



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**ESTUDO SOBRE A AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-DORSAL  
DE RATOS: EVIDÊNCIAS ADICIONAIS PARA UM  
DIMORFISMO SEXUAL NA ATIVIDADE DA NADPH-  
DIAFORASE E NA AÇÃO DOS ESTEROIDES SEXUAIS  
FEMININOS NO SOMA NEURONAL**

Juliana de Castilhos

Porto Alegre

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**ESTUDO SOBRE A AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-DORSAL DE  
RATOS: EVIDÊNCIAS ADICIONAIS PARA UM DIMORFISMO SEXUAL  
NA ATIVIDADE DA NADPH-DIAFORASE E NA AÇÃO DOS  
ESTEROIDES SEXUAIS FEMININOS NO SOMA NEURONAL**

Juliana de Castilhos

**Orientadora:** Profa. Dra. Matilde Achaval Elena

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

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Porto Alegre

2009

*Dizemos que a ciência «explica», mas, na realidade, apenas «descreve».  
Descrevemos hoje melhor, mas explicamos tão pouco quanto todos os nossos  
predecessores. Descobrimos uma sucessão múltipla onde o homem ingênuo e o  
investigador das civilizações mais antigas se apercebia apenas de duas coisas:  
'causa' e 'efeito', como se costumava dizer. E deduzimos: isto e isto tem de se dar  
primeiro para que depois se siga aquilo - mas, com isso, não compreendemos  
absolutamente nada. Em qualquer processo químico, por exemplo, as  
transformações continuam, tal como antes, a aparecer como um «milagre». E como  
haveríamos nós de conseguir explicá-las? Operamos unicamente com coisas que  
não existem, com linhas, com superfícies, corpos, átomos, tempos divisíveis,  
espaços divisíveis! Como seria possível sequer uma explicação, se traduzimos tudo  
primeiro numa imagem, na nossa própria imagem! Na verdade, temos à nossa  
frente um continuum, de que isolamos algumas partes, da mesma maneira que, num  
movimento, nos apercebemos apenas de pontos isolados e, portanto, não vemos, na  
realidade, esse movimento, mas deduzimos que existe. Um intelecto que visse a  
causa e o efeito como um continuum, e não, à nossa maneira, como parcelamento e  
fragmentação arbitrários, que visse o curso do acontecer, repudiaria o conceito de  
causa e efeito e negaria toda a condicionalidade.*

Friedrich Nietzsche  
Causa e Efeito, em A Gaia Ciência  
(1882)

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Matilde Achaval Elena, minha gratidão por ter me aberto as portas do Laboratório de Histofisiologia Comparada ainda quando eu era apenas uma aluna de iniciação científica. Obrigada pela oportunidade, pela orientação e pelo constante incentivo.

Ao Prof. Dr. Alberto Antonio Rasia Filho. Faltam-me palavras para dizer o quanto foste importante na minha formação acadêmica. Por ter me dado a oportunidade de trabalharmos juntos e por despertado em mim a paixão pela Fisiologia, agradeço pela confiança, companheirismo, amizade e apoio. És um exemplo pessoa e de dedicação à ciência.

A minha família, pelo constante apoio. E por entenderem a minha ausência.

A minha colega de laboratório, e mais do isso, a minha amiga Paula Rigon da Luz Soster. Tua ajuda durante a realização dos experimentos foi imprescindível para que tudo isso se tornasse realidade. Obrigada por caminhar comigo durante os momentos difíceis, mas acima de tudo, obrigada pela amizade, pelas risadas e pelo companheirismo. Nossa parceria foi show!

Aos colegas Léder Leal Xavier e Erica do Espírito Santo Hermel, pela ajuda e disponibilidade constante.

À Prof. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro, pelos valiosos conselhos.

Aos meus amigos “normais” de fora da UFRGS: Letícia Carina Ribeiro, Daniela Reginatto da Costa, Felipe Schnack, Gustavo Agostini, Juliana Piva de Almeida, Luciana Piccoli, Eduardo Neuhaus, Cristian Moz, Tiago Rech e Alonso Licks, que estiveram sempre perto, incentivando, e fazendo com que essa jornada parecesse um pouco menos árdua.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia pela oportunidade e a todos os seus professores pelos ensinamentos.

Aos funcionários do ICBS, especialmente a Antonio G. Severino, por ter “quebrado vários galhos” no laboratório.

Aos funcionários do Biotério, pela criação e cuidado dos animais utilizados nesse trabalho.

A CAPES, pela bolsa de doutorado.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	VIII
<b>ABSTRACT</b> .....	IX
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	X
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XIII
<b>ABREVIATURAS</b> .....	XIV
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1. A Amígdala.....	2
1.2. Amígdala medial.....	6
1.2.1. Localização e divisão.....	6
1.2.2. Conexões da amígdala medial.....	9
1.2.3. Citoarquitetura da amígdala medial.....	14
1.2.4. Funções da amígdala medial.....	18
1.3. Hormônios gonadais e dimorfismo sexual.....	20
1.4. O ciclo estral da rata.....	26
1.5. Óxido nítrico.....	29
1.5.1. Formação do óxido nítrico.....	30
1.5.2. Distribuição neuroanatômica do óxido nítrico.....	32
1.5.3. Funções neuroendócrinas e comportamentais do óxido nítrico.....	33
1.5.4. Relação entre o óxido nítrico e os hormônios gonadais.....	34
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	39
<b>3. MATERIAL e MÉTODOS</b>	
3.1. Animais.....	42
3.2. Identificação das fases do ciclo estral.....	42
3.3. <b>Experimento 1:</b> Atividade da NADPH-diaforase entre machos e fêmeas ao longo do ciclo estral.....	44
3.3.1. Procedimento histoquímico para NADPH-diaforase.....	44
3.3.2. Aquisição de dados.....	45

3.3.3. Análise estatística.....	47
3.4. <b>Experimento 2:</b> Atividade da NADPH-diaforase após ovariectomia e terapia hormonal substitutiva.....	48
3.4.1. Procedimento cirúrgico e terapia hormonal substitutiva.....	48
3.4.2. Aquisição de dados.....	51
3.4.3 Análise estatística.....	51
3.5. <b>Experimento 3:</b> Avaliação do volume somático e nuclear de neurônios da AMePD de fêmeas ovariectomizadas com terapia hormonal substitutiva.....	52
3.5.1. Animais.....	52
3.5.2. Procedimento histológico.....	52
3.5.3. Aquisição de dados.....	53
3.5.4. Análise estatística.....	54
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1. Experimento 1 e 2: Sex differences in NADPH-diaphorase activity in the rat posterodorsal medial amygdala.....	56
4.2. Experimento 3: Influence of substitutive ovarian steroids in the nuclear and cell body volumes of neurons in the posterodorsal medial amygdala of adult ovariectomized female rats.....	66
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	73
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	76
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	78

## RESUMO

Em ratos, a amígdala medial pósterio-dorsal (AMePD) é uma região sexualmente dimórfica e está envolvida com o controle da reprodução. Os hormônios gonadais masculinos e femininos possuem um papel epigenético importante sobre a morfologia e a função neuro-glial na AMePD. Nesse trabalho dois grandes tópicos inéditos e pertinentes na literatura para o entendimento das bases celulares de funcionamento da AMePD foram estudados: (1) a atividade da NADPH-diaforase (NADPH-d) e o número de neurônios NADPH-d-positivos de ratos adultos, fêmeas ao longo do ciclo estral (diestro, proestro, estro e metaestro) ou após ovariectomia (OVX) seguida por terapia substitutiva consistindo em veículo/óleo (controle), somente estradiol (BE), estradiol e progesterona (BE+P) ou somente progesterona (P) e, (2) a modificação do volume somático e nuclear de neurônios da AMePD de ratas OVX adultas submetidas ao mesmo tratamento substitutivo, com o objetivo de revelar possíveis influências dos hormônios gonadais sobre esses parâmetros morfológicos. A histoquímica para a NADPH-d foi utilizada para estudar a densidade regional e neuronal da atividade da NADPH-d, seguida por uma análise semi-quantitativa utilizando-se a densitometria óptica. Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo experimental para obtenção dos resultados. Com base nisso, machos apresentaram maior densidade óptica regional e neuronal quando comparados as fêmeas ao longo do ciclo estral, com exceção da fase de diestro ( $P < 0,01$ ). Nenhuma diferença foi encontrada nesses dois mesmos parâmetros durante o ciclo ovariano ( $P > 0,05$ ). Quanto ao número de neurônios NADPH-d-positivos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre machos e fêmeas, estas ao longo do ciclo estral ( $P > 0,05$ ). Como os hormônios gonadais são capazes de gerar respostas supra-fisiológicas distintas daquelas observadas durante o ciclo ovariano normal na AMePD, foram testados também os efeitos da OVX nesses parâmetros. Não houve diferença estatisticamente significativa na densidade óptica regional, na densidade óptica neuronal e no número de neurônios NADPH-d-positivos quando se comparam fêmeas OVX tratadas com óleo ou com as três diferentes terapias hormonais ( $P = 0,07$ ,  $P = 0,18$  e  $P = 0,95$ , respectivamente). Para medir os volumes somático e nuclear dos neurônios da AMePD, uma semana após a OVX e ao final do tratamento hormonal, os encéfalos foram cortados em secções semi-finas (1 $\mu$ m) e corados com azul de toluidina a 1% para a estimacão estereológica, utilizando-se o método de Cavalieri associado à técnica de contagem de pontos. Tanto o volume somático quanto o neuronal apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados os dados entre as fêmeas OVX tratadas com óleo, BE, BE+P ou somente P ( $P < 0,05$ ). Ou seja, ratas OVX tratadas com BE+P apresentaram maior volume somático e nuclear quando comparadas às fêmeas OVX tratadas com óleo ( $P < 0,01$ ) ou somente com BE ( $P < 0,01$ ). Além disso, fêmeas OVX tratadas somente com P apresentaram maior volume somático e nuclear quando comparadas às fêmeas OVX tratadas com óleo ( $P < 0,05$ ). Esses resultados sugerem que a atividade da NADPH-d é diferente entre os sexos, mas em fêmeas não é afetada pelas mudanças nos níveis de hormônios gonadais em condições fisiológicas ou supra-fisiológicas. Além disso, os volumes somáticos e neuronais podem ser modulados pelos hormônios gonadais administrados em fêmeas OVX, onde a P gerou maiores resultados. Esses achados revelam ações adicionais dos esteróides sexuais na AMePD e novas características na morfologia neuronal em ratos machos e fêmeas adultos, complementando e avançando a literatura atual com resultados que ampliam o número de ações dos hormônios gonadais nesta área telencefálica de ratos.



## ABSTRACT

In rats, the posterodorsal medial amygdala (MePD) is a sexually dimorphic area and it is implicated in the control of reproduction. The male and female gonadal hormones have an important epigenetic role upon neuro-glial morphology and function in the rat MePD. In this work two great unpublished and relevant topics in the literature for the understanding of the cellular bases of functioning of the MePD were discovered: (1) the NADPH-diaphorase (NADPH-d) activity and the number of NADPH-d-positive neurons of adult males, females across the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus, and metaestrus) or following ovariectomy (OVX) and substitutive therapy consisting of vehicle/oil (control), estradiol benzoate alone (EB), estradiol benzoate and progesterone (EB+P), or progesterone alone (P), and, (2) the modification of the somatic and nuclear from MePD neurons of OVXed female rats submitted to the same hormonal therapy, aiming to reveal possible influence of sex steroids in these morphological parameters. The NADPH-d histochemical technique was used to study the regional and neuronal NADPH-d activity, followed by a semi-quantitative analysis using optical densitometry. All animals were submitted to the same experimental protocol. Males showed a higher regional and neuronal optical density when compared to females across the estrous cycle, with the exception of the diestrus phase ( $P < 0.01$ ). No differences were found in these two parameters during the ovarian cycle ( $P > 0.05$ ). As for the number of NADPH-d-positive neurons, there were no statistically significant differences found among males and cycling females ( $P > 0.05$ ). Since the gonadal hormones are able to provide supra-physiologic answers different from those observed during the normal ovarian cycle in the MePD, the effects of the OVX were tested also in these parameters. No statistically significant difference was found in the regional optical density, in the neuronal optical density, or in the number of NADPH-d positive neurons when comparing the data from OVXed females treated with vehicle or the three different hormonal therapies ( $P = 0.07$ ,  $P = 0.18$ , and  $P = 0.95$ , respectively). To measure the somatic and nuclear volumes from MePD neurons, one-week following ovariectomy and at the end of hormonal treatments, brains were cut to semithin sections (1  $\mu\text{m}$ ) and stained with 1% toluidine blue for stereological estimations, carried out using the Cavalieri method and the technique of point counting. Both the somatic and neuronal volume showed a statistically significant difference when comparing the data among OVXed females treated with vehicle (V), EB, EB+P or P. This is, OVX with EB+P treated females had higher mean somatic and nuclear volume when compared to V ( $P < 0.01$ ) or with EB ( $P < 0.01$ ). Also, OVXed females treated with P showed larger mean somatic and nuclear volume when compared to V ( $P < 0.05$ ). Results suggest that NADPH-d activity in the rat MePD is different between sexes but in females is not affected by changing levels of circulating gonadal hormones in physiological or supraphysiological conditions. Moreover, somatic and nuclear volume can be modulated by substitutive ovarian hormones administered to OVXed females, for which P can lead to higher results. These findings reveal additional actions of the sexual steroids in the MePD and new features for the neuronal morphology in adult male and female rats, complementing and advancing the current literature with results that enlarge the number of actions of gonadal hormones in this telencephalic area of rats.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

- Figura 1** Diagrama esquemático da 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). Reproduzido com autorização de Dall'Oglio (2007)..... 5
- Figura 2** Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar os quatro subnúcleos da AMe: AMeAD (em azul), AMeAV (em verde), AMePD (em vermelho) e AMePV (em amarelo). Os asteriscos localizam o trato óptico. Valores em mm referentes à distância posterior ao bregma. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998). Reproduzido com autorização de Hermel (2005)..... 8
- Figura 3** Fotomicrografias de neurônios impregnados pela técnica de Golgi modificada e com morfologia estrelada (A) ou bipenachada (B) do subnúcleo póstero-dorsal da amígdala medial de ratos. S = soma. Barra = 20 µm (de Castilhos, 2005)..... 16
- Figura 4** Desenhos feitos em câmara clara a partir de imagens de microscopia óptica de neurônios impregnados pela técnica de Golgi modificada e com morfologia estrelada ou bipenachada da amígdala medial de ratos. D = dorsal. V = ventral. M = medial. L = lateral. Barras: 20 µm. Conforme obtido por Rigoti (2002) e baseado em Dall'Oglio et al. (2008b)..... 17
- Figura 5** Concentrações plasmáticas de progesterona (P), prolactina (PRL), estradiol (E), hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) obtidas em intervalos de 2 horas nas quatro fases do ciclo estral da rata. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo diário claro-escuro (modificado de Smith et al., 1975)..... 28
- Figura 6** Reação catalizada pela óxido nítrico sintase (Marletta, 1993)..... 31
- Figura 7** Fotomicrografias mostrando a citologia vaginal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral. Diestro, com predominância de leucócitos; proestro, com predominância de células epiteliais nucleadas; estro, com predominância de células queratinizadas; e, metaestro, com presença conjunta desses tipos celulares. Barra: 20 µm (conforme originalmente apresentado em Hermel, 2005)..... 43

**ARTIGO 1**

- Figure 1** Digitized microscopic images of the NADPH-d activity in the posterodorsal medial amygdala of males (A) and females rats across the different phases of estrous cycle (diestrus in B; proestrus morning in C; proestrus afternoon in D; estrus in E; and, metaestrus in F). Arrows indicate some bitufted (black) or stellate (white) NADPH-d positive neurons. Only background was adjusted in these images. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ..... 59
- Figure 2** Digitized microscopic images of the NAPDH-d activity in the posterodorsal medial amygdala of ovariectomized females treated with vehicle (in A), estradiol benzoate alone (EB; in B), estradiol benzoate plus progesterone (EB+P; in C) or progesterone alone (P; in D). Only background was adjusted in these images. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ..... 59
- Figure 3** Values (mean  $\pm$  standard error of the mean) of the regional optical density for NADPH-d activity (A), neuronal optical density (B), and number of NADPH-d positive neurons (C) obtained from the posterodorsal medial amygdala of males and females in the different phases of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus, and metaestrus). “ \*\* ” corresponds to  $P < 0.01$  when compared to males; “ \* ” to  $P < 0.05$  when compared to males.. 60
- Figure 4** Values (mean  $\pm$  standard error of the mean) of the regional optical density for NADPH-d activity (A), neuronal optical density (B), and number of NADPH-d positive neurons (C) obtained from the posterodorsal medial amygdala of ovariectomized adult females rats treated with vehicle (V), estradiol benzoate alone (EB), estradiol benzoate plus progesterone (EB+P) or progesterone alone (P). No statistically significant differences were found among groups in these parameters ..... 60
- Figure 5** (A) Schematic representation and (B) cresyl violet staining of a coronal section showing the ventral aspect of the rat brain and the location of the posterodorsal medial amygdala (MePD). Image was near 3.30 mm posterior to the bregma, according to Paxinos and Watson (1998). opt = optic tract; st = stria terminalis. Coordinates are: D = dorsal, L = lateral; M = medial; and, V = ventral. Scale bar = 800  $\mu\text{m}$ ..... 63

## ARTIGO 2

- Figure 1** (A) Schematic representation of a coronal section of the rat brain showing the ventral location of the posterodorsal medial amygdaloid nucleus (MePD) at 3.30 posterior to the bregma (adapted from Paxinos and Watson, 1998). Insert box represents the area from where data were obtained in the different experimental groups. D= dorsal; L= lateral; M= medial; opt= optic tract; st= stria terminalis; V= ventral. Scale bar = 800  $\mu\text{m}$ . (B) Digitized images of serial semi-thin sections from the female rat MePD showing the cell body and neuronal nucleus (\*) cut at different levels. The number of each micrograph indicates the corresponding section in the series from the top (1) to the bottom (16). Serial reconstruction and estimation of somatic volume was done after determining the border of the neuronal cell body and following the Cavalieri method and the point counting technique. Staining: toluidine blue. Bar: 5  $\mu\text{m}$ ..... 68
- Figure 2** Values are mean  $\pm$  S.E.M. for the neuronal nucleus (A) and the cell body (B) volumes obtained from the posterodorsal medial amygdala of ovariectomized adult female rats treated with vehicle (V), estradiol benzoate alone (EB), estradiol benzoate plus progesterone (EB+P) and progesterone alone (P). "a" corresponds to  $P < 0.001$  when compared to V; "b" to  $P < 0.01$  when compared to EB; and, "c" at least to  $P < 0.05$  when compared to V..... 69

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Aferências intra-amigdalianas e extra-amigdalianas para os diferentes subnúcleos da amígdala medial de ratos, conforme Pitkänen (2000), e adaptado de Hermel (2006).....	11
<b>Tabela 2</b>	Eferências intra-amigdalianas e extra-amigdalianas dos subnúcleos da amígdala ântero-dorsal (AMeAD), pótero-dorsal (AMePD) e póstero-ventral (AMePV) do núcleo medial da amígdala de ratos, segundo Canteras e colaboradores (1995) e adaptado de Hermel (2006).....	12

## ABREVIATURAS

ACe	Amígdala central
AMbl	Amígdala basolateral
AMe	Amígdala medial
AMeAD	Amígdala medial ântero-dorsal
AMeAV	Amígdala medial ântero-ventral
AMePD	Amígdala medial pósterio-dorsal
AMePDi	Porção intermediária da amígdala medial pósterio-dorsal
AMePDI	Porção lateral da amígdala medial pósterio-dorsal
AMePDM	Porção medial da amígdala medial pósterio-dorsal
AMePV	Amígdala medial ântero-ventral
Arc	Núcleo arqueado
AVPV	Núcleo hipotalâmico periventricular ântero-ventral
BAOT	Núcleo próprio do trato olfativo acessório
BNST	Núcleo próprio da estria terminal
cGMP	GMP cíclico
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
DA	Dopamina
DHT	Diidrotestosterona
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HPG	Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LH	Hormônio luteinizante
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil ester
L-NMMA	N-mono-metil-L-arginina
MPOA	Área preóptica medial
NA	Noradrenalina
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleotídio-fosfato em sua forma reduzida
NADPH-d	Nicotinamida-adenina dinucleotídio-fosfato-diaforase

NBT	Azul de tetrazólio
NMDA	N-metil- <i>D</i> -aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
TF	Tampão fosfato
PVN	Núcleo paraventricular
SON	Núcleo supraóptico
SNC	Sistema nervoso central
T	Testosterona
VMH	Núcleo ventromedial do hipotálamo
VMHvl	Porção ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo

# **1. INTRODUÇÃO**



## 1. A Amígdala

A amígdala, ou complexo amigdalóide, constitui-se de núcleos subcorticais que se situam no lobo temporal, lateral ao hipotálamo e ventral ao estriado, no encéfalo de mamíferos. Em primatas, é caracterizada como uma massa ovóide de substância cinzenta, localizada na porção terminal e rostral da formação hipocampal, tendo como limite anterior o corno temporal do ventrículo lateral (ALHEID, 1995; de OLMOS, 2004). Em ratos, é constituída por núcleos e subnúcleos que formam uma complexa rede estrutural inter-relacionada e multifuncional, uma vez que está envolvida na modulação de diversos comportamentos e ajustes homeostáticos ou alostáticos (ALHEID, 1995; AGGLETON, 2000; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 2000; RASIA-FILHO *et al.*, 2004).

Uma das primeiras classificações da amígdala, baseada em estudos do prosencéfalo de diferentes classes de vertebrados, foi dada por Johnston em 1923, que a subdividiu em dois grupos: um grupo de núcleos filogeneticamente mais antigo, associado com o sistema olfativo (núcleos medial, central e cortical) e um grupo filogeneticamente mais recente (núcleos basal e lateral). Além desses núcleos, existiria um terceiro grupo, denominado de amígdala anterior, do qual fazem parte os núcleos laterais do trato olfativo, áreas de transição e núcleos não classificados.

Já em 1978, Krettek e Price dividiram a amígdala em núcleos profundos (núcleos lateral, basolateral, basomedial e central), em estruturas corticais conectadas com a amígdala (área amígdalo-hipocampal, núcleos corticais anterior e posterior, córtex periamigdalóide e núcleo do trato olfativo lateral) e em outros grupamentos celulares conectados com a amígdala [núcleo próprio do trato olfativo acessório (BAOT), grupos neuronais intercalados e parte intra-amigdalóide do núcleo próprio da estria terminal (BNST)].

Recentemente, Swanson e Petrovich (1998) elaboraram o conceito de que a amígdala é composta por grupos heterogêneos de núcleos e subnúcleos que parecem ser partes diferenciadas do córtex cerebral, do claustró e do estriado, e pertencendo a quatro sistemas funcionais diferentes: o simpático/parassimpático (núcleo central), o cortical frontotemporal (núcleos basolateral anterior e lateral), o olfativo acessório [amígdala medial (AMe)] e o olfativo principal (demais núcleos da amígdala).

O modelo corrente de estudo da organização da amígdala sugere que ela não é nem uma unidade funcional nem estrutural, mas sim é definida como um conjunto heterogêneo de grupos celulares nos hemisférios cerebrais (SWANSON; PETROVICH, 1998; DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001; DALL'OGGIO *et al.*, 2008b). 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 pela AMe e a amígdala central (ACe). A AMe, por sua vez, poderia ser composta por dois circuitos funcionalmente diferentes, associados com as divisões anterior e posterior do núcleo medial, e que se diferenciaria também por distintas presenças de neurotransmissores (NEWMAN, 1999; SIMMONS; YAHR, 2003; COOKE; WOOLLEY, 2005); 2) amígdala com características corticais, subdividida em porção basolateral e em porções que se ligam às vias olfativas e vomeronasal; 3) área de transição, localizada entre a porção ventral dos núcleos da base e a amígdala “expandida”; e 4) núcleos ainda não classificados, constituídos por um grande grupo de células dispersas na substância branca e no interior do BNST (ALHEID, 1995; de OLMOS, 2004; Figura 1).

Os núcleos amigdalianos têm papel relevante nas atividades comportamentais, simpática/parassimpática e endócrinas, fundamentais para a relação do animal com o seu ambiente (LeDOUX, 1992; DAVIS, 2000; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; de CASTILHOS *et al.*,

2006; 2008; QUAGLIOTTO *et al.*, 2008). Ela participa na percepção, na modulação e na integração das respostas associadas a estímulos de medo ou ansiedade, atenção, aprendizado, memória emocional, além de vários comportamentos sociais, tais como o reprodutivo, o defensivo e o maternal (LeDOUX, 1992; SWANSON; PETROVICH, 1998; DAVIS, 2000; DIELENBERG; HUNT; McGREGOR, 2001; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001; SHEEHAN *et al.*, 2001; de OLMOS, 2004; RASIA-FILHO; GIOVENARDI; DE ALMEIDA, 2008). Para participar dessas atividades, os núcleos amigdalianos possuem 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 sistema nervoso central (SNC) em resposta ao estímulo inicial (LeDOUX, 1992; QUIRK; REPA; LeDOUX, 1995; RASIA-FILHO, 1999; DAVIS, 2000). Assim, a amígdala apresenta a capacidade de adequar a relação do animal com seu ambiente modulando o comportamento social. Para avançar este conhecimento, é preciso que sejam detalhados os papéis dos subnúcleos que a compõe. Maior atenção será dada à AMe, principalmente à amígdala medial pósterodorsal (AMePD), tema desta tese e objetivo dos experimentos descritos a seguir. Para tanto, serão revisados os temas pertinentes à AMe e que historicamente envolviam todos os subnúcleos em conjunto nas descrições para, quando possível, focar nos dados relevantes da AMePD.

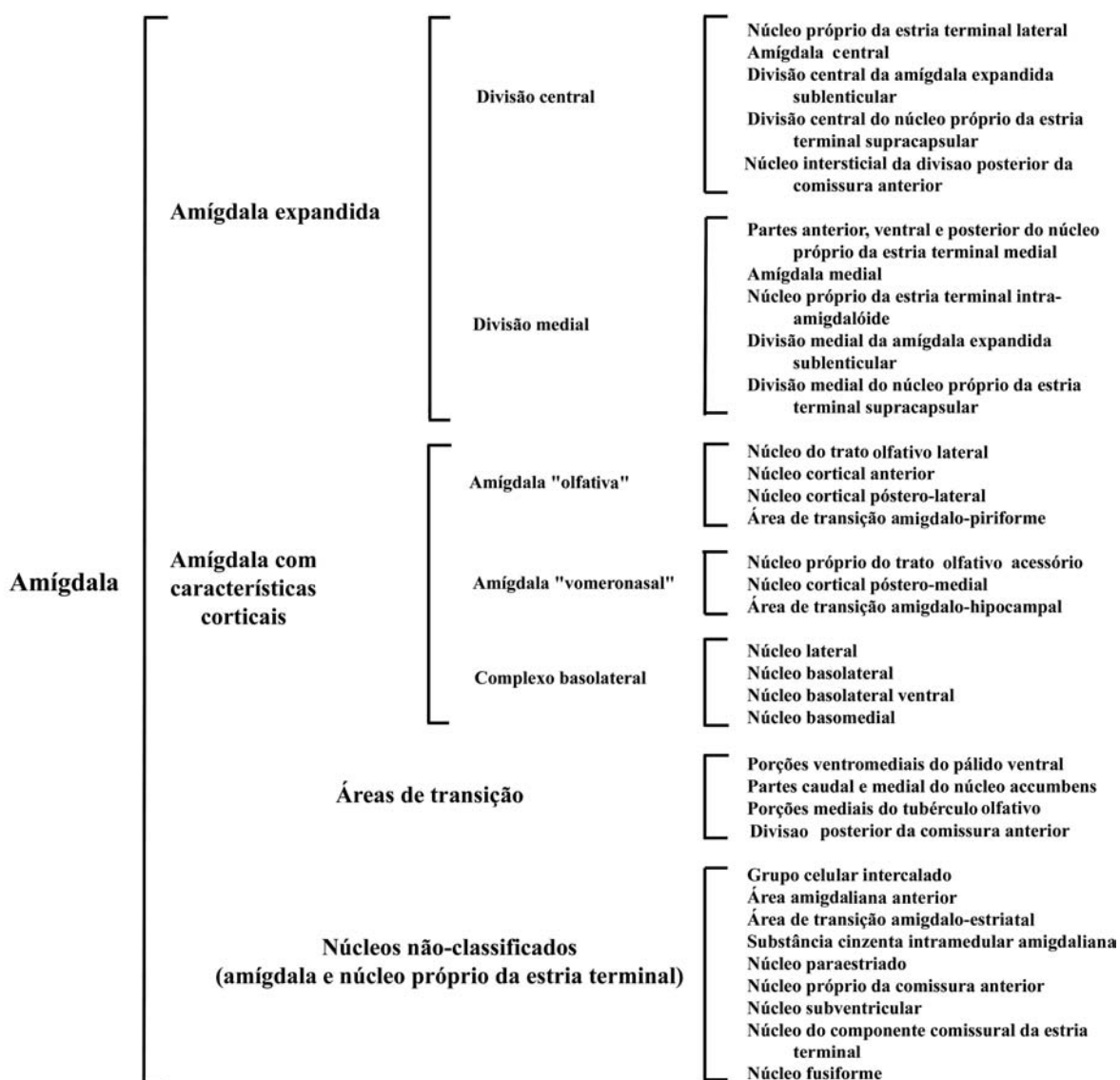


Figura 1. Diagrama esquemático da amígdala do rato com suas subdivisões anatômicas e seus componentes principais, conforme descrito por Alheid e colaboradores (1995) e modificado por Rasia-Filho e colaboradores (2000). Reproduzido com autorização de Dall'Oglio (2007).

## 1.2. Amígdala Medial

### 1.2.1. Localização e divisão

A AMe possui diferentes origens histogenéticas (GARCIA-LOPEZ *et al.*, 2008) como parte da amígdala expandida (de OLMOS, 2004). A AMe integra vias sexualmente dimórficas, incluindo o sistema olfativo/vomeronasal, inerva porções específicas do BNST e se conecta a diferentes núcleos hipotalâmicos com a função de modular comportamentos sociais em circuitos com processamento hierárquico e em paralelo (NEWMAN, 1999; DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001; SIMERLY, 2004; CHOI *et al.*, 2005).

A AMe é um dos núcleos superficiais do complexo amigdalóide que ocupa seu aspecto rostromedial. É formada por uma coluna proeminente de células que surgem em justaposição à superfície lateral de fibras que ascendem pelo trato óptico (ALHEID, 1995). Inicia medialmente e caudalmente ao núcleo do trato olfativo lateral, estendendo-se caudalmente até o corno temporal do ventrículo lateral. Neste nível, ela situa-se dorsomedialmente ao polo cefálico da área de transição amígdalo-hipocampal, formando a região medial da parede anterior desta porção do ventrículo. Ao longo de toda sua extensão, a AMe encontra-se em aposição com a região ventrolateral do trato óptico, separada por uma região com células esparsas entremeadas no feixe de axônios provenientes do BAOT (SCALIA; WINANS, 1975; NISHIZUKA; ARAI, 1983a; de OLMOS, 2004). Embora a AMe possa ser bem definida em sua região mais caudal, seu limite rostral com a amígdala anterior e lateral com as camadas profundas do núcleo cortical anterior não está claramente definido (ALHEID; HEIMER, 1988; ALHEID, 1995; PITKANEN, 2000). Há ainda uma zona pobre em células que separa a AMe da porção medial da ACe no sentido dorso-lateral, a qual é substituída mais ventralmente e caudalmente pelo BNST (ALHEID, 1995). Caudalmente, o grupo de núcleos intercalados da amígdala separa a AMe da amígdala basolateral

(AMbl), e, também caudalmente, mas em posição dorsal, grupos de fibras nervosas que ascendem pela estria terminal são interpostos entre a AMe e outros núcleos amigdalianos (BRODAL, 1947; ALHEID, 1995; PAXINOS; WATSON, 1998; de OLMOS, 2004).

Adicionalmente, e baseado em critérios citoarquitetônicos, hodológicos e funcionais, a AMe tem sido dividida em quatro subnúcleos: amígdala medial ântero-dorsal (AMeAD), amígdala medial ântero-ventral (AMeAV), amígdala medial pósterodorsal (AMePD) e amígdala medial pósteroventral (AMePV; CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; de OLMOS, 2004; DALL'OGGIO *et al.*, 2008a; b; 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; SIMERLY; SWANSON, 1995). Recentemente, Dall'Oglio e colaboradores (2008a) descreveram que a divisão “ventral” da AMe, incluindo-se os subnúcleos AMeAD e AMePV não encontra plena sustentação morfológica, hodológica ou nas respostas a hormônios gonadais.

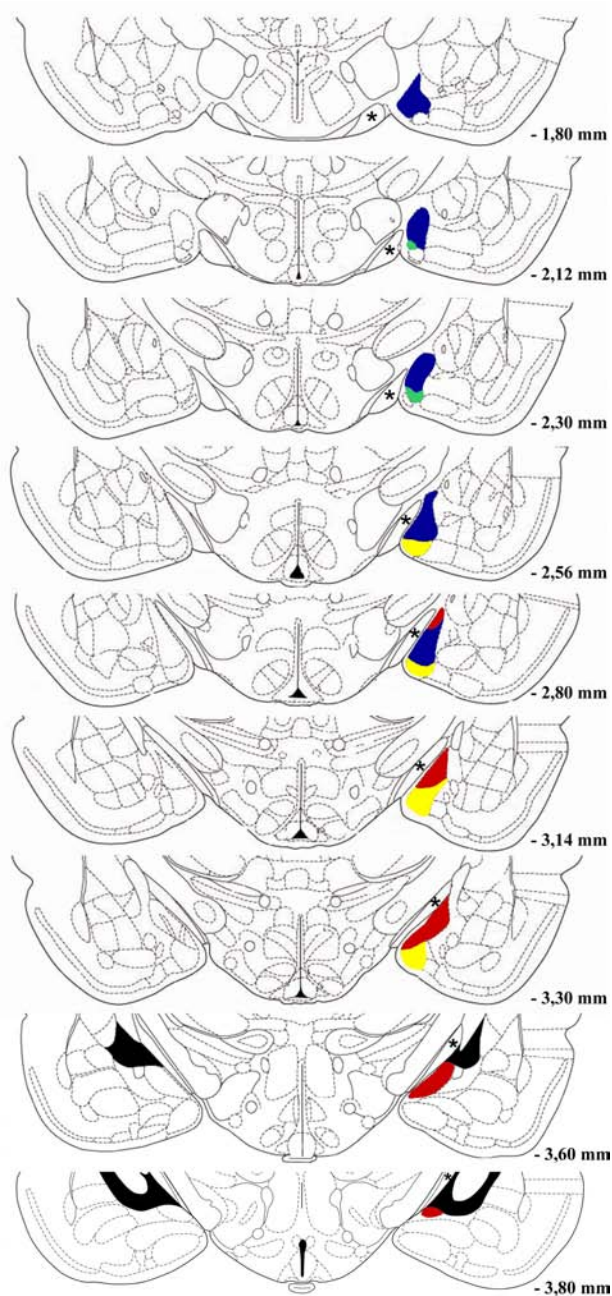


Figura 2. Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde se pode observar os quatro subnúcleos da AMe: AMeAD (em azul), AMeAV (em verde), AMePD (em vermelho) e AMePV (em amarelo). Os asteriscos localizam o trato óptico. Valores em mm referentes à distância posterior ao bregma. Figuras e abreviaturas baseadas no atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998). Reproduzido com autorização de (Hermel, 2005)

### 1.2.2. Conexões da amígdala medial

A AMe como um todo recebe projeções intra-amigdaloides, como do núcleo cortical posterior, acessório basal e lateral, bem como da área amigdaló-hipocampal. Além disso, recebe projeções de outras porções encefálicas como o córtex parietal, córtex frontal (principalmente infralímbico), formação hipocampal (parte distal e proximal do subiculum temporal), do sistema olfativo, tálamo, hipotálamo (núcleos pré-mamilar ventral, ventromedial, área pré-óptica medial e lateral, etc) e BNST (McDONALD, 1998).

As eferências (Tabelas 1 e 2), muitas delas recíprocas, são direcionadas para várias regiões dentro da própria amígdala, como é o caso do núcleo central e cortical e póstero-medial, e com regiões fora da amígdala tais como o bulbo olfativo, órgão vomeronasal, formação parahipocampal, estriado e globo pálido ventral, substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo, núcleos da rafe mesencefálicos, BNST e diversos núcleos do hipotálamo envolvidos com a modulação do sistema endócrino e do comportamento reprodutivo (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; PITKANEN, 2000; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001; CHOI *et al.*, 2005).

Especificamente, a AMePD possui várias aferências que advêm de diferentes regiões do encéfalo. Notavelmente, dentre as aferências mais importantes, estão as hipotalâmicas [provenientes da área hipotalâmica anterior, área pré-óptica medial (MPOA) e lateral e núcleo arqueado (Arc), núcleos dorsomedial, hipotalâmico posterior, lateral, pré-mamilar, supraóptico, tuberal e ventromedial], as do córtex cerebral (da área pré-límbica, córtex entorrinal, infralímbico e perirrinal dorsal), as aferências talâmicas (do núcleo medial, parafascilular, paraventricular e posterior, dentre outros), as do tronco encefálico (principalmente do núcleo dorsal da rafe e núcleo parabraquial), do sistema olfativo (do córtex piriforme, bulbo olfativo acessório e núcleo



endopiriforme) e de outras regiões distintas, como, por exemplo, do núcleo da faixa diagonal de Broca, do BNST e da substância *inominata*. Além destas, existem também as aferências intra-amigdaloides, onde, dentre outras, destacam-se as da área amígdalo-hipocampal, núcleo basal, basal acessório, cortical anterior, posterior, lateral e medial. As aferências inter-amigdaloides são exemplificadas pelas provenientes do córtex periamigdalóide, núcleo basal acessório, cortical posterior e núcleo do trato olfativo lateral (McDONALD, 1998). Em relação às eferências da AMePD, dentre as mais significativas e estudadas, estão as hipotalâmicas [para o núcleo hipotalâmico periventricular ântero-ventral (AVPV), MPOA e núcleo pré-mamilar ventral, dentre outros], as corticais (principalmente para a área entorrinal lateral, área de transição pós-piriforme, área CA1 hipocampal e subículo), as do tronco encefálico (para a área tegmental dorsal e substância cinzenta periaqueductal), e de outras regiões, como, por exemplo, para o BNST (parte ântero-dorsal e posterior principal) e para a substância *inominata*, principalmente (DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001; CHOI *et al.*, 2005). Ademais, existem também as eferências intra-amigdaloides onde, dentre elas, destacam-se aquelas para o núcleo central, cortical póstero-lateral e póstero-medial (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995).

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

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

Tabela 2. Eferências intra-amigdalianas e extra-amigdalianas dos subnúcleos da amígdala ântero-dorsal (AMeAD), pótero-dorsal (AMePD) e pótero-ventral (AMePV) do núcleo medial da amígdala de ratos, segundo Canteras e colaboradores (1995) e adaptado de Hermel (2005).

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

Tabela 2. (Continuação)

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

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

### 1.2.3. Citoarquitetura da amígdala medial

De uma forma geral, quase a totalidade da AMe é constituída por neurônios multipolares de tamanho pequeno (corpos celulares com 8-10  $\mu\text{m}$  de diâmetro) ou médio (corpos celulares com 10-15  $\mu\text{m}$  de diâmetro; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999). Os neurônios de maior tamanho são mais abundantes na região rostro-dorsal deste núcleo, principalmente na AMePD e na AMePV, embora ainda morfologicamente semelhantes (de OLMOS, 2004). De acordo com o número de processos dendríticos originados do soma neuronal, esses neurônios multipolares podem ser classificados como do tipo bipeinado (com dois ramos dendríticos primários) e do tipo estrelado (com três ou mais ramos dendríticos), e foram descritos como característicos da AMeAD, AMePD e AMePV (RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; de CASTILHOS *et al.*, 2006; 2008 MARCUZZO *et al.*, 2007; DALL'OGGIO *et al.*, 2008a; b; Figuras 3 e 4).

A AMePD, particularmente no sentido dorso-ventral, apresenta células que se distribuem em três colunas orientadas paralelamente em relação a sua superfície medial. A primeira coluna é a coluna superficial ou coluna medial (AMePDM), sendo formada por células agrupadas e de tamanho médio, a segunda coluna está arranjada de modo a constituir uma coluna intermediária de células também de tamanho médio (AMePDi; ALHEID, 1995). A terceira coluna é a mais “profunda” e é a coluna mais lateral (AMePDI), também formada por células de tamanho médio densamente agrupadas, mas menores com relação à primeira coluna (ALHEID, 1995; de OLMOS, 2004). Como anteriormente descrito, a AMe é envolta, medialmente e ventralmente, por uma camada distinta de células mais dispersas, denominada originalmente de “camada molecular” (NISHIZUKA; ARAI, 1983a), mas que constitui a eferência da via olfativa acessória (SCALIA; WINANS, 1975).

Como descrição geral, os corpos celulares dos neurônios da AMePD podem ser ovais, arredondados, fusiformes, triangulares, piriformes ou com formatos irregulares (RIGOTI, 2002; RASIA-FILHO *et al.*, 2004). Os ramos dendríticos podem ser longos (GOMEZ; NEWMAN, 1991; McDONALD, 1992) ou de comprimento variável (RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999), grossos, geralmente retilíneos e pouco numerosos. Pela análise ultraestrutural, nos neurônios da AMePD, as sinapses axo-dendríticas no tronco dos dendritos são as mais frequentemente observadas e, pelo aspecto morfológico, parecem ser, na sua grande maioria, sinapses excitatórias (HERMEL *et al.*, 2006a). Os espinhos dendríticos, quando presentes, apresentam formas variadas e encontram-se de forma aparentemente homogênea ao longo de cada dendrito, porém também podem ser encontrados em alguns somas celulares ou em cones axonais (McDONALD, 1992; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999; RIGOTI, 2002; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; HERMEL *et al.*, 2006a).

Os axônios dos subnúcleos da região posterior da AMe (AMePD e AMePV) dirigem-se preferentemente em sentido medial ao núcleo basal ou à porção principal do BNST, enquanto os da AMeAD formam parte da *ansa peduncularis*, também chamada de via amígdalo-fugal ventral (KAMAL; TOMBOL, 1975; DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001; COOKE; WOOLLEY, 2005).

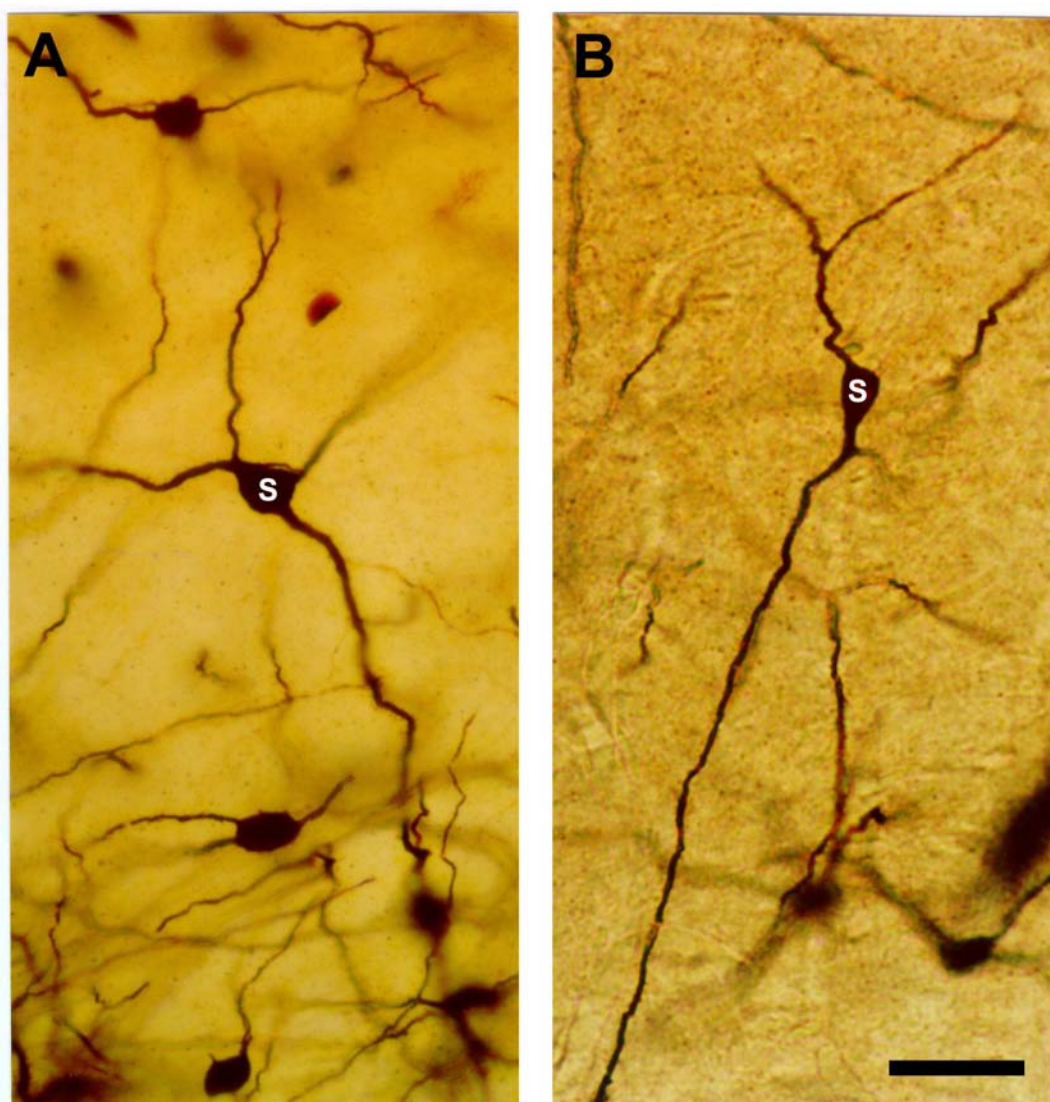


Figura 3. Fotomicrografias de neurônios impregnados pela técnica de Golgi modificada e com morfologia estrelada (A) ou bipenachada (B) do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial de ratos. S = soma. Barra = 20  $\mu$ m (de Castilhos, 2005).

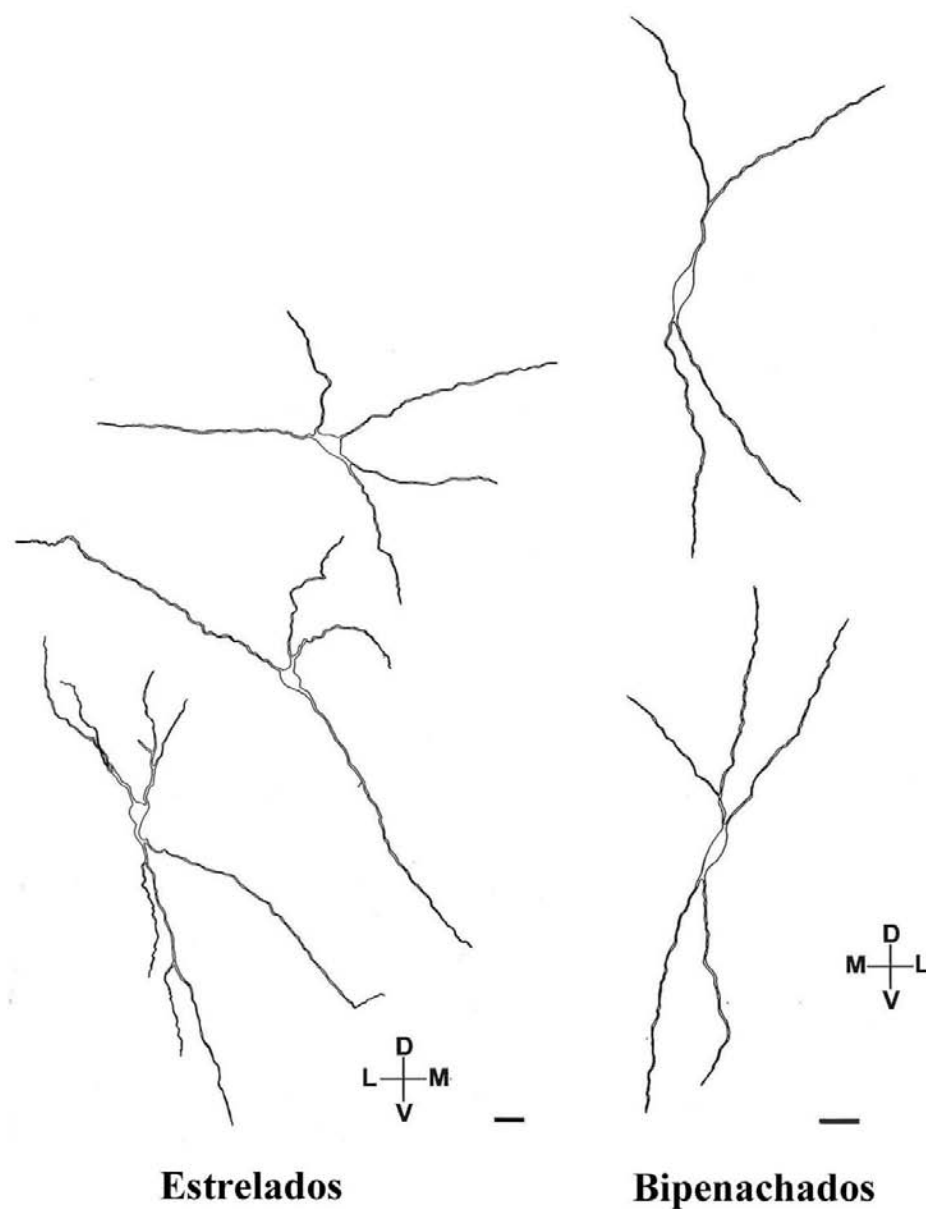


Figura 4. Desenhos feitos em câmara clara a partir de imagens de microscopia óptica de neurônios impregnados pela técnica de Golgi modificada e com morfologia estrelada ou bipenachada da amígdala medial de ratos. D = dorsal. V = ventral. M = medial. L = lateral. Barras: 20  $\mu$ m. Conforme obtido por Rigoti (2002) e baseado em Dall'Oglio et al. (2008b).



#### 1.2.4. Funções da amígdala medial

A AMe tem sido descrita como uma região envolvida na modulação de atividades endócrinas e comportamentais do animal com o seu ambiente, tais como a percepção, a modulação e a integração das informações olfativas, vomeronasais e genitosensoriais (GUILLAMON; SEGOVIA, 1997; PFAUS; HEEB, 1997; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; MEREDITH; WESTBERRY, 2004; PRO-SISTIAGA *et al.*, 2007), relacionado com estímulos em que a ansiedade e o medo inato e condicionado estejam envolvidos (ADAMEC; MORGAN, 1994; DUNCAN; KNAPP; BREESE, 1996; DAVIS, 2000), no processamento de respostas emocionais, adrenocorticais e neuroendócrinas a um evento estressor (DAYAS; BULLER; DAY, 1999; MARCUZZO *et al.*, 2007), e em uma série de comportamentos sociais, tais como o agressivo, o defensivo e o de aprendizado social (NEWMAN, 1999; SAVONENKO *et al.*, 1999; RASIA-FILHO; GIOVENARDI; DE ALMEIDA, 2008), o comportamento sexual, tanto em machos quanto em fêmeas, e o comportamento maternal (FLEMING; VACCARINO; LUEBKE, 1980; RASIA-FILHO *et al.*, 1991; COOLEN; PETERS; VEENING, 1997; NEWMAN, 1999; SHEEHAN *et al.*, 2001; de CASTILHOS *et al.*, 2006), além de ajustes cardiovasculares possivelmente envolvidos com alguns comportamentos (QUAGLIOTTO *et al.*, 2008).

Os subnúcleos da AMe têm diferentes funções (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995). Por exemplo, a AMePD parece influenciar as atividades neuroendócrinas e o controle dos sistemas simpático e parassimpático que o hipotálamo regula, enquanto as regiões AMeAD, AMeAV e AMePV podem estar relacionados com a modulação hipotalâmica dos comportamentos reprodutivo e defensivo (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; SIMERLY, 2004). Especificamente, a AMePD modula alguns comportamentos, como o maternal

e o sexual (NEWMAN, 1999; SHEEHAN *et al.*, 2001; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2005; de CASTILHOS *et al.*, 2006; 2008).

Acredita-se que o controle do comportamento reprodutivo em ratos e hamsters, machos e fêmeas, ocorra a partir de estímulos olfativos (KLING, 1922; KONDO; ARAI, 1995). Em ratos, aferências quimiossensoriais do bulbo olfativo, do órgão vomeronasal (TAKAHASHI; GLADSTONE, 1988; DOMINGUEZ; HULL, 2001) e de vários núcleos do hipotálamo (McDONALD *et al.*, 1999) projetam-se para a AMe. O primeiro subnúcleo a processar a informação olfativa/vomeronasal é a AMeAD que, via núcleos intercalados da amígdala, transfere a informação à AMePD depois de analisado sua relevância social para o animal em seu ambiente (MEREDITH; WESTBERRY, 2004). A seguir, seguem as informações olfativas processadas para áreas motoras e neuroendócrinas do telencéfalo basal, para a MPOA e outros núcleos hipotalâmicos e, também, para o tronco encefálico (LEHMAN; WINANS, 1982; CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; KONDO; ARAI, 1995; WOOD, 1997; DOMINGUEZ; HULL, 2001; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001). Os subnúcleos da AMe parecem estar em posição estratégica para modular comportamentos quer requeiram ativação quimissensorial para sua ocorrência, como é o caso da atividade sexual (TAKAHASHI; GLADSTONE, 1988; DOMINGUEZ; HULL, 2001). De fato, ratas submetidas à lesão na AMePD, quando colocadas junto a ratos, mostraram redução da ocorrência de atividade pré-copulatória (exploração olfativa) e aumento na duração da cópula. Após a cópula, elas buscavam menos frequentemente seus companheiros de acasalamento quando comparadas às ratas submetidas à lesão fictícia. Tais fêmeas foram colocadas também junto a outras lesadas e apresentaram diminuição do comportamento ofensivo dentro de seu grupo e direcionado aos animais controle (LEHMAN; WINANS, 1982). Já hamsters machos que sofreram lesão na AMe perderam o comportamento de acasalamento e diminuíram sua investigação olfativa direcionada aos genitais das fêmeas (LEHMAN; WINANS, 1982; TAKAHASHI; GLADSTONE, 1988).

Lesão ampla nesta área em ratos produziu diminuição na frequência de ejaculações, aumento do número de intromissões penianas e aumento do intervalo entre as intromissões quando comparados a animais não lesionados (KONDO, 1992; MEISEL, 1994). Sugeriu-se, assim, que lesões na AMe causam alterações significativas nos modelos de respostas sociais e sexuais em roedores, o que reforça a sugestão de que a AMe poderia ser um componente neural do sistema de regulação do comportamento copulatório em ratos (VOCHTELOO; KOOLHAAS, 1987; TAKAHASHI; GLADSTONE, 1988).

É muito importante também ressaltar que um dos principais papéis funcionais das projeções da AMePD para o AVPV é a regulação da liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), imprescindível para o ciclo reprodutivo (SIMERLY, 1998). Em 1999, Newman e colaboradores sugeriram que as conexões neuronais e sua sensibilidade aos hormônios sexuais são dinamicamente moduladas no decorrer da vida e que essas células regulam os comportamentos sexuais femininos. Neste sentido, os subnúcleos da AMe podem estar envolvidos na organização das fases do ciclo estral, juntamente com o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), AVPV, MPOA e Arc. Sendo assim, as conexões da AMePD com os núcleos hipotalâmicos podem regular a liberação do GnRH (KALRA; McCANN, 1975; SIMERLY, 1998; ETGEN *et al.*, 1999) e/ou diminuir a ocorrência de comportamento defensivo e modular a receptividade sexual feminina. Reforça-se com isso as evidências de que as AMePDs de machos e fêmeas deveriam ser sensíveis a esteroides sexuais e modular integradamente dentro de circuitos neurais a ocorrência de comportamentos típicos masculino e feminino.

### **1.3. Hormônios gonadais e dimorfismo sexual**

Hormônios são tradicionalmente definidos como compostos liberados na corrente sanguínea principalmente pelas glândulas endócrinas e que agem em sítios-alvo específicos

localizados a variadas distâncias da glândula secretora (KAWATA, 1995; GREENSPAN, 2004; PFAFF, 2004; BALTHAZART; BALL, 2006). O colesterol é o precursor das cinco principais classes de hormônios esteróides: progestinas, estrogênios, androgênios, mineralocorticoides e vitamina D (KAWATA, 1995; GREENSPAN, 2004). Os três primeiros têm sua maior produção nas gônadas.

A exposição do sistema nervoso a hormônios influencia permanentemente uma variedade de características como o tamanho e o número de neurônios, ramos dendríticos e conexões sinápticas em diferentes áreas, não somente no desenvolvimento, mas também em adultos (GOMEZ; NEWMAN, 1991; ERSKINE; MILLER, 1995; WOOLLEY *et al.*, 1997; MADEIRA *et al.*, 2001). Por exemplo, o estradiol induz novas sinapses e espinhos dendríticos nas células piramidais de CA1 do hipocampo (WOOLLEY *et al.*, 1997). O mesmo ocorre na porção ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo (VMHvl), onde a ação do estradiol também é capaz de causar hipertrofia somática (ERSKINE; MILLER, 1995). No VMHvl, durante o proestro, quando o nível de estrogênio em circulação sanguínea está em seu valor mais alto, a arborização dendrítica apresenta-se alongada e com maior densidade de espinhos dendríticos (MADEIRA *et al.*, 2001). Além disso, quando o estrogênio é administrado em ratas ovariectomizadas, causa um aumento das sinapses axodendríticas na VMHvl (NISHIZUKA; PFAFF, 1989).

Além dos efeitos mediados pelos esteroides sexuais, o dimorfismo sexual é um fenômeno comum onde fêmea e macho da mesma espécie diferem entre si, incluindo a secreção cíclica das gonadotrofinas e o comportamento sexual, o de agressividade, o emocional e o cognitivo, por exemplo (STEFANOVA; OVTCHAROFF, 2000). O comportamento sexual depende de uma variedade de relações individuais e sociais entre os dois sexos. O funcionamento do sistema hormonal gonadal tônico dos machos contrasta com o caráter cíclico das fêmeas e muitas diferenças se estabelecem entre os gêneros, refletidas tanto estruturalmente como no aspecto comportamental (NAFTOLIN, 1981; BECKER, 2002; PFAFF, 2004). Alguns mecanismos

celulares que geram tais diferenças estão relacionados com a sensibilidade dada pelos tipos de receptores a estes hormônios, o número de células responsivas em uma determinada área nervosa e a conectividade sináptica entre estruturas com a mesma possibilidade de modulação de função exercida pelos esteroides sexuais (KELLEY, 1988).

Classicamente, acreditava-se que tais mudanças poderiam ocorrer durante um período crítico denominado “organizacional”, que se estende aproximadamente de 4-5 dias antes do nascimento até 5-10 dias pós-natais, e é quando ocorrem mudanças permanentes em estruturas sensíveis do SNC, ou, atuando sobre animais púberes ou adultos, desempenhando papéis “ativacionais”, controlando a função reprodutiva adulta (MURDOCH; GORSKI, 1991; TORAN-ALERAND, 1995). A ação transformadora dos hormônios soma-se às do genoma e do ambiente, para determinar o desenvolvimento de estruturas nervosas sexualmente dimórficas, que, por sua vez, modulam a fisiologia do comportamento reprodutivo típico de machos e fêmeas (KELLY, 1991). Além disso, os hormônios são componentes críticos da interação neurônio-glia, provocando ações neuromodulatórias e neurotróficas em situações fisiológicas ou patológicas (GARCIA-SEGURA; McCARTHY, 2004). Células neuronais e gliais possuem receptores para hormônios gonadais, os quais podem provocar efeitos genômicos e não-genômicos sobre o SNC (McEWEN, 1990; McEWEN *et al.*, 1991; TORAN-ALERAND, 1995; GARCIA-SEGURA, 1999). Com isso, os hormônios gonadais atuam no sistema nervoso promovendo mudanças que persistem durante toda a vida do animal, como no caso das áreas ditas sexualmente dimórficas, que se diferenciam entre os sexos quanto à sua estrutura/morfologia e função (HINES; ALLEN; GORSKI, 1992; PILGRIM; REISERT, 1992; RASIA-FILHO *et al.*, 2004; HERMEL *et al.*, 2006b; MARTINEZ, 2007; ROCHA *et al.*, 2007). Além disso, esteroides sexuais modulam o comportamento reprodutivo em uma grande variedade de espécies animais (PFAFF, 2004). O comportamento reprodutivo, incluindo o sexual propriamente dito, o comportamento maternal, o defensivo, de defesa territorial e de exploração do ambiente dependem da plasticidade das células

neuronal e gliais provocadas pelos hormônios sexuais (McEWEN, 1990; WOOD, 1995; GARCIA-SEGURA, 1999).

Diferentes áreas do SNC são alvo da ação dos hormônios gonadais, os quais promovem alterações na expressão gênica e na síntese proteica (MURDOCH; GORSKI, 1991; TORAN-ALERAND, 1995). A AMePD é uma dessas áreas, como descrito adiante. Esses processos ocorrem por meio da ligação dos hormônios aos seus receptores, preferencialmente no núcleo da célula (mas também no citoplasma ou, alternativamente, diretamente na membrana celular para gerar respostas mais rápidas), quando então se estabelece contato com o sítio de reconhecimento, o que provoca aumento na duplicação do DNA e, subsequentemente, o aumento da síntese da proteína correspondente modulada por esses esteroides (TORAN-ALERAND, 1995; McEWEN; ALVES, 1999; CORNIL; BALL; BALTHAZART, 2006). Essas proteínas incluem enzimas de síntese (como a tirosina hidroxilase), transportadores, receptores, proteínas de transdução de sinal (fosfatases, cinases, proteínas acessórias, etc) ou enzimas de degradação (como monoamina oxidase), os quais modificam a neurotransmissão (McEWEN; ALVES, 1999).

Os esteroides sexuais não se restringem a ações genômicas. Eles podem agir alterando o potencial de membrana neuronal e o metabolismo dos neurotransmissores, influenciando as transmissões sinápticas (MARTINEZ, 2007). Ações gênicas e não-gênicas diferem em tempo de ação: efeitos resultantes em segundos são considerados não-gênicos, enquanto efeitos que demandam vários minutos ou até mesmo dias são considerados gênicos (McEWEN *et al.*, 1991; CORNIL; BALL; BALTHAZART, 2006). Pelas rápidas mudanças no ambiente neural causadas pelos hormônios gonadais, como o estradiol, não envolvendo mecanismos genômicos, eles poderiam ser inclusive caracterizados como neuromoduladores ou mesmo neurotransmissores (BALTHAZART; BALL, 2006; CORNIL; BALL; BALTHAZART, 2006). Considera-se ainda que o estrogênio possa ser sintetizado no encéfalo por meio da enzima aromatase, sendo uma fonte local de altas concentrações desse esteroide (CORNIL; BALL; BALTHAZART, 2006). As

alterações neuroquímicas provocadas por hormônios têm repercussão na modulação dos comportamentos e das atividades neuroendócrinas em diversos modelos experimentais (McEWEN, 1990; WOOD, 1995).

No que importa a AMe, a distribuição de receptores para hormônios sexuais entre seus subnúcleos não é homogênea. Neurônios com receptores para andrógenos estão presentes em todos os seus subnúcleos, porém sua concentração maior é observada da parte média à posterior da AMe, mormente na AMePD (SHERIDAN, 1979; SIMERLY *et al.*, 1990). Neurônios com receptores dos tipos  $\alpha$  e  $\beta$  para estrógenos são encontrados preferentemente na AMePD (SIMERLY *et al.*, 1990; LI; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997; OSTERLUND *et al.*, 1998), mas também há descrições da presença desses receptores tanto na AMeAD como na AMePV (LI; SCHWARTZ; RISSMAN, 1997; SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997; OSTERLUND *et al.*, 1998). É notável que a quantidade de receptores para estrógenos na AMePD chega a ser similar ao que é encontrado em diversos núcleos do hipotálamo (SIMERLY *et al.*, 1990). Receptores para progesterona também já foram relatados na AMe (SAR; STUMPF, 1973; McEWEN, 1983; KATO, 1985; ROMANO; KRUST; PFAFF, 1999; HAGIHARA *et al.*, 1992; de VRIES, 2002). Em ratos, cerca de 80 a 90% dos neurônios na AMePD que possuem receptores para estrógenos também possuem para andrógenos (GRECO *et al.*, 1998).

Os subnúcleos da AMe são sexualmente dimórficos e podem se modificar de acordo com as variações fisiológicas ou experimentais dos níveis de hormônios gonadais (MIZUKAMI; NISHIZUKA; ARAI, 1983; NISHIZUKA; ARAI, 1983c; RASIA-FILHO *et al.*, 1991; 2004; de CASTILHOS *et al.*, 2008; MORRIS; JORDAN; BREEDLOVE, 2008). Os esteroides sexuais podem, então, alterar a morfologia e a função de neurônios e das células da glia na AMePD (RASIA-FILHO *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2005; HERMEL *et al.*, 2006b; MARTINEZ *et al.*, 2006; CUNNINGHAM; CLAIBORNE; McGINNIS, 2007; MORRIS; JORDAN; BREEDLOVE, 2008). De fato, diferenças entre machos e fêmeas na AMePD incluem, por exemplo: o número de

neurônios e de células gliais (JOHNSON; BREEDLOVE; JORDAN, 2008; MORRIS; JORDAN; BREEDLOVE, 2008), o volume somático neuronal (HERMEL *et al.*, 2006b), a arborização dendrítica e a conectividade sináptica (NISHIZUKA; ARAI, 1983b; c; ZEHR *et al.*, 2006; COOKE; STOKAS; WOOLLEY, 2007; DALL'OGGIO *et al.*, 2008b), a quantidade de neuropeptídeos (MICEVYCH; MATT; GO, 1988; ORO; SIMERLY; SWANSON, 1988; WANG; de VRIES, 1995; de VRIES, 2002) e a presença de receptores para opioides endógenos (WILSON; MASCAGNI; McDONALD, 2002).

Dentre esses dados, variações morfológicas mediadas por hormônios gonadais foram encontradas no volume somático neuronal na AMePD de ratos, sendo maior em machos do que em fêmeas em proestro e estro, mas não entre machos e fêmeas em diestro (HERMEL *et al.*, 2006b). Não era conhecido até o momento o que ocorria com o volume somático em neurônios da AMePD em fêmeas após a ovariectomia e o emprego de terapia substitutiva. A presente tese apresenta uma contribuição neste sentido, alicerçada nesses presentes conhecimentos e desenvolvendo esta linha de investigação. Isso é relevante porque, em outras áreas encefálicas, como no VMH, por exemplo, o volume do neuropilo é significativamente maior em machos do que em fêmeas, sem apresentar modificação durante o ciclo estral (MADEIRA; FERREIRA-SILVA; PAULA-BARBOSA, 2001). Em outros estudos, o volume somático dos neurônios presentes na MPOA é maior em machos do que em fêmeas (MADEIRA; LEAL; PAULA-BARBOSA, 1999). Parece com isso, que um certo padrão de dimorfismo sexual pode ser encontrado nas estruturas nervosas que apresentam uma conexão direta com a AMePD, tais como as duas regiões acima mencionadas (SANCHEZ; DOMINGUEZ, 1995). Devido à capacidade que os hormônios gonadais possuem de gerar alterações nos circuitos neurais, esses dados passam a ter especial relevância, ao se entender que neurônios podem desempenhar várias ações de acordo com sua morfologia, propriedades intrínsecas de membrana celular, tipo e distribuição dos contatos sinápticos e sua capacidade de responder à ação epigenética hormonal (WOOLLEY;



McEWEN, 1993; EVERITT, 1995; RASIA-FILHO; LONDERO; ACHAVAL, 1999; de CASTILHOS *et al.*, 2008). Por exemplo, neurônios do hipocampo dorsal ou do VMH tiveram modificadas as densidades de espinhos dendríticos (locais preferenciais para sinapses) após ovariectomia e / ou administração de hormônios gonadais em ratas adultas (FRANKFURT *et al.*, 1990; WOOLLEY; McEWEN, 1993), sendo este resultado também encontrado na AMePD (de CASTILHOS *et al.*, 2008). Em níveis fisiológicos, a própria variação hormonal detectada durante o ciclo estral da rata é capaz de modificar a morfologia dos neurônios e dos astrócitos hipotalâmicos (FRANKFURT *et al.*, 1990; GARCIA-SEGURA, 1999), como igualmente ocorre na AMePD (MARTINEZ *et al.*, 2006).

#### **1.4. O ciclo estral da rata**

O ciclo sexual, ovariano ou estral de ratas compõe um meio natural e repetitivo para estudar as variações dos hormônios esteroides e suas ações fisiológicas em pouco tempo. Muito do conhecimento que há sobre o controle do ciclo ovariano de vários mamíferos que possuem ovulação espontânea é baseado em estudos sobre o controle do ciclo estral da rata. Esse ciclo é composto por quatro fases distintas: proestro, estro, diestro 1 (ou metaestro) e diestro 2 (ou diestro). A fase de proestro dura cerca de 12 a 14 horas e se estende do início da manhã até o início da tarde (onde ocorrem os picos hormonais pré-ovulatórios), enquanto que o estro dura aproximadamente de 25 a 27 horas. Após o estro ocorre então a fase de metaestro, com duração de 6 a 8 horas, seguida pelo diestro, com duração de 55 a 57 horas, reiniciando, após, um novo ciclo (FREEMAN, 1994). Cada uma das fases do ciclo caracteriza-se por expressar mudanças no útero e na cérvix uterina, detectáveis por características típicas do epitélio vaginal, como a presença predominante de células epiteliais nucleadas (no proestro), de células epiteliais

cornificadas (no estro), de leucócitos (no diestro), ou uma mistura homogênea de todos os tipos de células citadas (no metaestro).

Além disso, cada período exhibe variações nas concentrações de gonadotrofinas e conseqüentemente de esteroides gonadais (MATTHEWS; KENYON, 1984). No ciclo estral, as concentrações de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) permanecem baixas durante quase todo o ciclo. Na fase de proestro o estradiol chega à sua máxima concentração, de forma a desencadear uma retroação positiva, o qual promove a liberação de GnRH. A secreção de LH começa a aumentar antes da ovulação, denominado “pico pré-ovulatório”. Esse aumento na secreção de LH induzido pelo efeito de retroalimentação positiva do estradiol no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG), pode ser mimetizado em ratas ovariectomizadas (OVX) pelo emprego da reposição hormonal com estradiol (FREEMAN; DUPKE; CROTEAU, 1976). Já entre o estro e a manhã do metaestro, as concentrações de estradiol estão baixas e só começam a aumentar a partir da tarde do metaestro, atingindo seus maiores valores perto do meio dia do proestro e retornando a valores basais na madrugada do estro. A progesterona apresenta um primeiro pico na tarde do proestro que se estende até o início do estro, e um segundo pico, no metaestro até a madrugada do diestro (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975; Figura 5).

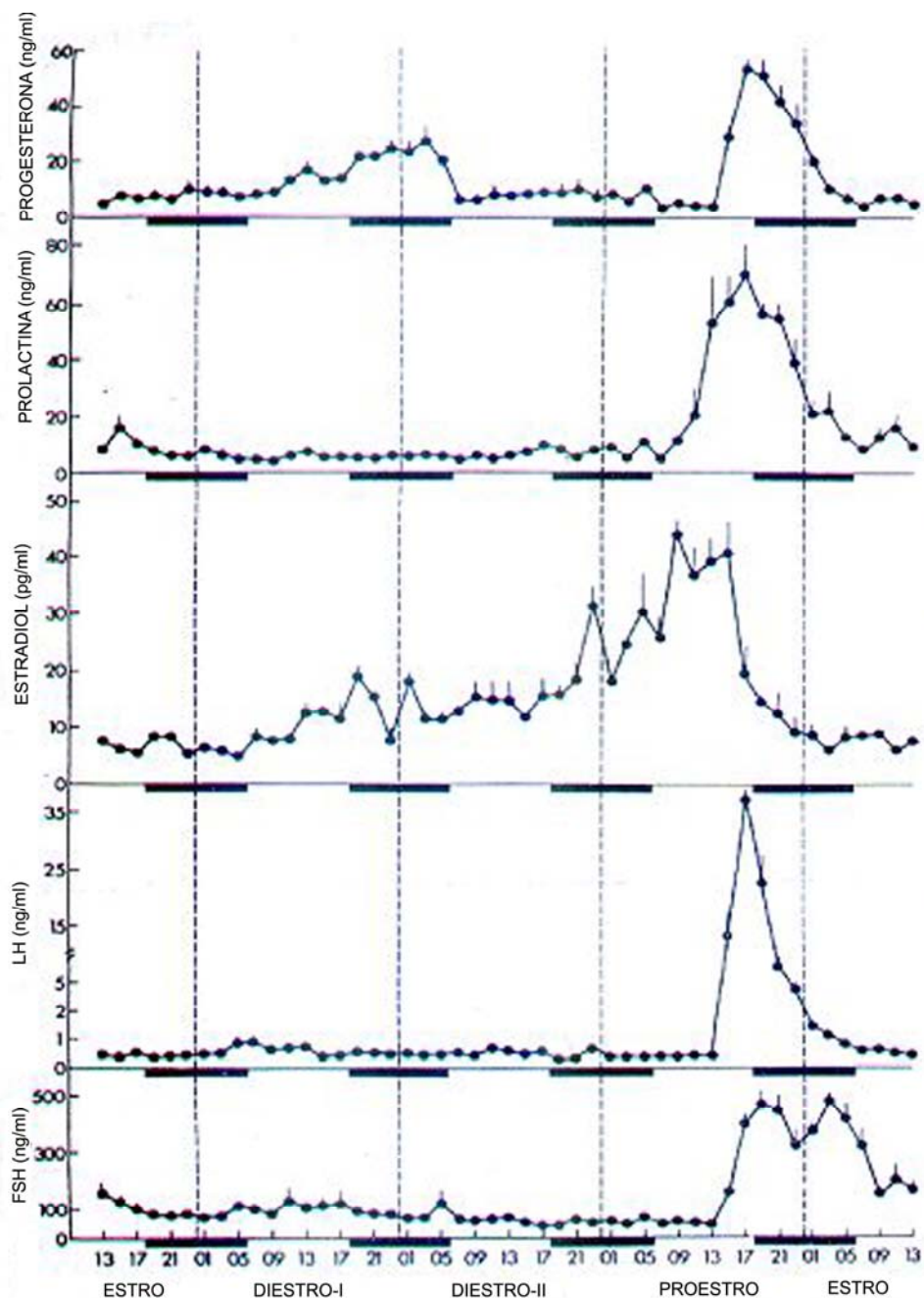


Figura 5. Concentrações plasmáticas de progesterona (P), prolactina (PRL), estradiol (E), hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) obtidas em intervalos de 2 horas nas quatro fases do ciclo estral da rato. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo diário claro-escuro (modificado de Smith et al., 1975).

Ainda não é claro o mecanismo pelo qual o estradiol estimula a secreção de GnRH. Sabe-se que sinais centrais e periféricos modulam a atividade dos neurônios GnRH, dentre eles, o óxido nítrico (NO) e a noradrenalina (NA). Esses dois sistemas possuem um papel importante em relação à sinalização neural e hormonal que modula a função reprodutiva (KALRA, 1993; HERBISON, 1998; McCANN *et al.*, 1999), mediando, possivelmente, o mecanismo de retroação positiva dos esteroides gonadais (JENNES *et al.*, 1992; McCANN *et al.*, 1999).

Considerando que o NO é um fator extremamente relevante na regulação do eixo HPG, descreveremos a seguir, com mais detalhes, como se dá a formação do NO e seu papel na modulação de diversas funções neuroendócrinas e comportamentais. Este é um dos temas que está em aberto para estudo na AMePD e para o que esta tese apresenta uma contribuição quanto às diferenças entre machos e fêmeas.

## 1.5. Óxido nítrico

O NO é um gás instável, mensageiro neuronal que revolucionou os conceitos clássicos da neurotransmissão (DAWSON; SNYDER, 1994). Ele foi primeiramente descoberto como a molécula responsável pelas ações tumorílicas e bactericidas dos macrófagos (GREEN *et al.*, 1981; GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981; HIBBS; TAINTOR; VAVRIN, 1987; STUEHR *et al.*, 1989). Subsequentemente foi demonstrado que o NO representava um fator de relaxamento derivado do endotélio que mediava a habilidade de substâncias como a acetilcolina e a bradicinina de dilatar vasos sanguíneos (IGNARRO *et al.*, 1981; IGNARRO *et al.*, 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Estudos a seguir indicaram a possibilidade de que o NO poderia ser formado no encéfalo, sendo essa evidência obtida em culturas de células cerebelares (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988). A presença de uma

enzima formadora de NO (NO sintase, ou NOS), também no encéfalo, foi mais tarde confirmada (KNOWLES *et al.*, 1989), e esta enzima foi subsequentemente purificada e seu DNA foi clonado e sequenciado (BREDT *et al.*, 1991b). Outras séries de observações estabeleceram o NO como um mensageiro de populações neuronais específicas. Primeiro, foi demonstrado que o glutamato, atuando sobre os receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA) estimulavam a formação de NO (BREDT; SNYDER, 1989) e que inibidores da NOS, como a nitroarginina e a *N*-metil-arginina, bloqueavam a estimulação por NMDA sobre os níveis de GMP cíclico (cGMP) em secções do encéfalo (BREDT; SNYDER, 1989; GARTHWAITE *et al.*, 1989). O isolamento da NOS neuronal (nNOS), a primeira forma de NOS a ser purificada (BREDT; HWANG; SNYDER, 1990), levou ao desenvolvimento de anticorpos e mapeamento imunistoquímico que revelou uma associação da nNOS com populações neuronais com atividade neuroquímica específica (BREDT; HWANG; SNYDER, 1990; BREDT *et al.*, 1991a). Na AMePD encontram-se neurônios com capacidade de síntese de NO, como será demonstrado.

### **1.5.1. Formação do óxido nítrico**

A regulação da síntese do NO é mais importante do que de outros neurotransmissores porque o NO não pode ser armazenado, recaptado ou inativado após sua liberação na sinapse por nenhum dos mecanismos regulatórios convencionais (BREDT; SNYDER, 1994). Embora os critérios para estabelecer uma substância como um neurotransmissor sejam ainda discutidos, a formação de NO em grupos discretos de neurônios e a sua capacidade de mediar ações sinápticas forneceu fortes evidências para consolidar tal gás como tendo função neurotransmissora no SNC de mamíferos (PANZICA *et al.*, 2006). Mas, por exemplo, neurotransmissores são usualmente armazenados em vesículas e liberados por exocitose. Já o NO é formado de acordo com a demanda e simplesmente se difunde entre as células (JAFFREY; SNYDER, 1995). Outro aspecto

importante é que os neurotransmissores geralmente agem em receptores específicos nas membranas de células adjacentes, enquanto o NO se difunde para dentro das células adjacentes e se liga a inúmeras proteínas que servem como “alvos”/“receptores”, como a guanilil ciclase (GARTHWAITE; BOULTON, 1995; JAFFREY; SNYDER, 1995). Sendo assim, o NO possui uma grande habilidade para se difundir através das membranas, permitindo uma rápida movimentação em todas as direções, desde o local de sua síntese (XIE; HERMANN; KERSCHBAUM, 2002). Além disso, neurotransmissores podem ser inativados por mecanismos enzimáticos ou de recaptação, enquanto que o NO é inativado por reações químicas com outras moléculas, como o superóxido ou sua ligação com a hemoglobina (JAFFREY; SNYDER, 1995).

A quantidade de NO produzido depende da atividade da enzima NOS. A NOS converte L-arginina em NO e L-citrulina, em um processo que consome cinco elétrons (MARLETTA, 1993; Figura 6). Sendo assim não é surpreendente que a NOS seja uma das enzimas com grande possibilidade de regulação (HU; EL-FAKAHANY, 1996; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). E foi a evidência de que a calmodulina era absolutamente necessária para a atividade da enzima que tornou possível a purificação da NOS (BREDT; SNYDER, 1990).

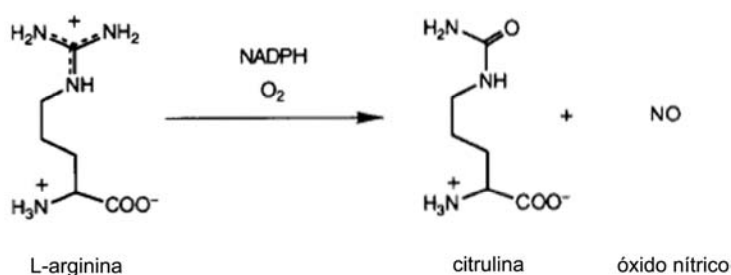


Figura 6. Reação catalizada pela óxido nítrico sintase (Marletta, 1993).

Após esta etapa, duas classes distintas de NOS foram identificadas: a NOS constitutiva, dependente de cálcio/calmodulina (cNOS) e a NOS induzível, independente de cálcio (iNOS ou NOS tipo II; (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991), conhecida por ser regulada pós-transcricionalmente. Além disso, duas isoformas da cNOS foram descritas, denominadas de NOS endotelial (eNOS ou NOS tipo III) e NOS neuronal (nNOS ou NOS tipo I) (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). A nNOS é a mais abundante isoforma presente no encéfalo, e é co-localizada com neurônios marcados com nicotinamida-adenina dinucleotídeo-fosfato em sua forma reduzida (NADPH) diaforase (NADPH-d; DAWSON; DAWSON, 1996). Todos os tipos de NOS requerem NADPH e O<sub>2</sub> como co-substratos para a sua reação (MARLETTA, 1993). Os primeiros neurônios marcados com a técnica da NADPH-d foram identificados por Thomas e Pearse em 1964, que descobriram neurônios que se marcavam de azul escuro na presença de azul de nitrotetrazólio (*nitro blue tetrazolium*, NBT) e NADPH. A atividade da nNOS depende também de outros cofatores, tais como, flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e tetrahydro-L bioterina (BREDT; SNYDER, 1994; VINCENT, 1994).

A expressão da proteína nNOS é estimulada em resposta ao aumento de níveis intracelulares de cálcio. No encéfalo, o glutamato agindo em receptores NMDA desencadeia um influxo de cálcio que se liga com a calmodulina para ativar a nNOS. Dessa maneira, o glutamato pode triplicar a atividade da nNOS em fatias de encéfalo em questão de segundos, o que gerou um novo modelo de transdução sináptica (BREDT; SNYDER, 1989).

### **1.5.2. Distribuição neuroanatômica do óxido nítrico**

A presença de neurônios produtores de NO vem sendo descrita em estudos que utilizam técnica histoquímica para NADPH-diaforase, imunoistoquímica para nNOS e hibridização *in situ*

em diversas áreas do SNC de mamíferos, incluindo o sistema olfatório, o córtex cerebral, o diencéfalo, o tronco encefálico, o cerebelo e a medula espinal (VINCENT; KIMURA, 1992; BRUNING; FUNK; MAYER, 1994; EGBERONGBE *et al.*, 1994; PANZICA *et al.*, 1994; RODRIGO *et al.*, 1994; BRUNING; MAYER, 1996; GOTTI *et al.*, 2005). Em ratos, a distribuição de células nNOS positivas foi descrita em detalhes particularmente em certos núcleos hipotalâmicos e límbicos envolvidos no controle de comportamentos reprodutivos, tais como, MPOA, núcleos paraventricular (PVN), supraóptico (SON), Arc e VMH, BNST (BREDT; FERRIS; SNYDER, 1992; VINCENT; KIMURA, 1992; BHAT *et al.*, 1996), AMe e BAOT (COLLADO *et al.*, 2003; CARRILLO *et al.*, 2007). Para tanto, muitos experimentos tem se valido da identificação de neurônios positivos para a NADPH-d uma vez que ela é uma nNOS (HOPE *et al.*, 1989; 1991).

### **1.5.3. Funções neuroendócrinas e comportamentais do óxido nítrico**

A localização da nNOS em diversos tipos celulares que pertencem a uma grande variedade de sistemas neuronais, sugere que o NO está envolvido no controle de diversas atividades fisiológicas, tais como, potenciação a longo prazo (LTP), neuroproteção, degeneração neural e regulação da secreção peptidérgica (DAWSON; SNYDER, 1994; DAWSON; DAWSON, 1996).

Particularmente, o NO tem um papel fundamental na reprodução em vários níveis no organismo. Diversos estudos sugerem que o NO facilita o desencadeamento do comportamento sexual tanto por sua ação central quanto periférica, e provavelmente por meio de uma interação com outros sistemas de neurotransmissores (PANZICA *et al.*, 2006). Periféricamente, o NO, produzido pela eNOS e pela nNOS, está envolvido com a regulação da ereção peniana (IGNARRO, 2002), a ovulação (SHUKOVSKI; TSAFRIRI, 1994; BONELLO *et al.*, 1996) e a



transferência de oócitos dos ovários para os ovidutos (KLEIN *et al.*, 1998). Centralmente, o NO tem um importante papel no controle do comportamento sexual tanto de ratos machos quanto de fêmeas (MANI *et al.*, 1994; BENELLI *et al.*, 1995; SATO *et al.*, 1998; LAGODA *et al.*, 2004). Isto vem sendo confirmado com estudos utilizando diferentes linhagens de camundongos *knockout*. Em particular, a interrupção do exon 2 (resultando em uma atividade residual da nNOS) induz déficit no comportamento sexual de camundongos machos (NELSON *et al.*, 1995), enquanto a interrupção do exon 6 (resultando na perda total de atividade da nNOS) induz o desaparecimento total do comportamento sexual de machos e da ovulação em fêmeas (GYURKO; LEUPEN; HUANG, 2002). No encéfalo, o NO aumenta a síntese e secreção de GnRH, possibilitando o reflexo de lordose (RETTORI; McCANN, 1998; McCANN *et al.*, 1999; 2003).

Além desses comportamentos, o NO influencia outros comportamentos motivados, incluindo-se o agressivo, e a modulação da memória e do aprendizado espacial (NELSON *et al.*, 1997; NELSON; CHIAVEGATTO, 2001).

#### **1.5.4. Relação entre o óxido nítrico e os hormônios gonadais**

O controle do comportamento reprodutivo pelo NO é modulado pelos hormônios gonadais e provavelmente mediado por interações com outros sistemas de neurotransmissão, como a dopamina (DA) no encéfalo de machos (HULL *et al.*, 1997; 1999; HULL; MUSCHAMP; SATO, 2004; HULL; DOMINGUEZ, 2006) e pela NA no encéfalo de fêmeas (CHU; ETGEN, 1997). O sistema NO-cGMP faz parte de uma via de sinalização intracelular que serve para regular o efeito facilitatório dos adrenoreceptores  $\alpha 1$  nos comportamentos de lordose em ratas (ETGEN, 2003). Em ratos machos, por exemplo, a testosterona (T) aumenta os níveis de NO

dada sua ação estimulatória na nNOS (DU; HULL, 1999). Por sua vez, o NO aumenta a liberação da DA na MPOA (LORRAIN; HULL, 1993; LORRAIN *et al.*, 1996; DOMINGUEZ *et al.*, 2004). O aumento da liberação de DA promove maior responsividade aos estímulos produzidos pela presença da fêmea em estro e aumento da possibilidade, frequência e eficiência da cópula (LORRAIN *et al.*, 1996). Estudos recentes demonstraram que a ação da nNOS é mediada pela aromatização da T em  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), e não pela redução à diidrotestosterona (DHT; PUTNAM *et al.*, 2005). Ainda em machos, foi demonstrado que a microinjeção de  $N$ -nitro- $L$ -arginina metil ester ( $L$ -NAME), inibidor da síntese de NO, na MPOA bloqueou a cópula em machos intactos e prejudicou sua ocorrência mesmo em ratos que já tinham experiência sexual (LAGODA *et al.*, 2004).

A ampla distribuição da NOS no eixo HPG sugere que o NO possui funções neuroendócrinas, podendo estar envolvido na modulação da secreção de GnRH (MORETTO; LOPEZ; NEGRO-VILAR, 1993; GROSSMAN *et al.*, 1994). Sabe-se que a secreção pulsátil de NO pode variar de acordo com a fase do ciclo estral, onde no proestro a amplitude de secreção é maior do que no estro e no diestro, tendo sua liberação sincronizada com a secreção de GnRH (KNAUF *et al.*, 2001). A administração intracerebroventricular de L-NMMA (N-mono-methyl-L-arginina), um inibidor da atividade da NOS, bloqueia a secreção pulsátil de LH (RETTORI *et al.*, 1993). Já a administração intracerebroventricular de L-arginina (que é substrato para a produção de NO), amplifica o pico de LH induzido pelo estradiol em ratas OVX (BONAVERA; KALRA; KALRA, 1996). De fato, a distribuição da nNOS em diversas regiões cerebrais se sobrepõe aos receptores para hormônios gonadais (SHUGHRUE; MERCHENTHALER, 2001; MERCHENTHALER *et al.*, 2004), como no caso da AMePD.

Diversos estudos em roedores demonstraram que a expressão de nNOS é regulada pelos hormônios gonadais. A castração diminui a expressão da nNOS enquanto o tratamento com T ou seu metabólito, o  $E_2$ , aumenta o número de células nNOS ou NADPH-d positivas, assim como a

expressão de RNAm para nNOS na MPOA, PVN e na VMHvl (CECCATELLI *et al.*, 1996; HADEISHI; WOOD, 1996; SANCHEZ *et al.*, 1998; DU; HULL, 1999; WAREMBOURG; LEROY; JOLIVET, 1999; PUTNAM *et al.*, 2005). O papel fundamental do estradiol e dos seus receptores na regulação do sistema nNOS é também confirmado por resultados obtidos em camundongos machos mutantes que não possuíam ER $\alpha$  ou que não foram expostos ao estradiol (aromatase *knockout*, ArKO). Em ambos os casos foi detectada uma diminuição significativa da imunorreatividade para nNOS na MPOA, PVN e Arc (SICA, 2007). Além disso, foi demonstrado que o ER $\alpha$  e o AR interagem para regular a nNOS especificamente para cada região do encéfalo de machos e fêmeas (SCORDALAKES; SHETTY; RISSMAN, 2002). E a atividade da NADPH-d aumenta durante a fase de estro no BAOT (COLLADO *et al.*, 2003) e na AMeAV (CARRILLO *et al.*, 2007).

Baseado em todos esses dados, estava claro que dois tópicos relevantes sobre a organização celular da AMePD necessitavam maior investigação para avançar tais conhecimentos e para tornar congruentes os raciocínios sobre os efeitos dos hormônios gonadais nesta área. O foco de estudo é questionar de que maneira a variação dos hormônios gonadais, de forma fisiológica ou supra-fisiológica, poderia estar modificando o neuropilo da AMePD de ratos. Com base no que já foi publicado na literatura e nos encadeamentos lógicos das linhas de pesquisa que envolvem a AMePD, escolhemos estudar a atividade da NADPH-d em machos, em fêmeas ao longo do ciclo estral e em fêmeas OVX com terapia substitutiva. A seguir, buscou-se estudar o volume somático e nuclear de neurônios da AMePD de fêmeas OVX também submetidas à terapia substitutiva. Não havia, até o momento, nenhum relato na literatura dos efeitos da ovariectomia e da reposição hormonal com estradiol e/ou progesterona sobre a atividade da NADPH-d ou sobre o volume somático e nuclear na AMePD, e nem se o ciclo estral poderia se relacionar com a atividade da NADPH-d nessa mesma região. Esse tipo de

conhecimento é relevante frente ao fato de que a AMePD é uma região considerada sexualmente dimórfica, participando na modulação do comportamento reprodutivo na secreção neuroendócrina por influenciar a atividade de diferentes áreas hipotalâmicas e formando circuitos neurais específicos.

## **2. OBJETIVOS**

Como diferenças relacionadas ao sexo, ao ciclo estral e à influência dos hormônios gonadais como terapia substitutiva já foram relatadas para a AMePD de ratos, o que sugere que a organização estutural desta região varia em função dos níveis circulantes de hormônios gonadais, e considerando-se que o conhecimento das populações neuronais da AMePD é de fundamental importância para uma melhor compreensão do seu papel funcional, buscando avançar e correlacionar os conhecimentos com dados ainda inéditos, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

1. Avaliar a influência dos hormônios gonadais em níveis fisiológicos na atividade regional, na atividade neuronal e no número de células positivas para a NADPH-diaforase na AMePD de machos e, em fêmeas, ao longo de todas as fases do ciclo estral (diestro, manhã e tarde do proestro, estro e metaestro), utilizando-se técnica histoquímica e análise semi-quantitativa por técnica de densitometria óptica.
2. Avaliar a influência da ovariectomia e dos hormônios gonadais femininos, estradiol e progesterona, em níveis supra-fisiológicos, combinados ou não, como terapia substitutiva na atividade regional, na atividade neuronal e no número de células positivas para a NADPH-diaforase na AMePD, utilizando-se técnica histoquímica e análise semi-quantitativa por técnica de densitometria óptica.
3. Determinar o efeito da ovariectomia e da terapia substitutiva com estradiol e progesterona, em níveis supra-fisiológicos, combinados ou não, sobre o volume somático e nuclear de neurônios da AMePD de ratas utilizando-se técnica de reconstrução estereológica de cortes seriados e o método de Cavalieri em associação com a técnica de contagem de pontos.

Com isso, esperavam-se encontrar dados que corroborassem o entendimento da AMePD como sendo sexualmente dimórfica, além de evidenciar os efeitos das variações cíclicas dos esteroides sexuais e efeitos da manipulação hormonal sobre estes parâmetros morfológicos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**



### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar adultos de ambos os sexos (3 – 5 meses de idade, 6 machos e 70 fêmeas) provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram mantidos em grupos (no máximo cinco por caixa padrão) com água e comida *ad libitum*. A temperatura foi mantida em torno de 22° C e em ciclo claro/escuro de 12 h cada.

Foram tomados todos os cuidados éticos para minimizar o número de animais estudados e o seu sofrimento. Os ratos utilizados para os experimentos foram manipulados de acordo com as normas brasileiras para o uso ético de animais em experimentação científica, além das diretrizes internacionais de cuidados éticos para estudo de animais em laboratório (Conselho Diretivo da Comunidade Européia de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC). O projeto (número 2007904) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 34, ata nº 114, de 04/09/2008, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Para a realização deste estudo, foram realizados três experimentos. No primeiro experimento foram utilizados 6 machos e 30 fêmeas ao longo do ciclo estral e no segundo e terceiro experimento foram utilizadas, em cada um, 20 fêmeas ovariectomizadas com tratamento substitutivo. Os procedimentos realizados para cada um dos experimentos serão descritos a seguir.

### **3.2. Identificação das fases do ciclo estral**

Em todos os experimentos, as ratas tiveram seu ciclo estral avaliado quanto à sua normalidade (fases de diestro, proestro, estro e metaestro) por meio da citologia vaginal realizada diariamente durante um período de duas semanas. Para isso foi utilizada uma pipeta de tamanho

adequado preenchida com solução salina. Após a coleta, o material obtido do “esfregaço vaginal” foi colocado sobre uma lâmina histológica e observado ao microscópio óptico para a identificação dos tipos celulares de cada fase. Classicamente, cada uma dessas fases distingue-se pela preponderância de tipos celulares característicos, que são: leucócitos em diestro, células epiteliais em proestro, células queratinizadas no estro ou a presença dos três tipos celulares no metaestro (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975; FREEMAN, 1994; Figura 7). Ao final dessas duas semanas somente as fêmeas que apresentaram dois ciclos regulares consecutivos foram selecionadas para estudo.

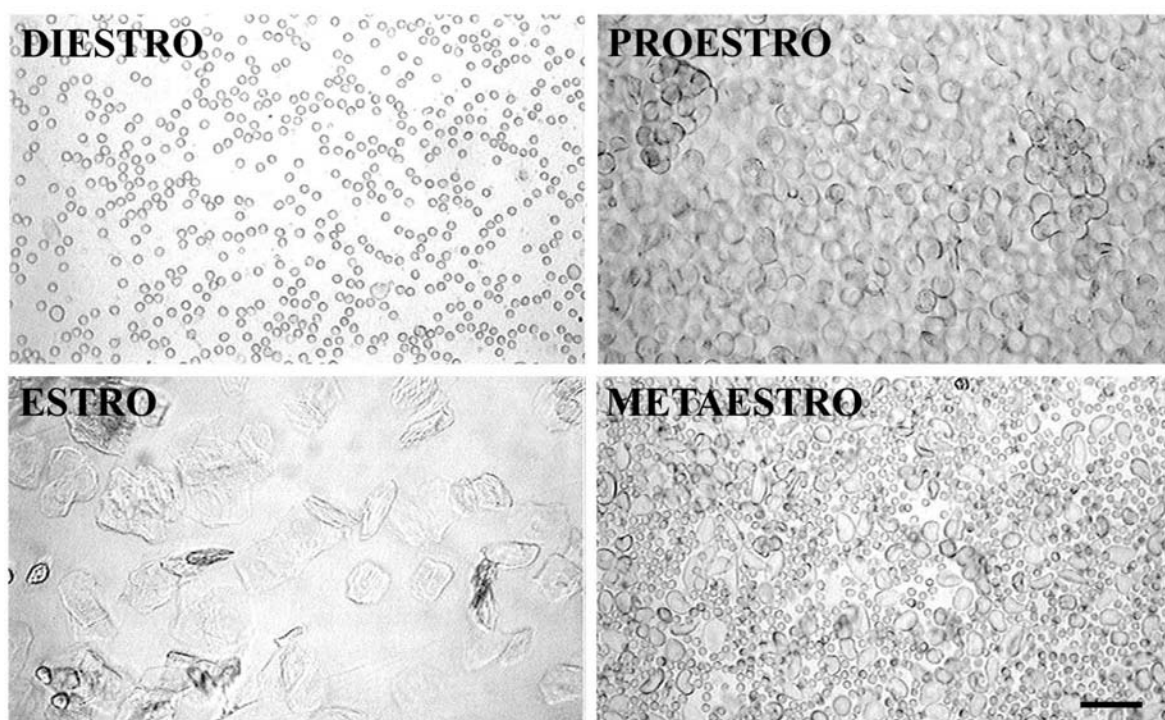


Figura 7. Fotomicrografias mostrando a citologia vaginal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral. Diestro, com predominância de leucócitos; proestro, com predominância de células epiteliais nucleadas; estro, com predominância de células queratinizadas; e, metaestro, com presença conjunta desses tipos celulares. Barra: 20  $\mu$ m (conforme originalmente apresentado em HERMEL, 2005).

### 3.3. Experimento 1: Atividade da NADPH-diaforase entre machos e fêmeas ao longo do ciclo estral

#### 3.3.1. Procedimento histoquímico para NADPH-diaforase

Nesse experimento foi realizada a técnica histoquímica da NADPH-d adaptada de (CARRILLO *et al.*, 2007). Esta técnica utiliza NADPH como substrato e azul de nitrotetrazólio (NBT) como cromógeno, gerando um precipitado azul escuro insolúvel denominado formazan.

Atualmente sabe-se que a enzima NADPH-d é histoquimicamente definida como a enzima responsável por catalizar a seguinte reação (HOPE; VINCENT, 1989):



Foram utilizados 6 machos e 6 fêmeas em cada fase do ciclo estral (diestro, manhã do proestro, tarde do proestro, estro e metaestro; n = 36). Com exceção do grupo estudado na manhã do proestro, todas as outras ratas foram sacrificadas na tarde de seus respectivos ciclos (16h). Para realização da técnica, todos os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.; Cristalia, Brasil), injetados com 1000 UI de heparina no ventrículo cardíaco esquerdo e perfundidos com o auxílio de uma bomba peristáltica (Control Company, Brasil, fluxo de 20 mL/min) com 200 mL de solução salina seguida por 200 mL de paraformaldeído 4 % diluído em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4 (TF). Os encéfalos foram removidos e pós-fixados por 4 horas na mesma solução fixadora. Então, foram seccionados (50  $\mu\text{m}$ ) em vibrátomo (Leica, Alemanha), sendo as secções recolhidas em TF 0,1M pH 7,4 e processados para o procedimento histoquímico. Foi realizada uma pré-incubação dos cortes à temperatura ambiente por 10 min em

uma solução contendo 12 $\mu$ L de Triton X-100 (Sigma) diluído em 100 mL de TF 0,1M pH 7,4. Após, os cortes foram incubados a 37° C em uma solução contendo 5 mg de NADPH (Sigma) e 3 mg de NBT (Sigma), diluídos em TF 0,1M pH 7,4. O tempo de incubação dos cortes na estufa foi de 1 h e 30 min. Após a reação, os cortes foram lavados com TF 0,1M pH 7,4, montados em lâminas gelatinizadas, desidratados em uma série alcoólica crescente, diafanizados em xilol e cobertos com bálsamo do Canadá.

Todos os encéfalos utilizados foram fixados e pós-fixados durante o mesmo período de tempo em soluções idênticas. Foram igualmente processados ao mesmo tempo, seguindo-se exatamente os mesmos passos histológicos, bem como incubados nos mesmos meios, pelo mesmo período de tempo. Esses procedimentos foram realizados a fim de reduzir a possibilidade de *overreaction*, diferenças na reação do cromógeno ou alterações nos níveis de fundo dos grupos experimentais, o que poderia gerar resultados inadequados para comparações entre os grupos experimentais.

### **3.3.2. 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) juntamente com as descrições da AMePD foram baseadas nas descrições de Alheid et al. (1995) e Canteras et al. (1995). As secções contendo esta região foram projetadas em desenhos esquemáticos de cortes coronais do encéfalo. Os locais onde puderam ser identificados neurônios na AMePD, 3,0 a 3,30 mm posterior ao bregma (PAXINOS; WATSON, 1998), foram selecionadas para estudo em microscópio óptico. Ambos os hemisférios cerebrais foram utilizados.

O protocolo para medir a densidade óptica da atividade da NADPH-d na AMePD foi baseado no estudo realizado previamente por Martinez e colaboradores (2006). A intensidade do produto da reação da atividade a NADPH-d foi estudada por uma análise semi-quantitativa usando um microscópio Nikon Eclipse E-600 (400x) acoplado a uma câmera CCD “Pro-Series High Performance” e o programa “Image Pro Plus Software 6.0” (Media Cybernetics, EUA). As secções foram analisadas e as imagens AMePD foram capturadas, digitalizadas e convertidas para tons de cinza (0-255; sendo, 0 = branco absoluto e 255 = negro absoluto). Todas as condições de luz e magnificações foram mantidas constantes. Quadros com 20.330  $\mu\text{m}^2$  (como área de interesse, AOI) foram colocados sobre uma grade que foi sobreposta à imagem para auxiliar na medição da densidade óptica regional. Para se medir a densidade óptica neuronal, foram colocados quadros com 13  $\mu\text{m}^2$ . Vasos sanguíneos e outros artefatos evidentes foram evitados. Foram analisadas pelo menos 25 secções da AMePD de cada grupo estudado (5 secções por animal). Uma área de tecido livre foi determinada e utilizada para corrigir as medidas de densidade óptica, servindo como imagem de *background*. Foi realizada a subtração de cada fundo marcado com o fundo de correção (XAVIER *et al.*, 2005).

A densidade óptica dos neurônios imunorreativos por campo, em uma calibração padrão, foi obtida pela fórmula:

$$DO(x,y) = -\log [(Intensidade(x,y) - NA / Incidente - NA)],$$

onde: DO = densidade óptica; (x,y) = coordenadas do “pixel” analisado; Intensidade = intensidade de luz visível no “pixel” ; Incidente = intensidade de luz que incide sobre o pixel; e NA= negro absoluto.

O número de neurônios NADPH-d-positivos na AMePD foram contados utilizando um microscópio Nikon Eclipse E-600 (40×, Japan) acoplado a uma câmera Pro-Series High Performance CCD e ao software Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, USA). No mínimo 5 secções de cada animal foram utilizadas. As contagens foram feitas visualmente por um observador treinado. Foram contados somente os neurônios em que suas características citológicas e de marcação pela NADPH-d eram evidentes.

### **3.3.3. Análise Estatística**

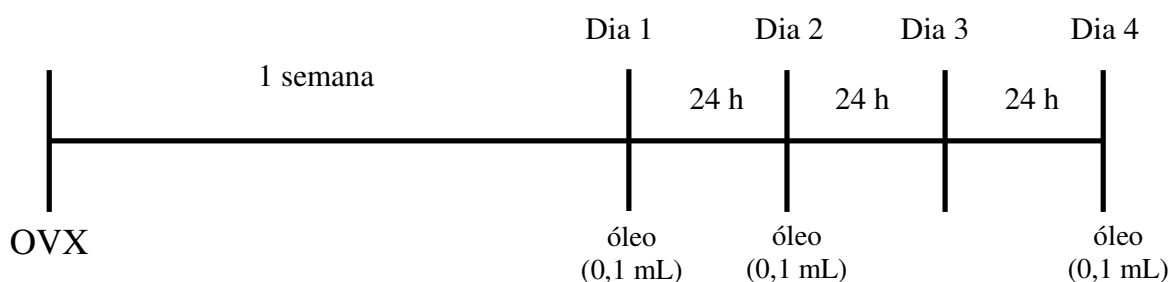
Os dados referentes à densitometria óptica regional e a densitometria óptica neuronal da atividade da NADPH-d, assim como as contagens dos neurônios NADPH-d-positivos, foram comparados pelo teste da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Previamente, os grupos de ratas em proestro (estudadas na manhã ou na tarde desta fase) foram comparados pelo teste *t* de Student. Como não houve diferença estatisticamente significativa entre esses grupos (como descrito no artigo respectivo), os dados desses dois grupos foram agrupados. O nível de significância estatística foi estabelecido *a priori* em  $P < 0,05$ .

### **3.4 Experimento 2: Atividade da NADPH-diaforase após ovariectomia e terapia hormonal substitutiva**

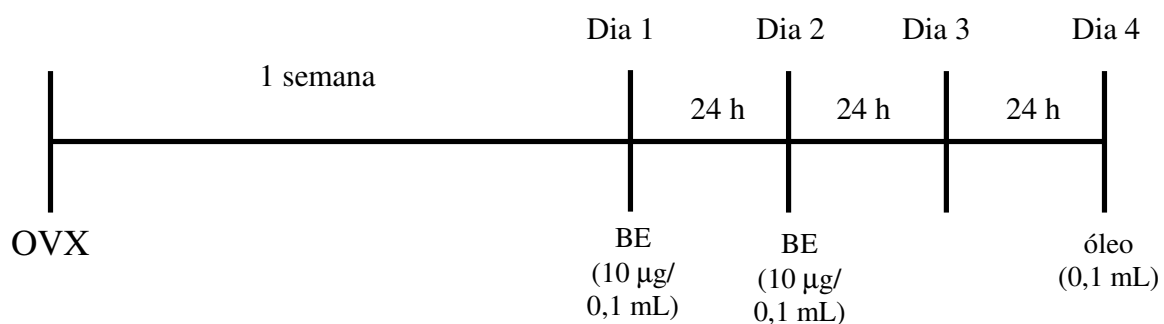
#### **3.4.1. Procedimento cirúrgico e terapia hormonal substitutiva**

Após avaliação da citologia vaginal, as ratas foram anestesiadas com quetamina e xilasina (80 e 20 mg/kg, respectivamente) injetadas por via intraperitoneal (i.p.), e ovariectomizadas, bilateralmente, por acesso cirúrgico dorsal. Após a retirada dos ovários e a sutura por planos, as ratas foram recolocadas em suas respectivas caixas para recuperação pós-operatória. Sete dias após o procedimento cirúrgico, as ratas foram divididas nos seguintes grupos experimentais com metodologia baseada e adaptada de estudos previamente publicados (MARTINEZ *et al.*, 2006; de CASTILHOS *et al.*, 2008):

- grupo 1 (V): fêmeas ovariectomizadas (OVX; n = 5) e que receberam três injeções subcutâneas (s.c.) de veículo (óleo de gergelim) em volume de 0,1 mL, no horário da manhã (às 9 h), servindo como grupo controle. A primeira dose foi dada no primeiro dia da terapia substitutiva (dia 1), a segunda dose de óleo foi dada 24 h depois da primeira dose (dia 2), e a terceira dose foi dada 48 h após a segunda dose e 5 h antes da rata ser sacrificada e submetida à técnica histoquímica para NADPH-d, (dia 4 da terapia substitutiva), conforme o seguinte esquema:



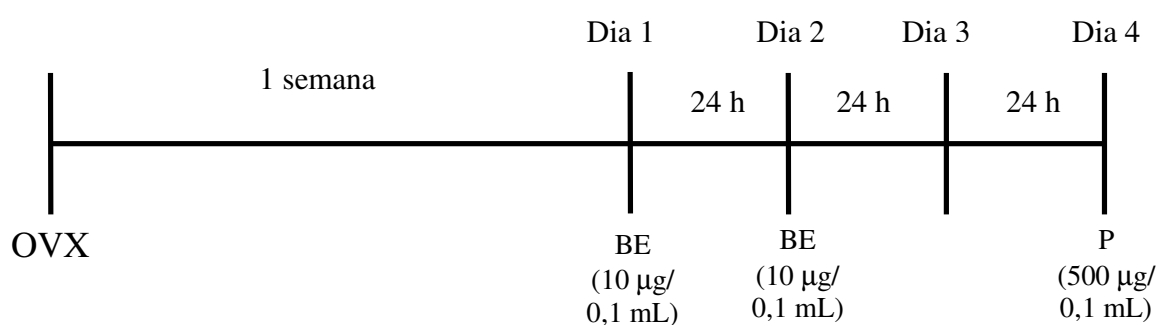
- grupo 2 (BE): fêmeas OVX (n = 6) e que receberam benzoato de estradiol (BE; Sigma Chemicals Co., EUA) na dose de 10 µg diluídos em 0,1 mL de veículo (óleo de gergelim) sob o seguinte protocolo: a primeira dose de BE foi dada no primeiro dia de terapia substitutiva (dia 1), a segunda dose de BE foi dada 24 h depois da primeira dose (dia 2) e a terceira dose foi de veículo (óleo) na dose de 0,1 mL, 48 h após a segunda dose de BE e 5h antes da rata ser sacrificada e submetida à técnica histoquímica para NADPH-d (dia 4), conforme o esquema a seguir:



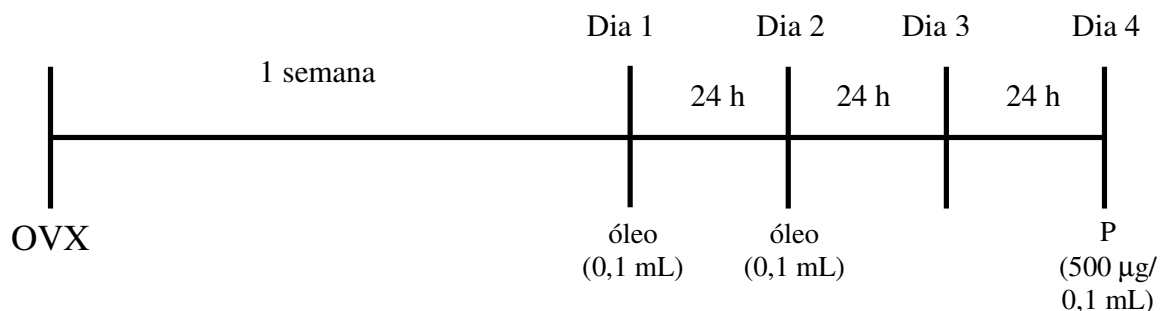
- grupo 3 (BE+P): fêmeas OVX (n = 4) e que receberam 10 µg de BE e 500 µg de progesterona (P; Sigma Chemicals Co., EUA) ambos diluídos em 0,1 mL de veículo (óleo de gergelim), sob o



seguinte esquema: a primeira dose de BE foi dada no primeiro dia da terapia substitutiva (dia 1), a segunda dose de BE foi dada 24 h depois da primeira dose (dia 2) e a terceira dose foi de P, 48 h após a segunda dose de BE e 5h antes da rata ser sacrificada e submetida à técnica histoquímica para NADPH-d, conforme seguinte protocolo:



- grupo 4 (P): fêmeas OVX (n = 5) e que receberam 0,1 mL de veículo (óleo de gergelim) e 500 µg de P, diluída em 0,1 mL de óleo, sob o seguinte esquema: a primeira dose de óleo foi dada no primeiro dia da terapia substitutiva (dia 1), a segunda dose de óleo foi dada 24 h depois da primeira dose (dia 2) e a terceira dose foi de P, 48 h após a segunda dose de óleo e 5h antes da rata ser sacrificada e submetida à técnica histoquímica para NADPH-d, conforme seguinte protocolo:



Após o tratamento com a terapia hormonal, e 5 horas após a última injeção, os animais foram então anestesiados e perfundidos para a realização do procedimento histoquímico e da densitometria óptica regional e neuronal, bem como para a contagem de neurônios NADPH-d positivos, conforme descrito no experimento 1.

### 3.4.2. Aquisição dos dados

Foi utilizado o mesmo procedimento para aquisição dos dados conforme experimento 1.

### 3.4.3. Análise Estatística

Os dados referentes a densitometria óptica regional e a densitometria óptica neuronal da atividade da NADPH-d, assim como as contagens dos neurônios NADPH-d positivos foram comparados empregando-se o teste da análise da variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. O nível de significância estatística foi estabelecido *a priori* em  $P < 0,05$ .

### **3.5. Experimento 3: Avaliação do volume somático e nuclear de neurônios da AMePD de fêmeas ovariectomizadas com terapia hormonal substitutiva**

#### **3.5.1. Animais**

Foram utilizadas ratas Wistar adultas de mesma idade e nas mesmas condições de criação em biotério mencionadas anteriormente. Estas tiveram a regularidade do seu ciclo estral avaliada, posteriormente ovariectomizadas, conforme protocolo do experimento 2, e divididas em 4 grupos, também conforme protocolo do experimento 2 (n = 5 em cada grupo experimental). Após a terapia substitutiva, as fêmeas foram anestesiadas com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.; Cristalia, Brasil), injetados com 1000 UI de heparina (Cristalia, Brasil) no ventrículo cardíaco esquerdo e perfundidos com o auxílio de uma bomba peristáltica (Control Company, Brasil, 20 mL/min) com 200 mL de solução salina, seguida por 100 mL de paraformaldeído 4 % (Reagen, Brasil) e glutaraldeído 0,5 % (Sigma, EUA) diluídos em TF 0,1M e pH 7,4. Os encéfalos foram removidos, seccionados coronalmente em vibrátomo (100 µm; Leica, Alemanha) e as áreas contendo a AMePD (aproximadamente – 3,30 mm posterior à sutura bregmática) foram selecionadas e identificadas segundo o atlas para encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1998).

#### **3.5.2. Procedimento histológico**

Após terem sido pós-fixadas na mesma solução durante uma noite, as secções contendo a AMePD foram lavadas em TF salino (3 vezes de 30 min), pós-fixadas por 1 h em tetróxido de ósmio 1% (Sigma, EUA), em seguida o material foi novamente lavado em TF salino (3 vezes de 15 min) e desidratado em uma série de concentrações crescentes de álcool e óxido de propileno

(Electron Microscopy Sciences, EUA). Posteriormente foi feita a inclusão em resina (Durcupan, ACM-Fluka, Suíça). Para isso, o material foi submetido ao seguinte protocolo: álcool 50% 2 vezes de 5 min; álcool 70% 2 vezes de 10 min; álcool 96% 2 vezes de 20 min; álcool 100% 2 vezes de 20 min. Posteriormente as secções foram embebidas em óxido de propileno, durante 5 min; depois foi feita uma mistura 1:1 com resina (Durcupan ACM-Fluka, Suíça) e óxido de propileno onde as secções ficaram durante 10 min; finalmente, as secções foram colocadas em resina pura a vácuo durante 24 h a temperatura ambiente. Após isso, as secções ainda com resina foram colocadas lâminas de vidro e cobertas com lâminas de acetato a 60°C por 48 h (RODRIGO, 1996). Secções semifinas (1µm) foram obtidas em um ultramicrotomo (MT 6000-XL, RMC, Tucson, EUA) usando-se navalhas de vidro e analisadas sob microscópio óptico após coloração com azul de toluidina 1% diluída em tetraborato de sódio 1% (Merck, Alemanha).

### 3.5.3. Aquisição de dados

A estimativa do volume somático e nuclear dos neurônios da AMePD esquerda de todos os animais foi obtida com o método de Cavalieri associado com a técnica de contagem de pontos (técnica de reconstrução de secções seriadas; CRUZ-ORIVE; WEIBEL, 1990; LEDDA *et al.*, 2000; HERMEL *et al.*, 2006b; ROCHA *et al.*, 2007), ou seja, imagens seriadas contendo a AMePD foram obtidas e digitalizadas usando-se um microscópio Nikon Eclipse E-600 (Japão) acoplado a uma câmera CCD Pro-Series “High Performance” com o auxílio do programa “Image Pro Plus Software 6.0” (Media Cybernetics, EUA). Um mínimo de 12 secções e 42 áreas/ponto por soma neuronal foram analisadas. Somente os corpos celulares contidos completamente na série de secções foram utilizados na avaliação quantitativa. O valor médio do volume somático e nuclear foi calculado com a equação:

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

onde V= volume,  $\Sigma P$ = total de áreas/ponto contadas, a/p= área/ponto ( $8,98 \mu\text{m}^2$ ), T= espessura da secção ( $1 \mu\text{m}$ ).

#### **3.5.4. Análise estatística**

Os valores obtidos nos diferentes grupos experimentais foram comparados pelo teste da análise da variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. O nível de significância estatístico foi estabelecido *a priori* em  $P < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

## **Experimentos 1 e 2**

*Sex differences in NADPH-diaphorase activity in the rat posterodorsal medial amygdala*

*Brain Research, 1305 p.31-39, 2009*

*doi:10.1016/j.brainres.2009.09.110*

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)**BRAIN  
RESEARCH**

## Research Report

**Sex differences in NADPH-diaphorase activity in the rat posterodorsal medial amygdala**Juliana de Castilhos<sup>a,b</sup>, Paula Rigon<sup>b</sup>, Léder Leal Xavier<sup>c</sup>,  
Alberto Rasia-Filho<sup>d</sup>, Matilde Achaval<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil<sup>b</sup>Laboratório de Histoфизиologia Comparada, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil<sup>c</sup>Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil<sup>d</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 28 September 2009

Available online 6 October 2009

## Keywords:

Nitric oxide

Extended amygdala

Sex difference

Gonadal hormone

Sex steroid

Optical densitometry

## ABSTRACT

The rat posterodorsal medial amygdala (MePD) is a sexually dimorphic area implicated in the control of reproduction. Interestingly, nitric oxide (NO) synthesizing neurons are widely distributed in brain regions involved with the modulation of sexual behavior. Here we studied the NADPH-diaphorase (NADPH-d) activity and the number of positive cells in the MePD of adult males and adult females either across the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus, and metaestrus) or following ovariectomy and substitutive therapy (consisting of oil, estradiol alone, the combination of estradiol and progesterone, or progesterone alone). The NADPH-d histochemical technique was followed by a semi-quantitative analysis using optical densitometry. Males showed a higher MePD regional optical density and neuronal optical density than females across the estrous cycle, with the exception of the diestrus phase ( $P < 0.01$ ). No differences were found in these parameters during the ovarian cycle ( $P > 0.05$ ). There were no statistically significant differences among males and cycling females in the number of NADPH-d positive cells ( $P > 0.05$ ). Additionally, no statistically significant difference was found in the regional optical density, in the neuronal optical density, or in the number of NADPH-d positive neurons when comparing the data from ovariectomized females that received vehicle or the three different hormonal replacement therapies ( $P = 0.07$ ,  $P = 0.18$ , and  $P = 0.95$ , respectively). Results suggest that NADPH-d activity in the rat MePD is different between sexes but in females it is not affected by changing levels of circulating gonadal hormones in physiological or supraphysiological conditions.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

**1. Introduction**

The medial amygdala (MeA) has different histogenetic origins (García-López et al., 2008) and is considered a part of the “extended amygdala” in the rat forebrain (de Olmos et al.,

2004). It integrates sexually dimorphic pathways coming from the olfactory/vomeronasal pathways, innervates specific bed nuclei of the stria terminalis (BNST), and connects to different hypothalamic nuclei for the modulation of social behaviors (Newman, 1999; Petrovich et al., 2001; Dong et al., 2001;

\* Corresponding author. Laboratório de Histoфизиologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55 51 33083092/33083146.  
E-mail address: achaval@ufrgs.br (M. Achaval).



Simerly, 2004; Choi et al., 2005). Based on cytoarchitectonical, hodological, and functional criteria, the MeA was divided into the anterodorsal, the anteroventral (MeAV), the posterodorsal (MePD), and the posteroventral subnuclei (Canteras et al., 1995; de Olmos et al., 2004; Dall'Oglio et al., 2008a,b). The MePD is particularly important in the modulation of sexual and maternal behaviors (Newman, 1999; Sheehan et al., 2001; Rasia-Filho et al., 2004; Choi et al., 2005; de Castilhos et al., 2006, 2008).

Gonadal hormones have an important epigenetic influence upon neuro-glial morphology and function in the rat MePD (Newman, 1999; Rasia-Filho et al., 2004; Martinez et al., 2006; Cunningham et al., 2007; de Castilhos et al., 2008; Morris et al., 2008; Johnson et al., 2008; Cooke and Woolley, 2009). The presence of gonadal hormone-responsive cells is remarkable in the MePD, where neurons with androgen receptors (Sheridan, 1979; Simerly et al., 1990), with both  $\alpha$ - and  $\beta$ -estradiol receptors (ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ ; Simerly et al., 1990; Li et al., 1997; Shughrue et al., 1997; Österlund et al., 1998), and progesterone receptors are found (De Vries and Simerly, 2002). Therefore, it is not surprising that the MePD may exhibit sexual dimorphism or effects of sex steroids evidenced when comparing data from males and females, and females over the estrous cycle or following ovariectomy (OVX) and hormonal replacement (Rasia-Filho et al., 2004; Martinez et al., 2006; Hermel et al., 2006; Cunningham et al., 2007; de Castilhos et al., 2008; Morris et al., 2008; Dall'Oglio et al., 2008a; Cooke and Woolley, 2009). For example, OVXed females that received estradiol benzoate (EB) plus progesterone (P) showed a higher immunoreactivity to glial fibrillary acidic protein (GFAP) than females that received EB alone, a finding that does not quite correlate with the normal endogenous variations of ovarian hormones in proestrus females (Rasia-Filho et al., 2002; Martinez et al., 2006). Likewise, OVXed females treated with EB or EB+P showed an increase in the density of dendritic spines when compared to control vehicle treated rats, a finding that does not exactly match with previous proestrus results (Rasia-Filho et al., 2004; de Castilhos et al., 2008). The age of the animal, the time after OVX, and the estrogen treatment for OVXed females can also influence the effects of ovarian steroids (Fan et al., 2008; Quiñones et al., 2009). These findings suggest that physiological and supra-physiological levels of ovarian steroids can lead to heterogeneous results when tested in adult rats.

Nitric oxide (NO) is a highly reactive and unstable gas that participates actively in a series of neurophysiological and/or neuropathological processes in mammals (Ohkuma and Katsura, 2001; de la Torre, 2002; Zemojtel et al., 2004). Among other functions, NO modulates neuronal excitability, synaptic plasticity, and neuroprotection (Prast and Philippu, 2001) and is involved in neuroendocrine functions and reproductive behaviors (Vincent, 1994; Garthwaite and Boulton, 1995; Panzica et al., 2006). Three forms of the synthesizing enzyme NO synthase (NOS) have been described and, using biochemical and immunocytochemical approaches, it was demonstrated that NADPH-diaphorase (NADPH-d) is a neuronal NOS (nNOS; Hope and Vincent, 1989; Hope et al., 1991; Roman et al., 2002). The NADPH-d histochemical technique and immunohistochemistry have been used for many years to indirectly demonstrate the presence of NO-producing neurons in several areas of the rat and mouse nervous system (Rodrigo et al.,

1994; Collado et al., 2003; Gotti et al., 2009). Some studies demonstrated the presence of nNOS in brain nuclei related with the control of reproductive behavior, such as the hypothalamic ventromedial nucleus (VMH), the medial pre-optic area (MPOA), and the MeAV (Vincent and Kimura, 1992; McDonald et al., 1993; Carrillo et al., 2007) and, consequently, it has been suggested that NO participates in the regulation of sexual behavior in male and female rats (Mani et al., 1994; Benelli et al., 1995; Hull et al., 1999). NOS can be co-localized in neurons that possess gonadal hormone receptors (Okamura et al., 1994a) and sex steroids can trigger nNOS expression (Panzica et al., 2006). Long-term treatments with estrogen in OVXed females induced an increase in the nNOS mRNA in the VMH (Ceccatelli et al., 1996; Grohé et al., 2004), whereas changes in nNOS immunoreactivity or NADPH-d activity across different phases of the estrous cycle were observed in the mouse VMH (Martini et al., 2004; Gotti et al., 2009), in the rat MeAV (Carrillo et al., 2007), and bed nucleus of the accessory olfactory tract (BAOT; Collado et al., 2003).

The present study investigated a possible sex difference, the effects of ovarian hormone manipulation either across the estrous cycle or following OVX and hormone replacement on the regional NADPH-d activity, the neuronal NADPH-d activity, and in the number of NADPH-d positive neurons in the MePD of adult rats. For this purpose, the NADPH-d histochemical technique was employed together with semi-quantitative analysis using optical densitometry (Rasia-Filho et al., 2002; Xavier et al., 2005; Martinez et al., 2006).

## 2. Results

NADPH-d histochemical activity was clearly observed in multipolar neurons classified as bitufted or stellate cells. Bitufted neurons present spindle, ovoid, or spherical-shaped cell bodies with two symmetric primary dendritic shafts, whereas stellate neurons have pleomorphic cell bodies and three or more primary dendrites that radiate in all directions. Both kinds of neurons appeared to display similar levels of NADPH-d activity in the MePD of all experimental groups.

A remarkable number of NADPH-d positive cells were observed within the MePD of all groups (Figs. 1 and 2). The majority of these neurons showed a moderate NADPH-d activity, but others developed an intense enzymatic activity. Only proximal portions of the dendrites could be visualized. In the neuropile, enzymatic activity was found in neurites, neuroglial cells, and blood vessels.

Prior to further analysis among groups belonging to the first experiment, data were compared between proestrus females studied in the morning or in the afternoon of this phase. There was no statistically significant difference between these two groups (unpaired Student *t* test,  $P > 0.05$ ). Therefore, their results were pooled together and the mean values obtained comprised the proestrus group used for the overall ANOVA among groups in the first experiment. In this regard, data obtained for the NADPH-d regional optical density [ $F(4,25)=5.64$ ;  $P<0.01$ ] reached a statistically significant difference among males and females across of the estrous cycle phases. Moreover, the Tukey *post hoc* test showed that males have a higher NADPH-d regional activity when compared to

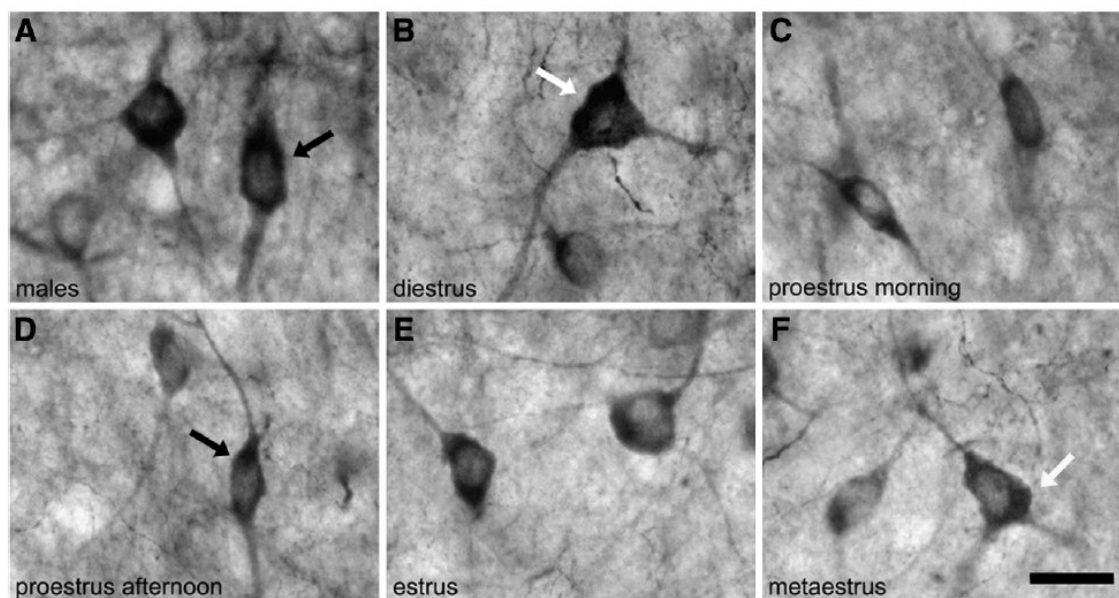


Fig. 1 – Digitized microscopic images of the NADPH-d activity in the posterodorsal medial amygdala of males (in A) and females rats across the different phases of estrous cycle (diestrus in B; proestrus morning in C; proestrus afternoon in D; estrus in E; and metaestrus in F). Arrows indicate some bitufted (black) or stellate (white) NADPH-d positive neurons. Only the background was adjusted in these images. Scale bar=20  $\mu$ m.

the proestrus ( $P < 0.01$ ), estrus ( $P < 0.05$ ), and metaestrus groups ( $P < 0.01$ ). When males and diestrus females were compared, no statistically significant differences were found ( $P > 0.05$ ). No statistical difference was found for the values obtained in females across the different phases of the estrous cycle ( $P > 0.05$ ; Fig. 3).

Data obtained for the NADPH-d neuronal optical density [ $F(4,25)=5.82$ ;  $P < 0.01$ ] also reached a statistically significant difference among males and females across of the estrous cycle phases. The NADPH-d neuronal optical density is higher in males when compared to the proestrus group ( $P < 0.01$ ), estrus group ( $P < 0.05$ ), and metaestrus group

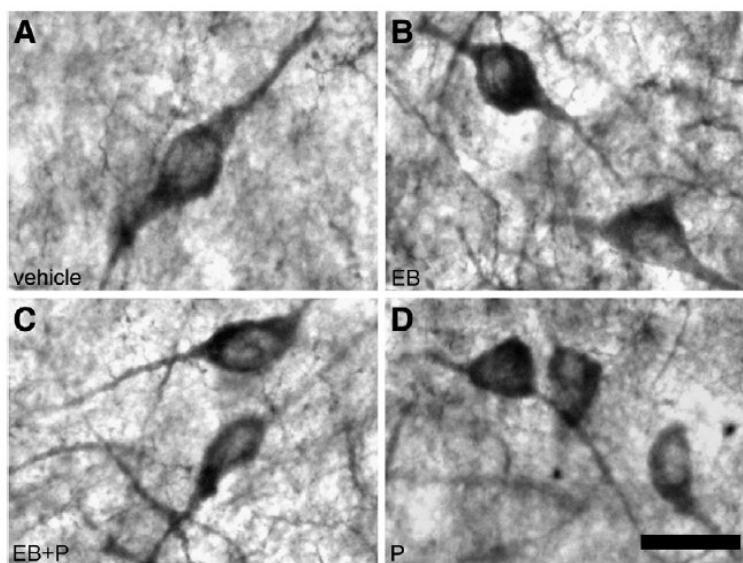


Fig. 2 – Digitized microscopic images of the NADPH-d activity in the posterodorsal medial amygdala of ovariectomized females treated with vehicle (A), estradiol benzoate alone (EB; B), estradiol benzoate plus progesterone (EB+P; C), or progesterone alone (P; D). Only the background was adjusted in these images. Scale bar=20  $\mu$ m.

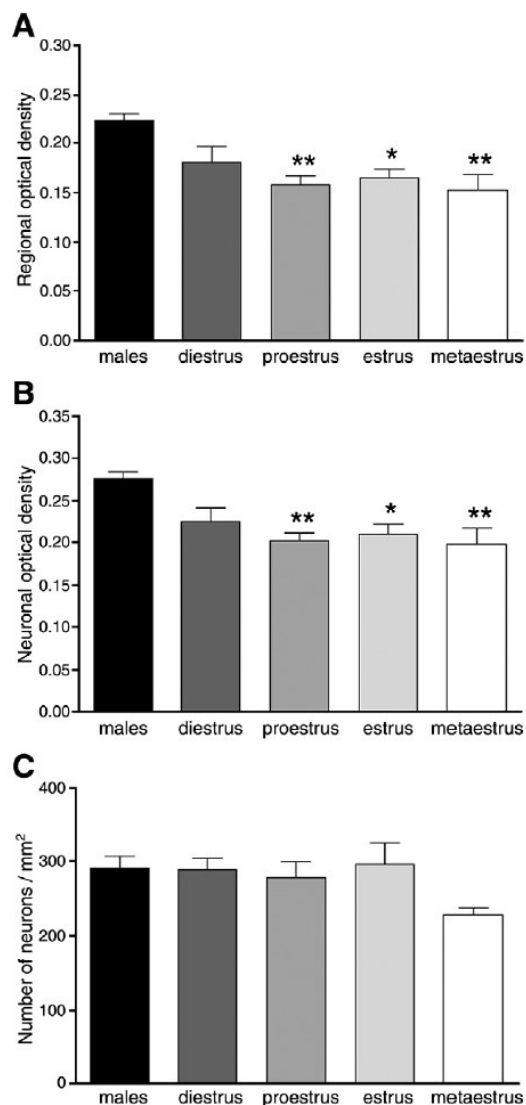


Fig. 3 – Values (mean  $\pm$  standard error of the mean) of the regional optical density for NADPH-d activity (A), neuronal optical density (B), and number of NADPH-d positive neurons (C) obtained from the posterodorsal medial amygdala of males and females in the different phases of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus, and metaestrus). \*\* corresponds to  $P < 0.01$  when compared to males; \* corresponds to  $P < 0.05$  when compared to males.

( $P < 0.01$ ). When neuronal optical density of males and diestrus females was compared, no statistically significant difference was found ( $P > 0.05$ ). No statistical difference was found for the values obtained in females across the different phases of the estrous cycle ( $P > 0.05$ ; Fig. 3). For the number of NADPH-d positive neurons in the MePD, no statistically significant difference was found when males and females

across of the estrous cycle were compared [ $F(4, 25) = 2.05$ ;  $P = 0.11$ ; Fig. 3].

The results obtained from OVXed females treated with V, EB alone, EB plus P, or P alone did not show a statistical significance for the NADPH-d regional optical density [ $F(3,16) = 2.86$ ;  $P = 0.07$ ], the NADPH-d neuronal optical density [ $F(3,16) = 1.84$ ;  $P = 0.18$ ], and for the number of NADPH-d

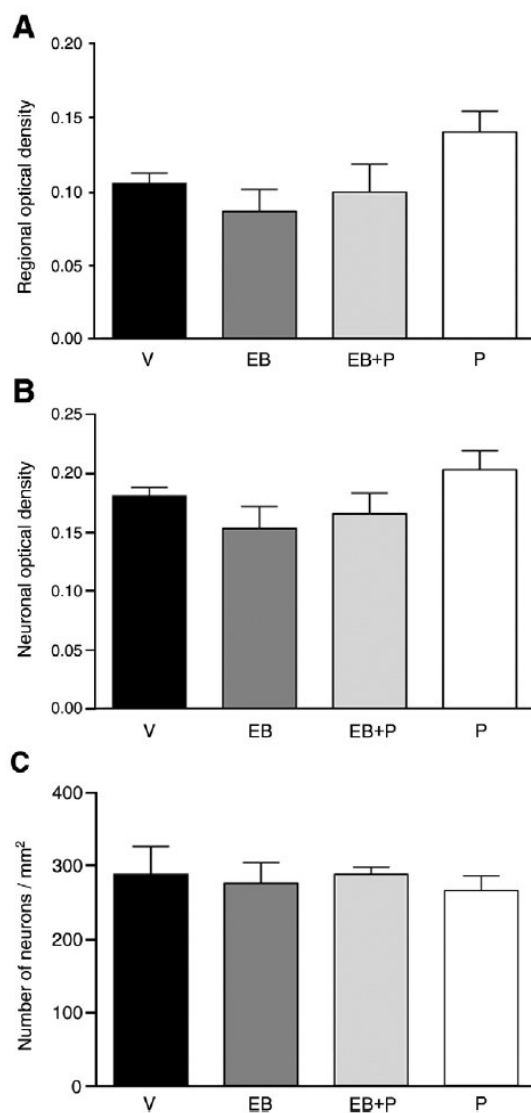


Fig. 4 – Values (mean  $\pm$  standard error of the mean) of the regional optical density for NADPH-d activity (A), neuronal optical density (B), and number of NADPH-d positive neurons (C) obtained from the posterodorsal medial amygdala of ovariectomized adult female rats treated with vehicle (V), estradiol benzoate alone (EB), estradiol benzoate plus progesterone (EB+P) or progesterone alone (P). No statistically significant differences were found among groups in these parameters.

positive neurons in the MePD of these groups [ $F(3,16)=0.10$ ;  $P=0.95$ ; Fig. 4].

### 3. Discussion

The present findings demonstrate that multipolar neurons in the MePD displayed NADPH-d activity and that regional and neuronal NADPH-d activity differed when males were compared with females across the estrous cycle. On the other hand, there were no differences between females in the estrous cycle or due to ovariectomy and to the supra-physiologic substitutive therapy of EB and/or P. In addition, there was no statistically significant difference in the number of NADPH-d positive neurons in the MePD among all the studied groups. These results are novel and add to the changes in the NADPH-d activity of the MeA subnuclei or interconnected brain areas in male and female rats.

#### 3.1. Functional correlations for the NADPH-d activity

Previously, a significant increase was demonstrated in the NADPH-d positive medium-stained cell density in the BAOT of estrus females (Collado et al., 2003). In this same study, the rise in plasma gonadal steroids induced an increase in the activity of a specific subpopulation of nitergic cells when compared to diestrus females. In the MeAV, female rats during the estrus had a significantly greater number of NADPH-d positive cells than diestrus females (Carrillo et al., 2007). Further comparisons showed that females during diestrus had a significant increase in the density of medium-stained cells in comparison to estrus females or to males (Carrillo et al., 2007). Furthermore, ovariectomy, besides significantly decreasing estradiol serum levels, also reduced nNOS and endothelial NOS expression in the hippocampus of rats (Grohé et al., 2004). A slow-release subcutaneous pellet containing  $17\beta$ -estradiol implanted during ovariectomy reverted these effects after 14 days (Grohé et al., 2004). In this present study, no such differences were found in the MePD between females across estrous cycle or following castration, while a difference between sexes was found when males were compared to proestrus, estrus and metaestrus females. Although, the functional meaning of NADPH-d activity is not completely elucidated, it is possible to conceive the existence of subregion-specific differences in the rat MeA subnuclei (MeAV and MePD) or interconnected areas, in which NO production and actions can be affected by sex steroids (Mizukawa et al., 1989; Vincent and Kimura, 1992; McDonald et al., 1993; Gotti et al., 2005; Carrillo et al., 2007).

It is possible that the number of NADPH-d positive cells does not always reflect the same amount of NOS-ir neurons in the mouse forebrain, with lower values for the former as demonstrated in the PVN, diagonal band of Broca, and medial septum (Gotti et al., 2004). These findings indicate that only a fraction of tissue and cellular nNOS protein present in these regions displays NO-producing enzymatic activity (Gotti et al., 2004). In this sense, it would be interesting to analyze the pattern of nNOS immunoreactivity in the MePD of the same experimental groups studied here and to compare data. Nevertheless, it is interesting to note that males have more

NADPH-d than females, except in the distrust phase. This sex difference can be either determined genetically or epigenetically by gonadal steroids. This indicates the need for further research to reveal the functional role of NO in the male MePD and its involvement with male-typical behaviors or adjustments of systemic physiological variables; for example, to reveal a possible role of NO in the modulation of intromissions and ejaculation during mating or for specific cardiovascular adjustments, for which compelling evidence indicates the MePD has a nodal point in different neural networks (Newman, 1999; de Castilhos et al., 2006; Quagliotto et al., 2008). In diestrus females, it has already been suggested that switches in the local MePD neurochemical control may be involved with the transition from one estrous phase to another (Rasia-Filho et al., 2004). The MePD activity in females might integrate chemosensory and visceral information with hormonal signals to co-ordinate the expression of stereotyped sexually dimorphic behaviors and timed neuroendocrine events (Newman, 1999; De Vries and Simerly, 2002; Rasia-Filho et al., 2004). However, it is currently difficult to predict the effect of NO on excitability in a certain brain area because NO may simultaneously enhance or decrease excitability (Prast and Philippu, 2001).

#### 3.2. Involvement of the NO with other neurotransmitters and hormones

Notable nNOS positive neurons were described in several hypothalamic and limbic nuclei (Bhat et al., 1996; Hadeishi and Wood, 1996), some of them involved in the control of reproduction (McDonald et al., 1993; Vincent and Kimura, 1992; Panzica et al., 2006; Carrillo et al., 2007). Cells that produce NO generally appeared as weakly or moderately stained small neurons, with large amounts of positive fibers (Panzica et al., 2006). The effects of NO on the reproductive behavior can be caused by its direct actions or indirectly via interactions with other neurochemical systems. For the latter, the involvement of NO in the control of reproduction can be modulated by gonadal hormones or mediated by the interaction with neurotransmitter systems (Panzica et al., 2006), such as dopamine in males (Hull and Dominguez, 2006) or noradrenaline in females (Chu and Etgen, 1996). It appears that the nNOS does not completely overlap with any other known neurotransmitter system, even though several studies have demonstrated co-localization with cholinacetyltransferase, serotonin, and numerous neuropeptides (Panzica et al., 1998; Prast and Philippu, 2001; Panzica et al., 2006). NO activates the release of gonadotrophin hormone-releasing hormone (GnRH), which enables the lordosis reflex in rats (McCann et al., 2003) and NO also induces erection and ovulation in rats (McCann et al., 1999, 2003). In OVXed female rats treated with EB and P, the NO/cGMP/protein kinase G pathway is involved with the lordosis behavior induced by P administration (Gonzalez-Flores and Etgen, 2004; Panzica et al., 2006). Treatment with competitive inhibitors of nNOS attenuated P-induced lordosis, whereas administration of a NO donor facilitates sexual behavior in females (Mani et al., 1994; Panzica et al., 2006). In male rats, the treatment with L-arginine facilitates sexual behavior, whereas administration of nNOS inhibitors reduced the

number of mounts and prevented ejaculation (Benelli et al., 1995; Sato et al., 1998; Panzica et al., 2006).

In male and female rats, NADPH-d cells co-localize with ER $\alpha$  and ER $\beta$  in the VMH (Okamura et al., 1994b) whereas nNOS-ir co-localizes with AR in the ventral premammillary nucleus of male rats (Yokosuka et al., 1997). In females, estradiol increases NADPH-d staining in the rat hypothalamic periventricular nucleus (PVN; Sanchez et al., 1998) and MPOA (Okamura et al., 1994a), also increasing nNOS mRNA in the ventrolateral subdivision of the rat VMH (Ceccatelli et al., 1996). These studies indicate that there is a relationship between gonadal hormone receptors and nNOS or NADPH-d activity in specific brain nuclei. The rat MePD presents ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and P receptors (PR) whose number and possible actions might change in OVXed females with hormonal substitutive therapy (Gréco et al., 2001; de Castilhos et al., 2008). In spite of these adaptive post-castration changes, the present results indicate that they did not affect the subpopulation of NADPH-d neurons in the female MePD. Therefore, data suggest that NADPH-d activity in the rat MePD is different between sexes but, in females, it is not affected by changing levels of circulating gonadal hormones in physiological or supraphysiological conditions.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Animals

Adult male and female Wistar rats (3–5 months old) were housed in groups with access to food and water *ad libitum*, and room temperature was maintained around 22 °C in a 12 h light/dark cycle (lights off at 6 PM) under standard laboratory conditions. The age of the experimental animals is in accordance with previous reports (Rasia-Filho et al., 2002; 2004; Martinez et al., 2006; de Castilhos et al., 2008). All efforts were made to minimize the number of animals studied and their suffering. Rats were manipulated according to international laws for the ethical care and use of laboratory animals (European Communities Council Directive of 24 November 1986, 86/609/EEC).

Vaginal smears were taken from virgin females during the 2 weeks prior to the beginning of the experiment to determine the regularity of estrous cycle. The presence of leucocytes and epithelial and/or keratinized cells obtained from the vaginal wall was evaluated on microscopic images (Smith et al., 1975; Freeman, 1994). That is, presently no blood samples were collected to correlate with estrous cycle. Instead, classic cytological criteria were used to determine the estrous phases assuming that ovarian steroids could be correlated with them. Only normally cycling females were studied. In the first experiment, females ( $n=6$  in each group) were sacrificed in the afternoon (around 4 PM) of each phase of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus, and metaestrus). In the proestrus phase, an additional group was studied in the morning (around 10 AM) to allow a further "within group" comparison due to the variation in the ovarian hormone levels in circulation during this phase (Freeman, 1994). In the second experiment, virgin females were submitted to surgical ovariectomy under ketamine and xylazine anesthesia (20 and

80 mg/kg *i.p.*, respectively). After 1 week of recovery, animals were submitted to substitutive therapy [ $n=5$  in the vehicle (V) group and in the P alone group;  $n=6$  in the EB alone group; and  $n=4$  in the EB + P group]. The first group received two injections of sesame oil (V; 0.1 mL, *s.c.*) 24 h apart, and a third injection of oil 48 h later. The second group received two injections of EB (Sigma Chemicals Co., USA; 10  $\mu$ g/0.1 mL, *s.c.*) 24 h apart, and a third injection of sesame oil 48 h later. Rats in the third group received two EB injections (10  $\mu$ g/0.1 mL, *s.c.*) as performed in the second group, and the third injection containing P (Sigma Chemicals Co., USA; 500  $\mu$ g/0.1 mL, *s.c.*) 48 h later. And the fourth group received two injections of sesame oil (0.1 mL, *s.c.*) 24 h apart, and a third injection of P 48 h later. In all groups, the last injection was given 5 h before sacrifice (adjusted from de Castilhos et al., 2008 and references therein).

### 4.2. Histochemical procedure

The NADPH-d histochemical technique was adapted from Carrillo et al. (2007). For this purpose, NADPH (Sigma Chemicals Co., USA) was employed as a substrate and nitro blue tetrazolium (NBT; Sigma Chemicals Co., USA) as chromogen, producing the insoluble dark blue precipitate formazan (Hope and Vincent, 1989). This served for the semi-quantification of the data obtained.

All animals were anaesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, *i.p.*; Cristalia, Brazil) and injected with 1000 IU heparin (Cristalia, Brazil) in the left cardiac ventricle. Using a peristaltic pump (Control Company, Brazil, 20 mL/min), rats were transcardially perfused with 200 mL of saline solution followed by 200 mL of 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) diluted in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4, PBS) at room temperature. Brains were removed and post-fixed in the same fixative solution at room temperature for 4 h. Coronal sections (50  $\mu$ m) were obtained using a vibratome (Leitz, Germany). Sections were collected in saline and pre-incubated with 12  $\mu$ L of Triton X-100 (Sigma Chemicals Co., USA) diluted in 100 mL of PBS at room temperature for 10 min. Sections were incubated at 37 °C in a solution containing 5 mg of NADPH and 3 mg of NBT diluted in PBS for 1.5 h. For control of the enzymatic activity, some random sections were processed but had the substrate omitted. Afterwards, sections were rinsed in PBS, dehydrated in ethanol, cleared with xylene, and covered with Permount and coverslips. All experimental groups were processed together at the same time to avoid possible non-specific variations in the procedures and their results.

### 4.3. Data acquisition

The location of the MePD in all experimental groups was based on previous descriptions and at approximately 3.0 to 3.3 mm posterior to the bregma (Alheid et al., 1995; de Olmos et al., 2004). Both hemispheres were used (after Carrillo et al., 2007). The lateral position in relation to the optic tract and the ventral position related to the stria terminalis served as anatomical landmarks for the identification of the MePD (Fig. 5). Microscopic images of the brain slices were compared with schematic drawings from an atlas (Paxinos and Watson, 1998).

The intensity of the NADPH-d activity was measured by semi-quantitative densitometric analysis using a Nikon

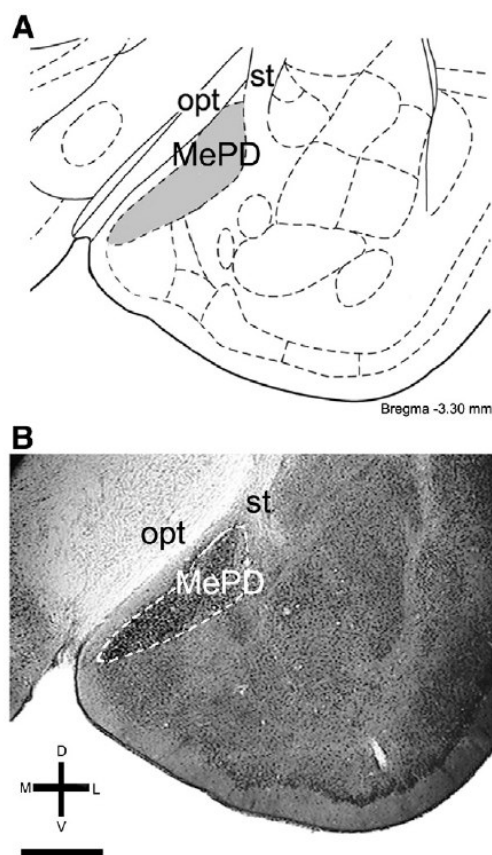


Fig. 5 – (A) Schematic representation and (B) cresyl violet staining of a coronal section showing the ventral aspect of the rat brain and the location of the posterodorsal medial amygdala (MePD). Image was near 3.30 mm posterior to the bregma, according to Paxinos and Watson (1998). opt, optic tract; st, stria terminalis. Coordinates are: D, dorsal; L, lateral; M, medial; V, ventral. Scale bar=800  $\mu\text{m}$ .

Eclipse E-600 microscope (400x, Japan) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and to the Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, USA). The digitized images obtained from MePD were converted to an 8-bit gray scale (0–255 gray levels). All lighting conditions and magnifications were held constant. Picture elements (pixels) employed to measure optical density were obtained from squares with 20.330  $\mu\text{m}^2$  (the area of interest, AOI) to evaluate regional density of the NADPH-d reaction and with 13  $\mu\text{m}^2$  for measuring each neuronal density obtained in the MePD. Obvious blood vessels and other artifacts were avoided. At least 25 sections were analyzed in the MePD from each studied group (5 sections per animal). Subtractions of background staining and background correction were done according to Xavier et al. (2005).

The optical density (OD) was calculated using the following formula:

$$OD(x,y) = -\log[\text{INT}_{(x,y)} - \text{BL}] / \text{INC} - \text{BL}$$

where  $OD(x,y)$  is the optical density at pixel $_{(x,y)}$ ,  $\text{INT}_{(x,y)}$  is the intensity at pixel $_{(x,y)}$ , BL (black) is the intensity generated when no light goes through the material, and “INC” is the intensity of the incident light.

The number of MePD NADPH-d-positive cells per studied microscopic field was counted using a Nikon Eclipse E-600 microscope (40x, Japan) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and to the Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, USA). At least 5 sections from each animal were used. Countings were done visually by a trained observer. A neuron was only counted when its cytological features and staining were considered indubitable when compared to the tissue background (Figs. 1 and 2).

#### 4.4. Statistical analysis

Data regarding the NADPH-d regional optical density, the NADPH-d neuronal optical density, and the NADPH-d neuronal counts from the MePD of males and females across the estrous cycle, and in a separate test, from ovariectomized females treated with the different substitutive therapies were compared by an one-way analysis of variance (ANOVA) test. When appropriate, *post hoc* comparisons were made using the Tukey test. In all cases, the level of statistical significance was set *a priori* at  $P < 0.05$ .

#### Acknowledgments

Grants are from the Brazilian Federal Agency Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). MAE and AARF are CNPq investigators.

#### REFERENCES

- Alheid, G.F., de Olmos, J.S., Beltramino, C.A., 1995. Amygdala and extended amygdala. *The Rat Nervous System*. Academic Press, San Diego, pp. 495–598.
- Bhat, G., Mahesh, V.B., Aguan, K., Brann, D.W., 1996. Evidence that brain nitric oxide synthase is the major nitric oxide synthase isoform in the hypothalamus of the adult female rat and nitric oxide potently regulates hypothalamic cGMP levels. *Neuroendocrinology* 64, 93–102.
- Benelli, A., Bertolini, A., Poggioli, R., Cavazzuti, E., Calza, L., Giardino, L., Arletti, R., 1995. Nitric oxide is involved in male sexual behavior of rats. *Eur. J. Pharmacol.* 294, 505–510.
- Canteras, N.S., Simerly, R.B., Swanson, L.W., 1995. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 360, 213–245.
- Carrillo, B., Pinos, H., Guillamón, A., Panzica, G., Collado, P., 2007. Morphometrical and neurochemical changes in the anteroventral subdivision of the rat medial amygdala during estrous cycle. *Brain Res* 1150, 83–93.
- Ceccatelli, S., Grandison, L., Scott, R.E., Pfaff, D.W., Kow, L.M., 1996. Estradiol regulation of nitric oxide synthase mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 64, 357–363.
- Choi, G.B., Dong, H.-W., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Swanson, L.W., Anderson, D.J., 2005. Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron* 46, 647–660.

- Chu, H.P., Etgen, A.M., 1996. Effects of nitric oxide stimulated release of norepinephrine from female rat hypothalamic slices. *Brain Res.* 741, 60–67.
- Collado, P., Guillamón, A., Pinos, H., Pérez-Izquierdo, M.A., García-Falgueras, A., Carrillo, B., Rodríguez, C., Panzica, G., 2003. NADPH-diaphorase activity increases during estrous phase in the bed nucleus of the accessory olfactory tract in the female rat. *Brain Res.* 983, 223–229.
- Cooke, B.M., Woolley, C.S., 2009. Effects of prepubertal gonadectomy on a male-typical behavior and excitatory synaptic transmission in the amygdala. *Dev. Neurobiol.* 69, 141–152.
- Cunningham, R.L., Claiborne, B.J., McGinnis, M.Y., 2007. Pubertal exposure to anabolic androgenic steroids increases spine densities on neurons in the limbic system of male rats. *Neuroscience* 150, 609–615.
- Dall'Oglio, A., Gehlen, G., Achaval, M., Rasia-Filho, A.A., 2008a. Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: further data based on the Golgi method. *Neurosci. Lett.* 430, 151–156.
- Dall'Oglio, A., Gehlen, G., Achaval, M., Rasia-Filho, A.A., 2008b. Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the “ventral” medial amygdala subnuclei of adult male and female rats. *Neurosci. Lett.* 439, 287–292.
- de Castilhos, J., Marcuzzo, S., Forti, C.D., Frey, R.M., Stein, D., Achaval, M., Rasia-Filho, A.A., 2006. Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. *Brain Res. Bull.* 69, 131–139.
- de Castilhos, J., Forti, C.D., Achaval, M., Rasia-Filho, A.A., 2008. Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: a Golgi study. *Brain Res.* 1240, 73–81.
- de la Torre, J.C., 2002. Vascular basis of Alzheimer's pathogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 977, 196–215.
- de Olmos, J.S., Beltramino, C.A., Alheid, G., 2004. Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. *The Rat Nervous System.* Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 509–603.
- De Vries, G.J., Simerly, R.B., 2002. Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. *Hormones, Brain and Behavior.* Academic Press, San Diego, pp. 137–191.
- Dong, H.-W., Petrovich, G.D., Swanson, L.W., 2001. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res. Rev.* 38, 192–246.
- Fan, L., Hanbury, R., Pandey, S.C., Cohen, R.S., 2008. Dose and time effects of estrogen on expression of neuron-specific protein and cyclic AMP response element-binding protein and brain region volume in the medial amygdala of ovariectomized rats. *Neuroendocrinol.* 88, 111–126.
- Freeman, M.E., 1994. *The ovarian cycle of the rat. The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York, pp. 613–657. ed.
- García-López, M., Abellán, A., Legaz, I., Rubenstein, J.L., Puelles, L., Medina, L., 2008. Histogenetic compartments of the mouse centromedial and extended amygdala based on gene expression patterns during development. *J. Comp. Neurol.* 506, 46–74.
- Garthwaite, J., Boulton, C.L., 1995. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 683–706.
- Gonzalez-Flores, O., Etgen, A.M., 2004. The nitric oxide pathway participates in estrous behavior induced by progesterone and some of its ring A-reduced metabolites. *Horm. Behav.* 45, 50–57.
- Gotti, S., Chiavegatto, S., Sica, M., Viglietti-Panzica, C., Nelson, R.J., Panzica, G., 2004. Alteration of NO-producing system in the basal forebrain and hypothalamus of Ts65Dn mice: an immunohistochemical and histochemical study of a murine model for Down Syndrome. *Neurobiol. Dis.* 16, 563–571.
- Gotti, S., Sica, M., Viglietti-Panzica, C., Panzica, G., 2005. Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. *Microsc. Res. Tech.* 68, 13–35.
- Gotti, S., Martini, M., Pradotto, M., Viglietti-Panzica, C., Panzica, G.C., 2009. Rapid changes on nitrinergic system in female mouse hippocampus during the ovarian cycle. *J. Chem. Neuroanat.* 38, 117–123.
- Gréco, B., Allegretto, E.A., Tetel, M.J., Blaustein, J.D., 2001. Coexpression of ER beta with ER alpha and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology* 142, 5172–5182.
- Grohé, C., Kann, S., Fink, L., Djoufack, P.C., Paehr, M., Van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R., Fink, K.B., 2004. 17 Beta-estradiol regulates nNOS and eNOS activity in the hippocampus. *Neuroreport* 15, 89–93.
- Hadeishi, Y., Wood, R.I., 1996. Nitric oxide synthase in mating behavior circuitry of male Syrian hamster brain. *J. Neurobiol.* 30, 480–492.
- Hermel, E.E.S., Ilha, J., Xavier, L.L., Rasia-Filho, A.A., Achaval, M., 2006. Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. *Neurosci. Lett.* 405, 153–158.
- Hope, B.T., Michael, G.J., Knigge, K.M., Vincent, S.R., 1991. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2811–2814.
- Hope, B.T., Vincent, S.R., 1989. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 653–666.
- Hull, E.M., Dominguez, J.M., 2006. Getting his act together: roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. *Brain Res.* 1126, 66–75.
- Hull, E.M., Lorrain, D.S., Du, J., Matuszewich, L., Lumley, L.A., Putnam, S.K., Moses, J., 1999. Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Beh. Brain Res.* 105, 105–116.
- Johnson, R.T., Breedlove, S.M., Jordan, C.L., 2008. Sex differences and laterality in astrocyte number and complexity in the adult rat medial amygdala. *J. Comp. Neurol.* 511, 599–609.
- Li, X., Schwartz, P.E., Rissmon, E.F., 1997. Distribution of estrogen receptor- $\beta$ -like immunoreactivity in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 66, 63–67.
- Mani, S.K., Allen, J.M., Rettori, V., McCann, S.M., O'Malley, B.W., Clark, J.H., 1994. Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 6468–6472.
- Martinez, F.G., Hermel, E.E.S., Xavier, L.L., Viola, G.G., Riboldi, J., Rasia-Filho, A.A., Achaval, M., 2006. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats. *Brain Res.* 1108, 117–126.
- Martini, M., Sica, M., Eva, C., Viglietti-Panzica, C., Panzica, G.C., 2004. Dimorphism and effects of estrous cycle on the nitrinergic system in mouse hypothalamus. *Horm. Behav.* 46, 95–96.
- McDonald, A.J., Payne, D.R., Mascagni, F., 1993. Identification of putative nitric oxide producing neurons in the rat amygdala using NADPH-diaphorase histochemistry. *Neuroscience* 52, 97–106.
- McCann, S.M., Mastronardi, C., Walczewska, A., Karanth, S., Rettori, V., Yu, W.H., 1999. The role of nitric oxide in reproduction. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 1367–1379.
- McCann, S.M., Haens, G., Mastronardi, C., Walczewska, A., Karanth, S., Rettori, V., Yu, W.H., 2003. The role of nitric oxide (NO) in control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior. *Curr. Pharm. Des.* 9, 381–390.
- Mizukawa, K., Vincent, S.R., McGeer, P.L., McGeer, E.G., 1989. Distribution of reduced-nicotinamide-adenine dinucleotide-phosphate diaphorase-positive cells and fibers in the cat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 8, 281–311.
- Morris, J.A., Jordan, C.L., Breedlove, S.M., 2008. Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is

- independent of circulating androgens and regional volume in adult rats. *J. Comp. Neurol.* 506, 851–859.
- Newman, S.W., 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 877, 242–257.
- Ohkuma, S., Katsura, M., 2001. Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 64, 97–108.
- Okamura, H., Yokosuka, M., Hayashi, S., 1994a. Estrogenic induction of NADPH-diaphorase activity in the preoptic neurons containing estrogen receptor immunoreactivity in the female rat. *J. Neuroendocrinol.* 6, 597–601.
- Okamura, H., Yokosuka, M., McEwen, B.S., Hayashi, S., 1994b. Colocalization of NADPH-diaphorase and estrogen receptor immunoreactivity in the rat ventromedial hypothalamic nucleus: stimulatory effect of estrogen on NADPH-diaphorase activity. *Endocrinology* 135, 1705–1708.
- Österlund, M., Kuiper, G.G., Gustafsson, J.A., Hurd, Y.L., 1998. Differential distribution and regulation of estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  mRNA within the female rat brain. *Mol. Brain Res.* 54, 175–180.
- Panzica, G.C., Cozzi, B., Viglietti-Panzica, C., 1998. Colocalization studies in the avian brain provide new insights on the roles of NO in higher vertebrates. *Eur. J. Anat.* 2, 63–76.
- Panzica, G.C., Viglietti-Panzica, C., Sica, M., Gotti, S., Martini, M., Pinos, H., Carrillo, B., Collado, P., 2006. Effects of gonadal hormones on central nitric oxide producing systems. *Neuroscience* 138, 987–995.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Petrovich, G.D., Canteras, N.S., Swanson, L.W., 2001. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res. Rev.* 38, 247–289.
- Prast, H., Philippu, A., 2001. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.* 64, 51–68.
- Quagliotto, E., Neckel, H., Riveiro, D.F., Casali, K.R., Mostarda, C., Irigoyen, M.C., Dall'ago, P., Rasia-Filho, A.A., 2008. Histamine in the posterodorsal medial amygdala modulates cardiovascular reflex responses in awake rats. *Neuroscience* 157, 709–719.
- Quinones, A.R., Camacho-Abrego, I., Rivera, N.A., Flores, G., Picazo, O., 2009. Morphological changes induced by the absence of ovarian hormones in nucleus accumbens of ovariectomized rats. *Open Neuroendocrinol. J.* 2, 31–35.
- Rasia-Filho, A.A., Xavier, L.L., dos Santos, P., Gehlen, G., Achaval, M., 2002. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and in the posterior medial amygdala of male and female rats. *Brain Res. Bull.* 58, 67–75.
- Rasia-Filho, A.A., Fabian, C., Rigoti, K.M., Achaval, M., 2004. Influence of sex, estrous cycle and motherhood in dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience* 126, 839–847.
- Rodrigo, J., Springall, D.R., Uttenthal, O., Bentura, M.L., Abadia-Molina, F., Riveros-Moreno, V., Martinez-Murillo, R., Polak, J.M., Moncada, S., 1994. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 345, 175–221.
- Roman, L.J., Martásek, P., Masters, B.S.S., 2002. Intrinsic and extrinsic modulation of nitric oxide synthase activity. *Chem. Rev.* 102, 1179–1190.
- Sanchez, F., Martínez, M.E., Rubio, M., Carretero, J., Moreno, M.N., Vázquez, R., 1998. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase activity in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus is modulated by estradiol. *Neurosci. Lett.* 253, 75–78.
- Sato, Y., Horita, H., Kurohata, T., Adachi, H., Tsukamoto, T., 1998. Effect of the nitric oxide level in the medial preoptic area on male copulatory behavior in rats. *Am. J. Physiol.* 274, R243–R247.
- Sheehan, T., Paul, M., Amaral, E., Numan, M.J., Numan, M., 2001. Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. *Neuroscience* 106, 341–356.
- Sheridan, P.J., 1979. The nucleus interstitialis striae terminalis and the nucleus amygdaloideus medialis: prime targets for androgen in the rat forebrain. *Endocrinology* 104, 130–136.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V., Merchenthaler, I.J., 1997. Comparative distribution of estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 388, 507–525.
- Simerly, R.B., 2004. *Anatomical substrates of hypothalamic integration. The Rat Nervous System*. Academic Press, San Diego, pp. 335–368.
- Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M., Swanson, L.W., 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 294, 76–95.
- Smith, M.S., Freeman, M.E., Neill, J.D., 1975. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96, 219–226.
- Vincent, S.R., 1994. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 42, 129–160.
- Vincent, S.R., Kimura, H., 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46, 755–784.
- Xavier, L.L., Viola, G.G., Ferraz, A.C., Da Cunha, C., Deonizio, J.M.D., Netto, C.A., Achaval, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res. Protoc.* 16, 58–64.
- Yokosuka, M., Prins, G.S., Hayashi, S., 1997. Co-localization of androgen receptor and nitric oxide synthase in the ventral premammillary nucleus of the newborn rat: an immunohistochemical study. *Dev. Brain Res.* 99, 226–233.
- Zemotaj, T., Penzkofer, T., Dandekar, T., Schultz, J., 2004. A novel conserved family of nitric oxide synthase? *Trends Biochem. Sci.* 29, 224–226.



## **Experimento 3**

*Influence of substitutive ovarian steroids in the nuclear and cell body volumes of neurons in the posterodorsal medial amygdala of adult ovariectomized female rats*

*Neuroscience Letters, in press*

*doi:10.1016/j.neulet.2009.11.036*



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neulet](http://www.elsevier.com/locate/neulet)

## Influence of substitutive ovarian steroids in the nuclear and cell body volumes of neurons in the posterodorsal medial amygdala of adult ovariectomized female rats

Juliana de Castilhos<sup>a,b</sup>, Erica E.S. Hermel<sup>b</sup>, Alberto A. Rasia-Filho<sup>c</sup>, Matilde Achaval<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ICBS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ICBS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 September 2009  
Received in revised form  
12 November 2009  
Accepted 12 November 2009

#### Keywords:

Amygdaloid complex  
Estradiol  
Progesterone  
Serial-section reconstruction  
Cavalieri method

### ABSTRACT

The volumes of the neuronal nucleus and the cell body in the left posterodorsal medial amygdala (MePD) of adult ovariectomized (OVX) female rats submitted to different hormonal therapies were studied here, aiming to reveal possible influence of substitutive sex steroids in these morphological parameters. One week following ovariectomy and at the end of treatments, brains were cut to semi-thin sections (1  $\mu\text{m}$ ) and stained with 1% toluidine blue for stereological estimations, carried out using the Cavalieri method and the technique of point counting. Both the volume of the neuronal nucleus and the soma showed a statistically significant difference when comparing the data among OVX females treated with vehicle (V), estradiol (EB) alone, EB plus progesterone (EB+P) or P alone [ $n=5$  rats in each group; one-way ANOVA test,  $P<0.01$  in both cases]. The Tukey test showed that OVX and EB+P treated females had higher mean neuronal nucleus and somatic volumes when compared to V ( $P<0.01$ ) or EB alone ( $P<0.01$ ). Also, OVX females treated with P alone showed larger mean neuronal nucleus and somatic volumes when compared to V ( $P<0.05$ ). These results suggest that the neuronal nucleus and the somatic volumes can be modulated by substitutive ovarian hormones administered to OVX females, for which P can lead to higher results. These findings reveal additional epigenetic actions of the sex steroids in the MePD and new neuronal morphological features in adult female rats.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

The medial amygdala (MeA) has been considered a part of the "extended amygdala" in the rat forebrain [1,13] and integrates sexually dimorphic pathways with the vomeronasal system and some specific hypothalamic nuclei [14,30,35]. Based on several morphological and functional criteria, the MeA was divided into the anterodorsal (MeAD), the anteroventral (MeAV), the posterodorsal (MePD), and the posteroventral (MePV) subnuclei [2,13,30,35]. The MePD has relevant roles in the modulation of the sexual and maternal behaviors [7,12,31,36,40].

Receptors for sexual steroids are remarkably found in the MePD, resembling the values found in different hypothalamic nuclei [16,17,25,32,41,42]. In this sense, neurons with androgen receptors shower higher concentrations in the posterior part of the MeA [42]. Neurons with both  $\alpha$  and  $\beta$  estradiol receptors (ER- $\alpha$  and ER- $\beta$ ) are found mainly in the MePD [16,17,25,32,41] as well as

progesterone receptors [14]. Then, it was not surprising that the gonadal hormones can alter the morphology of the MePD neurons and astrocytes [9,10,22,28,29].

The levels of gonadal hormones in circulation can affect the volume of the neuronal nucleus and the neuronal cell body area or volume in different brain areas [5,15,20,23,26,38]. Cell body organelles and nuclei can be targets for trophic actions of gonadal hormones [5,15,26]. For example, Hermel et al. [20] described an important sex difference in the mean somatic volume of MePD neurons, with males displaying larger cell bodies when compared to proestrus or estrus females. No statistical differences were found between males and diestrus females in this same study. The same sex difference in the mean somatic volume was previously described for the rat MePV, with higher values in males than in proestrus or estrus females, although not in diestrus ones [38]. No evidence of any lateralization effect on the neuronal somatic volume related to sex or due to estrous cycle phase could be found in the MePD or in the MePV, which indicates that the influence of sex steroids on this specific parameter occurs similarly on both brain hemispheres [20,38]. Because supraphysiological doses of ovarian hormones can alter the neuronal morphology of MePD neurons of adult female rats differently from that which occurs during the nor-

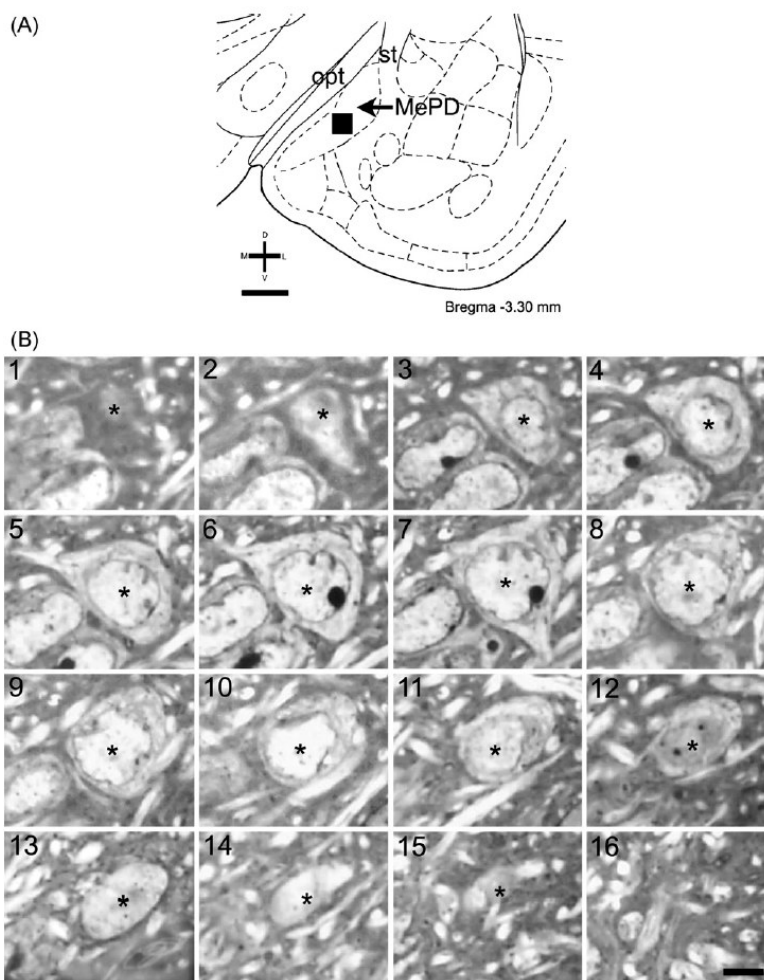
\* Corresponding author at: Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33083624; fax: +55 51 33083092/33083146.  
E-mail address: achaval@ufrgs.br (M. Achaval).

mal estrous cycle [11,36], we hypothesized that the same would happen for the neuronal volume in the present study. Our aims were to estimate the volumes of the MePD neuronal nuclei and cell bodies of ovariectomized (OVX) females treated with substitutive therapy. Here it was employed a stereological serial-section reconstruction, according to [8,20,24,38] and the Cavalieri method in association with the point counting technique [19].

Adult virgin female Wistar rats (3–4 months old) were housed in groups under standard laboratory conditions. They had access to food and water *ad libitum*, room temperature was maintained around 22 °C in a 12 h light:dark cycle (lights off at 6 AM). All efforts were made to minimise the number of animals studied and their suffering. In addition, all rats were manipulated according to international laws for the ethical care and use of laboratory animals

(European Communities Council Directive of 24 November 1986, 86/609/EEC) and to local guidelines on the ethical use of animals.

Vaginal smears were taken from virgin females during 2 weeks prior to the beginning of experiment to determine the regularity of estrous cycle. Only normally cycling females were used in this experiment. After that, rats were submitted to ovariectomy under ketamine and xylazine (80 and 10 mg/kg *i.p.*, respectively) anesthesia. After 1 week of recovery, animals were divided into four groups (each with  $n=5$ ). The first group received two injections of sesame oil as vehicle (V; 0.1 mL, *s.c.*) 24 h apart, and a third injection of oil 48 h later. The second group received two injections of estradiol benzoate (EB; Sigma Chemicals Co., USA; 10  $\mu\text{g}/0.1$  mL, *s.c.*) 24 h apart, and a third injection of sesame oil 48 h later. Rats in the third group received two injections of EB (10  $\mu\text{g}/0.1$  mL, *s.c.*)



**Fig. 1.** (A) Schematic representation of a coronal section of the rat brain showing the ventral location of the posterodorsal medial amygdaloid nucleus (MePD) at 3.30 posterior to the bregma. Adapted from [34]. Insert box represents the area from where data were obtained in the different experimental groups. D = dorsal; L = lateral; M = medial; opt = optic tract; st = stria terminalis; V = ventral. Scale bar = 800  $\mu\text{m}$ . (B) Digitized images of serial semi-thin sections from the female rat MePD showing the cell body and neuronal nucleus (\*) cut at different levels. The number of each micrograph indicates the corresponding section in the series from the top (1) to the bottom (16). Serial reconstruction and estimation of somatic volume was done after determining the border of the neuronal cell body and following the Cavalieri method and the point counting technique. Staining: toluidine blue. Bar: 5  $\mu\text{m}$ .

as performed in the second group, but the third injection was of progesterone (P; Sigma Chemicals Co., USA; 500 µg/0.1 mL, s.c.) 48 h later. And, the fourth group received 2 injections of sesame oil (0.1 mL, s.c.) 24 h apart, and a third injection of P 48 h later. In all groups, the last injection was given 5 h before sacrifice. The number of studied animals, injection dosages and protocols were based and adapted from previously published data [11,20,38].

At the end of this experimental step, animals were anaesthetised with sodium thiopental (50 mg/kg, i.p.; Cristalia, Brazil) and injected with 1000 IU heparin (Cristalia, Brazil) in the left cardiac ventricle. All animals were transcardially perfused, using a peristaltic pump (Control Company, Brazil, 20 mL/min), with 200 mL of saline solution followed by 100 mL of 0.5% glutaraldehyde (Sigma Chemicals Co., USA) and 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in a 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4, PBS) at room temperature. Brains were sectioned (100 µm) using a vibratome (Leica, Germany) and the sections were post fixed overnight in the same fixative solution, washed in PBS and post fixed in 1% OsO<sub>4</sub> (Sigma Chemicals Co., USA) in PBS for 1 h at room temperature. Sections were then washed with PBS and dehydrated in a graded series of alcohol and propylene oxide (Electron Microscopy Sciences, USA), embedded in resin (Durcupan, ACM-Fluka, Switzerland), remained in vacuum for 24 h, and, afterwards, were put onto slides with resin and polymerised for 48 h at 60 °C. Brain slices provided small pieces of tissue containing the MePD, approximately 3.30 mm posterior to the bregma (according to [34], Fig. 1A). Data were obtained from the left hemisphere. A rectangle containing the MePD was removed from the slides and glued onto resin blocks and polymerised once again for 48 h at 60 °C. Serial semi-thin sections (1 µm) were obtained using an ultramicrotome (RMC, USA) and were stained with 1% toluidine blue diluted in 1% sodium tetraborate.

Images were captured and digitalized using a Nikon Eclipse E-600 microscope (initially 1000× and further amplified 100% for analysis) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, USA). A minimum of 12 sections and 42 areas/point per neuronal soma were analysed and only the cell bodies that could be reliably and completely found along the series of sections were used for further quantitative evaluation (according to [20,38], Fig. 1B). Mean values for the volumes of the neuronal nucleus and the cell body were obtained from 15 MePD neurons per animal in each experimental group. Therefore, one mean value per rat was used for statistical analysis. This does not imply that that thousands of neurons in the MePD can be reduced to this number of cells studied here, and this is a methodological limitation of this study. Otherwise, present samples appeared to have come from the same subset of neurons and/or the somatic and nuclear volumes are rather homogeneous in the MePD because variation in the data is low.

The estimations of the neuronal nucleus and somatic volumes from the MePD were achieved using the Cavalieri method in association with the point counting technique [19]. Volume values were calculated using the following equation:

$$V = \sum P \cdot \frac{a}{p} \cdot T$$

where  $V$  = volume,  $\sum P$  = total of counted areas/point,  $a/p$  = area/point (8.98 µm<sup>2</sup>),  $T$  = thickness of the section (1 µm).

To obtain the underlying assumptions of data normality and homogeneity of variance, results were transformed using the weighted least squares method. Thereafter, data were compared among groups by a one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by the Tukey *post hoc* test. The statistical significant level was set as  $P < 0.05$ .

In the MePD, multipolar neurons exhibited a cell body with a thin rim of cytoplasm and a large, round, pale nucleus occupying the

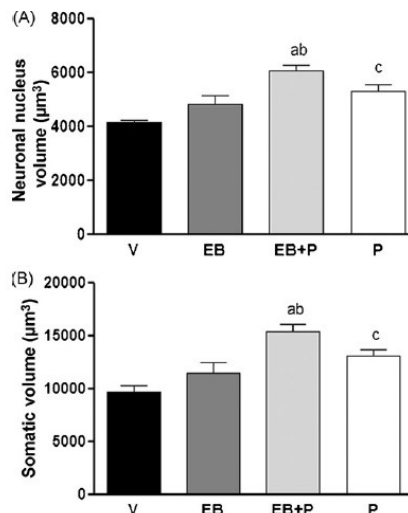


Fig. 2. Values are mean ± S.E.M. for the neuronal nucleus (A) and the cell body (B) volumes obtained from the posterodorsal medial amygdala of ovariectomized adult females rats treated with vehicle (V), estradiol benzoate alone (EB), estradiol benzoate plus progesterone (EB+P) and progesterone alone (P). "a" corresponds to  $P < 0.01$  when compared to V; "b" to  $P < 0.01$  when compared to EB; and, "c" at least to  $P < 0.05$  when compared to V.

centre of the soma, with a dense nucleolus and some heterochromatin granules against the nuclear membrane with indentations. From the soma, proximal portions of dendrites and an axon were identified in these neurons.

Data are summarized in Fig. 2. There was a statistically significant difference in the MePD mean neuronal somatic volume among groups [ $F(3,16) = 10.47$ ;  $P < 0.01$ ]. As evidenced by the *post hoc* test, EB alone is not different than V ( $P > 0.05$ ), but EB+P treated females showed highest MePD values when compared to females treated with V or females treated with EB alone ( $P < 0.01$  in both cases). In this same regard, females treated with P alone showed larger mean neuronal somatic volume compared to females treated with V ( $P < 0.05$ ). No differences were found when comparing females treated with EB alone or P alone, nor between EB+P and P treated females ( $P > 0.05$ ).

In addition, there was a statistically significant difference in the MePD mean neuronal nucleus volume among groups [ $F(3,16) = 13.48$ ;  $P < 0.01$ ]. The *post hoc* test showed a similar result as observed for the mean somatic volume. That is, EB alone did not promote statistically different results than V ( $P > 0.05$ ), whereas EB+P treated females showed the highest values when compared to females treated with V ( $P < 0.01$ ) or treated with EB alone ( $P < 0.01$ ). Again, females treated with P alone showed larger mean neuronal nucleus volume compared to V ( $P < 0.01$ ) and no statistically significant differences were observed when comparing data from the groups treated with EB alone or P alone, nor between EB+P and P alone treated females ( $P > 0.05$ ).

Data revealed that the estimated volumes of the neuronal cell body and nucleus of MePD neurons can be affected by substitutive therapy in adult OVX rats. Females treated with EB+P showed the highest mean values when compared to control females treated with V or females treated with EB alone. Interestingly, P potentiated these morphological effects. Although the structure of cell body organelles were not studied here, the parallel findings of the EB+P stimulatory effects in both the volume of the neuronal nucleus and

the volume of the cell body might suggest a causal relationship between them, as discussed in the next paragraphs.

Manipulation of the sex steroids can affect neuronal soma size in different brain areas. For example, OVX or diestrus adult female rats did not differ from each other in terms of neuronal cell body size, but in OVX females treated with estrogen and P the neuronal soma were larger than both groups in the medial preoptic area [23]. It is also interesting to note that the present results partially resemble the changes in the number of dendritic spines detected after OVX and hormonal replacement in the rat MePD [11]. For example, the dendritic spine density of OVX females treated with EB alone was higher than that of OVX females treated with oil, but dendritic spine density of OVX females treated with EB + P reached the highest values when compared to both oil-treated and EB-treated groups [11]. Moreover, OVX females treated with EB alone or EB + P increased the glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the MePD and MePV compared to control data [28]. Altogether, these findings would suggest that some common trophic morphological changes are set in motion after sex steroid replacement in the MePD of OVX females. Moreover, it is possible that MePD neurons may also be affected by estrogenic action on local glial cells [6,27] and/or indirectly by synaptic activity coming from other interconnected sex steroid-responsive brain areas [26].

Changes in the number and distribution of ER- $\alpha$  immunoreactivity have been detected in the brain of virgin, pregnant and lactating females, suggesting that changes in circulating estrogen levels affect the expression of this kind of receptor [4,33,43]. However, supraphysiological hormonal substitutive therapy after castration can lead to discrepancies compared to data obtained across the normal ovarian cycle and does not always mimic the physiological variations of these sex steroids [3,11,28,37]. It is possible that different adaptive expressions, regulation and actions of ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  and/or P receptors in OVX females promote morphological responses in different ways than during the estrous cycle. In effect, OVX females treated with EB showed a significant reduction in the number of neurons expressing both ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  and in the immunoreactivity for ER- $\alpha$  in the MePD 48 h after hormonal replacement [16]. The detection of ER- $\beta$  mRNA in the MePD showed a positive correlation with plasma P levels [21]. These modifications following OVX and the complex actions of EB and P in the neuronal morphology might also indicate direct actions for the hormonally dependent intracellular reorganization that occurs in the female MePD. They might involve a rise in nuclear Ca<sup>2+</sup>, the expression of brain-derived neurotrophic factor, cyclic AMP response element-binding protein expression and phosphorylation, insulin growth factor-1, and cytoskeleton dynamics [44–46].

The pathways by which sex hormones induce epigenetic intracellular anabolic effects are region- and time-specific [6]. The multiplicity of mechanisms leading to genomic action involves the combination of estrogen to cognate ERs with possible splice variants, binding to the promoter of target genes, interaction with specific coregulators, integrators and other factors to alter protein–protein interactions, nuclear transcription, and the synthesis of selected proteins [27]. The ERs also generate non-genomic actions initiated at the cell membrane and that involves signalling cascades, which also impact transcription and cellular plasticity [44].

Increased stacking of the rough endoplasmic reticulum [15], enlarged Golgi apparatus and the presence of pleomorphic mitochondria occurs in estrogen-treated OVX rats [5]. Progesterone can equally induce complex effects in neurons after hormonal replacement therapy [18]. Then, differences in the volume of cell body, nuclear or cytoplasmatic organelles involved with protein formation suggest that EB and P have trophic actions and can alter the metabolism of target neurons [26,39]. In addition, somatic volume modifications might affect biophysical properties of the cellular

membrane, synaptic computation, and cumulative neuronal activity [38]. It is interesting to suppose that the structural features modified by EB + P described here, probably due to a stimulated somatic protein synthesis altering the somatic membrane surface, would impact on the brain functions modulated by the MePD, an issue that requires further research efforts.

Present findings reveal additional epigenetic actions of the sex steroids in the MePD and new neuronal morphological features in adult female rats. They suggest that sex steroids can contribute to a hormonally regulated structural plasticity in the MePD of the adult OVX female rats. These data can also be adjoined to previously published results for the MePD neurons somatic volume changes under natural, cyclic conditions in the female rat MePD and the physiological/supraphysiological responses to sex steroids in this brain area [11,20,28].

#### Acknowledgments

Grants from CAPES and CNPq (Brazil).

#### References

- [1] G.F. Alheid, Extended amygdala and basal forebrain, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 985 (2003) 185–205.
- [2] G.F. Alheid, J.S. de Olmos, C.A. Beltramino, Amygdala and extended amygdala, in: G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*, Academic Press, San Diego, 1995, pp. 495–578.
- [3] J. Brusco, R. Wittmann, M.S. de Azevedo, A.B. Lucion, C.R. Franci, M. Giovannardi, A.A. Rasia-Filho, Plasma hormonal profiles and dendritic spine density and morphology in the hippocampal CA1 stratum radiatum, evidenced by light microscopy, of virgin and postpartum female rats, *Neurosci. Lett.* 438 (2008) 346–350.
- [4] E.M. Byrnes, J.A. Babb, R.S. Bridges, Differential expression of oestrogen receptor alpha following reproductive experience in young and middle-aged female rats, *J. Neuroendocrinol.* 21 (2009) 550–557.
- [5] H.F. Carrer, A. Aoki, Ultrastructural changes in the hypothalamic ventromedial nucleus of ovariectomized rats after estrogen treatment, *Brain Res.* 240 (1982) 221–233.
- [6] H.F. Carrer, M.J. Cambiasso, Sexual differentiation of the brain: genes, estrogen and neurotrophic factors, *Cell. Mol. Neurobiol.* 22 (2002) 479–500.
- [7] G.B. Choi, H.-W. Dong, A.J. Murphy, D.M. Valenzuela, G.D. Yancopoulos, L.W. Swanson, D.J. Anderson, Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus, *Neuron* 46 (2005) 647–660.
- [8] L.M. Cruz-Orive, E.R. Weibel, Recent stereological methods for cell biology: a brief survey, *Am. J. Physiol.* 4 (1990) 136–149.
- [9] R.L. Cunningham, B.J. Claiborne, M.Y. McGinnis, Pubertal exposure to anabolic androgenic steroids increases spine densities on neurons in the limbic system of male rats, *Neuroscience* 150 (2007) 609–615.
- [10] A. Dall'Oglio, G. Gehlen, M. Achaval, A.A. Rasia-Filho, Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: further data based on the Golgi method, *Neurosci. Lett.* 430 (2008) 151–156.
- [11] J. de Castilhos, C.D. Forti, M. Achaval, A.A. Rasia-Filho, Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: a Golgi study, *Brain Res.* 1240 (2008) 73–81.
- [12] J. de Castilhos, S. Marcuzzo, C.D. Forti, R.M. Frey, D. Stein, M. Achaval, A.A. Rasia-Filho, Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior, *Brain Res. Bull.* 69 (2006) 131–139.
- [13] J. de Olmos, C.A. Beltramino, G.F. Alheid, Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey, in: G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004, pp. 509–603.
- [14] G.J. De Vries, R.B. Simerly, Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain, in: D.W. Pfaff, A.P. Arnold, A.M. Etgen, S.E. Fahrbach, R.T. Rubin (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior*, Elsevier, New York, 2002, pp. 137–191.
- [15] M.S. Erskine, S. Miller, Ultrastructural effects of estradiol and 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol on neurons within the ventromedial nucleus of the hypothalamus, *Neuroendocrinology* 61 (1995) 669–679.
- [16] B. Gréco, E.A. Allegretto, M.J. Tetel, J.D. Blaustein, Coexpression of ER beta with ER alpha and progesterin receptor proteins in the female forebrain: effects of estradiol treatment, *Endocrinology* 142 (2001) 5172–5181.
- [17] B. Gréco, M.E. Blasberg, E.C. Kosinski, J.D. Blaustein, Response of ERalpha-IR and ERbeta-IR cells in the forebrain of females rats to mating stimuli, *Horm. Behav.* 43 (2003) 444–453.
- [18] C. Guerra-Araiza, O. Villamar-Cruz, A. González-Arenas, R. Chavira, I. Camacho-Arroyo, Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain

- during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments, *J. Neuroendocrinol.* 15 (2003) 984–990.
- [19] H.J.G. Gundersen, E.B. Jensen, The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction, *J. Microsc.* 147 (1987) 229–263.
- [20] E.E.S. Hermel, J. Ilha, L.L. Xavier, A.A. Rasia-Filho, M. Achaval, Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats, *Neurosci. Lett.* 405 (2006) 153–158.
- [21] C. Isgor, D.R. Sengelaub, Prenatal gonadal steroids affect adult spatial behavior, CA1 and CA3 pyramidal cell morphology in rats, *Horm. Behav.* 34 (1998) 183–198.
- [22] R.T. Johnson, S.M. Breedlove, C.L. Jordan, Sex differences and laterality in astrocyte number and complexity in the adult rat medial amygdala, *J. Comp. Neurol.* 511 (2008) 599–609.
- [23] L. Keyser-Marcus, G. Stafisso-Sandoz, K. Gerecke, A. Jasnow, L. Nightingale, K.G. Lambert, J. Gatewood, C.H. Kinsley, Alterations of medial preoptic area neurons following pregnancy and pregnancy-like steroidal treatment in the rat, *Brain Res. Bull.* 55 (2001) 737–745.
- [24] M. Ledda, L. Barni, L. Altieri, E. Pannese, Decrease in the nucleo-cytoplasmic volume ratio of rabbit spinal ganglion neurons with age, *Neurosci. Lett.* 286 (2000) 171–174.
- [25] X. Li, P.E. Schwartz, E.F. Rissmon, Distribution of estrogen receptor- $\alpha$ -like immunoreactivity in rat forebrain, *Neuroendocrinology* 66 (1997) 63–67.
- [26] M.D. Madeira, L. Ferreira-Silva, M.M. Paula-Barbosa, Influence of sex and estrus cycle on the sexual dimorphisms of the hypothalamic ventromedial nucleus: stereological evaluation and Golgi study, *J. Comp. Neurol.* 432 (2001) 329–345.
- [27] A. Maggi, P. Ciana, S. Belcredito, E. Vegeto, Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions, *Annu. Rev. Physiol.* 66 (2004) 291–313.
- [28] F.G. Martinez, E.E.S. Hermel, L.L. Xavier, G.G. Viola, J. Riboldi, A.A. Rasia-Filho, M. Achaval, Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats, *Brain Res.* 1108 (2006) 117–126.
- [29] J.A. Morris, C.L. Jordan, S.M. Breedlove, Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is independent of circulating androgens and regional volume in adult rats, *J. Comp. Neurol.* 506 (2008) 851–859.
- [30] S.W. Newman, The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social network, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877 (1999) 242–257.
- [31] J.G. Oberlander, M.S. Erskine, Receipt of vaginal–cervical stimulation modifies synapsin content in limbic areas of the female rat, *Neuroscience* 153 (2008) 581–593.
- [32] M. Osterlund, G.G. Kuiper, J.A. Gustafsson, Y.L. Hurd, Differential distribution and regulation of estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  mRNA within the female rat brain, *Mol. Brain Res.* 54 (1998) 175–180.
- [33] J.L. Pawluski, S. Brummelte, C.K. Barha, T.M. Crozier, L.A. Galea, Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging, *Front. Neuroendocrinol.* 30 (2009) 343–357.
- [34] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, San Diego, 1998.
- [35] G.D. Petrovich, N.S. Canteras, L.W. Swanson, Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavioural systems, *Brain Res. Rev.* 38 (2001) 247–289.
- [36] A.A. Rasia-Filho, C. Fabian, K.M. Rigoti, M. Achaval, Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method, *Neuroscience* 126 (2004) 839–847.
- [37] A.A. Rasia-Filho, L.L. Xavier, P. dos Santos, G. Gehlen, M. Achaval, Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats, *Brain Res. Bull.* 58 (2002) 67–75.
- [38] M.I.M. Rocha, R.G. Mestriner, E.E.S. Hermel, L.L. Xavier, A.A. Rasia-Filho, M. Achaval, Neuronal somatic volume of posteroventral medial amygdala cells from males and across the estrous cycle of female rats, *Neurosci. Lett.* 420 (2007) 110–115.
- [39] S.I. S3, M.D. Madeira, Neuronal organelles and nuclear pores of hypothalamic ventromedial neurons are sexually dimorphic and change during the estrus cycle in the rat, *Neuroscience* 133 (2005) 919–924.
- [40] T. Sheehan, M. Paul, E. Amaral, M.J. Numan, M. Numan, Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats, *Neuroscience* 106 (2001) 341–356.
- [41] P.J. Shughrue, M.V. Lane, I.J. Merchenthaler, Comparative distribution of estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  mRNA in the rat central nervous system, *J. Comp. Neurol.* 388 (1997) 507–525.
- [42] R.B. Simerly, C. Chang, M. Muramatsu, L.W. Swanson, Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an *in situ* hybridization study, *J. Comp. Neurol.* 294 (1990) 76–95.
- [43] A. Vanoye-Carlo, C.A. Mendoza-Rodriguez, T. Morales, E. Langley, M. Corb3n, Estrogen receptors increased expression during hippocampal neuroprotection in lactating rats, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 116 (2009) 1–7.
- [44] N. Vasudevan, D.W. Pfaff, Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain, *Front. Neuroendocrinol.* 29 (2008) 238–257.
- [45] L. Zhao, S. Chen, J. Ming Wang, R.D. Brinton, 17 $\beta$ -estradiol induces  $Ca^{2+}$  influx, dendritic and nuclear  $Ca^{2+}$  rise and subsequent cyclic AMP response element-binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism, *Neuroscience* 132 (2005) 299–311.
- [46] J. Zhou, H. Zhang, R.S. Cohen, S.C. Pandey, Effects of estrogen treatment on expression of brain-derived neurotrophic factor and cAMP response element-binding protein expression and phosphorylation in rat amygdaloid and hippocampal structures, *Neuroendocrinology* 81 (2005) 294–310.

## **5. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos nos diferentes experimentos desta tese permitem concluir que:

1. No **Experimento 1** analisou-se a atividade regional e neuronal da NADPH-d, além da contagem de neurônios NADPH-d-positivos na AMePD, comparando-se machos e fêmeas ao longo de todas as fases do ciclo estral (diestro, manhã e tarde do proestro, estro e metaestro).

1.1. Os presentes resultados demonstraram que os neurônios da AMePD apresentam diferenças na atividade regional e neuronal para NADPH-d quando comparados machos e fêmeas ao longo do ciclo estral.

1.2. Machos possuem maior atividade regional e neuronal da NADPH-d na AMePD quando comparados às fêmeas em proestro, estro e metaestro, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre machos e fêmeas em diestro nesses parâmetros estudados.

1.3. Também não houve diferença estatisticamente significante entre as fêmeas ao longo do ciclo estral.

1.4. Não houve diferenças estatisticamente significantes quanto ao número de neurônios NADPH-d-positivos na AMePD de machos ou de fêmeas ao longo do ciclo estral.

2. No **Experimento 2** analisou-se a atividade regional e neuronal da NADPH-d, além da contagem de neurônios NADPH-d-positivos na AMePD, comparando-se fêmeas OVX e submetidas a terapia substitutiva.

2.1. As fêmeas OVX tratadas com óleo, BE, BE+P ou P não demonstraram diferenças estatisticamente significativas para a atividade regional e neuronal da NADPH-d ou no número de neurônios NADPH-d-positivos na AMePD.



2.2 Esses dados sugerem que a atividade da NADPH-d na AMePD é diferente entre os sexos, mas, em fêmeas, não é afetada pelas mudanças nos níveis de hormônios gonadais circulantes, tanto em condições fisiológicas quanto supra-fisiológicas.

3. No **Experimento 3** analisou-se o volume somático e nuclear de neurônios da AMePD de fêmeas OVX submetidas a terapia substitutiva.

3.1. Os resultados demonstraram que o volume somático e nuclear dos neurônios da AMePD podem ser afetados pela manipulação hormonal em ratas ovariectomizadas.

3.2. Fêmeas tratadas com BE+P apresentaram maior volume somático e nuclear na AMePD quando comparadas às fêmeas controle (tratadas com óleo) ou tratadas somente com BE.

3.3. Fêmeas OVX tratadas somente com P apresentaram maior volume somático e nuclear quando comparadas às fêmeas controle (tratadas com óleo).

3.4. Esses resultados sugerem que níveis supra-fisiológicos de esteroides sexuais podem modular o volume somático e nuclear de ratas OVX, onde a ação conjunta de BE+P provocou maior efeito trófico do que somente a administração de BE, indicando que a P potencializa os efeitos estrogênicos nesses parâmetros na AMePD de fêmeas OVX.

4. Em conjunto, esses achados revelam ações adicionais dos esteroides sexuais na AMePD e novas características na morfologia neuronal em ratos machos e fêmeas adultos, complementando e avançando a literatura atual com resultados que ampliam o número de ações dos hormônios gonadais nesta área do telencéfalo de ratos.

## **6. PERSPECTIVAS**

1. Estudar a distribuição de nNOS na AMePD entre machos, fêmeas ao longo do ciclo estral e fêmeas ovariectomizadas submetidas a terapia hormonal substitutiva, utilizando imunistoquímica para nNOS associada à microscopia óptica.

2. Investigar um possível efeito da castração em machos de curta duração (8 dias) e de longa duração (90 dias) e da manipulação dos hormônios gonadais sobre o volume somático neuronal e nuclear da AMePD.

3. Investigar a densidade dos receptores específicos para estrógenos e progesterona na AMePD nas diferentes fases do ciclo estral a fim de elucidar essas interações. Assim como identificar os transmissores químicos e suas possíveis variações neste subnúcleo durante o ciclo estral.

O estudo desses dados nos permitirá obter achados relevantes que contribuam para definir a organização celular da AMePD, resultados esses, que combinados com outros dados morfológicos esclarecerão a atividade funcional desta área em ratos.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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

AGGLETON, J.P. *The Amygdala: A Functional Analysis* Oxford: University Press, 2000.

ALDERTON, W.K., COOPER, C.E., KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357(Pt 3), p. 593-615, 2001.

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

ALHEID, G.F., HEIMER, L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27(1), p. 1-39, 1988.

BALTHAZART, J., BALL, G.F. Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci* 29(5), p. 241-249, 2006.

BECKER, J.B., BREEDLOVE, S.M., CREWS, D., McCARTHY, M.M. *Behavioral Endocrinology*. Cambridge, MA: The MIT Press, 2002.

BENELLI, A., BERTOLINI, A., POGGIOLI, R., CAVAZZUTI, E., CALZA, L., GIARDINO, L., ARLETTI, R. Nitric oxide is involved in male sexual behavior of rats. *Eur J Pharmacol* 294(2-3), p. 505-510, 1995.

BHAT, G., MAHESH, V.B., AGUAN, K., BRANN, D.W. Evidence that brain nitric oxide synthase is the major nitric oxide synthase isoform in the hypothalamus of the adult female rat and that nitric oxide potently regulates hypothalamic cGMP levels. *Neuroendocrinology* 64(2), p. 93-102, 1996.

BONAVERA, J.J., KALRA, P.S., KALRA, S.P. L-arginine/nitric oxide amplifies the magnitude and duration of the luteinizing hormone surge induced by estrogen: involvement of neuropeptide Y. *Endocrinology* 137(5), p. 1956-1962, 1996.

BONELLO, N., MCKIE, K., JASPER, M., ANDREW, L., ROSS, N., BRAYBON, E., BRANNSTROM, M., NORMAN, R.J. Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1 beta-

enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol Reprod* 54(2), p. 436-445, 1996.

BRETT, D.S., FERRIS, C.D., SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 267(16), p. 10976-10981, 1992.

BRETT, D.S., GLATT, C.E., HWANG, P.M., FOTUHI, M., DAWSON, T.M., SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7(4), p. 615-624, 1991a.

BRETT, D.S., HWANG, P.M., GLATT, C.E., LOWENSTEIN, C., REED, R.R., SNYDER, S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351(6329), p. 714-718, 1991b.

BRETT, D.S., HWANG, P.M., SNYDER, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347(6295), p. 768-770, 1990.

BRETT, D.S., SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(22), p. 9030-9033, 1989.

BRETT, D.S., SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(2), p. 682-685, 1990.

BRETT, D.S., SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 63, p. 175-195, 1994.

BRODAL, A. The amygdaloid nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 87, p. 1-17, 1947.

BRUNING, G., FUNK, U., MAYER, B. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the brain of the chicken. *Neuroreport* 5(18), p. 2425-2428, 1994.

BRUNING, G., MAYER, B. Prenatal development of nitric oxide synthase in the mouse spinal cord. *Neurosci Lett* 202(3), p. 189-192, 1996.

- CANTERAS, N.S., SIMERLY, R.B., SWANSON, L.W. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 360(2), p. 213-245, 1995.
- CARRILLO, B., PINOS, H., GUILLAMON, A., PANZICA, G., COLLADO, P. Morphometrical and neurochemical changes in the anteroventral subdivision of the rat medial amygdala during estrous cycle. *Brain Res* 1150, p. 83-93, 2007.
- CECCATELLI, S., GRANDISON, L., SCOTT, R.E., PFAFF, D.W., KOW, L.M. Estradiol regulation of nitric oxide synthase mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 64(5), p. 357-363, 1996.
- CHOI, G.B., DONG, H.W., MURPHY, A.J., VALENZUELA, D.M., YANCOPOULOS, G.D., SWANSON, L.W., ANDERSON, D.J. Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron* 46(4), p. 647-660, 2005.
- CHU, H.P., ETGEN, A.M. A potential role of cyclic GMP in the regulation of lordosis behavior of female rats. *Horm Behav* 32(2), p. 125-132, 1997.
- COLLADO, P., GUILLAMON, A., PINOS, H., PEREZ-IZQUIERDO, M.A., GARCIA-FALGUERAS, A., CARRILLO, B., RODRIGUEZ, C., PANZICA, G. NADPH-diaphorase activity increases during estrous phase in the bed nucleus of the accessory olfactory tract in the female rat. *Brain Res* 983(1-2), p. 223-229, 2003.
- 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. *J Comp Neurol* 489(1), p. 42-58, 2005.
- COOKE, B.M., STOKAS, M.R., WOOLLEY, C.S. Morphological sex differences and laterality in the prepubertal medial amygdala. *J Comp Neurol* 501(6), p. 904-915, 2007.
- COOKE, B.M., WOOLLEY, C.S. Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *J Neurosci* 25(46), p. 10759-10767, 2005.

COOLEN, L.M., PETERS, H.J., VEENING, J.G. Distribution of Fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain. *Neuroscience* 77(4), p. 1151-1161, 1997.

CORNIL, C.A., BALL, G.F., BALTHAZART, J. Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: where do the estrogens come from? *Brain Res* 1126(1), p. 2-26, 2006.

CRUZ-ORIVE, L.M., WEIBEL, E.R. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol* 258(4 Pt 1), p. L148-156, 1990.

CUNNINGHAM, R.L., CLAIBORNE, B.J., MCGINNIS, M.Y. Pubertal exposure to anabolic androgenic steroids increases spine densities on neurons in the limbic system of male rats. *Neuroscience* 150(3), p. 609-615, 2007.

DALL'OGGIO, A. Morfologia dendrítica de neurônios do núcleo medial da amígdala de ratos : um estudo pela técnica de Golgi. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

DALL'OGGIO, A., GEHLEN, G., ACHAVAL, M., RASIA-FILHO, A.A. Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the "ventral" medial amygdala subnuclei of adult male and female rats. *Neurosci Lett* 439(3), p. 287-292, 2008a.

DALL'OGGIO, A., GEHLEN, G., ACHAVAL, M., RASIA-FILHO, A.A. Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: further data based on the Golgi method. *Neurosci Lett* 430(2), p. 151-156, 2008b.

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

DAWSON, T.M., DAWSON, V.L. Nitric oxide synthase: role as a transmitter/mediator in the brain and endocrine system. *Annu Rev Med* 47, p. 219-227, 1996.

DAWSON, T.M., SNYDER, S.H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14(9), p. 5147-5159, 1994.



DAYAS, C.V., BULLER, K.M., DAY, T.A. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur J Neurosci* 11(7), p. 2312-2322, 1999.

de CASTILHOS, J. Estudo sobre a ação dos hormônios gonadais na densidade de espinhos dendríticos na amígdala medial pósterodorsal de ratas. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

de CASTILHOS, J., FORTI, C.D., ACHAVAL, M., RASIA-FILHO, A.A. Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: a Golgi study. *Brain Res* 1240, p. 73-81, 2008.

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 Res Bull* 69(2), p. 131-139, 2006.

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

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

DIELENBERG, R.A., HUNT, G.E., MCGREGOR, I.S. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* 104(4), p. 1085-1097, 2001.

DIELENBERG, R.A., MCGREGOR, I.S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8), p. 597-609, 2001.

DOMINGUEZ, J.M., HULL, E.M. Stimulation of the medial amygdala enhances medial preoptic dopamine release: implications for male rat sexual behavior. *Brain Res* 917(2), p. 225-229, 2001.

DOMINGUEZ, J.M., MUSCHAMP, J.W., SCHMICH, J.M., HULL, E.M. Nitric oxide mediates glutamate-evoked dopamine release in the medial preoptic area. *Neuroscience* 125(1), p. 203-210, 2004.

DONG, H.W., PETROVICH, G.D., SWANSON, L.W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Brain Res Rev* 38(1-2), p. 192-246, 2001.

DU, J., HULL, E.M. Effects of testosterone on neuronal nitric oxide synthase and tyrosine hydroxylase. *Brain Res* 836(1-2), p. 90-98, 1999.

DUNCAN, G.E., KNAPP, D.J., BREESE, G.R. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res* 713(1-2), p. 79-91, 1996.

EGBERONGBE, Y.I., GENTLEMAN, S.M., FALKAI, P., BOGERTS, B., POLAK, J.M., ROBERTS, G.W. The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. *Neuroscience* 59(3), p. 561-578, 1994.

ERSKINE, M.S., MILLER, S. Ultrastructural effects of estradiol and 5 alpha-androstane-3 alpha, 17 beta-diol on neurons within the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Neuroendocrinology* 61(6), p. 669-679, 1995.

ETGEN, A.M. Ovarian steroid and growth factor regulation of female reproductive function involves modification of hypothalamic alpha 1-adrenoceptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1007, p. 153-161, 2003.

ETGEN, A.M., CHU, H.P., FIBER, J.M., KARKANIAS, G.B., MORALES, J.M. Hormonal integration of neurochemical and sensory signals governing female reproductive behavior. *Behav Brain Res* 105(1), p. 93-103, 1999.

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

FLEMING, A.S., VACCARINO, F., LUEBKE, C. Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat. *Physiol Behav* 25(5), p. 731-743, 1980.

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

FREEMAN, M.C., DUPKE, K.C., CROTEAU, C.M. Extinction of the estrogen-induced daily signal for LH release in the rat: a role for the proestrous surge of progesterone. *Endocrinology* 99(1), p. 223-229, 1976.

FREEMAN, M.E. The ovarian cycle of the rat. In: E. KNOBIL, J. NEILL. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994.

GARCIA-LOPEZ, M., ABELLAN, A., LEGAZ, I., RUBENSTEIN, J.L., PUELLES, L., MEDINA, L. Histogenetic compartments of the mouse centromedial and extended amygdala based on gene expression patterns during development. *J Comp Neurol* 506(1), p. 46-74, 2008.

GARCIA-SEGURA, L.M., CARDONA-GOMEZ, G.P., TREJO, J.L., FERNANDEZ-GALAZ, G.P., CHOWEN, J. Glial cells are involved in organizational and activational effects of sex hormones in brain. In: A. MATSUMOTO. *Sexual differentiation of the brain*. Florida: CRC Press, 1999.

GARCIA-SEGURA, L.M., McCARTHY, M.M. Minireview: Role of glia in neuroendocrine function. *Endocrinology* 145(3), p. 1082-1086, 2004.

GARTHWAITE, J., BOULTON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57, p. 683-706, 1995.

GARTHWAITE, J., CHARLES, S.L., CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336(6197), p. 385-388, 1988.

GARTHWAITE, J., GARTHWAITE, G., PALMER, R.M., MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172(4-5), p. 413-416, 1989.

GOMEZ, D.M., NEWMAN, S.W. Medial nucleus of the amygdala in the adult Syrian hamster: a quantitative Golgi analysis of gonadal hormonal regulation of neuronal morphology. *Anat Rec* 231(4), p. 498-509, 1991.

GOTTI, S., SICA, M., VIGLIETTI-PANZICA, C., PANZICA, G. Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. *Microsc Res Tech* 68(1), p. 13-35, 2005.

GRECO, B., EDWARDS, D.A., MICHAEL, R.P., CLANCY, A.N. Androgen receptors and estrogen receptors are colocalized in male rat hypothalamic and limbic neurons that express Fos immunoreactivity induced by mating. *Neuroendocrinology* 67(1), p. 18-28, 1998.

GREEN, L.C., RUIZ DE LUZURIAGA, K., WAGNER, D.A., RAND, W., ISTFAN, N., YOUNG, V.R., TANNENBAUM, S.R. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12), p. 7764-7768, 1981.

GREEN, L.C., TANNENBAUM, S.R., GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 212(4490), p. 56-58, 1981.

GREENSPAN, F.S., GARDNER, D.G. *Basic & Clinical Endocrinology*. New York: Lange Medical Books / McGraw-Hill, 2004.

GROSSMAN, A.B., ROSSMANITH, W.G., KABIGTING, E.B., CADD, G., CLIFTON, D., STEINER, R.A. The distribution of hypothalamic nitric oxide synthase mRNA in relation to gonadotrophin-releasing hormone neurons. *J Endocrinol* 140(2), p. R5-8, 1994.

GUILLAMON, A., SEGOVIA, S. Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res Bull* 44(4), p. 377-382, 1997.

GYURKO, R., LEUPEN, S., HUANG, P.L. Deletion of exon 6 of the neuronal nitric oxide synthase gene in mice results in hypogonadism and infertility. *Endocrinology* 143(7), p. 2767-2774, 2002.

HADEISHI, Y., WOOD, R.I. Nitric oxide synthase in mating behavior circuitry of male Syrian hamster brain. *J Neurobiol* 30(4), p. 480-492, 1996.

HAGIHARA, K., HIRATA, S., OSADA, T., HIRAI, M., KATO, J. Distribution of cells containing progesterone receptor mRNA in the female rat di- and telencephalon: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 14(3), p. 239-249, 1992.

HERBISON, A.E. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19(3), p. 302-330, 1998.

HERMEL, E.E. Caracterização ultra-estrutural e volumétrica somática dos neurônios do subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial de ratos adultos. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, UFRGS, 2005.

HERMEL, E.E., FACCIÓNI-HEUSER, M.C., MARCUZZO, S., RASIA-FILHO, A.A., ACHAVAL, M. Ultrastructural features of neurons and synaptic contacts in the posterodorsal medial amygdala of adult male rats. *J Anat* 208(5), p. 565-575, 2006a.

HERMEL, E.E., ILHA, J., XAVIER, L.L., RASIA-FILHO, A.A., ACHAVAL, M. Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. *Neurosci Lett* 405(1-2), p. 153-158, 2006b.

HIBBS, J.B., JR., TAINTOR, R.R., VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235(4787), p. 473-476, 1987.

HINES, M., ALLEN, L.S., GORSKI, R.A. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res* 579(2), p. 321-326, 1992.

HOPE, B.T., MICHAEL, G.J., KNIGGE, K.M., VINCENT, S.R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7), p. 2811-2814, 1991.

HOPE, B.T., VINCENT, S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J Histochem Cytochem* 37(5), p. 653-661, 1989.

HU, J., EL-FAKAHANY, E.E. Intricate regulation of nitric oxide synthesis in neurons. *Cell Signal* 8(3), p. 185-189, 1996.

HULL, E.M., DOMINGUEZ, J.M. Getting his act together: roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. *Brain Res* 1126(1), p. 66-75, 2006.

HULL, E.M., DU, J., LORRAIN, D.S., MATUSZEWICH, L. Testosterone, preoptic dopamine, and copulation in male rats. *Brain Res Bull* 44(4), p. 327-333, 1997.

HULL, E.M., LORRAIN, D.S., DU, J., MATUSZEWICH, L., LUMLEY, L.A., PUTNAM, S.K., MOSES, J. Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behav Brain Res* 105(1), p. 105-116, 1999.

HULL, E.M., MUSCHAMP, J.W., SATO, S. Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. *Physiol Behav* 83(2), p. 291-307, 2004.

IGNARRO, L.J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 53(4 Pt 1), p. 503-514, 2002.

IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRNS, R.E., CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24), p. 9265-9269, 1987.

IGNARRO, L.J., LIPPTON, H., EDWARDS, J.C., BARICOS, W.H., HYMAN, A.L., KADOWITZ, P.J., GRUETTER, C.A. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 218(3), p. 739-749, 1981.

JAFFREY, S.R., SNYDER, S.H. Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, p. 417-440, 1995.

JENNES, L., JENNES, M.E., PURVIS, C., NEES, M. c-fos expression in noradrenergic A2 neurons of the rat during the estrous cycle and after steroid hormone treatments. *Brain Res* 586(1), p. 171-175, 1992.

JOHNSON, R.T., BREEDLOVE, S.M., JORDAN, C.L. Sex differences and laterality in astrocyte number and complexity in the adult rat medial amygdala. *J Comp Neurol* 511(5), p. 599-609, 2008.

JOHNSTON, J.B. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain *J Comp Neurol* 35(5), p. 337-537, 1923.

KALRA, P.S., McCANN, S.M. The stimulatory effect on gonadotropin release of implants of estradiol or progesterone in certain sites in the central nervous system. *Neuroendocrinology* 19(4), p. 289-302, 1975.

KALRA, S.P. Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr Rev* 14(5), p. 507-538, 1993.

KAMAL, A.M., TOMBOL, T. Golgi studies on the amygdaloid nuclei of the cat. *J Hirnforsch* 16(3), p. 175-201, 1975.

KATO, J. Progesterone receptor in brain and hypophysis. In: D.W. PFAFF. *Current Topics in Neuroendocrinology*. Berlin: Springer Verlag, 1985.

KAWATA, M. Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci Res* 24(1), p. 1-46, 1995.

KELLEY, D.B. Sexually dimorphic behaviors. *Annu Rev Neurosci* 11, p. 225-251, 1988.

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

KLEIN, S.L., CARNOVALE, D., BURNETT, A.L., WALLACH, E.E., ZACUR, H.A., CRONE, J.K., DAWSON, V.L., NELSON, R.J., DAWSON, T.M. Impaired ovulation in mice with targeted deletion of the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *Mol Med* 4(10), p. 658-664, 1998.

KLING, A.S.B., L.A. The amygdala and social behavior. In: J.P. AGGLETON. *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss, 1922. p. 353-377.

KNAUF, C., PREVOT, V., STEFANO, G.B., MORTREUX, G., BEAUVILLAIN, J.C., CROIX, D. Evidence for a spontaneous nitric oxide release from the rat median eminence: influence on gonadotropin-releasing hormone release. *Endocrinology* 142(6), p. 2343-2350, 2001.

KNOWLES, R.G., PALACIOS, M., PALMER, R.M., MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(13), p. 5159-5162, 1989.

KONDO, Y. Lesions of the medial amygdala produce severe impairment of copulatory behavior in sexually inexperienced male rats. *Physiol Behav* 51(5), 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. *Physiol Behav* 57(1), p. 69-73, 1995.

KRETTEK, J.E., PRICE, J.L. A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J Comp Neurol* 178(2), p. 255-280, 1978.

LAGODA, G., MUSCHAMP, J.W., VIGDORCHIK, A., HULL, E.M. A nitric oxide synthesis inhibitor in the medial preoptic area inhibits copulation and stimulus sensitization in male rats. *Behav Neurosci* 118(6), p. 1317-1323, 2004.

LEDDA, M., BARNI, L., ALTIERI, L., PANNESE, E. Decrease in the nucleo-cytoplasmic volume ratio of rabbit spinal ganglion neurons with age. *Neurosci Lett* 286(3), p. 171-174, 2000.

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

LEHMAN, M.N., WINANS, S.S. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: autoradiographic and behavioral analyses. *Brain Res* 240(1), p. 27-41, 1982.

LI, X., SCHWARTZ, P.E., RISSMAN, E.F. Distribution of estrogen receptor-beta-like immunoreactivity in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 66(2), p. 63-67, 1997.



LORRAIN, D.S., HULL, E.M. Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. *Neuroreport* 5(1), p. 87-89, 1993.

LORRAIN, D.S., MATUSZEWICH, L., HOWARD, R.V., DU, J., HULL, E.M. Nitric oxide promotes medial preoptic dopamine release during male rat copulation. *Neuroreport* 8(1), p. 31-34, 1996.

MADEIRA, M.D., FERREIRA-SILVA, L., PAULA-BARBOSA, M.M. Influence of sex and estrus cycle on the sexual dimorphisms of the hypothalamic ventromedial nucleus: stereological evaluation and Golgi study. *J Comp Neurol* 432(3), p. 329-345, 2001.

MADEIRA, M.D., FERREIRA-SILVA, L., RUELA, C., PAULA-BARBOSA, M.M. Differential effects of the aging process on the morphology of the hypothalamic ventromedial nucleus of male and female rats. *Neurosci Lett* 314(1-2), p. 73-76, 2001.

MADEIRA, M.D., LEAL, S., PAULA-BARBOSA, M.M. Stereological evaluation and Golgi study of the sexual dimorphisms in the volume, cell numbers, and cell size in the medial preoptic nucleus of the rat. *J Neurocytol* 28(2), p. 131-148, 1999.

MANI, S.K., ALLEN, J.M., RETTORI, V., McCANN, S.M., O'MALLEY, B.W., CLARK, J.H. Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(14), p. 6468-6472, 1994.

MARCUZZO, S., DALL'OGGIO, A., RIBEIRO, M.F., ACHAVAL, M., RASIA-FILHO, A.A. Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. *Neurosci Lett* 424(1), p. 16-21, 2007.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 268(17), p. 12231-12234, 1993.

MARTINEZ, F.G. Estudo imunoistoquímico de filamentos intermediários astrocitários de subnúcleos da amígdala medial sob a ação de hormônios gonadais em ratos durante o desenvolvimento pós-natal e em ratas adultas. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

MARTINEZ, F.G., HERMEL, E.E., XAVIER, L.L., VIOLA, G.G., RIBOLDI, J., RASIA-FILHO, A.A., ACHAVAL, M. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats. *Brain Res* 1108(1), p. 117-126, 2006.

MATTHEWS, M.K., JR., KENYON, R. Four- versus five-day estrous cycles in rats: vaginal cycling and pregnancy. *Physiol Behav* 33(1), p. 65-67, 1984.

McCANN, S.M., HAENS, G., MASTRONARDI, C., WALCZEWSKA, A., KARANTH, S., RETTORI, V., YU, W.H. The role of nitric oxide (NO) in control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior. *Curr Pharm Des* 9(5), p. 381-390, 2003.

McCANN, S.M., MASTRONARDI, C., WALCZEWSKA, A., KARANTH, S., RETTORI, V., YU, W.H. The role of nitric oxide in reproduction. *Braz J Med Biol Res* 32(11), p. 1367-1379, 1999.

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

McDONALD, A.J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55(3), p. 257-332, 1998.

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

McEWEN, B.S. Gonadal steroid influences on brain development and sexual differentiation. *Int Rev Physiol* 27, p. 99-145, 1983.

McEWEN, B.S., ALVES, S.E. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20(3), p. 279-307, 1999.

McEWEN, B.S., COIRINI, H., WESTLIND-DANIELSSON, A., FRANKFURT, M., GOULD, E., SCHUMACHER, M., WOOLLEY, C. Steroid hormones as mediators of neural plasticity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39(2), p. 223-232, 1991.

McEWEN, B.S., COIRINI, H., SCHUMACHER, M. Steroid effects on neuronal activity: when is the genome involved? In: D. CHADWICK, K. WIDDOWS. *Steroids and Neuronal Activity*. Chichester, John Wiley & Sons, 1990. p. 3-12.

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

MERCHENTHALER, I., LANE, M.V., NUMAN, S., DELLOVADE, T.L. Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. *J Comp Neurol* 473(2), p. 270-291, 2004.

MEREDITH, M., WESTBERRY, J.M. Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. *J Neurosci* 24(25), p. 5719-5725, 2004.

MICEVYCH, P.E., MATT, D.W., GO, V.L. Concentrations of cholecystokinin, substance P, and bombesin in discrete regions of male and female rat brain: sex differences and estrogen effects. *Exp Neurol* 100(2), p. 416-425, 1988.

MIZUKAMI, S., NISHIZUKA, M., ARAI, Y. Sexual difference in nuclear volume and its ontogeny in the rat amygdala. *Exp Neurol* 79(2), p. 569-575, 1983.

MONCADA, S., PALMER, R.M., HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43(2), p. 109-142, 1991.

MORETTO, M., LOPEZ, F.J., NEGRO-VILAR, A. Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 133(5), p. 2399-2402, 1993.

MORRIS, J.A., JORDAN, C.L., BREEDLOVE, S.M. Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is independent of circulating androgens and regional volume in adult rats. *J Comp Neurol* 506(5), p. 851-859, 2008.

MURDOCH, F.E., GORSKI, J. The role of ligand in estrogen receptor regulation of gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 78(3), p. C103-108, 1991.

- NAFTOLIN, F. Understanding the bases of sex differences. *Science* 211(4488), p. 1263-1264, 1981.
- NELSON, R.J., CHIAVEGATTO, S. Molecular basis of aggression. *Trends Neurosci* 24(12), p. 713-719, 2001.
- NELSON, R.J., DEMAS, G.E., HUANG, P.L., FISHMAN, M.C., DAWSON, V.L., DAWSON, T.M., SNYDER, S.H. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* 378(6555), p. 383-386, 1995.
- NELSON, R.J., KRIEGSFELD, L.J., DAWSON, V.L., DAWSON, T.M. Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior. *Front Neuroendocrinol* 18(4), p. 463-491, 1997.
- NEWMAN, S.W. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann N Y Acad Sci* 877, p. 242-257, 1999.
- NISHIZUKA, M., ARAI, Y. Intrinsic connections in the medial amygdala as revealed by complete deafferentation. *Neurosci Lett* 35(3), p. 247-251, 1983a.
- NISHIZUKA, M., ARAI, Y. Male-female differences in the intra-amygdaloid input to the medial amygdala. *Exp Brain Res* 52(3), p. 328-332, 1983b.
- NISHIZUKA, M., ARAI, Y. Regional difference in sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *Exp Brain Res* 49(3), p. 462-465, 1983c.
- NISHIZUKA, M., PFAFF, D.W. Intrinsic synapses in the ventromedial nucleus of the hypothalamus: an ultrastructural study. *J Comp Neurol* 286(2), p. 260-268, 1989.
- ORO, A.E., SIMERLY, R.B., SWANSON, L.W. Estrous cycle variations in levels of cholecystokinin immunoreactivity within cells of three interconnected sexually dimorphic forebrain nuclei. Evidence for a regulatory role for estrogen. *Neuroendocrinology* 47(3), p. 225-235, 1988.
- OSTERLUND, M., KUIPER, G.G., GUSTAFSSON, J.A., HURD, Y.L. Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 54(1), p. 175-180, 1998.

PALMER, R.M., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122), p. 524-526, 1987.

PANZICA, G.C., AREVALO, R., SANCHEZ, F., ALONSO, J.R., ASTE, N., VIGLIETTI-PANZICA, C., AIJON, J., VAZQUEZ, R. Topographical distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase in the brain of the Japanese quail. *J Comp Neurol* 342(1), p. 97-114, 1994.

PANZICA, G.C., VIGLIETTI-PANZICA, C., SICA, M., GOTTI, S., MARTINI, M., PINOS, H., CARRILLO, B., COLLADO, P. Effects of gonadal hormones on central nitric oxide producing systems. *Neuroscience* 138(3), p. 987-995, 2006.

PAXINOS, G., WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press, 1998.

PETROVICH, G.D., CANTERAS, N.S., SWANSON, L.W. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Brain Res Rev* 38(1-2), p. 247-289, 2001.

PFAFF, D.W. *Neurobiological and molecular mechanisms of sexual motivation*. Cambridge: MIT Press, 1999.

PFAFF, D.W., PHILLIPS, M.I., RUBIN, R.T. *Principles of hormone/behavior relations*. New York: Elsevier Academic Press, 2004.

PFAUS, J.G., HEEB, M.M. Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Res Bull* 44(4), p. 397-407, 1997.

PILGRIM, C., REISERT, I. Differences between male and female brains--developmental mechanisms and implications. *Horm Metab Res* 24(8), p. 353-359, 1992.

PITKANEN, A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: J.P. AGGLETON. *The Amygdala*. New York: Willey-Liss, 2000. p. 31-115.

PRO-SISTIAGA, P., MOHEDANO-MORIANO, A., UBEDA-BANON, I., DEL MAR ARROYO-JIMENEZ, M., MARCOS, P., ARTACHO-PERULA, E., CRESPO, C., INSAUSTI, R., MARTINEZ-MARCOS, A. Convergence of olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon. *J Comp Neurol* 504(4), p. 346-362, 2007.

PUTNAM, S.K., SATO, S., RIOLO, J.V., HULL, E.M. Effects of testosterone metabolites on copulation, medial preoptic dopamine, and NOS-immunoreactivity in castrated male rats. *Horm Behav* 47(5), p. 513-522, 2005.

QUAGLIOTTO, E., NECKEL, H., RIVEIRO, D.F., CASALI, K.R., MOSTARDA, C., IRIGOYEN, M.C., DALL'AGO, P., RASIA-FILHO, A.A. Histamine in the posterodorsal medial amygdala modulates cardiovascular reflex responses in awake rats. *Neuroscience* 157(4), p. 709-719, 2008.

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* 15(5), p. 1029-1039, 1995.

RASIA-FILHO, A.A. Estudo sobre o dimorfismo sexual encontrado nos neurônios e na glia na amígdala medial. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

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* 126(4), p. 839-847, 2004.

RASIA-FILHO, A.A., GIOVENARDI, M., DE ALMEIDA, R.M. Drugs and aggression. *Recent Pat CNS Drug Discov* 3(1), p. 40-49, 2008.

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 Res Bull* 48(2), p. 173-183, 1999.

RASIA-FILHO, A.A., LONDERO, R.G., ACHAVAL, M. Functional activities of the amygdala: an overview. *J Psychiatry Neurosci* 25(1), p. 14-23, 2000.

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. *Braz J Med Biol Res* 24(10), p. 1041-1049, 1991.

RETTORI, V., BELOVA, N., DEES, W.L., NYBERG, C.L., GIMENO, M., McCANN, S.M. Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21), p. 10130-10134, 1993.

RETTORI, V., McCANN, S.M. Role of nitric oxide and alcohol on gonadotropin release in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 840, p. 185-193, 1998.

RIGOTI, K.M. Análise morfológica neuronal e da densidade de espinhos dendríticos da amígdala medial de ratas durante o ciclo estral. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

ROCHA, M.I., MESTRINER, R.G., HERMEL, E.E., XAVIER, L.L., RASIA-FILHO, A.A., ACHAVAL, M. Neuronal somatic volume of posteroventral medial amygdala cells from males and across the estrous cycle of female rats. *Neurosci Lett* 420(2), p. 110-115, 2007.

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

RODRIGO, J., SPRINGALL, D.R., UTTENTHAL, O., BENTURA, M.L., ABADIA-MOLINA, F., RIVEROS-MORENO, V., MARTINEZ-MURILLO, R., POLAK, J.M., MONCADA, S. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345(1312), p. 175-221, 1994.

ROMANO, G.J., KRUST, A., PFAFF, D.W. Expression and estrogen regulation of progesterone receptor mRNA in neurons of the mediobasal hypothalamus: an in situ hybridization study. *Mol Endocrinol* 3(8), p. 1295-1300, 1989.

SANCHEZ, F., MARTINEZ, M.E., RUBIO, M., CARRETERO, J., MORENO, M.N., VAZQUEZ, R. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase activity in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus is modulated by estradiol. *Neurosci Lett* 253(2), p. 75-78, 1998.

SANCHEZ, M.A., DOMINGUEZ, R. Differential effects of unilateral lesions in the medial amygdala on spontaneous and induced ovulation. *Brain Res Bull* 38(4), p. 313-317, 1995.

SAR, M., STUMPF, W.E. Autoradiographic localization of radioactivity in the rat brain after the injection of 1,2-<sup>3</sup>H-testosterone. *Endocrinology* 92(1), p. 251-256, 1973.

SATO, Y., HORITA, H., KUROHATA, T., ADACHI, H., TSUKAMOTO, T. Effect of the nitric oxide level in the medial preoptic area on male copulatory behavior in rats. *Am J Physiol* 274(1 Pt 2), p. R243-247, 1998.

SAVONENKO, A., FILIPKOWSKI, R.K., WERKA, T., ZIELINSKI, K., KACZMAREK, L. Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. *Neuroscience* 94(3), p. 723-733, 1999.

SCALIA, F., WINANS, S.S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 161(1), p. 31-55, 1975.

SCORDALAKES, E.M., SHETTY, S.J., RISSMAN, E.F. Roles of estrogen receptor alpha and androgen receptor in the regulation of neuronal nitric oxide synthase. *J Comp Neurol* 453(4), p. 336-344, 2002.

SHEEHAN, T., PAUL, M., AMARAL, E., NUMAN, M.J., NUMAN, M. Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. *Neuroscience* 106(2), p. 341-356, 2001.

SHERIDAN, P.J. The nucleus interstitialis striae terminalis and the nucleus amygdaloideus medialis: prime targets for androgen in the rat forebrain. *Endocrinology* 104(1), p. 130-136, 1979.

SHUGHRUE, P.J., LANE, M.V., MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388(4), p. 507-525, 1997.



SHUGHRUE, P.J., MERCHENTHALER, I. Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 436(1), p. 64-81, 2001.

SHUKOVSKI, L., TSAFRIRI, A. The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology* 135(5), p. 2287-2290, 1994.

SICA, M., MARTINI, M., VERZÈ, L., VIGLIETTI-PANZICA, C., PANZICA, G.C. Expression of nitric oxide synthase in the male mouse limbic system is mediated by estrogen receptors. *Trab. Inst. Cajal* [XXX], p. 47-48, 2007.

SIMERLY, R.B. Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behav Brain Res* 92(2), p. 195-203, 1998.

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

SIMERLY, R.B., CHANG, C., MURAMATSU, M., SWANSON, L.W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 294(1), p. 76-95, 1990.

SIMMONS, D.A., YAHR, P. GABA and glutamate in mating-activated cells in the preoptic area and medial amygdala of male gerbils. *J Comp Neurol* 459(3), p. 290-300, 2003.

SMITH, M.S., FREEMAN, M.E., NEILL, J.D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96(1), p. 219-226, 1975.

STEFANOVA, N., OVTSCHAROFF, W. Sexual dimorphism of the bed nucleus of the stria terminalis and the amygdala. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 158, p. III-X, 1-78, 2000.

STUEHR, D.J., GROSS, S.S., SAKUMA, I., LEVI, R., NATHAN, C.F. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med* 169(3), p. 1011-1020, 1989.

SWANSON, L.W., PETROVICH, G.D. What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21(8), p. 323-331, 1998.

TAKAHASHI, L.K., GLADSTONE, C.D. Medial amygdaloid lesions and the regulation of sociosexual behavioral patterns across the estrous cycle in female golden hamsters. *Behav Neurosci* 102(2), p. 268-275, 1988.

THOMAS, E., PEARSE, A.G. The Solitary Active Cells. Histochemical Demonstration of Damage-Resistant Nerve Cells with a Tpn-Diaphorase Reaction. *Acta Neuropathol* 3, p. 238-249, 1964.

TORAN-ALERAND, C.D. Developmental interactions of estrogens with neurotrophins and their receptors. In: P.E. MICEVYCH, R.P. HAMMER JR. *Neurobiological effects of sex steroid hormones*. New York: Cambridge, 1995. p. 391-411.

VINCENT, S.R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 42(1), p. 129-160, 1994.

VINCENT, S.R., KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46(4), p. 755-784, 1992.

VOCHTELOO, J.D., KOOLHAAS, J.M. Medial amygdala lesions in male rats reduce aggressive behavior: interference with experience. *Physiol Behav* 41(2), p. 99-102, 1987.

WANG, Z., DE VRIES, G.J. Androgen and estrogen effects on vasopressin messenger RNA expression in the medial amygdaloid nucleus in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 7(11), p. 827-831, 1995.

WAREMBOURG, M., LEROY, D., JOLIVET, A. Nitric oxide synthase in the guinea pig preoptic area and hypothalamus: distribution, effect of estrogen, and colocalization with progesterone receptor. *J Comp Neurol* 407(2), p. 207-227, 1999.

WILSON, M.A., MASCAGNI, F., McDONALD, A.J. Sex differences in delta opioid receptor immunoreactivity in rat medial amygdala. *Neurosci Lett* 328(2), p. 160-164, 2002.

WOOD, R.I. Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Horm Behav* 32(1), p. 40-45, 1997.

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

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. *J Comp Neurol* 336(2), p. 293-306, 1993.

WOOLLEY, C.S., WEILAND, N.G., MCEWEN, B.S., SCHWARTZKROIN, P.A. Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J Neurosci* 17(5), p. 1848-1859, 1997.

XAVIER, L.L., VIOLA, G.G., FERRAZ, A.C., DA CUNHA, C., DEONIZIO, J.M., NETTO, C.A., ACHAVAL, M. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Protoc* 16(1-3), p. 58-64, 2005.

XIE, M., HERMANN, A., KERSCHBAUM, H.H. Complementary distribution of NADPH-diaphorase and l-arginine in the snail nervous system. *Cell Tissue Res* 307(3), p. 393-400, 2002.

ZEHR, J.L., TODD, B.J., SCHULZ, K.M., MCCARTHY, M.M., SISK, C.L. Dendritic pruning of the medial amygdala during pubertal development of the male Syrian hamster. *J Neurobiol* 66(6), p. 578-590, 2006.

ZHOU, J., ZHANG, H., COHEN, R.S., PANDEY, S.C. Effects of estrogen treatment on expression of brain-derived neurotrophic factor and cAMP response element-binding protein expression and phosphorylation in rat amygdaloid and hippocampal structures. *Neuroendocrinology* 81(5), p. 294-310, 2005.