

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

**ESTUDO DA DENSIDADE DOS ESPINHOS DENDRÍTICOS NA REGIÃO
PÓSTERO-DORSAL DA AMÍGDALA MEDIAL DE RATOS INTACTOS E
ORQUIECTOMIZADOS**

Claudia Diehl Forti

PORTO ALEGRE
2005

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

**ESTUDO DA DENSIDADE DOS ESPINHOS DENDRÍTICOS NA REGIÃO
PÓSTERO-DORSAL DA AMÍGDALA MEDIAL DE RATOS INTACTOS E
ORQUIECTOMIZADOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Alberto Antônio Rasia Filho
Co-orientadora: Profa. Dra. Matilde Achaval Elena

Porto Alegre
2005

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto Antônio Rasia Filho, pela oportunidade concedida, por seu entusiasmo e amor contagiante pela ciência, e acima de tudo por sua amizade, seus ensinamentos valiosos e seus valores éticos. Fica aqui minha admiração e meu respeito!

À Prof. Dra. Matilde Achaval Elena pela dedicação, amizade e orientação valorosa a este trabalho.

À UFRGS, à coordenação do PPG em Neurociências e demais professores do curso, pela oportunidade de estudo e qualidade de trabalho.

À Alessandra Swarowski, amiga dos tempos de graduação e grande incentivadora do meu caminho científico.

À Aline Pagnussat, Maria Izabel Ugalde, Gustavo Mânica; pelo companheirismo, amizade e incentivo nos momentos difíceis. Também à Günther Gehlen, Simone Marcuzzo, Aline Dal'Oglio, Paula Rigon, Flávia Martinez e Érica Hermel pela colaboração e convivência neste período.

Ao meu esposo Paulo Roberto, pelo apoio incondicional, investimento no meu trabalho e por toda sua paciência e amor.

Aos meus pais, por acreditarem que o estudo é a maior herança e pela confiança em mim depositada.

À minha madrinha Dra Ada, pelo exemplo pessoal e profissional e também por seus conselhos inteligentes.

Ao meu irmão Cássio e minha cunhada Li, pela acolhida e pelas risadas reconfortantes.

À amiga Juliana Beckel pela parceria de sempre.

SUMÁRIO

Abreviaturas

Lista de Figuras

RESUMO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Amígdala.....	10
1.2 Amígdala Medial.....	13
1.3 Citoarquitetura da Amígdala Medial e Organização da Amígdala Medial pósterio-dorsal.....	23
1.4 Ação dos Hormônios Gonadais no Sistema Nervoso.....	28
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivos Gerais.....	35
2.2 Objetivos Específicos.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Animais.....	37
3.2 Procedimento Cirúrgico.....	37
3.3 Procedimento Histológico.....	38
3.4 Aquisição dos Dados.....	39
3.4.1 Localização da AMePD e Seleção de Neurônios.....	39
3.4.2 Desenho dos Espinhos Dendríticos.....	40
3.4.3 Cálculo da Densidade dos Espinhos Dendríticos.....	41
3.4.4 Análise Estatística.....	41
4 RESULTADOS	43
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ABREVIATURAS

AA	Amígdala Anterior
AAP	Área Amigdalár Piriforme
ABL	Amígdala Basolateral
ABLa	Amígdala Basolateral Anterior
ABLp	Amígdala Basolateral Posterior
ABMa	Amígdala Basomedial Anterior
ABMp	Amígdala Basomedial Posterior
ACe	Amígdala Central
ACoa	Amígdala Cortical Anterior
ACOM	Amígdala Cortical Medial
ACOl	Amígdala Cortical Lateral
ACOp	Amígdala Cortical Posterior
ACOpm	Amígdala Cortical Pósterio-Medial
ACOpl	Amígdala Cortical Pósterio-Lateral
AL	Amígdala Lateral
AMe	Amígdala Medial
AMeAD	Amígdala Medial Ântero-Dorsal
AMeAV	Amígdala Medial Ântero-Ventral
AMePD	Amígdala Medial Pósterio-Dorsal
AMePDI	Amígdala Medial Pósterio-Dorsal Lateral
AMePDi	Amígdala Medial Pósterio-Dorsal Intermediária

AMePDm	Amígdala Medial Póster-Dorsal Medial
AMePV	Amígdala Medial Póster-Ventral
AVPV	Núcleo Periventricular Ântero-Ventral
BST	Núcleo Próprio da Estria Terminal
BSTpi	Região Póster-Intermediária da Estria Terminal
BSTpm	Região Póster-Medial da Estria Terminal
DHT	Diidrotestosterona
Epm	Erro padrão da média
HPA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
POA	Área Pré-Óptica
SNC	Sistema Nervoso Central
ST	Estria terminal
TO	Trato Óptico
VNM	Núcleo Ventromedial do Hipotálamo
VPM	Núcleo Pré-Mamilar Ventral

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar a AMePD.....	14
FIGURA 2	Corte coronal do encéfalo do rato onde se observa as subregiões da AMePD.....	15
FIGURA 3	Fotomicrografias dos espinhos dendríticos das subregiões medial e lateral da AMePD.....	45
FIGURA 4	Desenhos de espinhos dendríticos nas subregiões medial e lateral da AMePD.....	46
FIGURA 5	Densidade de espinhos (média \pm epm) por micrômetro dendrítico nas subregiões medial e lateral da AMePD.....	47
FIGURA 6	Fotomicrografias dos espinhos dendríticos de ratos castrados de modo fictício ou orquiectomizados a curto prazo.....	48
FIGURA 7	Desenhos dos espinhos dendríticos de ratos castrados de modo fictício ou orquiectomizados a curto prazo.....	49
FIGURA 8	Fotomicrografias dos espinhos dendríticos de ratos castrados de modo fictício ou orquiectomizados a longo prazo.....	50
FIGURA 9	Desenhos dos espinhos dendríticos de ratos castrados de modo fictício ou orquiectomizados a longo prazo.....	51
FIGURA 10	Densidade de espinhos (média \pm epm) por micrômetro dendrítico na AMePD de ratos submetidos à castração de curta ou longa duração.....	52

RESUMO

A amígdala medial (AMe) é um dos núcleos superficiais do complexo amigdalóide que pode ser dividido de acordo com critérios citoarquitetônicos e hodológicos em 4 subnúcleos distintos: ântero-dorsal (AMeAD), ântero-ventral (AMeAV), pósterio-ventral (AMePV) e pósterio-dorsal (AMePD). Destes, a AMePD, dentre outras funções, está envolvida na regulação do comportamento sexual de roedores. Em ratos, este subnúcleo é uma estrutura sexualmente dimórfica, com ampla quantidade de receptores para hormônios gonadais e que se apresenta subdividida em três colunas celulares: medial (AMePDm), intermediária (AMePDi) e lateral (AMePDI). O presente trabalho teve como objetivos estudar a densidade de espinhos dendríticos na AMePDm e na AMePDI as quais, em ratos, estão relacionadas com os comportamentos de intromissão peniana e ejaculação, respectivamente. Também estudou-se os efeitos da castração com curta (8 dias) e longa (90 dias) duração na densidade dos espinhos dendríticos na AMePD. Todos os animais foram anestesiados e perfundidos, tiveram seus encéfalos seccionados em cortes coronais de 200 μm de espessura e submetidos à técnica de Golgi. Após, os espinhos foram desenhados ao longo dos primeiros 40 μm dendríticos com auxílio de uma câmara clara acoplada a microscópio óptico e tiveram sua densidade calculada. A análise estatística demonstrou que não há diferença significativa na densidade de espinhos dendríticos entre os neurônios da AMePDm e AMePDI quando comparadas entre si. Esses resultados sugerem que, embora funcionalmente diferentes, essas regiões parecem estar realizando contatos sinápticos em número similares. Ainda não está claro se estes espinhos são necessários para possibilitar que cada subregião contribua para um aspecto específico do comportamento sexual masculino. Por outro lado, a análise estatística também revelou que a castração por si só não é capaz de alterar a densidade de espinhos dendríticos nos neurônios da AMePD a curto prazo mas, por outro lado, que a castração de longa duração causou uma redução significativa na densidade de espinhos dendríticos em relação aos animais controle neste subnúcleo, evidenciando a ação da testosterona na manutenção da integridade morfológica a longo prazo nos neurônios da AMePD e sua importância para a plasticidade sináptica nesta região.

1 INTRODUÇÃO

1.1 AMÍGDALA

A amígdala é composta por núcleos interconectados e localizados lateralmente ao hipotálamo e ventralmente ao estriado (ALHEID *et al.*, 1995; EVERITT, 1995; PAXINOS; WATSON, 1998; SWANSON; PETROVICH, 1998; RASIA-FILHO *et al.*, 2000; de OLMOS *et al.*, 2004). No início do século XIX, observando secções do lobo temporal de seres humanos, Burdach descobriu uma massa de substância cinzenta, em forma de amêndoa, a qual chamou de amígdala. A seguir, pela microscopia óptica, revelou-se que a amígdala possuía diferenças estruturais e estendia-se além de seus limites anatômicos (JOHNSTON, 1923). Atualmente sabe-se que a amígdala não tem uma função unitária simples, e sim um papel de integração das atividades comportamentais, endócrinas e vegetativas que são importantes para a relação dos animais com seu ambiente (LeDOUX, 1992; DAVIS, 2000; RASIA-FILHO, *et al.*, 2000). Nos mamíferos está implicada com uma surpreendente variedade de comportamentos e funções neurais, incluindo emoção, memória, comportamentos sociais e reprodutivo, e modulação dos sistemas neuroendócrino e vegetativo (ALHEID *et al.*, 1995; EVERITT, 1995; WOOD; NEWMAN, 1995; SWANSON; PETROVICH, 1998; RASIA-FILHO *et al.*, 1999, 2000, 2004).

Para realizar tais funções, a amígdala recebe diferentes tipos de informações sensoriais interoceptivas e exteroceptivas como estímulos auditivos, visuais e olfativos (KNUEPFER, *et al.*; 1995; QUIRK *et al.*, 1995). Também é capaz de modificar sua própria atividade no que se supõe seja uma etapa na apreciação emocional da informação obtida e, desta maneira, a

amígdala apresenta a capacidade de adequar os comportamentos do animal ao seu ambiente, modulando suas atividades sociais (DAVIS, 2000) e estimulando várias regiões do sistema nervoso central (SNC) para que se inicie a resposta ao estímulo percebido (LeDOUX, 1992; KNUEPFER, *et al.*; 1995; QUIRK *et al.*, 1995; DAVIS, 2000). A seguir serão revisadas as regiões da amígdala e algumas de suas principais funções com maior atenção em uma de suas regiões, a amígdala medial (AMe), sobre a qual tratará a presente dissertação.

A amígdala foi dividida de diferentes maneiras por diferentes autores, baseado em sua anatomia e função. Prince e colaboradores (1987) propuseram um esquema único de classificação dos núcleos amigdalóides de ratos, gatos e macacos dividindo a amígdala desses animais em três grandes porções: núcleo basolateral (ABL), do qual fariam parte os subnúcleos lateral, basal e basal acessório e que estariam amplamente interconectados com o neocórtex; núcleo amigdalor cortical medial (ACOM), que corresponderia aos subnúcleos cortical, medial, córtex periamigdalóide, e núcleo do trato olfativo lateral, o qual estaria relacionado com o sistema olfativo (principal e acessório); e, por último, núcleo central (ACe) e área amigdalóide anterior (AA), que estariam envolvidos com atividades vegetativas.

Recentemente, de acordo com sua citoarquitetura, a amígdala de ratos pôde ser dividida em quatro regiões anatômicas: 1) amígdala expandida, que recebeu esse nome por estender-se além de seus limites anatômicos, subdividindo-se em ACe e AMe, 2) amígdala com características corticais, que foi subdividida em porções relacionadas com as vias olfativas principal e vomeronasal e em outra porção basolateral, 3) regiões de transição, situadas entre a porção ventral dos núcleos da base e a amígdala expandida e, finalmente, 4) núcleos ainda não classificados, caracterizados por células dispersas na substância branca ou no interior do núcleo da estria terminal (ALHEID *et al.*, 1995). Segundo outros autores, estruturalmente, a amígdala

parece consistir de uma divisão estriatal, constituída pela AA, AMe e ACe, e de uma divisão cortical que corresponde aos núcleos basolateral anterior (ABLa) e posterior (ABLp), basomedial anterior (ABMa) e posterior (ABMp), cortical pósteromedial (ACOpM) e pósterolateral (ACOpL), cortical anterior (ACOA), lateral (ACOL), posterior (ACOP), área amigdalóide piriforme (AAP) e área piriforme de transição. Funcionalmente a amígdala parece fazer parte de três grandes sistemas: o vegetativo, relacionado com a ACe; o frontotemporal, que compreende a amígdala lateral (AL) e a ABLa; e, o sistema relacionado com as vias olfativas principal e acessória, onde estão envolvidos os demais núcleos amigdalóides (SWANSON; PETROVICH, 1998).

Com base nisso, algumas funções foram descritas para a amígdala de ratos. Por exemplo, alguns desses núcleos amigdalóides, principalmente a AL, o ABL e alguns núcleos centrais, possuem um papel importante na modulação do medo pois suas aferências e eferências associam informações e desencadeiam respostas comportamentais e vegetativas frente a estímulos ameaçadores inatos e condicionados (DAVIS, 1992). Em ratos, por exemplo, estímulos auditivos condicionados chegam ao corpo geniculado medial de onde partem duas vias paralelas: uma projeção direta da divisão medial do corpo geniculado medial e do núcleo intralaminar talâmico para a AL, e uma projeção indireta, do corpo geniculado medial para o córtex auditivo e de lá para a AL (ARMONY *et al.*, 1995). É interessante que a lesão na ACe, AMe e ACO aumentou a investigação que os animais fazem em seus próprios predadores (BLANCHARD, 1972), diminuiu o comportamento de “freezing” na presença de estímulo aversivo (BLANCHARD, 1972; YOUNG; LEATON, 1996), e produziu uma perda total da retenção da informação necessária para a adaptação comportamental relacionada com a dominação social (BOLHUIS *et al.*, 1984).

Alguns núcleos da amígdala têm função seletiva na memória e, são áreas críticas de integração dos efeitos moduladores de hormônios e neurotransmissores (CAHILL; McGAUGH, 1996; McGAUGH *et al.*, 1996). A presença das catecolaminas liberadas pela adrenal na circulação sanguínea altera o efeito da estimulação amigdalóide na consolidação da memória (BENNETT *et al.*, 1985; LIANG *et al.*, 1985). A adrenalina ativa receptores de aferências vagais que se projetam para o núcleo do trato solitário que, por sua vez, envia projeções que liberam noradrenalina na amígdala (McGAUGH *et al.*, 1996). Diferentes núcleos amigdalóides também modulam diferentes funções no aprendizado (HATFIELD; GALLAGHER, 1995; ROBBINS, EVERITT, 1996), por exemplo, a ABL está envolvida no processo de consolidação da memória (Da CUNHA *at al.*, 1999). O aprender relacionado a condições emocionais parece envolver a ABL e suas conexões com o estriado ventral (GALLAGHER; CHIBA, 1996; ROBBINS, EVERITT, 1996). Danos em outras regiões da amígdala também podem afetar as respostas de atenção e orientação. Por exemplo, ratos com lesão na ACe apresentaram respostas inadequadas de atenção em relação a estímulos condicionados (GALLAGHER *et al.*, 1990; 1992).

Adicionalmente, determinados núcleos da amígdala são sexualmente dimórficos, ou seja, apresentam diferenças morfológicas e funcionais entre machos e fêmeas (RASIA-FILHO, *et al.*, 1999; 2000; 2004). Por exemplo, a ACOpd possui um maior volume e uma maior quantidade de neurônios em ratos machos quando comparados a fêmeas (VINADER-CAEROLS *et al.*, 1998). E a AMe de ratos machos intactos apresenta mais espinhos dendríticos em relação às fêmeas intactas (RASIA-FILHO *et al.*, 2004).

1.2 AMÍGDALA MEDIAL

Em ratos, a AMe é um dos núcleos superficiais do complexo amigdalóide e que ao longo de toda sua extensão está em contato direto com a região ventro-lateral do trato óptico (TO); (de OLMOS *et al.*, 2004). É formada por uma densa coluna de células em justaposição à superfície lateral de fibras eferentes do núcleo próprio da via olfativa acessória (SCALIA; WINANS, 1975). Tem início dorsalmente e posteriormente ao núcleo do trato olfativo, estendendo-se caudalmente até o corno temporal do ventrículo lateral, onde forma a parede anterior deste. O limite rostral da AMe com a amígdala anterior e o limite lateral com as camadas mais profundas do núcleo cortical anterior ou com núcleos intercalados ainda não estão bem definidos (ALHEID *et al.*, 1995).

A AMe é considerada parte da amígdala estendida, embora ainda haja controvérsias se a mesma é uma continuação ventral do estriado ou não (CANTERAS *et al.*, 1995; SWANSON; PETROVICH, 1998; de OLMOS; HEIMER, 1999; NEWMAN, 1999). A AMe tem sido subdividida em regiões de acordo com critérios citoarquitetônicos e hodológicos. Por exemplo, Alheid e de Olmos (1995) dividem a AMe nos subnúcleos ântero-dorsal (AMeAD), ântero-ventral (AMeAV), pósterodorsal (AMePD) e póstero-ventral (AMePV). De acordo com suas conexões, a AMe pode ser também organizada em uma região anterior ou rostral, da qual fazem parte a AMeAD, AMeAV e AMePV, e em uma região posterior ou caudal da qual faz parte a AMePD (CANTERAS *et al.*, 1995). A AMePD localiza-se adjacente ao TO e ventralmente à estria terminal (ST), conforme observa-se na Figura 1. Em cortes histológicos coronais corados pela técnica de Nissl aparece com a forma de um triângulo alongado, com uma base ventral que se estende no terço caudal da AMe (ALHEID, 1995; de OLMOS *et al.*, 2004).

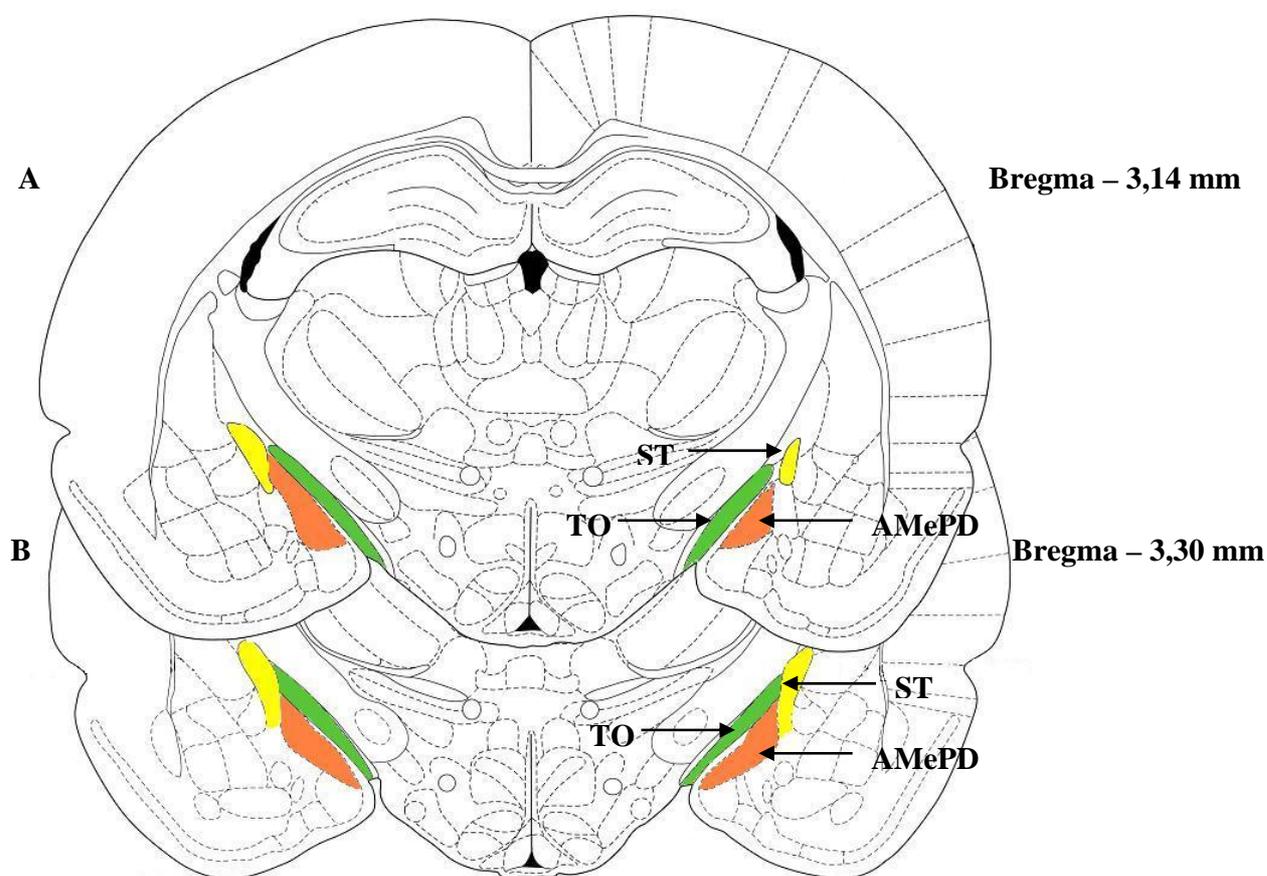


Figura 1 Esquema representativo de cortes coronais do encéfalo do rato onde se observa a íntima relação existente entre a AMePD, o trato óptico (TO) e a estria terminal (ST). Adaptado do Atlas de PAXINOS e WATSON (1998), sendo que **A** corresponde à figura 32 e **B** à figura 33 do atlas referido.

Ainda, a AMePD apresenta, como característica citoarquitetônica, uma região de células densas que se estendem superficialmente e profundamente, separadas por uma região intermediária de células esparsas (de OLMOS *et al.*, 1985) que se organizam em três colunas orientadas paralelamente à superfície lateral do núcleo as quais podem ser subdivididas em três regiões: medial, intermediária e lateral (; ALHEID *et al.*, 1995; COOLEN, 1997; de OLMOS *et*

al., 2004). A primeira é uma coluna superficial ou medial (AMePDm), formada por células densamente agrupadas, de pequeno à médio tamanho; a segunda coluna é profunda e mais lateral (AMePDI), constituída de células de tamanho médio densamente compactadas, porém menos agrupadas do que as células da coluna superficial, e a terceira coluna possui células de tamanho médio, que se organizam de maneira a constituir uma coluna intermediária (AMePDi) entre as colunas AMePDm e AMePDI (de OLMOS *et al.*, 2004, vide Figura 2).

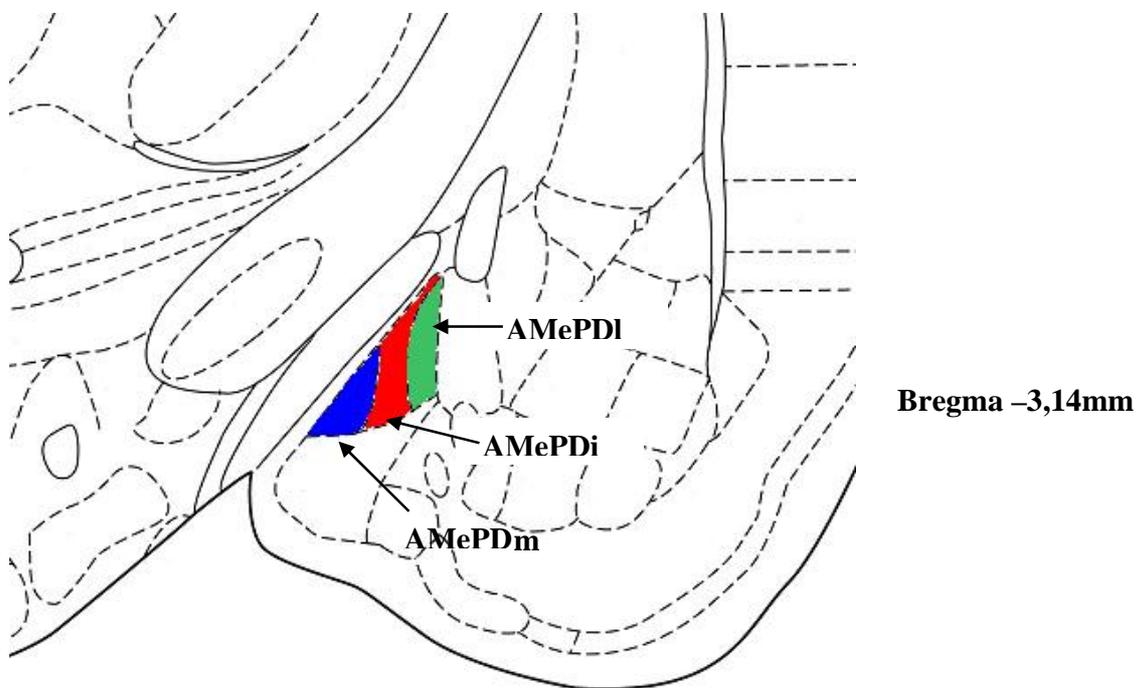


Figura 2 – Esquema representativo de corte coronal do encéfalo do rato onde se verifica as subdivisões da AMePD. Adaptado de PAXINOS e WATSON (1998), correspondente à figura 32 do atlas mencionado.

A AMe de ratos possui uma ampla rede de conexões neurais entre seus subnúcleos, com outros núcleos da amígdala e também com núcleos extra-amigdalóides (CANTERAS *et al.*, 1995). Suas aferências são provenientes do córtex pré-frontal, do núcleo próprio da estria terminal (BST) e de vários núcleos do hipotálamo envolvidos com a modulação do sistema neuroendócrino e comportamento reprodutivo (PITKÄNEN, 2000). Mas a maioria das aferências neuronais que chegam à AMe são provenientes diretamente do bulbo olfativo acessório, que envolve estímulos de ferômonios que atuam no órgão vomeronasal. Há, ainda, aferências mais modestas de regiões do telencéfalo basal, as quais possuem conexões recíprocas com a AMe (OTTERSEN, 1980; GROVE 1988); do tálamo (VEENING, 1978; OTTERSEN; BEM-ARI; 1979; OHTAKE; YAMADA,1989) e da região dorsal da ponte relacionada com informações somáticas e viscerais (HERBERT; SAPER, 1990), de grupos celulares da rafe mesencefálica (AZMITIA; SEGAL, 1978; OTTERSEN, 1981) e do *locus coeruleus* (JONES; MOORE, 1977). Por outro lado, a AMe envia suas projeções para o sistema olfativo (principal e acessório); a formação hipocampal (ventralmente); o estriado ventral, globo pálido ventral, e núcleo próprio da estria terminal no telencéfalo basal; para diversos núcleos hipotalâmicos; para o tálamo na porção medial; para a substância cinzenta periaqueductal e para os núcleos da rafe mesencefálicos (CANTERAS *et al.*, 1995).

De fato, estudos da amígdala em ratos indicam que a maioria de seus grupos celulares projetam-se para núcleos hipotalâmicos envolvidos com diversos comportamentos por via direta ou, indiretamente, via hipocampo ventral, o qual se projeta para o hipotálamo medial (PETROVICH *et al.*, 2001). A parte principal do BST também recebe uma densa aferência do núcleo amigdalóide posterior e ambos enviam projeções para a AMePD e regiões hipotalâmicas interconectadas (SIMERLY *et al.*, 1989; CANTERAS *et al.*, 1992). As eferências da AMePD

possuem uma organização estrutural para alguns núcleos hipotalâmicos que estão especificamente envolvidos com os ajustes neuroendócrinos e vegetativos localizados na zona periventricular (CANTERAS *et al.*, 1995; PETROVICH *et al.*, 2001; SIMERLY, 2004).

A AMePD é claramente influenciada pela atividade da via vomeronasal, proveniente do bulbo olfativo acessório e que chega na AMe anterior. Esta, por sua vez, reconhece a relevância social do estímulo olfativo, e via núcleos intercalados da amígdala determina se a AMePD será estimulada ou não (BRESSLER; BAUM, 1996; GUILLAMÓN; SEGOVIA, 1997; McDONALD, 1998; MEREDITH; WESTBERRY, 2004). Com base nisto, a AMe contribui para a interpretação da informação sensorial exteroceptiva mas também interoceptiva (BRESSLER; BAUM, 1996; GUILLAMÓN; SEGOVIA, 1997; DIELENBERG *et al.*, 2001); para a regulação de comportamentos sociais (BOLHUIS *et al.*, 1984; NEWMAN, 1999; 2002) e reprodutivo de machos e fêmeas (RASIA-FILHO *et al.*, 1991; COLLEN *et al.*, 1997; NEWMAN, 1999; 2002; SHEEHAN *et al.*, 2001), bem como para a modulação da memória condicionada e aprendizado onde o componente emocional esteja envolvido (CANTERAS *et al.*, 1995; ROOZENDAAL; McGAUGH, 1996; RASIA FILHO *et al.*, 2000).

A AMe, associada à ABL, está relacionada com a indução e formação de memória modulada pelos glicocorticóides (ROOZENDAAL; McGAUGH, 1996). Ainda, o aprendizado modulado pela AMe está relacionado a estímulos olfativos (HINES *et al.*, 1992; McGAUGH *et al.*, 1992; HESS *et al.*, 1997), porém a ativação da AMe se alterna com outros núcleos do complexo amigdalóide de acordo com a demanda da tarefa e os estágios do aprendizado. Por exemplo, há um aumento de c-fos na AMe de ratos durante a exploração anogenital realizada nas fêmeas, e uma diminuição da expressão dessa proteína em relação a outros núcleos da amígdala durante o treino de discriminação olfativa nesses machos (HESS *et al.*, 1997). A AMe

também está envolvida nas atividades neuroendócrinas hipotalâmicas durante uma resposta emocional (MIYATA *et al.*, 1995) e parece reger respostas de liberação hormonal hipofisária bem como modular a função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) na presença de estresse emocional (McGAUGH *et al.*, 1992; DAYAS *et al.*, 1999). De fato a AMe é o primeiro local dentro da amígdala responsável pelo controle do eixo HPA e pelas respostas de secreção de ocitocina frente a um evento estressor emocional e incondicionado (DAYAS *et al.*, 1999).

Em gatos e ratos também está bem estabelecida a função da AMe na regulação dos comportamentos defensivo e agressivo (KOOLHAAS *et al.*, 1980; SLODDART-APTER *et al.*, 1980; SIEGEL *et al.*, 1986; BLOCK; GORSKI, 1988; SIEGEL; BRUTUS, 1990; DIELENBERG *et al.*, 2001). A AMe é o componente facilitatório para a expressão do comportamento defensivo e o ataque predatório em ratos (CUELLO; KANAZAVA, 1978; McLEAN *et al.*, 1985; HARLAN *et al.*, 1989; SWANN; NEWMAN, 1992; SHAIKH *et al.*, 1993). Outros estudos demonstraram que ratos com lesão eletrolítica bilateral na AMe, quando colocados em uma caixa para disputa de território, apresentavam uma diminuição do comportamento agressivo em relação a ratos controle (VOCHTELOO; KOOLHAAS, 1987). A AMePV parece estar envolvida em comportamentos defensivos desencadeados pelo odor de um predador, como por exemplo nas respostas desencadeadas pelo odor de um gato frente a um rato (SHEEHAN *et al.*, 2000). Já os demais subnúcleos da AMe parecem ser ativados em outros modelos experimentais onde o odor não é o fator aversivo preponderante a ser testado (DIELENBERG, *et al.*, 2001).

Muito relevante é que a AMe está envolvida na modulação do comportamento reprodutivo em ratos e outros roedores (KLING; BROTHERS, 1992; KONDO, 1992; KONDO; ARAI, 1995; WOOD; NEWMAN, 1995). Devido ao fato da AMe receber aferências provenientes do

bulbo olfativo, do órgão vomeronasal (TAKAHASHI; GLADSTONE, 1988; DOMINGUEZ *et al.*, 2001) e de vários núcleos do hipotálamo (CANTERAS *et al.*, 1995; McDONALD *et al.*, 1999), ela parece ser essencial na modulação de comportamentos que requeiram ativação “quimiossensorial”, como para a ocorrência do comportamento sexual (TAKAHASHI; GLADSTONE, 1988; DOMINGUEZ *et al.*, 2001). Em ratos machos a AMe facilita as respostas aos estímulos sexuais (KONDO, 1992) enquanto nas fêmeas parece ser um componente neural do sistema inibitório de regulação do comportamento de cópula (VOCHTELOO; KOOLHAAS, 1987; TAKAHASHI; GLADSTONE, 1998). Lesão na AMe de machos produz uma diminuição da frequência de ejaculação, aumento do número de intromissões penianas que precedem a primeira ejaculação e aumento do intervalo entre as intromissões quando comparados com animais não lesionados (KONDO, 1992). Por outro lado, ratas com lesão na AMe, quando colocadas junto a machos, demonstraram diminuição da exploração olfativa em seus parceiros e aumento na duração da cópula. Após o acasalamento, tais fêmeas buscaram seus companheiros com menos frequência e, quando colocadas frente a outras ratas, demonstraram uma diminuição de seu comportamento ofensivo quando comparadas ao grupo controle (LEHMAN; WINANS, 1982).

Estudos mais detalhados têm sugerido que os diferentes subnúcleos da AMe possuem distintas funções na regulação do comportamento sexual (NEWMAN, 1999; DOMINGUEZ *et al.*, 2001). Por exemplo, os subnúcleos AMeAD e AMePV, para a modulação da atividade reprodutiva feminina, enviam amplas projeções para o núcleo hipotalâmico ventro-medial (VMN) e quantidades esparsas a moderadas em direção ao núcleo arqueado (CANTERAS *et al.*, 1995). Já a AMePD, embora envie poucas eferências para o VMN, parece estar envolvida com funções neurondócrinas ativadas por estimulação cérvico-vaginal em ratas (PFAUS *et al.*,

1996). E projeta-se para a região periventricular ântero-ventral (AVPV) da região pré-óptica hipotalâmica para influenciar a secreção das gonadotrofinas (SIMERLY, 1998). Hamsters machos com lesão na AMeAD apresentaram perda do comportamento de acasalamento, bem como perda da investigação anogenital frente às fêmeas (LEHMAN *et al.*, 1980; LEHMAN; WINANS, 1982; TAKAHASHI; GLADSTONE, 1988) enquanto ratos e hamsters com danos na AMePD apresentaram uma modesta, mas estatisticamente significativa, diminuição da investigação anogenital e um aumento da duração da atividade copulatória na presença de fêmea em estro (NEWMAN, 2002). Ademais, ratos com lesão na AMePD apresentaram uma redução do comportamento de cópula e perda da ereção peniana quando expostos ao odor de uma fêmea em estro (KONDO, 1992).

Em ratos e hamsters machos, os axônios das regiões anterior e posterior da AMe projetam-se para locais diferentes dentro do BST (ALHEID *et al.*, 1995). Em hamsters, a AMeAD envia projeções para a região póster-intermediária do BST (BSTpi) e a AMePD para a região póster-medial (BSTpm), constituindo circuitos funcionalmente e estruturalmente distintos, envolvidos na regulação do comportamento sexual desses animais (NEWMAN, 1999; 2002). Ambos os circuitos apresentaram um aumento da proteína c-fos em resposta ao comportamento de acasalamento (KÖLLACK; NEWMAN, 1992; WOOD; NEWMAN, 1993). A circuitaria envolvendo a AMeAD apresentou uma imunorreatividade à c-fos generalizada após o acasalamento ou depois de encontros agressivos entre hamsters machos (KOLLACK-WALKER; NEWMAN, 1995), o que sugere seu papel no direcionamento da atenção para a interpretação do ambiente (GOMEZ; NEWMAN, 1992; NEWMAN, 1999; 2002). Por outro lado, há um aumento da proteína c-fos na AMePD durante a investigação anogenital do macho em uma fêmea momentos antes da monta ou após a ejaculação (COOLEN *et al.*, 1997). Há,

porém, grupos celulares específicos nas subregiões da AMePD que revelaram um aumento específico dessa proteína relacionado ou com a investigação anogenital da fêmea ou com a ocorrência de ejaculação (COOLEN *et al.*, 1997; 1998).

Estudos com ratos machos demonstraram um aumento da imunorreatividade para c-fos na AMePDM depois de ter ocorrido a intromissão peniana e, na AMePDI, após a ejaculação (COOLEN *et al.*, 1997), evidenciando que as diferentes regiões deste subnúcleo estão envolvidas com comportamentos sexuais distintos nestes animais. Estes dados indicam também, que a AMePD participa da modulação do comportamento sexual de roedores e em parte é responsável pelas alterações da atividade copulatória masculina encontrada após lesão ampla da AMe. Igualmente vão ao encontro dos experimentos que utilizaram a implantação de hormônios sexuais na AMePD e evidenciaram que estes esteróides estimulavam a atividade de cópula em hamsters e ratos (RASIA FILHO *et al.*, 1991; WOOD; NEWMAN; 1995; NEWMAN, 2002; HUDDLESTON *et al.*, 2004).

Para completar, a AMe também apresenta um papel inibitório sobre o comportamento maternal de ratas (VOOCHTELO; KOOLHAAS, 1987; TAKAHASHII; GLADSTONE, 1998). Essa inibição envolve eferências para os núcleos hipotalâmicos anterior e VMN, em um circuito neural que afeta tal comportamento também via processamento de informações olfativas (SHEEHAN *et al.*, 2001). Ratas com lesão na AMe reduzem o contato com sua prole, enquanto exposição aos filhotes promove a ativação de c-fos nesta região em ratas intactas (KIRKPATRICK *et al.*, 1994a; b). E, mais especificamente, foi demonstrado que o comportamentos maternal e o defensivo envolvem a AMePD em ratas (LONSTEIN *et al.*, 2000; SHEEHAN *et al.*, 2000). Por exemplo, a presença de filhotes em uma mesma caixa causa repulsa em fêmeas nulíparas ao mesmo tempo em que tem a capacidade de gerar

comportamento maternal em ratas múltiparas. Em ambos os casos a AMePD apresentou imunorreatividade para c-fos, o que sugere seu envolvimento na inibição do comportamento maternal e na estimulação do comportamento de defesa desses animais (SHEEHAN *et al.*, 2000). Provavelmente os hormônios gonadais podem alterar a atividade da AMePD, que em associação com áreas olfativas e hipotalâmicas interconectadas, e em um contexto de experiência maternal prévia, modulam a ocorrência do comportamento apropriado da fêmea de acordo com as circunstâncias ambientais (GUILLAMÓN; SEGOVIA, 1997; PITKÄNEN, 2000; SHEEHAN *et al.*, 2000; RASIA-FILHO *et al.*, 2004).

E, com o que se conseguiu associar hodologia neural com função, a AMe em conjunto com a área septal lateral, a área pré-óptica medial (MPOA), o hipotálamo anterior, o VMN e o hipotálamo ventro-lateral, a substância cinzenta periaqueductal e o tegmento adjacente formam um circuito integrado que influencia não somente os comportamentos sexual de machos e fêmeas e o comportamento maternal, mas também outros comportamentos relacionados com a reprodução, com os de marcação territorial, agressão por invasão territorial e agressão maternal (NEWMAN, 1999; 2002). Esses circuitos são anatomicamente e reciprocamente interconectados (SIMERLY; SWANSON, 1988; MARAGOS *et al.*, 1989; CANTERAS *et al.*, 1994; 1995; COOLEN; WOOD, 1998) e também possuem grupos celulares com receptores para hormônios gonadais (RESS *et al.*, 1980; COTTINGHAM; PFAFF, 1986; COMMIS; YAHR, 1985; SIMERLY *et al.*, 1990; WOOD; NEWMAN, 1995b).

1.3 CITOARQUITETURA DA AMÍGDALA MEDIAL E ORGANIZAÇÃO DA AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-DORSAL

Estudos recentes da citoarquitetura da AMe revelaram que esta região está dividida em uma parte principal, que é constituída pela AMeAD, que possui neurônios com tamanhos variados; pela AMeAV, que é descrita como um subnúcleo pequeno, densamente ocupado por neurônios de tamanho médio; pela AMePD, que está localizada na parte caudal do núcleo e apresenta grupamentos celulares organizados em três colunas orientadas paralelamente à superfície lateral do núcleo, como anteriormente mencionado; e pela AMePV, com células isomórficas (de OLMOS *et al.*, 2004).

Experimentos realizados em gatos, cachorros, camundongos e ratos evidenciaram, pela técnica de Golgi, uma morfologia neuronal relativamente simples e muito similar na AMe dessas espécies (McDONALD, 1992). Os neurônios são do tipo multipolar, com corpos celulares ovais ou fusiforme (KAMAL; TÖMBOL, 1975; GOMES; NEWMAN, 1991; McDONALD, 1992; RASIA-FILHO *et al.*, 1999) e com tamanhos que variam de pequeno, com cerca de 8-10 μm de diâmetro, até médio, com aproximadamente 10-15 μm nesta medida (McDONALD, 1992; RASIA FILHO *et al.*, 1999). Os neurônios multipolares característicos dessa região são do tipo bipenachados (tradução livre para “bitufted”, do inglês) os quais possuem 2 ramos dendríticos primários que se originam em pólos opostos do soma neuronal (RASIA FILHO *et al.*, 1999; 2004), ou do tipo estrelado, classificados assim por possuírem 3 ou mais ramos dendríticos primários (JONES; COWAN, 1983; RASIA FILHO *et al.*, 1999; 2004).

A arborização dendrítica é tida como esparsa, com ramos dendríticos grossos, razoavelmente retilíneos, longos ou de comprimento variável que se irradiam para direções variadas (NARKIEWICZ *et al.*, 1978; de OLMOS, 1985; GOMEZ; NEWMAN, 1991; McDONALD, 1992; RASIA FILHO *et al.*, 1999; 2004). Muitos dendritos estendem-se ao longo da superfície pial de forma perpendicular ou oblíqua. Alguns deles, normalmente os das células do tipo bipenachados, são orientados paralelamente às fibras da estria terminal adjacente (McDONALD, 1992; RIGOTTI, 2002). A densidade de espinhos dendríticos observada nos neurônios das subregiões da AMe varia de pouca a moderada (NARKIEWICZ *et al.*, 1978; MILHOUSE; de OLMOS, 1981; RASIA-FILHO *et al.*, 2004). Espinhos dendríticos do tipo pleomórficos são encontrados na AMeAD, AMePD e AMePV (RASIA FILHO *et al.*, 2002; 2004, RIGOTTI, 2002). A parte celular da AMe é rodeada, no seu lado ventral e medial, por uma “camada molecular” constituída de células mais dispersas (NISHIZUKA; ARAI, 1983) e que se estreita dorsalmente e rostralmente até desaparecer por completo na região da AMeAD (de OLMOS *et al.*, 2004), o que corresponde ao feixe de axônios que forma a via eferente do núcleo próprio da via olfativa acessória (SCALIA; WINANS, 1975).

Os axônios da AMe dirigem-se medialmente em direção aos núcleos basais do complexo amigdalóide ou em direção à estria terminal, sendo classificados como axônios de projeção longa (VALVERDE, 1962; KAMAL; TÖMBOL, 1975). Inicialmente geram um campo denso terminal em outras regiões da amígdala. Algumas fibras estendem-se lateralmente para a área piriforme e núcleos endopiriformes, caudalmente para a área de transição piriforme e para a formação hipocampal e, rostralmente, para o estriado, tubérculo olfativo e bulbo olfativo acessório. A maioria dos axônios de projeção extra-amigdalóide deixa a AMe via estria terminal ou via “ansa peduncularis” (via amígdalo-fugal) indo, então, em direção a regiões

telencefálicas ou diencefálicas. A AMeAD e a AMePV utilizam como via principal a “ansa peduncularis” enquanto a AMePD utiliza-se da estria terminal como via eferente preponderante (de OLMOS *et al.*, 2004).

A neurogênese da amígdala medial se dá aproximadamente até o 16º dia de vida intra-uterina, e se inicia antes nas regiões anterior e ventral, o que provavelmente relaciona-se com o estabelecimento de conexões com o sistema olfativo (BAYER, 1980). Neste contexto, a região anterior da AMe parece ser influenciada principalmente por informações olfativas e a região posterior pelos hormônios gonadais, embora haja receptores para esses esteróides em ambas regiões mencionadas (WOOD; NEWMAN, 1995). Tal afirmação baseia-se no fato de que a AMe possui grandes concentrações de receptores para hormônios gonadais e, embora receptores para androgênios estejam presentes na parte anterior deste núcleo, a maior concentração destes se dá na AMePV e na AMePD (SIMERLY *et al.*, 1990; GRÉCO *et al.*, 1998). Ainda, a concentração de receptores do tipo α e β para estrógenos é maior na AMePD em relação aos demais subnúcleos da AMe (LI *et al.*, 1997; SHUGHRUE *et al.*, 1997; ÖSTERLUND *et al.*, 1998).

A testosterona é convertida em estradiol pela enzima aromatase e, em diidrotestosterona (DHT), pela 5- α -redutase. Ambas as enzimas são encontradas na AMe (SHINODA *et al.*, 1994; GORSKI, 2000). Em ratos o estradiol possui ação relevante na masculinização do SN (KELLY, 1991; NELSON, 1995). É interessante notar que o bloqueio farmacológico de receptores de andrógenos na AMe não altera o comportamento sexual de machos (McGINNIS *et al.*, 1996), mas a implantação de estradiol na AMe de ratos e hamsters castrados é eficiente para aumentar a atividade copulatória desses animais (RASIA-FILHO *et al.*, 1991; WOOD; NEWMAN, 1995). Hamsters machos castrados e que receberam estradiol ou DHT na região posterior da

AMe demonstraram que o comportamento de monta daqueles que receberam DHT não foi diferente dos castrados e tratados com veículo. Por outro lado, os machos que foram tratados com estradiol apresentaram um aumento da atividade sexual copulatória e não copulatória em relação aos demais grupos estudados. Esses resultados sugerem que a facilitação da testosterona no comportamento sexual modulado pela AMe posterior é mediado pela aromatização a estradiol nesses animais (WOOD, 1996). Assim, os receptores para hormônios gonadais na AMePD podem estar envolvidos na modulação do comportamento sexual masculino e contribuir para a plasticidade neuro-glial mediada por esses esteróides nesta região (COOKE *et al.*, 2003).

É notável que a maioria dos grupos celulares sexualmente dimórficos estejam localizados em regiões hipotalâmicas e em outras regiões do sistema límbico. Muitos desses núcleos são amplamente interconectados e expressam uma grande quantidade de receptores para os esteróides gonadais, o que sugere que tais áreas cerebrais estejam envolvidas com funções correlacionáveis e sob a influência de tais hormônios (deVRIES; SIMERLY, 2002). É o caso da AMe, e mais especificamente da AMePD, nosso “alvo” neste estudo, a qual é uma área sexualmente dimórfica em ratos e que, juntamente com outras regiões telencefálicas basais, possui conexões com regiões hipotalâmicas responsáveis pela modulação do comportamento reprodutivo, como é o caso da MPOA, do VMN, do AVPV e do núcleo pré-mamilar ventral (VPM) (CANTERAS *et al.*, 1995; PETROVICH *et al.*, 2001; SIMERLY, 2004).

A AMe também possui uma variedade de transmissores químicos e neuromoduladores. Muitos neuropeptídeos são encontrados nos neurônios da AMe: colecistoquinina (CCK), substância P, vasopressina, hormônio liberador de corticotrofinas, angiotensina II, somatostatina, neuropeptídeo Y, ocitocina, peptídeo intestinal vasoativo, opióides endógenos,

neurotensina, galanina, hormônio liberador de gonadotrofinas e polipeptídeo natriurético atrial (FRANKFURT *et al.*, 1985; MICEVYCH *et al.*, 1988; MALSBUY; McKAY, 1989; De VRIES, 1995; VEINANTE; FREUND-MERCIER, 1997; GLOOR, 1997; de OLMOS *et al.*, 2004). Muitos neurônios da AMe também expressam a enzima glutamato descarboxilase (GAD), que é responsável por transformar o glutamato em ácido gama-aminobutírico (GABA), e o próprio GABA (SWANSON; PETROVICH, 1998).

Algumas diferenças podem ser observadas, no que diz respeito à quantidade e distribuição desses neurotransmissores entre hamster e ratos. Por exemplo, muitos neurônios de hamsters apresentam a enzima tirosina-hidroxilase, o que não é observado em ratos (ASMUS *et al.*, 1992). Por outro lado, células nervosas contendo arginina-vasopressina são frequentemente encontradas em ratos mas não em hamster (MALSBUY; McKAY, 1994; NEWMAN, 1999). É notável também que existam diferenças em relação à distribuição destes neurotransmissores nos diferentes subnúcleos da AMe. Substância P, CCK e angiotensina II encontram-se preferencialmente nos neurônios da AMePD (SIMERLY; SWANSON, 1987; SIMERLY *et al.*, 1989; LIND; GANTEN, 1990) enquanto neurônios que contém o hormônio liberador de corticotrofina são mais abundantes nos demais subnúcleos (SWANSON *et al.*, 1983; SAKANAKA *et al.*, 1986). Já a vasopressina localiza-se principalmente na AMeAD (URBAN *et al.*, 1990), embora sua presença também seja abundante na AMePD (NEWMAN, 1999). A presença de neuropeptídeo Y é aparentemente uniforme entre os subnúcleos da amígdala medial (McDONALD, 1989).

A AMePD apresenta diferença no número de sinapses (NISHIZUKA; ARAI, 1981; 1983) e de neurotransmissores entre os sexos. Por exemplo, machos possuem maior quantidade de células imunorreativas à CCK e à substância P (MALSBUY; McKAY, 1989; 1994;

MICEVYCH *et al.*, 1988) e maior quantidade de neurônios expressando vasopressina (de VRIES; Al SHAMMA, 1990; SZOT; DORSA, 1993) do que fêmeas. Isto pode sugerir que o processamento e a transmissão de informações a partir da AMePD possa também ser sexualmente dimórfico (deVRIES; SIMERLY, 2002).

Não é surpreendente, portanto, que a AMePD desempenhe importante função na modulação do comportamento sexual de ratos machos e fêmeas e, aparentemente, nos eventos neuroendócrinos que acompanham esse comportamento, uma vez que é influenciada diretamente por hormônios esteróides gonadais, integra estímulos quimiossensoriais, olfativos e de ferômonios junto com aferências somatosensoriais dos órgãos genitais (WOOD; NEWMAN, 1995; NEWMAN, 2002).

1.4 AÇÃO DOS HORMÔNIOS GONADAIS NO SISTEMA NERVOSO

Os esteróides sexuais têm por condição modificar a morfologia e as propriedades fisiológicas dos neurônios do SNC (NISHIZUKA *et al.*, 1981; NABEKURA *et al.*, 1986; McEWEN *et al.*, 1991; LORENZO *et al.*, 1992; NELSON, 1995; RASIA FILHO *et al.*, 1999; 2004). Além de causar modificações na morfologia e bioquímica neural, esses hormônios modulam a função neuroendócrina, influenciam comportamentos reprodutivos e não reprodutivos (GOMEZ; NEWMAN, 1991; McEWEN *et al.*, 1991; WOOD; NEWMAN, 1995; LUCION *et al.*, 1996) e ainda contribuem para o desenvolvimento do dimorfismo sexual (MIZUKAMI *et al.*, 1983; NISHIZUKA *et al.*, 1983; HINES *et al.*, 1992; PILGRIM; REISERT, 1992; GUILLAMÓN; SEGOVIA, 1997; VINADER-CAEROLS *et al.*, 2000).

Como em outros tecidos-alvo, no SNC os esteróides gonadais atuam no genoma celular promovendo alterações na expressão gênica e na síntese protéica. Para tal, esses hormônios ligam-se a receptores localizados preferencialmente no núcleo celular, onde estabelecem contato com um sítio de reconhecimento que faz aumentar a replicação do DNA, culminando com o aumento da síntese protéica correspondente (MURDACH; GORSKI, 1991; TORAN-ALLERAND, 1995; McEWEN, 1999). Além desses efeitos ditos gênicos, esses hormônios podem causar efeitos não-gênicos, alterando o potencial de membrana e o metabolismo dos neurotransmissores químicos (McEWEN *et al.*, 1991). Por exemplo, em ratos machos, a castração levou a um aumento do período refratário dos neurônios hipotalâmicos (KENDRIC, 1983). Quando os efeitos ocorrem de segundos a minutos após a colocação do hormônio com a célula alvo, a ação é dita não-gênica e quando o efeito demora vários minutos ou dias a ação é considerada gênica (McEWEN *et al.*, 1991).

Classicamente, embora se admitam várias exceções, tem sido descrito que os hormônios gonadais atuam no SNC durante um período inicial “organizacional” para promover o desenvolvimento de mudanças a longo prazo na estrutura, bioquímica e fisiologia de áreas e circuitos sexualmente dimórficos. Subseqüentemente, na fase adulta, esses esteróides estimulam os circuitos já desenvolvidos (GOMEZ; NEWMAN, 1991; RASIA-FILHO *et al.*, 1999). Podem-se tomar como exemplos destes efeitos a masculinização da inervação, na medula espinal, da musculatura bulbo-cavernosa, que nos ratos se dá pelos receptores de andrógenos durante o período perinatal; e as ações neurotróficas da testosterona e do estradiol na AMePD por atuação em seus receptores específicos (GOMEZ; NEWMAN; 1991; MALSURY; McKAY, 1994; JOHANSEN *et al.*, 2004; RASIA-FILHO *et al.*, 2004).

Os esteróides sexuais influenciam uma variedade de características morfológicas, tais como: número de neurônios, tamanho neuronal, morfologia dendrítica (comprimento e arborização) e conexões sinápticas em diferentes regiões encefálicas de diferentes espécies. Além de promoverem a maturação neuronal e o crescimento de neuritos, propiciam a sinaptogênese e a formação de circuitos neurais (NISHIZUKA; ARAI, 1981a; NISHIZUKA; ARAI, 1982; TORAN-ALLERAND, 1984; ARNOLD; BREEDLOVE, 1985; ARNOLD; JORDAN, 1988; FRANKFURT *et al.*, 1990; GOULD *et al.*, 1990; GOMEZ; NEWMAN, 1991; WOOLEY; McEWEN, 1993). Por exemplo, a castração de ratos machos foi capaz de provocar uma diminuição na área do soma e no diâmetro dos dendritos primários de neurônios localizados no núcleo da medula espinal lombar relacionado à musculatura bulbo-cavernosa (ARNOLD; SASAKI, 1991).

Alterações na morfologia neuronal mediadas pela ação dos hormônios gonadais foram observadas nos neurônios da AME, sendo que o tamanho deste núcleo, o número de espinhos dendríticos e a quantidade de receptores nicotínicos é maior nos machos do que nas fêmeas, além de haver um maior número de sinapses diretamente sobre os ramos dendríticos e em seus espinhos também nos machos (NISHIZUKA; ARAI, 1981 a, b, 1983; HINES *et al.*, 1992; RASIA-FILHO *et al.*, 1999). Dentre os subnúcleos da AMe, está relatado que os hormônios gonadais masculinos afetam a morfologia e a função neuro-glial da AMePD (NEWMAN, 1999; RASIA-FILHO *et al.*, 1999; 2002; LONSTEIN *et al.*, 2000).

Um dos locais mais marcantes desta plasticidade neuronal dependente dos esteróides sexuais são os dendritos e seus espinhos, os quais são estruturas críticas para a atividade sináptica (SHEPHERD, 1996; NIMCHINSKY *et al.*, 2002). Os dendritos possuem uma função estrutural relacionada com a seleção e o estabelecimento de conexões (SHEPHERD, 1999) e a

arborização dendrítica desempenha um papel chave na integração de entradas e saídas sinápticas com a atividade intrínseca do neurônio (SHEPHERD, 1999; SEGAL; ANDERSON, 2000). Os dendritos apresentam forma e tamanhos variados e a diversidade da excitabilidade dendrítica aumenta com a sua variação morfológica e a distribuição de seus canais iônicos. Essas alterações podem ocorrer rapidamente ou a longo prazo, como por exemplo as permanentes mudanças na função dendrítica mediadas pela formação e crescimento de espinhos dendríticos (HÄUSSER *et al.*, 2000).

É neste sentido que o estudo dos espinhos dendríticos tem recebido cada vez mais atenção dada sua relevância para a atividade celular e para sua correlação funcional com o aporte de informações sinápticas aferentes. Os espinhos dendríticos são protusões membranosas que representam o local terminal de cerca de 90% das sinapses excitatórias do SNC e contêm receptores para neurotransmissores, várias organelas e um sistema de sinalização essencial para a função sináptica relacionada com a plasticidade neuronal. De fato, em alguns estudos têm-se demonstrado que um espinho pode representar um local de sinapse, pois geralmente está conectado com um único axônio (SHEPHERD, 1996; 1999; KANDEL, 2000). Por dados de microscopia eletrônica os espinhos são referidos como especializações pós-sinápticas (BRADLEY *et al.*, 1999; WOOLF *et al.*, 1999). Podem, ainda, promover um isolamento bioquímico para as sinapses, realizar síntese protéica local e apresentar um papel neuroprotetor por graduar os níveis intracelulares de cálcio no interior do neurônio (GUTHRIE *et al.*, 1991; KOCH; ZADOR, 1993; GOLD; BEAR, 1994; HARRIS; KATER, 1994; SEGAL, 1995,a; b; SHEPHERD, 1996; KORKOTIAN; SEGAL, 1998).

A morfologia clássica dos espinhos dendríticos consiste de uma cabeça conectada à haste dendrítica por meio de um pequeno pescoço (NIMCHINSKY *et al.*, 2002). Há, porém,

variações morfológicas descritas na literatura e a nomenclatura mais utilizada divide os espinhos em três classes: espinhos do tipo “cogumelo”, que possuem uma cabeça grande contrastando com um pescoço pequeno; espinhos finos, com uma cabeça pequena e um pescoço estreito; e, espinhos arredondados e menos protusos, que não possuem uma clara diferenciação entre a cabeça e o pescoço (PETERS; KAISERMAN-ABRAMOF, 1970). Outros autores têm adicionado outra categoria a esta lista, o espinho com aspecto de filopódio, encontrado durante o desenvolvimento (NIMCHINSKY *et al.*, 2002). A distribuição, a densidade, a forma e o tamanho destes espinhos estão diretamente relacionados à função da célula nervosa (WOOLF *et al.*, 1991).

Para estudo dos espinhos dendríticos e a ação dos hormônios sexuais no SNC, experimentos prévios empregaram a técnica de Golgi. Esta técnica, que é caracterizada pela impregnação do tecido nervoso pelo nitrato de prata, quando bem sucedida permite visualizar corpo celular, axônio, dendritos e espinhos de aproximadamente 1 a 10% de todos neurônios de determinada região do SNC (RAMÓN Y CAJAL, 1909; VALVERDE, 1970; SCHEIBEL; SCHEIBEL, 1978). O procedimento é realizado colocando-se uma amostra de tecido nervoso em uma solução de dicromato de potássio e nitrato de prata. Desta forma, por razão desconhecida e aleatória, os neurônios assumem uma cor parda ou preta contrastando com um fundo amarelo-alaranjado, o que permite identificar sua morfologia (SCHEIBEL; SCHEIBEL, 1978).

Com base nisso, a técnica foi utilizada para demonstrar a mudança na quantidade de espinhos dendríticos na formação hipocampal de ratas adultas, onde há relativamente mais estudos do que em machos (WOOLLEN; McEWEN, 1993). Por exemplo, em ratas adultas estudadas ao longo do ciclo estral, a densidade de espinhos dendríticos foi diretamente

proporcional à variação dos níveis hormonais: em pró-estro, quando os esteróides sexuais estão elevados, houve aumento no número de espinhos dendríticos; em estro, quando tais hormônios estão baixos, verificou-se diminuição no número de espinhos e, em níveis hormonais intermediários, durante a fase de diestro, o número de espinhos dendríticos foi igualmente intermediário. Essa variação na densidade dos espinhos dendríticos foi mais significativa na região CA1 que em outras regiões do hipocampo (WOOLLEY *et al.*, 1990). Ainda, a densidade de espinhos dendríticos nos neurônios do VMN mostrou-se significativamente menor em ratas ovariectomizadas quando comparadas às que foram ovariectomizadas e tratadas com estrógeno somente, ou tratadas com estrógeno e progesterona ou, ainda, em ratas intactas (McEWEN *et al.*, 1990). Outro estudo com ratas ovariectomizadas mostrou que, após receberem tratamento com estradiol, ocorria um aumento de 48% na densidade dos espinhos dendríticos na região ventro-lateral do VMN (CALIZO; FLANAGAN-CATO; 2000). Estudo da densidade de espinhos dendríticos nos subnúcleos da AMe durante as diferentes fases do ciclo estral de ratas verificou que há variação na densidade desses espinhos na AMeAD, na AMePV e na AMePD. Na fase de diestro, e ocorrendo de forma mais acentuada na AMePD, há maior número de espinhos dendríticos, o que sugere também uma plasticidade neural induzida pelos esteróides sexuais na morfologia e fisiologia do AMe, embora em situação oposta à descrita no hipocampo e no hipotálamo. É interessante notar que os machos apresentaram maior densidade de espinhos dendríticos nas três subregiões da AMe quando comparados às fêmeas ao longo do ciclo estral (RASIA-FILHO *et al.*, 2004).

Já em hamsters machos a gonadectomia resultou na diminuição da área do soma neuronal, da arborização dendrítica, do percentual de dendritos terciários, do comprimento dos dendritos terminais e da densidade de espinhos dendríticos em neurônios da AMe quando comparados a

grupo controle (GOMEZ; NEWMAN, 1991). Em ratos machos adultos demonstrou-se que a testosterona mantém a estrutura da AMe e organiza seu desenvolvimento pós-natal (MALSBUY; McKAY, 1994). Por outro lado, de forma interessante, ratos machos castrados em idade adulta e implantados com cápsula subcutânea contendo testosterona por dois meses, para gerar níveis plasmáticos fisiológicos deste hormônio, apresentaram uma redução significativa no comprimento, volume e número de ramos terminais dendríticos de neurônios do núcleo arqueado hipotalâmico em comparação ao seu grupo controle, castrados e com cápsula sem hormônio. A densidade de espinhos dendríticos não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados (DANZER *et al.*, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Com base na revisão realizada até aqui, onde a AMePD é tida como uma região encefálica envolvida na modulação do comportamento sexual masculino e, que esta modulação se dá em grande parte pelas alterações na morfologia neuronal mediadas pela ação dos esteróides gonadais, surgiram as questões que motivaram este trabalho:

- Como a AMePDI está envolvida com a ejaculação enquanto a AMePDM está relacionada com a intromissão peniana durante a relação sexual em ratos, poder-se-ia elaborar a hipótese de que uma distinta densidade de espinhos dendríticos poderia ser encontrada em cada uma dessas subregiões, dando a base para atividades sinápticas diferentes elaborarem comportamentos também diferentes.

- Ainda não está relatado o que ocorre com a densidade dos espinhos dendríticos na AMePD após a retirada dos hormônios gonadais em machos. Sabe-se que há diferença entre machos e fêmeas neste parâmetro, mas não há dados na literatura sobre os efeitos da orquiectomia, a curto ou a longo prazo na densidade de espinhos dendríticos da AMePD de machos. Considerando-se o fato da AMe ser um local sexualmente dimórfico, a AMePD ter grande quantidade de receptores para hormônios gonadais e esses hormônios estarem implicados com plasticidade neural e ação neurotrófica, tanto no período “organizacional” como na idade adulta, esperar-se-ia que a castração promovesse uma diminuição na densidade dos espinhos dendríticos. Com isso poder-se-ia, também, comprovar se a castração feita em

idade adulta é capaz de modificar a densidade de espinhos dendríticos na AMePD com pouco tempo (8 dias) ou após maior prazo (90 dias) depois da retirada cirúrgica dos testículos.

2.2 Específicos

- 1) Estudar a densidade de espinhos dendríticos de ratos machos adultos intactos nas porções medial e lateral da AMePD, utilizando o protocolo de Golgi.
- 2) Avaliar a densidade dos espinhos dendríticos na AMePD de ratos machos castrados em idade adulta, e estudados, um grupo 8 dias após a gonadectomia e, outro grupo 90 dias após tal procedimento, utilizando o mesmo procedimento histológico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (entre 3 e 5 meses de idade) procedentes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais permaneceram em grupos de no máximo 5 ratos por caixa, com livre acesso à alimentação e à água. A temperatura foi mantida em aproximadamente 22°C, em ciclo claro/escuro de 12 horas cada.

Como regra, procurou-se minimizar o número de animais estudados e seu sofrimento. Para isso todos os animais foram manipulados de acordo com as leis internacionais de cuidado e ética com animais em laboratório (Diretriz do Conselho da Comunidade Européia de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC) e pelas normas brasileiras de ética para experimentação animal. Dadas às dificuldades técnicas do método empregado, de N = 60 animais obtivemos 30 ratos divididos nos grupos experimentais descritos abaixo.

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para este estudo, os ratos foram divididos em 5 grupos experimentais (com n = 6 em cada grupo): 1) machos adulto intactos; 2) machos submetidos à castração fictícia realizada quando adultos e estudados 8 dias após a cirurgia (CASTR FICT 8d); 3) machos castrados em idade adulta e estudados 8 dias após a cirurgia (CASTR 8d); 4) machos submetidos à castração

fictícia em idade adulta e estudados 90 dias após a cirurgia (CASTR FICT 90d) e 5) machos castrados quando adultos e estudados 90 dias após a gonadectomia (CASTR 90d).

Para a orquiectomia, os ratos foram anestesiados por via intra-peritoneal (i.p) com cetamina (90 mg/Kg; König, Argentina), e xilasina (10 mg/Kg; Vallée, Brasil), e operados por via transescrotal. Com o animal em decúbito dorsal, foi realizada uma incisão transversal única de cerca de 2 cm na bolsa escrotal. Após isso, através de um corte único que interessava diversos planos, obtinha-se a extrusão dos testículos. Nos ramos vasculares para a gônada e no ducto deferente foram atados nós para só então ser feita a gonadectomia. Posteriormente, suturavam-se, com fio cirúrgico os planos mais profundos e por fim a pele do escroto (RASIA-FILHO; LUCION, 1996). Após a castração os animais retornaram ao biotério, onde permaneceram até o momento da realização da técnica de Golgi.

Todos os ratos dos grupos controle submetidos à gonadectomia fictícia foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico feito nos ratos castrados, porém seus testículos não foram removidos. Esses ratos foram estudados na mesma época pós-operatória dos ratos gonadectomizados.

3.3 PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO

A técnica de Golgi foi realizada de acordo com Gabbott e Somogyi (1984). Para realização desta técnica os ratos foram anestesiados com tiopental sódico por via i.p. (50 mg/Kg; Cristália, Brasil). A seguir receberam 1000 UI de heparina e foram perfundidos por via transcardíaca com paraformaldeído (Reagen, Brasil) a 4% e ácido pícrico a 1,5% diluídos em tampão fosfato 0,1 M e pH = 7,4. A perfusão do encéfalo do rato foi feita utilizando-se uma bomba peristáltica e,

após esta, os encéfalos foram retirados e pós-fixados na mesma solução fixadora por 24 horas. Posteriormente, foram seccionados em vibrátomo (Leica, Alemanha), obtidos cortes coronais de 200 μm de espessura, utilizando-se como referencial anatômico o atlas das coordenadas estereotáxicas do encéfalo do rato elaborado por Paxinos e Watson (1998). Os cortes foram imersos em solução de dicromato de potássio a 3% (Merck, Alemanha), dissolvido em água bidestilada e sem íons, por 24 horas e ao abrigo da luz. Após, as secções foram lavadas em água destilada, colocadas entre lamínulas e submersas em nitrato de prata a 1,5% (Merck, Alemanha), também dissolvido em água bidestilada e sem íons, resguardados da luz por no mínimo 48 horas. Os cortes foram, então, lavados em água destilada, desidratados em diluições crescentes de álcool, clareados em xilol, montados em lâminas histológicas e cobertos com bálsamo do Canadá e lamínula. Todos os grupos experimentais foram submetidos às mesmas condições de execução metodológica acima descritas.

3.4 AQUISIÇÃO DOS DADOS

3.4.1 Localização da AMePD e seleção dos neurônios para os desenhos dos espinhos dendríticos

Para a realização dos desenhos dos espinhos dendríticos foram selecionados os cortes histológicos contendo a AMePD que apresentavam aproximadamente o mesmo tamanho, enquanto aqueles que se apresentavam anormalmente retraídos após o procedimento histológico foram descartados. Devido ao fato do número de neurônios impregnados pela prata variar de uma secção para outra, ambos os lados da AMePD foram utilizados no presente estudo. A localização precisa da AMePD foi baseada nas descrições de Alheid e colaboradores

(1995) e Canteras e colaboradores (1995). Além disso, as secções contendo a AMePD foram projetadas, com auxílio de uma câmara clara acoplada a microscópio óptico (Olympus BX41, Japão), em desenhos esquemáticos de secções coronais do encéfalo do rato (PAXINOS; WATSON, 1998). Tal subregião foi estudada a uma distância entre 3,14 e 3,30 mm posterior à sutura bregmática, o que corresponde às figuras 32 e 33 do atlas utilizado (PAXINOS; WATSON, 1998), e que restringe bastante o número de cortes que podem ser utilizados.

Para serem selecionados para posterior estudo, os neurônios da AMePD deveriam obedecer os seguintes critérios de aceitação: a) ter seu soma neuronal localizado invariavelmente dentro da AMePD (e dentro das subdivisões medial e lateral) mas relativamente distante de suas bordas, como precaução para não coletar dados fora da área desejada; b) possuir soma neuronal visível e ter, no mínimo, segmentos dendríticos iniciais muito bem impregnados; c) ter bordas bem definidas e espinhos dendríticos claramente distinguíveis em relação ao fundo; e d) estar relativamente isolado dos demais neurônios impregnados para evitar um “emaranhado” de dendritos que poderia confundir a coleta de dados.

3.4.2 Desenho dos espinhos dendríticos

Após a localização da AMePD e a seleção dos neurônios, foram desenhados os espinhos que estavam nos primeiros 40 μm dendríticos do soma neuronal em aumento de 1000 X. Foram selecionados os primeiros 40 μm dendríticos para o desenho dos espinhos porque esses se mostraram representativos da densidade ao longo do restante do comprimento dendrítico até cerca de 160 μm de distância do soma na AMe posterior de ratas (RASIA-FILHO *et al.*, 2004).

Cada grupo experimental foi composto por 6 ratos. E, inicialmente, foram desenhados 8 ramos dendríticos distintos, um por neurônio, da porção lateral e mais 8 ramos da porção medial da AMePD, de cada animal do grupo de ratos intactos, totalizando 48 ramos por área estudada neste grupo. A seguir, nos grupos experimentais CASTR FICT 8d, CASTR 8d, CASTR FICT 90d e CASTR 90d foram desenhados 8 ramos dendríticos distintos de cada rato, novamente um dendrito por neurônio diferente, com um total de 48 ramos por grupo experimental.

3.4.3 Cálculo da densidade dos espinhos dendríticos

Os desenhos dos dendritos com seus respectivos espinhos foram digitalizados usando-se um “scanner” e tiveram seus comprimentos mensurados por um sistema de análise de imagem (Image Pro Plus 4.1, Media Cybernetics, EUA). A densidade de espinhos dendríticos foi definida como o número total de espinhos desenhados dividido pela unidade de comprimento do segmento dendrítico estudado (WOLLEY; McEWEN, 1993; RASIA-FILHO *et al.*, 1999).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por se enquadrarem nos requisitos para aplicação de testes paramétricos, os dados da densidade dos espinhos dendríticos dos neurônios localizados nas regiões medial e lateral da AMePD foram comparados pelo teste ‘t’ de Student (bilateral) e para dados pareados, uma vez que de cada rato obtiveram-se dados para as duas colunas deste subnúcleo.

Os dados da densidade de espinhos dendríticos da AMePD dos ratos CASTR 8d e dos ratos CASTR 90d, juntamente com seus respectivos grupos controles, foram comparados entre si utilizando-se o teste da análise da variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste *post*

de Bonferroni (ZAR, 2005). Em ambos casos o nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

DENSIDADE DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NA AMePD MEDIAL E LATERAL DE RATOS INTACTOS

O primeiro objetivo deste trabalho foi determinar se há diferença na densidade de espinhos dendríticos nas subregiões medial e lateral da AMePD, as quais diferem hodologicamente e funcionalmente em ratos. Fotomicrografias representativas de neurônios com seus espinhos dendríticos nas subregiões medial e lateral podem ser observadas nas Figuras 3A e 3B, respectivamente, e desenhos dos espinhos nos 40 μm dendríticos de tais grupos estão representados nas Figuras 4A e 4B. Conforme se observa na Figura 5, pela análise estatística empregada não há diferença estatisticamente significativa na densidade de espinhos dendríticos em neurônios localizados nas subregiões medial e lateral da AMePD quando comparadas entre si ($P = 0,55$).

DENSIDADE DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NA AMePD DE RATOS CASTRADOS

Como as subregiões medial e lateral não diferiram entre si em relação à densidade de espinhos dendríticos, pelo menos no que tange à amostra estudada, investigou-se o efeito da castração, a curto prazo e a longo prazo, sobre a densidade dos espinhos dendríticos da AMePD como um todo, sem separação entre as subregiões. Fotomicrografias e desenhos dos espinhos nos 40 μm dendríticos representativos dos grupos CASTR FICT 8d e CASTR 8d são apresentadas nas Figuras 6A e 6B e 7A e 7B, respectivamente. Por sua vez, as Figuras 8A e 8B

e, 9A e 9B correspondem aos espinhos dendríticos de neurônios da AMePD dos grupos CASTR FICT 90d e CASTR 90d, respectivamente.

Conforme se pode observar na Figura 10, há uma diferença estatisticamente significativa nos valores da densidade dos espinhos dendríticos entre os grupos estudados [$F(3,191) = 83,778$; $P < 0,01$]. O teste *post-hoc* permitiu detectar que o grupo CASTR FICT 90d tem maior densidade de espinhos dendríticos na AMePD em comparação aos grupos CASTR FICT 8d, CASTR 8d, e CASTR 90d, ($P < 0,01$ em todos os casos). Já, o grupo CASTR 90d possui menor densidade de espinhos dendríticos quando comparados aos grupos CASTR 8d e CASTR FICT 8d ($P < 0,01$), mas os grupos CASTR FICT 8d e CASTR 8d não diferem entre si em relação à densidade de espinhos dendríticos na AMePD ($P > 0,05$).

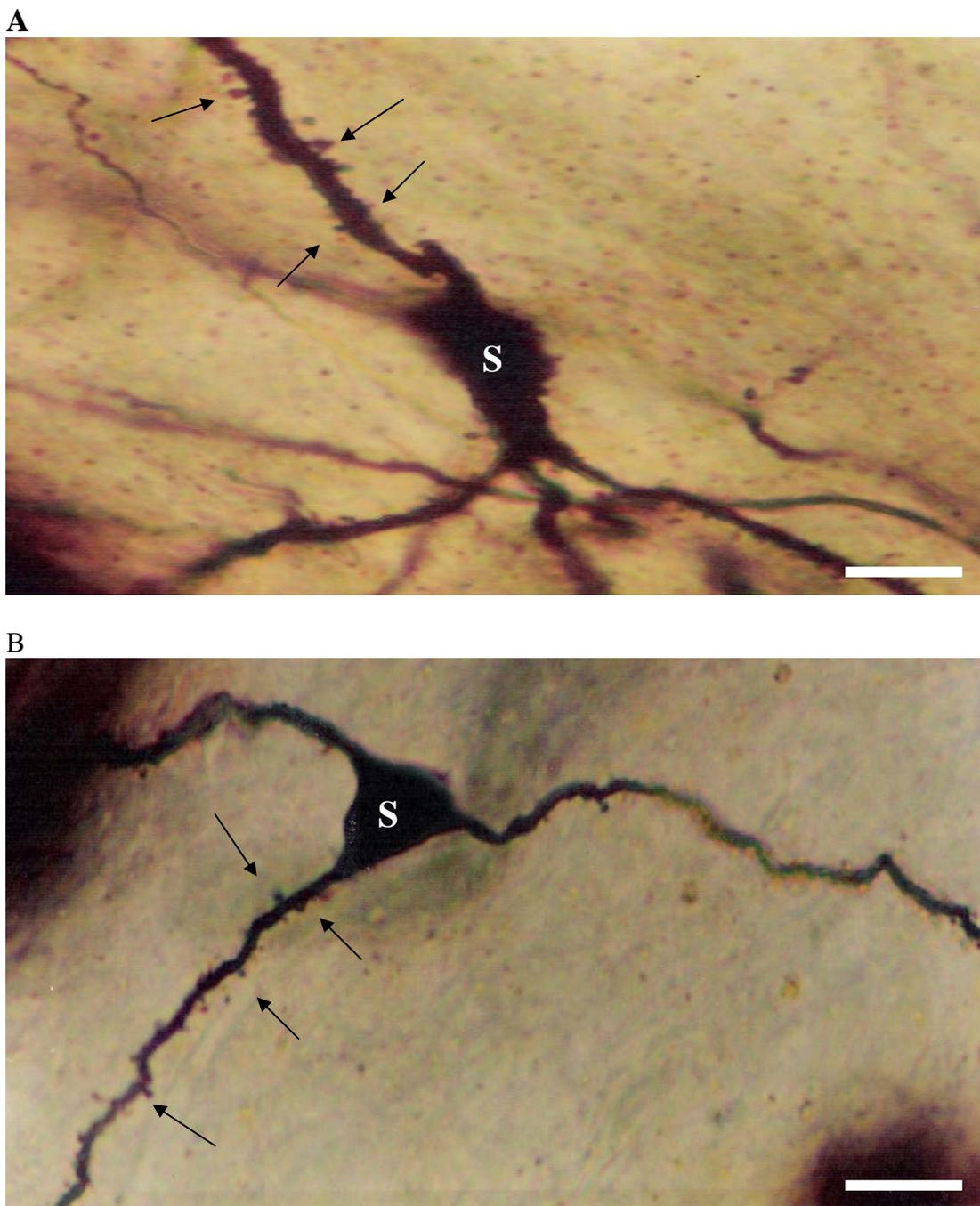


Figura 3– Fotomicrografias de neurônios da amígdala medial póstero-dorsal (AMePD) de rato macho intacto, impregnados pela técnica de Golgi. Em **A** observa-se neurônio do tipo bipenachado localizado na AMePD medial e, em **B**, neurônio estrelado localizado na AMePD lateral. Notar que em ambas fotomicrografias, embora em menor aumento, já é possível observar a presença de espinhos dendríticos. As setas nas figuras apontam espinhos dendríticos pleomórficos. S = soma neuronal. Barra = 10 μm .

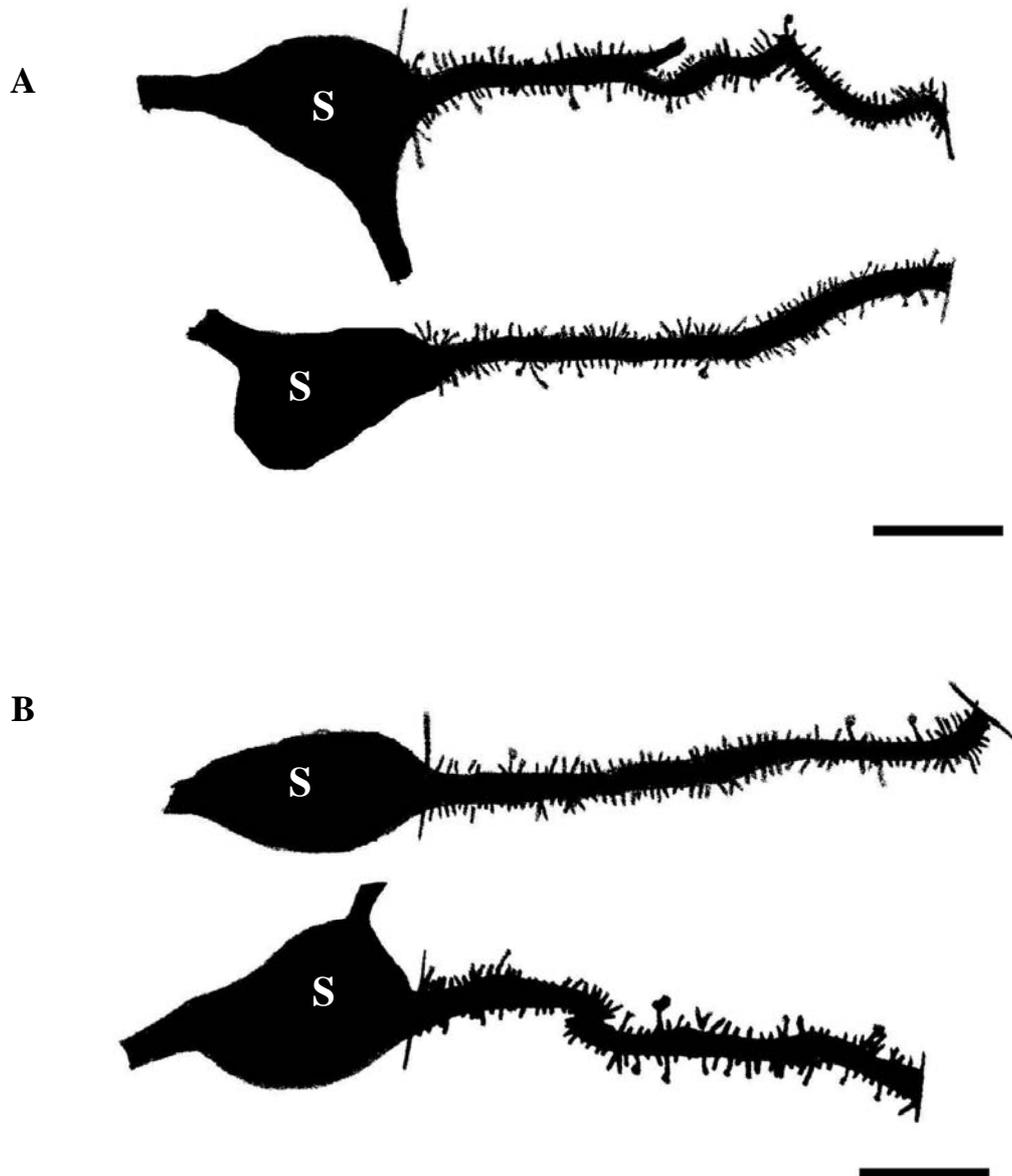


Figura 4 – Desenhos dos espinhos presentes nos primeiros 40 μ m dendríticos nos neurônios da amígdala medial pósterio-dorsal (AMePD) de ratos intactos impregnados pela técnica de Golgi. Em **A** observam-se os espinhos dendríticos de neurônios dos tipos estrelado e bipenachado da região medial da AMePD e, em **B**, os espinhos dendríticos de neurônios bipenachado e estrelado da região lateral da AMePD. Notar a quantidade de espinho aparentemente idêntica entre os neurônios das subregiões estudadas. A morfologia dos espinhos dendríticos pode não ser idêntica à real por razões técnicas. S = soma neuronal. Barra = 10 μ m.

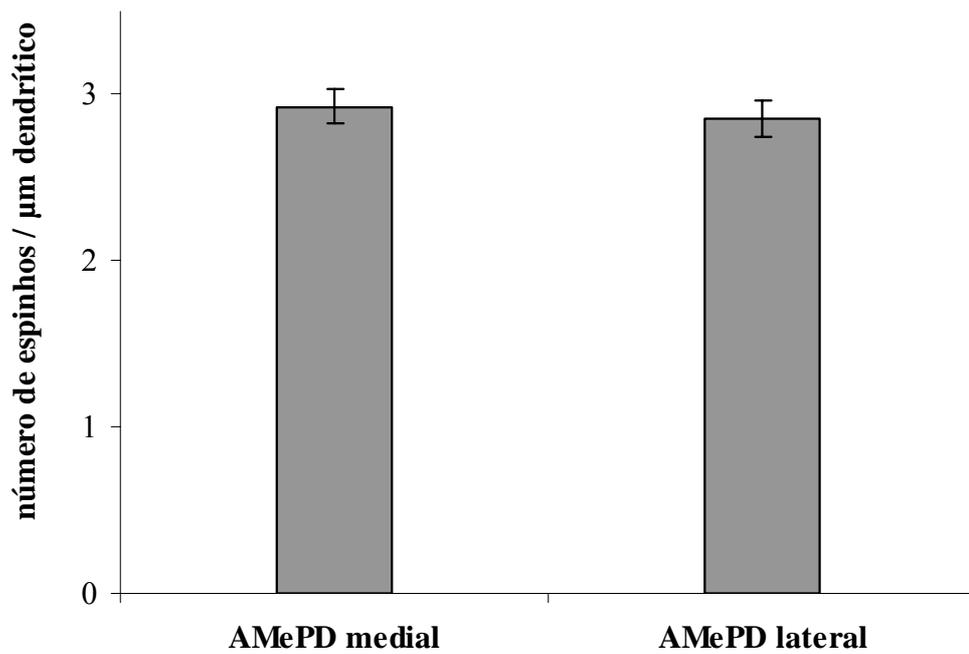


Figura 5 – Densidade de espinhos dendríticos (média \pm epm) das regiões medial e lateral da amígdala medial pósterio-dorsal de ratos adultos e intactos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P = 0,55$).

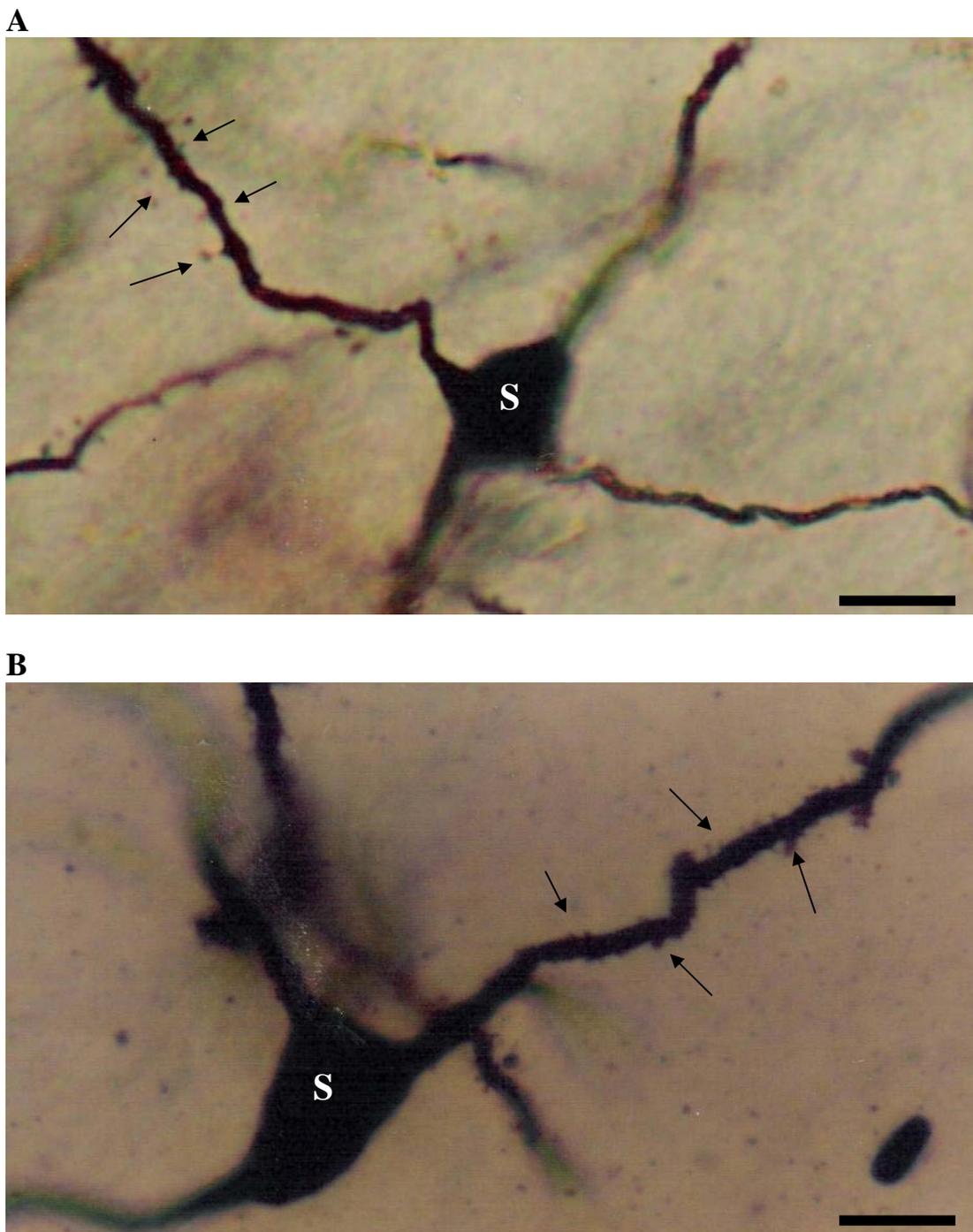


Figura 6 - Fotomicrografias de neurônios da amígdala medial póstero-dorsal de ratos machos adultos impregnados pelo método de Golgi. Em **A** observa-se neurônio do tipo estrelado de rato submetido à castração fictícia de curta duração (8 dias) e, em **B**, neurônio estrelado de rato submetido à orquiectomia e estudado 8 dias após a cirurgia. Observar que ambos neurônios apresentam espinhos dendríticos pleomórficos e que a densidade de seus espinhos parece ser próxima quando comparada entre si. S = soma neuronal. Barra = 10 μm .

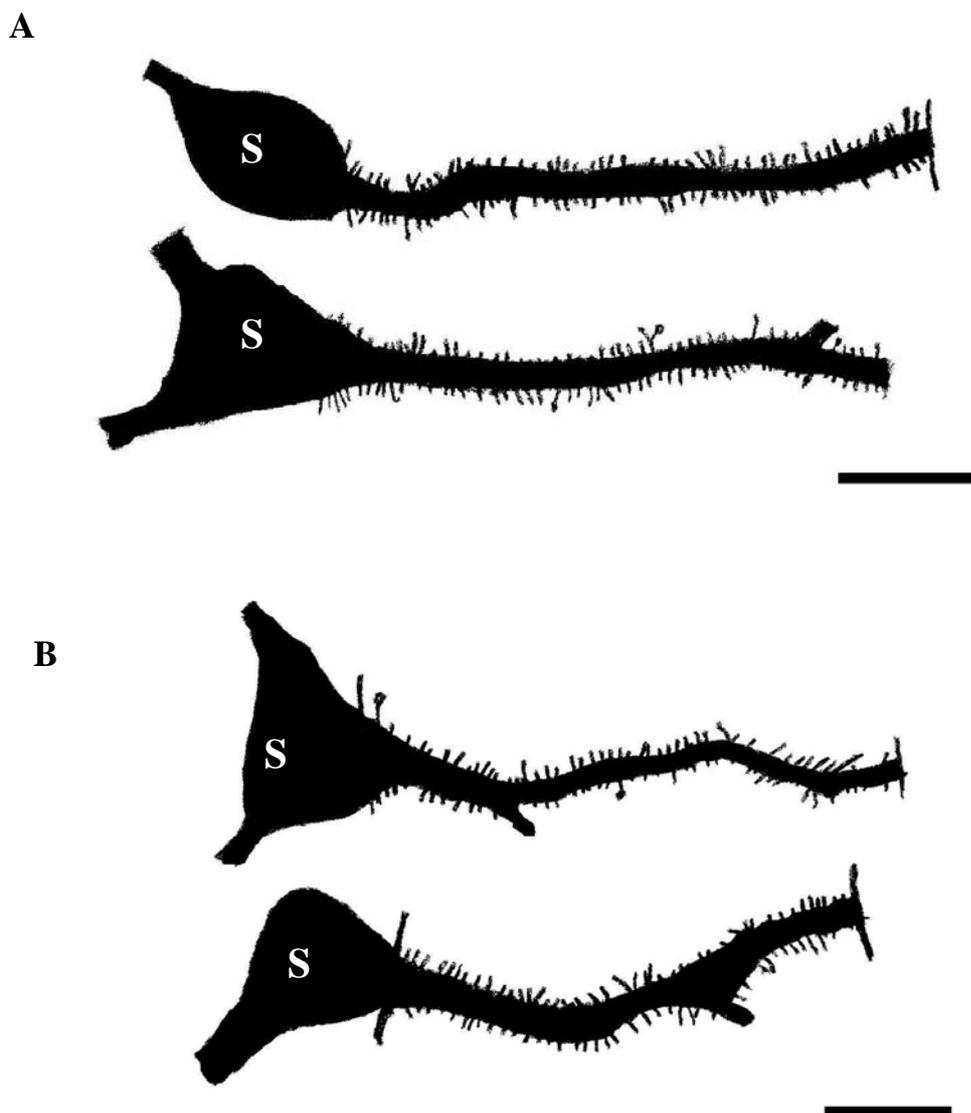


Figura 7 – Desenho dos espinhos dendríticos dos neurônios da amígdala medial pósterio-dorsal de ratos adultos impregnados pela técnica de Golgi. Em **A**, observam-se desenhos de espinhos de neurônios do tipo bipeachado e estrelado, respectivamente, de ratos submetidos à castração fictícia e estudados 8 dias após a cirurgia, e em **B**, de neurônios estrelado e bipeachado de ratos orquitectomizados e estudados 8 dias após o procedimento. Observar que em ambos grupos há similar densidade de espinhos dendríticos entre os neurônios. A morfologia dos espinhos dendríticos pode não ser idêntica à real por razões técnicas. S = soma neuronal. Barra = 10 μm .

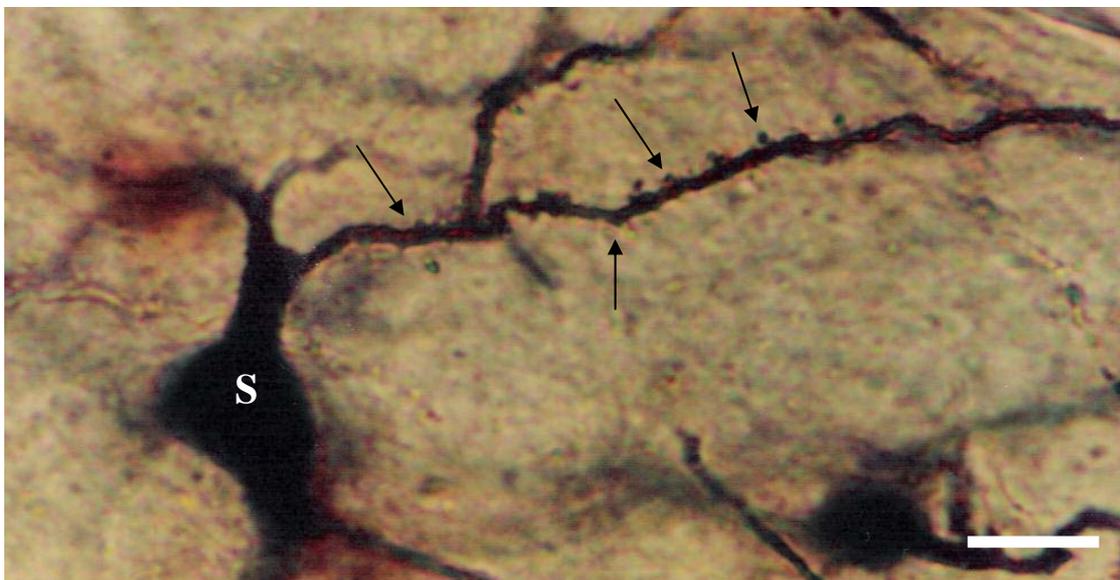
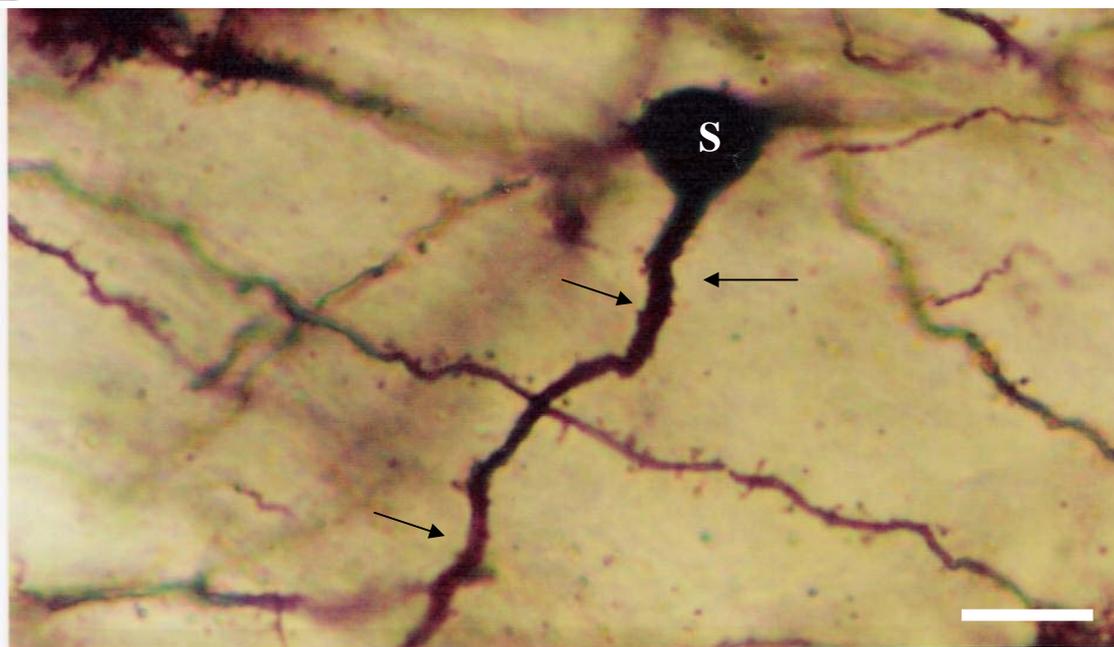
A**B**

Figura 8 – Fotomicrografias de neurônios da amígdala medial pósterio-dorsal de ratos machos adultos impregnados pela técnica de Golgi. Em **A** observa-se neurônio bipenachado de rato submetido à castração fictícia de 90 dias, e verifica-se uma maior quantidade de espinhos no segmento dendrítico inicial. Em **B**, que corresponde a um neurônio estrelado de rato castrado e estudado 90 dias após o procedimento cirúrgico, observa-se menor quantidade de espinhos dendríticos. S = soma neuronal. Barra = 10 μ m.

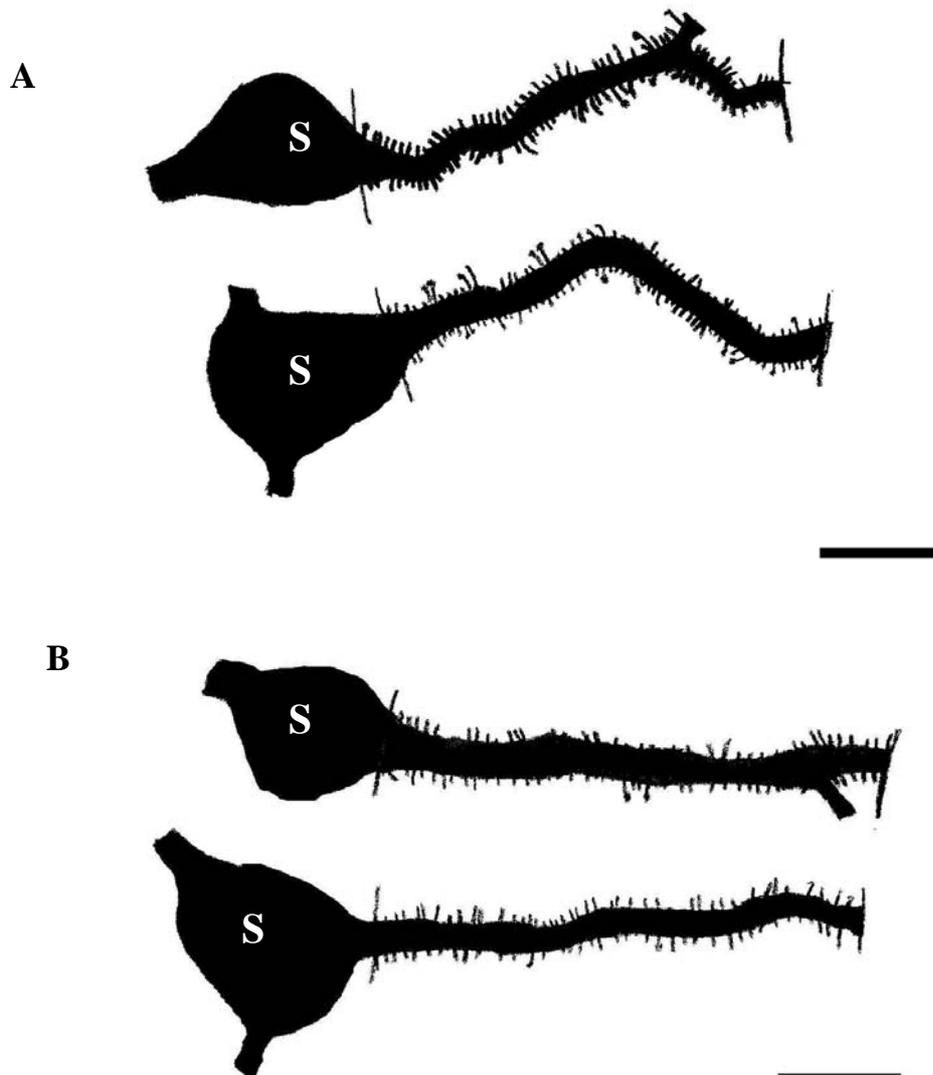


Figura 9 – Desenhos dos espinhos nos primeiros 40 μm dendríticos de neurônios da amígdala medial pósterodorsal de ratos adultos impregnados pela técnica de Golgi. Em **A**, espinhos dendríticos de neurônios de rato submetido à castração fictícia de longa duração e, em **B**, espinhos dendríticos de rato castrado e estudados 90 dias após a gonadectomia. Observar a diferença na quantidade de espinhos dendríticos entre os desenhos, onde uma menor quantidade é verificada após a castração de longa duração em relação ao procedimento fictício. A morfologia dos espinhos dendríticos pode não ser idêntica à real por razões técnicas. S = soma neuronal. Barra = 10 μm .

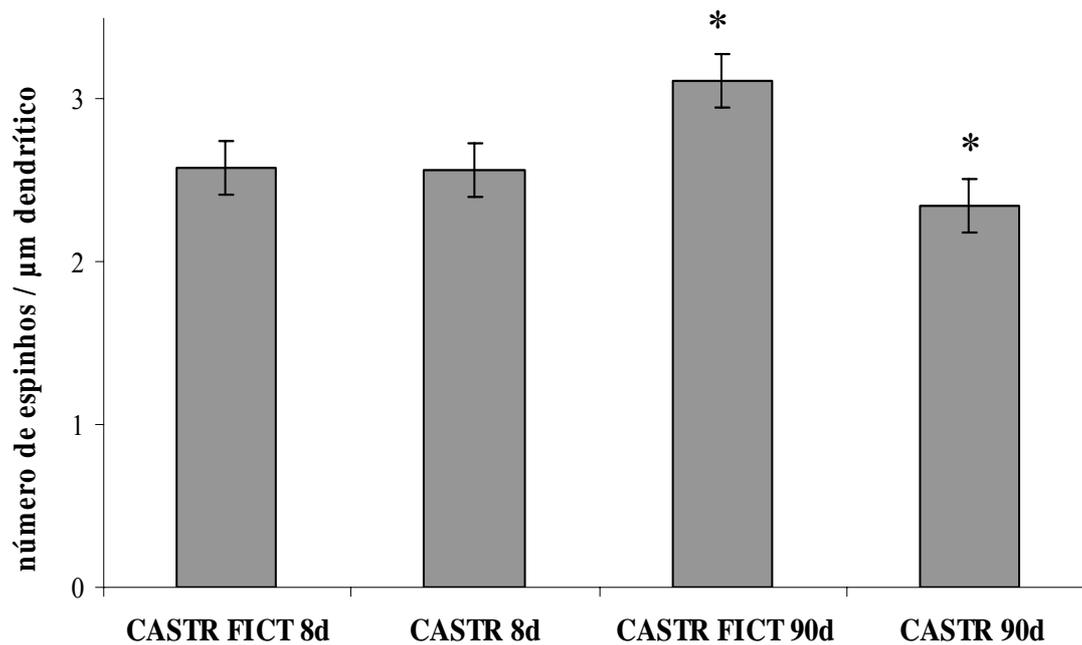


Figura 10 – Densidade de espinhos dendríticos (média ± epm) de neurônios da amígdala medial pósterodorsal de ratos adultos castrados de forma fictícia (como controles) ou orquiectomizados e estudados a curto (8 dias) ou longo prazo (90 dias) após a cirurgia. Diferença significativa foi encontrada na densidade de espinhos dendríticos: * = $P < 0,01$ quando comparado aos demais grupos experimentais.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo revelou que não há diferença significativa na densidade de espinhos dendríticos localizados nos neurônios das subregiões medial e lateral da AMePD de ratos intactos. Também identificou-se que a castração age diferentemente na densidade dos espinhos dendríticos da AMePD quando decorridos curto ou longo prazo da sua ocorrência. Os ratos dos grupos CASTR 8d e CASTR FICT 8d não diferem entre si quanto à densidade de espinhos dendríticos embora ambos apresentem menor densidade de espinhos em relação aos ratos CASTR FICT 90d. Estes, por sua vez, apresentam a maior densidade dentre todos os grupos estudados e, a menor densidade de espinhos dendríticos foi encontrada no grupo de ratos CASTR 90d. É importante ressaltar que não há dados disponíveis na literatura a respeito da relação entre os neurônios da AMePD, sua morfologia e função, e espinhos dendríticos em ratos intactos e orquiectomizados. Se existissem, seriam relevantes para fornecer comparações e auxiliar no entendimento de como os espinhos nos neurônios da AMePD de ratos poderiam estar agindo sob ação androgênica e por modulação sináptica na gênese do comportamento sexual desses animais. Há somente os relatos de Gomez e Newman (1991) e Malsbury e McKay (1994) sobre o efeito da castração na morfologia neuronal da AMe de hamsters e na expressão de substância P em ratos castrados, respectivamente. Este trabalho representa, portanto, um passo inicial para o estudo dos espinhos dendríticos na AMePD de ratos intactos e castrados. A seguir, baseado nos presentes dados originais, procurar-se-á encontrar correlações entre tais achados, morfologia e função da AMePD de ratos.

Neste sentido, utilizou-se uma variante da técnica de Golgi (GABBOT; SMOGYI, 1984) que é amplamente empregada para revelar a morfologia neuronal (RAMÓN Y CAJAL, 1909) e

procurar relacioná-la com função (ROCHA *et al.*, 2003; CHKLOVSKII, 2004). Este método tem se mostrado eficiente para o estudo da morfologia neuronal de machos e fêmeas normais ou submetidos aos mais diversos procedimentos experimentais (GREENOUGH *et al.*, 1977; GOMEZ; NEWMAN, 1991; McEWEN *et al.*, 1991; RASIA-FILHO *et al.*, 1999; 2004). E faz com que se observem neurônios impregnados pela prata de forma aparentemente aleatória, o que pode variar de experimento para experimento mesmo tendo-se o cuidado de realizar sempre o mesmo protocolo técnico. No presente estudo procurou-se estabelecer critérios rígidos para aceitação e estudo de neurônios e seus espinhos dendríticos, os quais, indiretamente, embora com algumas restrições, podem indicar o número de sinapses que estão ocorrendo em um neurônio (NARKIEWICZ *et al.*, 1974; WOOLEY *et al.*, 1996). É inerente à técnica que não se observem todos os espinhos que realmente existem, mas todos os grupos experimentais estiveram submetidos às mesmas condições de avaliação da densidade de espinhos dendríticos.

As subregiões medial e lateral da AMePD processam diferentes informações para a execução de atividades sexuais distintas, e para tal, essas áreas também estão envolvidas com circuitos neurais diferentes (COOLEN *et al.*, 1997). De fato, a AMePD, embora não seja elemento crucial, é um dos componentes do sistema neural que está envolvido na regulação do comportamento sexual masculino, especialmente na ocorrência da ejaculação e na saciedade sexual (BAUM *et al.*, 1992; SMOCK *et al.*, 1992; COOLEN *et al.*, 1997; KONDO, 1998; STARK *et al.*, 1998; PARTIFF; NEWMAN, 1998). Após injeção sistêmica de 8-OH-DPAT, agonista dos receptores 1A da serotonina e conhecido por sua eficiência na facilitação da ocorrência da ejaculação (AHLENIUS *et al.*, 1981; FERNÁNDEZ-GUASTI, 1991), foi encontrada imunorreatividade para c-fos na AMePD lateral e em outras regiões encefálicas interconectadas que podem estar compondo um circuito específico para a gênese deste comportamento em ratos (COOLEN *et al.*, 1997). Partindo-se deste dado prévio relevante, as

subregiões medial e lateral da AMePD poderiam ter neurônios com densidade de espinhos dendríticos igualmente diferentes. No presente trabalho, porém, não foi encontrada diferença nesse parâmetro e nessas áreas estudadas. Ainda não está claro, no entanto, se os espinhos são necessários para possibilitar que cada subregião contribua para um aspecto específico do comportamento sexual masculino, se passam a ter um número diferente somente após a ocorrência de certos parâmetros do comportamento reprodutivo masculino ou qual é a natureza neuroquímica das aferências que estão sendo processadas por eles (GLOOR, 1997; NEWMAN, 2002; STEFANOVA, 2000; de OLMOS *et al.*, 2004; SIMERLY, 2004). Como hipótese plausível também pode ser que o número de espinhos no segmento dendrítico inicial não seja demonstrativo do local para a diferença funcional entre as regiões medial e lateral da AMePD. Isto seria muito intrigante por si só, uma vez que evidente dimorfismo sexual e ação dos hormônios gonadais em fêmeas pôde ser encontrado justamente neste comprimento do segmento dendrítico (RASIA-FILHO *et al.*, 2004).

A plasticidade nervosa na AMePD pode ser complexa e há dados para pressupor isto. Por exemplo, lesão na AMe produz respostas comportamentais diferentes em ratos machos virgens ou naqueles sexualmente experientes. Machos sexualmente inexperientes com lesão ampla na AMe apresentaram uma supressão evidente no comportamento de cópula (KONDO, 1992) enquanto machos sexualmente experientes com lesão na região posterior da AMe prosseguiram com a atividade de cópula, embora em menor proporção (KONDO, 1998). Ainda, a estimulação elétrica da AMePD e da AMePV facilitou o comportamento sexual de ratos machos quando colocados frente a fêmeas que não estavam em estro, mas suprimiu esse comportamento quando ele normalmente deveria ocorrer, ou seja, na presença de fêmeas receptivas na fase de estro (STARK *et al.*, 1998). Esses achados sugerem que a modulação da AMe no comportamento sexual masculino envolve o processamento de informações adicionais sobre o contexto social do

encontro sexual e a experiência do animal (STARK *et al.*, 1998; DOMINGUEZ *et al.*, 2001). Tais dados podem ser relevantes para o entendimento da AMePD dentro de uma rede neural dinâmica envolvida com a gênese e a modulação de comportamentos sociais observados normalmente e adaptativamente no animal, de acordo com a demanda de cada momento de vida (NEWMAN, 1999; 2002; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; SIMERLY; 2004).

Neste contexto, os esteróides gonadais masculinos parecem afetar a morfologia dos neurônios da AMePD, como se observa pelos efeitos da castração a curto e a longo prazo na densidade dos espinhos dendríticos neste subnúcleo. Era a hipótese inicial de trabalho que, como a AMePD possui grande quantidade de receptores para hormônios sexuais (SIMERLY *et al.*, 1990; YOKOSUKA *et al.*, 1997; SHUGHRUE *et al.*, 1997) e tais hormônios estão francamente envolvidos com a plasticidade sináptica (GOMEZ; NEWMAN, 1991; RASIA-FILHO *et al.*, 1999; 2004), a castração de ratos machos teria a capacidade de alterar a densidade dos espinhos dendríticos na AMePD tanto a curto como a longo prazo. Os resultados deste trabalho, porém, apontaram que a orquiectomia de ratos adultos realizada a curto prazo (8 dias) não teve a capacidade de alterar a densidade dos espinhos dendríticos nos neurônios da AMePD, uma vez que essa densidade não foi diferente daquela encontrada no grupo controle, castrados de modo fictício, e analisados no mesmo período após a cirurgia. Essa densidade similar pode estar relacionada com outros fatores que não os envolvidos aos hormônios sexuais propriamente ditos como, por exemplo, com os efeitos inespecíficos relacionados com a anestesia, com a cirurgia e com o estresse relacionado a esses eventos.

Diferentes experimentos realizados em ratos apontaram a AMe como uma das regiões envolvidas nos efeitos neurais do estresse. A ativação do eixo HPA é uma das características mais marcantes das respostas neuroendócrinas a eventos que sejam considerados estressores (AGUILERA, 1998; SAPOLSKY, 1999). Embora a maioria dos estudos que avaliaram a

importância da amígdala na ativação deste eixo apontem a ACe como referência para tal (BEAULIEU *et al.*, 1986, 1987; ROOZENDAAL *et al.*, 1991; 1992; VAN de KAR *et al.*, 1991; PREWITT; HERMAN, 1994), a AMe mostra-se igualmente importante nas atividades mediadas pelo hipotálamo durante uma resposta emocional (MIYATA *et al.*, 1995). De fato, o estresse emocional é capaz de gerar uma maior expressão de c-fos na AMe do que em qualquer outro subnúcleo da amígdala (ARNOLD *et al.*, 1992; PEZZONE *et al.*, 1992; CHEN; HERBERT, 1995; CULLINAN *et al.*, 1995; CAMPEAU; WATSON, 1997; BHATNAGAR; DALLMAN, 1998; LI; SAWCHENKO, 1998). Por exemplo, imobilização por um período de 15 minutos, utilizada como estressor emocional em ratos adultos, promoveu maior expressão de c-fos na AMe comparativamente à ACe (DAYAS *et al.*, 1999). A noradrenalina parece mediar a ação da AMe na ativação do eixo HPA em resposta ao estresse agudo de imobilização (MA *et al.*, 2005). Eferências partem da AMe em direção ao núcleo paraventricular hipotalâmico, onde localizam-se as células que contêm o hormônio liberador de corticotrofinas (SILVERMAN *et al.*, 1981; TRIBOLLET; DREIFUSS, 1981; SWANSON; SAWCHENKO 1983), evidenciando então a participação da AMe nos eventos envolvidos ao estresse. Além de ativar o eixo HPA em ratos, a AMe parece reger respostas de liberação de ocitocina na presença de estresse emocional (McGAUGH *et al.*, 1992; DAYAS *et al.*, 1999). Isto sugere que, pelo menos para eventos estressores incondicionados, a AMe representa uma região crítica para a geração das respostas neuroendócrinas do animal (DAYAS *et al.*, 1999). E, embora todos esse estudos não tenham dividido a AMe por subregiões, os presentes achados levam a pensar que a AMePD pode ter participação nas respostas ao estresse do procedimento anestésico e cirúrgico empregado.

Outros estudos têm investigado a ação dos hormônios relacionados com o estresse sobre a morfologia neuronal em diferentes áreas do SNC de ratos. Por exemplo, nos neurônios da área CA3 do hipocampo, a exposição crônica a tais hormônios causou uma atrofia nos dendritos

apicais (YOSHIFUMI *et al.*, 1992) e aumentou a densidade de espinhos dendríticos, o que se supõe seja um mecanismo compensatório para a diminuição da superfície dendrítica de contato sináptico (SUNANDA *et al.*, 1995). Por outro lado, o mesmo estresse crônico que causou atrofia dendrítica nas células da CA3 do hipocampo, promoveu um aumento da arborização dendrítica nos neurônios da ABL (VYAS *et al.*, 2001; 2002), mostrando que o mesmo agente estressor pode causar alterações morfológicas opostas de acordo com o “alvo” de seus hormônios. Infelizmente pouco se sabe até o momento a respeito dos efeitos do estresse na densidade de espinhos dendríticos na AMePD. Em recente experimento que avaliou o efeito do estresse agudo de imobilização em ratos a curto prazo, isto é, por 6 horas e em um único dia, tal procedimento foi capaz de diminuir a densidade dos espinhos dendríticos nos neurônios da AMePD (MARCUIZZO, comunicação pessoal). Estes dados reforçam a idéia de que a manipulação para a cirurgia nos grupos CASTR 8d e CASTR FICT 8d pode ter agido como estressor e causado uma diminuição dos espinhos dendríticos em ambos os grupos experimentais promovendo uma diminuição idêntica na densidade de espinhos conforme demonstrado.

Desta forma, fazendo-se uma relação entre diferentes tipos de eventos estressores e os resultados dos grupos CASTR 8d e CASTR FICT 8d pode-se pensar que a manipulação experimental em ambos os grupos pode ter servido como um evento estressor emocional incondicionado. E considerando-se o fato da AMe estar envolvida com as respostas do estresse e que a AMePD também possui receptores para glicocorticosteróides (MORIMOTO, 1996), poder-se-ia supor que as densidades similares de espinhos dendríticos encontradas nos neurônios dos grupos de ratos CAST 8d e CAST FICT 8d poderia ter relação direta com o estresse que os animais estiveram submetidos. Claramente, no grupo CASTR 8d os níveis de testosterona e seus metabólitos em circulação estão significativamente reduzidos neste período

pós-cirúrgico (TEPPERMAN; TEPPERMAN, 1987), mas não no grupo CASTR FICT 8d. Por outro lado, este efeito observado aos 8 dias pós-operatórios não se repercute a longo prazo. A mesma manipulação anestésica e cirúrgica foi aplicada no grupo CASTR FICT 90d, mas a densidade de espinhos dendríticos observadas nos neurônios da AMePD de ratos CASTR FICT 90d se equivale àquela encontrada nos ratos intactos. Poder-se-ia sugerir que isso se deu, pelo menos em parte, pela recuperação, a longo prazo, dos efeitos iniciais estressantes. Já, nitidamente, os ratos do grupo CASTR 90d, apresentaram uma redução significativa na densidade de seus espinhos na AMePD em comparação aos demais grupos experimentais.

A ação da testosterona na morfologia neuronal tem sido estudada em diferentes regiões encefálicas envolvidas com o comportamento sexual, e em experimentos realizados em ratos e hamsters intactos ou gonadectomizados (GOMEZ; NEWMAN, 1991; SASAKI, ARNOLD; 1991; RASIA-FILHO *et al.*, 1999). Por exemplo, no núcleo arqueado do hipotálamo, ratos gonadectomizados em idade adulta apresentaram um aumento no comprimento, no volume e no número de terminações dendríticas, além de aumento na densidade de espinhos dendríticos quando comparados a ratos intactos controle (DANZER, *et al.*, 1998). A reposição hormonal com testosterona para atingir níveis fisiológicos foi eficiente para evitar as alterações na morfologia dos neurônios deste núcleo hipotalâmico (DANZER *et al.*, 2001). Também em ratos castrados em idade adulta ocorre diminuição significativa na área do soma neuronal e no comprimento dendrítico nos motoneurônios da medula espinal lombar, outra área sexualmente dimórfica sensível à ação dos hormônios sexuais e relacionadas com a musculatura bulbocavernosa de machos (SASAKI; ARNOLD; 1991). Neste local, a retirada dos hormônios gonadais masculinos acarreta prejuízo no funcionamento das sinapses químicas e elétricas destes motoneurônios, o que pode ser revertido por tratamento substitutivo com androgênio (MATSUMOTO *et al.*, 1997). Na AMePD, a orquiectomia produziu uma significativa

diminuição na área de densidade de células imunorreativas à substância P (SP-ir), o que ficou mais acentuado com o avanço do tempo pós-castração. Além disso, nos ratos estudados 8 semanas após a castração houve diminuição de 42% na área preenchida por células SP-ir na AMePD, em relação ao observado nos ratos submetidos à castração fictícia, e uma redução de 27% no volume da AMePD nestes mesmos animais (MALSBUY; McKAY, 1994).

No presente trabalho, a menor densidade de espinhos dendríticos nos neurônios da AMePD foi encontrada no grupo de ratos CASTR 90d. Tais resultados estão de acordo aos observados em hamsters machos adultos, onde a castração a longo prazo alterou a morfologia dos neurônios da AMe posterior. Neste experimento a retirada dos hormônios gonadais promoveu redução significativa na área do soma neuronal, diminuição na arborização dendrítica e redução na densidade dos espinhos dendríticos (GOMEZ; NEWMAN; 1991). Tomando-se em conta que a castração pode alterar a morfologia neuronal da AMePD, que há redução do volume deste subnúcleo provavelmente por alterações atróficas axonais e de arborização dendrítica em ratos (MALSBUY; McKAY, 1994) ou ainda no soma neuronal e no neurópilo de hamsters castrados a longo prazo (GOMEZ; NEWMAN; 1991), pode-se sugerir que a testosterona é fundamental para a manutenção da integridade morfológica dos neurônios da AMePD e, conseqüentemente, possivelmente para a realização das funções exercidas nesta subregião.

Uma especulação sobre esta interrelação morfofuncional seria que a privação dos androgênios na circulação sanguínea causaria diminuição de espinhos dendríticos e possíveis locais sinápticos dos neurônios da AMePD e, estes espinhos, ao declinarem com o passar do tempo, causariam a piora do comportamento sexual desses animais após a castração (RASIA-FILHO *et al.*, 1991). Ou seja, como se tem sugerido que cada espinho representa uma sinapse (NARKIEWICZ *et al.*, 1974; WOOLEY *et al.*, 1996) e há redução de espinhos dendríticos nos ratos CASTR 90d na AMePD, a qual está relacionada com a modulação do comportamento

sexual masculino (BAUM *et al.*, 1992; SMOCK *et al.*, 1992; COOLEN *et al.*, 1997; KONDO, 1998; STARK *et al.*, 1998; PARTIFF; NEWMAN, 1999), poderia ser que a diminuição da atividade sináptica nesta região estivesse relacionada com uma conseqüente diminuição da emissão comportamental com a qual está envolvida. Mas é interessante, no entanto, que a perda é gradual: primeiro o comportamento de ejaculação, após o de intromissão peniana e, posteriormente o de “monta” dos machos nas fêmeas (TEPPERMAN; TEPPERMAN, 1987). E que estudos com hamsters machos castrados mostraram que o comportamento de “monta” foi restabelecido quando tais animais receberam microinjeção de testosterona na AMe posterior (WOOD, 1996), e em ratos, a implantação de estradiol é capaz de gerar aumento similar na ocorrência de atividade copulatória (RASIA-FILHO *et al.*, 1991). O quanto os espinhos dendríticos da AMePD participam nessas atividades e dos efeitos dos esteróides sexuais ainda não está elucidado, o que se configura como futura linha de investigação.

Neste mesmo sentido, apesar das evidentes alterações que os hormônios gonadais causam na morfologia neuronal, os mecanismos que podem explicar tais alterações ainda não estão totalmente esclarecidos. Os efeitos dos androgênios parecem ser mediados por alterações no genoma celular, onde a testosterona e seu metabólito estradiol ligam-se a receptor nuclear e estimulam a síntese protéica local (MURDOCH; GORSKI, 1991; TORAN-ALLERAND, 1995; Mc EWEN, 1999). Em ratas ovariectomizadas, o tratamento com estradiol proporcionou um aumento na quantidade do retículo endoplasmático rugoso, de polirribossomos e do complexo de Golgi nas células do VMN, sugerindo que este hormônio pode acarretar um aumento da síntese protéica nestas células (CARRER; AOKI; 1982; MEISE; PFAF; 1985). A gonadectomia de ratos aumentou os níveis de RNAm para receptores de androgênios e diminuiu os níveis de RNAm para receptores de estrogênios na AMe de ratos a curto prazo, porém 28 dias após o procedimento cirúrgico os níveis de ambos RNAm foram reduzidos (SIMERLY, 1993).

Modificação na quantidade de tubulina e de actina neuronal (MATSUMOTO, 1992) e rearranjo de microtúbulos (WOOLF, 1998) têm sido igualmente sugerido como responsáveis por alterações estruturais nos neurônios. Isto tudo é relevante porque os espinhos dendríticos possuem um citoesqueleto especializado, composto por filamentos de actina capazes de produzir alterações rápidas na sua motilidade e morfologia (FIFKOVA; MORALES; 1992; MATUS, 2000). Ou seja, apesar dos espinhos serem estruturas muito pequenas e aparentemente simples, a regulação de seus componentes intracelulares tem se mostrado bastante complexa. Estudos recentes têm demonstrado que inúmeras moléculas estão envolvidas no desenvolvimento e na remodelação dos espinhos, sugerindo que uma complexa rede de sinalizadores interconectados convergem para regular plasticamente o citoesqueleto destas estruturas (ETHELL; PESQUALE, 2005; LIPPMAN; DUNAEVSKY, 2005). Experimentos realizados nos motoneurônios da musculatura bulbocavernosa na medula espinal lombar têm evidenciado a influência dos androgênios sobre os filamentos de actina e a expressão do RNAm para β -actina encontrada no soma neuronal e nos dendritos proximais reduz-se após a castração (MATSUMOTO; ARAI, 1994). Fundamentado nesses dados, a actina parece ser um componente determinante da morfologia do espinho dendrítico e, com base no fato dos androgênios terem a capacidade de modular sua expressão, poder-se-ia hipotetizar que também na AMePD a privação dos esteróides sexuais, a longo prazo, acarretaria em alterações na densidade de espinhos por modificação na composição intracelular de actina. Alternativamente, a densidade de espinhos dendríticos na AMePD poderia estar reduzida no grupo CASTR 90d porque a retirada dos hormônios gonadais poderia ter gerado também menos atividade em regiões aferentes interconectadas com a AMePD. Com menor aporte de informação sináptica, poderia ocorrer diminuição do número de espinhos e, assim, configurar um efeito indireto da castração sobre a morfologia neuronal e a atividade da AMePD.

Os presentes dados indicam, portanto, que há várias possibilidades para pesquisas futuras para que se venha elucidar o papel dos espinhos dendríticos na AMePD e sua regulação pelos hormônios gonadais masculinos. Este é um campo profícuo que se encontra aberto para novas contribuições.

6 CONCLUSÃO

- As subregiões medial e lateral da AMePD, apesar de estarem envolvidas com circuitos neurais diferentes e mediarem comportamentos sexuais distintos em ratos machos não apresentaram diferença significativa na densidade de espinhos dendríticos quando comparadas entre si. Estes resultados indicam que os espinhos, pelo menos nos primeiros micrômetros dendríticos, não são as estruturas sinápticas responsáveis pelas diferenças funcionais observadas nas subregiões medial e lateral da AMePD.

- Adicionalmente, o efeito da castração de curta duração (8 dias), por si só, não modifica a densidade de espinhos dendríticos da AMePD, uma vez que houve redução da densidade de tais espinhos similarmente entre os ratos dos grupos CASTR 8d e CASTR FICT 8d. Provavelmente isto tenha ocorrido devido a eventos estressores inespecíficos.

- Já a castração de longa duração (90 dias) é capaz de causar redução na densidade dos espinhos dendríticos nos neurônios da AMePD quando comparada ao grupo controle respectivo, indicando a importância da ação androgênica na morfologia dos neurônios da AMePD e provavelmente, na atividade sináptica desta região encefálica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and stress response. **T. Endocrinol. Metabol.**, v. 9, n. 8, p. 329 – 336, 1998.

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

AHLENIUS, S.; LARSSON, K.; SVENSSON, L.; CARLSSON, A.; LINDBERG, P.; WIKSTRÖM, H.; SANCHES, D.; ARVIDSSON, L-E.; HACKSELL, U.; NILSON, J.L.G. Effects of a new type of 5-HT receptor agonist on male rat sexual behavior. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 15, p. 785-792, 1981.

ARMONY, J.L.; SERUAN-SCHREIBER, D.; COHEN, J.D., LeDOUX, J.E. An anatomically constrained neural network model of fear conditioning. **Behav. Neurosci.**, v. 109, n. 2, p. 246-257, 1995.

ARNOLD, A.P.; BREEDLOVE, S.M. Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior. A Reanalysis. **Horm. Behav.**, v. 19, n. 4, p. 469-498, 1985.

ARNOLD, J.F.; De LUCAS BUENO, M.; H.; HANCOCK, D.C.; EVAN, G.I.; HERBERT, J. Expression of *c-fos* in region of the basal limbic forebrain following intracerebroventricular corticotropin-releasing factor in unstressed males rats. **Neurosci.**, v. 51, p. 377-390, 1992.

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

AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphé nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 179, p. 641-668, 1978.

BAUM, M.J.; EVERITT, B.S. Increased expression of *c-fos* in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. **Neurosci.**, v. 50, p. 627-646, 1992.

BAYER, S.A. Quantitative H-thymidine radiographic analyses of neurogenesis in the rat amygdala. **J. Com. Neurol.**, v.194, p. 845-895, 1980.

BEAULIEU, S.; DI PAOLO, T.; COTE, J.; BARDEN, N. Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin secretion to immobilization stress: opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic system. **Neuroendocrinol.**, v. 45, p. 37-46, 1987.

BEAULIEU, S.; DI PAOLO, T.; BARDEN, N. Control of ACTH secretion by the central nucleus of the amygdala: implication of the serotonergic system and its relevance to the glucocorticoid delayed negative feedback mechanism. **Neuroendocrinol.**, v. 44, p. 247-254, 1986.

BENNETT, C.; LIANG, K.C.; McGAUGH, J.L. Depletion of adrenal catecholamines alters the amnesic effect of amygdala stimulation. **Behav. Brain Res.**, v. 15, p. 83-91, 1985.

BHATNAGAR, S.; DALLMAN, M. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. **Neurosci.**, v. 84, p. 1025-1039, 1998.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Inate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **J. Comp.Physiol.Psychol.**, v. 81, p. 281-290, 1972.

BLOCH, G.J.; GORKI, 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.

BOLHUIS, J.J.; FITZGERALD, R.E.; DIJK, D.J.; KOOLHAAS, J.M. The corticomedial amygdala and learning in an agonistic situation in the rat. **Physiol. Behav.**, v. 32, p.575-579, 1984.

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

CAHILL, L.; McGAUGH, J.L. Modulation of memory storage. **Curr. Op. Neurobiol.**, v. 6, p. 237-242, 1996.

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

CAMPEAU, S.; WATSON, S.J. Neuroendocrine and behavioral responses and brain pattern of *c-fos* induction associated with audiogenic stress. **J. Neuroendocrinol.**, v. 9, p. 577-588, 1997.

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

_____; _____. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: A phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 348, p. 41-79, 1994.

_____; _____. Connections of the posterior nucleus of the amygdala. **J. Comp. Neurol.**, v. 324, p. 143-179, 1992.

CHEN, X.; HERBERT, J. Regional changes in *c-fos* expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine response. **Neurosci.**, v. 64, p. 675-685, 1995.

CHKLOVSKII, D.B. Synaptic connectivity and neuronal morphology: two sides of the same coin. **Neuron.**, v. 43, p. 609-617, 2004.

COMMINS, D.; YAHR, P. Autoradiographic localization of estrogen and androgen receptors in the sexually dimorphic area and other regions of the gerbil brain. **J. Comp. Neurol.**, v.231, p. 473-489, 1985.

COOKE, B.M.; BREEDLOWE, S.M.; JORDAN, C.L. Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and arousal in males rats. **Horm. Behav.**, v. 43, p. 336-346, 2003.

COOLEN, L.M.; WOOD, R.I. Bidirectional connections of the medial nucleus amygdaloid in the Syrian hamster brain: Simultaneous anterograde and retrograde tract tracing. **J. Comp. Neurol.**, v. 399, p.189-209, 1998.

_____; OLIVER, B.; PETERS, H.J.P.W.; VEENING, J.G. Demonstration of ejaculation-induced neural activity in the male rat brain using 5-HT agonist 8-OH-DPAT. **Physiol. Beh.**, v 62, n. 4, p. 881-891, 1997.

COTTINGHAM, S.L.; PFAFF, D.W. Interconnectedness of steroid hormone-binding neurons: existence and implications. **Curr. Op. Neuroendocrinol.**, v. 7, p. 223-249, 1986.

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

CULLIMAN, W.E.; HERMAN. J.P.; BATTAGLIA, D.F.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Pattern and time course of immediate early gene expression in the rat brain following acute stress. **Neurosci.**, v. 64, p. 477-505, 1995.

Da CUNHA, C.; ROOZENDAAL, B.; VAZDARJANOVA, A.; McGAUGH, J.L. Microinfusion of flumazenil into the basolateral but not the central nucleus of the amygdala enhance memory consolidation in rats. **Neurobiol. Learn Mem.**, n. 72, p. 1-7, 1999.

DANZER, S.C.; McMULLEN, N.T.; RANCE, N.E. Testosterone modulate the dendritic architecture of arcuate neuroendocrine neurons in adult male rats. **Brain Res.**, v. 890, p. 78-85, 2001.

_____; _____. Dendritic growth of arcuate neuroendocrine neurons following orchietomy in adult rats. **J. Comp. Neurol.**, v. 390, p. 234-246, 2001.

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

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

de OLMOS, J.S.; BELTRAMINO, C.A.; ALHEID, G. Amygdala and extended amygdala of the rat: A cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. In PAXINOS, G. **The Rat Nervous System**. San Diego, Academic Press, 2004. p. 509-603.

_____; _____. Amygdala. In: PAXINOS, G. (ed). **The Rat Nervous System**, Australia, 1985. p. 223-234.

_____; HEIMER, L. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 877, p. 1-32, 1999.

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

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

_____; AL SHAMMA, H.A. Sex differences in hormonal responses of vasopressin pathways in the rat brain. **J. Neurobiol.**, v. 273, p. 307-317, 1990.

DIELEMBERG, R.A.; HUNT, G.R.; MCGREGOR, L.S. When a rat smells a cat: The distribution of FOS immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neurosci.**, v. 104, n. 4, p. 1085-1097, 2001.

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

ETHELL, I.M; PESQUALE, E.B. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. **Prog. Neurobiol.**, v. 75, p. 161-205, 2005.

EVERITT, B. Limbic lobe and olfactory pathways. In: BERRY, M.M.; BANNISTER, L.H., STANDRING, S.M. **Gray's Anatomy**. London: Churchill Livingstone, 1995. p. 1115-1151.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; ESCALANTE, A. Role of presynaptic serotonergic receptors on the mechanism of action 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonist on masculine sexual behaviour: physiological and pharmacological implications. **J. Neural. Transm.**, v. 84, p. 95-107, 1991.

FIFKOVA, E.; MORALES, M. Actin matrix of dendritic spines, synaptic plasticity, and long-term potentiation. **Int. Rev. Cytol.**, v. 139, p. 267-307, 2000.

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

_____; SIEGEL, R.A.; SIM, I.; WUTTKE, W. Cholecystinin and substance P concentration in discrete areas of the rat brain: sex differences. **Brain Res.**, v. 358, p. 53-58, 1985.

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

GALLAGHER, M., CHIBA, A.A. The amygdala and emotion. **Curr. Op. Neurobiol.**, v. 6, p. 221-227, 1996.

_____; HOLLAND, P.C. Understanding the function of the central nucleus; is simple conditioning enough? In: AGGLETON, J.P. **The Amygdala**. New York: Wiley-Liss, 1992. p. 307-321.

_____; GRAHAM, P.W., HOLLAND, P.C. The amygdala central nucleus and appetitive Pavlovian conditioning: lesions impair one class of conditioned behavior. **J. Neurosci.**, v.10, p.1906-1911, 1990.

GLOOR, P. The amygdaloid system: In: GLOOR, P. **The Temporal Lobe and Limbic System**. New York: Oxford University Press 1997. p. 591-721.

GOLD, J.I.; BEAR, M.F. A model of dendritic spine Ca concentration exploring possible bases for a sliding synaptic modification threshold. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, n. 9, p. 3941-3945, 1994.

GOMEZ, D.M.; NEWMAN, S.W. Differential projections of the anterior and posterior regions of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster. **J. Comp. Neurol.**, v.317, p. 195-218, 1992.

_____; _____. Medial nucleus of the amygdala in the adult syrian hamster: A quantitative Golgi analysis of gonadal hormonal regulation of neuronal morphology. **Anat. Rec.**, v. 231, p. 498-509, 1991.

GORSKI, R. Sexual differentiation of the nervous system. In: KANDEL, E.; SCHWARTZ, J. H. & JESSEL, T. M. **Principles of Neural Sciences**. New York: McGraw Hill, 2000. p. 1131-1198.

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

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

GREENOUGH, W.T.; CARTER, C.S.; STEERMAN, C.; DeVOOGD, T.J. Sex differences in dendritic patterns in hamster preoptic area. **Brain Res.**, v. 126, p. 63-72, 1977.

GROOVE, E. A. Efferent connections of the substantia innominata in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 277, p. 347-364, 1988.

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

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

HARLAN, R.E.; GARCIA, M.M.; KRAUSE, J.E. Cellular localization of substância P and neurokinin A-encoding preprotachynin mRNA in the female rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 287, p. 179-212, 1989.

HARRIS, K.M.; STEVENS, J.K. Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. **J. Neurosci.**, v. 9, n. 8, p. 2982-2997, 1989.

HATFIELD, T.; GALLAGHER, M. Teste-potentiated odor conditioning: impairment produced by infusion of N-methyl-D-aspartame antagonist into basolateral amygdala. **Behav. Neurosci.**, v. 109, p. 663-668, 1995.

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

HERBERT, H.; SAPER, C.B. Cholecystokinin,-galanin,-and corticotropin-releasing factor- like immunoreactive projections from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 293, p. 581-598, 1990.

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

HINES, M.; ALLEN, L.S.; GORSKY, R.A. Sex difference in subregions of the medial nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis of the rat. **Brain Res.**, v. 6, p. 579-6621, 1992.

HUDDLESTON, G.G.; MICHAEL, R.P.; ZUMPE, D.; CLANCY, A.N. Estradiol in the male rat amygdala facilitates mounting but not ejaculation. **Physiol. Behav.**, v. 79, p. 239-246, 2003.

JOHANSEN, J.A.; JORDAN, C.L; BREEDLOWE, S.M. Steroid hormone masculinization of neural structure in rats: A tale of two nuclei. **Physiol. Behav.**, v. 83, p. 271-277, 2004.

JOHNSTON, J.B. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. **J. Comp. Neurol.** v. 35, p. 337-482, 1923.

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

JONES, B.J.; MOORE, R.Y. Ascending projections of the locus ceruleus in the rat.II. Autoradiographic study. **Brain. Res.**, v.127, p. 23-53, 1977.

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

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

KELLY, K.M. Sexual differentiation of the nervous system. In: KANDEL, E.R; SCWARTZ, J.H. & JESSEL, T.M. **Principles of Neural Sciences**. New York: Elsevier, 1991. p. 959-973.

KENDRICK, K.M. Electrophysiological effects of testosterone on the medial preoptic-anterior hypothalamus of the rat. **J. Endocrinol.**, v. 96, p. 35-42, 1983.

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

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

KOCH, C.; ZADOR, A. The function of dendritic spine: Devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. **J. Neurosci.**, v. 13, n. 2, p. 413-422, 1993.

KOLLACK, S.S., NEWMAN, S.W. Mating behavior induce selective expression of Fos protein within the chemosensory pathways of the male Syrian hamster brain. **Neurosci. Lett.**, v. 143, p. 223-228, 1992.

KOLLACK-WALKER, S., NEWMAN, S.W. Mating and agonistic behavior produce different patterns of Fos immunolabeling in the male Syrian hamster. **Neurosci.**, v. 66, p. 721-736, 1995.

KONDO, Y.; SACHS, B.D.; SAKUMA, Y. Importance of the medial amygdala in rat penile erection evoked by remote stimuli from estrous female. *Behav.* **Brain Res.**, v. 91, p. 215-222, 1998.

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

_____. Lesions of the medial amygdala produce severe impairment of copulatory behavior in sexually inexperienced male rats. **Physiol. Behav.**, v. 51, p. 939-943, 1992

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

KORKOTIAN, E.; SEGAL, M. Fast confocal imaging of calcium release from spines in dendritic spines. **Eur. J. Neurosci.**, v. 10, n. 6, p. 2076-2084, 1998.

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

KNUEPFER, M.M.; EISMAN, N.; SCHÜTZE, I.; STUMPF, H.; STOCK, G. Responses of single neuron in amygdala to interoceptive and exteroceptive stimuli in conscious cats. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. 666-675, 1995.

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

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

LI, H.Y.; SAWCHENKO, P.E. Hypothalamic effector neurons and extended circuitries activated in "neurogenic" stress: a comparison of footshock effects exerted acutely, chronically, and in animals with controlled glucocorticoid levels. **J. Comp. Neurol.**, v. 393, p. 244-266, 1998.

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

LIANG, K.C.; BENNETT, C.; McGAUGH, J.L. Peripheral epinephrine modulates the effects of post-training amygdala stimulation on memory. **Behav Brain Res.**, v.15, p. 93-100, 1995.

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

LIPPMAN, J.; DUNAIEVSKY, A. Dendritic spine morphogenesis and plasticity. **J. Neurobiol.**, v. 64, p. 47-57, 2005.

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

LORENZO, A.; DIAZ, H.; CARRER, H.; CACERES, A. Amygdala neurons in vitro: neurite grow and effects of estradiol. **J. Neurosci. Res.**, v. 33, p. 418-435, 1992.

LUCION, A.B.; CHARCHAT, H.; PEREIRA, G.A.M.; RASIA-FILHO, A.A. Influence of early postnatal gonadal hormones on anxiety in adult males rats. **Physiol. Behav.**, v. 60, p. 1419-1423, 1996.

MA, S.; MORILAK, D.A. Norepinephrine release in medial amygdala facilitates activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to acute immobilisation stress. **J. Neuroendocrinol.**, v. 17, p. 22-28, 2005.

MALSBURY, C.W.; McKAY, K. Neurotrophic effects of the testosterone on the medial nucleus of the amygdala in adult rat. **J. Neuroendocrinol.**, v. 6, n. 1, p. 57-69, 1994.

_____; _____. A sex difference in the pattern of substance P-like immunoreactivity in the bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Res.**, v. 420, p. 365-370, 1987.

MARAGOS, W.R.; NWWMAN, S.W.; LEHMAN, M.N; POWER, J.B. Neurons of origin fiber trajectory of amygdalofugal projections to the medial preoptic area in Syrian hamster. **J. Comp Neurol.**, v. 280, p. 59-71, 1989.

MARIMOTO, M.; MORITA, N. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. **Neurosci. Res.**, v. 26, p. 235-269, 1996.

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

MATSUMOTO, A. Hormonally induced neuronal plasticity in the adult motoneurons. **Brain Res. Bull.**, v. 44, p. 539-547, 1997.

_____; ARAI, Y; URANO, A.; HYODO, S. Androgen regulates gene expression of cytoskeletal protein in adult rat motoneurons. **Horm. Behav.**, v. 4, p. 357-366, 1994.

_____. Sex steroid induction of synaptic reorganization in adult neuroendocrine brain. **Rev. Neurosci.**, v. 3, p. 287-306, 1992.

McDONALD, A.J.; SHAMMAH-LAGNADO, S.J., SHI, C.; DAVIS, M. Cortical afferents to the extended amygdala. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 877, p. 309-338, 1999.

_____. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Prog. Neurobiol.**, v. 55, p. 257-332, 1998.

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

McEWEN, B.S.; COIRINI, H.; WESTLIND-DANIELSSON, A.; FRANKFURT, M.; GOULD, E.; SCHUMACHER, M.; WOOLLEY, C. Steroid hormone as mediators of neural plasticity. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, v. 39, p. 223-232, 1991.

McGAUGH, J.L. Involvement of the amygdala in neuromodulatory influences on memory storage. In: AGGLETON, J.P. **The Amygdala**. New York: Wiley-Liss, 1992. p. 431-451.

McGINNIS, M.Y.; WILLIAMS, G.W.; LUMIA, A.R. Inhibition of male sex behavior by androgen receptor blockade in preoptic area or hypothalamus, but not amygdala or septum. **Physiol. Behav.**, v. 60, p. 783-789, 1996.

McLEAN, S.; SKIRBOLL, L.R.; PERT, C.B. Comparison of substance P and enkephalin distribution in rat brain: An overview using radioimmunochemistry. **Neurosci.**, v.14, n. 3, p. 837-852, 1985.

MEREDITH, M.; WESTBERRY, J.M. Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. **J. Neurosci.**, v.24, p. 5719-5725, 2004.

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

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

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

MORIMOTO, M.; MORITA, N.; OZAWA, H.; YOKOYAMA, K., KAWATA, M. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. **Neurosci Res.**, v. 26, n. 3, p. 235-69, 1996.

MURDOCH, F.E.; GORSKI, J. The role of ligand in estrogen receptor regulation of gene expression. **Moll. Cell. Endocrinol.**, v. 78, p. C103-C108, 1991.

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

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

NELSON, R.J. **An Introduction to Behavioral Endocrinology**. Sunderland: Sinauer Associates, cap. 6, p. 231-288, 1995.

NEWMAN, S.W. Pheromonal signals access the medial extended amygdala: one node in a proposed social behavior network. In: PFAFF, D.W.; ARNOLD, A.P.; ETGEN, A.M.; FAHRBACH,S.E.; RUBIN, R.T. **Hormones, Brain and Behavior.**, San Diego: Academic Press, v. 2, 2002. p. 17-31.

_____. The medial extended amygdala in male reproductive behaviour: a node in the mammalian social behaviour network. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 877, p. 242-257, 1999.

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

NISHIZUCA, M; ARAI, Y. Intrinsic connections in the medial amygdala as revealed by complete defferentation. **Neurosci. Lett.**, v. 35, p. 247-251, 1983.

_____; _____. Synapse formation in response to estrogen in the meedial amygdala developing in the eye. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, n. 11, p. 7024-7026, 1982.

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

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

OHTAKE, T.; YAMANDA, H. Efferent connections of the nucleus reuniens and the rhomboid nucleus in the rat: An anterograde PHA-L tracing study. **Neurosci. Res.**, v. 6, p. 556-568, 1989.

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

OTTERSEN, O.P. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. III. Afferents from the lower brainstem. **J. Comp. Neurol.**, v. 202, p. 335-356, 1981.

_____. Afferent connections of the amygdaloid complex of the rat and cat. II. Afferents from the hypothalamus and the basal telencephalon. **J. Comp. Neurol.**, v. 194, p. 267-289, 1980.

_____; BEN-ARI, Y. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat. I. Projections from the thalamus. **J. Comp. Neurol.**, v. 187, p. 401-424, 1979.

PARFITT, D.B.; NEWMAN, S.W. Fos-immureactivity within the extended amygdala is correlated with the onset of sexual society. **Horm. Behav.**, v. 34, p. 17-29, 1998.

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

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

PETERS, A.; PALAY, S.; WEBSTER, H. Dendrites. In: PETERS, A.; PALAY, S. & WEBSTER, H. **The Fine Structure of the Nervous System**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 70-100.

PEZZONE, M.A.; LEE, W.S.; HOFFMAN, G.E.; RABIN, B.S. Induction of c-fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. **Brain Res.**, v. 597, p. 41-50, 1992.

PFAUS, J.G.; MARCANGIONE, C.; SMITH, W.J.; MANITT, C.; ABILLAMMA, H. Differential induction of Fos in the female rat brain following different amounts of vaginocervical stimulation: Modulation by steroids hormones. **Brain Res.**, v. 741, p. 314-330, 1996.

PILGRIM, C.; REISERT, I. Differences between males and females brains-developmental mechanisms and implications. **Horm. Metab. Res.**, v. 24, p. 353-359, 1992.

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

PREWITT, C.M.; HERMAN, J.P. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical regulation following lesions of the central nucleus of the amygdala. **Stress**, v.1, p. 263-280, 1997.

_____; _____. Lesion of the central nucleus of the amygdala decreases basal CRH mRNA expression and stress-induced ACTH release. **Ann. N.Y Acad. Sci.**, v.746, p. 438-440, 1994.

PRINCE J.L.; RUSSCHEN, F.T.; AMARAL, D.G. The limbic region. II. The amygdaloid complex. In HÖKFELT, T.; BJÖRKLUND, A.; SWANSON, L.W. **Integrat Systems of the CNS.**, Part I, Handbook of Chemical Neuroanatomy, Elsevier, Amsterdam, v.5, 1987. p. 279-388.

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

RAMÓN Y CAJAL, S. **Histologie du système nerveux de l'Homme et des vertébrés**. A. Malaine, 1909.

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

_____; LONDERO, R.G.; ACHAVAL, M. Funcional activities of the amygdala: on overview. **J. Psych Neurosci.**, v. 25, n. 1, p. 14-23, 2000.

_____; LONDERO, R.G.; ACHAVAL, M. Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. **Brain Res. Bull.**, v. 48, p. 173-183, 1999.

_____; PERES, T.M.S.; CUBILLA-GUTIERREZ, F.H.; LUCION, A.B. Effect of the estradiol implanted in the corticomедial amygdala on the sexual behavior of castrated male rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 1041-1049, 1991.

_____; LUCION, A.B. Effects of 8-OH-DPAT on sexual behavior of males rats castrated at different ages. **Horm. Behav.**, v. 30, p. 251-258, 1996.

RESS, H.D.; SWITZ, G.M.; MICHAEL, R.P. The estrogen-sensitive neural system in the brain of female cats. **J. Comp. Neurol.**, v. 193, p. 789-804, 1980.

RIGOTI, K.M. Análise morfológica neuronal e da densidade de espinhos dendríticos da amígdala medial de ratas durante o ciclo estral. Dissertação de Mestrado. PGG. Neurociências, ICBS. UFRGS. p. 12-78, 2002.

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

ROBBINS, T.W.; EVERITT, B.J. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. **Curr. Op. Neurobiol.**, v. 6, p. 228-236, 1996.

ROOZENDAAL, B.; McGAUGH, J.L. Amygdaloid nuclei lesions differentially affects glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 65. p. 1-8, 1996.

_____; KOOLHAAS, J.M.; BOHUS, B. Attenuated cardiovascular, neuroendocrine, and behavioral responses after a single footshock in central amygdaloid lesioned males rats. **Physiol. Behav.**, v. 50. p. 771-775, 1991.

SAKANAKA, M.; SHIBASAKI, T.; LEDERIS, K. Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. **Brain Res.**, v. 382, p.213-238, 1986.

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. **Exp. Gerontol.**, n. 34, p. 721-732, 1999.

SASAKI, M.; ARNOLD, A.P. Androgenic regulation of dendritic tress of motoneurons in the spinal nucleus of the bulbocavernosus: Reconstrution after intacellular iontophoresis of horseradish peroxidase. **J. Comp. Neurol.**, v. 308, p. 11-27, 1991.

SCALIA, F.; WINNANS, S.S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. **J. Comp. Neurol.**, v. 161, p. 31-55, 1975.

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

SEGAL, M., ANDERSON, P. Dendritic spine shaped by synaptic activity. **Curr. Op. Neurobiol.**, v. 10, p. 582-586, 2000.

_____. Imaging of calcium variations in living dendritic spines of cultured rat hipócampal neurons. **J. Physiol.**, v. 486, p. 283-295, 1995a.

_____. Dendritic spine for neuroprotectin: a hypothesis. **Trends Neurosci.**, v. 11, p. 468-471, 1995b.

SHAIKH, M.B.; STEINBERG, A.; SIEGEL, A. Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive rage behavior in the cat. **Brain Res.**, v. 283, p. 283-284, 1993.

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

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

SHEPHERD, G.M. The dendritic spine: A multifunctional integrative unit. **J.Endocrinol.**, v. 104, n.1, p. 130-136, 1979.

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

SHINODA, K.; NAGANO, M., OSAWA, Y. Neuronal aromatase expression in preoptic, strial, and amygdaloide regions during late prenatal and early postnatal development in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 343, p.113-129, 1994.

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

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

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

SILVERMAN, A.J.; HOFFMAN, D.L.; ZIMMERMAN, E.A. The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN). **Brain Res. Bull.**, v. 6, p. 47-61, 1981.

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

_____. Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. **Brain Res.** v. 92, p. 195-203, 1998.

_____. Distribution and regulation of steroid hormone receptor gene expression in the nervous system. **Adv. Neurol.**, v. 59, p. 207-226, 1993.

_____; 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. Neurol.**, v. 294, p. 76-95, 1990.

_____. 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.

_____; SWANSON, L.W. Projections of the medial preoptic nucleus: A phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. . **J. Comp. Neurol.**, v. 270, p. 209-242, 1988.

_____; _____. The distribution of neurotransmitter-specific cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus: Implications for the control of gonadotropin-secretion in the rat. **Brain Res.**, v.400, p.11-34, 1987.

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

SMOCK, T.; ARNOLD, S.; ALBECK, D.; EMERSON, P.; GARRITANO, J.; BURROWS, K.; DERBER, W.; SANSON, C.; MARRS, K.; WEATHERLY, H.; KRUSE, K. A peptidergic circuit for reproductive behavior. **Brain Res.**, v. 598, p. 138-142, 1992.

STARK, C.P.; ALPERN, H.P.; FUHRER, J.; TROWBRIDGE, M.G.; WIMBISH, H.; SMOCK, T. The medial amygdaloid nucleus modifies social behavior in male rats. **Physiol. Behav.**, v. 63, p. 253-259, 1998.

STEFANOVA, N.; OVTSCHAROFF, W. Sexual dimorphism of the bed nucleus of stria terminalis and amygdala. Springer-Verlag, Heidelberg, 2000.

SUNANDA; RAO, M.S.; RAJU, T.R. Effect of chronic restraint stress on dendritic spine and excrescences of hippocampal CA3 pyramidal neurons – a quantitative study. **Brain Res.**, v. 694, p. 312-317, 1995.

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

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

_____. **Brain maps: structure of the rat brain.** Amsterdam:Elsevier, 1992.

_____; SAWCHENKO, P.E.; RIVER, J.; VALE, W.W. Organization of ovine corticotrophin releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: An immunohistochemical study. **Neuroendocrinol**, v. 36, p. 165-186, 1983.

SZOT, P.; DORSA, D.M. Differential timing and sexual dimorphism in the expression of the vasopressin gene in the developing rat brain. **Brain. Res.**, v. 73, p. 177-183, 1993.

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

TEPPERMAN, J.; TEPPERMAN, H. M. The male. In J. _____; _____. **Metabolic and Endocrine Physiology**. Year Book Med. Pub., Chicago, 1987. p. 103 – 126.

TORAN-ALLERAND, C.D. Developmental interactions of estrogens with neurotrophins and their receptors. In: MICEVYCH, P.E.; HAMMER Jr, R.P. **Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones**. New York: Cambridge, 1995. p. 391-411.

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

TRIBOLLET, E.; DREIFUSS, J.J. Localization of neurones projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus area of the rat: a horseradish peroxidase study. **Neurosci.**, v. 6, p. 1315-1328, 1981.

URBAN, J.H.; MILLER, M.A.; DRAKE, C.T.; DORSA, D.M. Detection of vasopressin mRNA of the medial amygdala not the locus coeruleus by in situ hybridization. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 3, p. 277-283, 1990.

VALVERDE, F. The Golgi method: A tool for comparative structural analyses. In: NAUTA, W.J.H.; EBBSSON, S.O.E. **Contemporary Research Methods in Neuroanatomy**. Berlin, Springer-Verlag, 1970. p. 12-31.

VAN de KAR, L.D.; PIECHOWSKI, R.A.; RITTENHOUSE, P.A.; GRAY, T.S. Amygdaloid lesions: differential effects on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. **Neuroendocrinol.**, v. 54, p. 89-95, 1991.

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

VINADER-CAEROLS, C.; COLLADO, P.; SEGOVIA, S.; GUILAMÓN, A. Sex differences in posteromedial cortical nucleus of the amygdala in the rat. **Neuro. Report.**, v. 9, p. 2653-2656, 1998.

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

VYAS, A.; MITRA, R.; SHANKARANARAYANA RAO, B.S., CHATTARJI, S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in the hippocampal and amygdaloid neurons. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 6810-6818, 2002.

_____; _____. CHATTARJI, S. Effect of chronic immobilization and unpredictable stress on angiogenesis. **Soc. Neurosci.**, v. 30, p. 736-743, 2001.

WATANABE, Y.; GOULD, E.; McEWEN, B.S. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Brain Res.**, v. 588, p. 341-345, 1992.

WOOD, R.I. Estradiol, but no dihydrotestosterone, in the medial amygdala facilitates male hamster sex behavior. **Physiol. Behav.**, v. 59, p. 833-841, 1996.

_____; NEWMAN, S.W. Hormonal influence on neuron of the mating behavior pathway in male hamsters. In: MICEVYCH, P.E.; HAMMER Jr., R.P. **Neurobiological effects of sex steroids hormones**. Cambridge University Press, Cambridge, UK., p. 3-39, 1995a.

_____; _____. Androgen and estrogen receptors coexist within individual neurons in the brain of the Syrian hamster. **Neuroendocrinol.**, v. 62, p. 487-497, 1995b.

_____: _____. Mating activates androgen receptor-containing neurons in chemosensory pathways of the males Syrian hamster brain. **Brain Res.**, v. 614, p. 65-77, 1993.

WOOLF, N.J. A structural basis for memory storage in mammals. **Progress Neurobiol.**, v. 55, p. 59-77, 1998.

WOOLLEY, C.S.; WENZEL, H.J.; SCHWARTZKROIN, P.A. Estradiol increases the frequency of multiple synapse boutons in the hippocampal CA1 region of the adult female rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 373, p. 108-117, 1996.

_____; McEWEN, B.S. Rates of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 336, p. 293-306, 1993.

_____; GOULD, E.; FRANKFURT, M.; McEWEN, B.S. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. **J. Neurosci.**, v. 10. n. 12, p. 4035-4039, 1990.

YOKOSUKA, M.; OKAMURA.; HAYASHI, S. Postnatal development and sex difference in neurons containing estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon, and amygdala in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 389, p. 81-93, 1997.

YOUNG, B.J.; LEATON, R.N. Amygdala central nucleus lesions attenuate acoustic startle stimulus-avoked heart rate changes in rats. **Behav. Neurosci.**, v.110, p. 228-237, 1996.

ZAR, H. J. **Biostatistical Analysis**. 5 ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, 2005.