERSEN, L. S.; OTTEM, N. E.; CARPENTER, D. C. Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biology of Reproduction*. v. 69, p. 1771-1778, 2003.

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

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

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

PLAS-ROSER, S.; & AROM, C.; Stress related effects in the control of sexual receptivity and in the secretion of progesterone by the adrenais in the cyclic female rats. *Physiol. Behav.*, v. 27, p. 264, 1981.

PLOTSKY, P. M. & MEANEY, M.J. Early, posnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adults rats. *Brain Research. Molecular Brain Research*, v. 18, p. 195-200, 1993.

PRINCE, N. K.; PRINCE, S. J. KINGHORN, W. E.; FLEMING, E. D.; RHEES, W. R. Effects of sexual behavioral manipulation on brain plasticity in adult rats. *Brain Research Bulletin*, v. 47, n. 4, p. 349-355, 1998.

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.

SAKLY, M. & KOCH, B. Ontogenetical variations of transcortin modulate glucocorticoid receptor function and corticotropic activity in the pituitary gland. *Hormone and Metabolic Research*, v. 15, p. 92-96, 1983.

SAPOLSKI, R. M. & MEANEY, M. J. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanism and the stress hyporesponsive period. *Brain Research Reviews*, v.11, p 64-76, 1986.

SAPOLSKY, R. M. The physiological relevance or glucocorticoid endangerment of hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 746, p. 294-307, 1994.

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

SCHMITZ, C. and HOF, P. R. Design-based stereology in neuroscience, v.130, p. 813-831, 2005.

SHERIDAN, P. J. The nucleus interstitialis stria terminalis and the nucleus amygdaloideus medialis prime targets for androgen in the rat forebrain. *Endocrinology*, v.104, n.1, p. 2197-2210, 1996.

SHIVERS, D. B.; HARLAN, E. R.; MORELL, D. W.; PFAFF. Absence of estradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature*, v. 304, p. 345-347, 1983.

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

SHUGHRUE, P. G.; MERCHENTHALER, J. Distribution of estrogen receptor- β immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol* V. 436, p. 64-81, 2001

SEGARRA, C. A.; ACOSTA, M. A.; GONZÁLEZ, L. J.; ANGULO, A. J.; McEwen, S. B. Sex differences in estrogenic regulation of preproenkephalin RNAm levels in the medial preoptic area of prepubertal rats. *Molecular Brain Research*, v. 60, p. 133-139, 1998.

SEVERINO, G, S.; FOSSATI, I, A, M.; PADOIN, M, J.; TREVIZAN, L.; SANVITTO, G, L.; FRANCI, C, R.; ANSELMO-FRANCI, J, A.; LUCION, A, B. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous phases of females. *Physiol. Behav.* v. 81, p. 489-498, 2004,

SIMERLY, R, B.; Hormonal control of the development and regulation of tyrosine hydroxylase expression within a sexually dimorphic population of dopaminergic cells in the hypothalamus. *Mol Brain Res*, v. 6, p. 297-310, 1989.

SIMERLY, R, B.; Anatomical substrates of hypothalamic integration In: *The Rat Nervous System* (ed. Paxinos, G). San Diego, Academic Press. p. 353-376, 1995.

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

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

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. *J. Comp. Neural.*, v. 294, p. 76-95 , 1990.

SIMERLY, R, B.; & SWANSON, L. W.; The distribution of neurotransmitter-specific cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus: implications of control of gonadotropin secretion in the rat. *Brain Res.*, v. 400, p. 11-34, 1987.

SIMERLY, R, B.; & SWANSON, L. W.; Projection of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neural.*, v. 270, p. 209-242, 1988.

SIMERLY, R, B.; SWANSON, L. W.; & GORSKI, R. A. Demonstration of a sexual dimorphism of serotonin-immunoreactive fibers in the medial preoptic nucleus: An immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neural*, v. 225, p. 151-166, 1994.

SIMERLY, R, B.; SWANSON, L. W.; HANDA, R. J. GORSKI, R. A. Influence of perinatal androgen on the sexually dimorphic distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*, v. 40, p. 501-510, 1985.

STEWART, J. & KOLB, B. The effects of neonatal gonadectomy and prenatal stress on cortical thickness and asymmetry in rats. *Behavioral and Neural Biology*, v. 49, p.144-60, 1993.

SUCHECKI, D.; MOZAFFARIAN, D.; GROSS, G.; ROSENFELD, P & LEVINE, S. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the rat infant. *Neuroendocrinology*, v. 57, p. 204-212, 1993.

SWANSON, L, W.; HARTMAN, B, K.; The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connection in the rat using dopamine- β -hydroxylase as a marker. *J. Comp. Neural*, v.163, p. 467-506, 1976.

SWANSON, L, W.; & KUYPER, H. G. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytological subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J. Comp. Neural*, v. 194, p. 555-570, 1980.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic research*, v. 53, p. 865-871, 2002.

TOHEI, A.; TOMABECHI, T., MAMADA, M.; AKAI, M.; WATANABE, G.; TAYA, K Effects of repeated ether on the hypothalamic-pituitary-testes axis in adult rats with special reference to inhibin secretion. *J Vet Med Sci*, v. 59, n. 5, p. 329-334, 1997.

WALKER, C. C.; PERRIN, M.; VALE W.; RIVIERC. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology.*, v. 118, p. 1445-1451, 1986.

WALKER, S. J. VRANA, K. E. Pituitary corticotrophine function during the stress hiporesponsive period in neonatal rats. *Neuroendocrinology.*, v. 57, p. 1003-1010, 1993.

WARD, I. L.; Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behaviors of males. *Science*, v. 175, p. 82-84, 1972.

WARD, I. L.; WEISZ, J. Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science*, v, 207, p.328-329, 1980.

WARD, I. L.; The prenatal stress syndrome: Current status. *Psychoneuroendocrinology*, v. 9, p. 3-11, 1984a.

WARD, I. L.; WEISZ, J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female fetuses and thier mothers. *Endocrinology*, v. 114, p. 1635-1644, 1984b.

WARD, I. L.; WARD, O.B.; WINN, R.J.; BIELAWSY, D. Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress or both factores. *Beh. Neurosc.*, v. 108, n. 6, p. 1188-1195, 1994.

WATSON, R. E. Jr. LANGURB, MC. Jr. ENGLE M. G. MALEY, B. E. Estrogen-receptive neurons in the anteroventrl nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region. *Brain Research* , v. 689, p. 254-264, 1995.

WATSON, R. E. Jr.; HOFFMANN, G. E. WIEGAND, S. J. Sexually dimorphic opoid distribution in the preoptic area: manipulation by gonadal steroids. *Brain Res.*, v.398, p. 157-63, 1986

WEST, M. J.; GUNDERSEN, H. J. G Unbiased setereological estimation of the number of neurone in the human hippocampus. *J Comp Neurol.*, v. 296, p. 1-22, 1990.

WIEGAND, S. J.; TERASAWA, E.; BRIDSON, W. E.; Persistent estrus and blockasde of progesterone-induced LH release follows lesions which do not damage the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology*, v. 102, p.1645-1648, 1978.

WINKELMANN-DUARTE, E. C. Alterações morfológicas do sistema nervoso central induzidas pela manipulação neonatal. Tese de doutorado apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2004.

WOOD, R. L.; & NEWMAN, S. W. Hormonal influence on neurons of the mating behavior pathway in male hamster. In: MICIVYCH, P. E. & HAMMER Jr, R. P.

Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones. New York, Cambridge, p. 3-39, 1995.

WOOD, R. L. Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Horm. Behav.*, v. 32, p. 40-45, 1997.

YOSHIDA, M.; KAZUNARI, Y.; KIZAKI, Z.; SAWADA, T.; KAWATA, M.; The distributions of apoptotic cells in the medial preoptic areas of male and female neonatal. *Neuroscience Research.*, v. 36, p. 1-7, 2000.

ZOELLER, R. T. & YOUNG, W. S. Changes in cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding gonadotropin releasing hormone in the anterior hypothalamus of female rats during the estrous cycle. *Endocrinology*, v. 123, p. 1688-89, 1988.