

DENISE RIBEIRO GOBBO

“Estudo das eferências do Núcleo Medial da Amígdala para o VMHvl, em ratas ooforectomizadas no início da puberdade”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt

Versão original

São Paulo, SP

2017

RESUMO

Gobbo DR. Estudo das eferências do Núcleo Medial da Amígdala para o Núcleo Ventromedial do Hipotálamo, em ratas ooforectomizadas no início da puberdade. [dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Na puberdade ocorrem mudanças significativas na organização de circuitos neurais com ajuda da ação dos hormônios esteroidais, levando a dimorfismos sexuais relevantes para a promoção de comportamentos adultos. A porção ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo [VMHvl] é o sítio neural que mais exerce controle do comportamento sexual feminino a partir da ação dos hormônios ovarianos. Dentre os núcleos que o aferentam, destaca-se o núcleo medial da amígdala [MEA], transmitindo informações essenciais para iniciar tal comportamento. Investigamos a densidade das projeções do núcleo MEA para o VMHvl, em ratas ooforectomizadas pré-pubescentes e em ratas controle. Foi feita a ooforectomia em ratas *Sprague-Dawley* com 35 dias de idade. Ao atingirem idade de 90 dias, injetamos por iontoforese o traçador anterógrado *Phaseolus vulgaris* no MEA. Notamos uma diferença na densidade de projeções e varicosidades do MEA para o VMHvl entre os grupos. Aparentemente, os hormônios ovarianos contribuem na organização das conexões do MEA com estruturas do circuito do comportamento sexual feminino.

Palavras-chave: Neuroanatomia. Amígdala. Puberdade. Conexões. Hipotálamo. Comportamento sexual feminino.

ABSTRACT

Gobbo DR. Efferent projections from the medial amygdala nucleus to Ventromedial Hypothalamus (VMHvl) in ovariectomized rats at early puberty. [Masters Dissertation (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

During puberty, significant changes occur to organize neural circuits, with steroid hormones action, leading to significant sexual dimorphism to promote adult behaviors. The ventrolateral portion of the ventromedial nucleus of the hypothalamus [VMHvl] is the major neural site controlling this behavior through the ovarian hormones action. One of the outputs to VMHvl, originated from the medial amygdala nucleus [MEA] transmit essential information to start such behavior. We investigate the projections density of MEA to VMHvl, in ovariectomized rats at early puberty. We performed ovariectomy Sprague-Dawley rats with approximately 35 days of age, when they reach the age of 90 days, we perform unilateral iontophoretic injections of neuronal anterograde tracer *Phaseolus-vulgaris Leucoagglutinin* into the MEA. Our results showed a possible difference in projections density of the MEA to VMHvl, between ovariectomized rats the onset of puberty and control. Therefore, ovarian hormones are important factors that contribute to the organization of MEA connections with structures of the circuit of female sexual behavior during puberty.

Keywords: Neuroanatomy. Amygdala. Puberty. Connections. Hypothalamus. Female sexual behavior.

1 INTRODUÇÃO

Durante períodos críticos específicos, o sistema nervoso central [SNC] é susceptível a agentes que organizam os circuitos neurais a fim de promover respostas frente a diferentes estímulos em fases mais tardias da vida. Em encéfalos imaturos, existe uma maior sensibilidade aos hormônios gonadais (Schwarz, McCarthy, 2008); de grande relevância para o desenvolvimento de um indivíduo, a fase perinatal, é bem conhecida pela exposição a hormônios esteroides femininos ou masculinos que levam à diferenciação sexual dos circuitos neurais e programação de comportamentos adultos (Romeo, Richardson, Sisk, 2002; Schulz, Sisk, 2006).

Entretanto, apesar de pouco compreendida, a puberdade é outra importante fase de desenvolvimento e remodelamento destes circuitos. Durante esse período, o sistema nervoso sofre importantes mudanças organizacionais que refinam a estrutura e função dos circuitos neurais, que poderão maturar a expressão de comportamentos da fase adulta (Romeo, Richardson, Sisk, 2002; Schulz, Sisk, 2006). Algumas das características notáveis durante a puberdade e adolescência é a elevada liberação de hormônios esteroidais gonadais e o remodelamento dos circuitos corticais e límbicos, que permitem a cognição da fase adulta, a tomada de decisões e estratégias e os comportamentos sociais (Sisk, Zehr, 2005). Portanto, a transição do jovem para a fase adulta envolve tanto maturação gonadal quanto a maturação comportamental em ambos os sexos de forma específica, uma vez que são processos intimamente ligados com interações entre o sistema nervoso e os hormônios gonadais (Sisk, Foster, 2004). Tais hormônios esteroides ainda exercem um papel fundamental para o desenvolvimento comportamental nesses períodos uma vez que podem influenciar a sobrevivência celular, o

fenótipo celular, a organização sináptica e a conectividade dentro dos circuitos neurais (Schulz, Sisk, 2006). Assim, tanto o hormônio testicular, testosterona, como os hormônios ovarianos exercem importante papel na diferenciação sexual dos circuitos neurais durante esse período de desenvolvimento, a fim de facilitar a expressão de comportamentos típicos de cada sexo, como pode ser observado no gráfico da figura 1 (Schulz, Molenda-Figueira, Sisk, 2009).

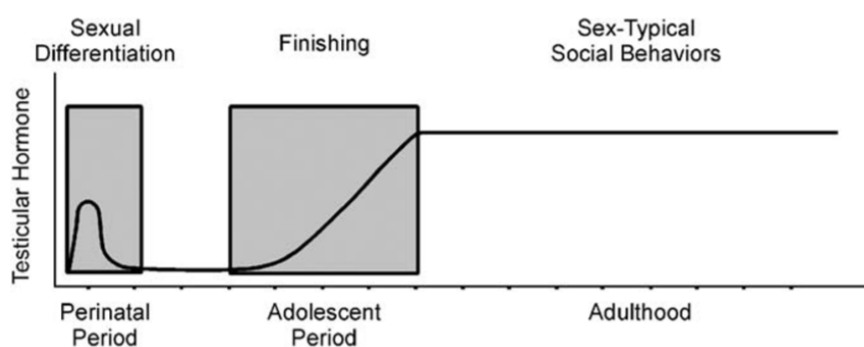


Figura 1 - Ilustração da relação entre as flutuações hormonais esteroidais em janelas específicas para e o dimorfismo sexual. Fonte: (Schulz, Sisk, 2006).

Segundo Phoenix e colaboradores (1959), o papel dos hormônios esteroidais pode ser dividido na fase organizacional, onde seus efeitos repercutem durante janelas específicas do desenvolvimento, como no período perinatal e puberdade, anteriormente descritos. Após esse período de maturação dos efeitos organizacionais, os hormônios esteroides também tem um importante papel em ativar esses circuitos neurais a fim de promover comportamentos sociais específicos na fase adulta, chamada fase de ativação, que se refere à capacidade desses hormônios de modificar a atividade de células alvo específicas a partir da presença ou ausência desses hormônios (Phoenix et al., 1959; Sisk, Zehr, 2005; Phoenix, 2009). Estudos recentes apontam que dimorfismos sexuais podem ser observados no tamanho de sítios neurais, induzidos pela ação hormonal, que possivelmente teria um efeito de estimular ou prevenir morte celular gerando tal

diferença e ainda nas conexões sinápticas e morfologia celular (Schwarz, McCarthy, 2008).

Além disso, a maioria dos mamíferos exibem tais dimorfismos em virtude das diversas funções, diferentes em ambos os sexos, e controladas pelo sistema nervoso como na secreção de gonadotrofinas; em comportamentos variados como o sexual, de ansiedade, de agressão, alimentar e ainda certas habilidades para aprendizado (Hier, Crowley, 1982; Brand, Slob, 1988; Primus, Kellogg, 1989; Schulz et al., 2004; Schulz, Sisk, 2006). Entre o repertório desses comportamentos adultos, pode se evidenciar o comportamento sexual, que é de grande importância para proliferação das espécies, além de ser uma ação de cunho motivado, evolutivamente conservada e, na maioria dos animais, está sob estreito controle hormonal.

Apesar desta dependência à exposição hormonal, o comportamento sexual em ratas fêmeas também é desencadeado por pistas sensoriais oriundas do macho. Para tanto, há uma caracterização a partir dos comportamentos sexuais, em receptivos e proceptivos, onde o comportamento receptivo se define pela postura de lordose, uma dorso-flexão das fêmeas para trás em resposta à montagem dos machos; enquanto que, o comportamento proceptivo inclui ações como: pular, balançar as orelhas e a estimulação do órgão sexual (Canteras et al., 2012).

Considerando o ciclo reprodutivo de ratas, no ciclo estral há uma sequência de liberação de hormônios ovarianos que se associam ao período da ovulação, como o estrógeno e a progesterona, participando amplamente na modulação do comportamento sexual feminino (Blaustein, Erskine, 2002). Assim, através da análise da citologia vaginal, é possível caracterizar o ciclo estral das ratas em quatro fases diferentes: diestro, proestro, estro e metaestro. Os níveis de

estrógeno começam a se elevar no metaestro, atingindo seu pico no proestro e retornando aos níveis basais no estro. Enquanto que a secreção de progesterona se eleva no metaestro e diestro, decaem e em seguida seus níveis atingem o segundo pico no final do proestro (Marcondes, Bianchi, Tanno, 2002).

Adicionalmente, os hormônios sexuais afetam o sistema nervoso de forma que se estendem além de suas ações essenciais, como regulação e secreção de gonadotrofinas e modulação do comportamento sexual (McEwen, Alves, 1999). Salientando para os hormônios sexuais femininos, resultados de estudos experimentais e clínicos indicam que o estrógeno pode também influenciar nos mecanismos de memória, cognição, estabilidade postural, habilidades motoras finas e alterações humorais; além de exercer uma ação protetora contra a neurodegeneração e lesões cerebrais (Maggi et al., 2004). Logo, o estrógeno teria como alvo distintos núcleos cerebrais e trabalhando através de mecanismos multifatoriais para atingir tal diversidade funcional (Maggi et al., 2004).

Assim, podemos dizer que a integração hormonal aos mecanismos neurais são os maiores contribuintes para o controle do comportamento (Blaustein, Erskine, 2002). O sítio neuronal de maior controle do comportamento sexual por hormônios ovarianos, já bastante estabelecido pela literatura, é o núcleo ventromedial do hipotálamo [VMH] que apresenta um grande número de neurônios que expressam receptores para o estrógeno (Flanagan-Cato, 2011), além de permitir a resposta de lordose, através de projeções para a substância cinzenta periaquedutal (Sa, Lukoyanova, Madeira, 2009). Ainda neste contexto, estudos demonstram que lesões no VMH eliminam a lordose em roedores (Malsbury, Kow, Pfaff, 1977; Pfaff, Sakuma, 1979), mas quando realizadas em ratas ooforectomizadas e tratadas por reposição hormonal de estrógeno, as mesmas

reestabelecem este comportamento (Mathews, Edwards, 1977; Georgescu, Pfaus, 2006). Anatomicamente, o VMH está localizado lateralmente ao terceiro ventrículo, na chamada divisão tuberal do hipotálamo e dorsalmente à eminência mediana. Subdividido em duas regiões, o VMH apresenta as porções ventrolateral [VMHvl] e a dorsomedial [VMHdm], com padrões de projeções axonais e aferências específicas, além de terem funções distintas (Flanagan-Cato, 2011). A subdivisão VMHvl é formada por um conjunto de células densamente compactadas e circundadas por uma zona pobre em neurônios e rica em fibras, conhecida como plexo lateral de fibras axonais e dendríticas [*lfc*]. Ainda, a parte VMHvl apresenta principalmente receptores necessários à regulação da receptividade sexual, como os receptores para estrógeno de ambos os subtipos ER α e ER β ; enquanto que, a parte VMHdm expressa receptores associados ao equilíbrio energético (Flanagan-Cato, 2011). Trabalhos com impregnação de Golgi e microscopia eletrônica indicam que as fibras dendríticas do VMHvl apresentam plasticidade morfológica frente às flutuações hormonais de estrógeno e progesterona (Griffin, Flanagan-Cato, 2011). Isso porque estudos em ratas ooforectomizadas previamente tratadas com estrógeno indicam um encurtamento dos dendritos do VMHvl restringindo uma potencial conexão sináptica com o *lfc* que promoveria a receptividade sexual da fêmea. O oposto foi observado em ratas ooforectomizadas tratadas com estrógeno e subsequentemente progesterona (Griffin, Flanagan-Cato, 2011) no qual há um alongamento dos dendritos.

O estrógeno ainda é apontado por regular o aumento dos níveis de neurotransmissores nas populações neurais que se projetam para o VMHvl, assim como a expressão de receptores para NMDA, GABA α e serotonina [5-HT] em neurônios do VMHvl (Sa et al., 2010). Sendo assim, alguns neurotransmissores

são apontados por promoverem um importante papel funcional deste núcleo. Os neurotransmissores GABA e glutamato são sugeridos em alguns trabalhos como possíveis mediadores envolvidos na plasticidade sináptica estrógeno induzida, influenciando no comportamento sexual (Luine et al., 1999). Isso porque estudos farmacológicos sugerem que agonistas do GABA facilitariam a lordose em ratas quando aplicados no VMHvl e na substância cinzenta periaquedutal [PAG]; enquanto que antagonistas GABAérgicos apontariam efeitos opostos. Em outro estudo realizado a partir de microinfusões bilaterais do aminoácido glutamato, resultaram na inibição potente e aguda da lordose, sendo reestabelecida após 20 minutos das infusões em ratas ooforectomizadas previamente tratadas com benzoato de estradiol (Luine et al., 1999; Griffin, Flanagan-Cato, 2011).

Ainda, experimentos têm demonstrado densas coleções neuronais contendo receptores esteroides gonadais em encéfalos de ratos em regiões como o núcleo medial da amígdala [MEA], o núcleo intersticial da estria terminal [BSTN] e o núcleo pré-óptico medial [MPN]. Esses núcleos são elementos chave no circuito neural que regula comportamentos sensíveis a esteroides e eventos neuroendócrinos de reprodução (Morrell, Krieger, Pfaff, 1986). A figura 2 esquematiza o circuito neural responsável pela promoção do comportamento sexual feminino.

Circuito neural

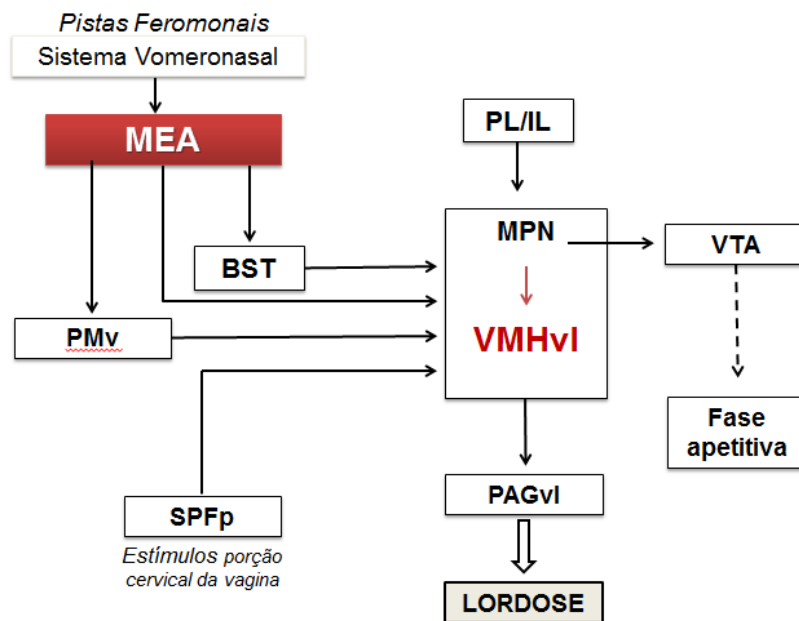


Figura 2 - Esquemática do circuito neural responsável pelo comportamento sexual feminino. Fonte: (Swanson, 2004; Griffin, Flanagan-Cato, 2011; Canteras et al., 2012) modificado.

Entretanto, sinais relevantes para a lordose, que descem do sistema límbico e MPOA, tem uma influência inibitória. Desta forma, sugere-se que a facilitação da lordose pode exigir não apenas uma excitação das projeções do VMHvl para a PAG (Sakuma, Pfaff, 1979), mas também uma redução da inibição que chega na MEA e MPOA. Isso porque neurônios no VMHvl frequentemente dão origem a axônios colaterais que se projetam para a PAG assim como para MEApd e MPNm, sugerindo que a facilitação da lordose e a redução da inibição de outras vias podem ser funções da mesma população neural (Akesson, Ulibarri, Truitt, 1994).

Além disso, regiões como BSTN, MEA e MPN contêm na maioria das células ambos ER's, enquanto que certo número de neurônios expressa claramente apenas ER α ou ER β (Shughrue, Scrimo, Merchenthaler, 1998).

O MEA, portanto, é um núcleo de grande relevância para o presente estudo, por apresentar características anatômicas de dimorfismo sexual dentro do complexo amigdalóide além de promover o comportamento sexual feminino, veiculando a informação olfatória aos núcleos hipotalâmicos responsáveis por desempenhar tal comportamento, participando do circuito neuroanatômico que desencadeia a lordose. Por ser uma estrutura heterogênea, a organização de seus neurônios ainda não está clara, assim como sua morfologia e propriedades neuroquímicas (Rowniak, 2013; Keshavarzi et al., 2014). Experimentos recentes testaram a hipótese em que a plasticidade neural induzida por estrógeno envolveria uma possível regulação dos receptores para glutamato do tipo AMPA (Ferri et al., 2014). Com isso, foram observadas mudanças estruturais em espinhos dendríticos do VMHvl e amígdala central seguida de alterações observadas nos receptores AMPA (Ferri et al., 2014).

Sendo assim, o MEA tem sido implicado no controle hormonal do comportamento sexual feminino gerando importante papel nas mudanças neuroendócrinas no acasalamento e gravidez. Outros estudos investigaram os efeitos da estimulação química da porção pósterodorsal da MEA [zona de convergência de informações olfatórias, feromonais e estimulação genitosensorial] e propuseram que a ativação de receptores para glutamato [Glu] nessa região iniciaria uma série de eventos dentro de um grande circuito que participa das funções neuroendócrinas, possivelmente relacionada com a prenhez em ratas (Lehmann, Erskine, 2005).

Deste modo, é evidente o relevante papel dos hormônios ovarianos, não apenas para o exercício do comportamento sexual feminino e expressão da lordose em ratas, mas também na importante plasticidade morfológica em que pode

exercer no SNC. Principalmente nos sítios neurais em que atua modulando comportamento sexual feminino, em especial o VMHvl e MEA. No entanto, pouco se compreende a respeito da ação do estrógeno no SNC e os processos neurais que contribuem para as alterações morfológicas em que promove; como a respeito da organização esteroide-dependente dos circuitos neurais durante a puberdade para promoção de comportamentos em adultos. Ainda, os estudos relacionados às influências dos hormônios ovarianos durante a organização dos circuitos neurais em ratas estão aquém em relação ao dos machos.

Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar e comparar o circuito neural hormônio-dependente que modula o comportamento sexual feminino em ratas, considerando de principal interesse as eferências do núcleo MEA, em destaque para o VMHvl. A partir de diversos trabalhos que relatam alterações morfológicas deste núcleo entre o período da puberdade até a fase adulta, é questionável se tais alterações afetam no padrão ou intensidade das eferências do núcleo MEA em animais adultos que não passaram pela ação de hormônios ovarianos durante a fase púbere [idade crítica para diferenciação sexual e aquisição de comportamentos sexuais].

2 CONCLUSÕES

- Estabelecemos as conexões do MEA com o VMHvl tanto no GCa quanto no GOa, assim como nas demais estruturas que compõem o circuito neural responsável pelo comportamento sexual feminino.
- A ooforectomia realizada em ratas em idade pré-púbere promoveu uma diferente organização das conexões, analisadas quantitativamente na fase adulta, em particular das projeções do MEA para o VMHvl.
- Os animais controle, que passaram pela fase púbere com atuação dos hormônios ovarianos, apresentaram quantidade de varicosidades das projeções do MEA para VMHvl substancialmente maior que as ratas adultas ooforectomizadas no início da puberdade.

REFERÊNCIAS*

Akesson TR, Micevych PE. Estrogen concentration by substance P-immunoreactive neurons in the medial basal hypothalamus of the female rat. *Journal of neuroscience research*. 1988;19(4):412-9, 70-1.

Akesson TR, Ulibarri C, Truitt S. Divergent axon collaterals originate in the estrogen receptive ventromedial nucleus of hypothalamus in the rat. *Journal of neurobiology*. 1994;25(4):406-14.

Aronin N, Coslovsky R, Leeman SE. Substance P and neurotensin: their roles in the regulation of anterior pituitary function. *Annual review of physiology*. 1986;48:537-49.

Blaustein JD, Erskine MS. Feminine Sexual Behavior: Cellular Integration of Hormonal and Afferent Information in the Rodent Forebrain. In: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT, editors. *Hormone, Brain and Behavior* New York: Academic Press; 2002. p. 139-214.

Brand T, Slob AK. Peripubertal castration of male rats, adult open field ambulation and partner preference behavior. *Behavioural brain research*. 1988;30(2):111-7.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *The Journal of comparative neurology*. 1994;348(1):41-79.

Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *The Journal of comparative neurology*. 1995;360(2):213-45.

Canteras NS, Watson C, Paxinos G, Puelles L. Ingestive, Reproductive and Defensive in the Mouse Nervous. *Hypothalamic Goal-Directed Behavior: System Elsevier*; 2012. p. 539-57.

Cooke BM, Tabibnia G, Breedlove SM. A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(13):7538-40.

Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic pathology*. 2015;43(6):776-93.

Dorner G, Staudt J. Structural changes in the hypothalamic ventromedial nucleus of the male rat, following neonatal castration and androgen treatment. *Neuroendocrinology*. 1969;4(4):278-81.

Elliott PJ, Iversen SD. Behavioural effects of tachykinins and related peptides. *Brain research*. 1986;381(1):68-76.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Ferri SL, Hildebrand PF, Way SE, Flanagan-Cato LM. Estradiol regulates markers of synaptic plasticity in the hypothalamic ventromedial nucleus and amygdala of female rats. *Hormones and behavior*. 2014;66(2):409-20.

Flanagan-Cato LM. Estrogen-induced remodeling of hypothalamic neural circuitry. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2000;21(4):309-29.

Sex differences in the neural circuit that mediates female sexual receptivity. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2011;32(2):124-36.

Georgescu M, Pfau JG. Role of glutamate receptors in the ventromedial hypothalamus in the regulation of female rat sexual behaviors I. Behavioral effects of glutamate and its selective receptor agonists AMPA, NMDA and kainate. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2006;83(2):322-32.

Gomez DM, Newman SW. Medial nucleus of the amygdala in the adult Syrian hamster: a quantitative Golgi analysis of gonadal hormonal regulation of neuronal morphology. *The Anatomical record*. 1991;231(4):498-509.

Differential projections of the anterior and posterior regions of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster. *The Journal of comparative neurology*. 1992;317(2):195-218.

Griffin GD, Flanagan-Cato LM. Ovarian hormone action in the hypothalamic ventromedial nucleus: remodelling to regulate reproduction. *Journal of neuroendocrinology*. 2011;23(6):465-71.

Guillamon A, Segovia S, del Abril A. Early effects of gonadal steroids on the neuron number in the medial posterior region and the lateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Brain research Developmental brain research*. 1988;44(2):281-90.

Hier DB, Crowley WF, Jr. Spatial ability in androgen-deficient men. *The New England journal of medicine*. 1982;306(20):1202-5.

Horta-Junior JAC, Lópes DE. Características morfofuncionales del reflejo auricular desencadenado por estímulos acústicos. [Doctoral]. Espanha: Universidad de Salamanca; 2008.

Keshavarzi S, Sullivan RK, Ianno DJ, Sah P. Functional properties and projections of neurons in the medial amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014;34(26):8699-715.

Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Description of a new method of ovariectomy in female rats. *Revista brasileira de reumatologia*. 2012;52(3):462-70.

Lehman MN, Powers JB, Winans SS. Stria terminalis lesions alter the temporal pattern of copulatory behavior in the male golden hamster. *Behavioural brain research*. 1983;8(1):109-28.

Lehman MN, Winans SS. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: autoradiographic and behavioral analyses. *Brain research*. 1982;240(1):27-41.

Lehman MN, Winans SS, Powers JB. Medial nucleus of the amygdala mediates chemosensory control of male hamster sexual behavior. *Science (New York, NY)*. 1980;210(4469):557-60.

Lehmann ML, Erskine MS. Glutamatergic stimulation of the medial amygdala induces steroid dependent c-fos expression within forebrain nuclei responsive to mating stimulation. *Neuroscience*. 2005;136(1):55-64.

Lephart ED. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain research Brain research reviews*. 1996;22(1):1-26.

Luine VN, Wu V, Hoffman CS, Renner KJ. GABAergic regulation of lordosis: influence of gonadal hormones on turnover of GABA and interaction of GABA with 5-HT. *Neuroendocrinology*. 1999;69(6):438-45.

Maggi A, Ciana P, Belcredito S, Vegeto E. Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. *Annual review of physiology*. 2004;66:291-313.

Malsbury CW, Kow LM, Pfaff DW. Effects of medial hypothalamic lesions on the lordosis response and other behaviors in remale golden hamsters. *Physiology & behavior*. 1977;19(2):223-37.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*. 2002;62(4a):609-14.

Mathews D, Edwards DA. Involvement of the ventromedial and anterior hypothalamic nuclei in the hormonal induction of receptivity in the female rat. *Physiology & behavior*. 1977;19(2):319-26.

Matsumoto A, Arai Y. Development of sexual dimorphism in synaptic organization in the ventromedial nucleus of the hypothalamus in rats. *Neuroscience letters*. 1986;68(2):165-8.

McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine reviews*. 1999;20(3):279-307.

Morrell JI, Krieger MS, Pfaff DW. Quantitative autoradiographic analysis of estradiol retention by cells in the preoptic area, hypothalamus and amygdala. *Experimental brain research*. 1986;62(2):343-54.

Naftolin F. Brain aromatization of androgens. *The Journal of reproductive medicine*. 1994;39(4):257-61.

Pfaff DW. Estrogen and brain function: Neural analysis of a hormone-controlled mammalian reproductive behavior. *Physiology of Reproduction*. New York Raven Press,; 1980. p. 1517-9

Pfaff DW, Sakuma Y. Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *The Journal of physiology*. 1979;288:203-10.

Phoenix CH. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Hormones and behavior*. 2009;55(5):566.

Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*. 1959;65:369-82.

Primus RJ, Kellogg CK. Pubertal-related changes influence the development of environment-related social interaction in the male rat. *Developmental psychobiology*. 1989;22(6):633-43.

Romeo RD, Richardson HN, Sisk CL. Puberty and the maturation of the male brain and sexual behavior: recasting a behavioral potential. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2002;26(3):381-91.

Rowniak M. The amygdala in the guinea pig is sexually dimorphic--a morphometric study. *Brain research*. 2013;1524:44-53.

Sa SI, Lukyanova E, Madeira MD. Effects of estrogens and progesterone on the synaptic organization of the hypothalamic ventromedial nucleus. *Neuroscience*. 2009;162(2):307-16.

Sa SI, Pereira PA, Paula-Barbosa MM, Madeira MD. Role of neural afferents as mediators of estrogen effects on the hypothalamic ventromedial nucleus. *Brain research*. 2010;1366:60-70.

Sakuma Y. Influences of neonatal gonadectomy or androgen exposure on the sexual differentiation of the rat ventromedial hypothalamus. *The Journal of physiology*. 1984;349:273-86.

Sakuma Y, Pfaff DW. Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. *The American journal of physiology*. 1979;237(5):R278-84.

Schenk MP, Manning RJ, Paalman MH. Going digital: image preparation for biomedical publishing. *The Anatomical record*. 1999;257(4):128-36.

Schulz KM, Molenda-Figueira HA, Sisk CL. Back to the future: The organizational-activational hypothesis adapted to puberty and adolescence. *Hormones and behavior*. 2009;55(5):597-604.

Schulz KM, Richardson HN, Zehr JL, Osetek AJ, Menard TA, Sisk CL. Gonadal hormones masculinize and defeminize reproductive behaviors during puberty in the male Syrian hamster. *Hormones and behavior*. 2004;45(4):242-9.

Schulz KM, Sisk CL. Pubertal hormones, the adolescent brain, and the maturation of social behaviors: Lessons from the Syrian hamster. *Molecular and cellular endocrinology*. 2006;254-255:120-6.

Schwarz JM, McCarthy MM. Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal. *Journal of neurochemistry*. 2008;105(5):1561-72.

Shughrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I. Evidence for the colocalization of estrogen receptor-beta mRNA and estrogen receptor-alpha immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinology*. 1998;139(12):5267-70.

Simerly RB, Young BJ, Capozza MA, Swanson LW. Estrogen differentially regulates neuropeptide gene expression in a sexually dimorphic olfactory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(12):4766-70.

Sisk CL, Foster DL. The neural basis of puberty and adolescence. *Nature neuroscience*. 2004;7(10):1040-7.

Sisk CL, Zehr JL. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2005;26(3-4):163-74.

Swanson LW. *Brain maps: structure of the rat brain* 3th ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2004.

Zehr JL, Todd BJ, Schulz KM, McCarthy MM, Sisk CL. Dendritic pruning of the medial amygdala during pubertal development of the male Syrian hamster. *Journal of neurobiology*. 2006;66(6):578-90.