



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

**ESTUDO SOBRE A DENSIDADE DE ESPINHOS
DENDRÍTICOS DE NEURÔNIOS DA
AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-DORSAL DE
RATOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES
EXPERIMENTAIS**

Simone Marcuzzo

Porto Alegre

2006



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

**ESTUDO SOBRE A DENSIDADE DE ESPINHOS DENDRÍTICOS
DE NEURÔNIOS DA AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-DORSAL
DE RATOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS**

Simone Marcuzzo

Orientador: Prof. Dr. Alberto A. Rasia Filho

Co-orientadora: Profa. Dra. Matilde Achaval Elena

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

Porto Alegre

2006

AGRADECIMENTOS

À CAPES, à UFRGS e ao Programa de Pós Graduação em Neurociências pela oportunidade.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Alberto Antônio Rasia Filho e Profa. Dra. Matilde Achaval Elena, pela confiança, oportunidade, dedicação, paciência e pelo exemplo de competência e ética. A eles, todo meu respeito.

À Profa. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro por participar do experimento com os ratos velhos. E ao Dr. Sadi Schio por ter participado do experimento com os animais estressados cronicamente.

À Profa. Dra. Sidia M. Callegari-Jacques pelo auxílio com a análise estatística.

À Profa. Dra. Carmen Silvia Benevides Fellippa pelo incentivo e amizade.

À minha família, pelo incentivo e apoio em todos os momentos. À Mônica e à Leila pela ajuda no final do mestrado.

À amiga Aline Dall'Oglio pela ajuda, incentivo e amizade.

Ao Pedro Kalil Gaspar, pelo amor, dedicação e por estar sempre ao meu lado.

Aos colegas do laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS: Jocemar Ilha, Paula Rigon, Juliana de Castilhos, Erica Hermel, Rafaela Araújo, Maria Izabel Ugalde, Flávia Martinez, Leonardo Tartaruga, Taís Sarzenski, Günther Gelhen e Léder Xavier, pelas contribuições e amizade.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia da FFFCMPA: Édson Quagliotto, Janaína Brusco, Helington Neckel e Ramiro Barcos pela parceria e amizade. Também aos professores da FFFCMPA: Ana Maria Ponzio de Azevedo, Cyntia Fin, Pedro Dall'Ago e às técnicas de laboratório, Carmen Rocha e Rosângela Bjerk, pela ajuda e convivência agradável.

As ex-colegas de laboratório Aline Pagnussat, Cláudia Forti, Cláudia Puperi pela amizade.

A todos, que contribuíram para minha formação e para que este trabalho se tornasse realidade.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
RESUMO.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	12
1. 1. Amígdala medial.....	14
1. 1. 1. Localização, divisão, hodologia e funções.....	14
1. 2. Plasticidade neuronal e estresse de contenção.....	20
1. 3. Plasticidade neuronal e “ambiente enriquecido”.....	24
1. 4. Plasticidade neuronal e envelhecimento.....	27
1. 5. Técnica de Golgi e caracterização dos neurônios da AMePD.....	29
1. 6. Espinhos dendríticos.....	33
2. OBJETIVOS.....	39
2. 1. Gerais.....	39
2. 2. Específicos.....	39
3. MATERIAL e MÉTODOS.....	40
3. 1. Animais.....	40
3. 2. Procedimento experimental.....	40
3. 2. 1. Técnica de Golgi.....	42
3. 3. Aquisição dos dados.....	43
3. 4. Análise estatística.....	46
4. RESULTADOS.....	49
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÕES.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
8. ANEXO.....	103

ABREVIATURAS

ACe	Amígdala central
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
AMBI	Amígdala basolateral
AMe	Amígdala medial
AMeAD	Amígdala medial ântero-dorsal
AMeAV	Amígdala medial ântero-ventral
AMePD	Amígdala medial pósterio-dorsal
AMePD _i	Porção intermediária da amígdala medial pósterio-dorsal
AMePD _l	Porção lateral da amígdala medial pósterio-dorsal
AMePD _m	Porção medial da amígdala medial pósterio-dorsal
AMePV	Amígdala medial pósterio-ventral
BNST	Núcleo próprio da estria terminal
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CRH-R	Receptor para o hormônio liberador de corticotropina
e.p.m	Erro padrão da média
GR	Receptor para glicocorticóide
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
i.p.	Intraperitoneal
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MPOA	Área pré-óptica medial
MR	Receptor para mineralocorticóide
NMDA	N-metil-D-aspartato
PSD	Densidade pós-sináptica
REL	Retículo endoplasmático liso
SNC	Sistema nervoso central

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Classificação dos núcleos que compõe a amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais, conforme descrito por Alheid e colaboradores (1995) e modificado por Rasia-Filho e colaboradores (2000).
- Figura 2 Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar os quatro subnúcleos da AMe: AMeAD (em amarelo), AMeAV (em verde), AMePD (em azul) e AMePV (em vermelho). Os valores em mm colocados no lado direito das imagens referem-se à distância posterior ao bregma. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998) e equivalentes às figuras 26 a 31 deste iniciando-se na parte superior à inferior da figura.
- Figura 3 Fotografia representado o compartimento metálico utilizado no modelo de estresse de contenção (conforme descrito em DAYAS *et al.* 1999; WATANABE *et al.*, 1992).
- Figura 4 Fotografia do “ambiente enriquecido”, mostrando os diversos objetos utilizados para estímulos táteis e visuais (conforme descrito por JOHANSSON e BELICHENKO, 2002).
- Figura 5 Fotomicrografias de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, com morfologia estrelada (A) ou bipenachada (B) do subnúcleo póstero-dorsal da amígdala medial de rato macho adulto (conforme DE CASTILHOS *et al.*, 2006).
- Figura 6 Esquema da ultraestrutura do espinho dendrítico onde se observam a cabeça e o pescoço do espinho que emergem do dendrito adjacente na base da figura. Outros elementos constituintes da estrutura do espinho não estão demonstrados. PSD, densidade pós-sináptica; REL, retículo endoplasmático liso; VE, vesícula endocítica; Aparelho do espinho; Filamento de actina, que formam o citoesqueleto do espinho; Polirribossomos (adaptado de HERING; SHENG, 2001).
- Figura 7 Representação esquemática das diferentes morfologias dos espinhos dendríticos, como se observa à microscopia óptica, surgindo a partir de uma linha de base que representa o tronco dendrítico (adaptado de HERING; SHENG, 2001).
- Figura 8 Fotomicrografias de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial póstero-dorsal de ratos machos adultos não

manipulados experimentalmente e que foram classificados como de tipo bipenachado (A) e (A') estrelado (B) e (B').

- Figura 9 Desenhos esquemáticos feitos em câmara clara, acoplada a microscópio óptico, dos espinhos dos primeiros 40 μ m dendríticos de neurônios bipenachado (A) e estrelado (B), impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial póstero-dorsal de ratos machos adultos e não manipulados experimentalmente.
- Figura 10 Densidade de espinhos dendríticos (média \pm e.p.m.) obtida nos primeiros 40 μ m dendríticos de neurônios bipenachados e estrelados, impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial póstero-dorsal de ratos machos adultos e não manipulados experimentalmente.
- Figura 11 Fotomicrografias de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial póstero-dorsal dos grupos controle (machos adultos e não manipulados experimentalmente) ou submetidos ao procedimento de estresse de contenção com diferentes períodos de duração. (A) grupo controle, (A') detalhe dos espinhos do grupo controle em maior aumento; (B) e (B') grupo submetido ao estresse de 1 h, (C) e (C') grupo submetido ao estresse de contenção por 6 h, (D) e (D') grupo submetido ao estresse de contenção por 28 dias.
- Figura 12 Fotomicrografias de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial póstero-dorsal de ratos dos grupos controle (machos adultos não manipulados experimentalmente) ou submetidos ao "ambiente enriquecido" por 3 semanas. (A) grupo controle, (A') detalhe dos espinhos do grupo controle em maior aumento; (B) e (B') grupo submetido ao enriquecimento ambiental.
- Figura 13 Fotomicrografias de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, na amígdala medial póstero-dorsal de ratos do grupo controle (machos adultos e não manipulados experimentalmente, com 3-5 meses de idade) e do grupo de animais velhos, com 24 meses de idade. (A) grupo controle, (A') detalhe dos espinhos do grupo controle em maior aumento; (B) e (B') grupo de animais estudados em idade avançada.
- Figura 14 Desenhos esquemáticos feitos em câmara clara acoplada a microscópio óptico dos espinhos dos primeiros 40 μ m dendríticos de neurônios impregnados pela técnica de Golgi na amígdala medial póstero-dorsal dos seguintes grupos experimentais: (A) controle (machos adultos e não manipulados experimentalmente); (B) submetido a estresse de contenção por 1 h; (C) submetido a estresse de contenção por 6 h; (D) submetido a estresse de contenção por 28 dias; (E) mantido em "ambiente enriquecido" durante 3 semanas e (F) velhos com 24 meses de idade.

- Figura 15 Densidade de espinhos dendríticos (média \pm e.p.m.) obtida nos primeiros 40 μ m dendríticos de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial póstero-dorsal (AMePD) dos grupos controle (machos adultos e não manipulados experimentalmente), submetido a 1 h de estresse de contenção, submetido a estresse de contenção por 6 h ou submetido a estresse de contenção por 28 dias.
- Figura 16 Peso relativo das adrenais (valor relativo em mg / peso corporal do rato em g X 100, calculado conforme Watanabe, 1992) dos grupos controle (machos adultos e não manipulados experimentalmente), submetido a 1 h de estresse de contenção, submetido a estresse de contenção por 6 h ou submetido a estresse de contenção por 28 dias.
- Figura 17 Densidade de espinhos dendríticos (média \pm e.p.m.) obtida nos primeiros 40 μ m dendríticos de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial póstero-dorsal dos grupos controle (machos adultos e não manipulados experimentalmente, 3-5 meses de idade), submetido ao “enriquecimento ambiental” durante 3 semanas e velhos (24 meses de idade).

RESUMO

O núcleo medial da amígdala (AMe), cujo um de seus componentes tem localização póstero-dorsal (AMePD), é uma estrutura encefálica que apresenta plasticidade morfofuncional em seus neurônios e modula vários comportamentos sociais e reprodutivos em ratos. Os objetivos do presente estudo foram determinar a densidade de espinhos dendríticos de neurônios da AMePD de ratos nas seguintes condições experimentais: 1) machos adultos e não manipulados experimentalmente, para estudar separadamente os neurônios multipolares de tipo bipenachados e estrelados; 2) machos adultos submetidos ao estresse de contenção por 1 h, por 6 h ou por 28 dias; 3) machos adultos criados em “ambiente enriquecido” por 3 semanas; e, 4) em machos com idade avançada (24 meses), estudá-los na velhice. Todos os animais (N = 6 em cada grupo) foram manipulados em condições éticas e submetidos ao método de Golgi do tipo “single-section”. Nos animais dos grupos controle e submetidos ao estresse de contenção, adicionalmente as adrenais foram retiradas e pesadas. Para o estudo dos neurônios da AMePD, os encéfalos foram

seccionados em vibrátomo e os cortes coronais foram colocados, após fixação, em solução de dicromato de potássio e em nitrato de prata. Neurônios bem impregnados e indubitavelmente presentes na AMePD foram selecionados para estudo. Os espinhos presentes nos primeiros 40 μm dendríticos foram desenhados com auxílio de uma câmara clara, acoplada a microscópio óptico, em aumento de 1000X. Cada animal teve 8 ramos dendríticos selecionados, um por neurônio diferente, perfazendo 48 ramos ao total em cada grupo experimental. Para o primeiro objetivo, as médias da densidade de espinhos dendríticos dos neurônios multipolares bipenachados e estrelados foram comparados pelo teste “t” de Student. Para os demais, as médias das densidades de espinhos dendríticos dos ratos nos grupos estudados nas diferentes condições experimentais foram comparados entre todos os grupos experimentais pela ANOVA de uma via, tendo-se o grupo controle (obtido do primeiro experimento) como o mesmo para todos os outros grupos manipulados experimentalmente. A seguir, os dados foram analisados pelo teste *post-hoc* de Tukey tendo-se selecionado as comparações mais pertinentes aos grupos experimentais estudados. Em todos os casos o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. A densidade de espinhos dendríticos (média \pm e.p.m do número de espinhos por μm dendrítico) foi de $3,07 \pm 0,1$ e $3,12 \pm 0,05$ para os neurônios bipenachados e estrelados, respectivamente. Os dois tipos de neurônios multipolares não apresentaram diferença estatisticamente significativa na densidade de espinhos dendríticos entre si ($p = 0,6$). Desta forma, aleatoriamente selecionou-se parte dos resultados de ambos os tipos celulares que foram somados para gerar o grupo controle. Nos grupos experimentais estudados a seguir, os dois tipos morfológicos contribuíram indistintamente para os valores obtidos. Os resultados da ANOVA de uma via indicaram que em tais grupos houve diferença estatisticamente significativa quando os dados foram comparados entre si [$F(5,35) = 10,736$; $p < 0,01$]. O

teste *post hoc* de Tukey demonstrou que o grupo submetido ao estresse de contenção por 1 h possui uma menor densidade de espinhos dendríticos em comparação ao grupo controle ($1,94 \pm 0,08$ e $2,95 \pm 0,16$; respectivamente; $p < 0,01$). Tal redução foi de mais de 34% em relação ao grupo controle. Já os grupos submetidos ao estresse por 6 h e ao estresse por 28 dias (média \pm e.p.m = $2,52 \pm 0,11$ e $3,07 \pm 0,03$; respectivamente), não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). O peso relativo das adrenais apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e submetidos ao estresse de contenção [$F(3,29) = 48,576$; $p < 0,01$]. O grupo estressado cronicamente apresentou o peso relativo das adrenais maior do que qualquer outro dos grupos estudados ($p < 0,01$). O teste *post hoc* de Tukey demonstrou que o grupo submetido ao enriquecimento ambiental apresentou uma diminuição significativa na densidade de espinhos dendríticos em relação ao grupo controle ($2,39 \pm 0,12$ e $2,95 \pm 0,16$; respectivamente; $p < 0,05$) e que tal redução foi de 19% ($p < 0,05$). Por fim, o teste *post hoc* de Tukey também indicou que os ratos velhos não apresentaram diferença estatisticamente significativa no valor da densidade de espinhos dendríticos em relação ao grupo controle ($2,55 \pm 0,16$ e $2,95 \pm 0,16$; respectivamente; $p > 0,05$). Os resultados demonstram a plasticidade neural que ocorre na AMePD, específica para a condição experimental estudada. As modificações no número dos espinhos dendríticos na AMePD podem ser uma consequência do funcionamento da microcircuitaria local e da hodologia desta estrutura no contexto da organização geral do SNC do rato, como decorrência de ações hormonais nessa estrutura nervosa.

1. INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso Central (SNC) pode passar por mudanças em parte de sua morfologia e fisiologia em resposta a alterações no ambiente no qual o animal se encontra (McEWEN, 2006). Tal capacidade é designada plasticidade neural, donde o termo plasticidade vem a significar a qualidade do que pode ser modelado. Por exemplo, na citoarquitetura do hipocampo de ratos, modificação morfológica e funcional pode ser demonstrada em neurônios piramidais da região CA1 hipocampal que respondem a novos estímulos formando novas sinapses em espinhos dendríticos (SAPOLSKY, 2003; NAGERL *et al.*, 2004; KOMATSUZAKI *et al.*, 2005). Essas mudanças também podem ser induzidas por hormônios liberados em resposta a um evento específico ou que podem variar com o estágio de vida do animal (SHORS, 2005). Assim, os efeitos de diversos estímulos ambientais na plasticidade neural podem ser variados, além de serem distintos dependendo da idade e do sexo do animal (KOLB *et al.*, 2003; McEWEN, 2006). Tal capacidade é muito importante para a adaptação animal, pois a habilidade para interagir e responder ao ambiente depende da obtenção e consolidação de experiências em processos de aprendizagem e de memória (ROSENZWEIG; BENNET, 1996; NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2004; LEGGIO *et al.*, 2005).

A memória dita “emocional” é uma categoria especial de memória que envolve uma atividade dita “não-declarativa” (provavelmente não consciente) e a armazenagem de

informação que possua significância emocional. O sistema neural essencial para a formação de memória “emocional” envolve os núcleos amigdalianos e as estruturas que com eles se conectam (McDONALD; WHITE, 1993; LeDOUX, 1993; RASIA-FILHO; HILBIG, 2005). De fato, a amígdala é uma estrutura do prosencéfalo muito importante para a percepção da emoção e para comportamentos modulados pelas emoções, como no condicionamento pavloviano clássico (MAREN, 2003).

A amígdala, ou complexo amigdaliano, é uma estrutura que compreende subnúcleos (Figura 1) que formam uma complexa rede estrutural inter-relacionada e multifuncional, uma vez que está envolvida na modulação de diversos comportamentos (ALHEID *et al.*, 1995; EVERITT, 1995; SWANSON; PETROVICH, 1998; RASIA-FILHO *et al.*, 2000; SAH *et al.*, 2003; de OLMOS *et al.*, 2004). Atribui-se à amígdala de ratos diversas funções, tais como: respostas a estímulos gerados por medo e ansiedade, percepções de estímulos olfativos e hormonais, modulação do comportamento reprodutivo e participação na aquisição do aprendizado e da memória condicionada (RASIA-FILHO *et al.*, 1991; KLING; BROTHERS, 1992; LeDOUX, 1992; EVERITT, 1995; KONDO; ARAI, 1995; WOOD; NEWMAN, 1995; QUIRK *et al.*, 1995; SWANSON; PETROVICH, 1998; DAVIS, 2000; PITKÄNEN, 2000). Para participar dessas atividades, ela possui a capacidade de receber diferentes informações sensoriais, tanto interoceptivas (viscerais) quanto exteroceptivas (estímulos olfativos, auditivos e visuais) que acabam por modificar sua atividade e estimular diversas regiões do SNC em resposta ao estímulo inicial (KLING; BROTHERS, 1992; LeDOUX, 1992; QUIRK *et al.*, 1995; DAVIS, 2000). Com isto, a amígdala apresenta a capacidade de adequar a relação do animal em seu ambiente, modulando o comportamento social e conjugando-o com alterações simpáticas e parassimpáticas ou neuroendócrinas (RASIA-FILHO *et al.* 2000). Acertadamente, a

amígdala não se constitui mais nem em unidade anatômica e nem estrutural (SWANSON; PETROVICH, 1998). É imperativo, portanto, que se abandone a consideração de um elemento único e se estude detalhadamente cada um de seus componentes e, por vezes, de seus subcomponentes que formam circuitos específicos para gênese e modulação de respostas neurais envolvidas com comportamentos e ajustes amplos (CANTERAS *et al.*, 1995; NEWMAN, 1999; SHEEHAN *et al.*, 2001, PETROVICH *et al.*, 2001; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; RONDINI *et al.*, 2004).

Estudos mais recentes sobre a divisão da amígdala de ratos apresentam-na dividida em quatro regiões, segundo a sua citoarquitetura, hodologia e função, que são: 1) amígdala “expandida”, denominada assim por se estender além de seus limites anatômicos, sendo formada pelos núcleos medial (AMe) e central (ACe); 2) amígdala com características corticais, subdividida em porção basolateral (AMBI) e em porções que se ligam às vias olfativas e vomeronasal; 3) área de transição, localizada entre a porção ventral dos núcleos da base e a amígdala “expandida”; e 4) núcleos ainda não classificados, constituídos por um grande grupo de células dispersas na substância branca e no interior do núcleo próprio da estria terminal (ALHEID *et al.*, 1995; HEIMER *et al.*, 1997; de OLMOS *et al.*, 2004; Figura 1).

1. 1. Amígdala medial

1. 1. 1. Localização, divisão, hodologia e funções

A AMe é um dos núcleos superficiais do complexo amigdaliano, ocupando seu aspecto ventromedial, rostral à parte ventral do ventrículo lateral (de OLMOS *et al.* 1985; 2004; CANTERAS *et al.*, 1995; COOKE; SIMERLY, 2005). É formada por uma coluna

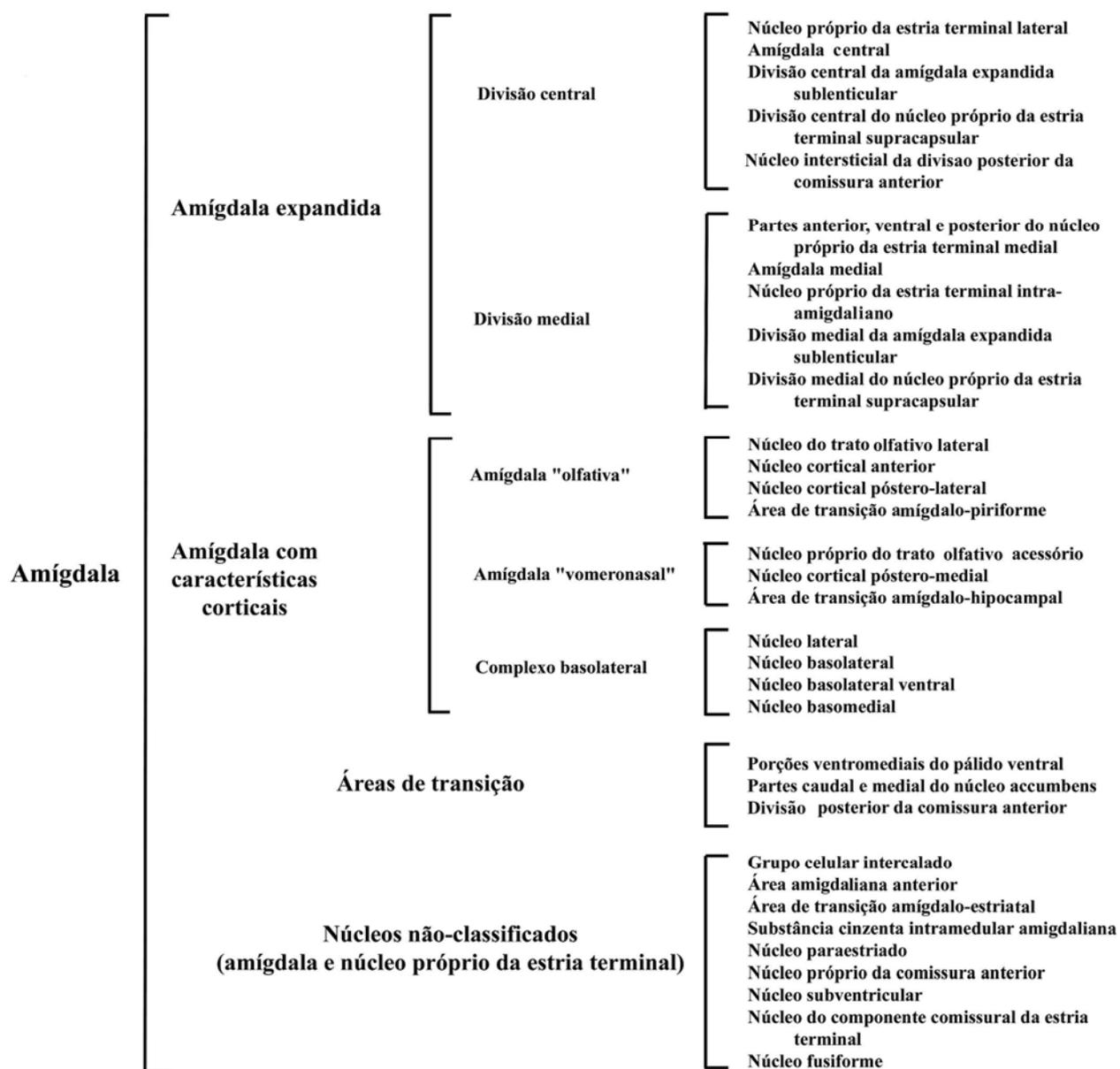


Figura 1. Classificação dos núcleos que compõe a amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais, conforme descrito por Alheid e colaboradores (1995) e modificado por Rasia-Filho e colaboradores (2000).

proeminente de células que surgem em justaposição à superfície lateral das fibras que ascendem pelo trato óptico e, caudalmente, encontra-se em posição ventral em relação à estria terminal (ALHEID, *et al.*, 1995). A AMe tem sido dividida em subnúcleos de diversas maneiras segundo critérios de diferentes autores. Alheid e cols. (1995) e de Olmos e cols. (2004) dividem-na nos subnúcleos ântero-dorsal (AMeAD), ântero-ventral (AMeAV), pósterodorsal (AMePD) e póstero-ventral (AMePV; Figura 2). E, em função de suas conexões, ela pode estar organizada em uma região anterior, da qual fazem parte a AMeAD, a AMeAV e a AMePV, e uma região posterior, formada basicamente pela AMePD (CANTERAS *et al.*, 1995).

A AMePD, objeto de estudo deste trabalho, é separada do trato óptico por uma camada com poucos corpos celulares, a qual se torna estreita em direção rostral e dorsal até que desaparece completamente próximo da AMeAD (de OLMOS *et al.*, 1985; 2004). Esta região, onde estão os axônios que compõem a eferência do núcleo próprio da via olfativa acessória, já foi chamada de “camada molecular” da AMe, embora haja controvérsia neste sentido (SCALIA; WINANS, 1975; NISHIZUKA; ARAI, 1983; COOKE, SIMERLY, 2005; DE CASTILHOS *et al.*, 2006). Os neurônios da AMePD agrupam-se formando três colunas orientadas paralelamente à superfície medial do núcleo. A primeira é uma coluna medial ou superficial (AMePDm), a segunda é a coluna intermediária (AMePDi) e a terceira coluna é a mais profunda e lateral (AMePDI; PAXINOS; WATSON, 1998; de OLMOS *et al.*, 2004). A AMePD possui várias aferências que advêm de diferentes regiões do encéfalo. Dentre as aferências mais estudadas, estão as hipotalâmicas [da área hipotalâmica anterior; áreas pré-ópticas medial (MPOA) e lateral; núcleo arqueado; núcleos dorsomedial, posterior, lateral, pré-mamilar ventral, supra-óptico, tuberal e ventromedial],

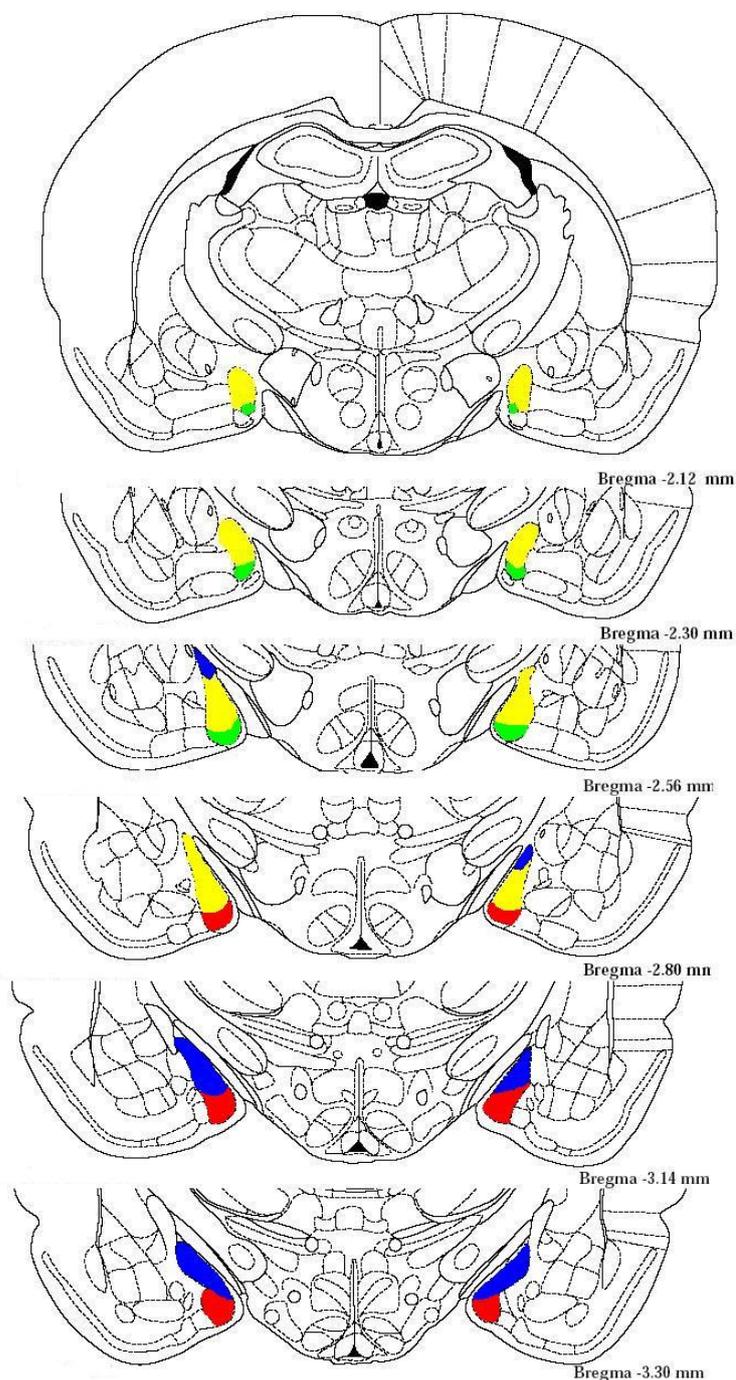


Figura 2. Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar os quatro subnúcleos da AMe: AMeAD (em amarelo), AMeAV (em verde), AMePD (em azul) e AMePV (em vermelho). Os valores em mm colocados no lado direito das imagens referem-se à distância posterior ao bregma.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

as do córtex cerebral (da área pré-límbica, córtex entorrinal, infralímbico e perirrinal dorsal), as aferências talâmicas (do núcleo medial, parafascicular, paraventricular e posterior, dentre outros), as do tronco encefálico (principalmente do núcleo dorsal da rafe e núcleo parabraquial), da via olfativa (do córtex piriforme, bulbo olfativo acessório e núcleo endopiriforme) e de outras regiões, como, por exemplo, do núcleo da faixa diagonal de Broca, do núcleo próprio da estria terminal (porção principal deste) e da substância *innominata*. Além dessas, existem também as aferências intra-amigdalíanas, onde, por exemplo, destacam-se as da área amígdalo-hipocámpal e dos núcleos basal e basal acessório e as dos núcleos corticais anterior, posterior, lateral e medial. As aferências inter-amigdalíanas são exemplificadas pelas provenientes do córtex periamigdaliano, núcleos basal acessório, cortical posterior e do trato olfativo lateral (McDONALD, 1998).

Em relação às eferências da AMePD, dentre as mais estudadas e significativas estão as hipotalâmicas (para os núcleos hipotalâmicos periventricular ântero-ventral, MPOA e núcleo pré-mamilar ventral), as corticais (principalmente para a área entorrinal lateral, área de transição pós-piriforme, área CA1 hipocámpal e subículo), as do tronco encefálico (para a área tegmental dorsal e substância cinzenta periaqueductal) e de outras regiões, como, por exemplo, para o núcleo próprio da estria terminal (parte ântero-dorsal e posterior principal) e para a substância *innominata*, principalmente. Ademais, existem também as eferências intra-amigdalíanas onde, dentre outras, destacam-se aquelas para os núcleos central, cortical póstero-lateral e póstero-medial (CANTERAS *et al.*, 1995; PETROVICH *et al.* 2001). Algumas dessas conexões, como se pode observar, são recíprocas e outras unidirecionais (por exemplo, COOKE; SIMERLY, 2005).

Com base em sua relação com a circuitaria neural onde está envolvida e em experimentos comportamentais, a AMe tem sido descrita como uma região que participa na

modulação da memória em condicionamentos pavlovianos clássicos e de aprendizado onde o componente emocional esteja envolvido (ALLEN; ALLEN, 1974; AGGLETON; BLINT, 1989; SHINDOU *et al.*, 1993; CANTERAS *et al.*, 1995; WATANABE *et al.*, 1995; ROOZENDAAL; McGAUGH, 1996; RASIA-FILHO *et al.*, 2000; STARK, 2005). Tal achado foi observado em testes de esquiva inibitória (ROOZENDAAL; McGAUGH, 1996), nas respostas neuroendócrinas a um evento estressor (McGAUGH, 1992; LU *et al.*, 1995; DAYAS *et al.*, 1999, KUBO *et al.*, 2004) e em uma série de testes envolvendo comportamentos sociais, tais como o agressivo e o defensivo (SLODDART-APTER; Mc DONNEL, 1980; BOLHUIS, 1984; SIEGEL; BRUTUS, 1990; SHAIKH *et al.*, 1993; DIELENBERG *et al.*, 2001), o medo (LI *et al.*, 2004), o sexual (RASIA-FILHO *et al.*, 1991; KONDO, 1992; WONG *et al.*, 1993; MEISEL; SACHS, 1994; KONDO; ARAI, 1995; NEWMAN, 1999; BREGEIRON *et al.*, 2002; STARK, 2005) e o maternal (NUMAN *et al.*, 1993; SHEEHAN *et al.*, 2000; 2001).

Por exemplo, a AMe, associada à AMBl, está relacionada com a formação de memória modulada pelos glicocorticóides (ROOZENDAAL; McGAUGH, 1996). Isto é observado em ratos quando situações emocionais, tais como a exposição do animal a algum predador natural, iniciam uma seqüência de eventos fisiológicos envolvendo a liberação de hormônios advindos da medula adrenal (como a adrenalina) e a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), resultando em aumento de corticosterona na circulação sanguínea (ROOZENDAAL; McGAUGH, 1996). Muitos estudos têm determinado que os glicocorticóides afetam várias etapas nos processos de consolidação e de evocação de memória (BOHUS; de KLOET, 1991; MITCHELL; MEANEY, 1991; ROOZENDAAL *et al.*, 2005). A AMe, a ACe e a AMBl apresentam alta densidade dos receptores para glicocorticóides (ALLEN; ALLEN, 1974) e acredita-se que, por isto, tais regiões estejam

relacionadas com o processo mnemônico (ROOZENDAAL; McGAUGH, 1996). Em concordância com isso, lesões excitotóxicas na AMe de ratos suprimiram respostas do eixo HPA quando os animais foram expostos a um evento estressor (isolamento social do animal estudado), bloqueando também a liberação de ocitocina nos núcleos supra-óptico e paraventricular do hipotálamo (DAYAS *et al.*, 1999). Os achados deste estudo mostraram, de forma muito importante, que a AMe é o primeiro local, dentro da amígdala, responsável pelo controle do HPA e pelas respostas secretórias ocitocinérgicas frente a um evento estressor emocional incondicionado (DAYAS *et al.*, 1999).

1. 2. Plasticidade neural e estresse de contenção

O estresse pode ser definido como qualquer tipo de ameaça, real ou potencial, que necessita respostas compensatórias para a manutenção da homeostasia (PACÁK; PALKOVITS, 2001). Não necessariamente um estímulo estressante deve ser sempre nocivo ao indivíduo, e as respostas adaptativas geradas desta forma já foram chamadas em conjunto de “alostasia”, que significa “a capacidade de manter a estabilidade do organismo em decorrência e durante as mudanças impostas ao animal” (McEWEN, 2002). A resposta ao estresse consiste em um componente rápido, que pode chegar a uma resposta extrema de “luta ou fuga” e que envolve geralmente (mas não exclusivamente) a ativação do sistema simpático-adrenal e a liberação de catecolaminas em circulação, mobilização de reservas de energia, aumento da atividade cardíaca, redirecionamento do fluxo sanguíneo das vísceras para os músculos periféricos e ocorrência de vigília com atividade de atenção e alerta (RADLEY; MORRISON, 2005; para avanço nesta discussão e exemplos adicionais, veja-se Rasia-Filho, 2006).

O estresse de contenção é um procedimento experimental que tem sido frequentemente utilizado para provocar respostas comportamentais e neuroendócrinas também observáveis após outras causas de estresse estudados em animais em laboratório (WATANABE *et al.*, 1992; DAYAS *et al.*, 1999; WOOD *et al.*, 2003; FONTELLA *et al.*, 2005). Consiste em colocar os animais, individualmente, em um compartimento que restringe seus movimentos, como o mostrado na Figura 3, e por tempo variado (WATANABE *et al.*, 1992; DAYAS *et al.*, 1999). Esse modelo é definido como sendo um estressor emocional, pois a situação ou estímulo sinaliza uma ameaça potencial à vida do animal. O estresse de contenção é um estímulo emocional suficientemente forte para ser chamado de estressor e evocar respostas como a ativação do eixo HPA e as diversas ações dos glicocorticóides (DAYAS *et al.*, 1999). Já está muito bem documentado na literatura que a contenção por pouco tempo ou em experimentos que envolvem muitos dias é capaz de aumentar os níveis de corticosterona circulantes em ratos (WATANABE *et al.*; 1992; INOUE, 1993; CHEN; HERBERT, 1995a; PELLEGRINI *et al.*, 1998; TORRES *et al.* 2001; PACE *et al.*, 2005).

De fato, uma das respostas endócrinas ao estresse esperadas e características é a ativação do eixo HPA, levando à rápida secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e ao aumento nos níveis de glicocorticóides circulantes, os quais são críticos para adaptação ao estresse (AGUILERA, 1998). O hormônio liberador da corticotrofina (CRH) é o maior regulador hipotalâmico da secreção do ACTH nas células da hipófise anterior, agindo em receptores específicos de membrana classificados como CRH-R tipo I e CRH-R tipo 2 (AGUILERA, 1998, HAUGER; DAUTZENBERG, 2000). Os glicocorticóides, por sua vez, são esteróides com capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica. No encéfalo eles podem se ligar a dois tipos de receptores citoplasmáticos pertencentes à



Figura 3. Fotografia representado o compartimento metálico utilizado no modelo de estresse de contenção (conforme descrito em DAYAS *et al.*,1999; WATANABE *et al.*, 1992).

superfamília de receptores esteróides: o receptor para mineralocorticóide (MR), chamado assim por se ligar com alta afinidade a aldosterona, mas também aos glicocorticóides; e o receptor para glicocorticóide (GR), o qual possui baixa afinidade por mineralocorticóide, mas maior ao tipo de hormônio que lhe dá o nome. A ação dos glicocorticóides envolve sua ligação a um complexo receptor-esteróide que regula a replicação do DNA em partes específicas e relacionadas com as ações celulares subsequentemente desencadeadas por tais hormônios (McEWEN, 2006). Ou seja, como regra, o hormônio entra no citoplasma e desloca uma proteína de choque-térmico ou outra chaperona da porção de união do GR. Isto leva à hiperfosforilação do GR e muda sua conformação para que ele possa entrar no núcleo e interagir com os elementos regulatórios de glicocorticóides nas áreas-alvo do DNA. A seguir, a transcrição de co-fatores pode melhorar ou reprimir a expressão gênica (BERNE *et al.*, 2004; McEWEN, 2006). Os MR são saturados em níveis basais de

glicocorticóides, enquanto que os GR não são saturados sob condições basais, mas sim nas fases de pico do ritmo circadiano e durante o estresse. Essas diferenças e a heterogeneidade nas distribuições regionais no encéfalo sugerem que os MR determinam a atividade basal do eixo HPA e o GR podem mediar as respostas neurais ao estresse (HAUGER; DAUTZENBERG, 2000).

Os glicocorticóides exercem seus efeitos em todo o encéfalo durante o estresse, alterando a cognição e o comportamento de uma maneira adaptativa. Apesar do aumento dos glicocorticóides ser benéfico em certas situações, tais como o aumento da atenção e a consolidação de informações aprendidas e relacionadas a eventos de vida (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; McEWEN, 2006), estímulos estressores prolongados ou extremos podem resultar em mudanças que, paradoxalmente, podem prejudicar a habilidade do SNC para a regulação apropriada do eixo HPA e para responder a estressores subseqüentes (RADLEY, 2005). Por exemplo, ratos adultos submetidos a estresse de contenção crônico exibiram atrofia nos dendritos apicais dos neurônios piramidais da região CA3 hipocampal (WATANABE *et al.* 1992). Acredita-se que esses efeitos sejam decorrentes da elevação dos níveis de corticosterona plasmática em resposta ao estresse, pois a injeção diária de corticosterona por 3 semanas igualmente induziu atrofia dos dendritos apicais desses neurônios (WOOLLEY *et al.* 1990). Doze semanas de injeções de corticosterona resultaram em morte de neurônios piramidais na mesma região CA3 hipocampal (SAPOLSKY *et al.*, 1985). Alterações morfológicas também foram encontradas nos dendritos dos neurônios piramidais do córtex pré-frontal medial de ratos usando-se este mesmo modelo experimental (BROWN, 2005). Em contraste à atrofia dos dendritos no hipocampo descrita acima, o estresse de contenção crônico resultou em aumento das

ramificações dendríticas nos neurônios piramidais e estrelados da AMBI (VYAS *et al.*, 2002) e do BNST (VYAS *et al.*, 2003).

O estresse de contenção agudo (uma única sessão com 60 min de duração) causou aumento da expressão de *c-fos* na AMe. Por outro lado, o estresse repetido, 10 sessões com duração de 60 minutos, resultou em uma diminuição da expressão de *c-fos* na AMe, mostrando que a resposta neuronal pode se adaptar ao estresse crônico (CHEN; HERBERT, 1995). Não há até o momento descrição do que ocorre na morfologia dos neurônios da AMe, e especificamente, na AMePD de ratos submetidos a esse procedimento experimental. Tal dado é relevante dado o papel proeminente da AMe na regulação neuroendócrina do eixo HPA (DAYAS *et al.*, 1999). Um dos objetivos desta dissertação é estudar a densidade de espinhos dendríticos em neurônios da AMePD de ratos submetidos ao estresse de contenção, como será detalhado adiante.

1. 3. Plasticidade neural e “ambiente enriquecido”

O “enriquecimento ambiental” é um modelo experimental onde animais são criados com muitos estímulos, os quais podem ser explorados livremente, e que podem causar modificações comportamentais e morfofuncionais neurais dependentes dessa experiência (LARSSON *et al.*, 2002; NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2004). Para tanto, os animais são mantidos em caixas em cujo interior há diversos objetos, tais como: bolas, rampas, escadas, cubos e rodas que estão à disposição dos animais por um período variável de tempo (Figura 4).

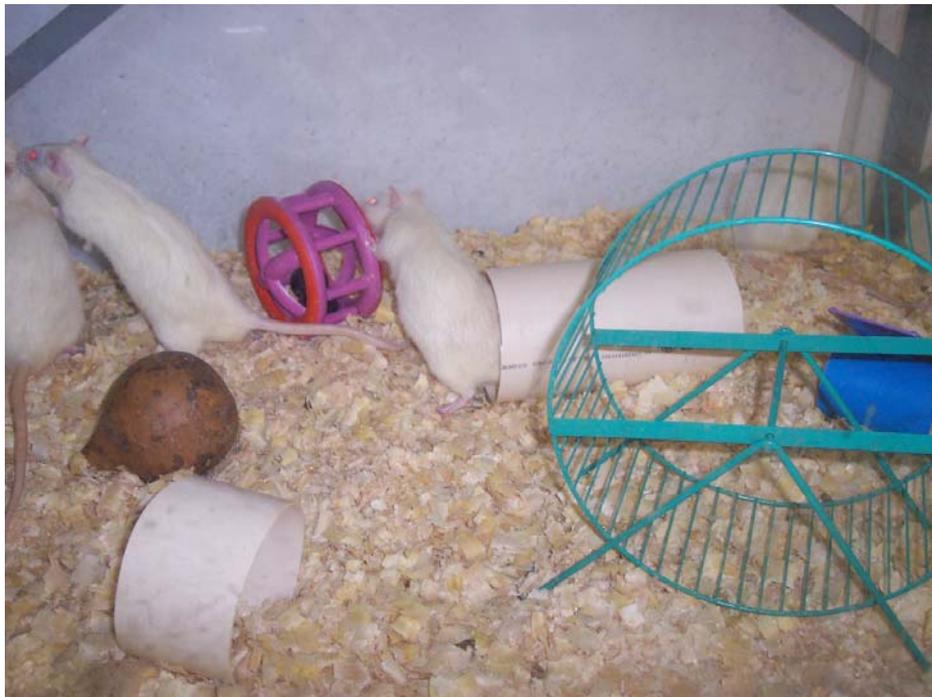


Figura 4. Fotografia do “ambiente enriquecido”, mostrando os diversos objetos utilizados para estímulos táteis e visuais (conforme descrito por JOHANSSON; BELICHENKO, 2002).

Há notáveis mudanças bioquímicas e estruturais em regiões encefálicas de ratos criados em “ambientes enriquecidos” quando comparados com aqueles provenientes de um ambiente padrão, amplamente utilizado em biotérios (NIKOLAEV *et al.*, 2002). Mais especificamente, na região CA1 do hipocampo de ratos há um aumento no número de sinapses e na densidade de espinhos dendríticos (MOSER *et al.*, 1994; RAMPON *et al.*, 2000; NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2004). Briones e cols. (2000) verificaram um aumento no comprimento total e no número de ramos dendríticos, além do aumento no número de espinhos dendríticos nos neurônios piramidais da área CA3 do hipocampo de ratos mantidos em “ambiente enriquecido”. O mesmo foi descoberto por Johansson e

Belichenko (2001) que mostraram aumento significativo na densidade de espinhos dendríticos nos neurônios piramidais do córtex somatossensorial de ratos submetidos ao “enriquecimento ambiental”. Esse procedimento também aumentou a complexidade e o comprimento dendrítico dos neurônios piramidais do córtex motor, quando comparados com animais em ambiente padrão (BIERNASKIE, 2001). E Yu-Yen Ip e cols. (2002) mostraram que o desenvolvimento do animal no “ambiente enriquecido” gera aumento na ramificação dendrítica, primariamente no córtex occipital. Esses resultados podem indicar que a maior quantidade de informação e de ações às quais os animais estão submetidos, podem gerar maior demanda sináptica nos neurônios das regiões que participam do processamento neural dos estímulos obtidos no “ambiente enriquecido”.

Nesta condição experimental também aumentaram os níveis de neurotrofinas no córtex cerebral, hipocampo e prosencéfalo basal de ratos (ICKES *et al.*, 2000) e a neurogênese no giro denteado de camundongos (KEMPERMANN *et al.*, 1997). Além disso, detectou-se o aumento de duas proteínas relacionadas com os locais de sinapse, a sinaptofisina e a PSD-95, em várias regiões encefálicas estudadas como um todo, incluindo as áreas anteriores e posteriores do córtex pré-frontal, o hipocampo, o tálamo e o hipotálamo (NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2004). Essas proteínas em maior quantidade sugerem que um maior número de contatos sinápticos excitatórios foram estabelecidos (BRAKE *et al.* 2001; KRETZ *et al.*, 2004). Com base em todos esses dados e com a hipótese inicial de trabalho, poder-se-ia supor que na AMePD também poderia ocorrer aumento na densidade de espinhos dendríticos em animais criados com mais estímulos ambientais.

Alternativamente, há que se considerar que ocorrem significativos efeitos comportamentais nesses animais. De acordo com Rosenzweig e Bennett (1996), a

experiência precoce em um “ambiente enriquecido” é capaz de melhorar o desempenho em muitas tarefas de aprendizado e a habilidade de solucionar problemas em uma ampla variedade de tarefas comportamentais. O ambiente enriquecido também pode atuar diminuindo a resposta neuroendócrina e os efeitos do estresse (NIKOLAEV *et al.*, 2002; BELZ *et al.*, 2003). Neste caso, na AMePD poderia haver uma menor atividade local, uma vez que ela está relacionada com resposta à estímulos estressantes, a comportamentos de defesa e na capacidade de relação do animal com seu ambiente. Não há dados na literatura até o momento sobre os efeitos do “ambiente enriquecido” sobre a densidade de espinhos dendríticos na AMePD de ratos, objetivo de estudo desta dissertação.

1. 4. Plasticidade neuronal e envelhecimento

Embora outras espécies animais tenham sido usadas para estudar o processo de envelhecimento (HASEGAWA *et al.*, 2005; HEAD *et al.*, 2005), os roedores criados em laboratório são os mamíferos mais usados para este tipo de pesquisa (WISE, 2000). Isso se deve ao fato de que se pode satisfazer a maioria dos seguintes critérios: o conhecimento das características genéticas da espécie, expectativa de vida não longa (comparativamente com o ser humano), condições ambientais definidas e conhecidas e conhecimento de doenças associadas ao envelhecimento, o que permite a diferenciação entre a senescência ou o envelhecimento em condição saudável (WISE, 2000).

O envelhecimento pode ser definido como as mudanças pós-maturacionais que tornam, com o avanço significativo do tempo para a espécie estudada, o organismo menos hábil para enfrentar as modificações ambientais e internas e, assim, levam à diminuição da

habilidade para sobreviver. É difícil determinar quando o desenvolvimento termina e quando começa o envelhecimento em um organismo ou espécie, porque os diferentes sistemas fisiológicos adquirem características adultas maduras em diferentes etapas (McEWEN, 1994). Para um determinado grupo experimental ser considerado “jovem”, “de meia-idade” ou “velho”, deve-se tomar como referência o sistema de células e tecidos que se está investigando (WISE, 2000). Assim, o envelhecimento é um processo multifatorial que pode ou não afetar o desempenho cognitivo, mas geralmente acomete a habilidade motora e o processamento de informações sensoriais (BOGUSZEWSKI; ZAGRODZKA, 2005). Isto pode, em parte, ser explicado pelas mudanças nas estruturas do sistema nervoso e nas alterações celulares que diretamente afetam os mecanismos envolvidos com a plasticidade neural (BURKE; BARNES, 2006).

As mudanças relacionadas à morfologia dos neurônios nos ratos velhos tendem a ser seletivas e não há um padrão único em todo o encéfalo (BURKE; BARNES, 2006). Contrariando idéias anteriores, um achado consistente é que a morte neuronal não tem necessariamente um papel significativo para o declínio da cognição relacionado ao envelhecimento (RAPP; GALLAGHER, 1996; MERRILL *et al.*, 2001). Mais propriamente, mudanças pequenas e em regiões específicas, as quais ocorrem nas ramificações dendríticas e na densidade de espinhos, são as maiores características dos efeitos do envelhecimento na morfologia neuronal e no funcionamento do sistema nervoso (BURKE; BARNES, 2006; von BOHLEN *et al.*, 2006). Por exemplo, em ratos da cepa Long-Evans, foi encontrado uma diminuição da densidade de espinhos dendríticos nos neurônios piramidais da camada III dos córtices parietal e occipital em animais velhos (24 meses de idade) quando comparados a animais adultos (4 meses de idade; KOLB, *et al.* 2003). Também foi demonstrada uma diminuição dos espinhos dendríticos, nesses animais

velhos em relação aos jovens, nos neurônios piramidais da camada V do córtex cingulado anterior (MARKHAM, JURASKA, 2002). Já, também em ratos da cepa Long-Evans, não foi encontrado diferença na densidade de espinhos dendríticos nos 50 μm dos dendritos basais dos neurônios piramidais da camada V do córtex occipital, quando comparados animais adultos (5 meses de idade) com velhos (26 meses de idade; STEMMELIN *et al.*, 2003). Nos neurônios do núcleo hipotalâmico ventromedial de ratos Wistar velhos (24 meses de idade) houve aumento no número de espinhos dendríticos em relação ao valor encontrado em machos jovens (6 meses de idade; MADEIRA *et al.*, 2001). Ao se tentar estabelecer uma relação com a ação de glicocorticóides quando do envelhecimento em roedores, os animais velhos apresentam maior exposição a tais esteróides por causa do aumento da concentração basal e do tempo até que os níveis se normalizaram após o estresse, evidenciando também um menor efeito de retroação negativa no eixo HPA (SAPOLSKY *et al.*, 1999).

Não há descrição até o momento do que ocorre com a densidade de espinhos dendríticos na AMePD de ratos velhos quando comparados aos ratos jovens. Este achado também é relevante pela presença de GR na AMe e pela participação deste subnúcleo nos processos de aprendizagem em ratos, além de contribuir para revelar se a AMePD apresenta um mesmo padrão de alteração morfológica que outras áreas do SNC com o passar da idade em ratos.

1. 5. Técnica de Golgi e caracterização dos neurônios da AMePD

Em 1873, Camillo Golgi descreveu uma técnica de impregnação pela prata que foi de importância fundamental para o entendimento da estrutura do tecido nervoso e de sua

organização básica. Com a técnica de Golgi pode-se ter a visualização da célula nervosa inteira, a qual adquire uma coloração negra que contrasta com o restante do tecido em cor amarela. Somente uma pequena proporção de células nervosas (1-10%) presentes no tecido é impregnada pela prata e de uma maneira ainda tida como aleatória. Ademais, nem todas as regiões do sistema nervoso de diferentes espécies impregnam-se igualmente e, conforme avança a idade do animal, torna-se muito mais difícil obter bons resultados (RAMÓN Y CAJAL, 1909; VALVERDE, 1962; PETERS; KAISERMAN-ABRAMOF, 1970; SCHEIBEL; SCHEIBEL, 1978; WOOLLEY; McEWEN, 1993; PANNESE, 1996).

A técnica de Golgi oferece a vantagem de mostrar células mais isoladas para estudo e a desvantagem de que, por seu caráter imprevisível, nunca se tem segurança quando algum tipo de neurônio ficará visível completamente. Quando isto ocorre, os neurônios podem ter seus componentes (corpo celular, dendritos, espinhos e axônio) passíveis de identificação e mensuração (RASIA-FILHO *et al.*, 1999; 2002; 2004). O método de Golgi tem amplo uso e pode ser aplicado em várias espécies animais, em situações normais ou quando os animais são submetidos aos mais diversos procedimentos experimentais. Por exemplo, foi utilizado para demonstrar as alterações na quantidade de espinhos dendríticos no hipocampo de ratas adultas ao longo do ciclo estral (WOOLLEY; McEWEN, 1993), para avaliar a densidade de espinhos dendríticos dos neurônios piramidais nos córtices pré-frontal e hipocampal de ratos em isolamento social após o desmame (SILVA-GOMEZ, 2003), e para analisar a reorganização dendrítica dos neurônios piramidais do córtex pré-frontal de ratos após administração crônica de corticosterona (WELLMAN, 2001). Também foi empregado para avaliar a morfologia dos neurônios piramidais do córtex de ratos submetidos a diferentes modelos de isquemia (GONZALEZ; KOLB, 2003) ou, em seres humanos, para revelar as mudanças

morfológicas nos dendritos da camada V dos neurônios piramidais do córtex pré-frontal de pacientes com esquizofrenia (BLACK *et al.*, 2004). Essa técnica tem sido utilizada para analisar os espinhos dendríticos em estudos como o estresse de contenção (MITRA *et al.*, 2005), o ambiente enriquecido (LEGGIO *et al.*, 2005) e o envelhecimento (STEMMELIN *et al.*, 2003; KOLB *et al.*, 2003) em várias regiões do encéfalo de ratos.

A morfologia dos neurônios da AMe de gatos (TÖMBÖL; SZAFRANSKAKOSMOL, 1972), de camundongos (VALVERDE, 1962) e de ratos (de OLMOS *et al.*, 1985; RASIA-FILHO *et al.*, 1999; DE CASTILHOS *et al.*, 2006) tem sido estudada utilizando o método de Golgi. Nesses trabalhos, semelhanças histológicas quanto à forma dos componentes da AMe das diferentes espécies animais puderam ser observadas. Ou seja, esses neurônios caracteristicamente apresentam tamanho de pequeno a médio (em torno de 12 μm de diâmetro médio), embora células maiores também podem ser encontradas em direção à porção rostral da AMeAD (de OLMOS *et al.*, 1985; RASIA-FILHO *et al.*, 1999). Conforme descrito anteriormente, na AMePD, os neurônios agrupam-se formando três colunas orientadas paralelamente à superfície medial do núcleo. A AMePDm é constituída por muitos neurônios densamente agrupados, de tamanho pequeno a médio. A AMePDi, aparentemente possui menos células, neurônios de tamanho médio, e forma uma matriz que separa e orienta as outras duas colunas. A AMePDI apresenta-se com neurônios de tamanho médio, também densamente agrupados, mas não tanto quanto os neurônios da AMePDm (PAXINOS; WATSON, 1998; DE OLMOS *et al.*, 2004).

Os neurônios da AMePD são multipolares e foram classificados como bipenachados ou estrelados, conforme o número de ramificações dendríticas primárias originadas do soma celular (RASIA-FILHO *et al.*, 1999; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; Figura 5). Isto é, os de tipo bipenachados apresentam dois ramos dendríticos primários

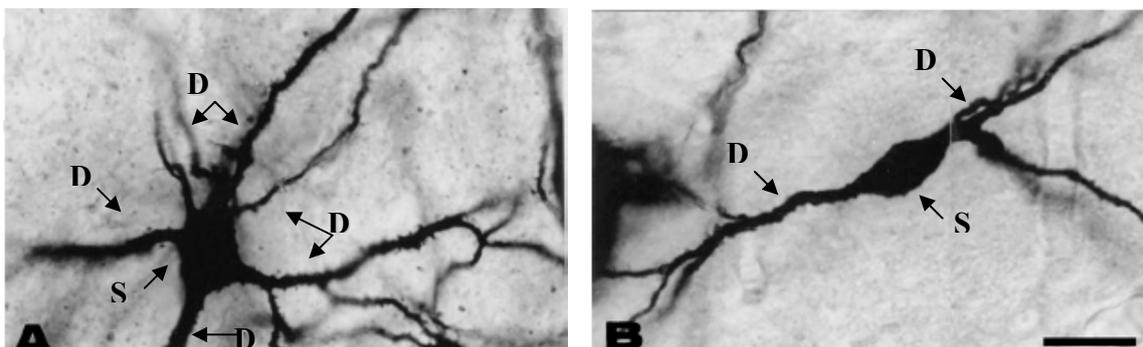


Figura 5. Fotomicrografias de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, com morfologia estrelada (A) ou bipenachada (B) do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial de rato macho adulto. S = soma neuronal, D = dendrito. Barra: 20 μ m (conforme DE CASTILHOS *et al.*, 2006).

surgindo do soma e os estrelados, mais de dois dendritos partindo do soma. A estrutura dendrítica desses neurônios é esparsa, irradiando-se em várias direções e com diferentes comprimentos. Os espinhos são pleomórficos e são encontrados ao longo dos dendritos, mas também foram visualizados no soma e, algumas vezes, no segmento inicial de axônios (DE CASTILHOS *et al.*, 2006; HERMEL *et al.*, no prelo). Os axônios dos subnúcleos da região posterior da AMe (AMePD e AMePV) preferentemente dirigem-se medialmente ao núcleo basal ou à porção principal do BNST, enquanto os da AMeAD compõe parte da *ansa peduncularis*, também chamada de via amígdalo-fugal ventral (KAMAL; TÖMBÖL, 1975; COOKE; SIMERLY, 2005).

Quanto à análise ultraestrutural desses neurônios encontrou-se que na AMePD as sinapses axo-dendríticas são as mais frequentemente observadas e parecem ser principalmente excitatórias. Suas regiões pré-sinápticas apresentam vesículas elétricas sozinhas ou mescladas com poucas vesículas de centro denso. Os dendritos recebem várias sinapses sobre o mesmo ramo. Os espinhos dendríticos apresentam diferentes morfologias e geralmente são alvo de um único contato sináptico, aparentemente

excitatório (HERMEL *et al.*, no prelo). Em concordância com isso, em ratos pré-púberes, registros eletrofisiológicos associados com microscopia eletrônica da AMePD, recentemente demonstraram a ocorrência de potenciais excitatórios pós-sinápticos muito mais provavelmente devido a múltiplos locais de contato sináptico, do que maior probabilidade de liberação de neurotransmissores (COOKE; WOOLLEY, 2005).

1. 6. Espinhos dendríticos

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

O protótipo de um espinho, tem a forma determinada pela presença de uma “cabeça” (volume de aproximadamente 0,001 a 1 μm^3) conectada ao neurônio por um “pescoço” (diâmetro menor que 0,1 μm ; HARRIS; KATER, 1994). Os espinhos podem se originar do soma, dos dendritos ou mesmo, algo menos comum, do cone axonal. São encontrados em várias populações neuronais, em todos os vertebrados e em alguns invertebrados (NIMCHINSKY *et al.*, 2002). O espinho é uma estrutura especializada para a transmissão sináptica e geralmente é um elemento pós-sináptico (ETHELL; PASQUALE,

2005; TADA; SHENG, 2006). Os receptores para neurotransmissores são restritos à superfície do espinho e confinados em aposição ao elemento pré-sináptico (NUSSER *et al.* 1998; POPOV *et al.*, 2005). Essa zona no espinho é indicada pela densidade pós-sináptica (PSD), uma zona de material elétron-denso que consiste de receptores, canais e sistemas de sinalização intracelulares envolvidos na transmissão sináptica e ao acoplamento da atividade sináptica à bioquímica pós-sináptica (NIMCHINSKY *et al.*, 2002). A cabeça do espinho contém a PSD e algumas estruturas especializadas, como os microfilamentos de actina (PETERS *et al.* 1991). Embora mitocôndrias e microtúbulos estejam ausentes, os espinhos contêm retículo endoplasmático liso (REL) e que pode formar uma estrutura chamada “aparelho do espinho” (PETERS *et al.* 1991). Acredita-se que a função do “aparelho do espinho” seja a manutenção da concentração de cálcio intracelular em níveis não patológicos, o que está associado a processo de neuroproteção (BURGOYNE *et al.* 1983). Os polirribossomos e os elementos da via lisossomal-endossomal estão também presentes em alguns espinhos dendríticos, perto de sua base, sugerindo que pode ocorrer síntese protéica local bem como existir proteínas para degradação de elementos citoplasmáticos ou de membrana celular (STEWART; SCHUMAN, 2001; Figura 6).

Os canais iônicos na PSD convertem os sinais químicos dos neurotransmissores em fluxo iônico através da membrana celular, o que gera modificação da voltagem local e outras respostas pós-sinápticas descritas comumente (por exemplo, veja-se NIMCHINSKY *et al.*, 2002). A forma dos espinhos pode afetar a transdução deste sinal por proporcionar um grau variável de compartimentalização bioquímica (ETHELL, PASQUALE, 2005). Por exemplo, o pescoço estreito do espinho pode prevenir o aumento do cálcio citoplasmático, ou alternativamente, se houver menor resistência, possibilitar que a concentração de cálcio seja rapidamente dissipada dentro do dendrito e se difunda para os espinhos próximos

(SVOBODA *et al.*, 1996). Isto pode facilitar a modificação de corrente elétrica local, auxiliando na ocorrência de atividade potencializada à longo prazo (ETHEL; PASQUALE, 2005). Por outro lado, os espinhos também podem funcionar como compartimentos elétricos, onde a geometria do pescoço do espinho atua como um elemento de resistência à passagem de corrente elétrica para o dendrito. Assim, causa uma diferença de potencial elétrico localmente, podendo ativar canais iônicos dependentes de voltagem ou impor uma diferença de capacitância com toda a árvore dendrítica, de acordo com as propriedades ativa ou passiva existentes (NIMCHINSKY *et al.*, 2002).

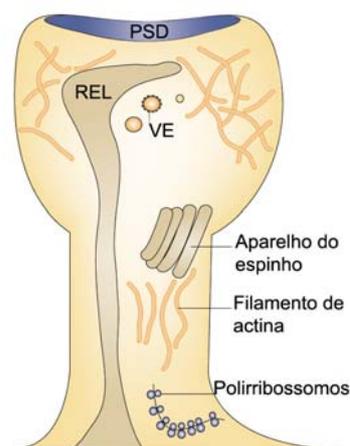


Figura 6. Esquema da ultraestrutura do espinho dendrítico onde se observam a cabeça e o pescoço do espinho que emergem do dendrito adjacente na base da figura. Outros elementos constituintes da estrutura do espinho não estão demonstrados. PSD, densidade pós-sináptica; REL, retículo endoplasmático liso; VE, vesícula endocítica; Aparelho do espinho; Filamento de actina, que formam o citoesqueleto do espinho; Polirribossomos (adaptado de HERING; SHENG, 2001).

Alguns espinhos podem ser mutáveis em sua morfologia e esse processo reflete o rearranjo rápido do citoesqueleto de actina em seu interior, o que pode levar a mudança no tamanho e no número de espinhos (OERTNER; MATUS, 2005; TADA; SHENG, 2006).

Em geral, os espinhos são classificados de acordo com sua morfologia com a seguinte nomenclatura: “filopódio”, que não apresenta uma cabeça definida e é fino e comprido, acredita-se que seja a forma precursora dos espinhos; “fino”, o qual apresenta pescoço fino e pode não ter uma cabeça bem definida; “espesso”, que não apresenta pescoço diferenciado, e se mostra como uma elevação maior do contorno dendrítico; em forma de “cogumelo”, como se depreende da sua nomenclatura e que parece ser o espinho mais estável (em termos de mudanças numéricas e contatos sinápticos duradouros); e, “ramificado”, onde um pescoço pode dar origem a mais de uma cabeça de espinho (PETERS, KAISERMAN-ABRAMOF, 1970; PETERS *et al.*, 1991; HERING; SHENG, 2001; GONZÁLEZ-BURGOS, 2004; Figura 7).

Essas diferentes formas parecem ser reguladas por uma via que é dependente da atividade local, envolvendo o influxo de cálcio através dos receptores de glutamato e dos canais de cálcio dependentes de voltagem (ETHEL; PASQUALE, 2005). De fato, muitas proteínas que regulam o metabolismo dos filamentos de actina e assim, a morfologia dos espinhos, são dependentes deste íon (MATUS, 2005). Por exemplo, são também constituin-

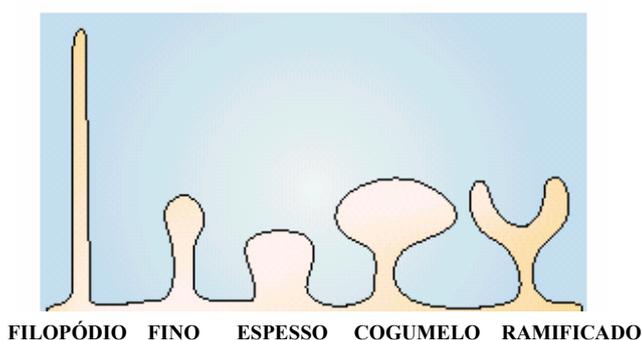


Figura 7. Representação esquemática das diferentes morfologias dos espinhos dendríticos, como se observa à microscopia óptica, surgindo a partir de uma linha de base que representa o tronco dendrítico (adaptado de HERING; SHENG, 2001).

tes da estrutura dos espinhos dendríticos as proteínas “Shank” e “Homer” que possuem a função de promover a organização estrutural e molecular dos espinhos dendríticos (MATUS, 2000; YUSTE; BONHOEFFER, 2001). A proteína “Shank” consiste de múltiplos locais para interação protéica, incluindo vários domínios diferentes entre si (NAISBITT *et al.*, 1999; EHLERS, 1999). Esses vários domínios de interação se ligam a “parceiros” específicos na PSD, os quais se relacionam com receptores NMDA, receptores metabotrópicos glutamatérgicos na membrana plasmática, receptores de inositol trifosfato no REL e na actina do citoesqueleto, todos contribuindo para a maturação e especificidade estrutural dos espinhos dendríticos (EHLERS, 1999; SALA *et al.*, 2001). Em neurônios em desenvolvimento, a proteína “Shank” estimula a conversão de espinhos com forma de filopódio em espinhos com forma de “cogumelo” (SALA *et al.*, 2001). Por sua vez, a morfologia dos espinhos pode afetar a função da sinapse que se está a estabelecer (OERTNER; MATUS, 2005; MATUS, 2005). Estudos recentes têm mostrado que a ativação dos receptores NMDA pode gerar mudanças rápidas na morfologia dos dendritos e no recrutamento sináptico dos receptores AMPA nos espinhos dendríticos. A ativação dos receptores NMDA em neurônios em cultura causa um aumento rápido e transitório no tamanho de espinhos pré-existentes e a formação gradual de novos espinhos (LIN, *et al.*, 2004; MATUS, 2005). Espinhos com cabeças maiores são mais estáveis, expressam um número maior de receptores do tipo AMPA e contribuem para atividades sinápticas mais intensas. Ao contrário, os espinhos com cabeças pequenas são “móveis” e instáveis e contribuem para conexões sinápticas que podem ser inclusive de tipo “silenciosas”, chamadas assim, pois são sinapses inativas em condições típicas (KASAI *et al.*, 2003, mas veja-se NIMCHINSKY *et al.*, 2002).

Constitui-se, desta forma, o estudo dos espinhos dendríticos uma área muito importante para o entendimento das bases celulares de funcionamento do sistema nervoso. A determinação do número de espinhos por segmento dendrítico (e, daqui, sua densidade por μm dendrítico) tem servido para estimar a maior ou menor ocorrência de sinapses (WOOLEY; McEWEN, 1993). A presente dissertação trata de investigar o que ocorre com a densidade de espinhos dendríticos com a técnica de Golgi, primeiro nos dois tipos de neurônios multipolares da AMePD e, a seguir, em animais em diferentes condições experimentais, isto é, em ratos submetidos ou a um modelo de estresse (de contenção), ou criados em “ambiente enriquecido” ou quando em idade avançada (velhice). Todos esses dados são ainda inéditos e pioneiros dada a escassa literatura pertinente à AMePD (ou também à AMe como um todo) nessas circunstâncias.

2. OBJETIVOS

2. 1. Gerais

Analisar a influência de diferentes condições experimentais na densidade de espinhos dendríticos de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, na AMePD de ratos machos adultos.

2. 2. Específicos

- Estudar a densidade de espinhos dendríticos presente nos dois tipos de neurônios, bipenachados e estrelados, da AMePD de ratos machos adultos normais, não manipulados experimentalmente;
- Determinar a densidade de espinhos dendríticos de neurônios da AMePD de ratos submetidos ao estresse de contenção agudo (1 hora ou 6 horas em uma única sessão) e crônico (6 horas diárias durante 28 dias);
- Determinar a densidade de espinhos dendríticos de neurônios da AMePD de ratos submetidos ao “enriquecimento ambiental” por 3 semanas.
- Determinar a densidade de espinhos dendríticos de neurônios da AMePD de ratos velhos (24 meses de idade) comparado-a com a de ratos jovens (3-5 meses de idade).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar adultos (N = 36, ou seja, n = 6 em cada um dos 6 grupos experimentais descritos a seguir), com 3-5 meses de idade (com exceção dos animais velhos que tinham 24 meses no momento do estudo), obtidos no biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram mantidos em grupos (no máximo cinco por caixa padrão de biotério) com livre acesso à água e comida. A temperatura foi mantida em torno de 20°C e em ciclo claro/escuro de 12 h cada. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais empregados ou seu sofrimento ao longo dos experimentos. Para isso, todos os animais foram manipulados de acordo com as leis internacionais de cuidado e ética com animais em laboratório (Diretrizes da Comunidade Européia de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC) e pelas normas brasileiras de ética para experimentação animal (projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médica de Porto Alegre, sob cadastro 070/05, parecer número 112-05).

3. 2. Procedimento experimental

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais, com n = 6 em cada um deles:

1. Para o estudo da densidade de espinhos dendríticos nos neurônios multipolares bipenachados e estrelados encontrados na AMePD foram utilizados ratos machos adultos não manipulados experimentalmente, mantidos nas condições descritas acima. Os mesmos animais deveriam providenciar dados referentes aos dois tipos neuronais.

2. Para o estudo do efeito do estresse de contenção, os animais foram divididos em três grupos: ratos submetidos ao estresse agudo de 1 hora, ratos submetidos ao estresse agudo de 6 horas e ratos submetidos ao estresse crônico de 28 dias. A contenção foi realizada em tubos metálicos de arame (25 cm de comprimento e 7 cm de diâmetro) por 1 h em um único dia (das 10 às 11 horas) no primeiro grupo; 6 horas em um único dia (das 10 às 16 horas) no segundo grupo; ou, por 6 horas e durante 28 dias consecutivos no último grupo. Os animais do grupo submetido ao estresse crônico de contenção (por 28 dias) foram recolocados em suas caixas padrão (3 a 4 animais por caixa) cada dia após o final das 6 h do experimento.

3. Para o estudo do efeito do “enriquecimento ambiental”, os ratos foram mantidos em caixas padrão de biotério até atingir a idade adulta e, a seguir, foram selecionados aleatoriamente e colocados em ambiente com novos e múltiplos estímulos. As caixas do “ambiente enriquecido” mediam 62 x 81 x 45 cm e continham em seu interior bolas, escadas, tubos e rodas. A limpeza da caixa era feita freqüentemente (como padrão em biotério) e os objetos no interior da caixa eram reposicionados e trocados a cada semana. Os animais permaneceram 3 semanas nesta condição.

4. Para o estudo do envelhecimento, os animais ficaram em suas caixas padrão de biotério, em grupos de 4 animais por caixa, durante 24 meses. Foram manipulados somente o necessário para sua criação e alimentação, como padrão em biotério. Somente os animais que não apresentavam sinais externos óbvios de patologia quando desta idade avançada foram selecionados para compor este grupo.

Para os procedimentos 2, 3 e 4 acima descritos, um mesmo grupo controle foi utilizado e adveio do primeiro experimento. Isto é relevante para a análise dos resultados, pois este grupo constituiu-se de ratos machos adultos e não submetidos a qualquer tratamento experimental, além dos cuidados para sua criação. O valor de densidade de espinhos dendríticos da AMePD deste grupo controle serviu como referencial para as comparações feitas nos grupos dos experimentos 2, 3 e 4 e estão de acordo com o que previamente havia sido relatado na literatura para outros ratos machos em idade adulta (RASIA-FILHO *et al.*, 2004), como descrito a seguir nos Resultados.

3. 2. 1. Técnica de Golgi

Ao final dos períodos experimentais descritos acima, todos os animais foram submetidos à técnica de Golgi, conforme descrito por Gabbot e Somogyi (1984), Woolley e McEwen (1993) e Rasia-Filho e cols. (1999, 2004). Para tanto, os ratos de todos os grupos experimentais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg por via i.p.; Cristália, Brasil), a seguir receberam heparina (1.000 UI; Cristália, Brasil), ao mesmo tempo que eram perfundidos, por via transcardíaca, com uma solução de paraformaldeído 4%, ácido pícrico 1,5% e tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). A seguir, os encéfalos foram

retirados e mantidos na mesma solução fixadora por mais 24 h sendo, então, seccionados em vibrátomo (Leica, Alemanha) em cortes coronais de 200 µm de espessura. Esses cortes foram imersos em solução de dicromato de potássio (Merck, Alemanha) 3% por 24 h e ao abrigo da luz. Após isto, foram lavados em água destilada, colocados entre lamínulas sobrepostas e mergulhados em solução de nitrato de prata (Merck, Alemanha) 1,5% por no mínimo 48 h e resguardados da luz. Após esse período, os cortes foram lavados com água destilada, montados em lâminas histológicas, desidratados em álcool, clareados com xilol e cobertos com bálsamo do Canadá e lamínulas (para maiores detalhes, veja Dall'Óglio *et al*, no prelo).

No grupo controle e nos animais submetidos ao estresse de contenção, após a anestesia, mas antes da perfusão transcardíaca com a substância fixadora, fez-se incisão abdominal para a dissecação e retirada bilateral das glândulas adrenais. Para compor os dados, alguns animais não submetidos à técnica de Golgi, mas sim a todo o restante do procedimento de manipulação experimental, foram também utilizados para esse propósito. Neste caso, o número de ratos por grupo variou entre 7 (animais submetidos ao estresse de contenção de 1h e por 6 h) e 8 (controle e animais submetidos ao estresse crônico). Após serem retiradas, as adrenais de ambos os lados foram colocadas em papel absorvente e imediatamente pesadas em balança de precisão (Marte, São Paulo).

3. 3. Aquisição de dados

Para a localização precisa da AMePD foi utilizado como referencial anatômico o atlas das coordenadas estereotáxicas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998) e as

descrições da AMe de Alheid e cols. (1995) e Canteras e cols. (1995). As secções contendo a AMePD foram projetadas em desenhos esquemáticos de cortes coronais do encéfalo localizados 3,14 a 3,30 mm posterior à sutura bregmática (PAXINOS; WATSON, 1998; Figura 2). Os locais onde puderam ser identificados neurônios na AMePD foram selecionadas para estudo em microscópio óptico (Olympus BX-41, Japão). Os cortes do encéfalo que apresentavam aproximadamente o mesmo tamanho foram usados para análise, e foram descartados aqueles que pareceram “retraídos” demasiadamente devido ao procedimento histológico *per se* e que poderiam gerar resultados incorretos. O número de neurônios impregnados pela técnica de Golgi variou de secção para secção e, por isso, ambos os lados do encéfalo foram utilizados para a coleta de dados (GOMEZ; NEWMAN, 1991, RASIA-FILHO *et al.*, 1999).

Necessariamente, para serem selecionados para posterior estudo, os neurônios tiveram que ser julgados quanto aos seguintes critérios: a) localizar-se indubitavelmente na região desejada, isto é, na AMePD, mas relativamente afastados de seus bordos limítrofes, como precaução para não se coletar dados de outras áreas vizinhas à área de interesse; b) ter, no mínimo, seus primeiros 40 μm bem impregnados; c) ter espinhos claramente distinguíveis; e, d) estar relativamente isolados das demais células vizinhas. Após isto, os dendritos e os espinhos foram desenhados com auxílio de câmara clara acoplada a microscópio óptico e em aumento de 1000 X. A densidade de espinhos foi calculada como a relação do número total de espinhos divididos pelo comprimento dendrítico estudado, o qual foi mensurado utilizando-se programa de análise de imagens (Image Pro-Plus 4.1, Media Cybernetica, EUA). Os valores foram expressos como número de espinho/ μm

dendrítico, donde sua densidade foi estabelecida (RASIA-FILHO *et al.*, 2004; DE CASTILHOS *et al.*, 2006).

Seis ratos diferentes foram estudadas em cada grupo experimental, guardados os comentários apresentados anteriormente no “Procedimento Experimental” para o primeiro grupo de ratos. Cada rato contribuiu com 8 dendritos diferentes. Cada dendrito adveio de um neurônio distinto dos demais, selecionados conforme descrito anteriormente. Desta forma, ao total, sempre 48 dados foram obtidos para cada tipo celular no primeiro experimento ou de ambos os tipos celulares em cada grupo estudado nos demais experimentos.

No presente estudo, os espinhos foram diretamente contados a partir dos desenhos feitos ao longo dos primeiros 40 μm de comprimento dendrítico. Este critério foi escolhido baseado em experimentos prévios (RASIA-FILHO *et al.*, 1999; 2004) nos quais a densidade de espinhos dendríticos nos primeiros 40 μm mostrou-se ser representativa de valores obtidos até comprimentos dendríticos maiores, como até 160 μm a partir do soma em neurônios da AMePD de ratas (N = 10 neurônios). Além disso, o nível de arborização dendrítica (primária ou secundária) não pareceu influenciar a densidade de espinhos nos neurônios da AMePD (RASIA-FILHO *et al.*, 2004). Neste ponto, para avaliação dos dados obtidos, faz-se necessário comentar que o tamanho pequeno da AMePD, o grau aleatório e incompleto de impregnação neuronal que pode ocorrer com a técnica de Golgi e os critérios de inclusão dos neurônios para estudo tornam esses experimentos difíceis de serem realizados. É uma limitação técnica deste tipo de experimento, no entanto, que não se possa saber qual a real quantidade de espinhos dendríticos ao longo de todos os dendritos em cada neurônio estudado (MITRA *et al.*, 2005) ou, que todos os ramos dendríticos em cada

neurônio possam ser medidos adequadamente quanto a seu comprimento (CLAIBORNE *et al.*, 1990; BANNISTER; LARKMAN; 1995). Nem que, sendo inerente quando se emprega o método de Golgi, que se consiga estabelecer quais neurônios são mais sensíveis a um tipo de manipulação experimental, ou ação hormonal, ou aferência sináptica específica (GABBOTT; SOMOGYI, 1984; WOOLLEY; McEWEN, 1993).

3. 4. Análise estatística

Os dados da densidade de espinhos dendríticos dos dois tipos de neurônios multipolares encontrados na AMePD, bipenachados e estrelados, apresentaram distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnoff) e foram comparados pelo teste “t” de Student para dados pareados, uma vez que de cada rato obtiveram-se resultados para esses dois tipos de células. Neste caso, necessariamente, utilizou-se a média da densidade de espinhos dendríticos obtida em cada rato para comparação e para determinação do grau de liberdade e valor crítico de “p”. Como será descrito a seguir, não houve diferença estatisticamente significativa nesta comparação. Por isso, aleatoriamente selecionou-se parte dos resultados desses dois tipos celulares, os quais foram agrupados para formar um valor controle e de referência para os grupos experimentais estudados a seguir.

Nos dados dos grupos estudados em diferentes condições (estresse de contenção, “ambiente enriquecido” ou em idade avançada), igualmente encontrou-se distribuição normal nos dados (teste de Kolmogorov-Smirnoff) e homogeneidade nas variâncias (teste de Bartlett). Como há uma discussão entre estatísticos quanto ao melhor procedimento

estatístico a empregar (vide Zar, 2004), inicialmente fez-se uso do teste da análise da variância (ANOVA) hierárquica para identificar se todos os valores de cada rato de cada grupo estudado poderiam ser testados em conjunto ou, se deveriam ser feitas médias dos valores de cada rato, o que, em ambos os casos, afeta o grau de liberdade e o valor crítico de “p” para comparações. Nos casos aqui descritos, concluiu-se pela necessidade de se empregar médias nos cálculos, uma vez que houve diferença estatisticamente significativa na contribuição de cada rato nos resultados de seu grupo experimental ($p < 0,05$; dados não apresentados).

Desta forma, e porque empregou-se um mesmo grupo controle, os dados de densidade de espinhos dendríticos foram analisados em conjunto pela ANOVA de uma via. Ou seja, devido ao desenho experimental no qual o grupo controle (ratos adultos não submetidos a qualquer tratamento) é o mesmo para comparação com todos os grupos estudados, os dados obtidos dos animais após estresse de contenção de 1 hora, o estresse de contenção por 6 horas, o estresse de contenção crônico por 28 dias, o “enriquecimento ambiental” e o envelhecimento foram comparados em conjunto inicialmente. Teste *post-hoc* foi feito, na seqüência, para realizar as comparações pertinentes entre os grupos experimentais e o grupo controle. Desta forma, o teste de Tukey para comparações múltiplas foi utilizado para comparar os valores nos três grupos submetidos ao estresse de contenção e o grupo controle, para os dados dos animais criados em “ambiente enriquecido” e o grupo controle e, em separado, para o grupo dos ratos velhos tendo os valores controle também como referencial (ZOLMAN, 1993; MOTULSKY, 1995; ZAR, 2004; S. Callegari-Jacques, comunicação pessoal).

Os valores relativos ao peso das adrenais dos grupos controle e submetidos ao estresse de contenção foram comparados pela ANOVA de uma via e pelo teste *post hoc* de Tukey (ZAR, 2004).

O nível de significância em todos os casos foi estabelecido em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Densidade de espinhos dendríticos em neurônios bipenachados e estrelados da AMePD de animais não manipulados experimentalmente

O primeiro objetivo do presente trabalho foi determinar se há diferença na densidade de espinhos dendríticos nos dois tipos de células multipolares da AMePD de ratos machos adultos. Fotomicrografias representativas desses neurônios, com seus espinhos dendríticos, podem ser observadas na Figura 8 e, os desenhos dos espinhos nos primeiros 40 μm dendríticos, na Figura 9. A densidade de espinhos por micrômetro dendrítico obtida (como média \pm erro padrão da média) encontra-se na Figura 10. Não houve diferença estatisticamente significativa na densidade de espinhos dendríticos quando comparados os valores de neurônios bipenachados e estrelados ($p = 0,6$).

Esses resultados estão apresentados também no Anexo 1, como parte de artigo aceito para publicação (DE CASTILHOS *et al.*, 2006).

Densidade de espinhos dendríticos em neurônios da AMePD de animais estudados em diferentes condições experimentais

Como os neurônios bifenestrados e estrelados não apresentaram diferença estatisticamente significativa na densidade de espinhos dendríticos entre si, ambos os tipos celulares contribuíram com parte dos dados e foram somados para gerar um grupo controle (com 48 dados ao total, obtidos dos animais estudados neste experimento). O valor médio da densidade de espinhos dendríticos (em torno de 3,0; Figura 10) está de acordo com o que foi previamente descrito para ratos machos adultos normais (RASIA-FILHO *et al.*, 2004). Baseado nisto, nos grupos experimentais estudados a seguir, os dois tipos morfológicos contribuíram indistintamente para os valores finais obtidos.

Fotomicrografias representativas de neurônios onde se observam espinhos dendríticos, bem como os desenhos desses espinhos nos primeiros 40 μm dendríticos de animais adultos não manipulados (controle) e de ratos submetidos ao estresse de contenção por 1 h, por 6 h ou por 28 dias, mantidos em “ambiente enriquecido” ou em idade avançada são representados nas Figuras 11-14.

O resultado do teste da ANOVA de uma via evidenciam que os grupos nas diferentes condições experimentais apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados entre si [$F(5,35) = 10,736$; $p < 0,01$]. O teste *post-hoc* demonstrou que o grupo submetido ao estresse de contenção por 1 h apresentou uma menor densidade de espinhos dendríticos na AMePD em comparação ao grupo controle ($p < 0,01$). Tal redução foi de mais de 34% em relação aos valores normais (Figura 15). Já os grupos submetidos ao estresse de contenção por 6 h ou por 28 dias não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p > 0,05$; Figura 15). Adicionalmente, a

densidade de espinhos dendríticos é menor em animais submetidos à situação de estresse agudo por 1 h do que durante 6 h ($p < 0,01$) ou por 28 dias ($p < 0,001$). A densidade de espinhos dendríticos é também menor no grupo submetido ao estresse por 6 h quando comparado com o grupo submetido ao estresse crônico ($p < 0,05$; Figura 15).

O peso relativo das adrenais (peso das adrenais em mg/peso corporal em g x 100, conforme WATANABE *et al.*, 1992) apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e os submetidos ao estresse de contenção [$F(3,29) = 48.576$; $p < 0.01$]. O teste *post hoc* indicou que: a) o grupo submetido ao estresse de contenção por 1 h não apresentou diferença significativa no peso relativo das adrenais em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b) o grupo submetido ao estresse de contenção por 6 h apresentou peso relativo das adrenais maior do que o grupo controle e do que o grupo submetido ao estresse por 1 h ($p < 0,05$) e, c) o grupo estressado cronicamente, o peso relativo das adrenais é maior do que em qualquer outro dos grupos estudados, ou seja, estressado por 1 h ou por 6 h e grupo controle ($p < 0,01$; Figura 16).

O teste *post hoc* também indicou que o grupo submetido ao “enriquecimento ambiental” apresentou uma diminuição significativa na densidade de espinhos dendríticos em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Tal redução foi de aproximadamente 19% (Figura 17). Finalmente, quando também comparado ao grupo controle, os ratos velhos não apresentaram diferença estatisticamente significativa no valor da densidade de espinhos dendríticos ($p > 0,05$; Figura 17).

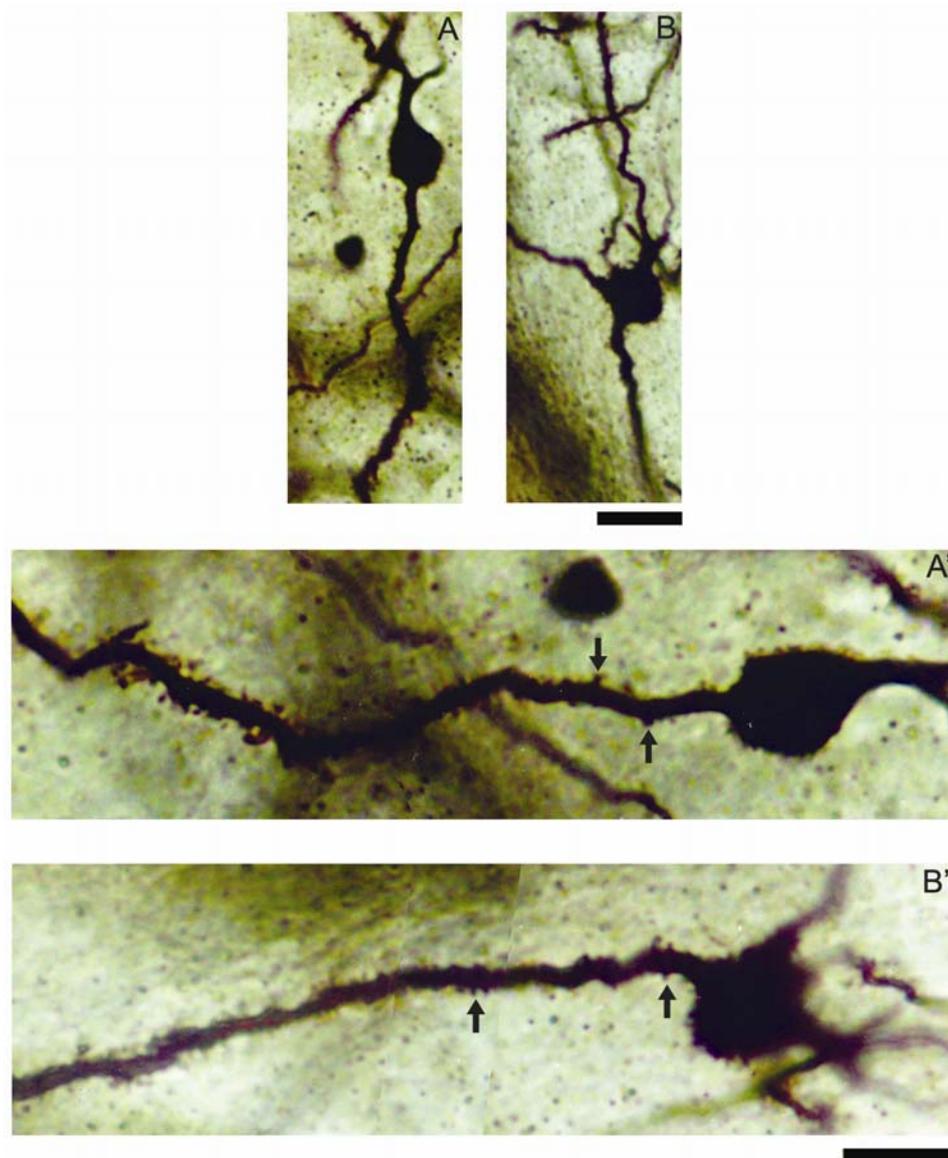


Figura 8. Fotomicrografias de neurônios bipenachados (A) e (A') e estrelados (B) e (B'), impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial póstero-dorsal de ratos machos adultos não manipulados experimentalmente. As setas indicam alguns espinhos dendríticos. Barra de A e B = 30 μ m; A' e B' = 20 μ m.

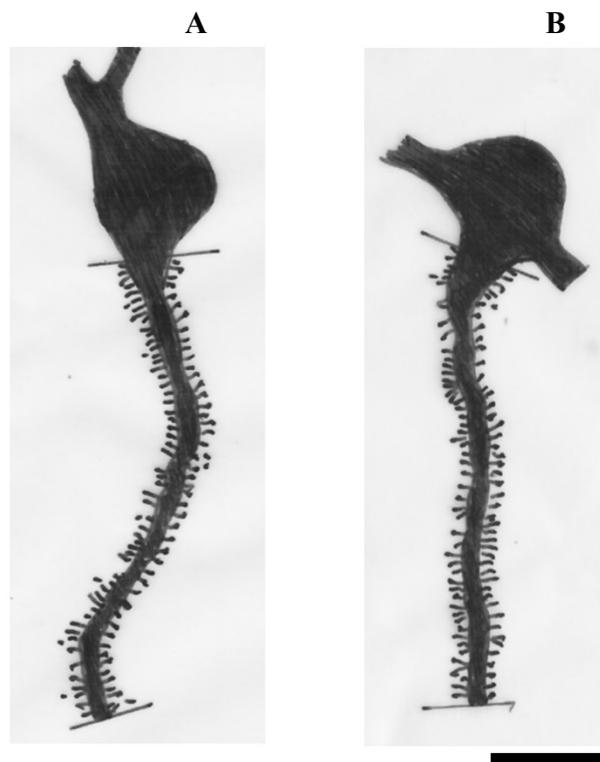


Figura 9. Desenhos esquemáticos feitos em câmara clara, acoplada a microscópio óptico, dos espinhos dos primeiros 40 μm dendríticos de neurônios bipenachado (A) e estrelado (B), impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial pósterio-dorsal de ratos machos adultos e não manipulados experimentalmente. A morfologia dos espinhos dendríticos pode não ser idêntica à real por razões técnicas. Barra = 10 μm .

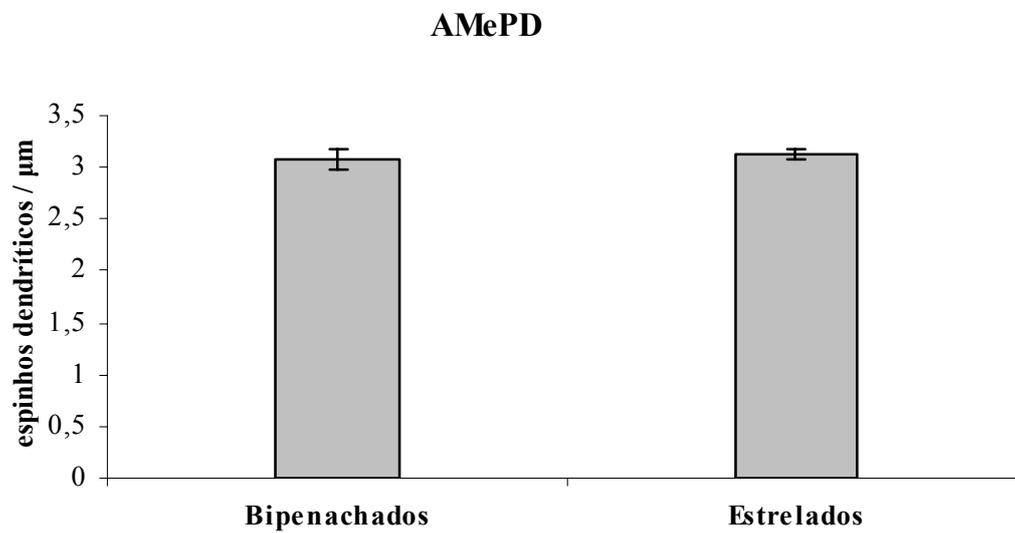


Figura 10. Densidade de espinhos dendríticos (média \pm e.p.m.) obtida nos primeiros 40 μm dendríticos de neurônios bipenachados e estrelados, impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial pósterio-dorsal (AMePD) de ratos machos adultos e não manipulados experimentalmente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste *t* de Student; $p = 0,6$).

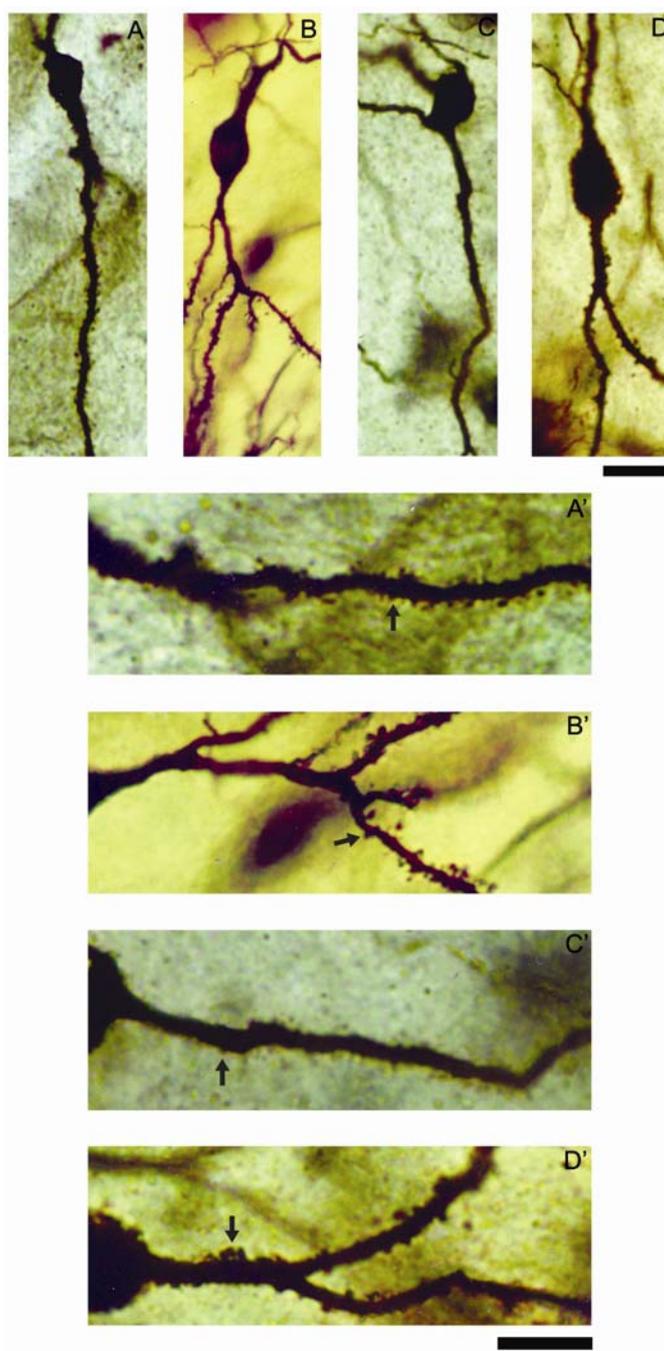


Figura 11. Fotomicrografias de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial pósterio-dorsal dos grupos controle (machos adultos e não manipulados experimentalmente) ou submetidos ao procedimento de estresse de contenção com diferentes períodos de duração. (A) grupo controle (A') detalhe dos espinhos do grupo controle em maior aumento; (B) e (B') grupo submetido ao estresse de contenção por 1 h (C) e (C') grupo submetido ao estresse de contenção por 6 h (D) e (D') grupo submetido ao estresse de contenção por 28 dias. Setas indicam alguns espinhos dendríticos. Barra de (A), (B), (C) e (D) = 30 μm ; (A'), (B'), (C') e (D') = 20 μm .

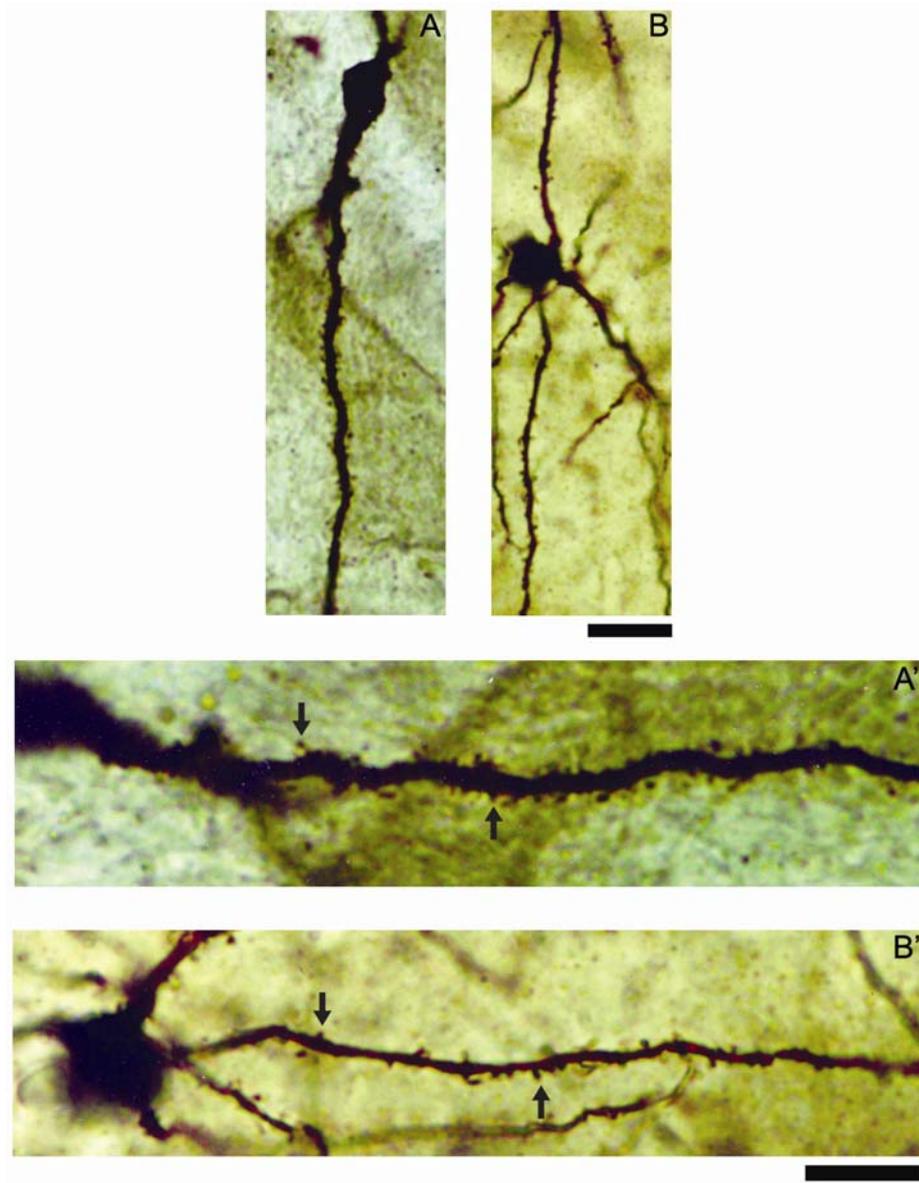


Figura 12. Fotomicrografias de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial póstero-dorsal de ratos dos grupos controle (machos adultos e não manipulados experimentalmente) ou submetidos ao “ambiente enriquecido” por 3 semanas. (A) grupo controle, (A’) detalhe dos espinhos do grupo controle em maior aumento; (B) e (B’) grupo submetido ao “enriquecimento ambiental”. Setas indicam alguns espinhos dendríticos. Barra de A e B = 30 μm ; A’ e B’ = 20 μm .

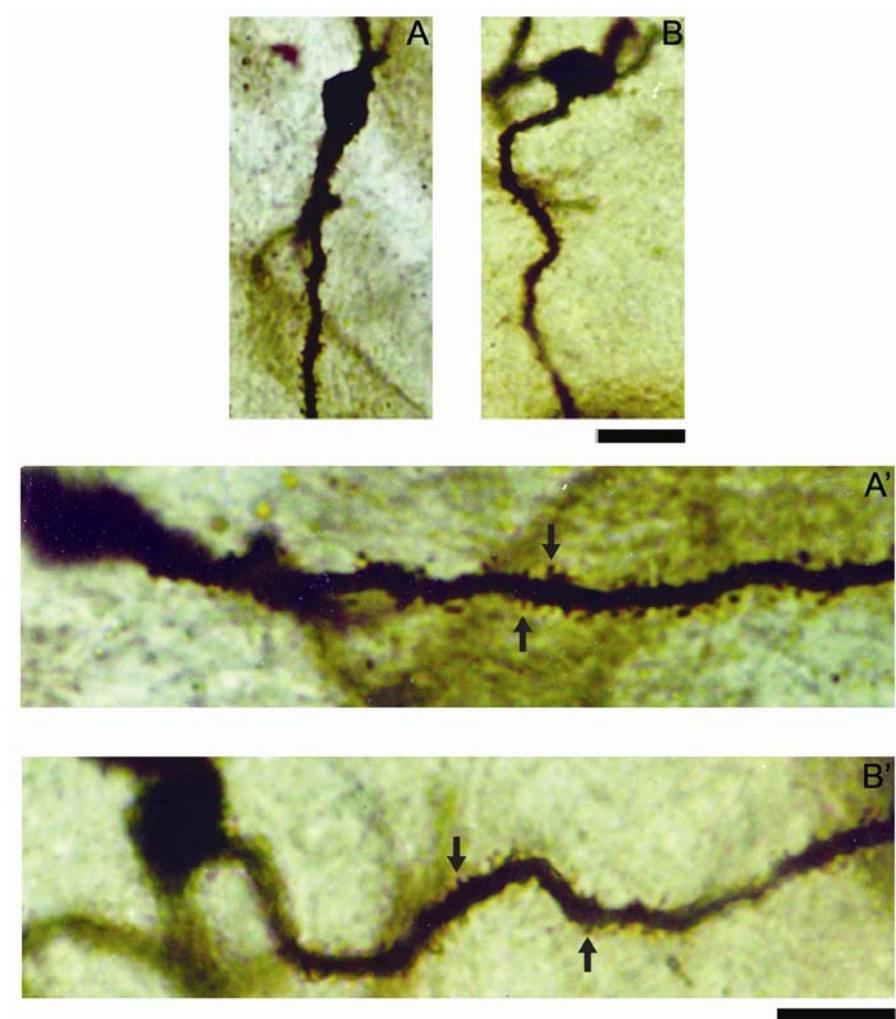


Figura 13. Fotomicrografias de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial póstero-dorsal de ratos do grupo controle (machos adultos e não manipulados experimentalmente, com 3-5 meses de idade) ou do grupo de animais velhos, com 24 meses de idade. (A) grupo controle, (A') detalhe dos espinhos do grupo controle em maior aumento; (B) e (B') grupo de animais estudados em idade avançada. Setas indicam alguns espinhos dendríticos. Barra de A e B = 30 μm ; A' e B' = 20 μm .

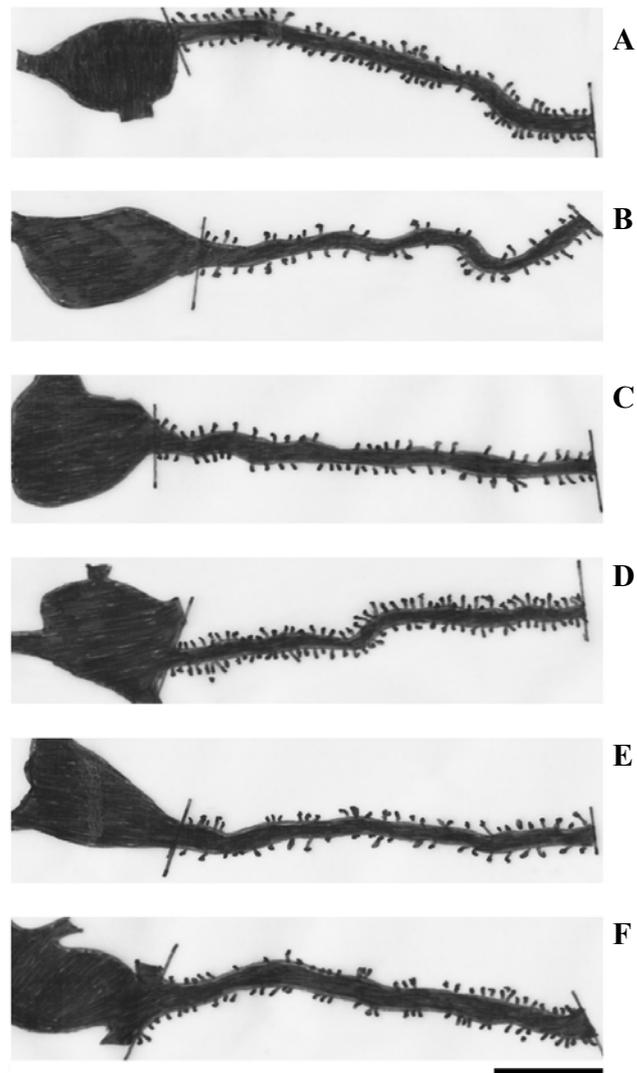


Figura 14. Desenhos esquemáticos feitos em câmara clara dos espinhos dos primeiros 40 μm dendríticos de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial pósterio-dorsal dos seguintes grupos experimentais: (A) controle (machos adultos e não manipulados experimentalmente); (B) submetido a estresse de contenção por 1 h; (C) submetido a estresse de contenção por 6 h; (D) submetido a estresse de contenção por 28 dias; (E) mantido em “ambiente enriquecido” durante 3 semanas e (F) animais velhos com 24 meses de idade. A morfologia dos espinhos dendríticos pode não ser idêntica à real por razões técnicas. Barra = 10 μm .

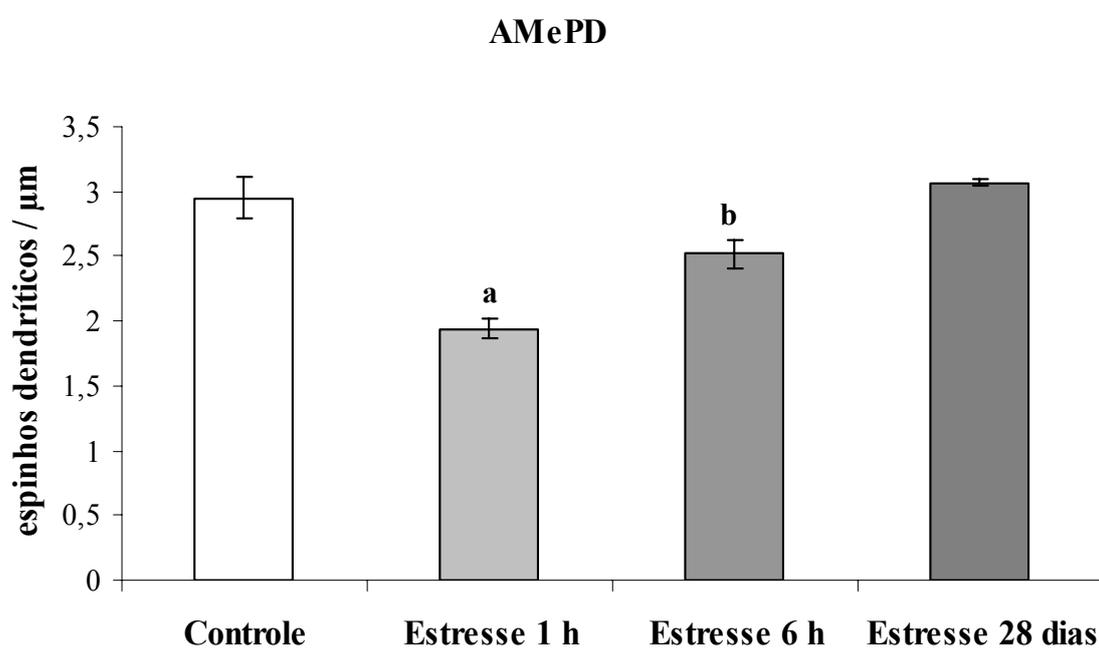


Figura 15. Densidade de espinhos dendríticos (média \pm e.p.m.) obtida nos primeiros 40 μm dendríticos de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial pósterodorsal (AMePD) dos grupos controle (machos adultos e não manipulados experimentalmente), submetido a estresse de contenção por 1 h, submetido a estresse de contenção por 6 h ou submetido a estresse de contenção por 28 dias.

^a $p < 0,01$ quando comparado aos demais grupos experimentais (após teste da análise da variância de uma via e teste *post-hoc* de Tukey);

^b $p < 0,05$ quando comparado com o grupo submetido ao estresse durante 28 dias (após teste da análise da variância de uma via e teste *post-hoc* de Tukey).

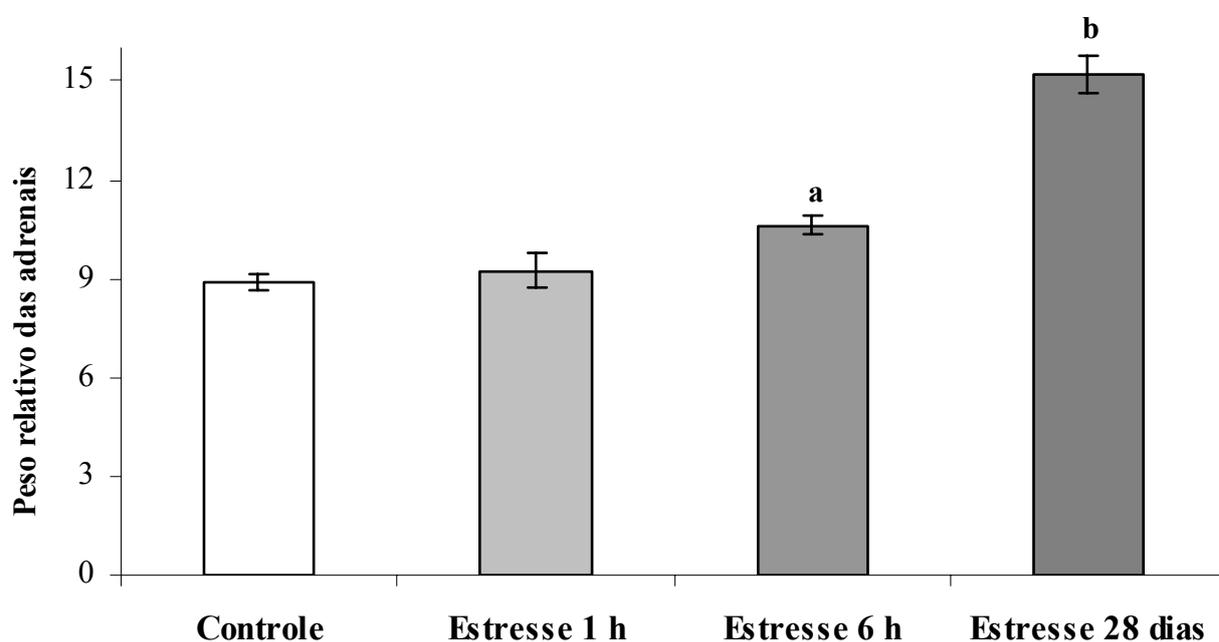


Figura 16. Peso relativo das adrenais (valor relativo em mg/peso corporal do rato em g x 100, calculado conforme Watanabe *et al.* 1992) dos grupos controle (machos adultos e não manipulados experimentalmente), submetido ao estresse de contenção por 1 h, submetido a estresse de contenção por 6 h ou submetido a estresse de contenção por 28 dias.

^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle e ao grupo submetido a estresse por 1 h (após teste da análise da variância de uma via e teste *post-hoc* de Tukey);

^b $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle, ao grupo submetido a estresse por 1 h e ao grupo submetido a estresse por 6 h (após teste da análise da variância de uma via e teste *post-hoc* de Tukey).

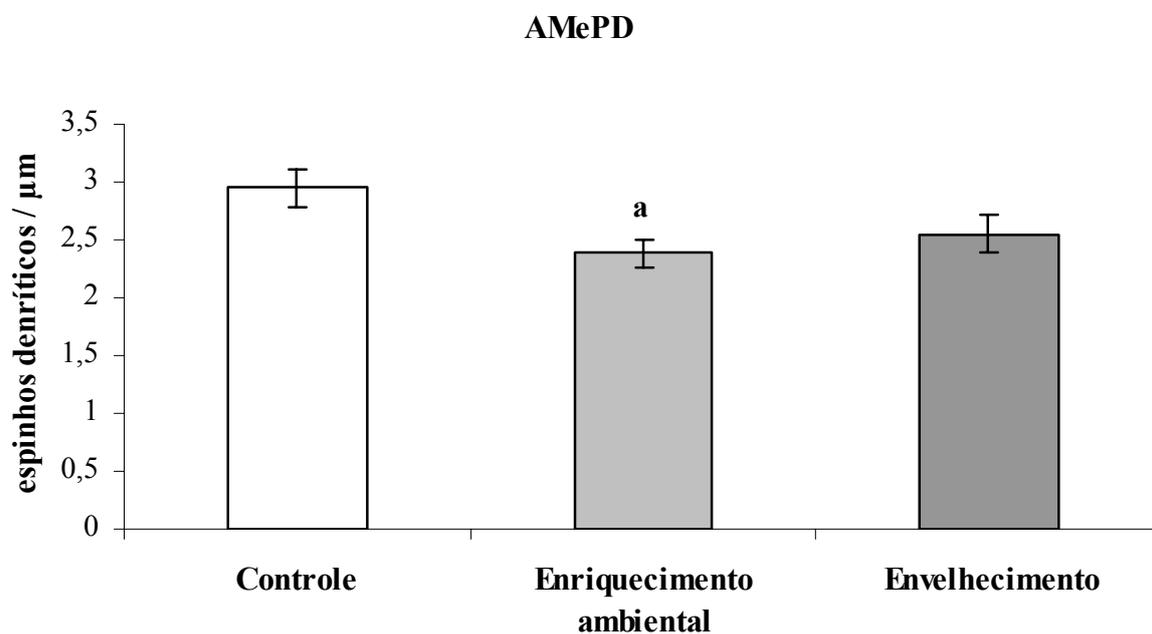


Figura 17. Densidade de espinhos dendríticos (média \pm e.p.m.) obtida nos primeiros 40 μm dendríticos de neurônios, impregnados pela técnica de Golgi, da amígdala medial pósterodorsal (AMePD) dos grupos controle (machos adultos e não manipulados experimentalmente com 3-5 meses de idade), submetido ao “enriquecimento ambiental” durante 3 semanas ou animais velhos (24 meses de idade).

^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (após teste da análise da variância de uma via e teste *post-hoc* de Tukey).

5. DISCUSSÃO

Os dados da presente dissertação confirmam que, de acordo com a forma do corpo celular e o número de ramificações dendríticas primárias, dois diferentes tipos de neurônios multipolares são encontrados na AMePD: os de tipo bipenachados (com dois ramos dendríticos primários partindo do soma) e os estrelados (com mais de dois dendritos partindo do soma; RASIA-FILHO *et al.*, 1999). Da mesma forma, as ramificações dendríticas desses neurônios da AMePD apresentam espinhos pleomórficos (como descrito por RASIA-FILHO *et al.*, 1999 e 2004).

Não se pode, por razões técnicas do método de Golgi, afirmar plenamente que todos os neurônios da região estudada têm a mesma característica morfofuncional ou passam pelas mesmas modificações induzidas por estímulos diversos. Mas, devido as amostras aqui descritas apresentarem uma distribuição normal e o pequeno erro padrão da média, parece ser plausível supor que eles representem dados de uma mesma população neuronal (RASIA-FILHO *et al.*, 1999). É inerente à técnica que não se observem todos os espinhos que realmente existem nos ramos dendríticos estudados; no entanto, todos os grupos experimentais foram submetidos às mesmas condições de avaliação da densidade de espinhos. E o número de espinhos, mesmo que indiretamente, poderia indicar a quantidade relativa de sinapses que estão ocorrendo em um dado neurônio (MITRA *et al.* 2005).

Com isso, os presentes dados sugerem que não há diferença na densidade de espinhos dendríticos nos neurônios multipolares da AMePD de ratos, o que poderia sugerir que o mesmo aporte sináptico está ocorrendo nas duas células, pelo menos nos seus primeiros 40 micrômetros dendríticos. É possível, todavia, que essas células ainda processem informação diferentemente, dada a maior superfície dendrítica que pode supostamente ocorrer em neurônios estrelados. Não há dados disponíveis até o momento sobre a função dos espinhos dendríticos dos neurônios da AMePD (por exemplo, se eles formam sinapses “silenciosas” ou verdadeiras, se são espinhos maduros ou imaturos ou se são estáveis ou instáveis) que possam ser comparados aos dados apresentados aqui para se entender qual o papel deles nessa região. Estudos adicionais, que procurem investigar quanto os espinhos da AMePD participam do processamento de informação sináptica, bem como a descrição neuroquímica mais completa da região, com seus circuitos de aferência, eferência e locais, fornecerão melhor entendimento desse dado.

Os resultados também demonstram diminuição significativa da densidade de espinhos dendríticos na AMePD no grupo de animais submetidos ao estresse de contenção durante 1 hora. Nos grupos mantidos sob estresse de contenção por 6 h e por 28 dias não foram detectadas alterações na densidade de espinhos, quando comparados ao grupo controle. Quanto ao peso relativo das adrenais, o grupo que passou por tal estresse durante 1 h não apresentou diferença significativa neste parâmetro em relação ao grupo controle. Este valor aumentou significativamente no grupo submetido ao estresse por 6 h e atingiu os maiores valores no grupo estudado após 28 dias de contenção. Igualmente foi demonstrada diminuição significativa na densidade de espinhos dendríticos no grupo submetido ao “ambiente enriquecido” por 3 semanas quando comparado aos valores obtidos em animais

mantidos em condições padrão de biotério. O grupo de animais velhos não apresentou diferença estatisticamente significativa na densidade de espinhos dendríticos quando comparado ao grupo controle composto por ratos adultos jovens.

Quanto aos resultados obtidos nos grupos submetidos ao estresse de contenção, o peso das adrenais pode ser relacionado à magnitude da condição adversa a qual o animal está submetido. Ou seja, Watanabe e cols. (1992) demonstraram que o estresse de contenção crônico (durante 21 dias, 6 horas por dia) resultou em aumento do peso relativo das glândulas adrenais e, concomitantemente, dos níveis de corticosterona em circulação. Com base nisso, sem desmerecer o que ocorre após 1 h de contenção, pode-se entender que o estresse por 6 h e o estresse crônico por 28 dias constituíram estímulos realmente potentes para os animais submetidos a tal condição experimental. Esses dados confirmam a metodologia empregada, estão de acordo com a literatura e se correlacionam diretamente com os níveis plasmáticos de corticosterona em ratos (GAMALLO *et al.* 1986), razão pela qual se acredita que os níveis desse esteróide também se encontravam elevados nos animais aqui estudados.

Mas o achado sobre o número de espinhos dendríticos na AMePD é intrigante. Mudanças na densidade de espinhos dendríticos e na estrutura dendrítica de diferentes regiões do SNC induzidas pelo estresse de contenção crônico têm sido descritas na literatura (RADLEY *et al.*, 2005; STEWART *et al.*, 2005). Por exemplo, ocorre atrofia nos dendritos dos neurônios piramidais da região CA3 hipocampal em ratos que foram submetidos ao estresse de contenção crônico (WATANABE *et al.*, 1992) ao mesmo tempo em que há um aumento da quantidade de espinhos dendríticos nessas células, no que se supõe seja um efeito compensatório à diminuição da superfície dendrítica de contato

sináptico (SUNANDA *et al.*, 1995). Com outro protocolo experimental considerado como estímulo moderado (durante 7 dias, 10 minutos de contenção por dia), observou-se atrofia dos dendritos mais distais e ramos proximais se tornaram mais escassos em neurônios piramidais das camadas II-III do córtex cerebral pré-frontal (BROWN *et al.*, 2005). Se o estresse de contenção for de duração mais longa (durante 21 dias, contenção de 3 horas por dia), o mesmo é capaz de gerar uma diminuição significativa no número de ramificações e no comprimento dos ramos de dendritos apicais dos neurônios piramidais das camadas II-III do córtex pré-frontal (COOK; WELLMAN, 2004). Por outro lado, diferentemente dos neurônios piramidais da área CA3 do hipocampo, e dos neurônios piramidais das camadas II-III do córtex pré-frontal, os neurônios do BNST e da ACe não exibiram atrofia dendrítica em um modelo de estresse de contenção considerado crônico (durante 10 dias, contenção de 2 horas por dia). Ao contrário, ou os dendritos permaneceram inafetados na ACe ou apresentaram aumento de arborização no BNST (VYAS *et al.*, 2003). Com esse mesmo protocolo para gerar estresse, demonstrou-se aumento da arborização dos neurônios piramidais e estrelados da AMBI (VYAS *et al.*, 2002) e aumento no número de espinhos dendríticos nos neurônios piramidais da AMBI (RADLEY; MORRISON, 2005).

Uma das formas mais completas para avaliação plena do comprimento dendrítico total é a reconstrução tridimensional de imagens (HOWARD *et al.*, 1992; FAIRÉN, 2005; WEARNE *et al.*, 2005). Infelizmente, isto não está disponível neste momento para poder ser aplicado nos dados aqui relatados, pois não há dados na literatura com relação à morfologia dos dendritos nos neurônios da AMe nem como um todo, nem estudada por subnúcleos, após estresse de contenção. Além disso, os protocolos de duração do estresse de contenção variam de estudo para estudo. Desta forma, guardadas as proporções com relação à região da amígdala estudada e quanto ao período de estresse utilizado nos

trabalhos citados, há algumas hipóteses para explicar os resultados obtidos após 1 h de estresse de contenção e outras para explicar a manutenção da quantidade de espinhos nos primeiros 40 μ m dendríticos nos grupo submetidos ao estresse por 6 h ou por 28 dias.

O fato de ocorrer menor densidade de espinhos dendríticos na AMePD em situação de estresse agudo (1h), e o mesmo valor em ratos controle e nos grupo submetidos à contenção por 6 h ou ao estímulo estressante crônico, sugere uma variação rápida na atividade sináptica local. Há relato de que os glicocorticóides podem modificar a estrutura dos espinhos dendríticos por via não genômica; mas, no entanto, são pouquíssimos os dados na literatura sobre essa modulação rápida na quantidade de espinhos (KOMASTUZAKI *et al.*, 2005). Por exemplo, após 1 h de administração de dexametasona, agonista total e específico dos GR, observou-se aumento na densidade e alteração na morfologia dos espinhos dendríticos de neurônios microinjetados com *Lucifer-Yellow* na região CA1 do hipocampo de ratos adultos (KOMASTUZAKI *et al.*, 2005). Esse efeito foi considerado como não genômico, já que a cicloeximida, um inibidor da síntese protéica, não foi capaz de suprimir o efeito da dexametasona. Além disso, esse efeito rápido (1 h) é diferente da via clássica de ação dos esteróides, a qual envolve a síntese de novas proteínas e necessita de mais horas (5-24 h) para ocorrer (KOMASTUZAKI *et al.*, 2005). Dado o papel antagônico do hipocampo e da amígdala na ativação do eixo HPA (FELDMAN *et al.*, 1995; HERMAN; CULLINAN, 1997), poder-se-ia supor que há pistas para que o efeito da elevação dos níveis plasmáticos dos hormônios relacionados ao estresse, como no caso dos glicocorticóides, contribua diferentemente para modificar a densidade de espinhos dendríticos nessas duas regiões. Ou seja, aumentando-a no hipocampo (KOMASTUZAKI *et al.*, 2005) e diminuindo-a na AMePD, como demonstrado aqui. Esta hipótese plausível precisa, por conseguinte, ser ratificada ou retificada com outros experimentos.

Assim como há diferenças estruturais em diferentes núcleos em resposta ao estresse de contenção crônico, como descrito previamente, há papel diferente dessas estruturas na regulação do eixo HPA. O hipocampo e o córtex pré-frontal são inibitórios à ativação do eixo HPA, enquanto a amígdala está implicada na ativação deste e na secreção de corticosterona (FELDMAN *et al.*, 1995; HERMAN; CULLINAN, 1997). Também isso está de acordo com os achados de que a influência da amígdala no sistema HPA é grandemente mediada pela AMe e ACe (HERMAN *et al.*, 2005). Especificamente, lesões na AMe reduzem a secreção de ACTH e/ou corticosterona após uma situação de estresse em ratos (FELDMAN *et al.*, 1994). E, neste sentido, é muito relevante a conexão bidirecional que existe entre a AMePD e a porção principal do BNST (COOKE; SIMERLY, 2005) e deste com a regulação da síntese de CRH no núcleo paraventricular hipotalâmico (HERMAN *et al.*, 1994).

Em sendo assim, a manutenção da densidade de espinhos dendríticos na AMePD em situação de estresse de contenção por 6 h ou por 28 dias, quando comparado ao grupo controle, poderia ser explicado, pelo menos em parte, pela persistente ativação do eixo HPA e a expressão de CRH na amígdala e pelas manifestações neuroendócrinas e comportamentais que pode decorrer do estresse crônico (MAKINO *et al.*, 2002). O eixo HPA continua a responder em situações de estresse crônico visto que o nível de glicocorticóides plasmáticos foi mais elevado ao final da segunda e da terceira semanas, em comparação ao primeiro dia, em animais submetidos a estresse de contenção diário de 6 h (MURAKAMI *et al.*, 2005). As células da glia, outros hormônios e citocinas locais podem estar relacionados com o estímulo estressante e o processamento da informação pela AMePD, embora pouco seja sabido neste momento a este respeito. Zhou e cols. (2005) sugerem que a manutenção ou mesmo aumento na atividade de circuitos neurais podem

contrapor os efeitos deletérios do estresse no sistema nervoso e suas conseqüências “alostáticas”. A presença de uma maior densidade de espinhos dendríticos no grupo submetido a estresse por 28 dias, quando comparado aos grupos submetidos ao estresse por 6 ou por 1 h, pode significar uma habituação ao estímulo inicial para manutenção de maiores entradas de estímulos sensoriais na AMePD ou para o processamento emocional e mnemônico do estímulo estressante. De acordo com a primeira idéia e com o dado de manutenção na densidade de espinhos dendríticos na AMePD após estresse crônico, está relatado que ocorre adaptação da expressão de *c-fos* na AMe de ratos após o estresse de contenção crônico (durante 10 dias, 60 min por dia; CHEN; HERBERT, 1995).

Ademais, somam-se as possibilidades de relação entre variação comportamental e modificação na densidade de espinhos dendríticos na AMePD. Além das alterações reprodutivas que se observam em animais estressados (NELSON, 2005), animais que passam por contenção durante 6 h diminuem significativamente a incidência de agressão entre si. Por outro lado, o estresse crônico (durante 21 dias, 6 horas por dia) foi capaz de elevar significativamente o comportamento agressivo entre os ratos estressados (WOOD *et al.*, 2003). Igualmente, as respostas comportamentais ao medo condicionado encontraram-se aumentadas após 3 semanas de estresse de contenção em ratos (CONRAD *et al.* 1999). Esses comportamentos citados também são modulados pela AMe (vide Introdução). Como já está demonstrada uma correlação entre o aumento de espinhos dendríticos na AMBI e o aumento do comportamento de ansiedade em ratos (MITRA *et al.*, 2005), poder-se-ia supor que os espinhos dendríticos na AMePD de animais submetidos a estresse crônico também poderiam se relacionar com o processamento de informação necessária para o animal se adaptar a sua condição de vida e ao estímulo aversivo percebido e com a modulação dos

comportamentos decorrentes disto. Igualmente neste ponto, novas linhas de pesquisa surgem a partir dos dados encontrados.

Os resultados também indicam que ocorre uma diminuição da densidade de espinhos dendríticos nos animais submetidos ao “enriquecimento ambiental” em relação ao grupo controle. Isto contraria uma de nossas hipóteses iniciais de trabalho e a explicação não é de todo fácil. Animais mantidos em “ambiente enriquecido” apresentam redução significativa dos valores basais de ACTH e corticosterona e podem ter atenuada a atividade do eixo HPA antes ou após uma condição estressante (BELZ *et al.* 2003). Com isso, poder-se-ia sugerir alguma ligação com os dados obtidos no experimento anterior. Por exemplo, se ocorre aumento na densidade de espinhos dendríticos em ratos submetidos a estresse crônico até fazer chegar ao valor controle, uma menor quantidade de espinhos poderia ser observada quando há menor atividade do eixo HPA. Tal raciocínio direto, no entanto, não é comprovado com o que ocorre no grupo de ratos submetidos a estresse de contenção por pouco tempo (1 h), onde também há diminuição da densidade de espinhos dendríticos quando deve estar ocorrendo elevação do nível de corticosterona plasmática. E, claramente, há grande diferença no caráter aversivo e na estratégia de comportamento animal entre um estímulo estressante como a contenção forçada do animal e a permanência em um local nada hostil para o animal como o “ambiente enriquecido”. Ainda não há dados que permitam correlacionar a densidade de espinhos dendríticos na AMePD e o mecanismo de formação e consolidação de memórias de diferentes tipos, como as de cunho emocional, integradas com a hodologia desta região e as influências do ambiente.

Pelo menos para o hipocampo de ratos criados em “ambiente enriquecido”, vários aspectos de seu funcionamento, como a ocorrência de atividade sináptica e celular

aumentada por longa duração (como nos casos de “long-term potentiation”, LTP), neurogênese, formação de novos espinhos dendríticos ou modificação estrutural de espinhos pré-existentes podem estar aumentados nesses animais (YUSTE; BONHOEFFER, 2001; LEGGIO *et al.*, 2005). De fato, aumento na densidade de espinhos dendríticos pode ser decorrente da existência de LTP, enquanto o oposto pode ocorrer em casos de depressão da atividade neuronal por longo prazo (como nos casos de “long-term depression”, LTD; CARLISLE; KENNEDY, 2005). As mudanças estruturais e numéricas dos espinhos dendríticos são relacionadas com a modificação do citoesqueleto de actina, o principal componente de seu citoesqueleto (MATUS, 2000). Há uma constante regulação dos filamentos de actina nos espinhos dendríticos, o que confere um caráter dinâmico à estrutura dos filamentos existentes; a polimerização ocorre na extremidade de crescimento rápido, que está posicionada em direção à superfície dos espinhos e a despolimerização ocorre na outra extremidade (PANTALONI *et al.*, 2001). Uma variedade de proteínas regula a formação, a estabilidade e a quebra dos filamentos de actina (ETHEL; PASQUALE, 2005). As proteínas RhoGTPases têm recebido maior atenção, das quais a RhoA, Rac1, e a cdc42 são as mais estudadas e são essenciais para a regulação da morfologia dos espinhos (LAMPRECHT; LeDOUX, 2004). A seqüência de sinalização que regula a forma dos espinhos dendríticos envolve a estimulação de receptores para transmissores químicos e canais iônicos na membrana plasmática do espinho, ativando vias de sinalização intracelular que controlam a atividade das RhoGTPases e assim regulam o citoesqueleto de actina (ETHEL; PASQUALE, 2005). Além disso, a regulação da quantidade de espinhos depende do padrão de estímulos que pode tanto produzir polimerização ou a despolimerização da actina, através do equilíbrio entre a actina-G (forma globular) e a actina-F (forma filamentososa) nos espinhos dendríticos (OKAMOTO *et*

al., 2004). Os disparos rápidos e intensos produzem LTP, causam a polimerização dos filamentos de actina e aumento dos espinhos pré-existentes ou a formação de novos espinhos; estímulos prolongados e de baixa intensidade produzem LTD, causam a despolimerização da actina, de modo que podem levar a retração dos espinhos e a diminuição da quantidade de espinhos dendríticos (ZHOU *et al.*, 2004). Cabe investigar no futuro se a criação de animais em “ambiente enriquecido” durante 3 semanas é capaz de gerar uma ativação tônica e de baixa intensidade na AMePD, relacionando-a com a condição ambiental a qual o animal está exposto e com os mecanismos intracelulares para ocorrência de uma menor densidade de espinhos dendríticos.

Baseado nisso e com o mesmo intuito, é que a necessidade de gênese e controle do comportamento animal poderia ajudar a elucidar o que ocorre na AMePD de ratos adultos em “ambiente enriquecido”. Nesta condição experimental, ocorre uma diminuição da emocionalidade avaliada, mesmo que de forma rudimentar, pelo teste do campo aberto (NIKOLAEV *et al.*, 2002). Além disso, a expressão de *c-fos* em vários núcleos da amígdala, após os animais submetidos ao “enriquecimento ambiental” terem sido expostos a um condicionamento aversivo (choque), demonstrou maiores resultados nos subnúcleos da AMe (incluindo a AMePD) do que em outros núcleos da amígdala (ACe, AMBl) após esse condicionamento. Tal expressão de *c-fos* foi maior no grupo de ratos sem estímulos e que viviam isolados do que naqueles animais mantidos em “ambiente enriquecido”. Isto pode sugerir que os animais do “ambiente enriquecido” experimentam de forma menos acentuada o estresse e geram menos resposta comportamental e neuroendócrina em decorrência disso (NIKOLAEV *et al.*, 2002). Poder-se-ia relacionar a diminuição da densidade de espinhos na AMePD do grupo criado em “ambiente enriquecido” com uma menor atividade desse subnúcleo, pois o “ambiente enriquecido” poderia ser capaz de

reduzir a atividade da AMePD e modular a emissão de comportamentos pelo animal. Há vários relatos na literatura que demonstram como a manipulação neonatal da ninhada ou do local onde o animal se desenvolve pode alterar francamente sua forma de interagir com o ambiente e com outros animais, de maneira transitória ou definitiva para o restante da vida (NIKOLAEV *et al.*, 2002; SCHRIJVER *et al.*, 2002; BELZ *et al.*, 2003; BOCK *et al.*, 2004; SEVERINO *et al.*, 2004; SINGER *et al.*, 2005; MADRUGA *et al.*, 2006).

Finalmente, não foram encontradas alterações significativas na densidade de espinhos dendríticos dos neurônios da AMePD de ratos velhos. O número de espinhos isoladamente não é suficiente para afirmar que a AMePD não sofra alterações morfológicas relacionadas ao envelhecimento; mas, infelizmente, não há nenhum estudo prévio sobre a estrutura dos dendritos de neurônios da AMe de ratos velhos. Há, no entanto, outros estudos envolvendo o córtex occipital, a região CA1 do hipocampo e o giro denteado de ratos em idade avançada onde, igualmente, não foram encontradas alterações na densidade de espinhos dendríticos (CURCIO; HINDS, 1983; STEMMELIN *et al.*, 2003; MARKHAM *et al.* 2005). Por outro lado, no córtex cingulado anterior de ratos velhos foi demonstrada uma diminuição no número desses espinhos (MARKHAM, JURASKA, 2002), enquanto no núcleo hipotalâmico ventromedial ocorreu um aumento (MADEIRA *et al.* 2001). Percebe-se novamente que as alterações na densidade de espinhos dendríticos em ratos velhos são específicas de cada região encefálica.

Alguns estudos procuram sugerir que neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal são particularmente vulneráveis ao processo de envelhecimento e, com isso, afetam a atividade de células corticais e o desempenho dos animais idosos em tarefas cognitivas (WONG *et al.*, 1998; STEMMELIN *et al.*, 2003). O fato de não ter sido encontrada

diminuição na densidade de espinhos dendríticos proximais na AMePD de ratos velhos pode sugerir que outros locais ao longo do dendrito sejam mais propensos a sofrer alteração, como os contatos sinápticos que são feitos diretamente nos ramos dendríticos (e que parecem ser os mais numerosos na AMePD; HERMEL *et al.*, no prelo) podem ser mais afetados do que os que se fazem nos espinhos dendríticos ou que, dada a pouca presença de acetilcolina na AMePD (Rasia-Filho e Achaval, dados não publicados), esta região esteja relativamente “protegida” da perda de sítios pós-sinápticos em decorrência da redução de aferências colinérgicas.

O dado de que a densidade de espinhos dendríticos na AMePD de ratos velhos não apresenta diferença estatisticamente significativa com relação aos ratos adultos correlaciona-se com outro estudo que comparou a expressão de *c-fos* na amígdala de ratos idosos (24 meses de idade) e a de ratos jovens (4 meses de idade), ambos expostos a vários testes comportamentais (labirinto em cruz elevado, campo aberto com centro iluminado e interação social; BOGUSZEWSKI; ZAGRODZKA, 2005). Neste trabalho demonstrou-se que a expressão de *c-fos* não diferiu entre os ratos jovens e ratos idosos, tanto nos grupos controle (adultos e velhos, sem estímulos) como após os diferentes estímulos comportamentais (BOGUSZEWSKI; ZAGRODZKA, 2005). Talvez a manutenção dos espinhos na AMePD de ratos velhos tenha um papel na funcionalidade da amígdala em idades mais avançadas, permitindo que o animal mantenha uma vida de relação adequada e interagindo com o meio onde se encontra. Necessariamente a AMePD deve ser entendida como formando circuitos neurais e o resultado do processamento de informações, seqüencial ou em paralelo, deve ajudar a compreender como as diferentes áreas do SNC de ratos organizam-se com o avanço da idade do animal. De acordo com Stemmelin e cols (2003), a manutenção da estrutura neuronal em certas áreas nervosas na velhice deve ser

condição necessária para que o animal mantenha-se capaz de lidar com as condições de seu ambiente e prolongar sua existência. A correlação entre quantidade, morfologia e funcionalidade dos espinhos dendríticos na AMePD pode auxiliar a elucidar se nesta área ocorre alguma alteração na atividade neuronal de ratos idosos.

Todos os resultados apresentados nesse trabalho demonstram a plasticidade inerente à AMePD e quão específica esta pode ser frente à condição estudada, devendo-se valer do estudo da microcircuitaria local e da hodologia desta estrutura no contexto da organização geral do SNC do rato. Estudos adicionais morfológicos, eletrofisiológicos e comportamentais podem se embasar nos presentes achados para auxiliar a desvendar as ações integradas da AMePD. Para isso, há um grande campo aberto para investigação.

6. CONCLUSÕES

Baseado na metodologia empregada e nos resultados obtidos, conclui-se que:

- 1) os neurônios bipenachados e estrelados da AMePD não apresentam diferença na densidade de espinhos dendríticos;
- 2) o estresse agudo de contenção por 1 h reduziu a densidade de espinhos dendríticos na AMePD. O mesmo procedimento realizado durante 6 h ou por 28 dias não promoveu alterações neste parâmetro;
- 3) a colocação de animais em “ambiente enriquecido” reduziu a densidade de espinhos dendríticos na AMePD;
- 4) ratos velhos não apresentam alteração na densidade de espinhos dendríticos na AMePD.

Esse trabalho mostra que a plasticidade neural que ocorre na AMePD é específica para a condição experimental estudada. As modificações no número dos espinhos dendríticos na AMePD podem ser uma consequência do funcionamento da microcircuitaria local e da hodologia desta estrutura no contexto da organização geral do SNC do rato, em decorrência de alterações hormonais nessa estrutura nervosa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGLETON, J. P.; BLINDT, M. S. Effects of amygdaloid and amygdaloid-hipocampal lesions on object recognition and spatial working memory in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, n. 5, p. 962-974, 1989.

AGUILERA, G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and stress response. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 9, n. 8, p. 329-336, 1998.

AHIMA, R. S.; HARLAN, R. E. Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. **Neuroscience**. v. 39, n. 3, p. 579-604, 1990.

ALHEID, G. F.; DE OLMOS, J. S.; BELTRAMINO, C. A. Amygdala and extended amygdala. In: PAXINOS, G. **The Rat Nervous System**. San Diego: Academic Press, p. 495-498, 1995.

ALLEN, J. P.; ALLEN, C. F. Role of the amygdaloid complexes in the stress-induced release of ACTH in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 15, p. 220-230, 1974.

BANNISTER, N. J. LARKMAN, A. U. Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns. **Journal of Comparative Neurology**, v. 360, p. 150-160, 1995.

BELZ, E.; KENNELL, J. S.; CZAMBEL, K.; RUBIN, R. T.; RHODES, M. E. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 76, p. 481-486, 2003.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 941-979, 2004.

BIERNASKIE, J.; CORBETT, D.; Enriched rehabilitative training promoter improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n.14, p. 5272-5280, 2001.

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

BOCK, J.; GRUSS, M.; BECKER, S.; BRAUN, K. Experience-induced changes of dendritic spine densities in the prefrontal and sensory cortex: correlation with developmental time windows. **Cerebral Cortex**, v. 15, p. 802-808, 2005.

BOGUSZEWSKI, P.; ZAGRODZKA, J. Expression of *c-Fos* in response to stressogenic stimuli in the amygdala of old vs. young rats a preliminary study. **Acta Neurobiologiae Experimental**, v. 65, n. 2, p. 191-194, 2005.

BOHUS, B.; de KLOET, E. R. Adrenal steroids and extinction behavior: Antagonism by progesterone, deoxycorticosterone and dexamethasone of a specific effect of corticosterone. **Life Science**, v. 28, n. 4, p. 433-440, 1991.

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

BRAKE, W. G.; ALVES, S. E.; DUNLOP, J. C.; LEE, S. J.; BULLOCH, K.; ALLEN, P. B.; GREENGARD, P.; McEWEN, B. S. Novel target sites for estrogen action in dorsal hippocampus: An examination of synaptic proteins. **Endocrinology**, v. 142, p. 1284-1289, 2001.

BREGEIRON, M. K.; MORRIS, M.; LUCION, A. B.; SANVITTO, G. L. Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. **Hormones and Behavior**, v. 41, n. 3, p. 267-74, 2002.

BRIONES, T.; THERDIEN, B.; METZGER, B. Effects of environment on enhancing functional plasticity following cerebral ischemia. **Biological Research for Nursing**, v. 1, n. 4, p. 209-307, 2000.

BROWN, S. M.; HENNING, S.; WELLMAN, C. L. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 15, n. 11, p. 1714-1722, 2005.

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

BURKE, S. N.; BARNES, C. A. Neural plasticity in the ageing brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 30-40, 2006.

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

CARLISLE, H. J.; KENNEDY, M. B. Spine architecture and synaptic plasticity. **Trends in Neuroscience**, v. 28, n. 4, p. 182-187, 2005.

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 responses. **Neuroscience**, v. 64, n. 3, p. 675-85, 1995.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P.W. A healthy body in a healthy mind-and vice versa-the damaging power of “uncontrollable” stress. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, p. 1842–1845, 1998.

CLAIBORNE, B. J.; AMARAL, D. G.; COWAN, W. M. Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 302, p. 206-219, 1990.

COOK, S. C.; WELLMAN, C. L. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. **Journal of Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 236-248, 2004.

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

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

CONRAD, C. D.; LeDOUX, J. E.; MAGARIÑOS, A. M.; McEWEN, B. S. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. **Behavioral Neuroscience**, v. 113, p. 902-913,1999.

CURCIO, C. A.; HINDS, J. W. Stability of synaptic density and spines volume in dentate gyrus of aged rats. **Neurobiology of Aging**, v. 4, p. 77-87, 1983.

DALL’OGLIO, A.; MARCUZZO, S.; DE CASTILHOS, J.; RASIA-FILHO, A. A. Método de Golgi. In: ELIAS, C.; BITTENCOURT, J. **Métodos em Neurociências**. Ed: Rocco, (no prelo).

DAVIS, M. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? **Biological Psychiatry**, v. 44, p. 1239-1247,1998.

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

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. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 2312-2322, 1999.

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

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

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

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

DIELENBERG, R. A.; HUNT, G. R.; MCGREGOR, L. S. When a Rat Smells a Cat: The distribution of FOS immunoreactivity in the rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**, v. 104, n. 4, p. 1085-1097, 2001.

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

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

EHLERS, M. D. Molecular morphogens for dendritic spines. **Trends in Neurosciences**, v. 25, p. 64-67, 2002.

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

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

FAIRÉN, A. Pioneering a golden age of cerebral microcircuits: The births of combined Golgi-electron microscope methods. **Neuroscience**, v. 136, p. 607-614, 2005.

FELDMAN, S.; CONFORTI, N.; ITZIK, A.; WEIDENFELD, J. Differential effect of amygdaloid lesions of CRF-41, ACTH and corticosterone responses following neural stimuli. **Brain Research**, v. 658, p. 21-26, 1994.

FELDMAN, S.; CONFORTI, N.; WEIDENFELD, J. Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli. **Neuroscience Biobehavior Review**, v. 19, p. 235-240, 1995.

FONTELLA, F. U.; CIMAROSTI, H.; CREMA, L. M.; THOMAZI, A. P.; LEITE, M. C.; SALBEGO, C.; GONÇALVES, C. A. S.; WOFCHUK, S.; DALMAZ, C.; NETTO, C. A. Acute and repeated restraint stress influences cellular damage in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. **Brain Research Bulletin**, v. 65, p. 443-450, 2005.

GABBOTT, P. L.; SOMOGYI, J. The “single” section Golgi-impregnation procedure: methodological description. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, n. 4, p. 221-230, 1984.

GAMALLO, A.; VILLANUA, A.; TRANCHO, G.; FRAILE, A. Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. **Physiology and Behavior**, v. 36, n. 2, p. 217-221, 1986.

GOLGI, C. Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. **Gazzeta Medica Italiana Lombarda**, v. 6, p. 244–246, 1873.

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

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

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

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

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

HASEGAWA, D.; YAYOSHI, N.; FUJITA, Y.; FUJITA, M.; ORIMA, H. Measurement of interthalamic adhesion thickness as a criteria for brain atrophy in dogs with and without cognitive dysfunction (dementia). **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 46, n. 6, p. 452-457, 2005.

HAUGER, R. L.; THRIVIKRAMAN, K. V.; PLOTSKY, P. M. Age-related alterations of hypothalamic–pituitary–adrenal axis function in male Fischer 344 rats. **Endocrinology**, v. 134, p.1528–1536, 1994.

HAUGER, R. L.; DAUTZENBERG, F. M. Regulation of Stress Response by Corticotropin-Releasing Factor Receptors. In: CONN, P. M.; FREE, M. E. **Neuroendocrinology in Physiology and Medicine**, New Jersey: Human Press, p. 261-286, 2000.

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

HEAD, E.; MOFFAT, K.; DAS, P.; SARSOZA, F.; POON, W. W.; LANDSBERG, G.; COTMAN, C. W.; MURPHY, M. P. Beta-amyloid deposition and tau phosphorylation in clinically characterized aged cats. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 5, p. 749-763, 2005.

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

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

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E.; WATSON, S. J. Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 6, n. 4, p. 433-442, 1994.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E., Neurocircuitry of stress: central control of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 2, p. 78-84, 1997.

HERMAN, J. P.; OSTRANDER, M. M.; MUELLER, N. K.; FIGUEIREDO, H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 8, p. 1201-1213, 2005.

HERMEL, E.; MARCUZZO, S.; HEUSER, M. C. F.; RASIA-FILHO, A. A.; ACHAVAL, M. Ultrastructural features of neurones and synaptic contacts in the posterodorsal medial amygdala of adult male rats. **Journal of Anatomy**, (no prelo).

HOWARD, C. V.; CRUZ-ORIVE, L. M.; YAEGASHI, H. Estimating neuron dendritic length in 3D from total vertical projections and from vertical slices. **Acta Neurologica Scandinavica**. Supplementum, v. 137, p. 14-19, 1992.

ICKES, B. R.; PHAM, T. M.; SANDERS, L. A.; ALBECK, D. S.; MOHAMMED, A. H.; GRANHOLM, A. C. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. **Experimental Neurology**, v. 164, n. 1, p. 45-52, 2000.

INOUE, T.; KOYAMA, T.; MURAKI, A.; YAMASHITA, I. Effects of single and repeated immobilization stress on corticotropin-releasing factor concentrations in discrete rat brain regions. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 17, p. 161-170, 1993.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, p. 285-316, 1997.

JACOBS, B.; SCHALL, M.; PRATHER, M.; KAPLER, E.; DRISCOLL, L. Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative Golgi study. **Cerebral Cortex**, v. 11, p. 558-571, 2001.

JOHANSSON, B.; BELICHENKO, P.; Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 22, p. 89-96, 2002.

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

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

KASCKOW, J. W.; REGMI, A.; MULCHAHEY, J. J.; PLOTSKY, P. M.; HAUGER, R. L. Changes in brain corticotropin-releasing factor messenger RNA expression in aged Fischer 344 rats. **Brain Research**, v. 822, p. 228–230, 1999.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, p. 493–495, 1997.

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

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

KOMATSUZAKI, Y.; MURAKAMI, G.; TSURUGIZAWA, T.; MUKAI, H.; TANABE, N.; MITSUHASHI, K.; KAWATA, M.; KIMOTO, T.; OOISHI, Y.; KAWATO, S. Rapid spinogenesis of pyramidal neurons induced by activation of glucocorticoid receptor in adult male rat hippocampus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, p. 1002-1007, 2005.

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

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

KONDO, Y.; TOMIHARA, K.; SAKUMA, Y. Sensory requirements for noncontact penile erection in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 113, n. 5, p. 1062-1070, 1999.

KORTE, S. M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. **Neuroscience Biobehavior Research**, v. 25, p. 117-142, 2001.

KRETZ, O.; FESTER, L.; WEHRENBURG, V.; ZHOU, L.; BRAUCKMANN, S.; ZHAO, S.; PRANGE-KIEL, J.; NAUMANN, T.; JARRY, H.; FROTSCHER, M.; RONE, G. M. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 26, p. 5913-21, 2004.

KUBO, T.; OKATANI, H.; NISHIGORI, T.; HAGIWARA, Y.; FUKUMORI, R.; GOSHIMA, Y. Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats. **Neuroscience Letters**, v. 354, p. 84-86, 2004.

LAMPRECHT, R.; LeDOUX, J. Structural plasticity and memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. 45-53, 2004.

LARSSON, F.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A. H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 93-207, 2002.

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

LeDOUX, J. E. Emotional memory systems in the brain. **Behavioral Brain Research**, v. 58, p. 69–79, 1993.

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

LI, C.; MAGLINAO, T. L.; TAKAHASHI, L. K. Medial Amygdala Modulation of Predator Odor-Induced Unconditioned Fear in the Rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, n. 2, p. 324-332, 2004.

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

LU, V. N.; HATTORI, Y.; MORIWAKI, A.; HAYASHI, Y.; HORI, Y. Inhibition of neurons in the rat medial amygdaloid nucleus in vitro by somatostatin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, p. 670-674, 1995.

MADEIRA, M. D.; FERREIRA-SILVA, L.; RUELA, C.; PAULA-BARBOSA, M. Differential effects of the aging process on the morphology of the hypothalamic ventromedial nucleus of male and female rats. **Neuroscience Letters**, v. 314, p. 73–76, 2001.

MADRUGA, C.; XAVIER, L. L.; ACHAVAL, M; SANVITTO, G. L.; LUCION, A. B. Early handling, but not maternal separation, decrease emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. **Behavioral Brain Research**, v. 166, n. 2, p. 241-246, 2006.

MAKINO, S; HASHIMOTO, K.; GOLD, P. W. Multiple feedback mechanisms activating corticotrophin-releasing hormone system in the brain during stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 147-158, 2002.

MAREN, S. What the amygdala does and doesn't do in aversive learning. **Learning and Memory**, v. 10, n. 5, p. 306-8, 2003.

MARKHAM, J. A.; JURASKA, B, J. M. Aging and sex influence the anatomy of the rat anterior cingulate cortex. **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 4, p. 579-588, 2002.

MARKHAM, J. A.; McKIAN, K. P.; STROUP, T. S.; JURASKA, J. M. Sexually dimorphic aging of dendritic morphology in CA1 hippocampus. **Hippocampus**, v. 15, p. 97-103, 2005.

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

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

McDONALD, R. J.; WHITE, N. M. A Triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. **Behavioral Neuroscience**, v. 107, p. 3-22, 1993.

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

McEWEN, B. S. **The Hostage Brain**. New York: Rockefeller University Press, 1994.

McEWEN, B. S. Stress and the aging hippocampus. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 20, p. 49–70, 1999.

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

McEWEN, B. S.; The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v. 886, p. 172-189, 2000.

McEWEN, B. S. Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. **Neurobiology of Aging**, v. 23, p. 921-939, 2002.

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

McGAUGH, J. L.; Involvement of the amygdala in neuromodulatory influences on memory storage. In: AGGLETON, J. P. **The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction**. New York: Wiley-Liss, p. 431-451, 1992.

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

MERRILL, D. A.; CHIBA, A. A.; TUSZYNSKI, M. H. Conservation of neuronal number and size in the entorhinal cortex of behaviorally characterized aged rats. **Journal of Comparative Neurology**, v. 438, p. 445–456, 2001.

MITCHELL, J. B.; MEANEY, M. J. Effects of corticosterone on response consolidation and retrieval in the forced swim test. **Behavioral Neuroscience**, v. 105, n. 6, p. 798-803, 1991.

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

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. **Neuroscience Research**, v. 26, p. 235-269, 1996.

MOSER, M. B.; TROMMALD, M.; ANDERSEN, P. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 91, n. 26, p. 12673–12675, 1994.

MOTULSKY, H. **Intuitive Biostatistics**. New York: Oxford University Press, 1995.

MURAKAMI, S.; IMBE, H.; MORIKAWA, Y.; KUBO, C.; SENBA, E. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. **Neuroscience Research**, v. 53, n. 2, p.129-139, 2005.

NAGERL, U. V.; EBERHORN, N.; CAMBRIDGE, S. B.; BONHOEFFER, T. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. **Neuron**, v. 44, n. 5, p. 759-767, 2004.

NAISBITT, S.; KIM, E.; TU, J.C.; XIAO, B.; SALA, C.; VALTSCHANOFF, J.; WEINBERG, R. J.; WORLEY, P. F.; SHENG, M. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. **Neuron**, v. 23, p. 569-582, 1999.

NELSON, R. J. **An Introduction to Behavioral Endocrinology**. Sunderland: Sinauer Associates, 2005.

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

NIKOLAEV, E.; KACZMAREK, L.; ZHU, S. W.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A. H. Environmental manipulation differentially alters *c-Fos* expression in amygdaloid nuclei following aversive conditioning. **Brain Research**, v. 957, p. 91-98, 2002.

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

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

NITHIANANTHARAJAH, J.; LEVIS, H.; MURPHY, M. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 81, p. 200-210, 2004.

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

NUSSER, Z.; LUJAN, R.; LAUBE, G.; ROBERTS, J. D.; MOLNAR, E.; SOMOGYI, P. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. **Neuron**, v. 21, n. 3, p. 545-549, 1998.

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

OKAMOTO, K.; NAGAI, T.; MIYAWAKI, A.; HAYASHI, Y. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. **Nature Neuroscience**, v. 10, p. 1104-1112, 2004.

OLIVEIRA, R. M. W.; DEL BEL, E. A.; MAMEDE-ROSA, M. L.; PADOVAN, C. M.; DEAKIN, J. F. W.; GUIMARÃES, F. S. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. **Neuroscience Letters**, v. 289, p. 123-126, 2000.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 4, p. 502-548, 2001.

PACE, T. W.; GAYLARD, R.; TOPCZEWSKI, F.; GIRATTI, M.; RUBIN, B.; SPENCER, R. L. Immediate-early gene induction in hippocampus and cortex as a result of novel experiences is not directly related to the stressfulness of that experience. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 1679-1690, 2005.

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

PANTALONI, D.; Le CLAINCHE, C.; CARLIER, M. F. Mechanism of actin-based motility. **Science**, v. 292, n. 5521, p. 1502-1506, 2001.

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

PELLEGRINI, A.; GRIECO, M.; MATERAZZI, G.; GESI, M.; RICCIARDI, M. P. Stress-induced morphohistochemical and functional changes in rat adrenal cortex, testis and major salivary glands. **The Histochemical Journal**, n. 30, v. 10, p. 695-701, 1998.

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

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

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

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

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

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

RADLEY, J. J.; MORRISON, J. H. Repeated stress and structural plasticity in the brain. **Ageing Research Reviews**, v. 4, p. 271-287, 2005.

RADLEY, J. J.; ROCHER, A. B.; WILLIAM, G. M.; JANSSEN, W. G. M.; HOF, P. R.; McEWEN, B. S.; MORRISON, J. H. Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. **Experimental Neurology**, v. 196, n. 1, p. 199-203, 2005.

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

RAMPON, C.; TANG, Y. P.; GOODHOUSE, J.; SHIMIZU, E.; KYIN, M.; TSIEN, J. Z. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. **Nature Neuroscience**, v. 3, n.3, p. 238–244, 2000.

RAPP, P. R.; GALLAGHER, M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 93, p. 9926–9930, 1996.

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

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

RASIA-FILHO, A. A.; LONDERO, R. G.; ACHAVAL, M. Funcional activities of the amygdala: an overview. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 14-23, 2000.

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

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

RASIA-FILHO, A. A.; HILBIG, A. Papel da amígdala e do hipocampo no transtorno do estresse pós-traumático. In: CAMINHA, R. **Transtornos do Estresse Pós-traumático**, São Paulo: Casa do Psicólogo, p. 37-53, 2005.

RASIA-FILHO, A. A. Is there anything “autonomous” in the nervous system? **Advances in Physiology Education**, v. 30, n. 1, p. 9-12, 2006.

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

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

ROOZENDAAL, B.; OKUDA, S.; DE QUERVAIN, D. J.; McGAUGH, J. L. Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. **Neuroscience**, v. 126, n. 4, p. 839-847, 2005.

ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT, E. L.; Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 78, n. 1, p. 57-65, 1996.

SAH, P.; FABER, E. S. L.; LOPEZ DE ARMENTIA, M.; POWER, J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 803-834, 2003.

SALA, C.; PIECH, V.; WILSON, N. R.; PASSAFARO, M.; LIU, G.; SHENG, M. Regulation of dendritic spines morphology and synaptic function by Shank and Homer. **Neuron**, v. 31, p. 115-130, 2001.

SAPOLSKY, R. M.; KREY, L.; McEWEN, B. S. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. **Journal of Neuroscience**, v. 5, p. 1222-1227, 1985.

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. **Experimental Gerontology**, v. 34, n. 6, p. 721-732, 1999.

SAPOLSKY, R. M.; Stress and plasticity in the limbic system. **Neurochemical Research**, v. 28, n. 11, p. 1735-1742, 2003.

SCALIA, F.; WINANDS, S. S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. **Journal of Comparative Neurology**, v. 61, p. 31-55, 1975.

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

SCHEIBEL, M. E.; LINDSAY, R. D.; TOMIYASU, U.; SCHEIBEL, A. B. Progressive dendritic changes in aging human cortex. **Experimental Neurology**, v. 47, n. 3, p. 392-403, 1975.

SCHRIJVER, N. C. A.; BAHR, N. I.; WEISS, I. C.; WÜRBEL, H. dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 209-224, 2002.

SCHULKIN, J.; GOULD, P. W.; McEWEN, B. S. Induction of corticotropin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, p. 219-243, 1998.

SEVERINO, G. S.; FOSSATI, I. A.; PADOIN, M. J.; GOMES, C. M.; TREVIZAN, L.; SANVITTO, G. L.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; LUCION, A. B. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. **Physiology and Behavior**, v. 81, n. 3, p. 489-498, 2004.

SHAIKH, M. B.; STEINBERG, A.; SIEGEL, A. Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive range behavior in the cat. **Brain Research**, v. 265, p. 283-294, 1993.

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

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

SHINDOU, T.; WATANABE, S.; YAMAMOTO, K.; NAKANISHI, H. NMDA receptor-dependent formation of long-term potentiation in the rat medial amygdala neuron in an in vitro slice preparation. **Brain Research Bulletin**, v. 31, p. 667-672, 1993.

SHORS, T. J.; FALDUTO, J.; LEUNER, B. The opposite effects of stress on dendritic spines in male vs. female rats are NMDA receptor-dependent. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 145-150, 2004.

SHORS, T. J. Significant life events and the shape of memories to come: A hypothesis. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 85, n. 2, p. 103-115, 2005.

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, p. 135-233, 1990.

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

SINGER, B.; FRIEDMAN, E.; SEEMAN, T.; FAVA, G. A.; RYFF, C. D. Protective environments and health status: cross-talk between human and animal studies. **Neurobiology of Aging**, v. 26, p. 113-118, 2005.

SLODDART-APTER, S. L.; McDONNELL, 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 Research**, v. 193, p. 19-32, 1980.

SORENSEN, T.; ZIMMER, J. Ultrastructural organization of normal and transplanted rat fascia dentata: I. A quantitative analysis of intracerebral and intraocular grafts. **Journal of Comparative Neurology**, v. 267, p. 43-54, 1988.

SORRA, K. E.; HARRIS, K. M. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. **Hippocampus**, v. 10, p. 501–511, 2000.

STARK, C. P. Behavioral effects of stimulation of the medial amygdala in the male rat are modified by prior sexual experience. **The Journal of General Psychology**, v. 132, p. 207–224, 2005.

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

STEWART, M. G.; DAVIES, H. A.; SANDI, C.; KRAEV, I. V.; ROGACHEVSKY, V. V.; PEDDIE, C. J.; RODRIGUEZ, J. J.; CORDERO, M. I.; DONOHUE, H. S.; GABBOTT, P. L. A.; POPOV, V. L. Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of rat hippocampus: A three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. **Neuroscience**, v. 131, n. 1, p. 43-54, 2005.

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

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

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

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

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

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

TORRES, I. L.; GAMARO, G. D.; SILVEIRA-CUCCO, S. N.; MICHALOWSKI, M. B.; CORREA, J. B.; PERRY, M. L.; DALMAZ, C. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 111-116, 2001.

TURNER, C.; YANG, M. C.; LEWIS, M. H. Environmental enrichment: effects on stereotyped behavior and regional neuronal metabolic activity. **Brain Research**, v. 938, p. 15-21, 2002.

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

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

von BOHLEN und HALBACH, O. ZACHER, C.; GASS, P.; UNSICKER, K. Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 83, n. 4, p. 525-531, 2006.

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

VYAS, A.; BERNAL, S.; CHATTARJI, S.; Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. **Brain Research**, v. 965, p. 290-294, 2003.

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

WATANABE, Y.; IKEGAYA, Y.; SAITO, H.; ABE, K. Roles of GABA, NMDA and muscarinic receptors in induction of long-term potentiation in the medial and lateral amygdala in vitro. **Neuroscience Research**, v. 21, p. 317-322, 1995.

WEARNE, S. L.; RODRIGUEZ, A.; EHLENBERGER, D. B.; ROCHE, A. B.; HENDERSON, S. C.; HOF, P. R. New techniques for imaging, digitization and analysis of three-dimensional neural morphology on multiple scales. **Neuroscience**, v. 136, p. 661-680, 2005.

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

WISE, P. M. Neuroendocrine Correlates of Aging. In: CONN, P. M.; FREE, M. E. **Neuroendocrinology in Physiology and Medicine**, Humana Press, p. 371-387, 2000.

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

WONG, T. P.; CAMPBELL, P. M.; RIBEIRO-da-SILVA, A.; CUELLO, A. C. Synaptic numbers across cortical laminae and cognitive performance of the rat during ageing. **Neuroscience**, v. 8, p. 403-412, 1998.

WOOD, G. E.; YOUNG, L. T.; REAGAN, L. P.; McEWEN, B. S. Acute and chronic restraint stress alter the incidence of social conflict in male rats. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 205-213, 2003.

WOOD, R. L.; NEWMAN, S. W. Hormonal influence on neurons of the mating behavior pathway in male hamster. In: MICIVYCH, P. E.; HAMMER Jr, R. P. **Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones**. New York: Cambridge, p. 3-39, 1995.

WOOLLEY, C. S.; GOULD, E.; McEWEN, B. S. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. **Brain Research**, v. 531, p. 225-231, 1990.

WOOLLEY, C. S.; McEWEN, B. S. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 336, n. 2, p. 293-306, 1993.

YUSTE, R.; BONHOEFFER, T. Morphologic changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 24, p. 1071-1089, 2001.

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

YU-YEN IP, E.; GIZA, L.; HOUDA, D. Effects of enriched environment and fluid percussion injury on dendritic arborization on this the cerebral cortex of the developing rat. **Journal of Neurotrauma**, v. 19, n. 5, p. 67-74, 2002.

ZAR, J. **Biostatistical Analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 2004.

ZHANG, W.; BENSON, D. L. Development and molecular organization of dendritic spines and their synapses. **Hippocampus**, v. 10, p. 512-526, 2000.

ZHOU, Q.; HOMMA, K. J.; POO, M. M. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. **Neuron**, v. 44, n. 5, p. 749-757, 2004.

ZHOU, J.; ZHANG, H.; COHEN, R. S.; PANDEY, S. Effects of estrogen treatment on expression of BDNF and CREB expression and phosphorylation in rat amygdaloid and hippocampal structures. **Neuroendocrinology**, v. 81, n. 5, p. 294-310, 2005.

ZOLMAN, J. F. **Biostatistics**. New York: Oxford University Press, 1993.