



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Efeitos do stresse crónico sobre a estrutura dos neurónios piramidais da amígdala basolateral

Catarina Raposo de Oliveira Lima

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Dr. Pedro Morgado
Co-orientador: Prof.^a Doutora Graça Baltazar

Covilhã, Maio de 2012

Agradecimentos

A dissertação de mestrado representa para mim o final de uma etapa, o fechar de um ciclo de aprendizagem que durou seis anos e o início de outro que durará a vida inteira. Porque “nenhum homem é uma ilha”, não posso deixar de aqui mencionar aqueles que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Assim, e em primeiro lugar, tenho de agradecer o incentivo, compreensão e apoio incondicionais dos meus pais e irmãos. O que sou hoje devo-o a eles.

Devo também um enorme e eterno obrigada à minha família beirã, em especial aos meus avós, que me acolheram em sua casa e durante seis anos me providenciaram sempre as melhores condições para que a minha estadia pela Covilhã fosse a melhor possível.

Por ter sido o grande responsável pelo início desta grande aventura (e refiro-me à escolha do curso), não posso deixar de agradecer ao Professor Sobrinho Simões. Tudo começou naquela tarde solarenga, com uma conversa descontraída no seu jardim com vista sobre o mar... Foram os seus conselhos que me ajudaram a perceber que caminho haveria de seguir. São as suas palavras que ainda hoje me inspiram e me incitam a continuar.

Deixo também uma palavra de agradecimento ao Professor José Cascalheira, que no meu terceiro ano me abriu as portas do seu laboratório e me possibilitou dar os primeiros passos no mundo da Neurociência. Agradeço-lhe por me ter recebido no seu grupo de investigação, pela experiência fabulosa que me concedeu e por ter feito desse ano um dos melhores do meu curso.

Ao longo destes anos foram vários os professores e tutores que me marcaram e como tal sinto-me na obrigação de os mencionar e dizer-lhes “muito obrigada”. Assim, à Professora Luíza Granadeiro, pela competência e exigência; à Professora Graça Baltazar, minha co-orientadora, pelos conselhos e apoio; ao Professor Fonseca, por me ter mostrado a beleza da anatomia, a importância do estudo constante, pelo diagnóstico certo logo no meu primeiro ano e pelo apoio sempre demonstrado. À Dra. Paula Helena, por me ter aberto as portas do seu bloco operatório e me ter apresentado à Ortopedia; ao Dr. Valbom, pela inspiração, pela simplicidade e por me incitar a ser melhor; ao Dr. Henrique Martins, pelas provocações e pela linha de pensamento original; ao Professor Adrián Llerena, pelo brilhantismo e pelas *wake up calls*; à Dra. Isabel Almeida, pelos dias concedidos para as deslocações a Braga, imprescindíveis para a realização do meu trabalho. Um especial obrigada ao Dr. Guillermo Pastor, pelo estágio de Cirurgia que superou todas as minhas expectativas, pela autonomia

que me concedeu, por me dizer “obrigada” após cada cirurgia e pelas lágrimas nos olhos com que me deixou no final do estágio. No fundo, um obrigada por me ter feito perceber que no meio de tantas especialidades, as cirúrgicas são aquelas que melhor combinam com a minha maneira de ser.

Desde há muito tempo que pretendia fazer do Mestrado uma escapatória à vida clínica, que se iniciou há mais de três anos. Sabia que pretendia trabalhar em Neurociências; queria fazer algo que me preenchesse, que me entusiasmasse. A busca pelo tema da dissertação não foi fácil: envolveu uma série de conversas com outros investigadores e muitas noites mal dormidas. Mas dessas conversas, apesar de não ter resultado um projecto, surgiram lições que guardarei com apreço. Assim, deixo o meu obrigada ao Rui Costa e Albino Oliveira-Maia pelos conselhos que me deram há um ano atrás. Agradeço-lhes a frontalidade e a disponibilidade que demonstraram e por me terem dado a resposta às minhas questões, por muito difícil que seja compreendê-la ou aceitá-la.

No entanto, este trabalho jamais teria sido possível sem a admirável disponibilidade e abertura do Professor Nuno Sousa! Qualquer palavra de agradecimento que possa proferir será sempre insuficiente para demonstrar o que sinto. A história por detrás deste projecto é inacreditável! Num momento em que julgava que não iria encontrar um trabalho que me completasse, aconteceu o improvável. Com uma estranha do outro lado da linha, o Professor Nuno Sousa surpreendeu-me! Por “nunca dizer que não a quem tem vontade de trabalhar”, por me ter aberto as portas da sua Escola e me ter acolhido no seu laboratório ficar-lhe-ei eternamente grata!

Não posso ainda deixar de agradecer ao Pedro Morgado que, sem me conhecer e sem qualquer referência, aceitou orientar-me e me ajudou a delinear o projecto deste trabalho. Pela disponibilidade e flexibilidade, pela abertura, pela paciência, pelo apoio e incentivo e por tudo o que me ensinou devo-lhe um enorme obrigada.

Muitas vezes ouvi de familiares e amigos próximos (e de tutores até) que ter escolhido desenvolver o trabalho de mestrado em Braga tinha sido uma má opção, que me tinha envolvido em algo complicado, que exigia deslocações e muitas horas de trabalho árduo numa faculdade que não era a minha. No entanto, não só me senti em casa como nem por um segundo duvidei que esta foi talvez das melhores decisões que tomei durante os seis anos de curso. Hoje tenho a certeza disso. O Professor Nuno Sousa e o Pedro Morgado jamais terão noção do bem que me fizeram...

Finalmente, e como não poderia deixar de ser, agradeço o apoio dos amigos de faculdade mais próximos, companheiros nesta caminhada tão longa que agora termina. Obrigada Miguel,

Leonor, Daniela, Catarina, Mónica, António, Manuel, Adriano, Tiago, Patrícia, Liliana, Daniela Cristina e Filomena. A vossa amizade e a vossa ajuda foram absolutamente indispensáveis para chegar até aqui!

Hoje não sinto que esteja a terminar um projecto; sinto antes que este é um esboço, o começo de algo maior. O trabalho de mestrado é, assim, uma rampa de lançamento para o futuro. Objectivo cumprido!

Resumo

Introdução: Hoje em dia o ser humano é frequentemente confrontado com situações stressantes, que ao longo do tempo podem contribuir para o aparecimento de estados patológicos. A influência do stresse sobre o comportamento e as estruturas cerebrais tem sido extensivamente estudada, mas ainda não existe consenso sobre a forma como este actua sobre a amígdala, um componente essencial dos circuitos que medeiam a resposta ao stresse. Assim, o presente estudo procurou avaliar o impacto do stresse crónico sobre a morfologia e plasticidade sinápticas dos neurónios piramidais do núcleo basolateral da amígdala.

Métodos: Foi utilizado um modelo de stresse crónico imprevisível, a que foi exposto um grupo de ratos durante 28 dias, e avaliados diferentes parâmetros morfológicos da árvore dendrítica (comprimento dendrítico, número de dendrites basais, número de ramificações, intersecções e comprimento da dendrite apical) e da plasticidade sináptica (densidade total e por tipo de espinha).

Resultados: O paradigma de stresse utilizado induziu uma diminuição da densidade total e por tipo de espinha ao nível dos segmentos dendríticos distais, o que representa uma diminuição dos contactos sinápticos distais. Ao nível proximal deu-se apenas uma redução da densidade de espinhas do tipo *thick*. Relativamente aos aspectos morfológicos, verificou-se uma reestruturação das dendrites apicais em resposta ao stresse, não acompanhada por quaisquer outras modificações estruturais.

Discussão/Conclusão: Os dados obtidos sugerem que a amígdala é uma estrutura relativamente resistente aos efeitos do modelo de stresse utilizado, registando-se apenas um efeito significativo sobre os mecanismos de plasticidade sináptica e uma ligeira reestruturação dendrítica apical. Estes resultados contrastam com os obtidos com outros paradigmas de stresse, nomeadamente o de stresse crónico de imobilização. No entanto, a tradução comportamental destes efeitos não foi analisada neste estudo, pelo que se abrem novas linhas de investigação no sentido de compreender o real impacto dos efeitos estruturais do stresse sobre as acções dos organismos vivos.

Palavras-chave

Stresse crónico; amígdala basolateral; neurónios piramidais; morfologia dendrítica; plasticidade sináptica.

Abstract

Introduction: Nowadays human beings are frequently exposed to stressful situations, which over time may contribute to the onset of pathological states. The influence of stress on behavior and brain structures has been extensively studied, but there is still no agreement on how it acts on the amygdala, an essential component of the neural circuits mediating the stress response. Thus, this study was designed to evaluate the impact of prolonged stress on the morphology and synaptic plasticity of basolateral amygdala pyramidal neurons.

Methods: We used a chronic unpredictable stress paradigm, to which we exposed a group of rats for 28 days. We then analyzed different morphological parameters of the dendritic tree (dendritic length, number of basal dendrites, number of intersections and length of the apical dendrite) and synaptic plasticity (total and specific density of spines).

Results: Chronic stress exposed animals shown a significant reduction in distal spine density, which represents a decrease of distal synaptic contacts. Proximally, there was only a reduction on the density of thick spines. The morphological analysis revealed that chronic stress induced dendritic reorganization limited to the apical tree, which was not associated to other structural changes.

Discussion/Conclusion: Our data suggest that the amygdala is relatively resistant to chronic unpredictable stress. We found chronic stress induces subtle effects over synaptic plasticity mechanisms and dendritic remodeling, but the behavioral correlates of these effects were not studied. These results clearly contrast with those obtained with other stress paradigms, particularly with chronic immobilization stress. Further studies need to be done in order to understand the real impact of the structural effects of stress on behavior.

Keywords

Chronic unpredictable stress; basolateral amygdala; pyramidal neurons; dendritic morphology; synaptic plasticity.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	v
Abstract.....	vi
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Acrónimos.....	x
Introdução.....	1
Métodos.....	4
Animais e tratamentos	4
Procedimentos histológicos	4
Análise de dendrites.....	5
Análise estatística	6
Resultados.....	7
Efeito do stresse crónico sobre o arranjo da árvore dendrítica	7
Efeito do stresse crónico sobre a densidade de espinhas dendríticas	11
Discussão	13
Conclusão	16
Bibliografia.....	17

Lista de Figuras

Figura 1 - Análise do arranjo da árvore dendrítica dos neurónios piramidais da BLA	8
Figura 2 - Análise <i>Sholl</i> do arranjo da árvore dendrítica dos neurónios piramidais da BLA.. ..	10
Figura 3 - Classificação morfológica das espinhas dendríticas.....	12

Lista de Tabelas

Tabela 1- Efeitos do stresse crónico sobre o comprimento dendrítico dos neurónios piramidais da BLA	7
---	---

Lista de Acrónimos

ACTH	Corticotropina
BLA	Amígdala basolateral
BNST	Núcleo da estria terminal
CRH	Hormona libertadora de corticotropina
CUS	Stresse crónico imprevisível
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenais
PFC	Córtex pré-frontal

Introdução

O stresse está continuamente presente na vida quotidiana e o seu impacto sobre a saúde e o comportamento é cada vez mais reconhecido, sendo vários os estudos que procuram compreender os seus efeitos sobre a função e estrutura cerebral.

Perante um stressor, a clássica resposta de “fuga ou luta” é iniciada pela activação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais (HHA), com produção hipotalâmica de hormona de libertação de corticotropina (CRH) e vasopressina e consequente libertação de corticotropina (ACTH) pela hipófise anterior. Esta estimula o córtex adrenal, levando à elevação temporária de corticosteróides em circulação. Simultaneamente ocorre activação do sistema nervoso autónomo e aumento da secreção de catecolaminas, que, juntamente com os glucocorticóides e outros neuropéptidos, contribuem para uma adequada resposta ao stresse. Esta traduz-se, a nível comportamental, num aumento do estado de alerta, vigilância e atenção.¹⁻³ Gradualmente surgem os efeitos da regulação génica mediada pelos corticosteróides, através da acção sobre receptores de mineralo- e glucocorticóides, expressos em várias estruturas cerebrais. Os receptores de mineralocorticóides são responsáveis pela manutenção da excitabilidade e integridade estrutural das redes neuronais, estando ainda envolvidos no processo de avaliação da informação sensorial e sua organização. Por sua vez, os receptores de glucocorticóides encontram-se associados ao término da resposta ao stresse, normalização da homeostasia e armazenamento de informação útil para eventos futuros.⁴

Assim, a normal resposta ao stresse é essencial para garantir a sobrevivência do organismo. A presença de um stressor ao longo de vários dias (stresse crónico) ou uma função adrenocortical e autonómica excessiva ou inadequada (traduzida numa elevação persistente dos níveis plasmáticos de corticosteróides) constitui uma ameaça à integridade fisiológica e psicológica de um indivíduo,^{2,3} produzindo alterações comportamentais profundas em humanos e roedores, manifestadas por sintomas depressivos, estados de ansiedade e déficits de memória e aprendizagem⁵⁻⁷ e aumentando o risco de obesidade abdominal, osteoporose e problemas cardiovasculares.^{7,8}

Ao longo dos anos, vários estudos têm explorado o impacto profundo do stresse crónico sobre a plasticidade neuronal de várias áreas cerebrais, em particular do hipocampo,^{9,10} córtex pré-frontal (PFC)¹¹ e amígdala,^{12,13} estruturas límbicas envolvidas na regulação do eixo HHA^{2,3,14} e cuja remodelação resulta na modificação de respostas fisiológicas e comportamentais, como a memória, flexibilidade mental e outros processos cognitivos, agressão e ansiedade.^{4,11,15}

Diferentes modelos de stresse crónico têm evidenciado resultados consensuais ao nível do hipocampo e PFC, estando descritos efeitos como a reorganização frontoestriatal,^{11,16} retracção dendrítica e diminuição da densidade de espinhas nos neurónios destas estruturas.¹⁷⁻²⁰

Em sentido contrário, os dados não são unânimes relativamente aos efeitos estruturais do stresse crónico na amígdala.

Esta estrutura límbica, localizada na região antero-medial do lobo temporal, encontra-se envolvida na atribuição de significado emocional a estímulos ambientais e na regulação das respostas fisiológicas e comportamentais a esses estímulos.²¹⁻²⁴ Na resposta ao stresse desempenha um papel de regulação do eixo HHA ao exercer sobre este uma acção excitatória,²⁵ além de intervir na modulação dos efeitos do stresse sobre a consolidação da memória.¹⁵

A amígdala, nomeadamente o complexo basolateral, tem sido implicada numa variedade de paradigmas de aprendizagem em que existe um componente de avaliação, sendo responsável pela formação de associações estímulo-recompensa, aprendizagem e processamento de estímulos aversivos, antecipação de recompensas e atribuição de significado motivacional ao resultado de uma acção.^{23,26-28} Encontra-se ainda envolvida nos circuitos que controlam o comportamento alimentar, o condicionamento do medo e a ansiedade.^{12,13,18,21-23,29-31}

Em termos estruturais, as modificações produzidas pelo stresse sobre a amígdala diferem das observadas no hipocampo em dois pontos cruciais: o sentido da reorganização dendrítica e a reversibilidade do processo.

Estudos que utilizaram modelos de stresse crónico de imobilização revelaram hipertrofia dendrítica, aumento do número de ramificações dendríticas e da densidade de espinhas proximais em neurónios piramidais da amígdala basolateral (BLA). Esta reorganização neuronal acompanha-se por um aumento do comportamento ansioso avaliado no paradigma de *elevated plus maze*.^{12,13,18,29} Ao contrário do que ocorre no hipocampo, estes efeitos são persistentes, mantendo-se mesmo após um período de recuperação de 21 dias.²⁹

Procurando mimetizar a elevação de corticosteróides que normalmente ocorre em resposta ao stresse, estudos utilizando a injeção crónica de corticosterona evidenciaram resultados contraditórios, descrevendo-se hipertrofia dos neurónios piramidais da BLA e aumento da ansiedade num estudo realizado por Mitra et al¹² e reportando-se uma ausência de modificações estruturais noutro estudo conduzido por Pêgo et al.³¹

Estas diferenças podem explicar-se pelo facto de poder verificar-se uma habituação da resposta ao stresse nos paradigmas que utilizam exposição repetida ao mesmo stressor.^{33,34} Assim, no sentido de reduzir esta adaptação e melhor reproduzir a variabilidade de stressores encontrados no dia-a-dia, desenvolveram-se protocolos de stresse crónico imprevisível (CUS), que envolvem a exposição a stressores físicos e psicológicos aleatórios.^{11,18,31}

Estudos realizados com este paradigma de stresse têm mostrado efeitos curiosos quando comparados com os de stresse crónico de imobilização. Se ao nível do hipocampo produzem as mesmas modificações mas em menor intensidade,¹⁸ ao nível da amígdala tal não se verifica. De facto, os efeitos são totalmente diferentes conforme a população de neurónios analisada: neurónios piramidais não sofrem qualquer tipo de reestruturação,^{12,18,31} enquanto os neurónios bipolares mostram atrofia dendrítica.¹⁸ Esta remodelação neuronal dá-se, portanto, em sentido oposto à que ocorre com protocolos de stresse crónico de imobilização.

Assim, dada a divergência de resultados encontrados consoante o paradigma de stresse utilizado e tendo em conta o envolvimento da amígdala numa série de acções comportamentais e o seu papel modulatório da resposta ao stresse, o presente estudo pretende avaliar o impacto estrutural de um modelo de stresse mais relevante para a patologia humana (CUS),^{10,34} não só ao nível da morfologia da árvore dendrítica dos neurónios piramidais, mas também ao nível dos contactos sinápticos estabelecidos proximal e distalmente.

Métodos

Animais e tratamentos

As experiências foram conduzidas de acordo com a regulamentação local (Directiva da União Europeia 86/609/EEC) e *guidelines* sobre tratamento e experimentação em animais do *National Institute of Health* e aprovadas pela Direcção Geral de Veterinária.

Ratos Wistar macho adultos (Laboratórios Charles River, Barcelona, Espanha), com dois meses à data de início da experiência, foram mantidos em grupos de dois animais em condições laboratoriais *standard* (ciclos artificiais de luz-obscuridade de 12h - luzes acesas das 8h00-20h00; temperatura ambiente 22°C; acesso a água e comida *ad libitum*). Um grupo de dez ratos foi submetido a quatro semanas de CUS. Resumidamente, os animais foram expostos a diferentes stressores, uma vez por dia, durante uma hora. Os stressores (água a 18°C, vibração, imobilização, *overcrowding*, exposição a um fluxo de ar quente) foram apresentados aleatoriamente ao longo da experiência. Este paradigma de stresse mostrou, em estudos anteriores, ter resultado em elevação dos níveis plasmáticos de corticosterona, o principal glucocorticóide no rato.¹⁰ O grupo de animais controlo (CONT) foi manipulado cuidadosamente durante o mesmo período de quatro semanas.

O peso corporal dos animais foi monitorizado semanalmente ao longo do estudo, tendo sido também determinado o peso do timo *post-mortem*; ambos os dados informam sobre a eficácia do tratamento. Foram ainda determinados os níveis serológicos de corticosterona usando um *kit* ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN); o soro foi colhido entre as 8h00 e 9h00.

Procedimentos histológicos

Um dia após a última sessão de stresse, os ratos foram perfundidos com solução salina 0,9% sob anestesia com pentobarbital e processados de acordo com o protocolo de Gibb & Colb.³⁵ Resumidamente, os cérebros foram removidos e imersos durante catorze dias em solução Golgi-Cox (solução 1:1 de dicromato de potássio 5% e cloreto de mercúrio 5% diluída em solução de cromato de potássio 5%, 4:10 - Glaser & Van der Loos³⁶) e depois transferidos para uma solução de sacarose 30% (mínimo 3 dias). Seguidamente foram cortados no vibrátomo em secções coronais de 200 µm de espessura, que se colocaram em sacarose 6% e seguidamente sobre lâminas de microscopia gelatinizadas. Subsequentemente foram alcalinizadas em

amónia 18.7%, fixadas em Kodak Rapid Fix (preparado de acordo com instruções da embalagem, omitindo a solução B), desidratadas em etanol, limpas em xileno, montadas e cobertas com lamela.

Análise de dendrites

Foram analisados neurónios piramidais do núcleo basolateral da amígdala. Estes são identificados pela sua configuração característica: corpo celular piramidal do qual partem três a sete dendrites, uma das quais sendo geralmente de maior calibre e por isso comparada à dendrite apical dos neurónios corticais. As dendrites secundárias e terciárias destes neurónios são ricas em espinhas.²¹ Os critérios utilizados para selecção de neurónios para reconstrução foram: (i) impregnação completa dos neurónios ao longo de todo o comprimento da árvore dendrítica; (ii) dendrites sem interrupções significativas dos ramos; (iii) neurónios relativamente isolados de outras células, de forma a evitar interferências com a análise; e (iv) ausência de alterações morfológicas atribuíveis a incompleta impregnação dendrítica pela coloração Golgi-Cox.

Para cada neurónio seleccionado, todos os ramos da árvore dendrítica foram reconstruídos a magnificação 600x com lente de imersão, usando um microscópio motorizado (Axioplan 2, Carl Zeiss, Alemanha) com uma câmara acoplada (DXC-390, Sony Corporation, Tóquio, Japão) e software Neurolucida (Microbrightfield, VT). A análise tridimensional dos neurónios reconstruídos foi realizada com o software NeuroExplorer (Microbrightfield).

Foram estudados três neurónios por rato de cada um dos dois grupos experimentais (cinco ratos por grupo, seleccionados aleatoriamente) e analisados vários aspectos da morfologia dendrítica. Para avaliar alterações globais realizou-se a comparação entre grupos do comprimento total e número de dendrites e número de ramificações das dendrites basais e apicais. Diferenças no arranjo da árvore dendrítica foram estudadas usando-se uma versão tridimensional da análise *Sholl*, determinando-se o número de intersecções de dendrites em esferas concêntricas posicionadas a intervalos radiais de 20 µm e medindo-se o comprimento da árvore dendrítica localizada entre duas esferas consecutivas.

Para análise do número e densidade (espinhas por micrómetro) de espinhas foram seleccionados segmentos dendríticos proximais e distais paralelos ou em ângulo agudo em relação à superfície coronal do corte. As espinhas dos segmentos seleccionados foram classificadas em *thin*, *thick*, *mushroom* e *ramified*, sendo calculada a proporção de espinhas

de cada categoria para cada neurónio, o que permitiu a avaliação de alterações na morfologia das espinhas.

Análise estatística

A análise estatística foi efectuada com recurso ao software *SPSS Statistics 19*®.

Para estudo das variáveis contínuas foi utilizado o teste T de Student e o teste U de Mann-Witney, para amostras com e sem distribuição normal, respectivamente. A distribuição das variáveis quanto à normalidade foi calculada através do teste de Shapiro-Wilk. Na análise *Sholl* foi utilizado o teste de *repeated measures*. Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. A significância estatística foi aceite para valor $p < 0,05$.

Resultados

Efeito do stresse crónico sobre o arranjo da árvore dendrítica

A exposição a CUS não resultou em diferenças significativas sobre o comprimento dendrítico dos neurónios piramidais da BLA de ambos os grupos experimentais, quer a nível apical (CONT: 1217,41 ± 82,23; CUS 1219,45 ± 111,38; $P = 0,988$), basal (CONT: 1853,73 ± 113,26; CUS 1839,48 ± 217,43; $P = 0,952$) ou total (CONT: 3071,14 ± 116,67; CUS 3058,93 ± 260,47; $P = 0,965$) (Tabela 1 e Figura 1 (A)). Do mesmo modo, o modelo de stresse utilizado não afectou o número total de ramificações apicais (CONT: 5,50 ± 0,65; CUS: 5,93 ± 0,73; $P = 0,665$) nem o número de dendrites basais por neurónio (CONT: 3,63 ± 0,27; CUS: 3,60 ± 0,27; $P = 0,935$) (Figura 1 (B) e (C)).

Tabela 1- Efeitos do stresse crónico sobre o comprimento dendrítico dos neurónios piramidais da BLA. Não se registaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos experimentais decorrentes da exposição a stresse prolongado. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Para estudo de diferenças entre grupos foi utilizado o teste T de Student.

	Controlo	CUS	Valor p
Comprimento dendrítico apical (μm)	1217,41 ± 82,23	1219,45 ± 111,38	0,988
Comprimento dendrítico basal (μm)	1853,73 ± 113,26	1839,48 ± 217,43	0,952
Comprimento dendrítico total (μm)	3071,14 ± 116,67	3058,93 ± 260,47	0,965

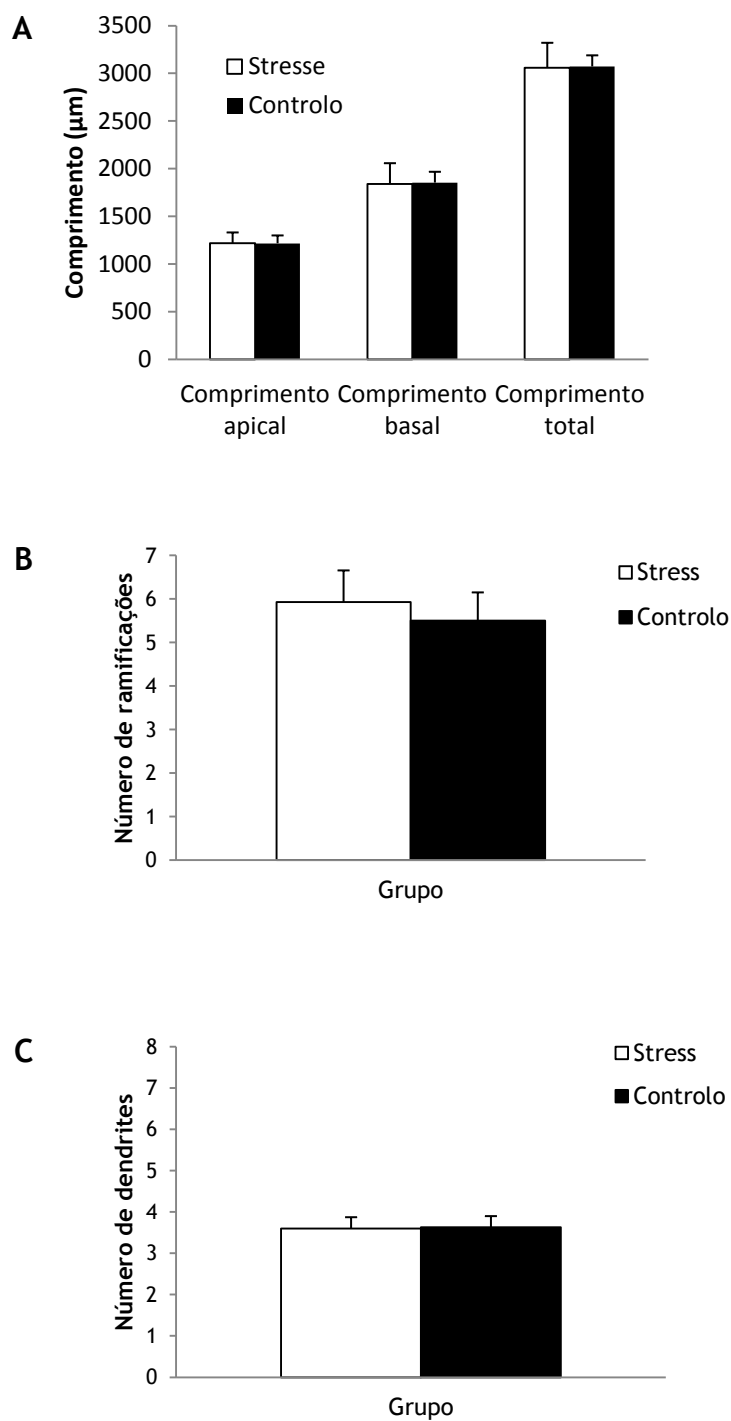


Figura 1 - Análise do arranjo da árvore dendrítica dos neurónios piramidais da BLA. Comprimento dendrítico (A). Número de ramificações da dendrite apical (B). Número de dendrites basais (C). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre grupos para os vários parâmetros morfológicos. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Para estudo de diferenças entre grupos foi utilizado o teste T de Student para todas as variáveis.

A análise *Sholl* dos segmentos dendríticos apicais (Figura 2 (A) e (C)) revelou que a exposição a CUS resultou numa maior arborização dendrítica proximal, evidenciada pelo aumento do comprimento e número de intersecções a uma distância de 100 μm a partir do corpo celular (comprimento - CONT: $87,72 \pm 10,30$; CUS: $125,96 \pm 11,59$; $P = 0,019$; número de intersecções - CONT: $3,42 \pm 0,38$; CUS: $4,73 \pm 0,43$; $P = 0,030$). A nível apical verificou-se ainda uma diminuição da ramificação dendrítica distal, traduzida pela redução do número de intersecções nos neurónios do grupo de stresse para uma distância de 240 μm a partir do corpo celular (CONT: $2,47 \pm 0,26$; CUS: $1,57 \pm 0,29$; $P = 0,026$).

Relativamente aos segmentos dendríticos basais, a análise *Sholl* não mostrou diferenças entre o grupo controlo e de stresse (Figura 2 (B)).

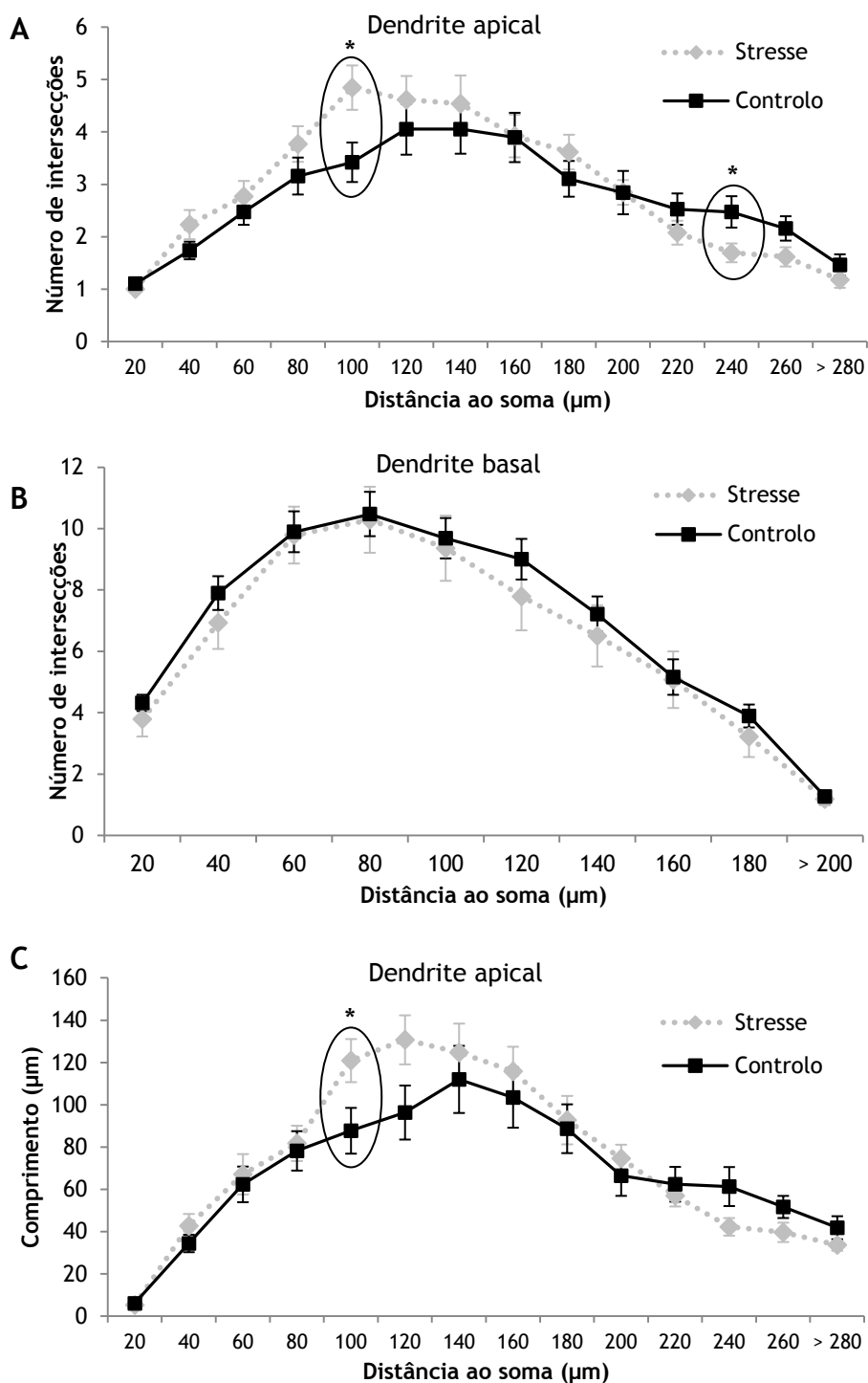


Figura 2 - Análise *Sholl* do arranjo da árvore dendrítica dos neurónios piramidais da BLA. Número médio de intersecções dos ramos dendríticos apicais (A) e basais (B) entre raios consecutivos de 20 µm. Comprimento médio dos ramos dendríticos apicais entre raios consecutivos de 20 µm (C). Diferenças estatisticamente significativas entre grupos estão indicadas com *, que representa valor $p < 0,05$. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média.

Efeito do stresse crónico sobre a densidade de espinhas dendríticas

Ao nível dos segmentos dendríticos proximais, verificou-se uma ausência de diferenças na densidade total de espinhas nos neurónios dos dois grupos considerados (CONT: $0,43 \pm 0,03$; CUS: $0,36 \pm 0,04$; $P = 0,166$). No entanto, após análise por tipo observou-se uma redução da densidade de espinhas *thick* nos neurónios do grupo de stresse (CONT: $0,25 \pm 0,02$; CUS: $0,17 \pm 0,02$; $P = 0,006$). A densidade dos restantes tipos de espinhas não sofreu qualquer alteração em consequência da exposição a stresse prolongado (*thin*: CONT: $0,05 \pm 0,01$; CUS: $0,06 \pm 0,01$; $P = 0,528$; *mushroom*: CONT: $0,12 \pm 0,01$; CUS: $0,13 \pm 0,02$; $P = 0,844$; *ramified*: CONT: $0,01 \pm 0,004$; CUS: $0,01 \pm 0,002$; $P = 0,546$) (Figura 3 (A)).

Relativamente aos segmentos dendríticos distais, verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa da densidade total (CONT: $0,61 \pm 0,04$; CUS: $0,38 \pm 0,03$; $P = 0,000$) e por tipo de espinha (*thin*: CONT: $0,16 \pm 0,02$; CUS: $0,10 \pm 0,02$; $P = 0,044$; *mushroom*: CONT: $0,22 \pm 0,02$; CUS: $0,13 \pm 0,01$; $P = 0,002$; *thick*: CONT: $0,21 \pm 0,02$; CUS: $0,14 \pm 0,01$; $P = 0,010$; *ramified*: CONT: $0,03 \pm 0,01$; CUS: $0,01 \pm 0,003$; $P = 0,026$) nos neurónios do grupo de stresse (Figura 3 (B)).

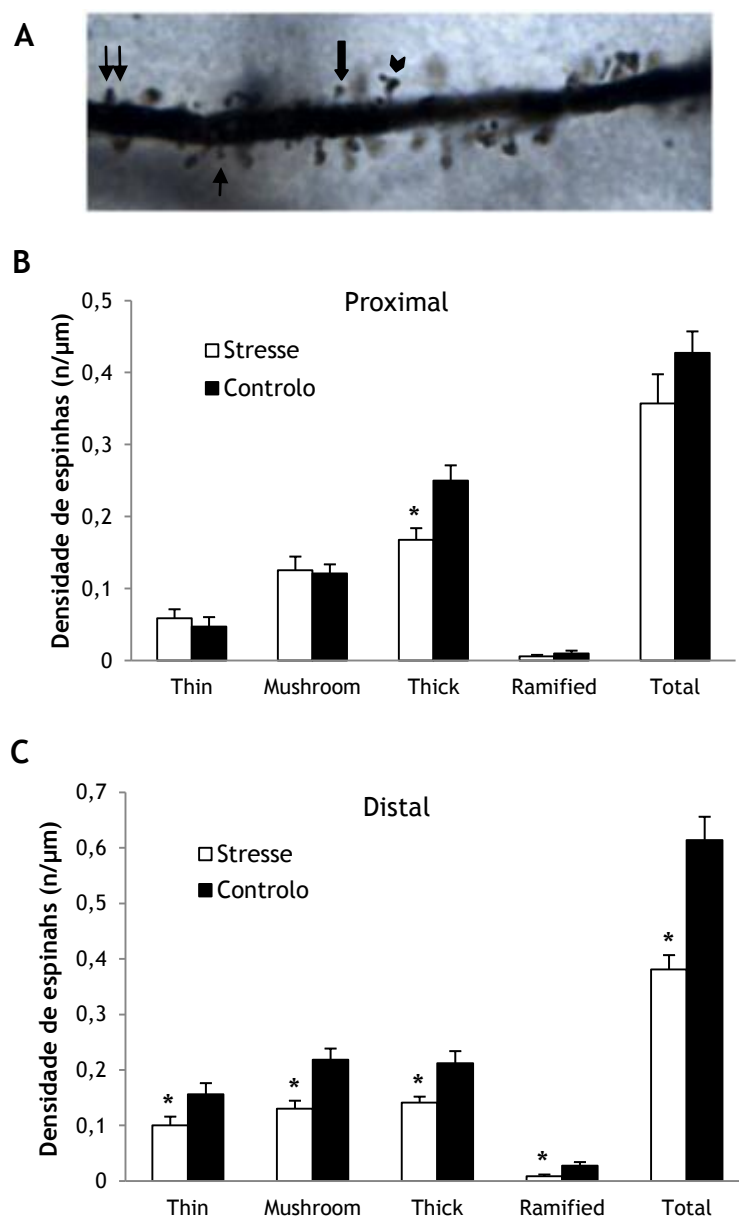


Figura 3 - Classificação morfológica das espinhas dendríticas. (A) Fotografia de grande ampliação (600x) onde se representam as diferentes categorias morfológicas utilizadas para classificar as espinhas dendríticas. *Thin* - seta única; *mushroom* - seta espessa; *thick* - dupla seta; *ramified* - ponta de seta. Análise da densidade de espinhas nos segmentos dendríticos proximais (B) e distais (C) dos neurónios piramidais da BLA. Verificou-se um efeito estatisticamente significativo ($*p < 0,05$) sobre a densidade de espinhas *thick* a nível proximal e sobre a densidade total e por tipo todos os tipos de espinha nos segmentos dendríticos distais. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Para estudo de diferenças entre grupos foi utilizado o teste T de Student para todas as variáveis excepto para a variável *thin*, em que se usou o teste estatístico U de Mann-Whitney.

Discussão

Um dos objectivos do presente estudo consistiu na análise morfológica da árvore dendrítica dos neurónios piramidais da BLA após exposição a stresse prolongado. Neste aspecto, e contrariamente aos efeitos verificados com stresse crónico de imobilização,^{12,13,18,29} o modelo utilizado não produziu quaisquer diferenças entre o grupo de stresse e controlo, nomeadamente ao nível do comprimento dendrítico. Tais resultados estão de acordo com o descrito em trabalhos que utilizaram o mesmo protocolo de stresse.^{18,31}

Um estudo recente realizado no nosso laboratório³¹ procurou correlacionar as modificações estruturais produzidas sobre a BLA e núcleo da estria terminal (BNST) com os efeitos comportamentais resultantes da exposição a stresse prolongado. Verificou-se uma ausência de alterações ao nível da amígdala e hipertrofia neuronal no BNST associadas a um aumento do comportamento ansioso. Assim, os autores concluíram que o BNST, mais do que a amígdala, poderá estar envolvido nos circuitos que controlam a ansiedade. Na mesma linha de pensamento, tendo em conta que modelos de stresse crónico de imobilização resultam em hipertrofia neuronal na amígdala, este estudo propõe que tal alteração morfológica poderá correlacionar-se com a indução de um estado de medo (em oposição a ansiedade), gerado pela agressividade e incapacidade de fuga associadas ao modelo de imobilização. Assim, os dados encontrados no presente estudo poderão ajudar a reforçar a justificação avançada por Pêgo et al³¹ para as diferenças estruturais obtidas com os vários modelos de stresse.

No entanto, a exposição a stresse crónico induziu uma reestruturação da árvore dendrítica apical, não acompanhada por alterações no comprimento ou número de ramificações totais por neurónio. Esta reorganização apical induzida pelo stresse crónico é semelhante à observada em neurónios piramidais de determinadas regiões do PFC^{16,37-41} e hipocampo.^{17,18,41-43}

Para além da remodelação dendrítica, também os mecanismos de plasticidade sináptica, que promovem a adaptação do organismo ao meio envolvente, podem ser afectados por stresse psicológico ou físico prolongado. Tal contribui para a desregulação e desequilíbrio na conectividade entre estruturas cerebrais, o que poderá estar implicado na génese de doenças psiquiátricas, neurológicas e no declínio cognitivo relacionado com a idade.³⁴ Assim, considerando os efeitos já descritos ao nível de outras estruturas,^{7,34} procurou-se analisar o número e densidade de espinhas em segmentos dendríticos distais e proximais dos neurónios piramidais da amígdala.

Relativamente a esta estrutura, os dados existentes revelam um aumento da densidade de espinhas nos segmentos peri-somáticos das dendrites primárias e secundárias de neurónios

piramidais, após exposição a stresse crónico de imobilização.^{12,13} No entanto, dez dias de CUS não induziram quaisquer alterações a este nível.¹² Até ao momento, apenas o estudo de Pêgo et al³¹ empregou o mesmo modelo de stresse e no mesmo período que o do actual trabalho; contudo, diferenças metodológicas na análise de espinhas impossibilitam a comparação de achados. Contrastando com os efeitos descritos anteriormente, os resultados obtidos mostraram uma ausência de diferenças na densidade total de espinhas nos segmentos dendríticos proximais de grupos de stresse e controlo. No entanto, tendo em conta que existem diferentes tipos de espinhas e que mudanças na sua morfologia poderão estar associadas a diferentes funções, as variações dos tipos de espinhas têm recebido cada vez mais importância.³⁴ De facto, após a análise por tipo, verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa na densidade de espinhas *thick* no grupo de stresse. Por estarem mais fortemente acopladas à dendrite, julga-se que alterações na densidade deste tipo particular de espinhas possam ter um maior impacto sobre a excitabilidade neuronal.⁴⁴

Até ao momento, não existem estudos que tenham avaliado os efeitos do stresse crónico sobre os ramos distais dos neurónios piramidais da amígdala em termos de densidade e morfologia das espinhas. Contudo, esta análise foi realizada no presente estudo, que revelou uma diminuição da densidade total e de todos os tipos de espinha nos neurónios do grupo sujeito a stresse, o que se traduz numa menor densidade de contactos sinápticos a nível distal.

Ao contrário dos segmentos dendríticos peri-somáticos, que recebem *input* maioritariamente inibitório proveniente dos interneurónios GABAérgicos locais, tronco cerebral e prosencéfalo basal,⁴⁵ as porções distais das dendrites dos neurónios piramidais são o principal alvo das projecções mesolímbicas dopaminérgicas para a BLA.⁴⁶ Este *input* tem origem na área tegmental ventral e *substantia nigra* e desempenha um papel importante na aprendizagem estímulo-recompensa e no condicionamento do medo.^{30,46-48} O córtex cerebral, tálamo e projecções inter- e intra-nucleares estabelecem contactos excitatórios glutamatérgicos também a nível distal, pelo que as terminações dopaminérgicas poderão exercer um papel modulatório sobre estes contactos sinápticos.^{45,46,48-51}

Estudos realizados com um protocolo de CUS demonstraram uma redução dos níveis de dopamina em regiões cerebrais que projectam para a amígdala, nomeadamente o hipocampo, estriado e PFC.^{52,53} Um outro estudo observou ainda uma diminuição dos neurónios tirosina hidroxilase-imunorreactivos ao nível do estriado, área tegmental ventral e *substantia nigra*.⁵⁴

Dada a importância destas projecções excitatórias para o núcleo basolateral, e tendo em conta que a densidade de espinhas num determinado segmento dendrítico poderá traduzir o estado de potenciação dessas sinapses,⁵⁵ a diminuição da densidade de espinhas distais

observada no presente estudo poderá representar uma menor activação da amígdala em consequência dos efeitos do stresse sobre as estruturas que com ela contactam. Estas alterações, aliadas à retracção dendrítica observada nos segmentos distais das dendrites apicais, poderão resultar em circuitos neuronais funcionalmente diferentes.⁵⁶

De facto, está demonstrado que alterações da plasticidade neuronal induzidas pelo stresse podem resultar numa comunicação anómala entre diferentes estruturas cerebrais^{11,16,34,41} o que pode reflectir-se em comportamentos disfuncionais.^{41,57} No entanto, a tradução comportamental destes efeitos estruturais não foi analisada neste estudo, assim como não foram avaliadas eventuais alterações morfológicas noutros tipos de neurónios da amígdala nem em estruturas cerebrais que recebem projecções deste núcleo amigdalóide. Tal informação contribuiria para melhor compreender o real impacto do stresse crónico sobre a amígdala e correlacionar estas alterações com as que se produzem noutras estruturas, como o PFC ou o hipocampo. Porém, dado o papel central da amígdala nos circuitos que controlam a consolidação de memórias e a aprendizagem e expressão do condicionamento do medo^{15,21,30,31,48} é possível que estes comportamentos sofram alterações decorrentes da exposição a CUS. Contudo, até ao momento existe apenas um estudo³¹ que avalia o impacto deste paradigma de stresse sobre a estrutura da BLA e o correlaciona com a expressão do medo; os seus resultados contrastam claramente com os obtidos com um protocolo de stresse de imobilização.^{43,58}

A amígdala é ainda um componente importante dos circuitos que medeiam a tomada de decisão.^{23,26-28} Estudos em humanos e roedores mostram que lesões ou inactivação da amígdala afectam o processo de decisão, gerando um padrão de escolhas desvantajoso.⁵⁹⁻⁶¹ Por outro lado, um estudo recente⁶² mostrou que a interrupção das conexões entre a BLA e o PFC e *nucleus accumbens* resulta num enviesamento das escolhas numa tarefa de risco. Nesta perspectiva, seria interessante avaliar o impacto dos resultados obtidos neste estudo sobre o processo de tomada de decisão.

Em suma, o presente estudo mostra que o stresse crónico imprevisível provoca alterações subtis sobre a amígdala, ao nível da plasticidade sináptica, e exerce uma acção selectiva sobre as dendrites apicais, induzindo a retracção dos segmentos mais distais. Assim, o conjunto dos dados actuais aponta para a amígdala como uma estrutura relativamente insensível aos eventos stressantes, não ocorrendo modificações estruturais significativas ou aumento do comportamento de medo.³¹

Conclusão

A amígdala é uma estrutura complexa, composta por vários núcleos, que contacta com uma multiplicidade de estruturas cerebrais e está envolvida na regulação de importantes acções comportamentais, como o medo ou a tomada de decisão. Faz parte de uma intrincada rede de estruturas cerebrais e são vários os neurotransmissores que sobre ela exercem a sua influência. Têm sido vários os estudos que procuram avaliar as influências do stresse crónico sobre esta estrutura, particularmente o núcleo basolateral, mas ainda são poucos os trabalhos que utilizam o paradigma de stresse imprevisível, um modelo mais fidedigno no que diz respeito à reprodutibilidade das condições a que os humanos estão expostos no seu dia-a-dia. O presente estudo vem comprovar que os dois paradigmas têm efeitos totalmente diferentes sobre a BLA, verificando-se alterações subtis da plasticidade sináptica apenas nos ramos mais distais da árvore dendrítica dos neurónios piramidais.

A diminuição da densidade de espinhas representa uma diminuição do fluxo de informação proveniente de outras estruturas, mas a relevância funcional destas alterações ainda se encontra por explicar, sendo necessários estudos electrofisiológicos que procurem avaliar o seu impacto sobre a excitabilidade neuronal. As razões que estão na base destas alterações também não estão completamente esclarecidas e fogem ao âmbito deste estudo.

Este estudo acrescenta ainda um dado interessante, relacionado com o efeito selectivo do stresse crónico sobre o arranjo das dendrites apicais dos neurónios piramidais da amígdala, ainda não descrito na literatura. Esta reestruturação ocorre no mesmo sentido que a observada em determinadas regiões do PFC e hipocampo.

Porque as diferentes estruturas cerebrais se organizam em redes neuronais complexas, influenciando-se mutuamente, a compreensão das alterações provocadas pelo stresse exige a realização de mais estudos. Dada a complexidade e multiplicidade de efeitos observados até agora, só a integração dos dados referentes às várias estruturas cerebrais permitirá ter um vislumbre sobre os mecanismos que estão na base de estados patológicos decorrentes da exposição crónica a stressores.

Bibliografia

1. Sapolsky RM, Romero M, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000;21(1):55-89
2. Fuchs E, Flugge G, Czeh B. Remodeling of neuronal networks by stress. *Front Biosci.* 2006;11:2746-58.
3. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev.* 2007;87(3):873-904.
4. de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(6):463-75.
5. Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J Neurosci.* 2000;20(4):1568-74.
6. McEwen BS. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1032:1-7.
7. Radley JJ, Morrison JH. Repeated stress and structural plasticity in the brain. *Ageing Res Rev.* 2005;4(2):271-87.
8. Brown ES, Varghese FP, McEwen BS. Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? *Biol Psychiatry.* 2004;55(1):1-9.
9. Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(6):453-62.
10. Sousa N, Almeida OF, Holsboer F, Paula-Barbosa MM, Madeira MD. Maintenance of hippocampal cell numbers in young and aged rats submitted to chronic unpredictable stress. Comparison with the effects of corticosterone treatment. *Stress.* 1998;2(4):237-49.

11. Cerqueira JJ, Mailliet F, Almeida OF, Jay TM, Sousa N. The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci*. 2007;27(11):2781-7.
12. Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A, Chattarji S. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(26):9371-6.
13. Vyas A, Jadhav S, Chattarji S. Prolonged behavioral stress enhances synaptic connectivity in the basolateral amygdala. *Neuroscience*. 2006;143(2):387-93.
14. de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*. 1998;19(3):269-301.
15. Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(6):423-33.
16. Dias-Ferreira E, Sousa JC, Melo I, Morgado P, Mesquita AR, Cerqueira JJ, Costa RM, Sousa N. Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. *Science*. 2009;325(5940):621-5.
17. Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*. 2000;97(2):253-66.
18. Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*. 2002;22(15):6810-8.
19. McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006;8(4):367-81.
20. McEwen BS, Gianaros PJ. Stress- and allostasis-induced brain plasticity. *Annu Rev Med*. 2011;62:431-45.
21. Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev*. 2003;83(3):803-34.

22. LeDoux J. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol.* 2003;23(4-5):727-38.
23. Balleine BW. Neural bases of food-seeking: affect, arousal and reward in corticostriatolimbic circuits. *Physiol Behav.* 2005;86(5):717-30.
24. McEwen BS. Stress, sex, and neural adaptation to a changing environment: mechanisms of neuronal remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1204 Suppl:E38-59.
25. LeDoux JE. Emotion, memory and the brain. *Sci Am.* 1994;270(6):50-7.
26. Rangel A, Camerer C, Montague PR. A framework for studying the neurobiology of value-based decision making. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(7):545-56.
27. Doya K. Modulators of decision making. *Nat Neurosci.* 2008;11(4):410-6.
28. Floresco SB, St Onge JR, Ghods-Sharifi S, Winstanley CA. Cortico-limbic-striatal circuits subserving different forms of cost-benefit decision making. *Cogn Affect Behav Neurosci.* 2008;8(4):375-89.
29. Vyas A, Pillai AG, Chattarji S. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience.* 2004;128(4):667-73.
30. Kim JJ, Jung MW. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(2):188-202.
31. Pêgo JM, Morgado P, Pinto LG, Cerqueira JJ, Almeida OF, Sousa N. Dissociation of the morphological correlates of stress-induced anxiety and fear. *Eur J Neurosci.* 2008;27(6):1503-16.
32. Mitra R, Sapolsky RM. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(14):5573-8.
33. Melia KR, Ryabinin AE, Schroeder R, Bloom FE, Wilson MC. Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. *J Neurosci.* 1994;14(10):5929-38.

34. Christoffel DJ, Golden SA, Russo SJ. Structural and synaptic plasticity in stress-related disorders. *Rev Neurosci*. 2011;22(5):535-49.
35. Gibb R, Kolb B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods*. 1998;79(1):1-4.
36. Glaser EM, Van der Loos H. Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. *J Neurosci Methods*. 1981;4(2):117-125.
37. Wellman CL. Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol*. 2001;49(3):245-53.
38. Brown SM, Henning S, Wellman CL. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2005;15(11):1714-22.
39. Cerqueira JJ, Taipa R, Uylings HB, Almeida OF, Sousa N. Specific configuration of dendritic degeneration in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex induced by differing corticosteroid regimens. *Cereb Cortex*. 2007;17(9):1998-2006.
40. Shansky RM, Morrison JH. Stress-induced dendritic remodeling in the medial prefrontal cortex: effects of circuit, hormones and rest. *Brain Res*. 2009;1293:108-13.
41. Bessa JM, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol Psychiatry*. 2009;14(8):764-73, 739.
42. Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res*. 1992;588(2):341-5.
43. Conrad CD, LeDoux JE, Magariños AM, McEwen BS. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav Neurosci*. 1999;113(5):902-13.
44. Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Kasai H. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites. *Neuron*. 2005;46(4):609-22.
45. Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ. Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala: synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons. *J Comp Neurol*. 2006;494(4):635-50.

46. Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ. Dopaminergic innervation of pyramidal cells in the rat basolateral amygdala. *Brain Struct Funct.* 2009;213(3):275-88.
47. Pinard CR, Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ. Dopaminergic innervation of interneurons in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience.* 2008;157(4):850-63.
48. Fadok JP, Darvas M, Dickerson TM, Palmiter RD. Long-term memory for pavlovian fear conditioning requires dopamine in the nucleus accumbens and basolateral amygdala. *PLoS One.* 2010;5(9):e12751.
49. Rosenkranz JA, Grace AA. Dopamine attenuates prefrontal cortical suppression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. *J Neurosci.* 2001;21(11):4090-103.
50. Rosenkranz JA, Grace AA. Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *J Neurosci.* 2002;22(1):324-37.
51. Kröner S, Rosenkranz JA, Grace AA, Barrionuevo G. Dopamine modulates excitability of basolateral amygdala neurons in vitro. *J Neurophysiol.* 2005;93(3):1598-610.
52. Rasheed N, Ahmad A, Pandey CP, Chaturvedi RK, Lohani M, Palit G. Differential response of central dopaminergic system in acute and chronic unpredictable stress models in rats. *Neurochem Res.* 2010;35(1):22-32.
53. Ahmad A, Rasheed N, Banu N, Palit G. Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress. *Stress.* 2010;13(4):355-64.
54. Rasheed N, Ahmad A, Al-Sheeha M, Alghasham A, Palit G. Neuroprotective and anti-stress effect of A68930 in acute and chronic unpredictable stress model in rats. *Neurosci Lett.* 2011;504(2):151-5.
55. Lippman J, Dunaevsky A. Dendritic spine morphogenesis and plasticity. *J Neurobiol.* 2005;64(1):47-57.
56. Alvarez VA, Sabatini BL. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci.* 2007;30:79-97.

57. McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology*. 2012;62(1):3-12.
58. Rodríguez Manzanares PA, Isoardi NA, Carrer HF, Molina VA. Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. *J Neurosci*. 2005 Sep 21;25(38):8725-34.
59. Ghods-Sharifi S, St Onge JR, Floresco SB. Fundamental contribution by the basolateral amygdala to different forms of decision making. *J Neurosci*. 2009;29(16):5251-9.
60. Zeeb FD, Winstanley CA. Lesions of the basolateral amygdala and orbitofrontal cortex differentially affect acquisition and performance of a rodent gambling task. *J Neurosci*. 2011;31(6):2197-204.
61. Bechara A, Damasio H, Damasio AR. Role of the amygdala in decision-making. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;985:356-69.
62. St Onge JR, Stopper CM, Zahm DS, Floresco SB. Separate prefrontal-subcortical circuits mediate different components of risk-based decision making. *J Neurosci*. 2012;32(8):2886-99.