

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

MARIANA DIAS LEITE

ORGANIZAÇÃO NUCLEAR DO SISTEMA SEROTONÉRGICO NO
ENCÉFALO DE MORCEGOS *Artibeus planirostris*

NATAL-RN

2015

MARIANA DIAS LEITE

Organização nuclear do sistema serotoninérgico no encéfalo de
morcegos *Artibeus planirostris*

Dissertação apresentada à Universidade Federal
do Rio Grande do Norte, para obtenção do título
de Mestre em Psicobiologia.

Orientador: Expedito Silva do Nascimento Junior

Natal-RN

2015

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de
Biociências

Leite, Mariana Dias.

Organização nuclear do sistema serotoninérgico no encéfalo de morcegos *Artibeus planirostris*. / Mariana Dias Leite. – Natal, RN, 2015.

76 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Expedito Silva do Nascimento Junior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

1. Morcego. – Dissertação. 2. Núcleos da rafe. – Dissertação. 3. Imunoistoquímica. – Dissertação. I. Nascimento Junior, Expedito Silva do. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 599.4

Título: Organização nuclear do sistema serotoninérgico no encéfalo de morcegos
Artibeus planirostris

Autor: Mariana Dias Leite

Data da defesa: 09 de julho de 2015

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Francisco Gilberto Oliveira

Universidade Regional do Cariri, CE

Prof. Dr. Judney Cley Cavalcante

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN

Prof. Dr. Expedito Silva do Nascimento Junior

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN

*"Não quero ser como um chiclete que,
na primeira esquina, o cara cospe fora.
Sempre que realizo um trabalho
tenho na consciência a certeza
de que ficará uma semente."*

Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

Difícil tentar expressar em palavras tudo e todos a que quero agradecer por fazer parte dessa etapa, mas vamos tentar...

Agradeço aos meus pais, Graça Dias e Carlos Leite, por me ensinarem, de formas diferentes, a batalhar na vida e pela vida. Obrigada pela educação que me deram, amo vocês. Mãe, sou a pessoa que sou graças a você.

Agradeço a Daniel Chaves, pessoa com quem amo compartilhar a vida. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa (e agradeço aos meus sogros, Vanice e Evanildo, por terem feito essa pessoa maravilhosa) e por estar ao meu lado, me dando todo o suporte necessário para passar por cada etapa da minha vida. Amo você ♥

Agradeço ao professor Expedito Jr, por ter aceitado me orientar mesmo sem me conhecer, e ter me acolhido tão bem em seu laboratório, quando lá "caí de paraquedas" no início do mestrado. Obrigada pela oportunidade e por todos os ensinamentos e orientações durante esse período. Aproveito para agradecer também aos demais professores do LabNeuro pela disposição, acolhimento e dúvidas esclarecidas.

Não posso deixar de agradecer a todos os amigos que fiz na pós-graduação de Psicobiologia e a todos que fazem parte do LabNeuro. Aqui não quero citar nomes, pois meu reconhecimento é a todos, mas não posso deixar de dar meu agradecimento especial a Melquisedec e Hélder, pessoas que me deram essencial ajuda na realização desse trabalho.

Por fim, mas não menos importante (não mesmo!!), agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma substância encontrada em muitos tecidos do organismo, inclusive no sistema nervoso atuando como neurotransmissor. Dentro do neuro-eixo, a localização da maioria dos neurônios 5-HT se sobrepõe com os núcleos da rafe do tronco encefálico, na linha média ou em suas proximidades, de tal maneira que a 5-HT neuronal pode ser considerada um marcador dos núcleos da rafe. Os neurônios serotoninérgicos projetam-se para praticamente todas as áreas do encéfalo. Estudos mostram a participação da serotonina na regulação da temperatura, comportamento alimentar, comportamento sexual, ritmos biológicos, sono, função locomotora, aprendizagem, entre outras. A anatomia destes grupos foi revisada em muitas espécies, inclusive em rato, coelho, gato e primatas, mas nunca antes em uma espécie de morcego da América do Sul. Este trabalho teve como objetivo caracterizar os grupamentos serotoninérgicos no encéfalo do morcego *Artibeus planirostris*, através de imunistoquímica para serotonina. Sete morcegos machos adultos da espécie *Artibeus planirostris* (Microchiroptera, Mammalia) foram utilizados nesse estudo. Os animais foram anestesiados, perfundidos por via transcardíaca e tiveram seus encéfalos removidos. Secções coronais do encéfalo congelado dos morcegos foram obtidos em micrótomo de deslizamento e submetidos a reação imunistoquímica para 5-HT. Delimitamos os núcleos linear caudal (CLi), dorsal (DR), mediano (MnR), paramediano (PMnR), pontino (PnR), magno (MgR), pálido (RPa) e obscuro (Rob) da rafe, além dos grupamentos B9 e ventrolaterais rostral e caudal (RVL/CVL). Os grupamentos serotoninérgicos nesta espécie de quiróptero apresentam morfologia e citoarquitetura relativamente semelhante ao descrito em roedores e primatas, confirmando a estabilidade filogenética desses grupamentos celulares.

Palavras-chaves: *Artibeus planirostris*, imunistoquímica, morcego, núcleos da rafe, serotonina, 5-HT, 5-hidroxitriptamina

ABSTRACT

Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) is a substance found in many tissues of the body, including the nervous system acting as a neurotransmitter. Within the neuro-axis, the location of the majority of the 5-HT neurons is superimposed with raphe nuclei of the brain stem, in the median line or its vicinity, so that neuronal 5-HT can be considered a marker of the raphe nuclei. Serotonergic neurons are projected to almost all areas of the brain. Studies show the participation of serotonin in regulating the temperature, feeding behavior, sexual behavior, biological rhythms, sleep, locomotor function, learning, among others. The anatomy of these groups has been revised in many species, including mouse, rabbit, cat and primates, but never before in a bat species from South America. This study aimed to characterize the serotonergic clusters in the brain of the bat *Artibeus planirostris* through immunohistochemistry for serotonin. Seven adult bat males of *Artibeus planirostris* species (Microchiroptera, Mammalia) were used in this study. The animals were anesthetized, transcardially perfused and their brains were removed. Coronal sections of the frozen brain of bats were obtained in sliding microtome and subjected to immunohistochemistry for 5-HT. Delimit the caudal linear (CLi), dorsal (DR), median (MnR), paramedian (PMnR), pontine (PNR), magnus (MgR), pallidus (RPA) and obscurus (ROb) raphe nucleus, in addition to the groups B9 and rostral and caudal ventrolateral (RVL/CVL). The serotonergic groups of this kind of cheiroptera present morphology and cytoarchitecture relatively similar to that described in rodents and primates, confirming the phylogenetic stability of these cell clusters.

Keywords: *Artibeus planirostris*, immunohistochemistry, bat, raphe nuclei, serotonin

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Conversão do triptofano à serotonina.....	14
Figura 2. Descrição clássica dos grupamentos serotoninérgicos no rato feito por Dahlström e Fuxe em 1964	19
Figura 3. Descrição dos núcleos da rafe no rato	20
Figura 4. <i>Artibeus planirostris</i>	22
Figura 5. Distribuição geográfica de <i>Artibeus planirostris</i>	23
Figura 6. Classificação filogenética da ordem Chiroptera.	25
Figura 7. Encéfalo do morcego <i>Artibeus planirostris</i>	38
Figura 8. Fotomicrografias em campo claro e esquemas de secções coronais em sentido rostrocaudal do tronco encefálico do morcego <i>Artibeus planirostris</i>	43-45
Figura 9. Fotomicrografias em campo claro de imunistoquímica para 5-HT, evidenciando os núcleos DR, MnR, Cli e B9.....	46
Figura 10. Fotomicrografias em campo claro de imunistoquímica para 5-HT, evidenciando os núcleos DR, MnR, Cli e B9.....	47
Figura 11. Fotomicrografias em campo claro de imunistoquímica para 5-HT, evidenciando os núcleos DR e PnR	48
Figura 12. Fotomicrografias em campo claro de imunistoquímica para 5-HT, evidenciando os núcleos RMg, RPa e RVL.....	49
Figura 13. Fotomicrografias em campo claro de imunistoquímica para 5-HT, evidenciando os núcleos RMg, RPa e CVL.....	50
Figura 14. Fotomicrografias em campo claro de imunistoquímica para 5-HT, evidenciando o núcleo ROb.	51

Figura 15. Gráficos de comparação entre a média da área (μm^2) dos neurônios nos diferentes núcleos serotoninérgicos.....52

Tabela 1. Comparação da média da área (μm^2) dos neurônios nos núcleos serotoninérgicos.....52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

10N	nervo vago
12N	nervo hipoglosso
4V	quarto ventrículo
5-HT	serotonina / 5-hidroxitriptamina
5-HT-IR	neurônios imunorreativos à serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
7N	nervo facial
Aq	aqueduto mesencefálico
B9	núcleo supralemniscal
BSA	albumina de soro bovino
Cb	cerebelo
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLi	núcleo linear caudal
CN	núcleo coclear
CVL	agrupamento serotoninérgico ventrolateral caudal
DR	núcleo Dorsal da Rafe
Dtg	núcleo tegmental dorsal
g7	joelho do nervo facial
GABA	ácido gama aminobutírico
icp	pedúnculo cerebelar inferior
IO	oliva inferior
IP	núcleo interpeduncular
lfp	fascículo longitudinal da ponte

Li	núcleo Linear
mcp	pedúnculo cerebelar médio
me5	tracto trigeminal mesencefálico
ml	lemnisco medial
MnR	núcleo Mediano da Rafe
PAG	substância cinzenta periaquedutal
PMnR	núcleo Paramediano da Rafe
Pn	núcleo pontino
PnR	núcleo Pontino da Rafe
py	tracto piramidal
RLi	núcleo linear rostral
RMg	núcleo Magno da Rafe
ROb	núcleo Obscuro da Rafe
RPa	núcleo Pálido da Rafe
RtTg	núcleo reticulotegmental pontino
RVL	agrupamento serotoninérgico ventrolateral rostral
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SNC	parte central do sistema nervoso
sp5	tracto trigeminal espinal
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
VL	agrupamento serotoninérgico ventrolateral
xscp	decussação do pedúnculo cerebelar posterior

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 HISTÓRICO DA SEROTONINA.....	12
1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A SEROTONINA	13
1.3 RECEPTORES SEROTONÉRGICOS.....	16
1.4 ANATOMIA DOS NÚCLEOS SEROTONÉRGICOS	18
1.5 SUJEITO EXPERIMENTAL.....	22
1.5.1 Taxonomia e filogenia	24
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 METODOLOGIA.....	29
3.1 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA.....	30
3.2 PROCEDIMENTOS.....	31
Anestesia	31
Perfusão	31
Remoção dos encéfalos e microtomia	32
Coloração de Nissl.....	33
Imunoistoquímica.....	34
Obtenção das imagens	36
Análise dos resultados.....	36
4 RESULTADOS	38
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÃO.....	60
7 REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DA SEROTONINA

Na década de 1940, um grupo de pesquisadores interessados em estudar a hipertensão identificou uma substância com atividade vasoconstritora, liberada no soro pelas plaquetas durante a coagulação do sangue. Rapport, Green e Page isolaram e caracterizaram essa substância a qual nomearam 'serotonina' em 1948, através de uma série de experimentos (Rapport, Green, & Page, 1948a, 1948b, 1948c, 1948d). Eles chamaram esta substância de serotonina usando as palavras latina *serum* (soro) e grega *tonic* (tônus) para nomeá-la, graças à sua presença no soro e ao seu efeito sobre o tônus vascular. Em 1949, a estrutura foi determinada como sendo 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Rapport, 1949). Dois anos depois, serotonina sintética foi pela primeira vez fabricada, o que facilitou estudos posteriores com tal substância.

Independentemente, Erspamer demonstrou em 1937 uma distribuição muito difundida na natureza de uma substância de contração do músculo liso a qual ele chamou de 'enteramina', por uma ampla quantidade ser estocada nas células enterocromafins do trato gastrointestinal. Em 1952, Erspamer e Asero relataram que a serotonina e a enteramina eram a mesma substância (Sjoerdsma & Palfreyman, 1990).

Nessa época, foram consideradas uma série de noções sobre o papel da serotonina no organismo, a maioria dos quais levou em conta a sua ação constritora profunda no músculo liso. Entre essas possibilidades estavam incluídas o controle do tônus vascular e, portanto, da pressão arterial sistêmica, o controle da motilidade gastrointestinal, a regulação da excreção de água, afetando arteríolas renais, e a regulação da ação hemostática por afetar os vasos sanguíneos após a liberação de plaquetas (Brodie & Shore, 1957).

Pouco tempo depois, a serotonina foi encontrada presente na parte central do sistema nervoso (SNC) dos mamíferos, em abundância e concentrada em quantidades variáveis em diferentes regiões do encéfalo (Twarog & Page, 1953). Isto levou à proposta da serotonina como um neurotransmissor no SNC. Rapidamente surgiu um alto interesse na serotonina por causa de seu envolvimento presumido nas principais psicoses. Esta hipótese foi baseada principalmente na constatação de que as ações de 5-HT na periferia foram antagonizados pela poderosa droga alucinógena LSD. Ao mesmo tempo, Brodie e Shore (1957) propuseram que a serotonina e a noradrenalina podem agir como sistemas neuroquímicos centrais opostos, algo semelhante à noradrenalina e acetilcolina no sistema nervoso autônomo periférico (Jacobs & Azmitia, 1992).

1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A SEROTONINA

A serotonina (5-HT) é uma molécula com diversos efeitos na parte central do sistema nervoso, bem como na periferia. Ela atua como hormônio e neurotransmissor e é onipresente no reino animal. Foi rapidamente identificada como estando presente em muitos tecidos, incluindo o encéfalo, pulmão, rim, plaquetas e no trato gastrointestinal (Mohammad-Zadeh, Moses, & Gwaltney-Brant, 2008).

Existem evidências científicas de que a síntese de serotonina encefálica possa ser modulada dieteticamente através da oferta de macronutrientes, como os carboidratos, proteínas e aminoácidos isolados (Lyons & Truswell, 1988). O precursor da serotonina é o aminoácido essencial triptofano e a disponibilidade de triptofano representa o fator limitante para a síntese de serotonina. Manipulando o nível extracelular de triptofano, a biossíntese de serotonina no encéfalo pode ser diretamente

influenciada (Halbach & Dermietzel, 2006). Curiosamente, a conversão do triptofano em serotonina representa apenas 5% do total do metabolismo de triptofano (Tyce, 1990).

A serotonina é uma monoamina biogênica, semelhante à adrenalina, noradrenalina, dopamina e histamina. É produzida em duas etapas: o aminoácido essencial triptofano é hidroxilado para 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela triptofano hidroxilase. Num segundo passo, o 5-HTP é descarboxilado pela enzima descarboxilase dos aminoácidos aromáticos, resultando em 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Figura 1). A enzima triptofano hidroxilase é o fator limitante para essa conversão, uma vez que possui pouca afinidade com outros aminoácidos e a sua distribuição é limitada aos tecidos contendo serotonina (Mohammad-Zadeh et al., 2008).

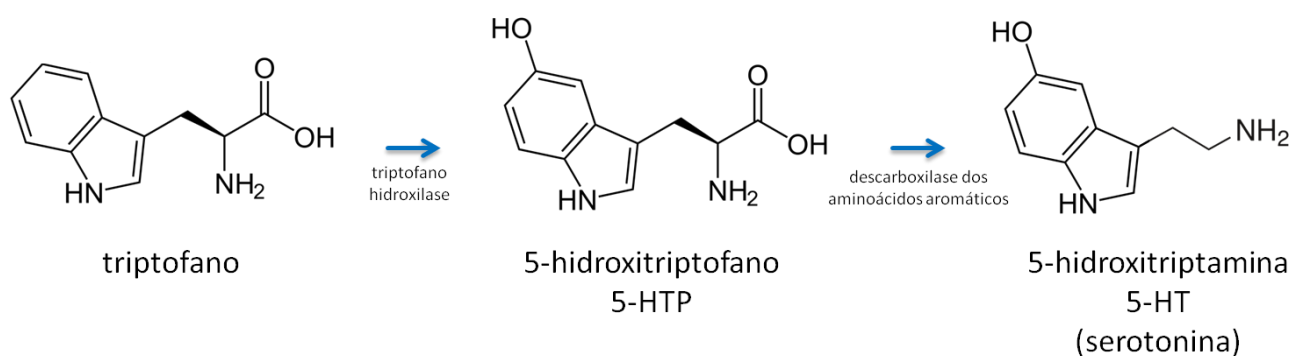


Figura 1. Conversão do triptofano à serotonina.

Síntese da serotonina fora da parte central do sistema nervoso é limitada às células enterocromafins e, em menor amplitude, às plaquetas. As plaquetas podem ter muito pouca capacidade de produzir a serotonina, no entanto, elas representam o principal local de armazenamento de serotonina fora do SNC (Mohammad-Zadeh et al., 2008).

Os neurônios serotoninérgicos projetam-se para praticamente todas as áreas do encéfalo. Essa característica, acrescentada ao fato de existirem diversos tipos de receptores para 5-HT, explicam a ampla variedade funcional deste neurotransmissor. Estudos relatam que a 5-HT tem sido associada ao controle do humor (Lowry et al., 2008; Montgomery, 1995), comportamento alimentar (Takase, Barone, & Nogueira, 2000; Takase & Nogueira, 2008), função locomotora (Noga, Johnson, Riesgo, & Pinzon, 2009), regulação do ciclo sono-vigília (Franco-Pérez, Ballesteros-Zebadúa, Custodio, & Paz, 2012; Jacobs & Azmitia, 1992; Monti, 2011), comportamento sexual, termorregulação, processamento sensorial nociceptivo, alerta e atenção (Jacobs & Azmitia, 1992; Sakai & Crochet, 2001), memória e aprendizagem (R. Vertes, Fortin, & Crane, 1999), regulação circadiana, entre outras (Jacobs & Azmitia, 1992). Além disso, estudos elucidaram que alterações funcionais desse sistema podem favorecer processos neuropatológicos, como distúrbios de sono e ansiedade, depressão e distúrbios neurodegenerativos como as doenças de Parkinson (Politis & Loane, 2011) e Alzheimer (Michelsen, Prickaerts, & Steinbusch, 2008). Aplicações experimentais de 5-HT sintética produzem efeitos semelhantes àqueles induzidos pela 5-HT produzida no sistema nervoso (Halbach & Dermietzel, 2006).

Apesar de ter sido implicada à serotonina uma ampla variedade de processos fisiológicos e comportamentais em animais vertebrados, ela não parece ser essencial a qualquer um deles. Esta aparente contradição é reconciliada com o conceito de que o sistema expansivo de neurônios serotoninérgicos exerce uma influência moduladora tônica sobre seus alvos difundidos. Assim, os neurônios serotoninérgicos regulam a expressão dos circuitos neurais, sem ser um componente necessário deles (Jacobs & Azmitia, 1992).

1.3 RECEPTORES SEROTONÉRGICOS

Os diversos efeitos da serotonina são mediados através de seus receptores. O receptor 5-HT é um receptor antigo filogeneticamente que evoluiu há mais de 750 milhões de anos e está presente tanto em invertebrados, quanto em mamíferos superiores (Peroutka & Howell, 1994).

No final da década de 1950, os grupos de Rocha e Silva em São Paulo e Gaddum em Edimburgo publicaram relatórios que provam que 5-HT causa a contração do íleo de porquinhos da Índia por dois mecanismos diferentes: diretamente pela ativação de células musculares lisas e indiretamente pela liberação de acetilcolina de nervos colinérgicos intramurais (citado por Richardson & Engel, 1986).

Em um artigo publicado em 1957, Gaddum e Picarelli demonstraram que os receptores 5-HT localizados nas células do músculo liso poderiam ser bloqueados por dibenzilina (D), ao passo que a ação contrátil indireta de 5-HT, através da ativação neuronal e liberação de acetilcolina foi inibida pela morfina (M). Eles então designaram os receptores 5-HT no músculo liso como D-receptores, e aqueles nos nervos colinérgicos como M-receptores. Esta foi a primeira demonstração clara da existência de subtipos de receptores 5-HT farmacologicamente distintos (Richardson & Engel, 1986).

Com o surgimento de técnicas de autorradiografia e imunoistoquímica tornou-se possível distinguir outros receptores serotonérgicos. Para simplificar, Bradley e colaboradores (1986) propuseram um sistema de nomenclatura do tipo 5-HT_x, tentando correlacionar os receptores que medeiam as respostas funcionais com os locais de ligação de radioligantes equivalentes. No final da década de 1980, quando a era da

biologia molecular se iniciou, tornou-se possível estudos com clonagem dos receptores, o que facilitou ainda mais o estudo e identificação dos mesmos.

Estudos farmacológicos e fisiológicos têm mostrado que as múltiplas ações da serotonina são mediadas por vários subtipos distintos de receptores de superfície celular. Os receptores 5-HT estão distribuídos entre sete famílias distintas (5-HT₁ a 5-HT₇), com algumas famílias contendo múltiplos receptores, classificados principalmente pelas suas sequências de aminoácidos semelhantes e propriedades estruturais. Segundo a classificação atual pelo banco de dados da IUPHAR (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology*), contamos com os seguintes receptores: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-ht_{1e}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D}, 5-HT_{3E}, 5-HT₄, 5-ht_{5a}, 5-ht_{5b}, 5-HT₆, 5-HT₇.

A heterogeneidade dos receptores 5-HT é gerada através de diferentes formas, como *splicing* alternativo (receptores 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₇), edição de RNA (5-HT_{2C}) e da formação de heterodímeros (por exemplo, o receptor 5-HT₄, com o β -2 adrenoceptor) (Barnes et al., 2013).

A estrutura quaternária dos receptores de serotonina consiste em, pelo menos, três diferentes constituintes: o transportador, o canal iônico e o receptor acoplado à proteína G. A maior parte dos receptores serotoninérgicos pertence à superfamília de receptores acoplados à proteína G (Halbach & Dermietzel, 2006).

Em contraste a estes subtipos de receptores acoplados à proteína G, que medeiam respostas lentas e modulatórias através de vias de sinalização de segundo mensageiro, o receptor 5-HT₃ é um canal iônico dependente de ligante. A ativação deste receptor conduz à abertura de canais catiônicos não seletivos, para promover a rápida transmissão sináptica (Yakel & Jackson, 1988).

Sendo os receptores 5-HT₃ canais iônicos dependentes de ligantes, a família de receptores 5-HT está mostrando diversidade semelhante às famílias de receptores de acetilcolina e glutamato, que atuam através de ambos, dos receptores metabotrópicos e alguns canais dependentes de ligantes de ação rápida (Hannon & Hoyer, 2008).

1.4 ANATOMIA DOS NÚCLEOS SEROTONÉRGICOS

A localização central ou na linha média de grandes neurônios no tronco encefálico tem atraído a atenção dos anatomistas desde a época de Ramon y Cajal, que descreveu estas células como grandes neurônios multipolares com projeções difusas. Empregando a técnica histoquímica de fluorescência, Dahlstrom & Fuxe (1964) descreveram a localização dos corpos celulares e terminais axônicos de neurônios contendo 5-HT no encéfalo de ratos. Esta descrição dos neurônios serotonérgicos respondeu a pergunta de Ramon y Cajal sobre a extensão das projeções dos neurônios da rafe. As informações também forneceram um esquema das conexões desse sistema neuroquímico. Aceita-se agora que o sistema da rafe no tronco encefálico compreende o sistema anatômico/neuroquímico mais expansivo e complexo no SNC de mamíferos (Jacobs & Azmitia, 1992).

Dahlstrom e Fuxe introduziram um sistema de código para os grupos de células serotonérgicas encontrados no tronco encefálico de ratos. De acordo com esse sistema, os grupos de células serotonérgicas foram codificados como B1 a B9, sendo B1 o grupo de células mais caudal (Figura 2). Os grupos de células serotonérgicas B sobrepõem principalmente com os núcleos da rafe, mas há algumas exceções, ou seja, algumas estruturas citoarquitetônicas pertencem a mais de um grupamento B ou, inversamente,

um grupamento B pode abranger mais de um núcleo ou entidades citoarquitetônicas identificáveis apenas vagamente (Törk, 1990).

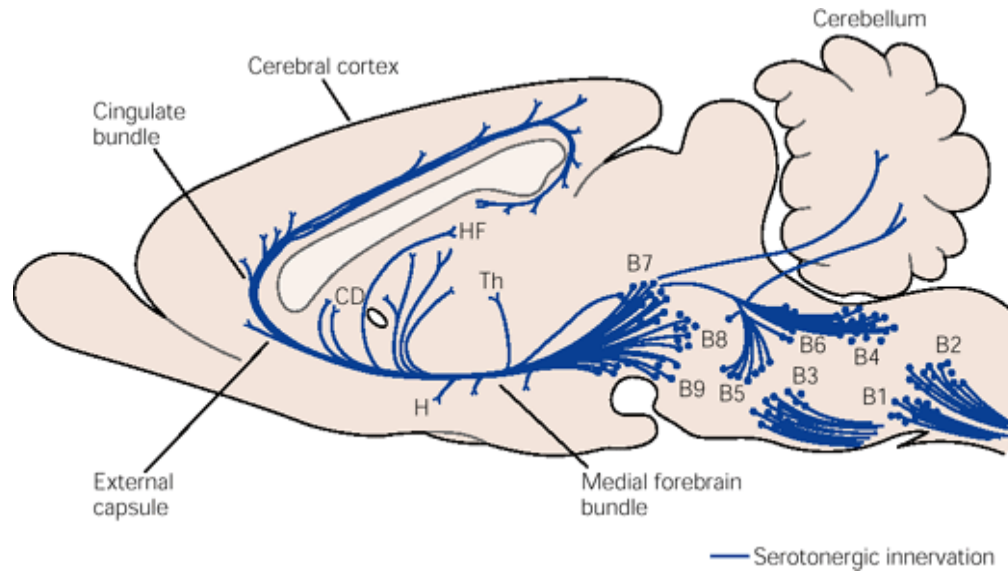


Figura 2. Descrição clássica dos grupamentos serotonérgicos no rato feito por Dahlström e Fuxe em 1964. Fonte: Kandel, Schwartz, & Jessell (2000)

Com a introdução da técnica de imunohistoquímica, esta classificação foi integrada com a nomenclatura citoarquitetônica do sistema da rafe (Törk, 1985). Embora os principais grupos celulares do sistema serotonérgico sigam as divisões citoarquitetônicas dos núcleos da rafe, essa sobreposição não é exata, considerando que numerosos neurônios imunorreativos à serotonina (5-HT-IR) estão presentes em outros setores da formação reticular, além dos limites dos núcleos da rafe, apesar de aparentemente contínuos com os aglomerados de células 5-HT-IR, bem como alguns neurônios não serotonérgicos estão presentes nos núcleos da rafe (Harding, Paxinos, & Halliday, 2004; Törk, 1985).

Assim, dentro do neuro-eixo a localização da maioria dos neurônios 5-HT se sobrepõe com os núcleos da rafe do tronco encefálico, de tal maneira que a 5-HT pode ser considerada um marcador dos núcleos da rafe (Törk, 1985).

De acordo com Paxinos e Watson (2007) os núcleos da rafe no rato estão agrupados em sequência rostrocaudal: no mesencéfalo estão presentes os núcleos Linear (Li), com suas porções rostral (RLi) e caudal (CLi) e o núcleo Dorsal da Rafe (DR); na ponte, os núcleos Mediano da Rafe (MnR), Paramediano da Rafe (PMnR) e Pontino da Rafe (PnR); e por último, no bulbo, os núcleos Magno da Rafe (RMg), Pálido da Rafe (RPa) e Obscuro da Rafe (ROb) (Figura 3).

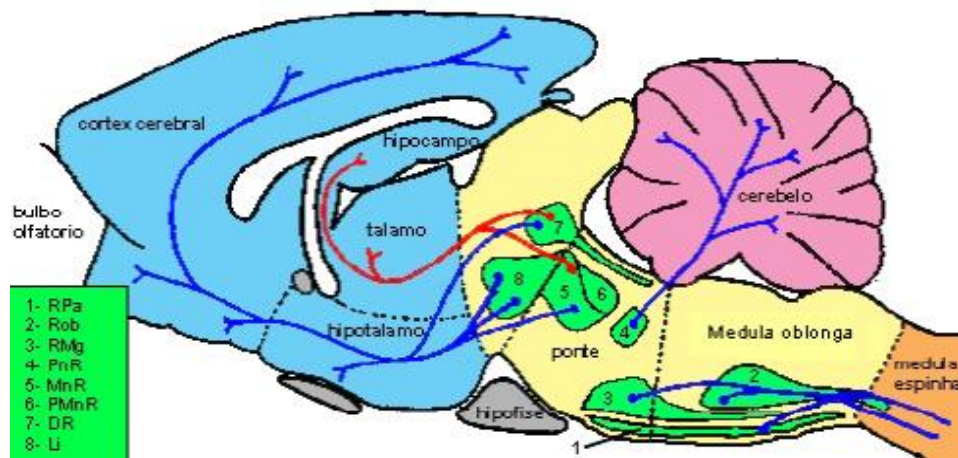


Figura 3. Descrição dos núcleos da rafe no rato. Fonte: Nogueira et al., 2004.

O complexo da rafe emite uma extensa rede de projeções para diversas áreas da parte central do sistema nervoso, no entanto, a densidade dessas projeções apresenta variações (Törk, 1985). Os núcleos de maior densidade serotonérgica e com a maior quantidade de projeções identificadas são os núcleos dorsal e mediano da rafe (Vertes, 1991). Em ratos, aproximadamente 50% dos neurônios serotonérgicos são encontrados no núcleo dorsal da rafe (Jacobs & Azmitia, 1992).

Estudos com aferentes dos núcleos da rafe mostram que as principais inervações são interconexões entre os próprios núcleos da rafe. Porém há muitos outros aferentes, como importantes projeções não serotonérgicas da habênula lateral (glutamatérgico) e do *locus coeruleus* (noradrenérgico). Outros aferentes neuronais relatados incluem vários neurotransmissores (por exemplo acetilcolina, GABA, dopamina, histamina e epinefrina) e neuromoduladores (encefalina, endorfina, substância P, colecistocinina, neurotensina, CRF (fator de liberação de corticotropina) e ACTH (corticotropina)). Células não neuronais também comunicam-se com neurônios serotonérgicos (por exemplo, células oligodendrogliais, ependimárias e endoteliais). Esta convergência de entradas neuronais e não neuronais fornece às células da rafe uma ampla amostragem de informações de vários sistemas neurais e endócrinos que podem ter relevância neurotrófica bem como fisiológica (Jacobs & Azmitia, 1992).

Portanto, o sistema serotonérgico consiste em um grupo de neurônios morfológicamente diverso, cujos corpos celulares estão localizados nos núcleos da rafe do tronco encefálico e em algumas regiões da formação reticular; seus complexos sistemas axonais inervam praticamente todas as regiões da parte central do sistema nervoso, mas com particular densidade no córtex cerebral, estruturas límbicas, gânglia basal, muitas regiões do tronco encefálico e substância cinzenta da medula espinal (Törk, 1990).

A anatomia destes grupos foi revisada em muitas espécies, como por exemplo em rato (Paxinos & Watson, 2007; Takeuchi, Kimura, & Sano, 1982; Törk, 1990), coelho (Bjarkam, Sørensen, & Geneser, 1997), gato (Takeuchi et al., 1982), mocó (Soares et al., 2012), humanos (Törk, 1990), macacos do Novo e Velho Mundo (Felten, Laties, & Carpenter, 1974; Hornung & Fritschy, 1988), várias espécies africanas como o

mussaranho-elefante (Pieters, Gravett, Fuxe, & Manger, 2010), o gerbil (Moon, Maseko, Ihunwo, Fuxe, & Manger, 2007), o damão-do-cabo (Gravett, Bhagwandin, Fuxe, & Manger, 2009), e inclusive em quirópteros de espécies diferentes da nossa, todas características da África (Dell et al., 2010; Kruger et al., 2010; Maseko, Bourne, & Manger, 2007; Maseko & Manger, 2007).

1.5 SUJEITO EXPERIMENTAL

Artibeus planirostris (Chiroptera, Phyllostomidae) é um morcego que apresenta pelagem de coloração castanha-acinzentada e listras faciais pouco evidentes. É uma espécie de tamanho médio, com comprimento do corpo variando de 7,5 a 11 cm, e massa corporal entre 40 e 69 g (Reis, Fregonezi, Peracchi, & Shibatta, 2013) (Figura 4).



Figura 4. *Artibeus planirostris*. Foto: Marília Barros

Artibeus planirostris apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo em zonas tropicais de diversos países ao longo da metade norte da América do Sul (Hollis, 2005). É um morcego comum em muitas regiões do Brasil (Zortéa, 2007), inclusive no Rio Grande do Norte (Barros, M.A.S.; dados não publicados) (Figura 5).

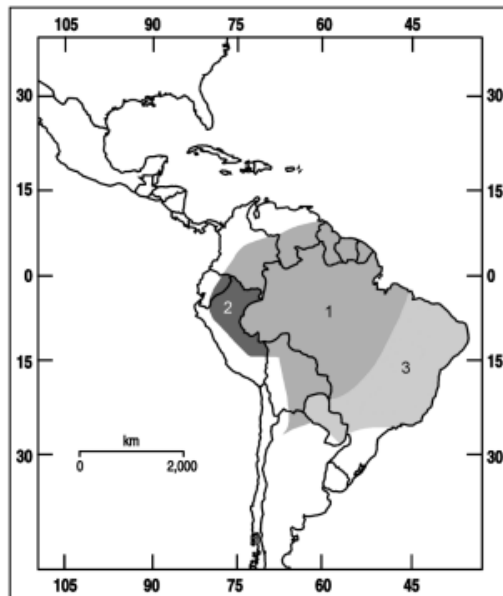


Figura 5. Distribuição geográfica de *Artibeus planirostris*: 1, *A. p. fallax*; 2, *A. p. hercules*; 3, *A. p. planirostris*. Fonte: Hollis, 2005

Artibeus planirostris é um morcego primariamente frugívoro, alimentando-se de uma grande variedade de frutas silvestres e cultivadas e, em menor frequência, de néctar, pólen e insetos (Zortéa, 2007). Habita fragmentos de mata, em áreas de floresta úmida ou xeromórfica (Hollis, 2005). Durante o dia, a espécie utiliza folhagem e ocos de árvores como abrigo (Reis et al., 2013). Embora tenha sido registrado em diferentes horários ao longo do período noturno, *A. planirostris* é mais ativo no início da noite, principalmente na segunda e terceira hora após o pôr do sol (Bernard, 2002).

É uma espécie oportunista e utiliza principalmente habitat fechado onde forrageia junto à vegetação (Bernard, 2002). Apresenta estratégia de forrageio do tipo “coletor” (*gleaning*), que consiste na captura de alimentos relativamente estacionários junto a uma superfície – em contraste com morcegos “aéreos” (*aerial*) que capturam presas em voo (Kalko, Handley Jr, & Handley, 1996). Ao localizar uma fonte de frutos, morcegos voam em círculos ao redor da mesma e então se aproximam de um fruto

individualmente (Kalko, 1994). Ainda em voo ou com um breve pouso na planta, os morcegos mordem, puxam e arrancam a fruta, voando para um poleiro temporário, geralmente sob as folhas de uma árvore, onde a ingerem (Kalko et al., 1996). Os morcegos ingerem a polpa e sementes pequenas, descartando o restante do fruto e sementes grandes (Handley Jr, Wilson, & Gardner, 1991).

Morcegos frugívoros da família Phyllostomidae podem utilizar o olfato e a ecolocalização na busca e discriminação de frutos (Kalko & Condon, 1998; Kalko, 1994; Korine & Kalko, 2005; Thies, Kalko, & Schnitzler, 1998). O papel da visão na ecologia sensorial de morcegos no geral ainda é pouco conhecido, mas morcegos frugívoros, incluindo espécies de *Artibeus*, apresentam maior acuidade visual e capacidade de discriminar formas em comparação a morcegos com outros tipos de hábito alimentar (Neuweiler, 2000; Suthers, 1966). Estudos morfológicos, moleculares e eletrofisiológicos sugerem que morcegos filostomídeos são capazes de perceber cores (Hope & Bhatnagar, 1979; Müller et al., 2009; Wang et al., 2004).

1.5.1 Taxonomia e filogenia

A ordem Chiroptera tem sido tradicionalmente dividida, com base em caracteres morfológicos de espécies fósseis e atuais, em duas subordens monofiléticas: Megachiroptera e Microchiroptera (Simmons & Geisler, 1998; Simmons, 1994). Os megaquirópteros correspondem a uma única família (Pteropodidae), à qual pertencem as espécies de raposas-voadoras que ocorrem exclusivamente nas zonas tropicais do Velho Mundo (Neuweiler, 2000). Já os microquirópteros são cosmopolitas e englobam as 17 demais famílias (Simmons, 1998), incluindo a família Phyllostomidae à qual pertence *A. planirostris*. Os microquirópteros desenvolveram um complexo sistema de ecolocalização laringeal ausente nas raposas-voadoras, que apresentam apenas em

algumas espécies cavernícolas (gênero *Rousettus*) capazes de utilizar um sistema rudimentar de ecolocalização a partir de estalidos da língua (Altringham, 1996).

Recentemente, porém, esta classificação tem sido contrariada por estudos filogenéticos baseados em dados moleculares, que indicam que alguns grupos de morcegos com ecolocalização sofisticada compartilham um ancestral comum com as raposas-voadoras (Teeling, 2009; Teeling et al., 2005). Dessa forma, a família Pteropodidae e mais cinco famílias de microquirópteros foram agrupados na subordem Yinpterochiroptera, e as famílias restantes, incluindo a Phyllostomidae, na subordem Yangochiroptera (Jones & Teeling, 2006; Teeling, Dool, & Springer, 2012) (Figura 6).

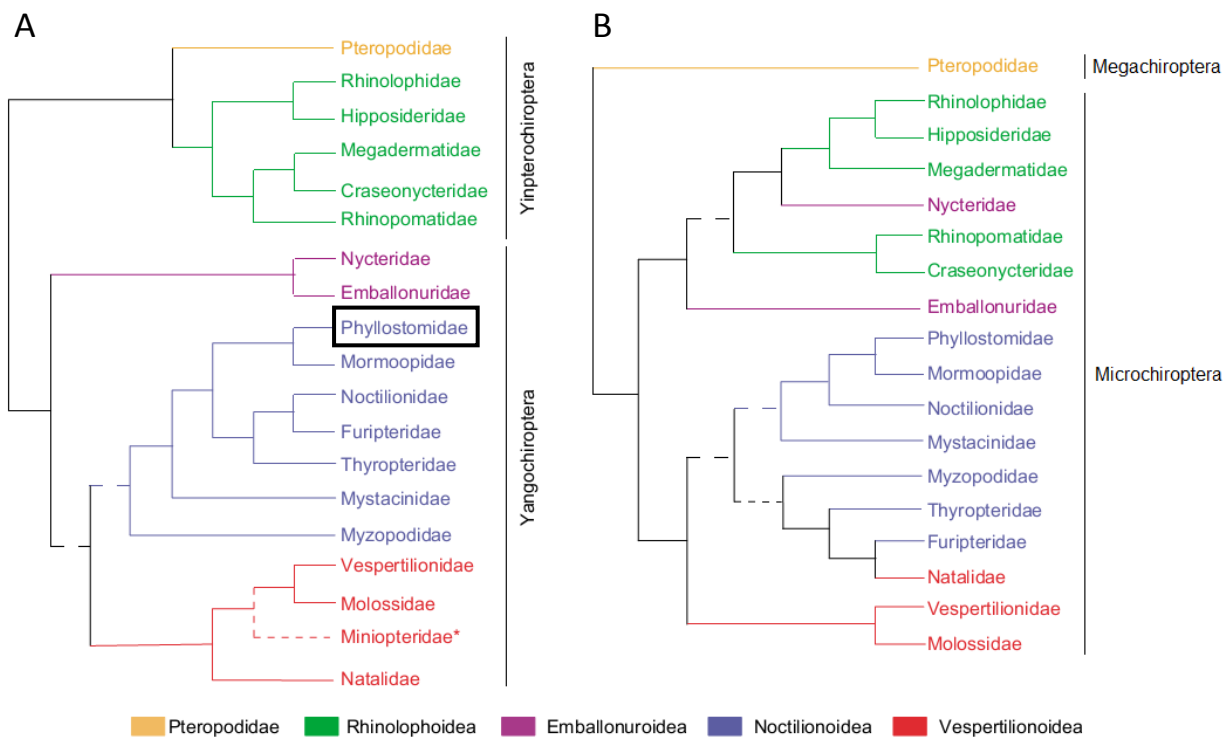


Figura 6. Classificação filogenética da ordem Chiroptera. A) Classificação filogenética atual, baseada em dados moleculares, resultando nas subordens Yinpterochiroptera e Yangochiroptera; B) Classificação filogenética tradicional, baseada em características morfológicas e fisiológicas, resultando nas subordens Megachiroptera e Microchiroptera. Em destaque a família do sujeito experimental do nosso estudo (adaptado de Jones & Teeling, 2006).

Dentre os diferentes táxons de morcegos, a família Mormoopidae é a mais filogeneticamente próxima da família Phyllostomidae (Datzmann, Helversen, & Mayer, 2010; Jones & Teeling, 2006). Muito provavelmente, o ancestral comum de ambas as famílias foi um insetívoro, uma vez que a insetivoria estrita é a estratégia de forrageio adotada pelos mormoopídeos e pela maciça maioria das espécies de morcegos (Baker, Bininda-Emonds, Mantilla-Meluk, Porter, & Van den Bussche, 2012). Morcegos filostomídeos especializados no consumo de frutos, como o gênero *Artibeus*, representam condições mais derivadas e recentes em relação às espécies insetívoras/onívoras, hematófagas, carnívoras e nectarívoras da família (Baker et al., 2012). As relações filogenéticas entre as diferentes espécies de *Artibeus* têm sido amplamente debatidas nos últimos anos (Lim, Engstrom, Lee, Patton, & Bickham, 2004; Marques-Aguiar, 1994; Van Den Bussche, Hudgeons, & Baker, 1998). Estudos recentes indicam que *A. planirostris* é espécie irmã de *A. amplus* e estreitamente relacionada à *A. obscurus* (Redondo, Brina, Silva, Ditchfield, & Santos, 2008), porém a filogenia do gênero ainda não é consensual.

O sistema serotoninérgico está envolvido em inúmeras funções orgânicas. Sua importância também se dá porque o mesmo recebe e envia projeções para áreas corticais, tronco encefálico e medula espinal, conectando assim diversas áreas do sistema nervoso num sistema complexo para influenciar comportamentos.

Tendo em vista a importância do sistema serotoninérgico para o organismo e da escassez de trabalhos com o sistema nervoso de morcegos, o presente trabalho torna-se importante para a comunidade científica, além de fornecer subsídios para a compreensão do comportamento desta espécie, bem como contribuir para estudos de

sistemática, uma vez que alguns núcleos podem apresentar localização e citoarquitetura distintas de outras espécies já estudadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar, através de imunoistoquímica para 5-HT, os grupamentos serotoninérgicos no encéfalo do morcego *Artibeus planirostris*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar os grupamentos serotoninérgicos, baseado no seu conteúdo em 5-HT, usando como padrão a terminologia do rato;
2. Delimitar citoarquiteticamente os núcleos que expressam 5-HT utilizando coloração de Nissl;
3. Caracterizar morfológicamente as células 5-HT-IR em cada um dos núcleos;
4. Comparar a média das áreas dos corpos neuronais dos grupamentos serotoninérgicos;
5. Comparar o sistema serotoninérgico do morcego *Artibeus planirostris* com outros modelos animais já estudados, tais como roedores e primatas.

3 METODOLOGIA

Foram utilizados 7 exemplares de *Artibeus planirostris*, capturados no campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, nordeste do Brasil (Licença SISBIO Nº 25233-2 - em anexo). As coletas foram realizadas em dois diferentes locais: na borda de um fragmento de vegetação, no Centro de Biociências (Coordenadas em UTM: 25M 256251 / 9353764), e no interior de um agrupamento arbóreo, nas proximidades da Reitoria da UFRN (Coordenadas em UTM: 25M 256226 / 9354214).

Para as capturas, foram utilizadas de uma a três redes de neblina Ecotone® de nylon, dimensões 12 x 3 m e tamanho de malha 19 x 19 mm. As redes foram armadas no nível do solo e, em cada noite de captura, foram abertas logo após o pôr do sol e permaneceram expostas por duas horas consecutivas.

Cada indivíduo capturado foi analisado quanto ao sexo e à faixa etária. Para o presente estudo, foram coletados apenas morcegos machos adultos, mantidos em sacos de algodão até o término da amostragem e transporte até o laboratório. Os demais indivíduos foram soltos no mesmo local de captura. Todos os animais utilizados estavam em boas condições de saúde.

Todos os cuidados foram tomados para evitar dor e sofrimento dos animais, seguindo estritamente às normas estabelecidas pelo National Research Council of the National Academy publicadas no livro “Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research”. Uma versão online está disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK43327>.

É importante ressaltar que o presente trabalho está isento de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (Parecer de Isenção CEUA Nº 001/2014 - em anexo) uma vez que os sujeitos utilizados foram os mesmos obtidos através de outro

projeto em andamento no laboratório, previamente autorizado pelo comitê local (Protocolo CEUA Nº 09/2012 - em anexo).

Todos os procedimentos foram realizados no laboratório de Neuroanatomia no Departamento de Morfologia da UFRN, vinculado ao Programa de Pós-graduação em Psicobiologia.

3.1 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Todos os indivíduos capturados foram identificados por uma especialista em quirópteros. Em campo, a identificação até o nível de espécie foi baseada em um conjunto de características morfológicas externas de acordo com a literatura (Aguirre, Vargas, & Solari, 2009; Haynes & Lee Jr, 2004; Hollis, 2005; Miranda, Bernardi, & Passos, 2011; Reis et al., 2013; Simmons & Voss, 1998). Para diferenciar espécies do gênero *Artibeus*, estes estudos levam em consideração, principalmente, padrões da pelagem, das listras faciais e da morfologia da folha nasal, e a espécie em questão foi identificada como *A. planirostris* por apresentar: 1. pelagem castanho-clara ou cinza-clara, curta, pouco densa e áspera; 2. listras faciais pouco evidentes; 3. borda inferior da folha nasal completamente livre; 4. antebraço com poucos pelos; 5. pontas das asas esbranquiçadas; 6. bordas das orelhas e trago de coloração não diferenciada; 7. ausência de máscara escura ao redor dos olhos. Até o presente momento, todos os indivíduos capturados corresponderam a exemplares típicos de *A. planirostris*, exceto pelo comprimento do antebraço (< 62 mm), menor em relação ao descrito para outras regiões da América do Sul (Aguirre et al., 2009; Barquez, Mares, & Braun, 1999; Miranda et al., 2011; Simmons & Voss, 1998). Porém, esta medida pode ser bastante variável (de 56 a 73 mm) (Reis et al., 2013) e, assim como foi observado para o

Cerrado (Zortéa, 2007), indivíduos da espécie aparentemente apresentam menor tamanho corporal no Rio Grande do Norte (Barros, M.A.S.; dados não publicados).

Para confirmação da identificação taxonômica em laboratório, um indivíduo da espécie foi sacrificado para retirada e exame detalhado do crânio. A confirmação da espécie com base na morfometria craniana foi realizada segundo a literatura (Barquez et al., 1999; Haynes & Lee Jr, 2004; Hollis, 2005; Simmons & Voss, 1998). Esta análise confirmou a identificação do indivíduo como *A. planirostris*, devido à ocorrência das seguintes características morfológicas: 1. constrição pós-orbitária ampla (> 7,3 mm); 2. arco supraorbital pouco acentuado; 3. processo pós-orbital pouco desenvolvido; 4. presença de terceiro molar superior; 5. largura do canino > 8,4 mm; 6. maior comprimento do crânio > 29.5 mm. Este indivíduo foi fixado em formol 10%, encontra-se mantido em álcool 70% e será posteriormente tombado em uma coleção científica pública como material testemunho.

3.2 PROCEDIMENTOS

Anestesia

Os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de ketamina (5mg/Kg), xilazina (0,5mg/Kg), diazepam (0,5mg/Kg) e cloridrato de tramadol (5mg/Kg).

Perfusão

Ao atingir o plano anestésico, cada animal foi submetido à perfusão transcardíaca, que compreende os seguintes passos:

1. Posicionamento do animal em decúbito dorsal sobre tela de arame sob ponto de água.

2. Toracotomia, com incisão de pele, músculos e arco costal, sendo estes removidos em bloco, para exposição do coração.
3. Cardiopunção no ventrículo esquerdo, utilizando uma agulha 16G (1,5 x 10 mm), a qual foi direcionada para a aorta, seguindo-se uma incisão no átrio direito. A agulha foi conectada a uma bomba peristáltica (Cole-Parmer), passando-se 150 ml de solução salina a 0,9% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 com heparina (Parinex, Hipolabor, 2ml/L de solução salina) a um fluxo de 60 ml/min, seguida de 300 ml de solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, dos quais 150 ml a um fluxo inicial de 60 ml/min e 150 ml o fluxo final de 30 ml/min, durando todo o procedimento de perfusão em média 30 minutos.

Remoção dos encéfalos e microtomia

Concluída a etapa da perfusão, os encéfalos foram retirados da cavidade craniana. Em seguida foram pós-fixados *overnight* na mesma solução fixadora e então colocados em solução sacarose 30% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, a 4 °C, até serem submetidos à microtomia. Os encéfalos foram congelados por gelo seco e seccionados em um micrótomo de deslizamento (Leica SM 2000R). Foram obtidas secções coronais de 30µm de espessura, as quais foram distribuídas sequencialmente em 6 compartimentos, em um meio líquido contendo tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, de maneira cíclica e sequenciada. Desse modo a distância entre uma secção e a outra imediatamente seguinte de um mesmo compartimento é de aproximadamente 180µm.

Os cortes de um compartimento foram imediatamente montados em lâminas de vidro e submetidas à coloração de Nissl para permitir a demarcação das

estruturas. Os cortes dos demais compartimentos foram armazenados em solução anticongelante (sacarose, etileno glicol e tampão fosfato 0,05M pH 7,4) e conservados a -20 °C para utilização posterior em procedimentos de imunistoquímicas.

Coloração de Nissl

Para o estudo da citoarquitetura dos núcleos, utilizamos a coloração pelo método de Nissl, empregando a tionina como corante. Através da coloração de Nissl o retículo endoplasmático rugoso, o núcleo e o nucléolo das células são seletivamente corados, sejam elas, neurônios ou células da glia, proporcionando a possibilidade de identificá-las através de seu tamanho, forma e localização. A cor resultante da marcação é azul-arroxeadada. Esse procedimento foi realizado com cada um dos animais utilizados, uma vez que, podem ocorrer diferenças individuais nas estruturas encefálicas.

Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e deixados secar por aproximadamente uma semana. Em seguida, foram submetidos à coloração de Nissl, passando inicialmente por uma desidratação dos cortes em concentrações crescentes de alcoóis etílicos (1x 70% por 2h, 2x 95% por 3 minutos cada, 2x 100% por 3 minutos cada) sendo posteriormente diafanizadas em xilol (1x por 3 minutos e 1x por 30 minutos). Os cortes foram reidratados em concentrações decrescentes de alcoóis etílicos por 2 minutos cada, chegando a tionina onde ficou por 40 segundos. Foram então mergulhados 15 vezes em água destilada e novamente desidratados (álcool 50% 1x, 1x 70%, 2x 95%, 3x 100% por 2 minutos cada) e diafanizados (2x

em xilol por 2 minutos cada), sendo, ao final, cobertos com lamínula utilizando como meio de montagem o Entellan.

Imunoistoquímica

A imunoistoquímica tem como princípio a utilização de um anticorpo específico ao antígeno estudado, cuja interação pode ser identificada pela ligação a um marcador que pode ser uma molécula fluorescente ou uma enzima (peroxidase ou fosfatase), cuja atividade será utilizada para produzir um complexo colorido na presença de um cromógeno.

Sendo assim, os cortes de um compartimento de cada morcego foram submetidos à imunoistoquímica para revelação de serotonina, com a finalidade de delimitar os grupamentos serotoninérgicos. As secções foram submetidas inicialmente a cinco lavagens de cinco minutos cada, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 em agitador orbital, em seguida, submetidas ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,3% diluído em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 por vinte minutos para a neutralização da peroxidase endógena, evitando aumento do *background* durante a reação de peroxidase a qual o tecido foi submetido. Posteriormente as secções foram submetidas a mais cinco lavagens de cinco minutos cada em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4.

Após as lavagens, os cortes foram incubados em uma solução de bloqueio contendo albumina de soro bovino (BSA) a 5% diluído em Triton X-100 durante sessenta minutos com o propósito de bloquear sítios inespecíficos ao anticorpo primário. Em seguida, as secções foram incubadas em solução contendo anticorpo primário anti-5-HT obtido em coelho (Sigma) em diluição de 1:5000, Triton X-100 0,4% e albumina de soro bovino a 2%, por 16 horas em rotor em baixa velocidade (60 a

80rpm) a 24 °C. Ao fim deste período os cortes foram lavados novamente por cinco vezes de cinco minutos cada em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Posteriormente a esta etapa as secções foram colocadas em contato com o anticorpo secundário biotilado anti-coelho obtido em cabra (Jackson Laboratories) diluído a 1:1000 em Triton X-100 0,4% , por 90 minutos à 24 °C, sob agitação lenta (60 a 80rpm), em rotor. Em seguida os cortes passaram por uma sessão de lavagens novamente em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e foram colocados em solução de avidina e biotina marcados com HRP (Vectastain Elite ABC Kit Standard – Vector Laboratories), numa diluição de 1:100 em Triton X-100 a 0,4%, contendo NaCl, por noventa minutos. Essa solução foi preparada trinta minutos antes, para que ocorra a formação de complexos avidina-biotina-peroxidase. Ao fim da incubação neste complexo os cortes foram lavados novamente por cinco vezes de cinco minutos cada em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Para evidenciar a reação, as secções foram expostas a meio contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como substrato e 25mg de 3,3',4,4'tetrahidrocloro-diaminobenzidina (DAB), utilizada como cromógeno, diluída em 99 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. A solução de DAB e tampão foi preparada cinco minutos antes dos cortes entrarem em contato, e estes permaneceram em contato com a solução durante aproximadamente cinco minutos. Após este período foi acrescentado H_2O_2 a 0,3%, que na solução final se torna 0,03%. Ao adicionar o H_2O_2 a reação inicia e o substrato começa a ser utilizado, deixando reagir até que fique com coloração marrom, o que ocorre em cerca de 5 minutos. O tempo ideal de reação varia de acordo com o anticorpo. Ao final desta etapa os cortes foram lavados por cinco vezes de cinco minutos cada em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 em agitador orbital.

Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, que após secagem em temperatura ambiente por aproximadamente uma semana, foram imersas em solução de tetróxido de ósmio a 0,05% com o intuito de intensificar a reação. Após as etapas de desidratação em baterias de álcool de graduação crescente até o álcool absoluto (1x 70%, 1x 95%, 2x 100% por 5 minutos cada) e de diafanização em xilol (2x por 5 minutos cada), foram montadas as lamínulas, utilizando como meio de montagem o Entellan.

Obtenção das imagens

As secções do encéfalo, coradas pelo método de Nissl e/ou submetidas à imunistoquímica para serotonina foram examinadas ao microscópio óptico (Nikon Eclipse Ni) em campo claro e então selecionadas. Imagens digitais foram obtidas de secções representativas usando uma videocâmara digital (Nikon DS-Ri1) acoplada ao microscópio, ajustado com as objetivas de 2X e 20X. As imagens foram analisadas, corrigidas minimamente para brilho e contraste e os esquemas construídos a partir do software Canvas 12, tomando como base o atlas estereotáxico do encéfalo de rato (Paxinos & Watson, 2007) e de camundongo (Franklin & Paxinos, 2008).

Análise dos resultados

A análise morfométrica das células, mensurando a área dos neurônios 5-HT-IR em cada núcleo serotoninérgico, foi realizada com o auxílio da ferramenta para delimitação de área do software NIS-Elements AR 4. Os núcleos DR e MnR são os mais extensos e por isso foram analisados em nível rostral, médio e caudal. Nos demais núcleos, as células foram delimitadas em sua porção mais representativa, coincidindo

com secções no nível médio desses núcleos. Os núcleos RVL e CVL foram agrupados durante a análise já que trata-se de subdivisões de um mesmo núcleo, sendo portanto apresentado nos resultados como agrupamento serotoninérgico ventrolateral (VL). O número total de células mensuradas em cada núcleo serotoninérgico foi de: DR (327), MnR (118), PMnR (52), CLi (26), B9 (42), PnR (26), RMg (22), RPa (20), VL (22) e ROb (25).

Para a análise estatística, foi utilizado o software SPSS Statistics 20. Foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e *post hoc* de Tukey. O teste Anova one-way foi utilizado para comparação das médias de área das células 5-HT-IR nos núcleos de interesse do estudo. Em todos os testes foi considerado $p \leq 0,05$ como sendo estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

Através das técnicas de imunohistoquímica para 5-HT e da coloração citoarquitetônica de Nissl pudemos observar o padrão de organização dos núcleos serotoninérgicos no encéfalo do morcego *Artibeus planirostris*. Ao longo de todo o tronco encefálico foram encontrados neurônios 5-HT-IR, localizados predominantemente na linha mediana, desde o nível da porção média do núcleo interpeduncular até a transição bulbo-espinal.

Entre os exemplares analisados, o comprimento do encéfalo variou entre 16,1 e 21,5mm, com um valor médio de 17,65mm, da extremidade anterior do córtex cerebral ao limite bulbo-espinal (Figura 7). O peso médio dos exemplares analisados foi de 41,6g, variando entre 39 e 45,6g.



Figura 7. Encéfalo do morcego *Artibeus planirostris* em vista ventral, dorsal e lateral.

A terminologia para as estruturas anatômicas adotada nesse trabalho está de acordo com a literatura existente (Bjarkam et al., 1997; Paxinos & Watson, 2007; Törk, 1990).

No sentido rostrocaudal, os primeiros neurônios 5-HT-IR no encéfalo do morcego aparecem no mesencéfalo, coincidindo com a presença de estruturas como substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo interpeduncular (IP) e núcleo pontino (Pn) (Figura 8A).

Os neurônios 5-HT-IR mais rostrais aparecem no Núcleo Linear Caudal (CLi). O CLi está localizado dorsalmente ao núcleo interpeduncular (IP) (Figura 8A e 8B). Em sua porção mais rostral é possível observar que o núcleo está disposto em formato triangular, com seus neurônios sendo atravessados pelas fibras da decussação do pedúnculo cerebelar superior (xscp), mais evidente em sua porção caudal. Esses neurônios possuem formato ovoide (Figura 9C e 10C).

Ao mesmo nível, coincide com o surgimento do grupamento B9 (núcleo serotoninérgico supralemniscal). Esse núcleo não está situado na linha mediana, como a maioria dos outros núcleos serotoninérgicos. Ele está localizado na formação reticular, lateralmente ao IP, com suas células imersas nas fibras do lemnisco medial (Figura 8A e 8B). Seus neurônios possuem formato ovoide (Figura 9E e 10D).

O Núcleo Mediano da Rafe (MnR) está localizado na linha mediana, imediatamente dorsal a decussação do pedúnculo cerebelar superior (Figura 8A e 8B). Os neurônios que formam este núcleo são vistos como uma coluna de células de cada lado da linha mediana, e seus limites laterais não estão claramente definidos, com muitas células se estendendo em uma coluna vertical lateralizada, conhecida como paramediano da rafe (PMnR). Os neurônios tanto do MnR quanto do PMnR são ovóides e arredondados (Figura 9C e 10C).

Os neurônios pertencentes ao Núcleo Dorsal da Rafe (DR) estão intimamente relacionados com a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e periventricular, sendo

localizados adjacentes a porção ventral da parede do aqueduto cerebral (Figura 8A e 8B). É o núcleo que possui a maior densidade de neurônios imunorreativos a serotonina, fortemente corado, com neurônios localizados na linha mediana com lateralizações.

Mais caudalmente, ao nível do fascículo longitudinal da ponte (lfp), visualizamos a porção final do DR, além de um aglomerado de células 5-HT-IR dispersas na linha mediana, identificado como o Núcleo Pontino da Rafe (PnR) (Figura 8C). Em sua porção final, o DR possui um formato de T, onde é possível observar que os neurônios localizados na região dorsal do T, possuem formato ovoide e fusiforme, enquanto que os neurônios localizados na linha mediana possuem formato ovoide e arredondado (Figura 11B). Os neurônios do PnR estão mais dispersos, são menores, ovoides e arredondados (Figura 11C).

Prosseguindo no sentido rostrocaudal, ao nível do nervo facial (7N), é possível visualizarmos o Núcleo Magno da Rafe (RMg) e ventralmente a este, o Núcleo Pálido da Rafe (RPa) ventral na linha mediana e ao redor dos limites dos tractos piramidais (py) (Figura 8D). Observando os neurônios, percebe-se uma uniformidade entre eles, onde ambos os núcleos possuem neurônios com formato arredondado e ovoide (Figura 12B). Além disso é possível perceber nesse mesmo nível o surgimento dos agrupamentos ventrolaterais, em sua porção rostral (RVL), com neurônios com formato arredondado e fusiforme (Figura 12C).

Prosseguindo a visualização das secções mais caudais, é possível perceber que estes núcleos RMg e RPa coexistem também com a porção caudal dos agrupamentos ventrolaterais (CVL) (Figura 8E). Estes agrupamentos são pouco densos e não estão localizados na linha mediana. Assim como o RVL, o CVL possui neurônios com corpos

celulares arredondados e fusiformes (Figura 13D). Diferentemente do nível anterior, nesse plano o RMg e o RPa são facilmente distintos devido ao pequeno tamanho dos neurônios do RPa (Figura 13B e 13C).

O último núcleo encontrado é o Núcleo Obscuro da Rafe (ROb), localizado diretamente caudal ao RMg. Esse núcleo está situado na linha mediana, formando duas colunas paralelas de neurônios imunoreativos a serotonina, com algumas células 5-HT-IR lateralizadas (Figura 8F). Coincide com a presença do nervo vago (10N) e do nervo hipoglosso (12N) e sua extensão vai até a porção fechada do bulbo. Possui neurônios muito diversificados, com formato piramidal, fusiforme, ovoide e arredondados (Figura 14B).

Visualmente percebemos que os núcleos pontino e pálido da rafe possuem neurônios menores em relação aos outros núcleos serotoninérgicos. Para confirmar tal hipótese, realizamos uma análise morfométrica das células, mensurando a área dos neurônios 5-HT-IR.

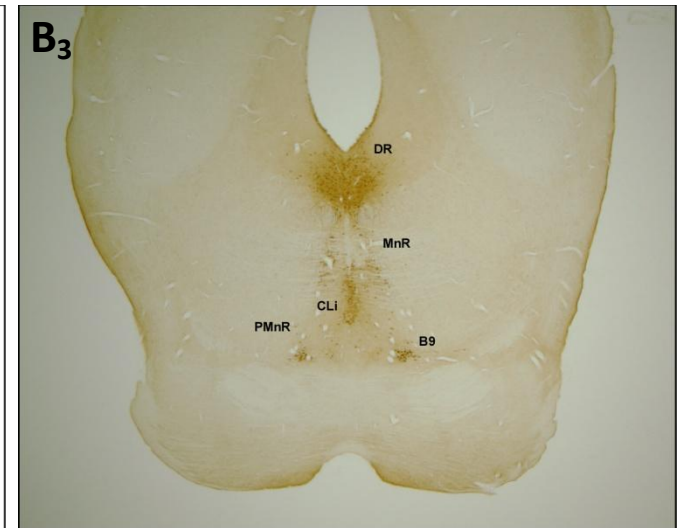
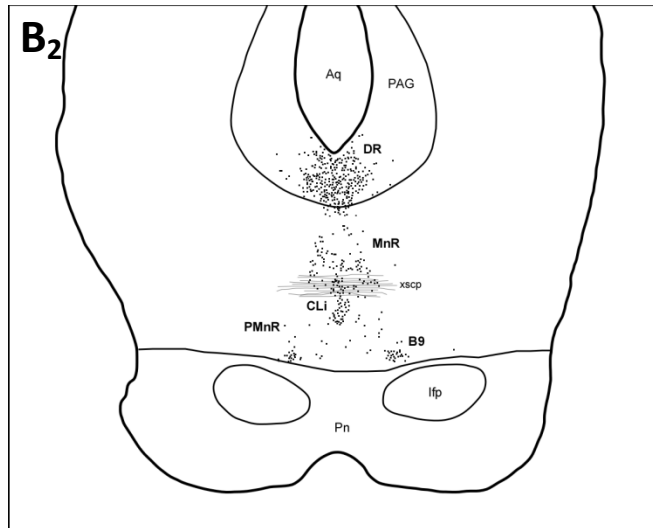
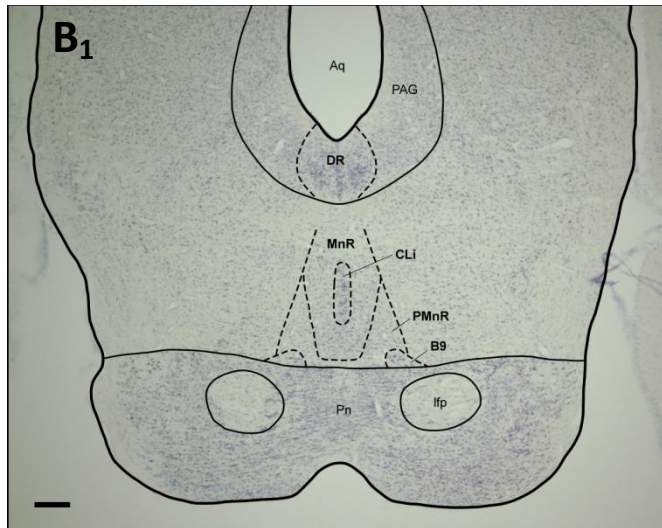
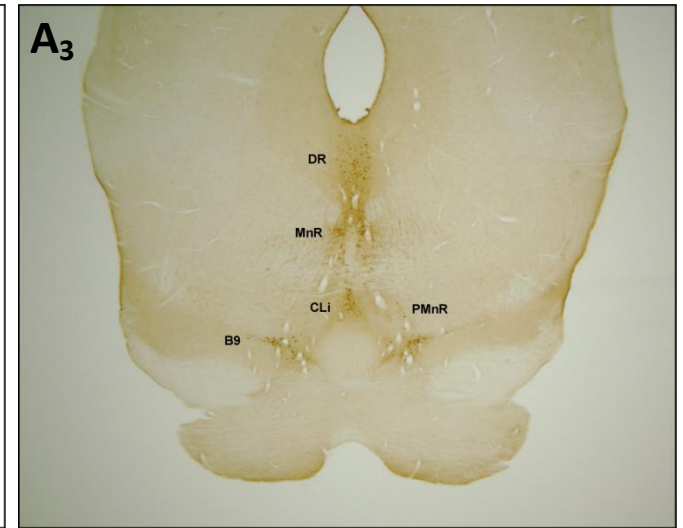
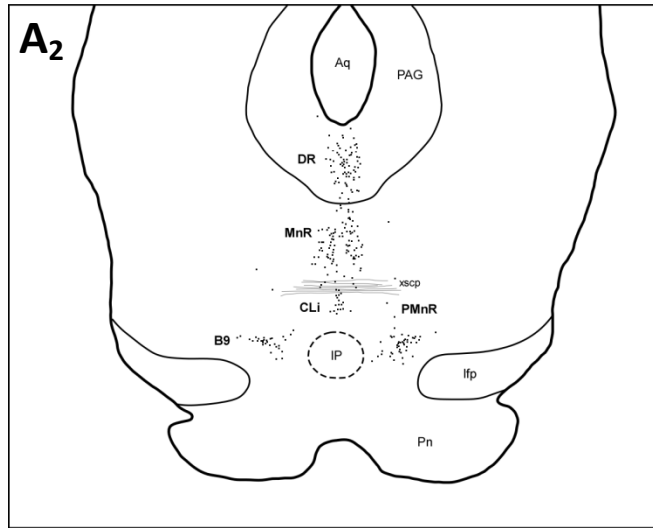
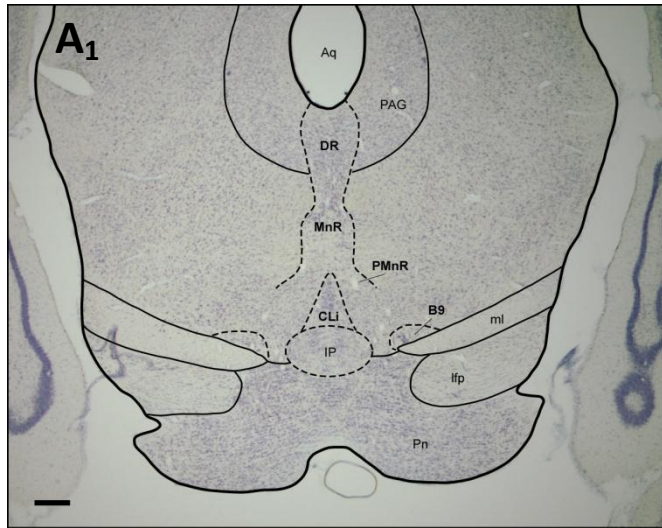
Como resultado desta análise percebemos que o núcleo pontino (PnR) e o pálido da rafe (RPa) diferem em tamanho dos seus neurônios quando comparados aos demais núcleos ($F=12,91$, $p\leq 0,001$). O núcleo RPa difere de todos os demais núcleos serotoninérgicos (DR, MnR, PMnR, CLi, B9, RMg, RPa, VL e ROb com $p\leq 0,001$ e PnR com $p=0,036$). O núcleo PnR difere de todos os demais núcleos serotoninérgicos, com exceção do núcleo PMnR (B9 $p=0,003$, CLi $p=0,049$, DR $p\leq 0,001$, MnR $p\leq 0,001$, RMg $p=0,006$, ROb $p=0,002$, RPa $p=0,036$ e VL $p=0,009$). Além disso, os corpos celulares dos neurônios do núcleo PMnR se mostraram menores do que o dorsal da rafe ($p=0,031$). Os resultados dessa análise estão representados na Figura 15 e descritos na Tabela 1.

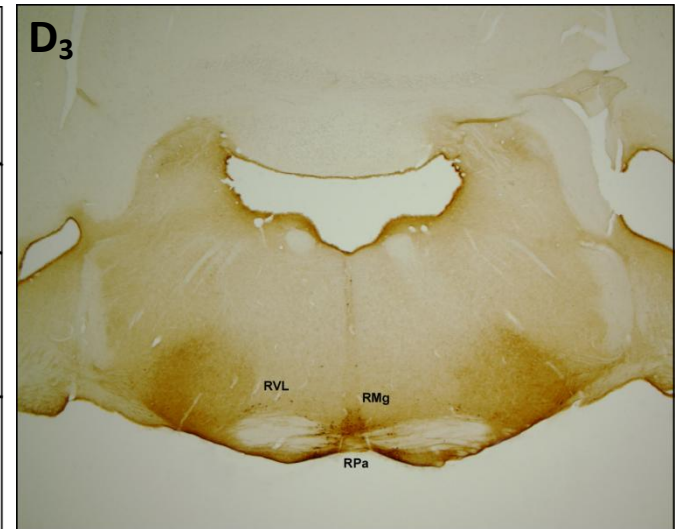
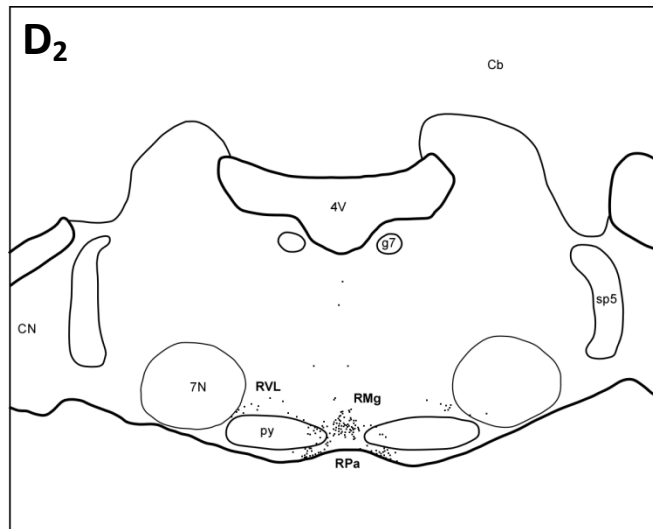
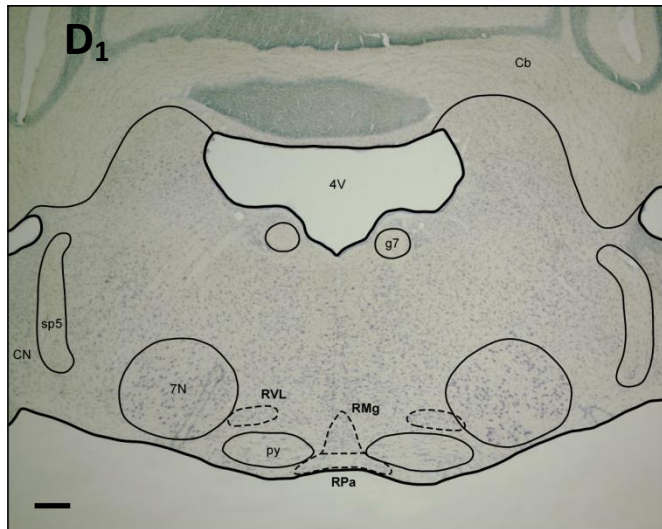
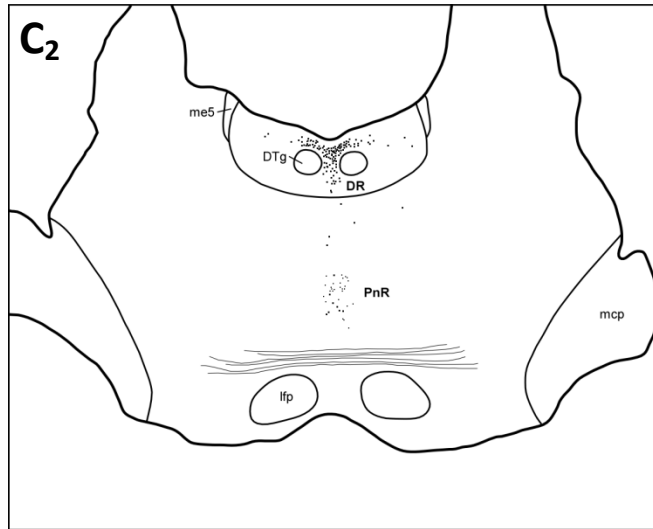
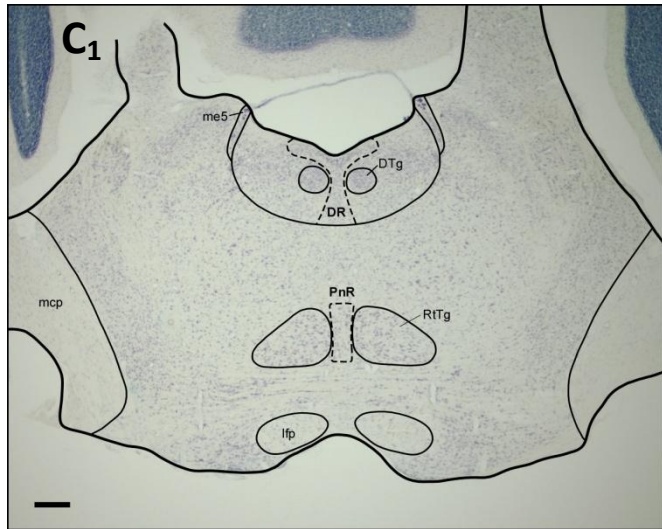
Figura 8. (páginas 43 a 45)

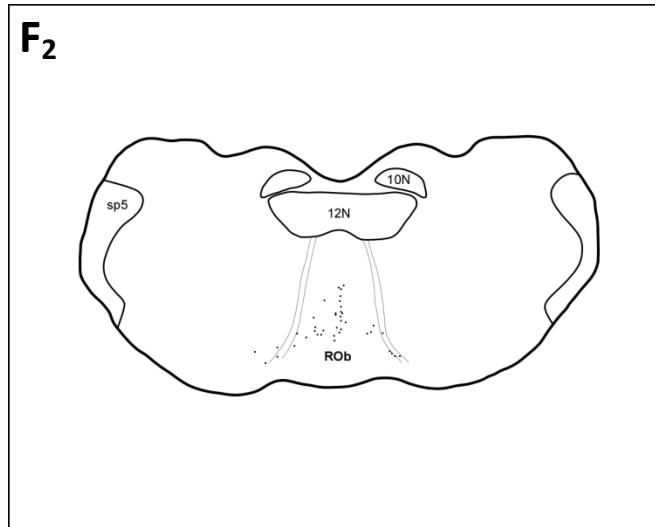
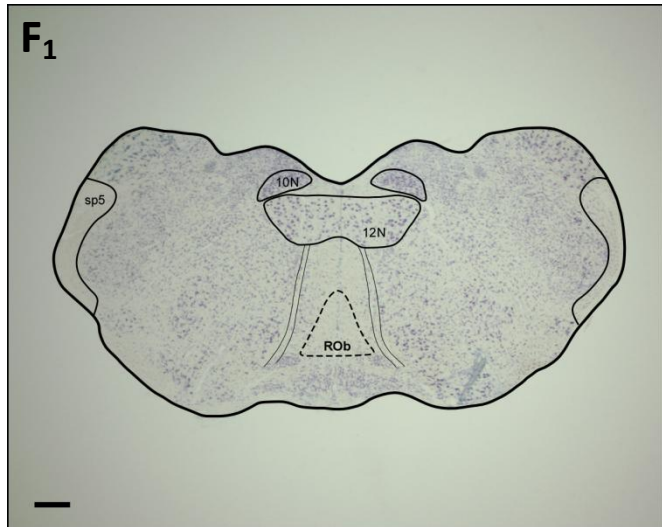
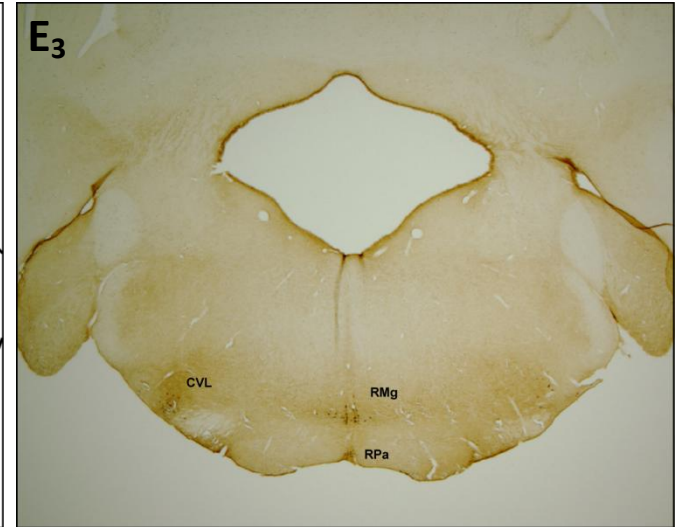
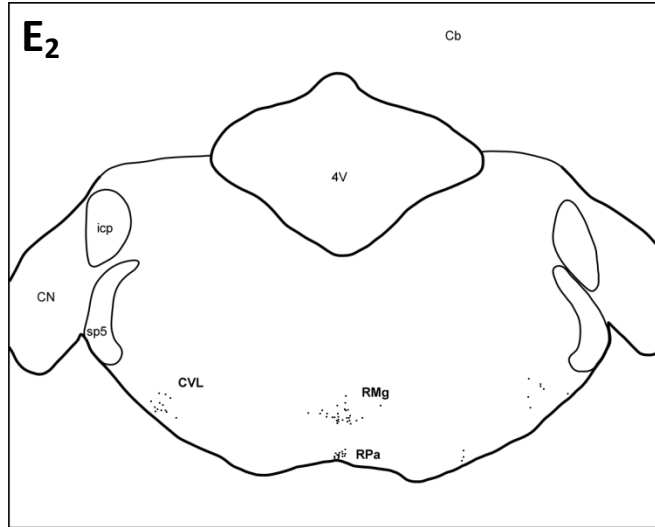
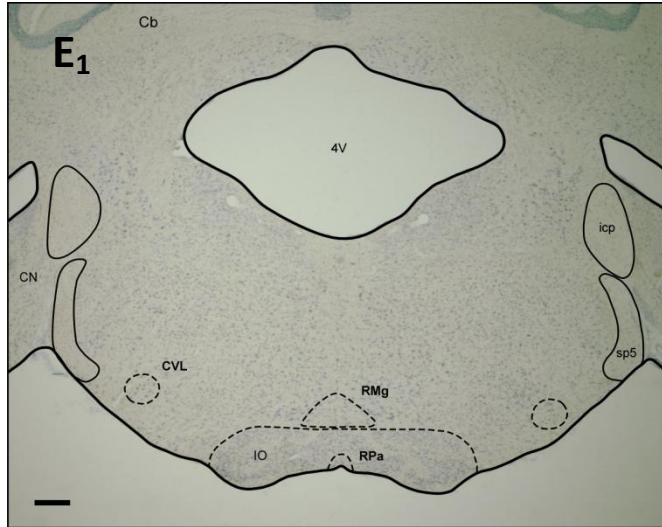
Fotomicrografias em campo claro e esquemas de secções coronais em sentido rostrocaudal do tronco encefálico do morcego *Artibeus planirostris*. Na coluna da esquerda, fotos coradas com a técnica de Nissl (A₁, B₁, C₁, D₁, E₁ e F₁), na coluna do meio, desenhos esquemáticos mostrando células 5-HT-IR (A₂, B₂, C₂, D₂, E₂ e F₂) e na coluna da direita, imunistoquímica para 5-HT (A₃, B₃, C₃, D₃, E₃ e F₃). Barras: 300µm.

Abreviações: 4V, quarto ventrículo; 7N, nervo facial; 10N, nervo vago; 12N, nervo hipoglosso; Aq, aqueduto mesencefálico; Cb, cerebelo; CN, núcleo coclear; Dtg, núcleo tegmental dorsal; g7, joelho do nervo facial; icp, pedúnculo cerebelar inferior; IO, oliva inferior; IP, núcleo interpeduncular; lfp, fascículo longitudinal da ponte; ml, lemnisco medial; mcp, pedúnculo cerebelar médio; me5, tracto trigeminal mesencefálico; PAG, substância cinzenta periaquedutal; Pn, núcleo pontino; py, tracto piramidal; RtTg, núcleo reticulotegmental pontino; sp5, tracto trigeminal espinal; xscp, decussação do pedúnculo cerebelar posterior.

Núcleos serotoninérgicos: B9, núcleo supralemniscal; CLi, linear caudal; CVL, grupamento ventrolateral caudal; DR, dorsal da rafe; MnR, mediano da rafe; PMnR, paramediano da rafe; PnR, pontino da rafe; RMg, magno da rafe; ROb, obscuro da rafe; RPa, pálido da rafe; RVL, grupamento ventrolateral rostral.







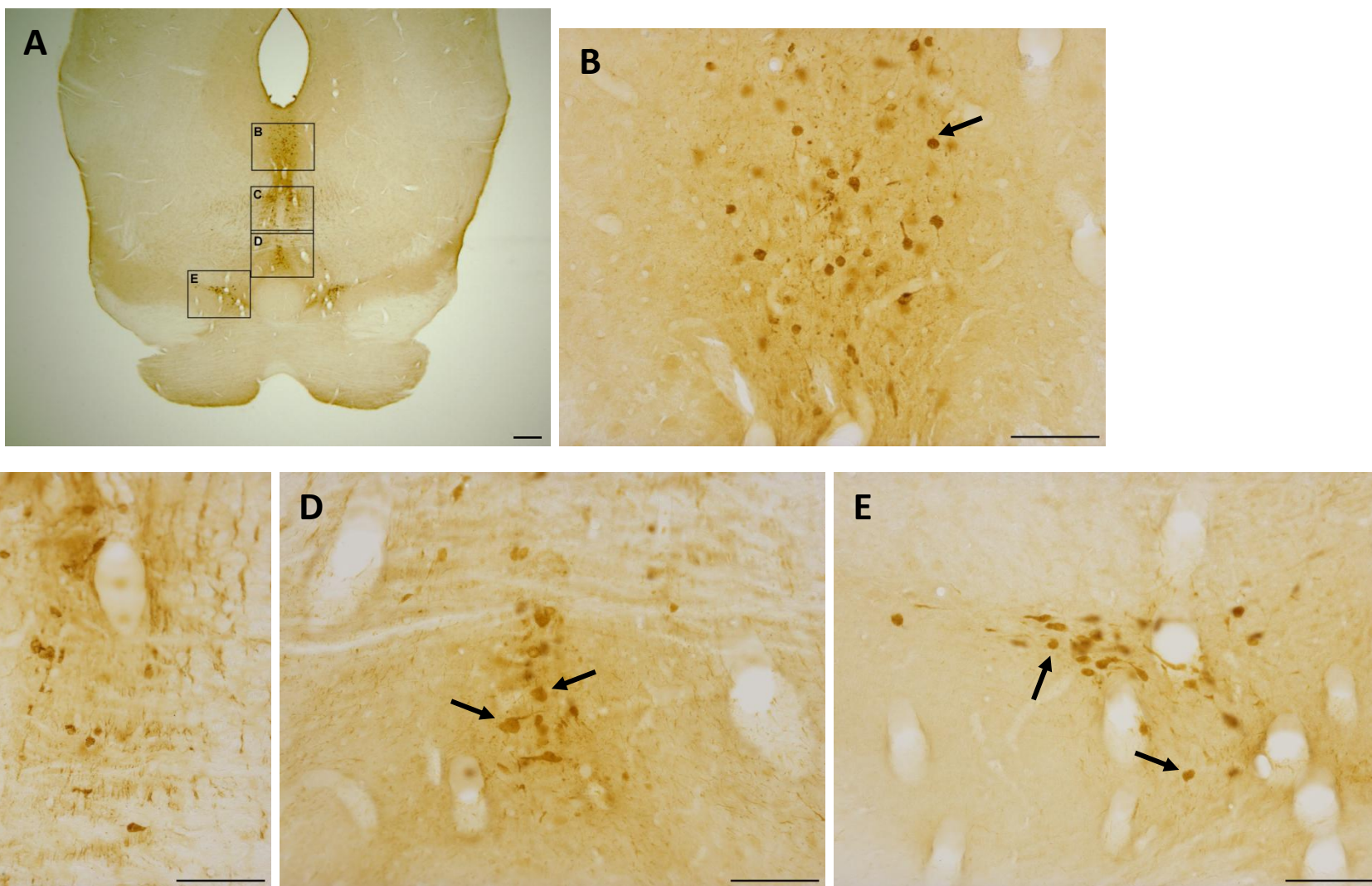


Figura 9. Fotomicrografias em campo claro de imunohistoquímica para 5-HT. B, C, D e E correspondem a ampliação mostrada em A, evidenciando o (B) Núcleo Dorsal da Rafe (DR), (C) Núcleo Mediano da Rafe (MnR), (D) Núcleo Linear Caudal (CLi) e (E) núcleo supralemniscal (B9). As setas apontam os neurônios morfológicamente característicos conforme descritos nos resultados. Barras: 300 μ m (A) e 100 μ m (B, C, D e E).

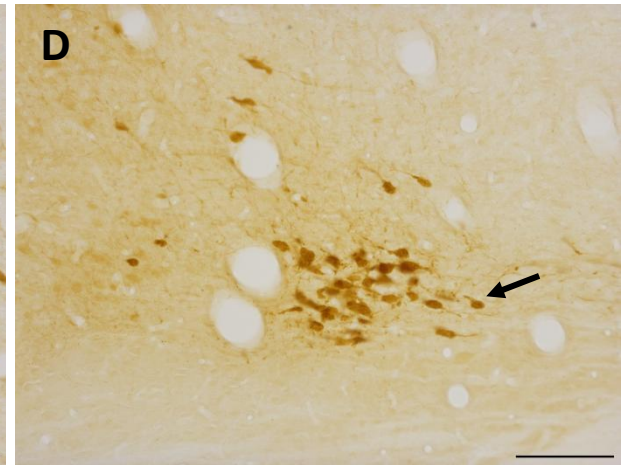
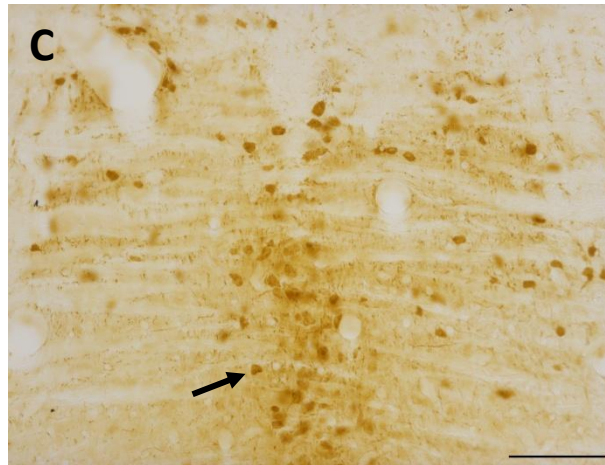
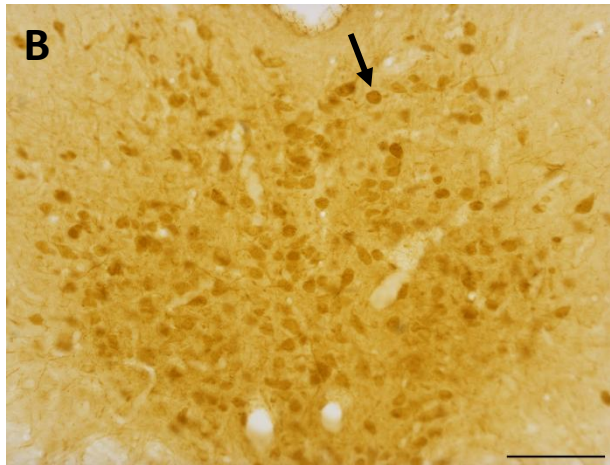
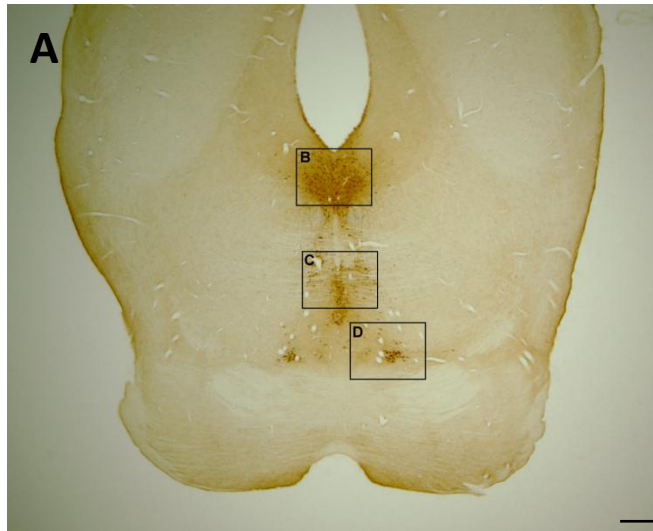


Figura 10. Fotomicrografias em campo claro de imunohistoquímica para 5-HT. B, C e D correspondem a ampliação mostrada em A, evidenciando o (B) Núcleo Dorsal da Rafe (DR), (C) Núcleo Mediano da Rafe (MnR) e Núcleo Linear Caudal (CLi) e (D) núcleo supralemniscal (B9). As setas apontam os neurônios morfológicamente característicos conforme descritos nos resultados. Barras: 300 μ m (A) e 100 μ m (B, C e D).

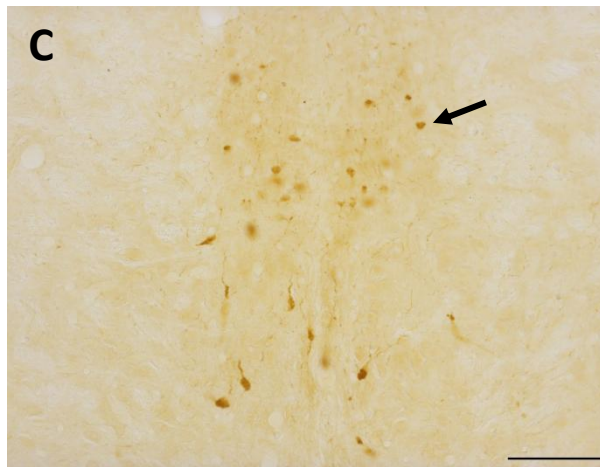
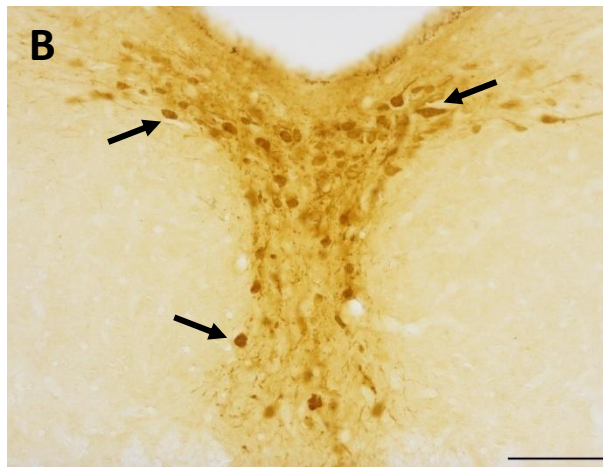
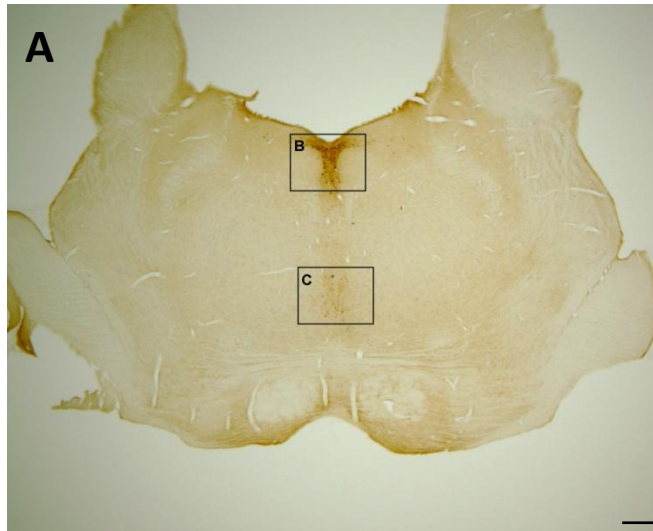


Figura 11. Fotomicrografias em campo claro de imunistoquímica para 5-HT. B e C correspondem a ampliação mostrada em A, evidenciando o (B) Núcleo Dorsal da Rafe (DR) e (C) Núcleo Pontino da Rafe (PnR). As setas apontam os neurônios morfologicamente característicos conforme descritos nos resultados. Barras: 300 μ m (A) e 100 μ m (B e C).

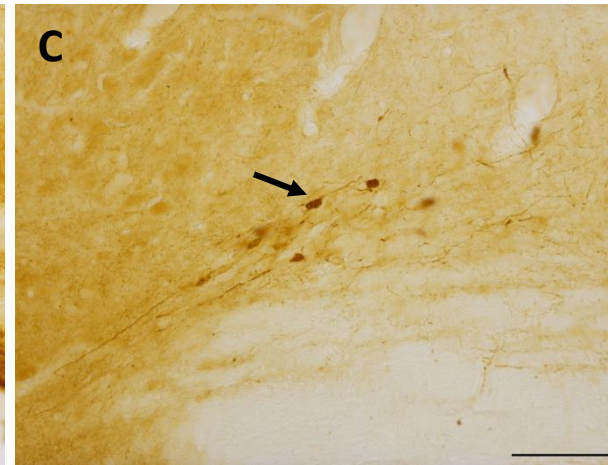
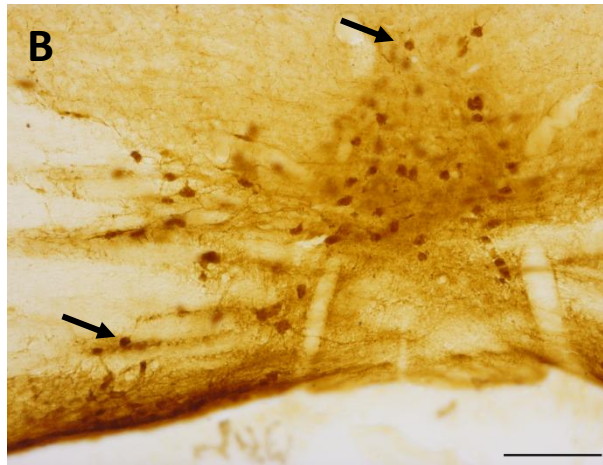
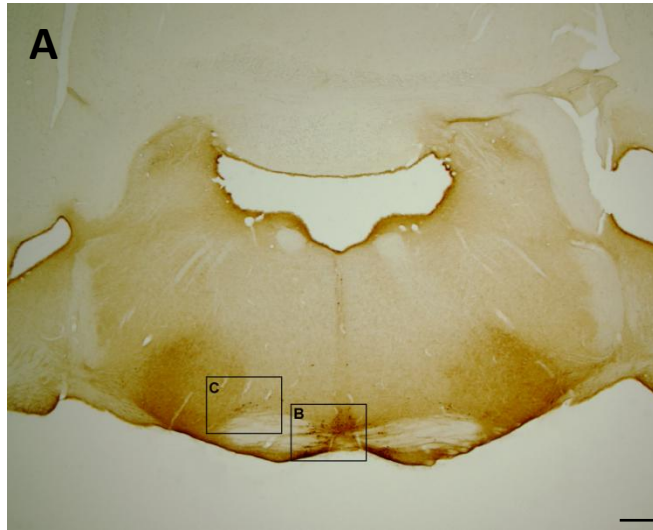


Figura 12. Fotomicrografias em campo claro de imunistoquímica para 5-HT. B e C correspondem a ampliação mostrada em A, evidenciando o (B) Núcleo Magno da Rafe (RMg) e Núcleo Pálido da Rafe (RPa) e (C) grupamento ventrolateral rostral (RVL). As setas apontam os neurônios morfológicamente característicos conforme descritos nos resultados. Barras: 300 μ m (A) e 100 μ m (B e C).

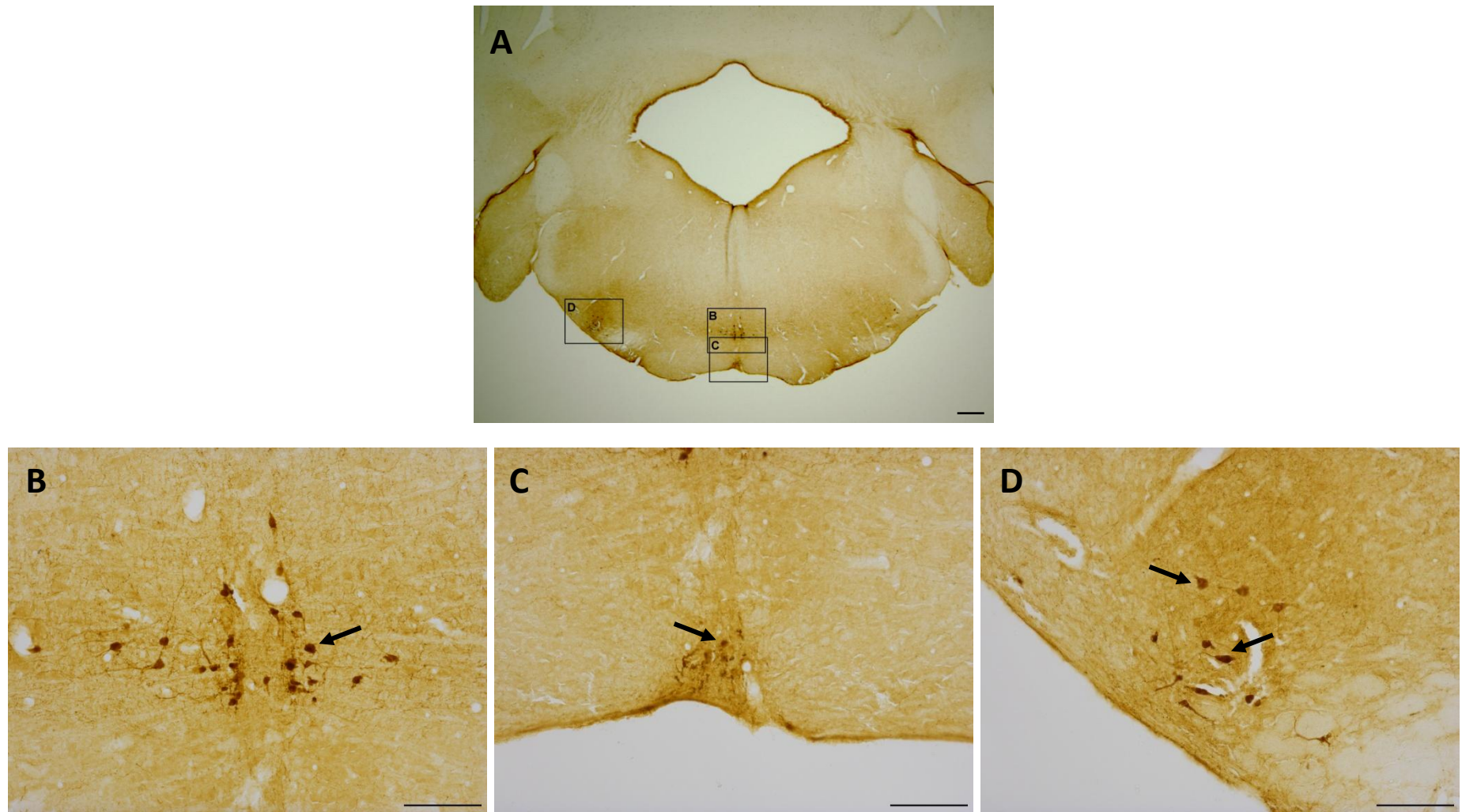


Figura 13. Fotomicrografias em campo claro de imunohistoquímica para 5-HT. B, C e D correspondem a ampliação mostrada em A, evidenciando o (B) Núcleo Magno da Rafe (RMg), (C) Núcleo Pálido da Rafe (RPa) e (D) grupamento ventrolateral caudal (CVL). As setas apontam os neurônios morfológicamente característicos conforme descritos nos resultados. Barras: 300 μ m (A) e 100 μ m (B, C e D).

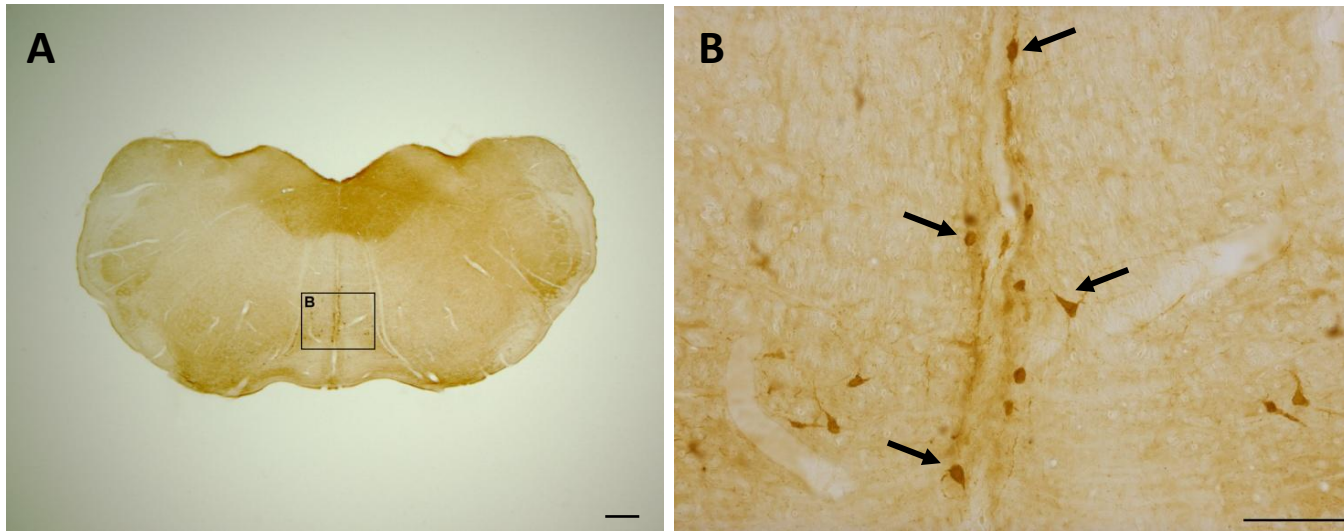


Figura 14. Fotomicrografias em campo claro de imunohistoquímica para 5-HT. B corresponde a ampliação mostrada em A, evidenciando o Núcleo Obscuro da Rafe (ROb). As setas apontam os neurônios morfológicamente característicos conforme descritos nos resultados. Barras: 300 μ m (A) e 100 μ m (B).

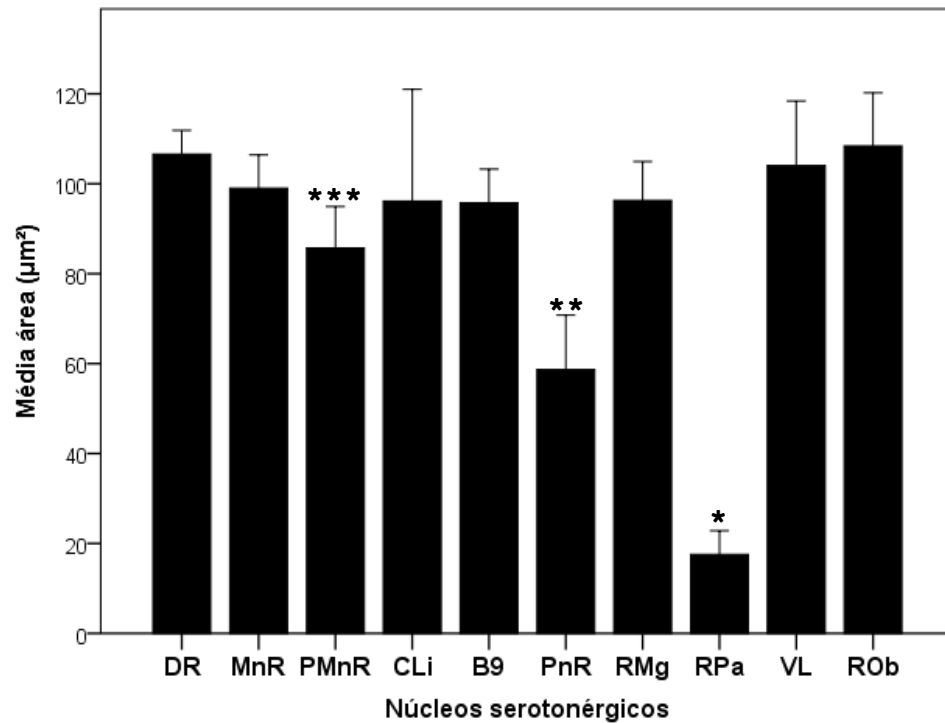


Figura 15. Gráficos de comparação entre a média da área (μm^2) dos neurônios nos diferentes núcleos serotonérgicos. Valores expressos com média \pm SEM. * O núcleo RPa difere de todos os demais núcleos serotonérgicos, com $p \leq 0,05$; ** O núcleo PnR difere de todos os demais núcleos, com exceção do núcleo PMnR, $p \leq 0,05$; *** O núcleo PMnR difere do núcleo DR com $p \leq 0,05$;

Tabela 1. Comparação da média da área dos neurônios nos núcleos serotonérgicos.

	DR	MnR	PMnR	CLi	B9	PnR	RMg	RPa	VL	ROb
Média (μm^2)	106,60	98,99	85,69	96,13	95,78	58,63	96,30	17,56	104,02	108,41
Erro Padrão	2,62	3,70	4,62	12,43	3,73	6,07	4,31	2,64	7,19	5,89

5 DISCUSSÃO

Através da imunistoquímica para 5-HT, associada a coloração de Nissl, foi possível delimitar os núcleos serotoninérgicos no tronco encefálico do morcego *Artibeus planirostris*, e assim observamos a sua organização.

Através dos resultados observados, constatou-se que, de um modo geral, os núcleos serotoninérgicos se mantêm conservados ao que já foi descrito em outras espécies de mamíferos.

Em comparação à organização citoarquitetônica do rato (Paxinos & Watson, 2007), animal mais comumente utilizado em estudos laboratoriais, identificamos no morcego neurônios 5-HT-IR nos núcleos: linear caudal da rafe (CLi), dorsal da rafe (DR), mediano da rafe (MnR), paramediano da rafe (PMnR), pontino da rafe (PnR), magno da rafe (RMg), pálido da rafe (RPa), obscuro da rafe (ROb), núcleo supralemniscal (grupo B9) e os grupos serotoninérgicos ventrolaterais rostral e caudal (RVL e CVL).

Os núcleos serotoninérgicos são comumente divididos em agrupamento rostral e caudal, com a grande maioria dos neurônios localizados próximo a linha mediana. O agrupamento rostral é composto pelos núcleos localizados no mesencéfalo e na ponte, com projeções para o telencéfalo e diencéfalo, enquanto que o agrupamento caudal são núcleos principalmente bulbares, com projeções descendentes dirigidas para a medula espinal. O tronco encefálico e o cerebelo recebem projeções de ambos os grupos (Bjarkam et al., 1997; Jacobs & Azmitia, 1992; Törk, 1990). Dessa forma, estão inclusos no agrupamento rostral os núcleos CLi, DR, B9, MnR, PMnR e PnR, enquanto que os núcleos RMg, RPa, ROb e RVL/CVL fazem parte do agrupamento caudal.

Nos diversos trabalhos realizados com diferentes animais, os núcleos serotoninérgicos parecem estar bem conservados, com pequenas diferenças anatômicas quanto a localização muitas vezes causada pela própria diferença anatômica nos encéfalos desses animais. Além disso, percebe-se que alguns trabalhos não citam os núcleos PMnR e PnR considerando estes como extensão do MnR.

A maioria dos trabalhos feitos até o momento foram realizados com animais pertencentes a ordem Rodentia, onde estão incluídos o rato, o mocó, o gerbil, duas espécies africanas de rato-toupeira, a ratazana-do-capim e o porco espinho (Bhagwandin, Fuxe, Bennett, & Manger, 2008; Dwarika, Maseko, Ihunwo, Fuxe, & Manger, 2008; Limacher, Bhagwandin, Fuxe, & Manger, 2008; Moon et al., 2007; Soares et al., 2012; Takeuchi et al., 1982; Törk, 1990). Em todos eles, os núcleos serotoninérgicos foram organizados de forma onde no agrupamento rostral foram incluídos os núcleos CLi, B9, DR e MnR, e no agrupamento caudal foram distinguidos os núcleos RMg, RPa, ROb e RVL/CVL.

Dessa mesma forma foram descritos os núcleos serotoninérgicos de animais pertencentes a outras ordens, como gato, coelho, girafa, mussaranho-elefante e damão-do-cabo (Badlangana, Bhagwandin, Fuxe, & Manger, 2007; Bjarkam et al., 1997; Bux, Bhagwandin, Fuxe, & Manger, 2010; Gravett et al., 2009; Leger, Charnay, Hof, Bouras, & Cespuglio, 2001; Pieters et al., 2010). No gato, apesar de não nomearem os núcleos que não estão na linha mediana, como B9 e RVL/CVL, os autores os descrevem como grupos de células 5-HT-IR isolados dos núcleos da rafe. Também citam o CLi apesar de não nomeá-lo e além disso o núcleo descrito como central superior possui a mesma localização onde hoje descrevemos o MnR. Vale ressaltar que no mocó, assim como o nosso trabalho, os autores também consideram

os núcleos PMnR e PnR. Porém há diferenças como a presença do RLi no mocó, que não identificamos no morcego, e descreveram o CLi, em sua porção mais caudal, localizado dorsalmente ao MnR, o que não visualizamos no morcego.

Em primatas, a organização do sistema serotoninérgico também foi descrita. Em *Macaca fascicularis*, foram identificados no grupo rostral, o núcleo dorsal da rafe (B7 e B6), central superior (B8, B5 e parte de B7) e supralemniscal (B9) e no grupo caudal, consistindo principalmente do núcleo obscuro da rafe (B2) em um agrupamento dorsal e dos núcleos magno da rafe (B3) e pálido da rafe (B1) em um agrupamento ventral (Azmitia & Gannon, 1986). No sagui (*Callithrix jacchus*) também foram identificados os núcleos do grupo anterior – núcleos linear caudal, mediano da rafe, dorsal da rafe e pontino da rafe e os do grupo posterior – núcleos magno da rafe, obscuro da rafe e pálido da rafe, além de grupamentos serotoninérgicos extra-rafe, como o grupamento B9, em associação com o lemnisco medial, alguns neurônios serotoninérgicos no núcleo interpeduncular, um número substancial de células localizados lateral ao MnR na formação reticular no mesencéfalo caudal e ponte rostral, na formação reticular bulbar, núcleo prepósito do hipoglosso e outros (Hornung & Fritschy, 1988).

A ordem Chiroptera é classicamente dividida em duas subordens: Microchiroptera e Megachiroptera. A primeira possui 17 famílias, e seus representantes utilizam a ecolocalização para auxiliar na locomoção e alimentação. Já os megaquirópteros são constituídos apenas por uma família e possuem o sentido visual e olfativo bem desenvolvido para auxiliar no forrageio e no desvio de obstáculos (Pettigrew et al., 1989). As relações filogenéticas são muito debatidas, com estudos mostrando que o voo pode ter surgido uma ou duas vezes na escala evolutiva dos mamíferos. A maioria dos trabalhos morfológicos apoiam a ideia de uma origem

difilética, enquanto que estudos baseados em achados moleculares dão suporte a origem monofilética (Kruger et al., 2010).

Importante lembrar que atualmente a classificação da ordem Chiroptera encontra-se em mudança, estando em uso as subordens Yinpterochiroptera e Yangochiroptera, em vez de Mega e Microchiroptera. À parte dessas relações filogenéticas, já foram realizados estudos com o sistema serotoninérgico de diferentes espécies (Dell et al., 2010; Kruger et al., 2010; Maseko et al., 2007; Maseko & Manger, 2007). Esses trabalhos não relataram diferenças na organização nuclear dos núcleos da rafe de espécies pertencentes à essas duas subordens.

Manger (2005) propôs, baseado em estudos da organização nuclear de sistemas colinérgicos, catecolaminérgicos e serotoninérgicos de variadas espécies de mamíferos, que independentemente das diferenças no tamanho, fenótipo ou história de vida, todas as espécies dentro de uma mesma ordem filogenética exibiriam o mesmo complemento de núcleos desses sistemas neuromodulatórios. Assim, se mega e microquirópteros (ou Yinptero e Yangochiroptera) pertencem a mesma ordem dos mamíferos, eles deveriam possuir a mesma organização nuclear desses sistemas. Apesar de que isso não foi o caso dos achados por Maseko et al. (2007) e Maseko & Manger (2007) para os núcleos colinérgicos e catecolaminérgicos, os núcleos serotoninérgicos parecem estar bem conservados não só dentro da mesma ordem, mas também dentre os mamíferos placentários como um todo.

Embora a distribuição e morfologia do sistema serotoninérgico seja muito similar na maioria das espécies, importantes diferenças existem. Os neurônios serotoninérgicos em vertebrados inferiores são orientados próximo a linha mediana no tronco encefálico, e as fibras serotoninérgicas são em sua maioria estreitas, não mielinizadas, e altamente

colateralizadas. Neurônios serotoninérgicos ainda são encontrados próximos a linha mediana em primatas superiores, mas muitos também ocorrem na parte lateral do tronco encefálico (lateralização), e a maior parte das fibras serotoninérgicas são mielinizadas (Azmitia & Gannon, 1983; Jacobs & Azmitia, 1992). A lateralização e mielinização, portanto, é mais pronunciada em primatas e representa diferenças entre os vertebrados superiores e inferiores na função do sistema serotoninérgico (Bjarkam et al., 1997). Os núcleos serotoninérgicos observados em nosso trabalho mostraram uma lateralização considerável de seus neurônios, o que é considerado uma característica de animais com uma organização complexa do cérebro.

O Núcleo Dorsal da Rafe é comumente subdividido em: dorsal (DRd), ventral (DRv), interfascicular (DRif), lateral (DRI) e caudal (DRc), e alguns autores ainda relatam o periperál (DRp). Não subdividimos em nosso trabalho o DR, porém foi possível observar diferenças morfológicas nos corpos celulares de seus neurônios, de acordo com a região em que estavam localizados. Embora não possamos prever propriedades funcionais de células serotoninérgicas com base em características morfológicas, o fato de que os neurônios serotoninérgicos com diferentes características morfológicas estão topograficamente organizados dentro de diferentes subdivisões do DR sugere uma ligação potencial entre estrutura e função (Abrams, Johnson, Hollis, & Lowry, 2004).

Através de nossa análise morfométrica, observamos que os neurônios do RPa do morcego *Artibeus planirostris*, são menores em relação a todos os demais núcleos serotoninérgicos. Pieters e colaboradores (2010) em um trabalho com o mussaranho-elefante, cita que é fácil distinguir os neurônios desse núcleo pelo seu pequeno tamanho em relação aos outros. Além disso, os neurônios do PnR também se

mostraram menores em relação a quase todos os demais núcleos, não diferindo apenas do núcleo PMnR, que possui localização quase similar em um nível mais rostral. Por fim, encontramos também que os neurônios do núcleo PMnR diferem apenas do DR, o núcleo serotoninérgico mais extenso. Quanto a morfologia das células, o ROb se mostrou o mais diverso, apresentando diferentes formatos celulares.

É importante ressaltar que o sistema serotoninérgico não possui nenhum papel direto em processos neurais relacionados ao voo, visão e ecolocalização, e por isso seu estudo comparativo é ideal, já que qualquer diferença ou similaridade descoberta em sua organização comparada ao de outros mamíferos não serão resultado de nenhuma dessas especializações dos morcegos (Maseko & Manger, 2007).

A distribuição e morfologia das células serotoninérgicas também foram estudadas em duas espécies de monotremados, o ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*) e a equidna-de-focinho-curto (*Tachyglossus aculeatus*) (Manger, Fahringer, Pettigrew, & Siegel, 2002). Esses animais são representantes das duas famílias existentes nos dias atuais da ordem Monotremata, conhecidos por serem mamíferos que põem ovos. Embora possuam características reptilianas, os monotremados são mamíferos. Como todos os mamíferos, possuem pelos, o coração dividido em quatro câmaras, são animais de sangue quente e possuem glândulas mamárias que produzem leite para nutrir seus filhotes.

Como o mais antigo ramo dos mamíferos, esperava-se que os núcleos serotoninérgicos nos monotremados se concentrassem na linha mediana do tronco encefálico, como ocorre em vertebrados não mamíferos. Os autores não encontraram lateralização no agrupamento rostral dos núcleos, nem reportaram a presença do núcleo linear caudal (Manger et al., 2002). Além da presença dos dois agrupamentos

rostral e caudal, consistente em todos os mamíferos, os monotremados apresentam também um agrupamento de células serotoninérgicas no hipotálamo, encontrado até então somente em vertebrados não mamíferos, como nos estudos com peixe, ave e réptil (Ikeda & Goto, 1971; Parent & Northcutt, 1982; Wolters, Donkelaar, Steinbusch, & Verhofstad, 1985).

A organização dos núcleos da rafe foi observada em marsupiais, mamíferos cuja principal característica é a presença de uma bolsa abdominal onde ocorre grande parte do desenvolvimento dos filhotes. No trabalho realizado com wallaby (*Macropus eugenii*) (Ferguson et al., 1999) a organização dos núcleos da rafe se mostra bem semelhante ao que já foi descrito em mamíferos placentários. Porém no estudo realizado com o gambá (*Didelphis virginiana*) (Crutcher & Humbertson, 1978), os autores relatam a presença de neurônios serotoninérgicos no hipotálamo desses animais, assim como ocorre nos mamíferos monotremados.

As similaridades na estrutura do encéfalo de mamíferos monotremados, marsupiais e placentários fornecem pistas sobre a provável estrutura do cérebro de um ancestral comum dos mamíferos (Manger et al., 2002). Em termos de sistema serotoninérgico, os microquirópteros estão alinhados com os mamíferos placentários (Eutheria) como um todo e com o marsupial wallaby (Metatheria), mas distinguem-se claramente dos monotremados (Prototheria) e do marsupial gambá (Metatheria), pois estes possuem neurônios serotoninérgicos no hipotálamo e não possuem os grupamentos ventrolaterais no bulbo.

6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstrados no presente trabalho nos permitem concluir que a imunohistoquímica para 5-HT foi eficiente na marcação de neurônios serotoninérgicos e aliada ao uso da técnica de Nissl nos permitiu delimitar e identificar o sistema serotoninérgico do morcego *Artibeus planirostris*. Esse sistema é composto pelos núcleos linear caudal (CLi), dorsal (DR), mediano (MnR), paramediano (PMnR), pontino (PnR), magno (MgR), pálido (RPa) e obscuro (Rob) da rafe, além dos grupamentos B9 e ventrolaterais rostral e caudal (RVL/CVL). Os núcleos serotoninérgicos nesta espécie de quiróptero apresentam morfologia e citoarquitetura relativamente semelhante ao descrito em outros animais já estudados, como roedores e primatas, confirmando a estabilidade filogenética desses grupamentos celulares. Adicionalmente, a análise morfométrica indicou diferenças significativas na área dos neurônios em alguns núcleos serotoninérgicos do *Artibeus planirostris*, mostrando que os núcleos RPa e PnR possuem neurônios menores.

7 REFERÊNCIAS¹

- Abrams, J. K., Johnson, P. L., Hollis, J. H., & Lowry, C. A. (2004). Anatomic and Functional Topography of the Dorsal Raphe Nucleus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1018, 46–57.
- Aguirre, L. F., Vargas, A., & Solari, S. (2009). *Clave de campo para la identificación de los murciélagos de Bolivia* (p. 38). Cochabamba: Centro de Estudios en Biología Teórica y Aplicada.
- Altringham, J. . (1996). *Bats: Biology and Behaviour* (p. 262). Oxford: Oxford University Press.
- Azmitia, E. C., & Gannon, P. J. (1983). The ultrastructural localization of serotonin immunoreactivity in myelinated and unmyelinated axons within the medial forebrain bundle of rat and monkey. *The Journal of Neuroscience*, 3(10), 2083–2090.
- Azmitia, E. C., & Gannon, P. J. (1986). The primate serotonergic system: a review of human and animal studies and a report on *Macaca fascicularis*. *Advances in Neurology*, 43, 407–468.
- Badlangana, N. L., Bhagwandin, A., Fuxe, K., & Manger, P. R. (2007). Distribution and morphology of putative catecholaminergic and serotonergic neurons in the medulla oblongata of a sub-adult giraffe , *Giraffa camelopardalis*. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 34, 69–79.
- Baker, R., Bininda-Emonds, O. R. P., Mantilla-Meluk, H., Porter, C. A., & Van den Bussche, R. A. (2012). Molecular time scale of diversification of feeding strategy and morphology in New World Leaf-Nosed Bats (Phyllostomidae): a phylogenetic perspective. In G. F. Gunnell & N. B. Simmons (Eds.), *Evolutionary History of Bats: Fossils, Molecules, and Morphology* (pp. 385–409). Cambridge: Cambridge University Press.
- Barnes, N. M., Andrade, R., Bockaert, J., Butler, A., Hamon, M., Hensler, J., ... Neumaier, J. (2013). 5-Hydroxytryptamine receptors. *IUPHAR database (IUPHAR-DB)*. Retrieved February 12, 2014, from <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=1>
- Barquez, R. M., Mares, M. A., & Braun, J. K. (1999). *The Bats of Argentina* (p. 275). Lubbock: Special Publications of the Museum of Texas Tech University Number 42.
- Bernard, E. (2002). Diet, activity and reproduction of bat species (Mammalia, Chiroptera) in Central Amazonia, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 19(1), 173–188.

¹ Referências segundo as normas da APA (American Psychological Association)

- Bhagwandin, A., Fuxe, K., Bennett, N. C., & Manger, P. R. (2008). Nuclear organization and morphology of cholinergic, putative catecholaminergic and serotonergic neurons in the brains of two species of African mole-rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 35(4), 371–87.
- Bjarkam, C. R., Sørensen, J. C., & Geneser, F. A. (1997). Distribution and Morphology of Serotonin-Immunoreactive Neurons in the Brainstem of the New Zealand White Rabbit. *The Journal of Comparative Neurology*, 380, 507–519.
- Bradley, P. B., Engel, G., Feniuk, W., Fozard, J. R., Humphrey, P. P. A., Middlemiss, D. N., ... Saxena, P. R. (1986). Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology*, 25(6), 563–576.
- Brodie, B. B., & Shore, P. A. (1957). A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 66(3), 631–642.
- Bux, F., Bhagwandin, A., Fuxe, K., & Manger, P. R. (2010). Organization of cholinergic, putative catecholaminergic and serotonergic nuclei in the diencephalon, midbrain and pons of sub-adult male giraffes. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 39(3), 189–203.
- Crutcher, K., & Humbertson, A. (1978). The organization of monoamine neurons within the brainstem of the North American opossum (*Didelphis virginiana*). *Journal of Comparative Neurology*, 179, 195–222.
- Dahlstrom, A., & Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiologica Scandinavica*, 62(suppl 232), 1–55.
- Datzmann, T., Helversen, O. Von, & Mayer, F. (2010). Evolution in nectivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). *BMC Evolutionary Biology*, 10, 165.
- Dell, L.-A., Kruger, J.-L., Bhagwandin, A., Jillani, N. E., Pettigrew, J. D., & Manger, P. R. (2010). Nuclear organization of cholinergic, putative catecholaminergic and serotonergic systems in the brains of two megachiropteran species. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 40(2), 177–95.
- Dwarika, S., Maseko, B. C., Ihunwo, A. O., Fuxe, K., & Manger, P. R. (2008). Distribution and morphology of putative catecholaminergic and serotonergic neurons in the brain of the greater canerat, *Thryonomys swinderianus*. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 35(1), 108–22.
- Felten, D. L., Laties, A. M., & Carpenter, M. B. (1974). Monoamine-containing cell bodies in the squirrel monkey brain. *American Journal of Anatomy*, 139, 153–166.

- Ferguson, I. A., Hardman, C. D., Marotte, L. R., Salardini, A., Halasz, P., Vu, D., & Waite, P. M. E. (1999). Serotonergic Neurons in the Brainstem of the Wallaby, *Macropus eugenii*. *The Journal of Comparative Neurology*, 411(February), 535–549.
- Franco-Pérez, J., Ballesteros-Zebadúa, P., Custodio, V., & Paz, C. (2012). Major neurotransmitters involved in the regulation of sleep-wake cycle. *Revista de Investigación Clínica*, 64, 182–191.
- Franklin, K. B. J., & Paxinos, G. (2008). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (3rd ed.). San Diego: Academic Press.
- Gravett, N., Bhagwandin, A., Fuxe, K., & Manger, P. R. (2009). Nuclear organization and morphology of cholinergic, putative catecholaminergic and serotonergic neurons in the brain of the rock hyrax, *Procavia capensis*. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 38(1), 57–74.
- Halbach, O. von B. und, & Dermietzel, R. (2006). *Neurotransmitters and Neuromodulators* (pp. 132–143). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Handley Jr, C. O., Wilson, D. E., & Gardner, A. L. (1991). Demography and Natural History of the Common Fruit Bat, *Artibeus jamaicensis*, on Barro Colorado Island, Panamá. In *Smithsonian Contributions to Zoology N° 511* (p. 184). Washington: Smithsonian Inst. Press.
- Hannon, J., & Hoyer, D. (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research*, 195(1), 198–213.
- Harding, A., Paxinos, G., & Halliday, G. (2004). Serotonin and Tachykinin Systems. In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System* (3rd ed., pp. 1205–1256). San Diego: Elsevier Academic Press.
- Haynes, M. A., & Lee Jr, T. E. (2004). *Artibeus obscurus*. *Mammalian Species*, 752, 1–5.
- Hollis, L. (2005). *Artibeus planirostris*. *Mammalian Species*, (775), 1–6.
- Hope, G. M., & Bhatnagar, K. P. (1979). Electrical response of bat retina to spectral stimulation: comparison of four microhironian species. *Experientia*, 35, 1189–91.
- Hornung, J. P., & Fritschy, J. M. (1988). Serotonergic system in the brainstem of the marmoset: a combined immunocytochemical and three-dimensional reconstruction study. *The Journal of Comparative Neurology*, 270(4), 471–87.

- Ikeda, H., & Goto, J. (1971). Distribution of monoamine-containing cells in the central nervous system of the chicken. *Japanese Journal of Pharmacology*, 21(17), 763–784.
- IUPHAR, G. to P. 5-Hydroxytryptamine receptors. Acessado em 20 de Julho de 2014: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=1>
- Jacobs, B. L., & Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, 72(1), 165–229.
- Jones, G., & Teeling, E. C. (2006). The evolution of echolocation in bats. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(3), 149–56.
- Kalko, E. K. V. (1994). The use of echolocation and other sensory cues in the frugivorous bat *Artibeus jamaicensis*, while foraging. *Bat Research News*, 35(1), 28.
- Kalko, E. K. V., & Condon, M. A. (1998). Echolocation, olfaction and fruit display: how bats find fruit of flagelliferous cucurbits. *Functional Ecology*, 12, 364–372.
- Kalko, E. K. V., Handley Jr, C. O., & Handley, D. (1996). Organization, diversity, and long-term dynamics of a neotropical bat community. In M. L. Cody & J. A. Smallwood (Eds.), *Long term studies in vertebrate communities* (pp. 503–553). San Diego: Academic Press.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). Disorders of mood: depression, mania and anxiety disorders. In E. R. Kandel, J. H. Schwartz, & T. M. Jessell (Eds.), *Principles of neural science* (4th ed., pp. 1216–1219). New York: McGraw-Hill.
- Korine, C., & Kalko, E. K. V. (2005). Fruit detection and discrimination by small fruit-eating bats (Phyllostomidae): echolocation call design and olfaction. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 59, 12–23.
- Kruger, J.-L., Dell, L.-A., Bhagwandin, A., Jillani, N. E., Pettigrew, J. D., & Manger, P. R. (2010). Nuclear organization of cholinergic, putative catecholaminergic and serotonergic systems in the brains of five microchiropteran species. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 40(3), 210–22.
- Leger, L., Charnay, Y., Hof, P., Bouras, C., & Cespuglio, R. (2001). Anatomical distribution of serotonin-containing neurons and axons in the central nervous system of the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 433(January), 157–182.
- Lim, B. K., Engstrom, M. D., Lee, T. E., Patton, J. C., & Bickham, J. W. (2004). Molecular differentiation of large species of fruit-eating bats (*Artibeus*) and phylogenetic relationships based on the cytochrome b gene. *Acta Chiropterologica*, 6(1), 1–12.

- Limacher, A., Bhagwandin, A., Fuxe, K., & Manger, P. R. (2008). Nuclear organization and morphology of cholinergic, putative catecholaminergic and serotonergic neurons in the brain of the Cape porcupine (*Hystrix africaeaustralis*): increased brain size does not lead to increased organizational complexity. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 36(1), 33–52.
- Lowry, C. A., Hale, M. W., Evans, A. K., Heerkens, J., Staub, D. R., Gasser, P. J., & Shekhar, A. (2008). Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1148, 86–94.
- Lyons, P. M., & Truswell, A. S. (1988). Serotonin precursor influenced by type of carbohydrate meal in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 47(3), 433–9.
- Manger, P. R. (2005). Establishing order at the systems level in mammalian brain evolution. *Brain Research Bulletin*, 66(4-6), 282–9.
- Manger, P. R., Fahringer, H. M., Pettigrew, J. D., & Siegel, J. M. (2002). The Distribution and Morphological Characteristics of Serotonergic Cells in the Brain of Monotremes. *Brain, Behavior and Evolution*, 60(5), 315–332.
- Marques-Aguiar, S. A. (1994). A systematic review of the large species of *Artibeus* Leach, 1821 (Mammalia: Chiroptera), with some phylogenetic inferences. *Boletim Do Museu Paraense Emílio Goeldi, Zoologia*, 10(1), 3–83.
- Maseko, B. C., Bourne, J. a, & Manger, P. R. (2007). Distribution and morphology of cholinergic, putative catecholaminergic and serotonergic neurons in the brain of the Egyptian rousette flying fox, *Rousettus aegyptiacus*. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 34(3-4), 108–27.
- Maseko, B. C., & Manger, P. R. (2007). Distribution and morphology of cholinergic, catecholaminergic and serotonergic neurons in the brain of Schreiber's long-fingered bat, *Miniopterus schreibersii*. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 34(3-4), 80–94.
- Michelsen, K. A., Prickaerts, J., & Steinbusch, H. W. M. (2008). The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research*, 172, 233–64.
- Miranda, J. M. D., Bernardi, I. P., & Passos, F. C. (2011). *Chave ilustrada para determinação dos morcegos da Região Sul do Brasil* (p. 51). Curitiba: João M.D. Miranda.
- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L., & Gwaltney-Brant, S. M. (2008). Serotonin: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31(3), 187–99.

- Montgomery, S. (1995). Serotonin, sertraline and depression. *Journal of Psychopharmacology*, 9(2 suppl), 179–184.
- Monti, J. M. (2011). Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews*, 15(4), 269–81.
- Moon, D.-J., Maseko, B. C., Ihunwo, A. O., Fuxe, K., & Manger, P. R. (2007). Distribution and morphology of catecholaminergic and serotonergic neurons in the brain of the highveld gerbil, *Tatera brantsii*. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 34(3-4), 134–44.
- Müller, B., Glösmann, M., Peichl, L., Knop, G. C., Hagemann, C., & Ammermüller, J. (2009). Bat eyes have ultraviolet-sensitive cone photoreceptors. *PloS One*, 4(7), e6390.
- Neuweiler, G. (2000). *The Biology of Bats* (p. 310). Oxford: Oxford University Press.
- Noga, B. R., Johnson, D. M. G., Riesgo, M. I., & Pinzon, A. (2009). Locomotor-activated neurons of the cat. I. Serotonergic innervation and co-localization of 5-HT₇, 5-HT_{2A}, and 5-HT_{1A} receptors in the thoraco-lumbar spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 102(3), 1560–76.
- Nogueira, M. I.; Takase, L. F.; Souza, S. L.; Mascaro, M. B.; Ocanã, R. P.; Castro, R. M. (2004). Serotonina: a trajetória evolutiva de uma molécula de ampla ação trófica e neurológica. *Ciência Hoje*, 34(202), 30-5.
- Parent, A., & Northcutt, R. G. (1982). The Monoamine-Containing Neurons in the Brain of the Garfish, *Lepisosteus osseus*. *Brain Research Bulletin*, 9, 189–204.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.). San Diego: Academic Press.
- Peroutka, S. J., & Howell, T. A. (1994). The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology*, 33(3-4), 319–24.
- Pettigrew, J. D., Jamieson, B. G. M., Robson, S. K., Hall, L. S., McAnally, K. I., & Cooper, H. M. (1989). Phylogenetic Relations Between Microbats, Megabats and Primates (Mammalia: Chiroptera and Primates). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 325(1229), 489–559.
- Pieters, R. P., Gravett, N., Fuxe, K., & Manger, P. R. (2010). Nuclear organization of cholinergic, putative catecholaminergic and serotonergic nuclei in the brain of the eastern rock elephant shrew, *Elephantulus myurus*. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 39(3), 175–88.

- Politis, M., & Loane, C. (2011). Serotonergic dysfunction in Parkinson's disease and its relevance to disability. *The Scientific World Journal*, 11, 1726–34.
- Rapport, M. M. (1949). Serum vasoconstrictor (serotonin) V. The presence of creatinine in the complex. A proposed structure of the vasoconstrictor principle. *The Journal of Biological Chemistry*, 180(3), 961–9.
- Rapport, M. M., Green, A. A., & Page, I. H. (1948a). Crystalline Serotonin. *Science (New York, N. Y.)*, 108(2804), 329–30.
- Rapport, M. M., Green, A. A., & Page, I. H. (1948b). Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *The Journal of Biological Chemistry*, 174(2), 735–41.
- Rapport, M. M., Green, A. A., & Page, I. H. (1948c). Serum vasoconstrictor (serotonin) III. chemical inactivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 176(3), 1237–41.
- Rapport, M. M., Green, A. A., & Page, I. H. (1948d). Serum vasoconstrictor (serotonin) IV. Isolation and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 176(3), 1243–51.
- Redondo, R. a F., Brina, L. P. S., Silva, R. F., Ditchfield, A. D., & Santos, F. R. (2008). Molecular systematics of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49, 44–58.
- Reis, N. R., Fregonezi, M. N., Peracchi, A. L., & Shibatta, O. A. (2013). *Morcegos do Brasil – Guia de Campo* (p. 252). Rio de Janeiro: Technical Books.
- Richardson, B. P., & Engel, G. (1986). The pharmacology and function of 5-HT₃ receptors. *Trends in Neurosciences*, 9, 424–428.
- Sakai, K., & Crochet, S. (2001). Differentiation of presumed serotonergic dorsal raphe neurons in relation to behavior and wake–sleep states. *Neuroscience*, 104(4), 1141–1155.
- Simmons, N. B. (1994). The case for chiropteran monophyly. *American Museum Novitates*, 3103, 1–54.
- Simmons, N. B. (1998). A reappraisal of interfamilial relationships of bats. In T. H. Kunz & P. A. Racey (Eds.), *Bat Biology and Conservation* (pp. 3–26). Washington: Smithsonian Institution Press.
- Simmons, N. B., & Geisler, J. H. (1998). Phylogenetic relationships of *Icaronycteris*, *Archaeonycteris*, *Hassianycteris*, and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in Microchiroptera. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 235, 1–182.

- Simmons, N. B., & Voss, R. S. (1998). The mammals of Paracou, French Guiana: a Neotropical lowland rainforest fauna - Part 1: Bats. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 237, 1–219.
- Sjoerdsma, A., & Palfreyman, M. G. (1990). History of serotonin and serotonin disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 600, 1–7; discussion 7–8.
- Soares, J. G., Cavalcanti, J. R. L. P., Oliveira, F. G., Pontes, A. L. B., Sousa, T. B., Freitas, L. M., ... Costa, M. S. M. O. (2012). Nuclear organization of the serotonergic system in the brain of the rock cavy (*Kerodon rupestris*). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 43(2), 112–9.
- Suthers, R. . (1966). Optomotor responses by echolocating bats. *Science*, 152, 1102–1104.
- Takase, L. F., Barone, J. R., & Nogueira, M. I. (2000). Involvement of the caudal raphe nuclei in the feeding behavior of rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(2), 223–228.
- Takase, L. F., & Nogueira, M. I. (2008). Patterns of fos activation in rat raphe nuclei during feeding behavior. *Brain Research*, 1200, 10–8.
- Takeuchi, Y., Kimura, H., & Sano, Y. (1982). Immunohistochemical demonstration of the distribution of serotonin neurons in the brainstem of the rat and the cat. *Cell and Tissue Research*, 224, 247–267.
- Teeling, E. C. (2009). Hear, hear: the convergent evolution of echolocation in bats? *Trends in Ecology & Evolution*, 24(7), 351–4.
- Teeling, E. C., Dool, S., & Springer, M. S. (2012). Phylogenies , fossils and functional genes: the evolution of echolocation in bats. In G. F. Gunnell & N. B. Simmons (Eds.), *Evolutionary History of Bats: Fossils, Molecules, and Morphology* (pp. 1–21). Cambridge: Cambridge University Press.
- Teeling, E. C., Springer, M. S., Madsen, O., Bates, P., O'brien, S. J., & Murphy, W. J. (2005). A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5709), 580–4.
- Thies, W., Kalko, E. K. V., & Schnitzler, H.-U. (1998). The roles of echolocation and olfaction in two Neotropical fruit-eating bats, *Carollia perspicillata* and *C. castanea* , feeding on *Piper*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 42, 397–409.
- Törk, I. (1985). Raphe nuclei and serotonin containing systems. In G. Paxinos (Ed.), *The rat nervous system* (2nd ed., pp. 43–78). Sidney: Academic Press.

- Törk, I. (1990). Anatomy of the Serotonergic System. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 600(1 The Neurophar), 9–34.
- Twarog, B. M., & Page, I. H. (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *The American Journal of Physiology*, 175(1), 157–61.
- Tyce, G. M. (1990). Origin and metabolism of serotonin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 16 Suppl 3, S1–7.
- Van Den Bussche, R. A., Hudgeons, J. L., & Baker, R. J. (1998). Phylogenetic accuracy, stability, and congruence: relationships within and among the New World bat genera *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania*. In T. H. Kunz & P. A. Racey (Eds.), *Bat Biology and Conservation* (Vol. 85, pp. 43–58). Washington: Smithsonian Institution Press.
- Vertes, R., Fortin, W., & Crane, A. (1999). Projections of the median raphe nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 407, 555–58.
- Vertes, R. P. (1991). A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 313(4), 643–68.
- Wang, D., Oakley, T., Mower, J., Shimmin, L. C., Yim, S., Honeycutt, R. L., ... Li, W.-H. (2004). Molecular evolution of bat color vision genes. *Molecular Biology and Evolution*, 21(2), 295–302.
- Wolters, J. G., Donkelaar, H. J. Ten, Steinbusch, H. W. M., & Verhofstad, A. A. J. (1985). Distribution of serotonin in the brain stem and spinal cord of the lizard *Varanus Exanthematicus*: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, 14(1), 169–193.
- Yakel, J. L., & Jackson, M. B. (1988). 5-HT₃ receptors mediate rapid responses in cultured hippocampus and a clonal cell line. *Neuron*, 1(7), 615–621.
- Zortéa, M. (2007). Subfamília Stenodermatinae. In N. R. Reis, A. L. Peracchi, I. P. Lima, & W. A. Pedro (Eds.), *Morcegos do Brasil* (pp. 107–128). Londrina: Nelio R. dos Reis.

ANEXOS



Natal (RN), 24 de fevereiro de 2014.

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o projeto de pesquisa n° **001/2014**, cujo título é “DELIMITAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPAMENTOS SEROTONÉRGICOS DO MORCEGO *Artibeus planirostris*”, está **ISENTO** da aprovação por esta comissão para sua execução. Tal isenção deve-se ao fato de não haver nenhuma implicação ética e moral na execução de um projeto cujo sujeito experimental já está morto.

Sob o ponto de vista legal, não existe nenhuma lei ou resolução que faça menção sobre a necessidade de aprovação pelas CEUAs de projetos de pesquisa que empregam sujeitos experimentais já mortos.

É importante destacar, no entanto, que se a eutanásia do sujeito fizesse parte do protocolo experimental, tal projeto obrigatoriamente deveria ser aprovado pela CEUA anteriormente a sua execução.

Agradecemos a atenção e colocamo-nos a disposição para ulteriores esclarecimentos.

Cordialmente,


John Fontenele Araujo
Coordenador da CEUA



PROTOCOLO N.º 009/2012

Professor/Pesquisador: *EXPEDITO SILVA DO NASCIMENTO JUNIOR*

Natal (RN), 14 de maio de 2012.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que se encontra em anexo o parecer emitido pela CEUA a respeito do projeto “O SISTEMA VISUAL PRIMÁRIO E O SISTEMA ÓPTICO ACESSÓRIO EM QUIRÓPTEROS DO RN”, **protocolo nº 009/2012**, que, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório Final: **ABRIL 2014** (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,


Elaine C. Gavioli
Coordenadora da CEUA



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 25233-1	Data da Emissão: 02/07/2012 16:44
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Expedito Silva do Nascimento Júnior	CPF: 025.880.734-25
Título do Projeto: O sistema visual primário e o sistema óptico acessório em quirópteros do RN	
Nome da Instituição : UFRN - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO G. NORTE	CNPJ: 24.365.710/0001-83

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Aquisição dos animais, instalação, adaptação	04/2012	12/2012
2	Aquisição de material permanente	04/2012	06/2013
3	Atualização bibliográfica	04/2012	03/2014
4	Injeção intra-ocular de traçador neural, perfusão e microtomia de 5 animais	07/2012	09/2012
5	Imuno-histoquímica para CTb e Nissl	07/2012	12/2012
6	Análise e documentação	07/2012	09/2013
7	Elaboração e submissão de resumos para congresso nacional	07/2012	09/2013
8	Imuno-histoquímica para neurotransmissores	10/2012	12/2012
9	Elaboração e submissão de resumos para congresso internacional	10/2012	12/2013
10	Injeção intra-ocular de traçador neural, perfusão e microtomia de 5 animais	01/2013	03/2013
11	Imuno-histoquímica para CTb e Nissl	01/2013	06/2013
12	Publicação em periódico de indexação internacional	01/2013	09/2013
13	Imuno-histoquímica para neurotransmissores	04/2013	06/2013
14	Defesa de dissertação de mestrado	03/2014	03/2014

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Observações e ressalvas

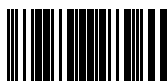
1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Outras ressalvas

1	As redes de neblinas deverão ser verificadas de 30 em 30 minutos.
---	---

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 73435717





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 25233-1	Data da Emissão: 02/07/2012 16:44
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Expedito Silva do Nascimento Júnior	CPF: 025.880.734-25
Título do Projeto: O sistema visual primário e o sistema óptico acessório em quirópteros do RN	
Nome da Instituição : UFRN - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO G. NORTE	CNPJ: 24.365.710/0001-83

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Melquisedec Abiaré Dantas de Santana	Aluno de mestrado	065.065.014-05	2171695 ITEP-RN	Brasileira
2	JOACIL GERMANO SOARES	Aluno de doutorado	022.647.454-28	1828631 SSP-PB	Brasileira
3	Leandro Moura de Freitas	Aluno de graduação	061.511.294-31	001756601 ssp-RN	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	NATAL	RN	5°50'33.79"S 35°12'07.60"O	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Chiroptera
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera (*Qtde: 10)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Chiroptera

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Captura manual, Rede de neblina
---	---	---------------------------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFRN - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO G. NORTE	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 73435717





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 25233-1	Data da Emissão: 02/07/2012 16:44
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Expedito Silva do Nascimento Júnior	CPF: 025.880.734-25
Título do Projeto: O sistema visual primário e o sistema óptico acessório em quirópteros do RN	
Nome da Instituição : UFRN - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO G. NORTE	CNPJ: 24.365.710/0001-83

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 73435717

