

WYLQUI MIKAEL GOMES DE ANDRADE

**DISTRIBUIÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO COMPARTIMENTO
SUBCORTICAL DO TELENCEFALO E HIPOCAMPO DO MOCÓ
(*Kerodon rupestris*)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biologia
Estrutural e Funcional da Universidade
Federal do Rio Grande do Norte

Natal-RN

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E
FUNCIONAL

**DISTRIBUIÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO COMPARTIMENTO
SUBCORTICAL DO TELENCEFALO E HIPOCAMPO DO MOCÓ
(*Kerodon rupestris*)**

ORIENTADOR

Judney Cley Cavalcante

Natal-RN

2017

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Andrade, Wylqui Mikael Gomes de.

Distribuição do óxido nítrico no compartimento subcortical do telencéfalo e hipocampo do Mocó (*Kerodon rupestris*) / Wylqui Mikael Gomes de Andrade. - Natal, 2017.

81 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional.

Orientador: Prof. Dr. Judney Cley Cavalcante.

1. Óxido nítrico - Dissertação. 2. Óxido nítrico sintase - Dissertação. 3. Telencéfalo - Dissertação. 4. *Kerodon rupestris* - Dissertação. I. Cavalcante, Judney Cley. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 661.982

ANDRADE, W. M. G. **Distribuição do óxido nítrico no compartimento subcortical do telencéfalo e hipocampo do mocó (*Kerodon rupestris*).**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof Dr Judney Cley Cavalcante

Instituição: UFRN

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa Dra Miriam Stela Maris de Oliveira Costa

Instituição: UFRN

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof Dr José Rodolfo Lopes de Paiva Cavalcanti

Instituição: UERN

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, pelas suas incansáveis lutas pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor e consumidor da vida, pela força que me deu para enfrentar o que foi necessário para a conclusão desse trabalho.

A minha família e Thaty e sua família, por entender minha ausência e pelo apoio ofertado.

Ao professor doutor Judney, pela enorme paciência e apoio aqui direcionados, assim como todas as orientações fornecidas. À professora Miriam e ao professor Exedito, pela parceria na execução do projeto e todo o apoio e sábias orientações aqui fornecidas. Este agradecimento se estende aos professores Fernando e Ruthnaldo e demais professores do departamento, pelas dicas, análises e conversas tão proveitosas que só enriqueceram o trabalho.

Aos meus irmãos Mário e Manu, pelo imenso esforço, paciência, força, apoio e ajuda que me prestaram. Sem eles, eu não teria conseguido finalizar, mesmo que bastante fora do tempo, o trabalho. Trabalhar com vocês me ajudou de diversas formas. Obrigado por tudo e por estarem tão perto de mim nessa etapa. Que Deus possa recompensá-los, porque a minha dívida com vocês é imensa. Bem como a todos os maravilhosos amigos da nossa turma do mestrado.

A todos os alunos do LabNeuro, em especial Nayra, que iniciou as perfusões, imunos e Nissls do projeto. A sua experiência ajudou-nos a trilhar um caminho mais seguro. O agradecimento também se estende aos amigos, que contribuíram demasiadamente nesse trabalho, ao Dr Melquisedec e MSc Paulo Leonardo, que contribuíram com saudáveis conversas e compartilhamento de experiências com o tema, Helder, Mariana, Mayara e Brenna, Nayana, Narylenne e Daniel em especial, por contribuírem diretamente e todos os demais que a memória e o espaço me impede de citar o nome.

A dona Regina, por todas as imunos, microtomias, diaforases e demais experimentos executados sem agenda. E também pelo fornecimento de todo o material solicitado na execução desse e de outros projetos pedidos sem nenhuma antecedência.

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa que exerce papel de neurotransmissor, regulando eventos sinápticos e participando de funções neurais como memória e aprendizado. No sistema nervoso, o NO é catalisado pela óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Por ser uma molécula gasosa, o NO pode se difundir livremente atravessando a membrana das células, desta forma agindo como um neurotransmissor retrógrado, geralmente considerado um moderador de ação local. NO e nNOS são moléculas altamente conservadas entre as espécies e estão presentes no sistema nervoso de diversos vertebrados. Nós realizamos imunistoquímicas anti-nNOS e histoquímicas para revelação de NADPH-diaforase com o objetivo de investigar a distribuição de células nitrérgicas no compartimento subcortical do telencéfalo de mocó (*Kerodon rupestris*). Os dados mostram uma distribuição heterogênea de neurônios imunorreativos a nNOS ou com atividade NADPH-diaforase ao longo de todo o compartimento subcortical. Observou-se neurônios imunorreativos a nNOS no núcleo accumbens, associando o NO a mecanismos de vício e recompensa; nos núcleos da amígdala e no hipocampo, podendo estar associados a aprendizado e memória; no núcleo intersticial da estria terminal, associado a comportamentos de defesa, analgesia e funções cardiovasculares; e nos núcleos da base, sugerindo papel neuroprotetor e de regulação neural do movimento, associando-se ainda a doenças neurodegenerativas nessas regiões. A distribuição de NO no telencéfalo subcortical de mocó é ampla, heterogênea e complexa, mas guarda muitas semelhanças com a distribuição em outros roedores, o que pode significar um amplo papel do NO nas funções cerebrais desta espécie. Além disso, o mapeamento da distribuição de nNOS está sendo importante para a definição morfológica de certas áreas encefálicas de mocó, em comparação com outras espécies de roedores e outros mamíferos.

Palavras-chave: Óxido nítrico, Óxido nítrico sintase, Telencéfalo, *Kerodon rupestris*.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a gaseous molecule that acts as a neurotransmitter, regulating synaptic events and participating in neural functions such as memory and learning. In the nervous system, NO is catalysed by neuronal nitric oxide synthase (nNOS). As a gaseous molecule, NO can diffuse freely trespassing the cells membrane. Because of this NO can act as a retrograde neurotransmitter and is usually treated as a local moderator. NO and nNOS are highly conserved among species and are present in the nervous system of many vertebrates. We performed immunohistochemical anti-nNOS and histochemical for NADPH-diaphorase in order to investigate the distribution of nitrenergic cells in the subcortical compartment of the rock cavy (*Kerodon rupestris*) telencephalon. The data show a heterogeneous distribution of neurons immunoreactive to nNOS or with NADPH-diaphorase activity throughout the subcortical compartment. Neurons immunoreactive to nNOS were observed in the nucleus accumbens, associating NO with mechanisms of addiction and reward; in the nuclei of the amygdala and in the hippocampus, that are associated with learning and memory; in the bed nucleus of the stria terminalis, associated to defense behaviors, analgesia and cardiovascular functions; and in the basal nuclei, suggesting a putative neuroprotector role and neural regulation of the movement, being still associated with neurodegenerative diseases in these regions. The distribution of NO in the subcortical telencephalon of the rock cavy is broad, heterogeneous and complex, suggesting a broad role of NO in the cerebral functions of this species. In addition, the mapping of nNOS distribution is being important for the morphological definition of the rock cavy's brain areas in comparison with other species of rodents and other mammals.

Key-words: Nitric oxide, Nitric oxide synthase, Telencephalon, *Kerodon rupestris*.

LISTA DE ABREVIATURAS

3v: terceiro ventrículo

aca: comissura anterior

AcbC: *core* do núcleo accumbens

AcbSh: *shell* do núcleo *accumbens*

AcbShL: *shell* parte lateral do núcleo *accumbens*

acp: comissura anterior, parte posterior

BLA: divisão anterior do núcleo basolateral da amígdala

BLP: divisão posterior do núcleo basolateral da amígdala

BMA: divisão anterior do núcleo basomedial da amígdala

BMP: divisão posterior do núcleo basomedial da amígdala

BMV: divisão ventral do núcleo basolateral da amígdala

CA1: região CA1 do hipocampo

CA2: região CA2 do hipocampo

CA3: região CA3 do hipocampo

CeC: divisão capsular do núcleo central da amígdala

CeL: divisão lateral do núcleo central da amígdala

CeM: divisão medial do núcleo central da amígdala

CPu: núcleo caudado-putamen (CPu)

DCI: divisão dorsal do núcleo claustró

DEn: divisão dorsal do núcleo endopiriforme

ec: cápsula externa

eNOS: isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico

GP: globo pálido

GrDG: camada granular do giro denteado

HDB: divisão horizontal da banda diagonal de Broca

ic: cápsula interna

IEn: divisão intermediária do núcleo endopiriforme

iNOS: isoforma induzível da sintase do óxido nítrico

IPACL: núcleo intersticial da borda posterior da comissura anterior, divisão lateral

IPACM: núcleo intersticial da borda posterior da comissura anterior, divisão medial

LaDL: divisão dorsolateral da divisão lateral da amígdala

LaVL: divisão ventrolateral da divisão lateral da amígdala

LaVM: divisão ventromedial da divisão lateral da amígdala

Ld: núcleo septal lambdoide

lo: trato olfatório lateral

LSD: núcleo septal lateral, parte dorsal

LSI: núcleo septal lateral, parte intermediária

LSV: núcleo septal lateral, parte ventral

LTD: depressão de longo termo

LTP: potenciação de longo termo

LV: ventrículo lateral

MCPO: núcleo pré-óptico magnocelular

MeAD: divisão anterodorsal do núcleo medial da amígdala

MeAV: divisão anteroventral do núcleo medial da amígdala

MePD: divisão posterodorsal do núcleo medial da amígdala

MePV: divisão posteroventral do núcleo medial da amígdala

mfb: fascículo prosencefálico medial

MoDG: camada molecular do giro denteado

MS: núcleo septal medial

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NADPHd: NADPH-diaforase

nNOS: isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico

nNOS-IR: célula imunorreativa a sintase do óxido nítrico

NO: óxido nítrico

NOS: sintase do óxido nítrico

och: quiasma óptico

Pir: córtex piriforme

PLd: núcleo septal paralambdoide

PMCo: núcleo cortical posteromedial da amígdala

PoDG: camada polimorfa do giro denteado

SBI: substância inominada
SFi: núcleo septofimbrial
SHi: núcleo septohipocampal
SHy: núcleo septohipotalâmico
SO: núcleo supraóptico
STD: divisão posterior do núcleo intersticial da estria terminal
STLI: divisão intermediária da divisão lateral do núcleo intersticial da estria terminal
STLJ: divisão justacapsular da divisão lateral do núcleo intersticial da estria terminal
STLP: divisão posterior da divisão lateral do núcleo intersticial da estria terminal
STLV: divisão ventral da divisão lateral do núcleo intersticial da estria terminal
STMAL: divisão anterolateral da divisão medial do núcleo intersticial da estria terminal
STMAM: divisão anteromedial da divisão medial do núcleo intersticial da estria terminal
STMV: divisão ventral da divisão medial do núcleo intersticial da estria terminal
TS: núcleo septal triangular
VCI: divisão ventral do núcleo claustró
VDB: divisão vertical da banda diagonal de Broca
VE_n: divisão ventral do núcleo endopiriforme
VP: núcleo pálido ventral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biossíntese do óxido nítrico. Retirado de Nelson e Cox, 2002.....	16
Figura 2 – Funções das diferentes isoformas da NOS. Adaptado de Förstermann e Sessa, 2012.....	17
Figura 3 – Monômeros de NOS, demonstrando seus domínios redutases e oxigenases. Adaptado de Förstermann e Sessa, 2012.....	17
Figura 4 – Funções intracelulares (ação molecular) do NO (modificado de Villanueva e Giulivi, 2010).....	18
Figura 5 – O mocó (<i>Kerodon rupestris</i>) em ambiente natural. Fonte: Arquivo LabNeuro.....	22
Figura 6 – Parâmetros utilizados para classificação subjetiva da densidade da marcação observada nos cortes obtidos nas imunistoquímicas para nNOS nesse trabalho.....	33
Figura 7 – Parâmetros utilizados para classificação subjetiva da intensidade da marcação observada nos cortes obtidos nas imunistoquímicas para nNOS nesse trabalho.....	34
Figura 8 – Esquemas representativos das secções coronais da parte mais anterior do telencéfalo do mocó, construídas a partir das lâminas coradas pela método de Nissl.....	37-41
Figura 9 – Fotomicrografia demonstrando subdivisões do núcleo endopiriforme e núcleo <i>accumbens</i> do mocó segundo classificação de neurônios imunorreativos a nNOS.....	43
Figura 10 – Fotomicrografia do núcleo pálido ventral, núcleo caudado-putamen, núcleo cláustro e substância inominada do mocó.....	45

Figura 11 – Fotomicrografias de células imunomarcadas nNOS do núcleo caudado putamen e claustró.....	46
Figura 12 – Fotomicrografias dos principais grupamentos da amígdala do mocó num nível médio.....	48
Figura 13 – Fotomicrografia do núcleo intersticial da estria terminal do mocó.....	50
Figura 14 – Fotomicrografia do hipocampo e giro denteado.....	52
Figura 15 - Fotomicrografia dos núcleos septais.....	53
Figura 16 – Secções de histoquímica para NADPHd ao nível do núcleo <i>accumbens</i>	55
Figura 17 – Secções de histoquímica para NADPHd ao nível da stria terminal e amígdala.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Intensidade e densidade da marcação na imunistoquímica para nNOS nos núcleos estudados.....	35-36
--	-------

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. Óxido Nítrico: síntese e funções biológicas	16
1.2. O mocó.....	21
1.3. Compartimento subcortical e hipocampo	24
2. Objetivos	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. Materiais e métodos	28
3.1. Sujeitos	28
3.2. Perfusão.....	28
3.3. Microtomia.....	29
3.4. Método de Nissl	29
3.5. Imunoistoquímica	30
3.6. Histoquímica para NADPH-diaforase	31
3.7. Análise das imagens	31
4. Resultados	35
4.1. Imunoistoquímica para nNOS.....	35
4.1.1. Núcleo endopiriforme	42
4.1.2. Núcleo accumbens	42
4.1.3. Núcleos pálido, caudado-putamen, claustro e substância inominada.....	44
4.1.4. Amígdala.....	46
4.1.5. Núcleo intersticial da estria terminal	49
4.1.6. Hipocampo e giro denteado	51
4.1.7. Núcleos septais	52
4.2. Histoquímica para NADPHd	54
5. Discussão.....	57
5.1. NO como neurotransmissor e o telencéfalo subcortical de mocó.....	58
5.2. Implicações morfofuncionais do NO.....	61
5.3. Conclusão.....	67
6. Bibliografia	68
ANEXOS.....	81

1. Introdução

1.1. Óxido Nítrico: síntese e funções biológicas

O óxido nítrico (NO) é um gás inorgânico e diatômico com propriedades químicas de um radical livre, possuindo um elétron desemparelhado no orbital externo (TOLEDO; AUGUSTO, 2012). Em bactérias, o NO participa da fixação de nitrogênio e em mamíferos age como mensageiro em macrófagos, ativando propriedades bactericidas e tumoricidas (SNYDER, 1992; NATHAN; HIBBS, 1991). Além destas funções, o NO atua também como um mediador fisiológico do relaxamento de vasos sanguíneos, sendo identificado como um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), junto a prostaciclina PGI_2 e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; PALMER; FERRIDGE; MONCADA, 1987). O NO é de considerável importância nas sinapses do sistema nervoso autônomo, especialmente na divisão entérica, onde medeia relaxamento da musculatura lisa (HANSEN, 2003).

Na parte central do sistema nervoso, o NO atua como neurotransmissor em elementos pré e pós-sinápticos, podendo difundir-se até os processos astrocitários e até mesmo a outras células. Por possuir a capacidade de difusão, ou seja, atravessar membranas facilmente assim como o oxigênio e o dióxido de carbono, não há controle preciso de direção de ação após liberação ou mecanismos de captação, embora sua grande reatividade química limite sua difusão a perto de 1mm do ponto de produção (NELSON; COX, 2002). Em ambos os casos, a principal ação do NO é ativar a enzima guanilato ciclase e então aumentar os níveis de guanidina monofostato cíclico (cGMP) em células alvo (GARTHWAITE, 1991). No sistema nervoso, a função do NO também está presente em mecanismos de potenciação e depressão de longo termo (respectivamente, LTP e LTD) (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

A síntese do NO é catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS), enzima que oxida o nitrogênio terminal do grupamento guanidino da L-arginina, gerando concentrações equimolares de L-citrulina. A NOS possui duas isoformas: a constitutiva e a induzível. A primeira está presente nos endotélios e nos neurônios,

sendo nomeadas respectivamente eNOS e nNOS. A isoforma nNOS está presente nos neurônios do cérebro, medula espinal, gânglios simpáticos e glândulas adrenais e também em células epiteliais dos pulmões, útero e estômago, mácula densa do rim, células da ilhota pancreática e musculatura esquelética (VILLANUEVA; GIULIVI, 2010). Nos neurônios, essa isoforma concentra-se nos espinhos dendríticos (ZHOU; ZHU, 2009). Já a eNOS encontra-se associada à membrana das células endoteliais, sinciotrofoblastos, células epiteliais tubulares dos rins, células intersticiais do cólon e hipocampo. A ativação de ambas depende da elevação de cálcio nas células endoteliais e requerem um doador de elétrons como a Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida (NADPH) e co-fatores como Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD), Flavina Mononucleotídeo (FMN) e tetrahydrobiopterina (BH₄) (BREDT et al., 1991a; MONCADA, 1997; PALMER; FERRIDGE; MONCADA, 1987) (Fig. 1).

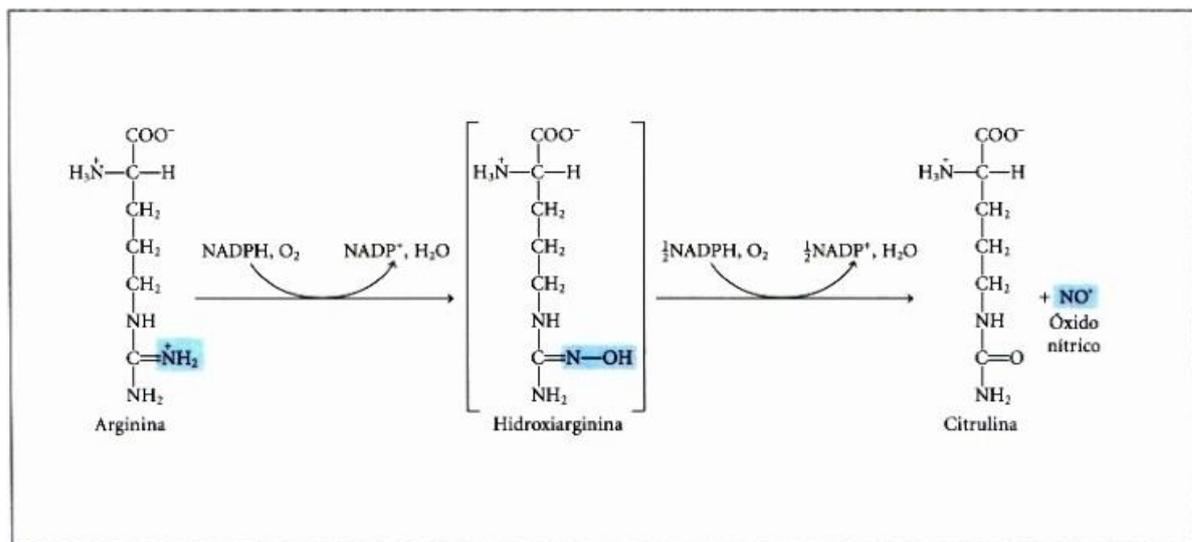


Figura 1 – Biossíntese do óxido nítrico. Os dois passos são catalisados pela NOS. O nitrogênio do NO é cedido do grupo guanidino da arginina. Retirado de Nelson e Cox, 2002.

A isoforma induzível (iNOS), por sua vez, é ativada pela presença de patógenos, tais quais o lipolissacarídeo (LPS) bacteriano, citocinas (especialmente a interleucina 1, IL-1), endotoxinas e o fator de necrose tumoral (TNF). A iNOS funciona independente de cálcio, formando complexos com a calmodulina em baixas concentrações de cálcio, e está presente em macrófagos, linfócitos, neutrófilos,

eosinófilos, células de Kupffer, hepatócitos e células epiteliais (DOMINICZACK; BOHR, 1995; MONCADA, 1997; SCHULZ; TRIGGLE, 1994; TOLEDO; AUGUSTO, 2012). A principal diferença entre as duas isoformas é que a isoforma iNOS é capaz de liberar grandes quantidades de NO por períodos de tempo relativamente longos (ZAGO; ZANESCO, 2006) (Fig. 2 e 3).

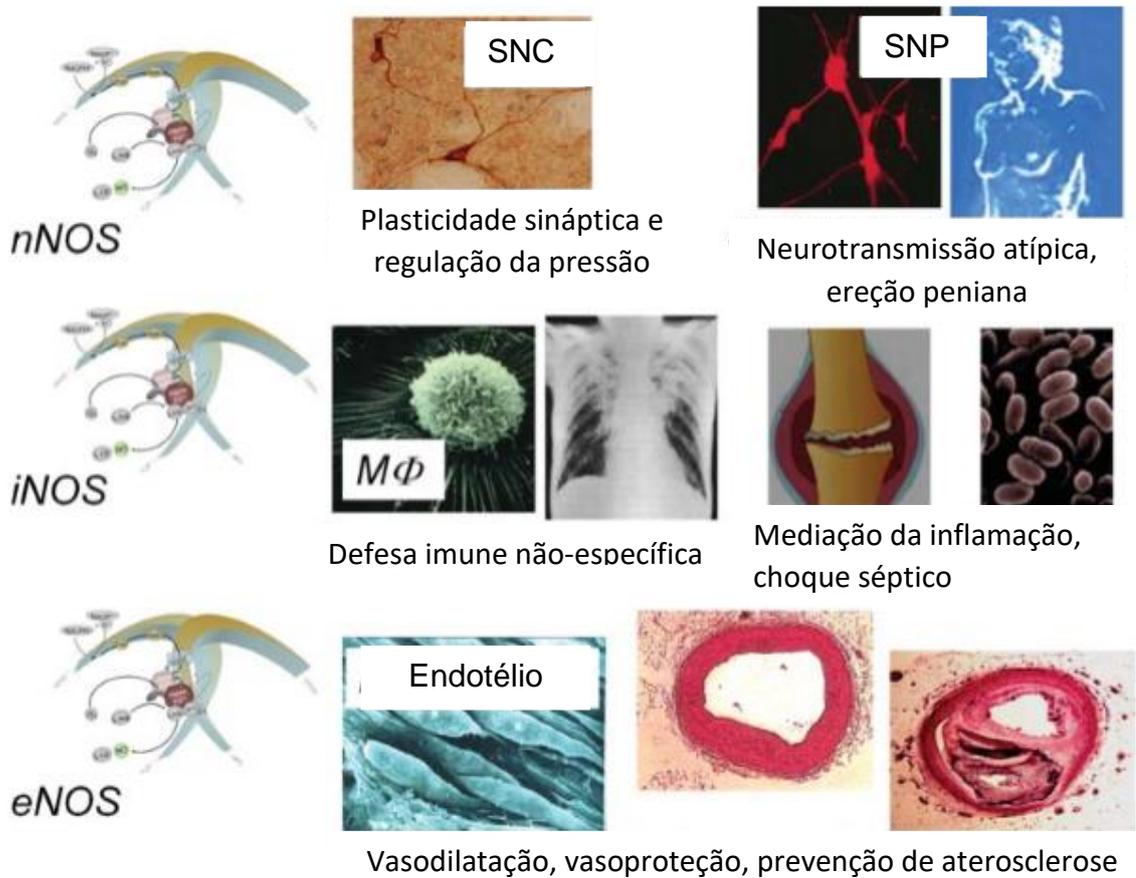


Figura 2 – Funções das diferentes isoformas da NOS. Adaptado de Förstermann e Sessa, 2012.

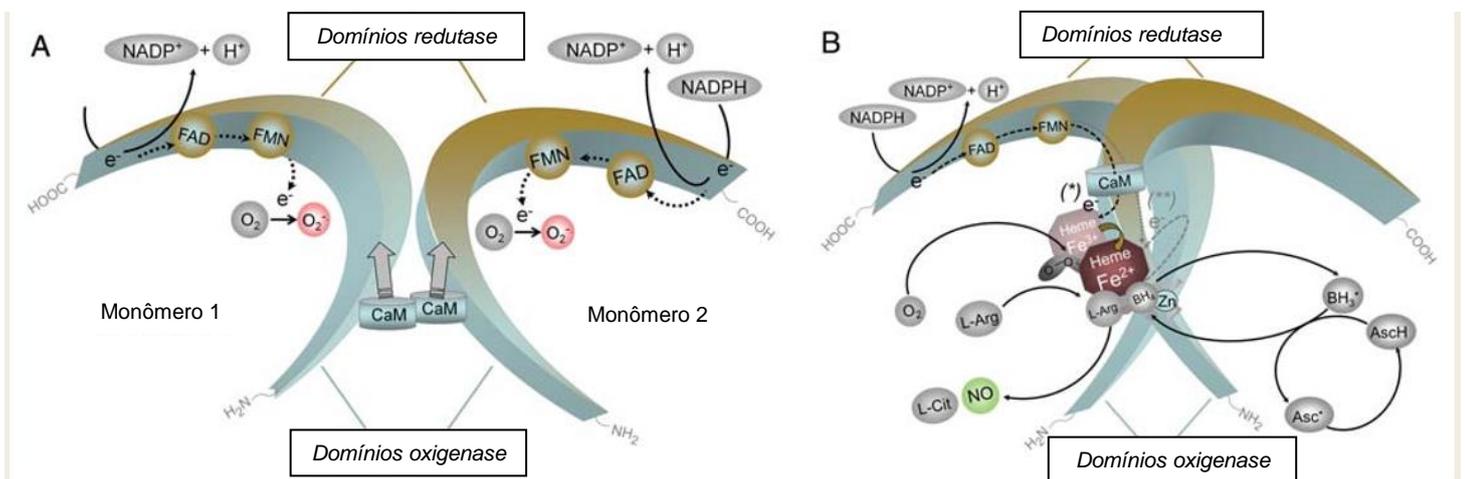


Figura 3 – Monômeros de NOS, demonstrando seus domínios redutases e oxigenases. Adaptado de Förstermann e Sessa, 2012. **NADP**: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, **NADPH**: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida, **FAD**: Flavina Adenina Mononucleotídeo, **FMN**: Flavina Mononucleotídeo, **CaM**: Calmodulina, **L-Arg**: Arginina, **L-Cit**: Citrulina, **NO**: óxido nítrico, **BH₃**: radical trihidrobiopterina, **BH₄**: tetrahidrobiopterina, **Asc**: radical ascorbato, **Asch**: ácido ascórbico.

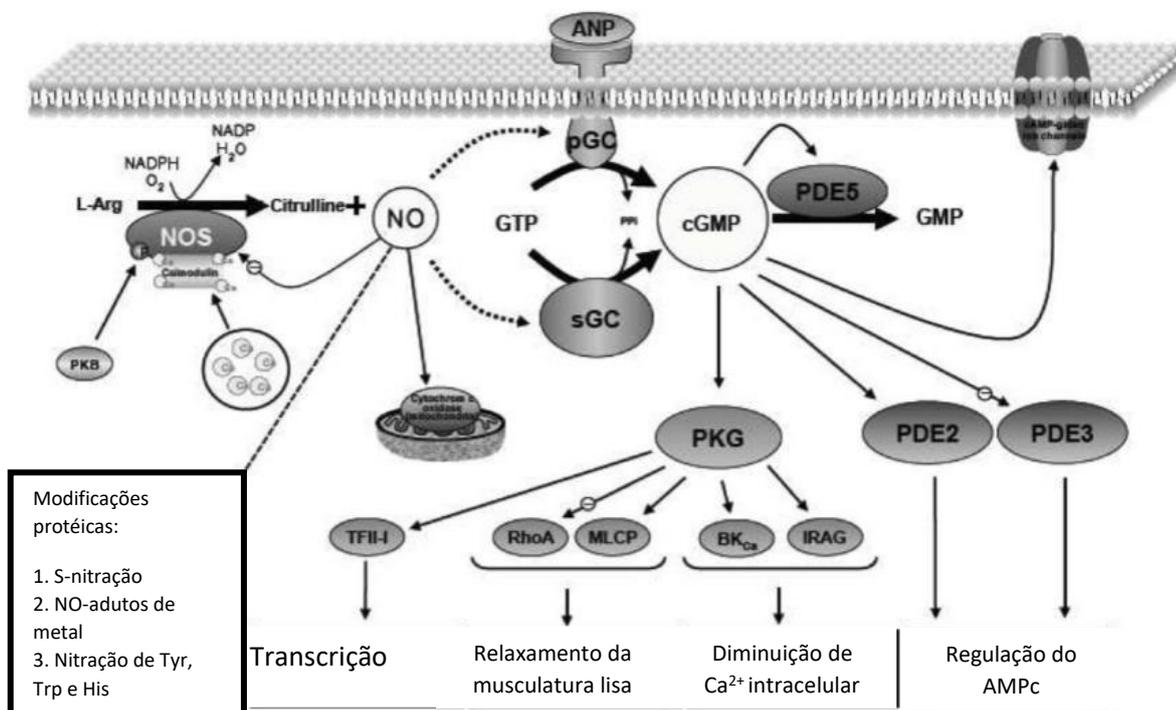


Figura 4 – Funções intracelulares (ação molecular) do NO (modificado de Villanueva e Giulivi, 2010). **sGC**: guanilato ciclase solúvel, **pGC**: guanilato ciclase particulada, **PKG**: proteína cinase dependente de GMPc, **PDE**: fosfodiesterase, **ANP**: peptídeo atrial natriurético, **PK**: proteínas cinases, **IRAG**: receptor de IP3 associado ao substrato cGKI β , **MLCP**: fosfatase MLC, **RhoA**: um substrato para PKGs, **BKCa**: canais de cálcio de alta condutância ativada por potássio.

Embora todas as três isoformas de NOS sejam produtos de diferentes genes, elas compartilham similaridade estrutural com identidade de 50% a 60% e estão ativas apenas como dímero. Cada subunidade deste complexo dimérico é composto por dois domínios: oxigenase e redutase (DUDZINSKI et al., 2006). O domínio oxigenase contém o sítio de ligação para L-arginina, BH₄ e grupamento heme e o domínio redutase, domínios de ligação a FMN, FAD, NADPH e calmodulina. As duas

subunidades interagem pelos domínios oxigenase, formando a conformação dimérica (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; STUEHR, 1997) (Fig. 3).

Nos últimos anos, estudos têm confirmado a significância da nNOS em uma variedade de eventos sinápticos, estando envolvida em funções como aprendizado, memória e neurogênese (ZHOU; ZHU, 2009). Na parte central do sistema nervoso, nNOS atua na regulação da LTP, tendo o NO um papel de neuromodulador nesses eventos (HOLSCHER; ROSE, 1992; IZUMI; ZORUMSKI, 1993). A nNOS é expressa em corpos neuronais maduros e imaturos e também em células da glia, existindo em duas formas, particulada e forma solúvel. Sua localização celular varia, estando expressa no núcleo e também no citoplasma, podendo ligar-se a membrana plasmática diretamente ou por meio de proteínas de ancoragem. Sua localização subcelular diferencial contribui para sua diversidade de funções (ZHOU; ZHU, 2009). A ativação da nNOS depende da presença do complexo cálcio-calmodulina, que funciona como um ativador alostérico da nNOS, facilitando o fluxo de elétrons do NADPH para o domínio flavina redutase e do domínio redutase para o grupamento heme (MATSUDA; IYANAGI, 1999). A atividade da nNOS é principalmente regulada pelas concentrações de cálcio intracelular e sua ativação depende da ligação com a calmodulina (ZHOU; ZHU, 2009).

A ativação da nNOS no sistema nervoso se dá principalmente através da liberação de glutamato na fenda sináptica ou através da despolarização de membrana através da abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (HABIB; ALI, 2011; PFEIFFER; MAYER; HEMMENS, 1999). O NO induz mudanças na sinalização neuronal por diversas vias. A maioria dos seus efeitos depende da síntese de GMPc. A ativação da guanilato ciclase (GC) e consequente ativação de proteínas quinases dependentes de GMPc tem sido sugerida como principal via ativada na célula onde atua o NO, assim sendo a via por meio da qual desencadeia seus efeitos (WANG; ROBINSON, 1997; SMOLENSKI et al., 1998) (Figura 4). Outra via para desempenhar suas funções é através da ativação e inativação seletiva de canais como acontece no hipocampo (ERDEMLI; KRNJEVIC, 1995) e também no *locus coeruleus* (PINEDA; KOGAN; AGHAJANIAN, 1996). Por fim, a síntese de GMPc mediada por NO também pode reduzir a ativação de receptores de GABA no cerebelo (ZARRI et al., 1994; ROBELLO et al., 1996) e de receptores de glutamato

tipo AMPA no prosencéfalo, cerebelo e nas células horizontais da retina (DEV; MORRIS, 1994; MCMAHON; PONOMAREVA, 1996).

No encéfalo, o NO está presente na camada adventícia dos vasos, possuindo função vasodilatadora, e nos neurônios e células da glia, atuando como segundo mensageiro e neurotransmissor (SNYDER, 1992). É provável que o NO possua uma proeminente função no desenvolvimento e regeneração de neurônios olfatórios, inclusive pressupondo participação na neuroplasticidade dessa região (ROSKAMS et al., 1994) estando ainda relacionado à memória, ao controle motor, ao sistema de recompensa e processamento superior (MIZUKAWA et al., 1989) dada sua distribuição neuroanatômica descrita até o momento.

Pela sua localização e propriedades únicas enquanto neurotransmissor, a dinâmica do NO chama a atenção e necessita de mais estudos que complementem a compreensão de suas funções e melhor expliquem sua relação com outros neurotransmissores, inclusive em diferentes espécies, ampliando o entendimento acerca desse mensageiro intercelular singular.

1.2. O mocó

O mocó (*Kerodon rupestris*) é um roedor encontrado nos estados do Nordeste do Brasil e norte de Minas Gerais, habitando preferencialmente a caatinga do semi-árido Brasileiro (CABRERA, 1961; LACHER JR, 1981).

Taxonomicamente pode ser classificado como membro da superfamília Cavoidea, família Caviidea, subfamília Caviinae, gênero *Kerodon*, juntamente com os gêneros *Cavia*, *Galea* e *Microcavia* (MOOJEN, 1952; CABRERA, 1961; LACHER JR, 1981). A este grupo pertencem pequenos animais já reconhecidamente domésticos, como porquinho da índia (*Cavia porcellus*), os que vivem em pequenas colônias feitas em buracos na terra ou usam cavidades nas bordas das rochas. Possuem hábitos grupais e diurnos (CRANDALL, 1964). A família Caviinae apresenta animais adaptáveis a diversos tipos de ambientes, podendo ser arborícolas, rupícolas e terrícolas; costumam ser herbívoros em consequência de sua dentição ser desprovida de caninos (MOOJEN, 1952).

O mocó é um animal que habita locais rochosos com diversas fendas onde se abriga dos predadores e passam boa parte do tempo. São facilmente adaptáveis às condições ecológicas como calor, escassez de água e de alimentos, especialmente nos períodos de grandes secas do semi-árido nordestino. Extraem sua alimentação de galhos de árvores e rochas, principalmente por serem excelentes saltadores e escaladores. Tal alimentação é constituída de cascas de árvores e gramíneas em geral, sendo as árvores mais procuradas o mufumbo (*Cobretum leprosum*), faveleira (*Cnidocolus phyllacanthus*) e a parreira brava (*Cissampelos parreira*) (CARVALHO, 1969; LACHER JR, 1981; MENDES, 1987). Em cativeiro aceitam bem frutas (maçã, banana, melão, melancia, manga) e raízes.

Apresenta coloração cinza clara com pelos pretos e amarelos ou esbranquiçados na região dorsal, castanho ferruginoso na região caudal, um pouco acastanhado nas patas e branco na cervical (Fig. 5). Suas patas possuem coxins calosos pouco excedidos pelas unhas rígidas que lhes proporciona a habilidade de saltar e escalar (MOOJEN, 1952). Seu olfato e audição são bastante aguçados, detectando seu predador a longas distâncias (CARVALHO, 1969). Atingem a fase adulta aos 200 dias, podendo alcançar até 50 cm de comprimento e 800g de peso corporal (MOOJEN, 1952; CARVALHO, 1969; ROBERTS; MALINI; DEAL, 1984).

A reprodução ocorre durante todo o ano, com exceção do período que vai de abril a junho. Dentre os *Cavinaes*, o mocó possui a gestação mais longa ($65 \pm 1,34$ dias), a menor média de tamanho da ninhada ($1,28 \pm 0,09$), o mais baixo peso de filhotes e o mais longo tempo de maturidade sexual (ROBERTS; MALINI; DEAL, 1984). Apesar das poucas crias por parto, o curto período gestacional garante uma elevada produção de crias durante o ano (LACHER JR, 1981).

Com relação ao seu padrão de atividade locomotora, tem sido relatado que nos dias mais escuros o mocó sai para se alimentar pela manhã e à tarde, enquanto nos dias mais claros sua atividade se concentra na fase noturna (CARVALHO, 1969). Estudos realizados por Sousa e Menezes (2006) elucidaram que embora o mocó apresente atividade ao longo de 24 horas, os períodos de transição de fases claro-escuro são os de maior concentração de atividade, sugerindo, portanto, comportamento predominantemente crepuscular.

Em consequência das singularidades morfofuncionais e hábitos comportamentais do mocó em relação a outros animais da ordem Rodentia, esta espécie tem se tornado um interessante modelo para estudos neuroanatômicos e comportamentais.



Figura 5: O mocó (*Kerodon rupestris*) em ambiente natural. Fonte: Arquivo LabNeuro.

O NO vem sendo amplamente estudado em diversas espécies como peixes (MASINI et al., 2005), lagartos (SMEETS; ALONSO, 1997), gatos (MIZUKAWA et al., 1988), coelhos (GONZÁLEZ-SORIANO et al, 2002), ratos (RODRIGO et al., 1994; HOPE et al., 1991; VINCENT; KIMURA, 1992; IWASEA et al., 1998; FREIRE et al., 2012), camundongos (GOTTI et al., 2005; HARA et al., 1996; REUSS; RIEMANN, 2000) e humanos (ECGBERONGBE et al, 1994), mostrando que há semelhanças que caracterizam o NO como um neuromediador filogeneticamente antigo e de distribuição bem conservada. No entanto, diferenças também trazem características de um neuromediador com funções específicas. Estas características nos trazem a curiosidade para estudar comparativamente o NO na parte central do sistema nervoso, trazendo à luz a distribuição de seus neurônios em um roedor até então não estudado, um animal com características comportamentais próprias e peculiares como o comportamento crepuscular.

Assim, desejamos obter mais informações da distribuição de células nitrérgicas no telencéfalo subcortical do mocó, comparando a distribuição presente com a de

outros animais já descritas, obtendo substrato neuroanatômico para ter base para elucidar o papel funcional desse neurotransmissor e a organização telencefálica no mocó.

1.3. Compartimento subcortical e hipocampo

A parte basal do telencéfalo contém os complexos estriatopálidais, a parte estriatal da amígdala, vários grupos de populações colinérgicas e núcleos septais. Os complexos estriatopálidais são localizados na parte ventrolateral do telencéfalo e estão envolvidos no controle dos movimentos. Em mamíferos, o complexo estriatopálidal dorsal é composto pelo núcleo caudado e putamen (que conjuntamente formam o striatum dorsal) e globo pálido (pálido dorsal), enquanto que o complexo estriatopálidal ventral é composto pelo núcleo accumbens e o tubérculo olfatório (que conjuntamente constituem o striatum ventral) e o pálido ventral (HODOS; BUTLER, 2005). O termo núcleos da base é atribuído aos núcleos claustrum, amígdala, núcleo caudado, putamen, globo pálido, substância inominada e núcleo accumbens (MACHADO; HAERTEL, 2014).

A organização das sinapses dos núcleos da base tem sido descrita como um *loop* aberto, capaz de ajustar-se de acordo com as informações coletadas e ainda com seu contexto. Tal *loop* pode ainda ser alterado por plasticidade neural (SHIPP, 2017).

Alguns núcleos são reconhecidamente estudados e referenciados, como o núcleo caudado, o núcleo putamen e o globo pálido, que juntos constituem o corpo estriado e associam-se ao controle dos movimentos voluntários (MACHADO; HAERTEL, 2014). Esses possuem extensas comunicações com núcleos dopaminérgicos de outras áreas do encéfalo, como a substância negra, especialmente a parte reticulada (SHIPP, 2017) e são estudados por estarem associados a conhecidos distúrbios neurodegenerativos. O termo corpo estriado refere-se aos núcleos caudado e putamen, que situam-se lateralmente ao tálamo e estão separados dos núcleos pálidos pela cápsula interna. O núcleo caudado, por sua vez, trata-se de uma estrutura em formato de C, dividida em cabeça, corpo e cauda, intimamente relacionado aos ventrículos laterais, situado superiormente ao corpo caloso (MACHADO, HAERTEL, 2014). A disposição do núcleo caudado como

uma argola achatada no cérebro torna possível a presença de distintas partes em cortes coronais.

Outro desses conhecidos seria a amígdala, estrutura heterogênea situada próximo a cauda do núcleo caudado, no lobo temporal, próximo ao giro uncus, que consiste em vários núcleos e é amplamente aceita como possuidora de um papel no medo condicionado e incondicionado. O complexo basolateral dessa formação projeta para o hipotálamo e tronco encefálico e atualmente é referido como o principal eferência da amígdala para regiões que controlam a expressão do medo, e lesões no núcleo central da amígdala tem demonstradamente interrompido comportamentos típicos de medo como o freezing (KAPP et al., 1979; PHILLIPS; LEDOUX, 1992).

Contudo, o núcleo *claustrum*, com poucas informações acerca de sua função carece de mais estudos sobre seu papel. Essa estrutura separa-se do núcleo putamen pela cápsula externa e da ínsula pela cápsula extrema, possui conexões recíprocas com praticamente todas as áreas corticais, mas sua função ainda permanece desconhecida, embora existam hipóteses que teria uma ação sincronizadora da atividade elétrica de várias partes do cérebro, integrando-as participando assim da regulação de comportamentos voluntários (SMYTHIES; EDELSTEIN; RAMACHANDRAN, 2012).

Além de funções isoladas, os núcleos da base possuem organizações como o sistema límbico, constituído pela amígdala, hipocampo, núcleo intersticial da estria terminal, núcleo *accumbens*, hipotálamo, área tegmentar ventral e grísea periaquedutal processa pistas externas de caráter emocional, social ou de relevância motivacional, gerando comportamentos inatos apropriados. A ativação desses circuitos se dá por estímulo sensorial primário (primariamente via sistema olfatório em roedores) (MACHADO; HAERTEL, 2014).

Mais desenvolvido em roedores que em humanos, os núcleos septais, situados entre os ventrículos laterais, possuem funções envolvidas nos comportamentos de ansiedade e depressão e extensivas comunicações com estruturas como o hipocampo, amígdala e hipotálamo (SWANSON, 1978).

Além de estar intrinsecamente ligado a funções emocionais, comportamento motor, atenção (HEIMER, 1995) e memória, os núcleos da base são importantes integradores de funções. Conexões unidirecionais do córtex para a matriz do corpo estriado inicia o *loop* núcleos da base-tálamo-córtex, revelando-se importante no processamento da ação e no repertório comportamental; um discreto agrupamento dos compartimentos estriatais, os estriassomas, tem o papel complementar de registrar ou antecipar recompensas que formam as plasticidades corticoestriatais. O referido *loop* pode ainda receber informações de regiões distantes e incorporá-las no processamento, e conduzi-las as mais divergentes terminações (SHIPP, 2017). O estudo neuroanatômico e neuroquímico dessas regiões pode contribuir extensivamente no entendimento da neuroanatomia e ajudar a elucidar alguns dos papéis e conexões dessas formações principalmente em roedores.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Descrever, de forma indireta, o padrão de distribuição de NO no compartimento subcortical do telencéfalo e hipocampo de mocó numa abordagem morfofuncional.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever a distribuição de nNOS no compartimento subcortical do telencéfalo e hipocampo de mocó.
- Descrever a distribuição de NADPH-diaforase no compartimento subcortical do telencéfalo e hipocampo de mocó.
- Delinear a neuroanatomia das formações neuronais nNOS-IR descritas no compartimento subcortical telencefálico e no hipocampo do mocó.
- Caracterizar qualitativamente intensidade de marcação e densidade de neurônios imunorreativos a nNOS no compartimento subcortical do telencéfalo e hipocampo de mocó.

3. Materiais e métodos

3.1. Sujeitos

Foram utilizados sete mocós adultos jovens, sendo 5 machos e 2 fêmeas, obtidos através de captura no município de Jucurutu (RN), mediante autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, SISBIO no. 42960-3). O processo de captura se realizou a partir do uso de armadilhas. Os animais foram mantidos na fazenda Samisa, propriedade da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), localizada no município de Extremoz-RN, com comida e água à vontade, temperatura ambiente e ciclo claro-escuro de 12h:12h. O projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRN, com número de protocolo 004/2014. Esse trabalho trata-se de uma extensão de um projeto intitulado Mapeamento Neuroquímico no Encéfalo do Mocó.

3.2. Perfusão

Os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina via intramuscular na dosagem de 20mg/kg e 2mg/kg respectivamente. Ao atingir o plano anestésico, cada animal foi submetido à perfusão transcardíaca que compreende o posicionamento do animal em decúbito dorsal sobre tela de arame sob ponto de água; seguida por toracotomia, com incisão de pele, músculos e arco costal, sendo estes removidos em bloco, para exposição do coração e cardiopunção no ventrículo esquerdo, utilizando uma agulha de 17 mm x 1,5 mm a qual é direcionada para a artéria aorta, seguindo-se uma incisão no átrio direito. A agulha é conectada a uma bomba peristáltica (Cole-Parmer), passando-se 300 ml de solução salina a 0,9% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 com heparina (Parinex, Hipolabor, 2ml/1000 ml de solução salina), seguido de 700 ml de solução paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.4.

Concluída a perfusão, os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico para roedores. Depois de fazer uma incisão longitudinal na pele e

rebatê-la lateralmente, foi feita a limpeza da superfície óssea, facilitando a visualização do bregma e do lambda, os quais foram nivelados na mesma altura, ajustando-se a barra dos incisivos, padronizando assim o plano de corte coronal para todos os animais. Após anotação das coordenadas do bregma e lambda, o osso da calota craniana foi removido com o uso de uma broca expondo-se o encéfalo. Ainda no aparelho estereotáxico, o encéfalo foi seccionado em três blocos, através de duas secções coronais: uma no nível do bregma e outra no nível do lambda. Os encéfalos foram retirados delicadamente para evitar danos. Logo após, os três blocos foram armazenados em uma solução de sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 a 4°C, até serem submetidos a microtomia.

3.3. Microtomia

Terminada a etapa de pós-fixação e imersão em tampão sacarose 30%, os encéfalos foram submetidos à microtomia cuja espessura dos cortes foi padronizada em 30 µm. Os encéfalos foram seccionados no plano coronal em criostato. Os cortes foram coletados em um meio líquido de tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 distribuídas sequencialmente em 6 compartimentos, de maneira cíclica e sequenciada, de modo a manter a distância de aproximadamente 180µm entre uma secção e a outra imediatamente seguinte de um mesmo compartimento. Os cortes de um compartimento foram imediatamente montados em lâminas de vidro gelatinizadas e submetidas à coloração pelo método de Nissl para permitir uma melhor demarcação das estruturas. Os cortes dos demais compartimentos foram transferidos para solução anticongelante e conservados a -20°C para utilização.

3.4. Método de Nissl

Uma série foi submetida a coloração de Nissl para análise da citoarquitetura, com a tionina como corante. Neste procedimento os cortes foram lavados em tampão fosfato 0,1M e montados em lâminas gelatinizadas. Após período de secagem do material e consequente desidratação em álcool a 70% duas horas antes

do procedimento, os cortes passaram por uma bateria de alcoóis etílicos de concentrações crescentes, a saber: primeiramente eram mergulhados em água destilada, seguidos por um banho em álcool a 70%, 2 banhos em álcool 95%, 2 banhos em álcool 100% de 3 minutos cada. Ao final da bateria, as lâminas foram mergulhadas em xilol, num primeiro banho de 3 minutos e sequencialmente imergidos num segundo banho de xilol por 30 minutos. Na sequência, os cortes foram reidratados em banhos em alcoóis etílicos de concentrações decrescentes (a mesma utilizada na primeira bateria, em sentido inverso) e posteriormente imergidos em tionina por 40 segundos, para novamente serem desidratados e deslipidificados como descrito acima. Ao final, foram cobertos com ERV-MOUNT e lamínula.

3.5. Imunoistoquímica

A técnica consistiu de uma imunoperoxidase padrão pelo método ABC, onde, após quatro lavagens com duração de dez minutos cada em tampão fosfato 0,1M (PB), pH 7,4, os cortes *free floating* foram submetidos a um pré-tratamento com uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,03% em PB 0,1M durante 20 minutos em agitador orbital para inativação da peroxidase endógena. Após mais quatro lavagens de dez minutos, os cortes então foram incubados em tampão fosfato contendo tampão Triton X-100 a 0,4% (TXPB) com anticorpo primário anti-nNOS feito em camundongo (1:1000, Sigma) e soro normal de cabra a 2% (Jackson Laboratories) permanecendo em incubação por 16 a 24 horas em agitador orbital. No dia seguinte, os cortes foram lavados em PB, por quatro vezes, e incubados em anticorpo secundário biotilnado anti-camundongo feito em cabra diluído a 1:1000 e TXPB por noventa minutos em agitador orbital. Os cortes foram novamente lavados em PB e incubados em solução avidina-biotina-peroxidase (kit ABC, Vector, 1:100) diluídos em TXPB a 0,4% contendo NaCl por noventa minutos. Em seguida, os cortes foram lavados e para a visualização da reação, as secções foram postas em meio contendo PB e H₂O₂ 0,03% como substrato e o cromógeno diaminobenzidina (DAB) 0,05% por aproximadamente 10 minutos. A reação foi parada com lavagens em PB em agitador orbital. Os cortes finalmente foram montados em lâminas gelatinizadas, mergulhados em tetróxido de ósmio 0,05% para intensificar a reação,

desidratadas em uma sequência crescente de álcoois e deslipidicados em xilol e cobertos com ERV-Mount e lamínula.

3.6. Histoquímica para NADPH-diaforase

Foi utilizado o método histoquímico para marcação de NADPH-diaforase. Esse processo iniciou-se diluindo 45 mg de azul de nitrotetrazólio em 1,5 ml de dimetil sulfóxido, formando a solução I. Em seguida acrescentou-se 900 mg de ácido málico em um béquer contendo 150 ml de tampão TRIS 0,05M, ajustando o pH da solução resultante para 8,0. Após o ajuste do pH foi acrescentado 150 mg do composto β -NADP e 60 mg de cloreto de manganês, formando a solução II. Após a homogeneização desta última, as duas soluções foram misturadas, acrescentando em seguida 4,5 ml de Triton-X100. Uma vez que a solução resultante é fotossensível ela foi sempre protegida da luz. As secções foram imersas nessa solução e colocadas para reagir sob agitação manual constante a 39°C em banho maria e protegidos da luz. A duração tem uma alta variabilidade que depende da temperatura e da iluminação passando aproximadamente quatro horas em reação. No entanto passado um período de 90 minutos foi observado em microscópio óptico o grau de marcação em intervalos de 10 minutos. Após a reação foram realizadas 3 lavagens sucessivas em PB de 3 minutos cada e por fim as lâminas foram cobertas com lamínula usando ERV-Mount.

3.7. Análise das imagens

As secções do encéfalo coradas pelo método de Nissl e as submetidas à imunoistoquímica e histoquímica foram examinadas e mapeadas ao microscópio óptico (Nikon ECLIPSE Ni) em campo claro. Imagens digitais foram obtidas de secções representativas usando uma videocâmera digital (Nikon DS-Ri), utilizando o software de aquisição NIS (Nikon). As imagens foram corrigidas minimamente para brilho e contraste e documentadas em fotomicrografias e esquemas construídos utilizando Canvas (versão 12.0; ACD Systems of America, Inc.; 2010).

Os dados são apresentados numa análise semiquantitativa da densidade de neurônios imunorreativos a nNOS e qualitativa da intensidade de marcação obtida na imunohistoquímica anti-nNOS seguindo o que está apresentado nas Fig. 6 e 7. Para a análise semiquantitativa da densidade todos os animais foram analisados e para cada um foi feita uma tabela com as numerações correspondentes a cada núcleo ou subnúcleo de acordo com a Fig. 6, onde nenhuma marcação equivale a zero e a máxima marcação equivale a 4. Ao final da análise foi feita uma média aritmética da pontuação de cada núcleo ou subnúcleo.

Foram construídos esquemas no Canvas (versão 12.0; ACD Systems of America, Inc.; 2010) tendo por base a marcação em Nissl dos encéfalos de macaco, o atlas de sistema nervoso de rato (PAXINOS; WATSON, 2007), atlas de sistema nervoso de sagui (PAXINOS et al, 2012) e atlas de sistema nervoso de camundongo (FRANKLIN; PAXINOS, 2008). Os esquemas foram construídos com um espaçamento de 1,26mm entre eles.

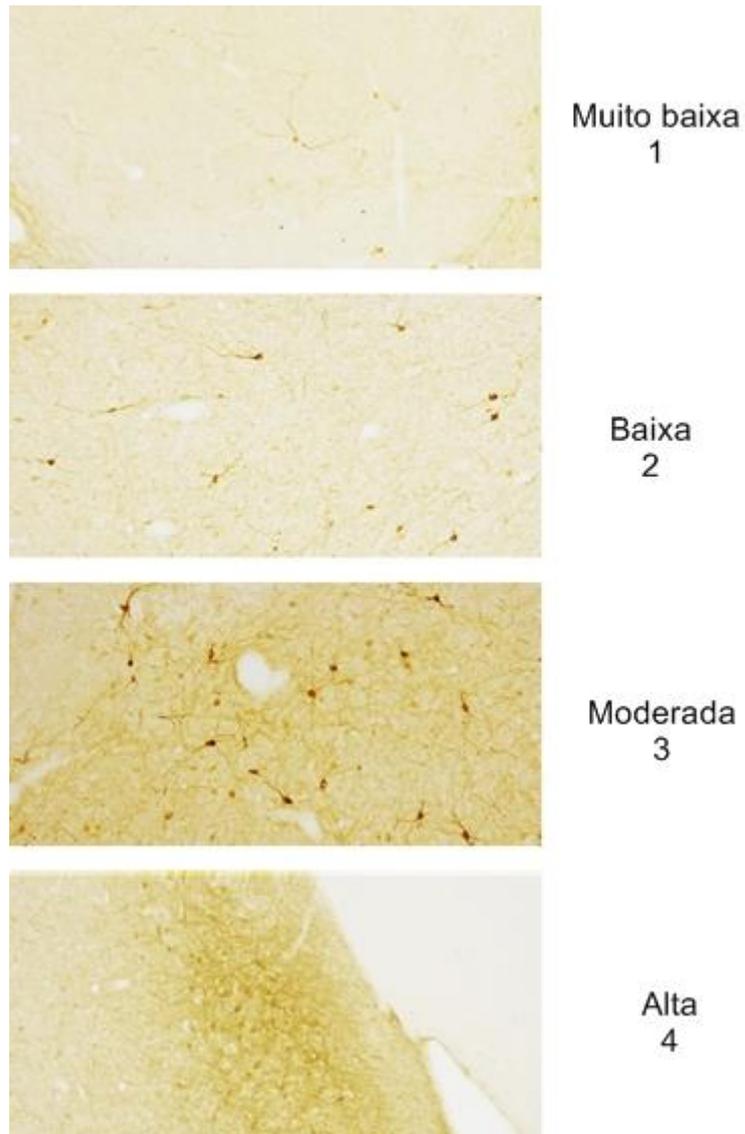


Figura 6 – Parâmetros utilizados para classificação subjetiva da densidade da marcação observada nos cortes obtidos nas imunistoquímicas para nNOS nesse trabalho.



Figura 7 – Parâmetros utilizados para classificação subjetiva da intensidade da marcação observada nos cortes obtidos nas imunistoquímicas para nNOS nesse trabalho.

4. Resultados

4.1. Imunoistoquímica para nNOS

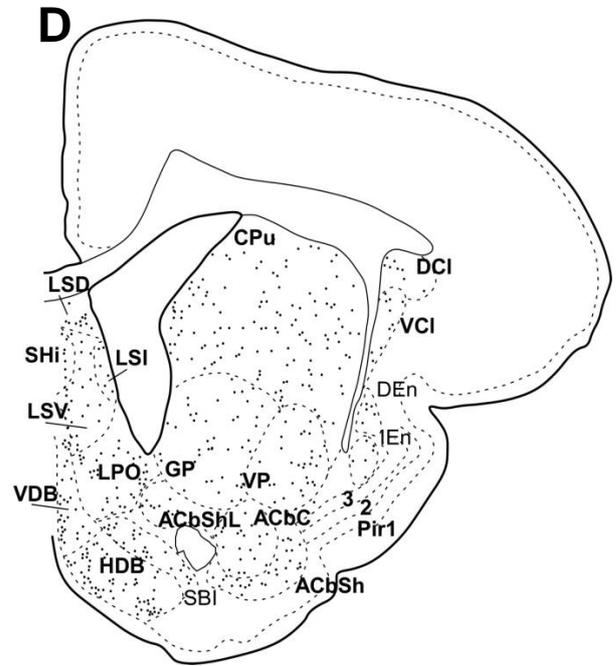
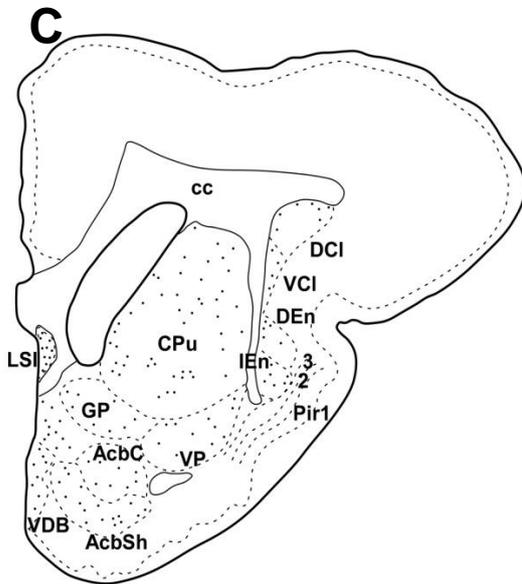
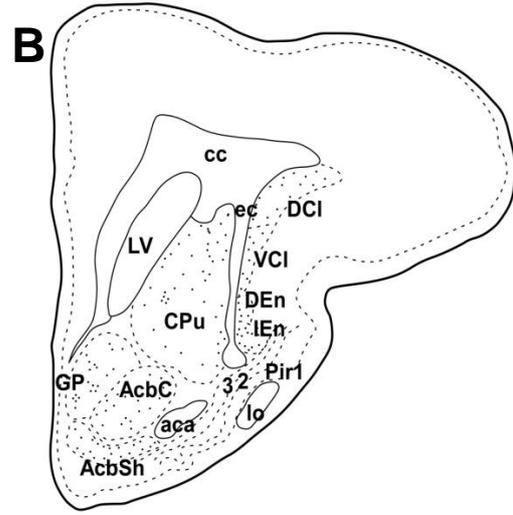
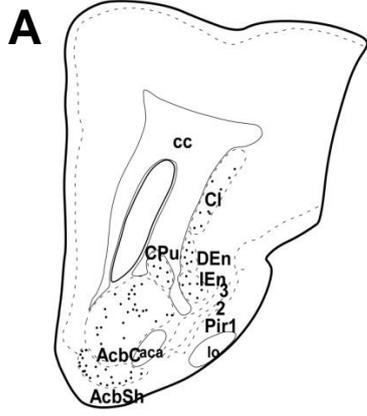
Utilizando imunoistoquímica para nNOS foram encontradas células imunorreativas ao longo de todo o telencéfalo. Os neurônios imunorreativos a nNOS (nNOS-IR) aparecem desde a região olfativa e estão presentes em todas as porções do telencéfalo.

Observamos um padrão de distribuição típico em todos os casos. Dada a complexidade da estrutura, os resultados serão apresentados por formações nucleares e estão compilados na Tabela 1.

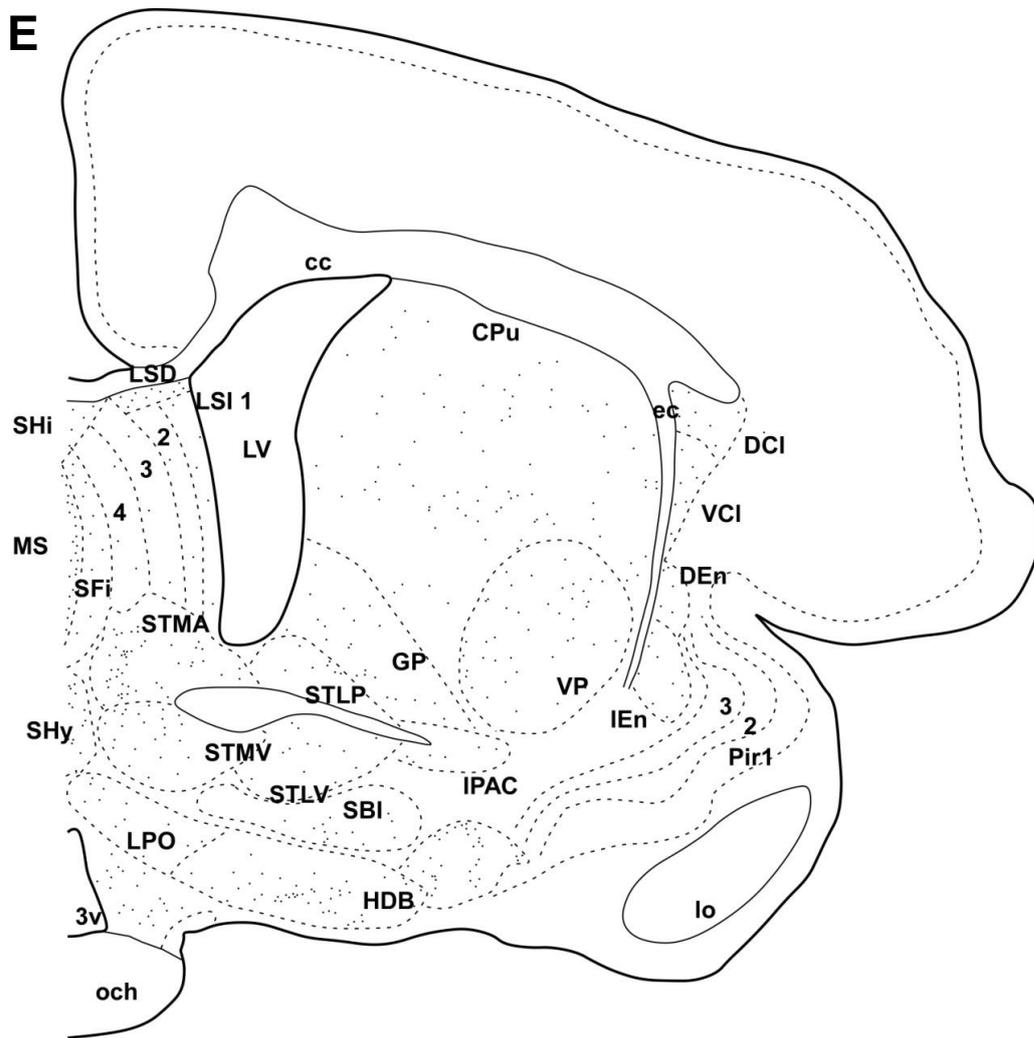
Tabela 1 – Intensidade e densidade da marcação na imunoistoquímica para nNOS nos núcleos estudados. Zero equivale a densidade mínima de neurônios, ou seja, nenhum neurônio e 4 equivale a densidade máxima encontrada entre os animais.

Núcleo	Intensidade da marcação	Densidade da marcação
Núcleo Endopirifome		
Divisão dorsal (DEn)	++	2,2
Divisão intermediária (IEn)	++	2,8
Divisão ventral (VEn)	++	2,8
Núcleo Accumbens		
Shell (AcbSh)	+++	3
Shell parte lateral (AcbShL)	+++	2,7
Core (AcbC)	+++	2
Corpo estriado		
Núcleo pálido ventral (VP)	++	1,5
Caudado-putamen (CPu)	+++	2,7
Globo pálido (GP)	+++	2,2
Substância Inominada (SBI)	+++	2,2
Núcleo Claustro		
Ventral (VCl)	++	2,2
Dorsal (DVI)	+++	2,3
Núcleo da Banda Diagonal de Broca		
Parte horizontal (HDB)	+	2,2
Parte vertical (VDB)	+	2
Amígdala		

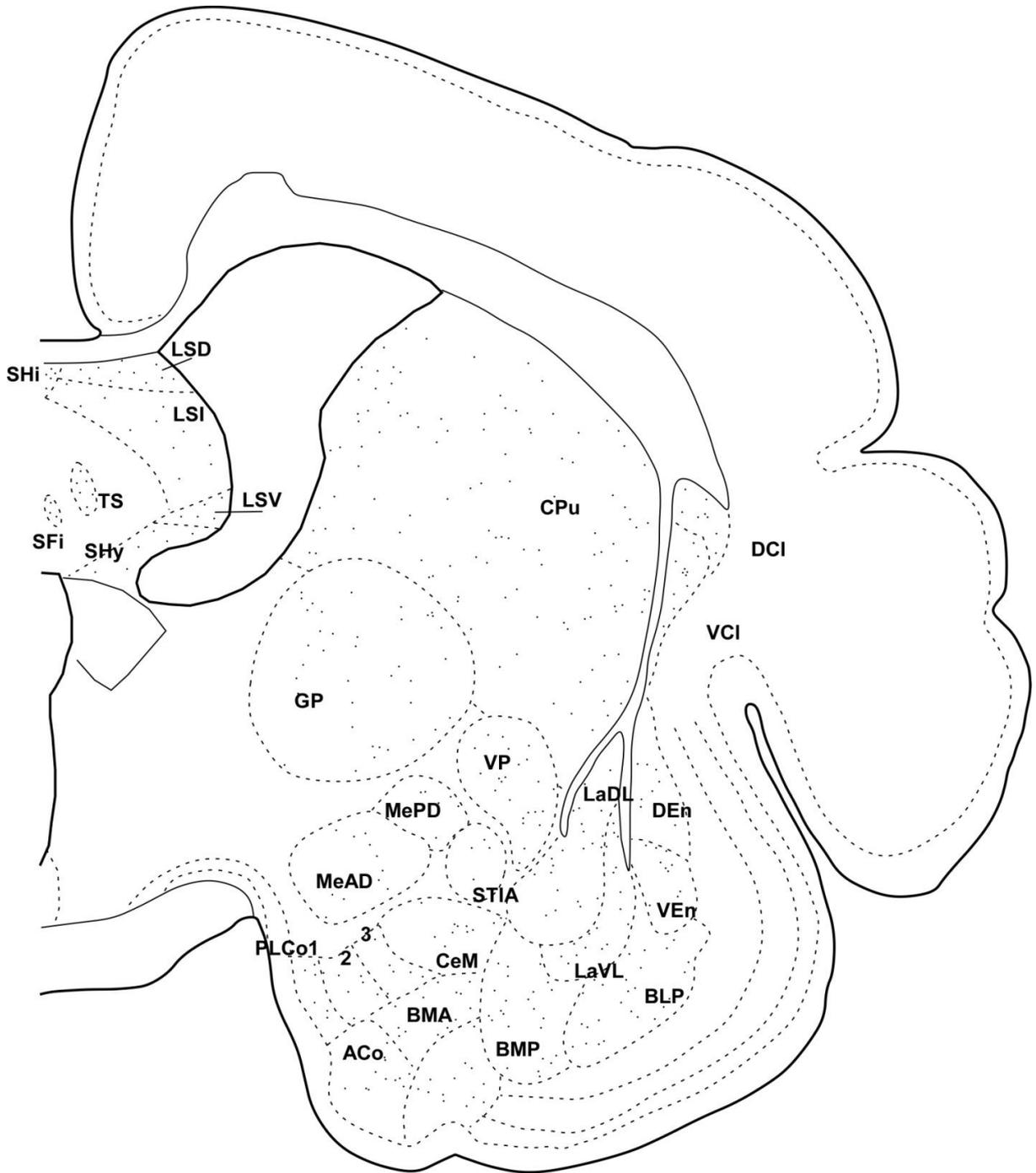
Núcleo central, parte lateral (CeL)	+	1,2
Núcleo central, parte capsular (CeC)	+	1,2
Núcleo central, divisão medial (CeM)	+	2
Núcleo medial, parte anterodorsal (MeAD)	++	3,7
Núcleo medial, parte anteroventral (MeAV)	++	3
Núcleo medial, parte posterodorsal (MePD)	++	3,7
Núcleo medial, parte posteroventral (MePV)	+++	3,8
Núcleo basomedial, parte anterior (BMA)	+	2
Núcleo basomedial, parte posterior (BMP)	+	2,2
Núcleo basolateral, parte ventral (BMV)	+	2
Núcleo basolateral, parte posterior (BLP)	+++	3
Núcleo basolateral, parte anterior (BLA)	++	2,7
Divisão lateral, parte dorsolateral (LaDL)	+++	2,8
Divisão lateral, parte ventrolateral (LaVL)	+++	3
Divisão lateral, parte ventromedial (LaVM)	++	2,7
Núcleo intersticial da estria terminal		
Divisão lateral, parte ventral (STLV)	++	3,7
Divisão lateral, parte posterior (STLP)	+++	2,2
Divisão lateral, parte intermediária (STLI)	++	3
Divisão lateral, parte justacapsular (STLJ)	+++	2
Divisão medial, parte anterolateral (STMAL)	++	1,7
Divisão medial, parte anteromedial (STMAM)	++	1,7
Divisão medial, parte ventral (STMV)	+++	1,7
Divisão posterior (STD)	+++	2,3
Hipocampo		
CA1	++	2
CA2	++	2,5
CA3	++	1,3
Giro denteado		
Camada molecular (MoDG)	+++	1,3
Camada granular (GrDG)	+	1,5
Camada polimorfa (PoDG)	+++	3,8
Núcleos septais		
Núcleo septal lateral, parte dorsal (LSD)	+	1,8
Núcleo septal lateral, parte ventral (LSV)	++	0,9
Núcleo septal lateral, parte intermediária (LSI)	++	2,8
Núcleo septal medial (MS)	+++	3,3
Núcleo septal triangular (TS)	+	1,8
Núcleo septal lambdoide (Ld)	++	1,7
Núcleo septal paralambdoide (PLd)	+	1,2
Núcleo septohipocampal (SHi)	+	0,9
Núcleo septohipotalâmico (SHy)	+	2,7
Núcleo septofimbrial (SFi)	+++	1,2

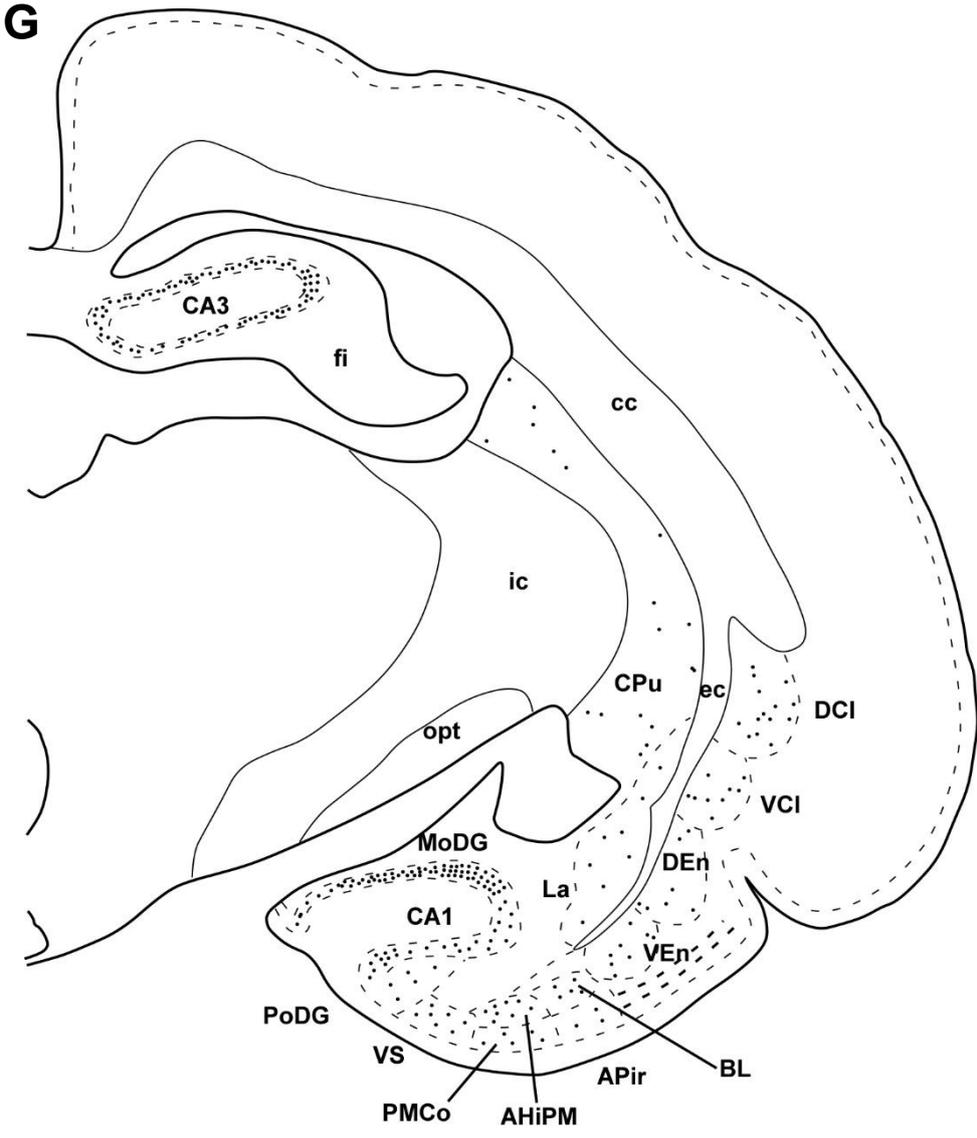


E



F





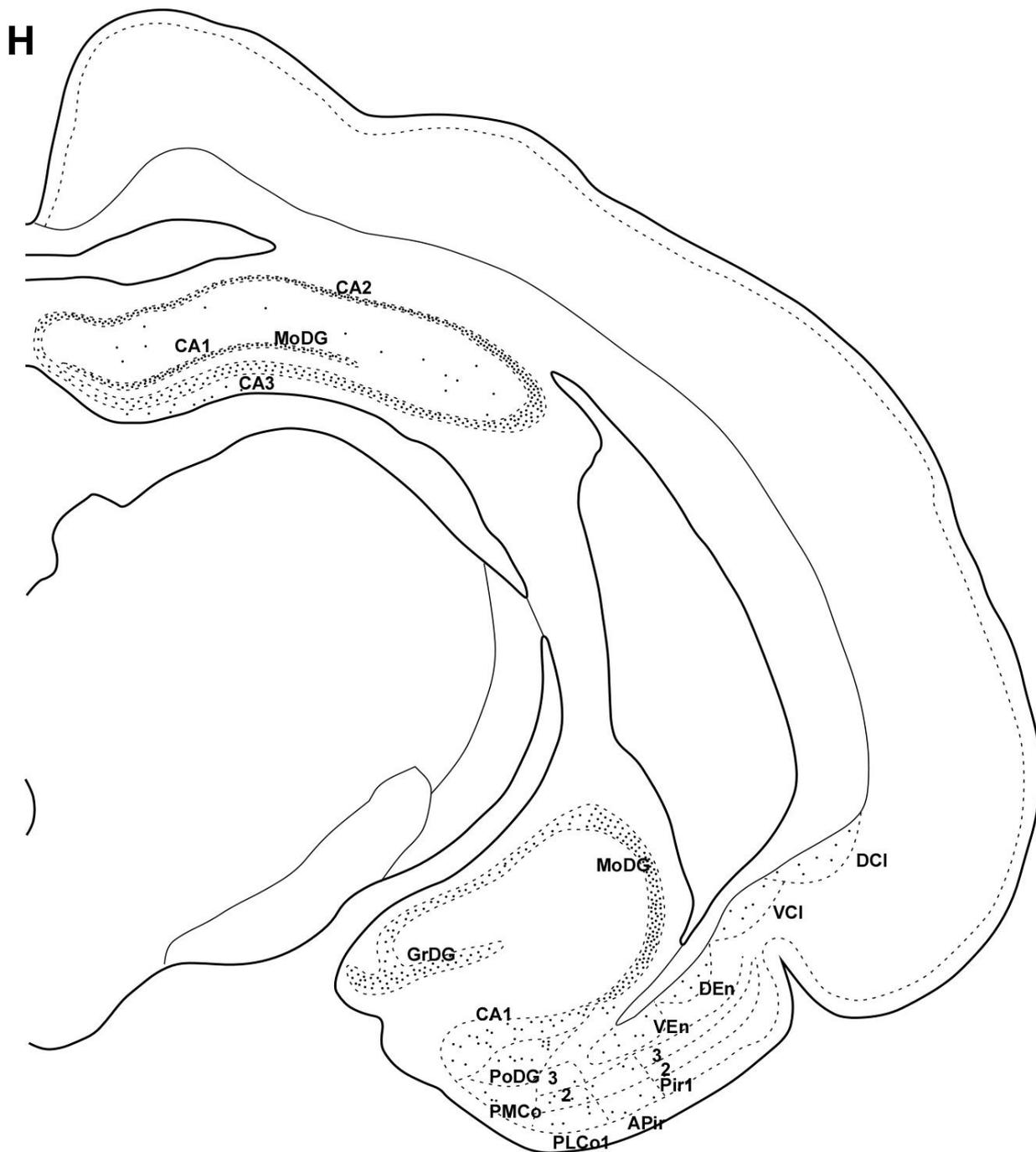


Figura 8 – Esquemas representativos das secções coronais da parte mais anterior do telencéfalo do mocó, construídas a partir das lâminas coradas pela método de Nissl. Os cortes distam entre si 1,26mm. Cada ponto equivale a um neurônio NNOS-IR obtido nas secções de imunistoquímica desse trabalho. Para o significado de cada sigla vide Tabela de abreviações.

4.1.1. Núcleo endopiriforme

O núcleo endopiriforme, tanto nas preparações obtidas pela coloração de Nissl quanto nas imunistoquímicas para nNOS, demonstra-se dividido em uma porção dorsal, uma porção ventral e uma intermediária. Nas 3 regiões a densidade se mostrou intermediária com médias de 2,2, 2,8 e 2,8 respectivamente. Na região dorsal (DEn) (Fig. 8 e 9D), encontram-se neurônios imunorreativos a nNOS (nNOS-IR) agrupados e multiformes, fortemente marcados. Na região ventral (VEn) foram encontrados neurônios multiformes também fortemente marcados, ao passo que na região intermediária (IEn) (Fig. 8 e 9E), encontram-se células nNOS-IR esparsas e piramidais, com grandes prolongamentos e fracamente marcadas.

4.1.2. Núcleo *accumbens*

A porção *shell* do núcleo *accumbens* (AcbSh) apresenta neurônios nNOS-IR fusiformes, de forte marcação e de densidade moderada (média 3) de neurônios nNOS-IR (Fig. 8A-D e 9F), possuindo em sua porção lateral neurônios fortemente marcados e densidade moderada dessas células (média 2,7). Enquanto a porção *core* apresenta neurônios triangulares de forte intensidade de marcação e baixa densidade (média 2) (Fig. 8A-D e 9C).

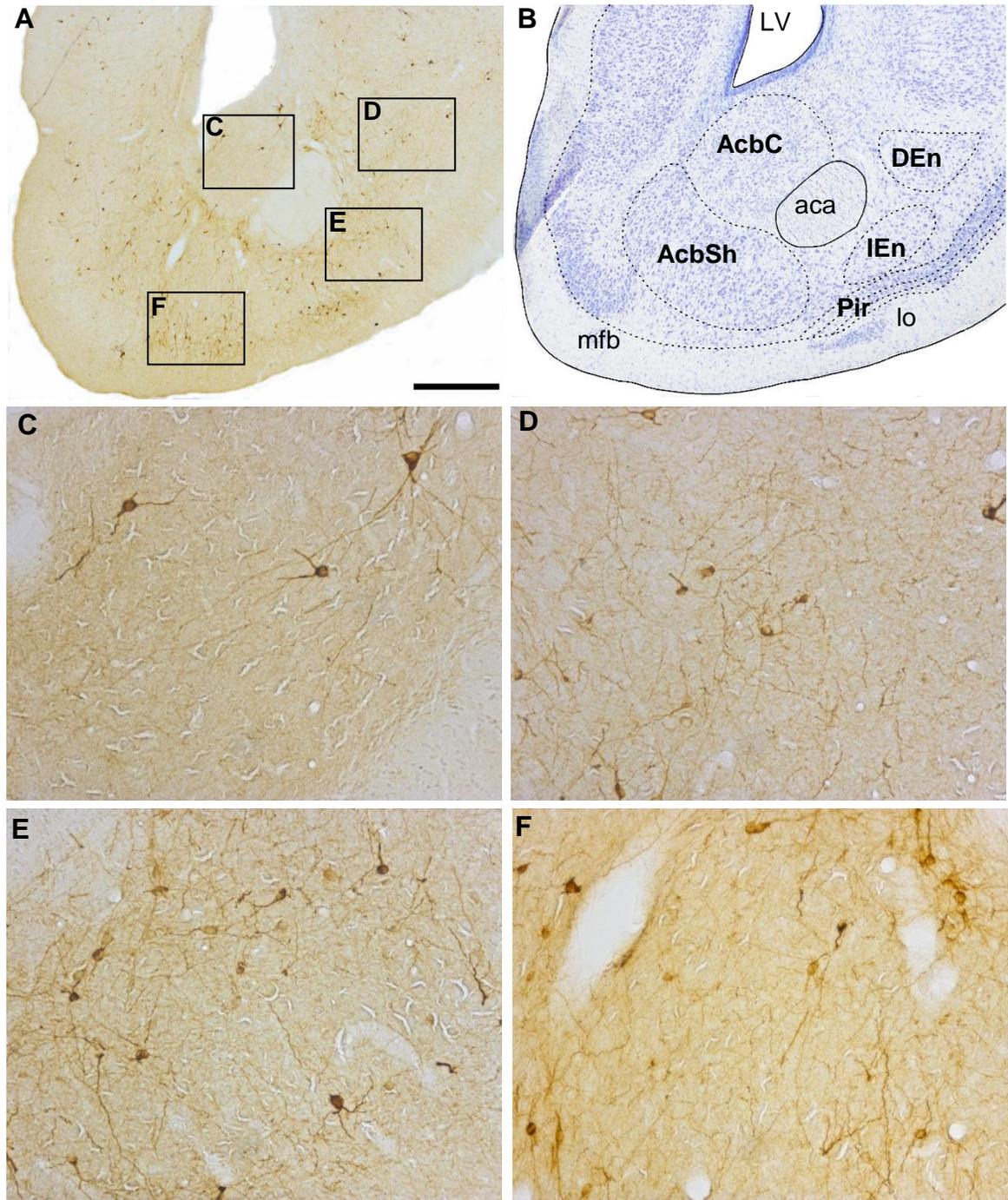


Figura 9 – Fotomicrografia demonstrando subdivisões do núcleo endopiriforme e núcleo *accumbens* do mocó segundo classificação de neurônios imunorreativos a nNOS. **A** Imunoistoquímica anti-nNOS, **B** Coloração de Nissl realizada em nível próximo da figura **A**, **C** Detalhe de células nNOS-IR do AcbC, **D** Detalhe de células nNOS-IR do DEn, **E** Detalhe das células nNOS-IR do IEn, **F** Detalhe das células nNOS-IR do AcbSh. Comprimento da barra: 500µm para **A** e **B**, e 100µm para **C**, **D**, **E** e **F**. **3v**: terceiro ventrículo, **aca**: comissura anterior, **DEn**: divisão dorsal do núcleo endopiriforme, **IEn**: divisão intermediária do núcleo endopiriforme, **mfb**: fascículo prosencefálico medial, **aca**: comissura anterior; **ACbC**: *core* do núcleo *accumbens*, **ACbSh**: *shell* do núcleo *accumbens*, **LV**: ventrículo lateral, **Pir**: córtex piriforme, **lo**: tracto olfatório lateral.

4.1.3. Núcleos pálido, caudado-putamen, claustro e substância inominada

Tratando-se da formação correspondente aos núcleos pálidos e núcleo caudado-putamen serão descritos junto aos núcleos claustro e substância inominada dada sua proximidade. O núcleo pálido ventral apresenta-se com densidade moderada (média 1,5) de nNOS-IR e fraca intensidade de marcação; os neurônios nNOS-IR nesse núcleo organizaram-se esparsamente pelo núcleo (Fig 8C-F e 10A). O globo pálido (Fig 10C) apresentou neurônios fortemente marcados e densidade intermediária (média 2,2). No núcleo caudado-putamen (CPu) encontram-se neurônios com densidade intermediária (média 2,7), porém mais alta que o pálido ventral. Estes neurônios estão distribuídos esparsamente, de maneira homogênea por todo o território do núcleo, possuindo longos prolongamentos dendríticos (Fig. 8A-G e 11D). A substância inominada (Fig 10D), por sua vez, apresenta neurônios fortemente marcados mas de densidade intermediária (média 2,2). O claustro ventral possui neurônios de intensidade e densidade de marcação intermediária (média 2,2) (Fig. 8 e 10A), ao passo que o claustro dorsal apresenta densidade semelhante (média 2,3) mas neurônios fortemente marcados (Fig. 8 e 11C). Toda a banda diagonal de Broca apresenta densidade intermediária (2,2 para a divisão horizontal e 2,3 para a divisão vertical), mas na divisão horizontal apresenta neurônios fracamente marcados (Fig. 8E-F e 10E), enquanto a divisão vertical apresenta uma intensidade de marcação moderada (Fig. 8D-E).

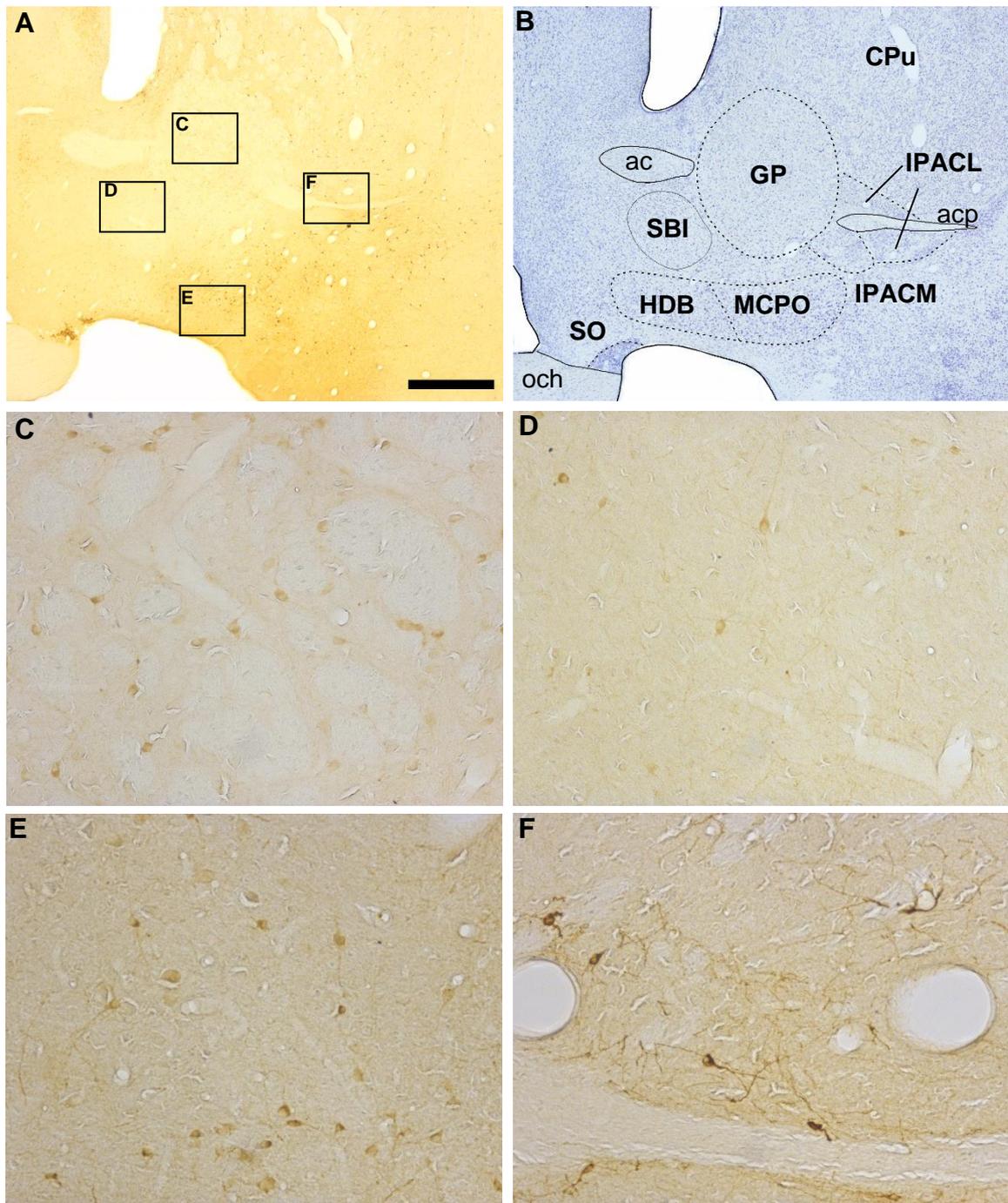


Figura 10 – Fotomicrografia do núcleo pálido ventral, núcleo caudado-putamen, núcleo claustró e substância inominada do mocó. **A** Secção de imunistoquímica para nNOS da região da substância inominada e núcleo pálido ventral ao nível do quiasma óptico em detalhe, **B** Secção de Nissl com delimitações das áreas apresentadas na figura **A**, **C** Fotomicrografia do GP, **D** Fotomicrografia dos neurônios da SBI, **E** Fotomicrografia dos neurônios da HDB, **F** Fotomicrografia dos neurônios da IPACL. Comprimento da barra: 500µm para **A** e **B**, 50µm para **C**, **D**, **E** e **F**. **ac**: comissura anterior, **acp**: comissura anterior, parte posterior, **SBI**: substância inominada, **VP**: núcleo pálido ventral, **HDB**:

parte horizontal da banda diagonal de Broca, **CPu**: núcleo caudado-putamen, **och**: quiasma óptico, **IPACL**: núcleo intersticial da borda posterior da comissura anterior, parte lateral, **IPACM**: núcleo intersticial da borda posterior da comissura anterior, parte medial, **MCPO**: núcleo pré-óptico magnocelular, **HDB**: banda diagonal de Broca, parte horizontal, **SO**: núcleo supra-óptico.

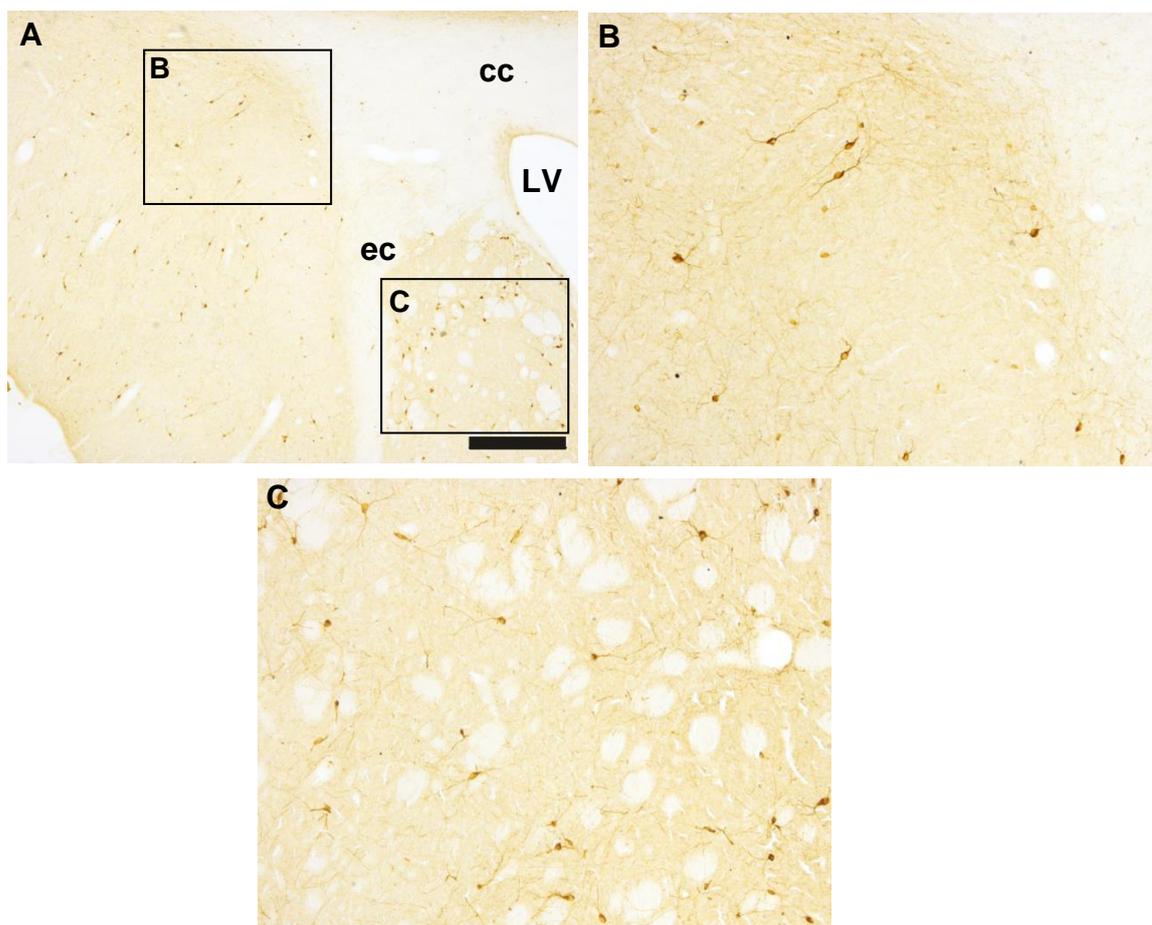


Figura 11 – Fotomicrografias de células imunomarcadas nNOS do núcleo caudado-putamen e claustrum. **A** Secção de imunohistoquímica do núcleo caudado-putamen e claustrum, **B** Detalhe dos neurônios marcados para nNOS do núcleo claustrum, **C** Detalhe dos neurônios imunorreativos a nNOS do núcleo caudado-putamen. Barra: 500µm para **A** e 125µm para **B** e **C**. **cc**: corpo caloso, **ec**: cápsula externa, **LV**: ventrículo lateral.

4.1.4. Amígdala

A amígdala apresentou neurônios nNOS-IR em quase todos os seus núcleos, revelando uma alta complexidade. As células nNOS-IR da divisão lateral do núcleo central da amígdala apresentaram-se de intensidade fraca e muito baixa densidade de marcação (média 1,2); a divisão capsular da divisão lateral do núcleo central da

amígdala também se apresentou com células nNOS-IR de intensidade fraca e densidade muito baixa (média 1,2); e a divisão medial do núcleo central da amígdala, de intensidade fraca e densidade baixa (média 2) (Fig. 8F e 12A). O núcleo medial da amígdala apresentou na divisão anterodorsal marcação de intensidade intermediária e alta densidade (média 3,7), na divisão anteroventral, de intensidade e densidade moderada (média 3), e nas divisões posterodorsal e posteroventral de alta densidade (média 3,7 e 3,8 respectivamente) e intensidade de marcação moderada (Fig. 8F, 12A, 12D e 12E). O núcleo basomedial da amígdala apresentou marcação com intensidade moderada e densidade baixa (médias 2 e 2,2 respectivamente) nas suas divisões anterior e posterior (Fig. 8F, 12A, 12D e 12G). Já o núcleo basolateral, na divisão posterior apresentou-se de intensidade forte e densidade intermediária (média 3), na divisão anterior de intensidade e densidade moderada (média 2,7) e na divisão ventral de fraca intensidade e densidade baixa (média 2) (Fig. 8F, 12A e 12D). Por fim, a porção lateral da amígdala apresentou-se de intensidade forte e densidade intermediária (médias 2,8 e 3, respectivamente) nas divisões dorsolateral e ventrolateral e de intensidade moderada e densidade intermediária (média 2,7) na divisão ventromedial (Fig. 8F, 12A e 12D). Os núcleos anterior da amígdala, corticais da amígdala e amígdalo-hipocampal não apresentaram nNOS-IR.

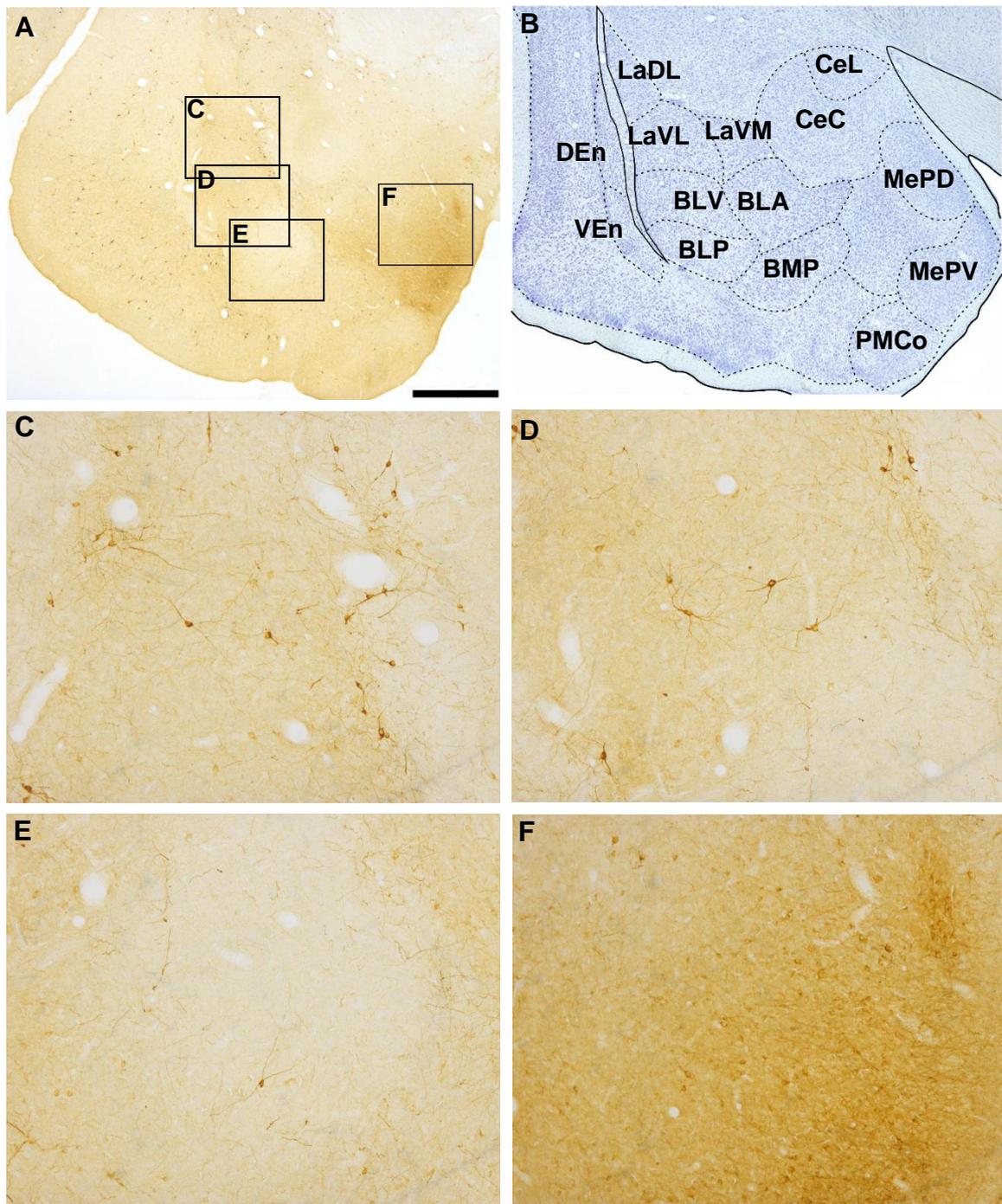


Figura 12 – Fotomicrografias dos principais grupamentos da amígdala do mocó num nível médio. **A** Fotomicrografia da amígdala do mocó, evidenciados pela imunistoquímica anti-nNOS, **B** Fotomicrografia da amígdala do mocó, com delimitações dos núcleos nessa secção, **C** Fotomicrografia de neurônios nNOS-IR da LaVL, **D** Fotomicrografia dos neurônios da BLP, **E** Fotomicrografia dos neurônios do BLV, **F** Fotomicrografia dos neurônios dos MePD e MePV. Comprimento da barra: 1000µm para **A** e **B**, 100µm para as demais. **BLA**: núcleo basolateral da amígdala, **CeL**: núcleo central da amígdala, divisão lateral, **CeM**: núcleo central da amígdala, divisão medial, **LaDL**: núcleo lateral da amígdala, divisão dorsolateral, **MePV**: núcleo medial da amígdala, divisão posteroventral, **MePV**: núcleo medial da amígdala, divisão posteroventral, **BMP**: núcleo

basolateral da amígdala, parte posterior, **BLV**: núcleo basolateral da amígdala, parte ventral, **BLP**: núcleo basolateral da amígdala, parte posterior, **LaVL**: parte lateral da amígdala, divisão ventrolateral, **LaVM**: parte lateral da amígdala, divisão ventromedial, **LaDL**: parte lateral da amígdala, divisão dorsolateral, **PMCo**: núcleo amigdalóide cortical posteromedial, **DEn**: núcleo endopiriforme, parte dorsal, **IEn**: núcleo endopiriforme, parte intermediária.

4.1.5. Núcleo intersticial da estria terminal

Segundo o atlas de Paxinos e Watson (2007) do encéfalo de rato e o atlas de Franklin e Paxinos (2008) de camundongo, o núcleo da estria terminal é um complexo formado pelas divisões lateral, medial e posterior. A divisão lateral está subdividida em divisão ventral, posterior, intermediária e justacapsular; a divisão medial em divisão anterolateral, anteromedial e divisão ventral; e a divisão posterior não é subdividida. Estabelecidas comparações que comprovaram similaridades entre os encéfalos desses roedores, a estria terminal do mocó foi igualmente dividida dessa forma, respeitando os limites e referenciais dos atlas, tais como comissura anterior, cápsula interna e o terceiro ventrículo.

Na divisão lateral do núcleo intersticial da estria terminal de mocó os neurônios nNOS-IR da divisão ventral apresentaram-se de intensidade moderada e alta densidade (média 3,7), na divisão posterior (Fig. 13C) de intensidade forte e densidade intermediária (média 2,2), divisão intermediária de intensidade e densidade moderada (média 3), e na divisão justacapsular, de forte intensidade e baixa densidade (média 2). Na divisão posterior observaram-se células de intensidade forte e densidade intermediária (média 2,3). A divisão medial, por sua vez, possui neurônios nNOS-IR na divisão anterior (Fig. 13C), de intensidade moderada e de baixa densidade (médias 1,7), nas subdivisões anteromedial e anterolateral, e a divisão ventral (Fig. 13E), de intensidade fraca e de baixa densidade (média 1,7) (Fig. 8E e 13A).

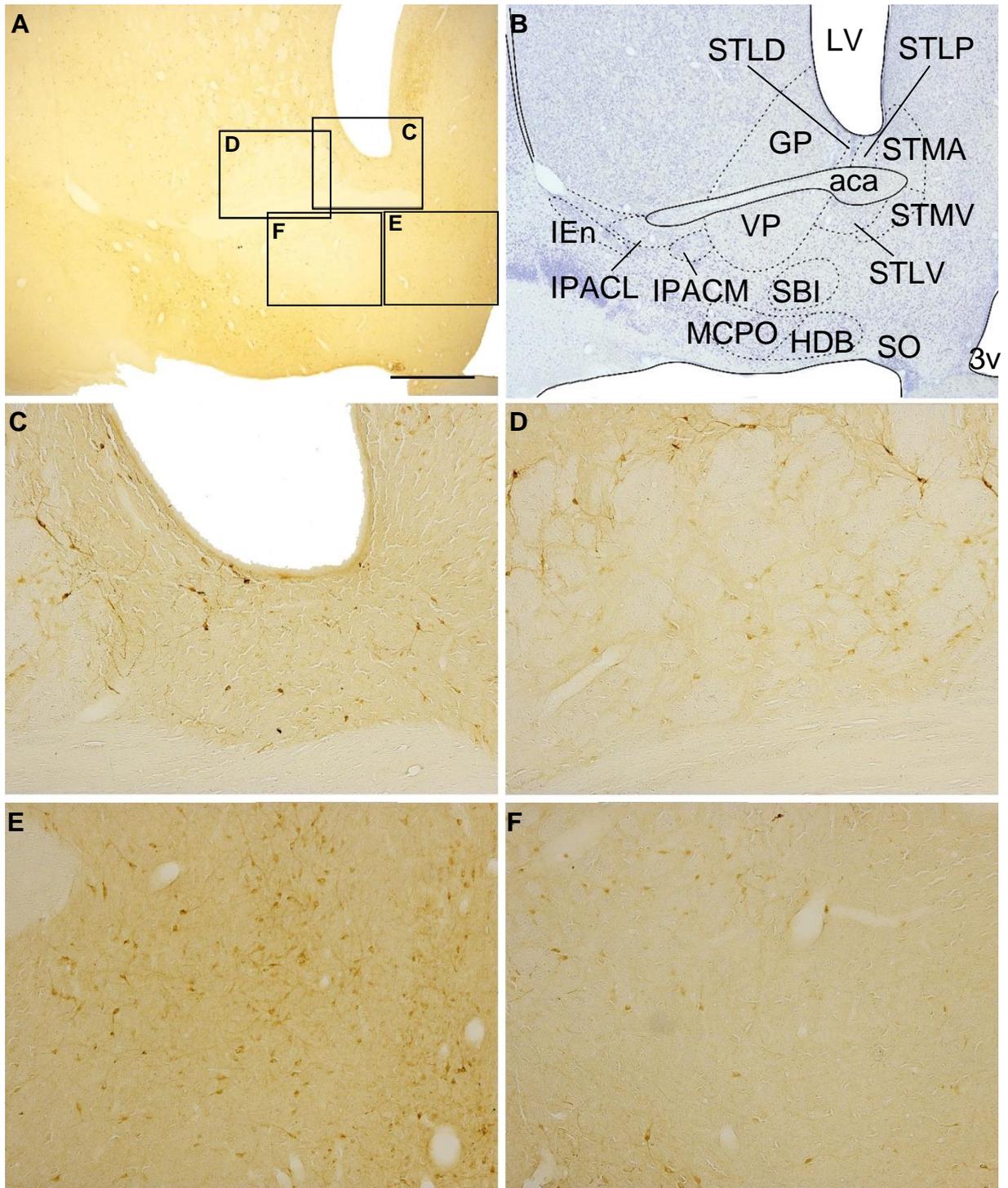


Figura 13 – Fotomicrografia do núcleo intersticial da estria terminal do mocó. **A** Fotomicrografia da região do núcleo intersticial da estria terminal do mocó, **B** Fotomicrografia da região do núcleo intersticial da estria termina do mocó coradas pelo método de Nissl, **C** Detalhe das células presentes na STLP e STMA, **D** Detalhe dos neurônios do GP, **E** Detalhe dos neurônios do STMV, **F** Detalhe dos neurônios do VP. Comprimento da barra: 1000µm para **A** e **B**, 200µm para **C**, **D**, **E** e **F**. **STD**: porção dorsal do núcleo intersticial da estria terminal, **VP**: núcleo pálido ventral, **GP**: núcleo globo pálido, **HDB**: banda diagonal de Broca, parte horizontal, **STLV**: núcleo intersticial da estria terminal, divisão lateral, parte ventral, **STMV**: núcleo intersticial da estria terminal, divisão medial, parte ventral,

STMAL: núcleo intersticial da estria terminal, divisão medial, parte anterolateral, **STMAL**: núcleo intersticial da estria terminal, divisão medial, parte anteromedial, **STLI**: núcleo intersticial da estria terminal, divisão lateral, parte intermediária, **STLP**: núcleo intersticial da estria terminal, parte lateral, divisão posterior, **STLJ**: núcleo intersticial da estria terminal, parte lateral, divisão justacapsular, **IPACL**: núcleo intersticial da borda posterior da comissura anterior, parte lateral, **IPACM**: núcleo intersticial da borda posterior da comissura anterior, parte medial, **SO**: núcleo supraóptico, **aca**: comissura anterior, parte anterior, **acp**: comissura anterior, parte posterior, **och**: quiasma óptico, **ic**: cápsula interna, **LV**: ventrículo lateral.

4.1.6. Hipocampo e giro denteado

A região CA1 do mocó apresenta-se de baixa densidade (média 2) e moderada intensidade de marcação, a região CA2 do mocó apresenta-se de baixa densidade e moderada intensidade (média 2,5) de marcação e a região CA3 de muito baixa densidade (média 1,3) e moderada intensidade de marcação (Fig. 8G-H, 14A e 14C). Já o giro denteado apresenta-se intensamente marcado e alta densidade (média 3,8) de marcação na região polimorfa, na região molecular apresenta alta intensidade de marcação, porém de muito baixa densidade (média 1,3), e na área granular, fracamente marcado e também muito baixa densidade (média 1,5) de marcação (Fig. 8G-H, 14A e 14D).

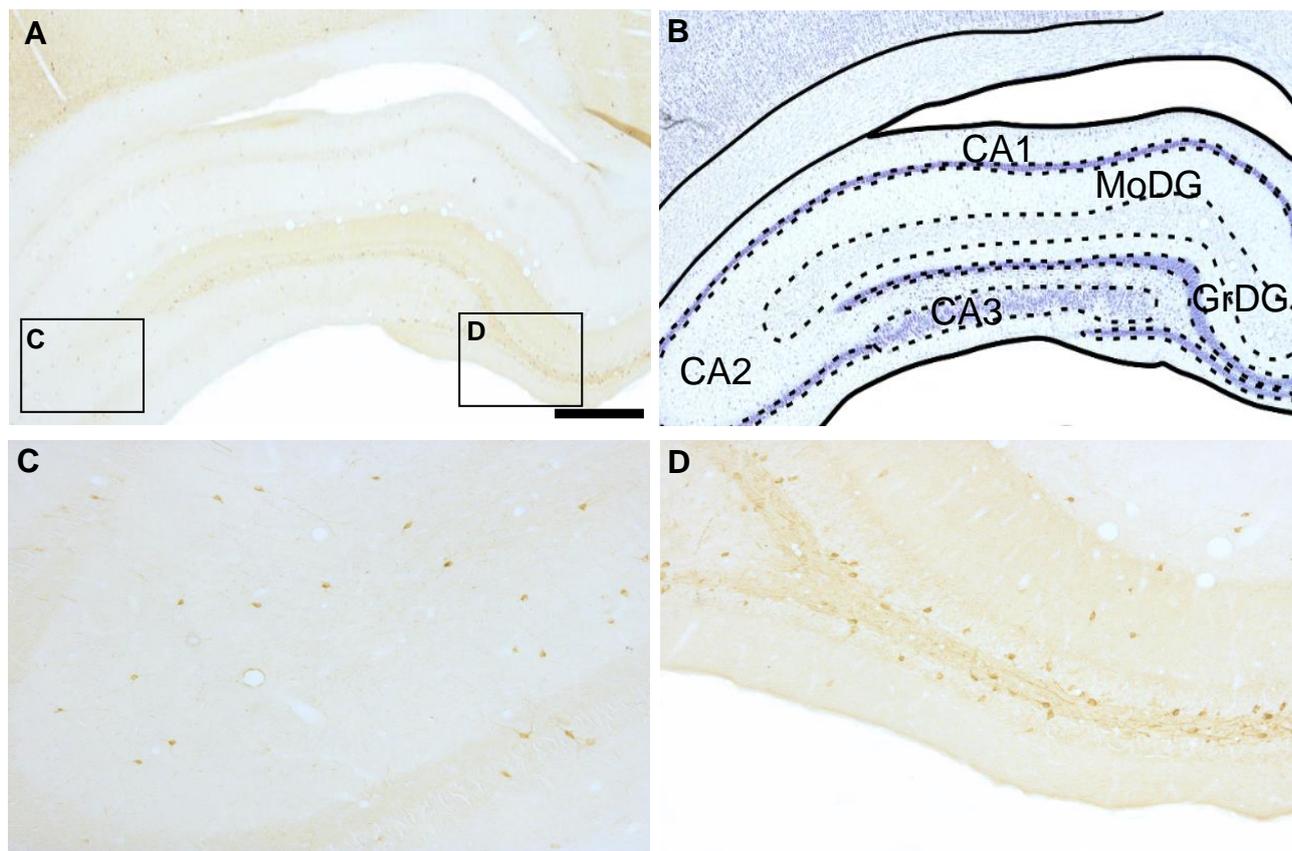


Figura 14 – Fotomicrografia do hipocampo e giro denteado. **A** Fotomicrografia da região do hipocampo do mocó, corada por imunistoquímica para nNOS, **B** Fotomicrografia corada pelo método de Nissl da região do hipocampo do mocó, **C** Fotomicrografia dos neurônios de CA3 e MoDG, **D** Fotomicrografia dos neurônios da GrDG. Barra: 1000µm para 15A e 15B, 5000µm para 15C e 15D. **CA1**: área CA1 do hipocampo, **CA2**: área CA2 do hipocampo, **CA3**: área CA3 do hipocampo, **MoDG**: camada molecular do giro denteado, **GrDG**: camada granular do giro denteado.

4.1.7. Núcleos septais

Nesse trabalho, puderam-se dividir os núcleos septais nas tradicionais divisões e subdivisões descritas em ratos, a saber: núcleo septal lateral, e suas subdivisões dorsal, ventral e intermediária, núcleo septal medial, núcleo septal lambdoide, núcleo septal paralambdoide, núcleo septal triangular, núcleo septofimbrial, núcleo septohicampal e núcleo septohipotálamico. O LSD apresentou-se de baixa densidade (média 1,8) de nNOS-IR e fraca intensidade de marcação(Fig. 8E e F, 15A e C), O LSI de intensidade moderada e de moderada densidade (média 2,8) (Fig. 8E e F, 15A e C), MS forte intensidade e moderada densidade (média 3,3)

nNOS-IR (Fig. 8E, 15A e D), LSV de muito baixa densidade (média 0,9) e de moderada intensidade de marcação (Fig. 8F, 15A e E), SHy de moderada densidade (média 2,7) e fraca intensidade de marcação (Fig. 8E e F, 15A e E), SFi apresentou-se de baixa densidade (média 1,2) e forte intensidade de marcação, STL de forte intensidade e moderada densidade (média 2,7) de nNOS-IR, SHi apresentou-se de muito baixa densidade (média 0,9) e de fraca intensidade de marcação, o Ld, por sua vez, apresentou-se de moderada intensidade e baixa densidade (média 1,8), o PLd de fraca intensidade e baixa densidade (média 1,2) e TS de fraca intensidade e baixa densidade (média 1,8).

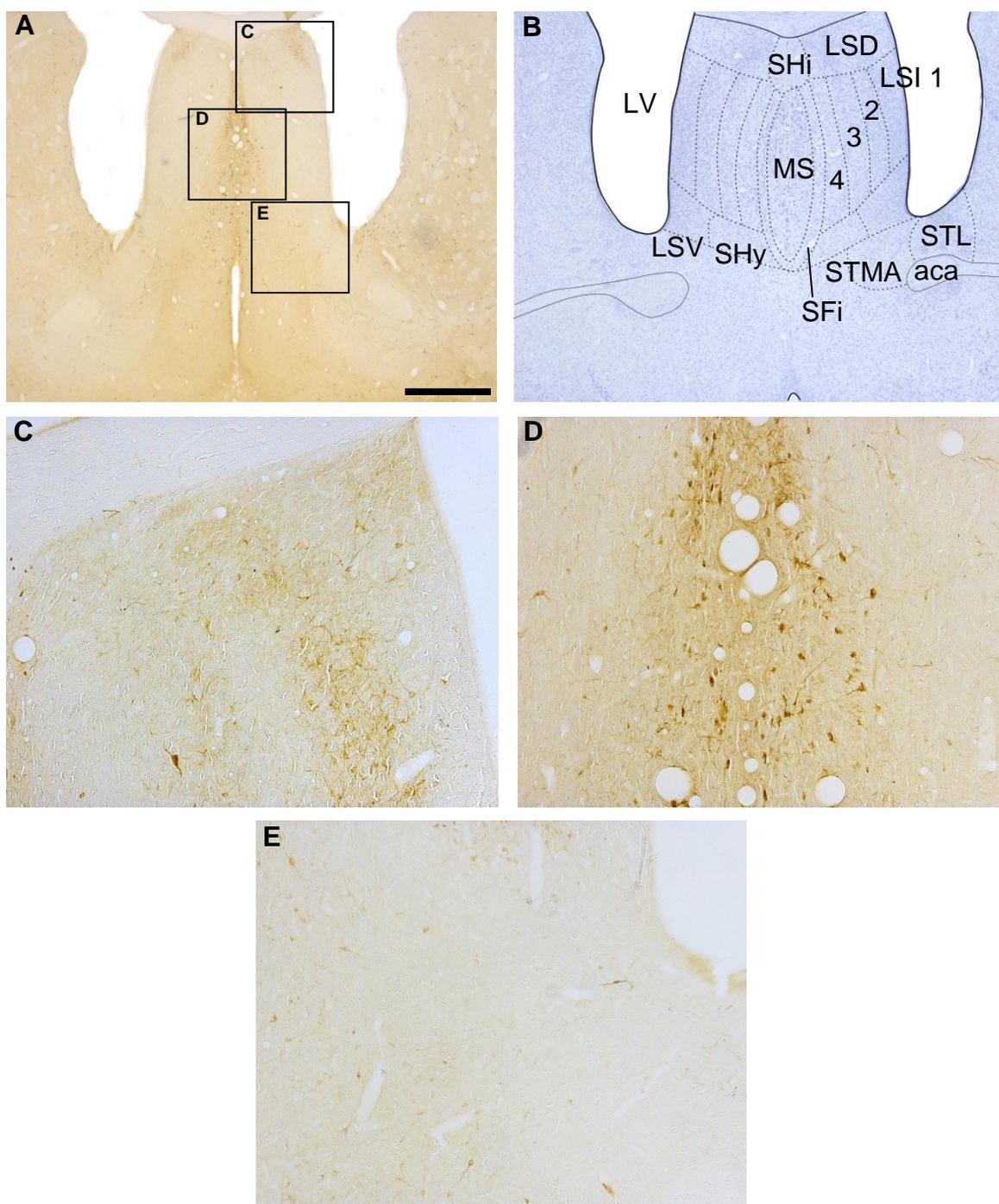


Figura 15 – Fotomicrografia dos núcleos septais. **A** Secção coronal de imunistoquímica para nNOS-IR ao nível dos núcleos septais, **B** Secção coronal corada pelo método de Nissl num nível aproximado ao de **A**, **C** Detalhe dos neurônios dos LSD e LSI, inferiormente, **D** Detalhe dos neurônios do MS, **E** Detalhe dos neurônios do SHy e LSV. Comprimento da barra: 1000µm para A e B, 2500µm para C, D e E.

4.2. Histoquímica para NADPHd

A histoquímica para NADPHd marcou neurônios também por todo o encéfalo do animal. A reação foi evidenciada por uma coloração azul-arroxeadada que variou de intensidade ao longo das regiões estudadas. Essa marcação mostrou-se mais variável entre os animais que a imunistoquímica e foi também utilizada como base para a discussão dos resultados. Houve casos em que se pode delimitar facilmente corpos celulares, atestando marcação e reatividade a NADPH, e outros casos em que se formou uma coloração esparsa, onde não se distinguem corpos celulares, porém diferente do *background* do tecido.

A marcação se manteve similar aos resultados obtidos na imunistoquímica na maioria das áreas estudadas. Houve diferenças no núcleo accumbens, onde se encontraram células de forte intensidade de marcação e alta densidade no AcbSh, fraca intensidade e densidade moderada de marcação no AcbShL e no AcbC, marcação de fraca intensidade e baixa densidade (Fig. 16A). O núcleo intersticial da estria terminal, por sua vez, em todas as suas divisões, apresentou-se como fraca intensidade e baixa densidade de marcação (Fig. 16D-E). E o hipocampo nas CA1 e CA3 apresentou células fracamente marcadas e de muito baixa densidade enquanto que na região CA2 foram encontradas células fracamente marcadas e de baixa densidade. O giro denteado, na parte granular, apresentou-se como fracamente marcado e de moderada densidade e na parte molecular, como fracamente marcado e de baixa densidade. Nas demais áreas analisadas, houve muita semelhança entre os critérios analisados nas duas marcações realizadas.

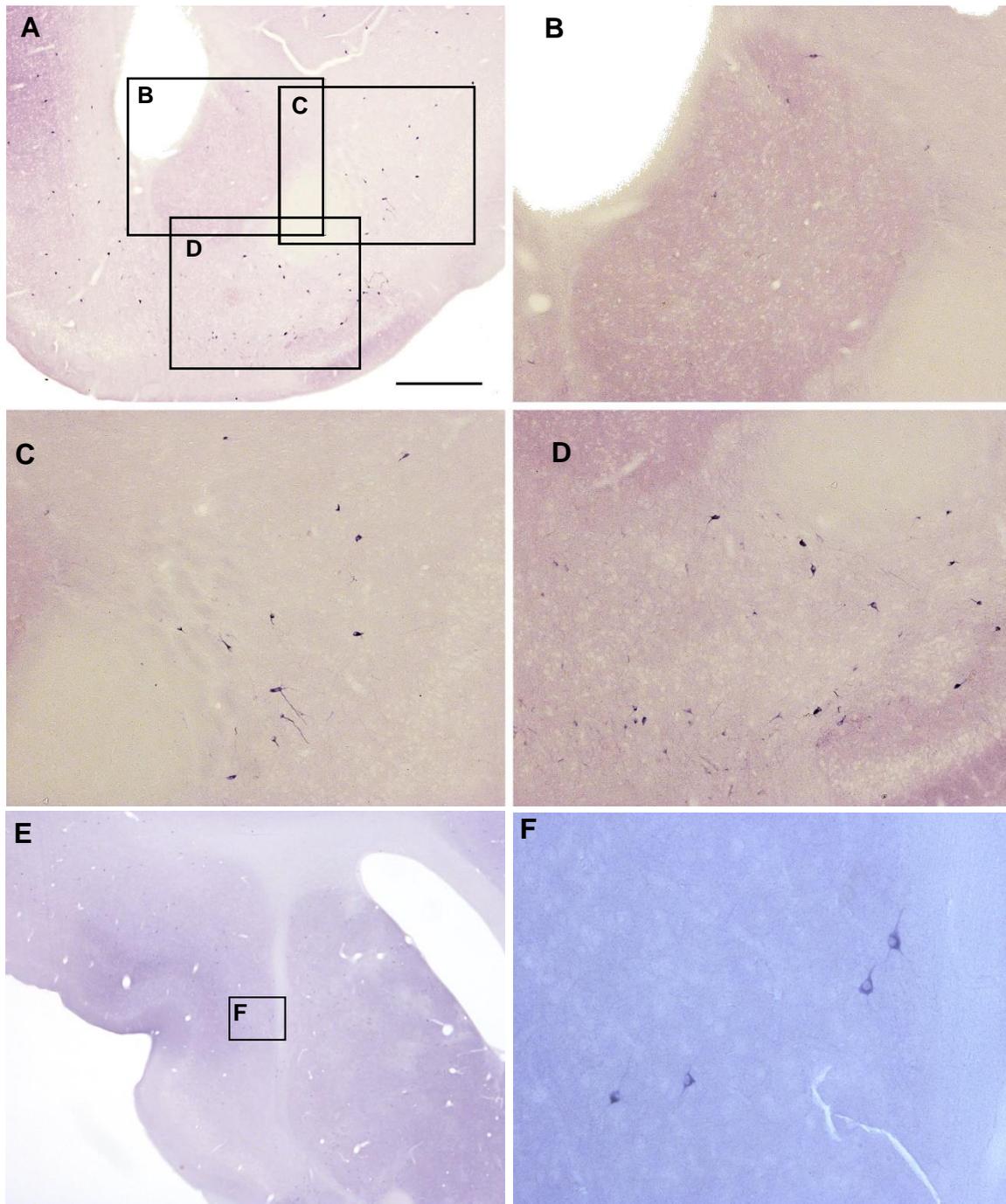


Figura 16 – Secções de histoquímica para NADPHd ao nível do núcleo *accumbens*. **A** Fotomicrografia ao nível do núcleo *accumbens*. **B** Detalhe da marcação presente no AcbC. **C** Detalhe dos neurônios do IEn. **D** Detalhe dos neurônios do AcbSh. Barra: 1000µm para A; 250µm para B, C e D; 500µm para E e 50µm para F.

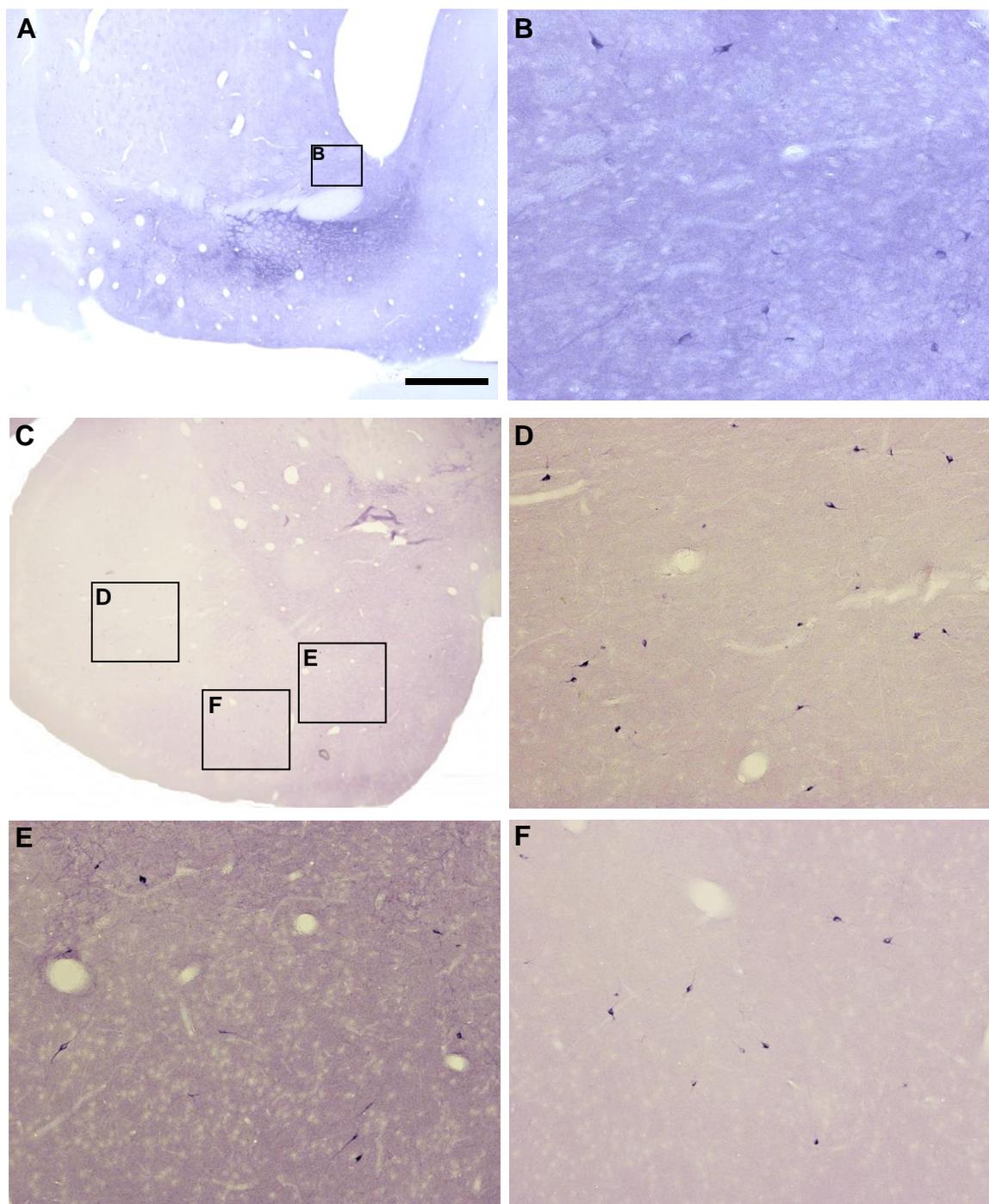


Figura 17 – Secções de histoquímica para NADPHd ao nível da estria terminal e amígdala. **A** Fotomicrografia ao nível da estria terminal e comissura anterior. **B** Detalhe dos neurônios presentes na STD. **C** Fotomicrografia ao nível da amígdala. **D** Detalhe dos neurônios da BLP. **E** Detalhe dos neurônios da BMP. **F** Detalhe dos neurônios da BLA. Tamanho da barra: 1000 μ m para A, 500 μ m para B, 250 μ m para C, 100 μ m para D, E e F.

5. Discussão

A imunoistoquímica demonstrou que a nNOS está presente em neurônios por todo o compartimento subcortical telencefálico do macaco de forma heterogênea e com intensidade de marcação diferentes. A NADPHd veio a confirmar a maioria dos achados utilizando imunoistoquímica com algumas diferenças presentes em algumas das formações estudadas.

A histoquímica para NADPHd é um método que tem por base a redução de um substrato, o azul de tetrazólio, um substrato incolor e solúvel, a formazan, um produto insolúvel. Essa reação é catalisada por uma diaforase, enzima que utiliza cofatores de uma reação desidrogenase para reduzir um corante na presença de β – NADP (SCHERER-SINGLER et al., 1983). O fato do corante em questão ser solúvel facilita sua entrada na célula, ao passo que, após a reação de desidrogenação e consequente formação de um produto insolúvel, a molécula fica retida na célula. Essa reação é evidenciada por uma coloração azul arroxeada no tecido, que está relacionada a concentração e atividade de NADPHd no tecido. A reação histoquímica é dependente da NADPHd endógena e marca sua atividade sempre que uma desidrogenase sintetiza NADPH. A evidência da atividade da NADPHd endógena trata-se de uma reação secundária, que, na presença de NADPH, reduz um corante. A técnica fornece uma imagem que permite delinear corpos celulares, árvores dendríticas e axônios, e pode ser amplamente empregada em estudos morfológicos e histoquímicos (SCHERER-SINGLER et al., 1983).

A identidade dessa enzima ainda permanece oculta, embora haja estudos que apontem que seria uma NOS, dadas semelhanças no peso molecular, localização e coexistência de citrulina em neurônios marcados por NADPHd (HOPE et al., 1991; VINCENT et al., 1983). Em tecido cerebral, a nNOS também foi inibida pela presença do substrato da NADPHd, o azul de tetrazólio (HOPE et al., 1991). Assim, a nNOS pode sintetizar NO de maneira dependente de NADPH em resposta a mudanças nas concentrações de cálcio intracelular livre por desamidação da arginina a citrulina (KNOWLES et al., 1989). Há ainda evidências de que a distribuição de nNOS e NADPHd é idêntica em tecidos cerebrais e também em tecidos periféricos, incluindo plexo mioentérico do intestino delgado e medula da glândula adrenal (DAWSON et al., 1991), inferindo NADPH como co-fator na síntese de NO e realçando a importância da técnica NADPHd no estudo da distribuição de

NO. A NADPHd, por sua vez, após fixação com aldeído, é mais específica para o NO que para outros neurotransmissores (HOPE et al., 1991).

Levando em consideração os argumentos acima, podemos então concluir que a histoquímica da NADPHd fornece um marcador específico para neurônios que produzem NO, demonstrando sua atividade no momento da fixação do tecido. De maneira geral, a histoquímica para NADPHd apresentou-se semelhante à imunoistoquímica para nNOS. Infere-se que as diferenças entre as marcações, quanto à densidade e intensidade, foram resultado de diferenças nos níveis de atividade NADPHd, no núcleo *accumbens*, na amígdala, na estria terminal e no hipocampo, no momento da fixação do tecido, refletindo diferenças de estado comportamental e fisiológico do animal.

5.1. NO como neurotransmissor e o telencéfalo subcortical de macaco

O NO mudou muitos conceitos da transmissão sináptica clássica. Como substância gasosa, pode reagir com múltiplos alvos, mas, basicamente, o segundo mensageiro do NO é a sGC. Ainda como uma de suas particularidades, os múltiplos sítios para doadores de elétrons da nNOS também fogem as definições clássicas das vias oxidativas (ZHOU; ZHU, 2009). No sistema nervoso entérico, a síntese em níveis fisiológicos de NO mantém a excitabilidade das células musculares lisas do intestino, onde são encontrados altos níveis de nNOS (BARAÑANO; FERRIS; SNYDER, 2001).

As células nNOS-IR aparecem em todo o encéfalo, possuem processos dendríticos que se ramificam excessivamente e possuem diversos formatos, o que sugere um importante papel regulador do NO, afetando as vias de diversos outros neurotransmissores. O NO e a nNOS têm sido localizados em estruturas encefálicas em um grande número de espécies de mamíferos e co-localizados com acetilcolina no tronco encefálico e prosencéfalo basal (BREDT et al., 1991a; BREDT et al., 1991b; BREDT; HWANG; SNYDER, 1991) e ainda com somatostatina e neuropeptídeo Y no corpo estriado e córtex cerebral (KOWAL et al., 1987; KOWAL; BEAL, 1988).

A marcação para nNOS do núcleo endopiriforme em ratos foi classificada como de alta densidade (RODRIGO et al., 1994), ao passo que, em camundongos, houve marcação de forte intensidade de neurônios nNOS-IR nesse núcleo (GOTTI et al., 2005). No nosso estudo, foram encontrados neurônios fortemente marcados no DEn e VEn, enquanto no IEn, os neurônios nNOS-IR foram fracamente marcados. A densidade de neurônios nNOS-IR variou de baixa a intermediária nesses núcleos, ao passo que no núcleo claustró houve baixa densidade e forte marcação em ratos, em camundongos e também em mocós.

O núcleo *accumbens* mostrou-se de forte marcação nas suas duas porções e de densidade moderada no AcbSh e baixa no AcbC. Em camundongos, a distribuição de células nNOS-IR pode ser caracterizada como de baixa densidade e de moderada intensidade (GOTTI et al., 2005) e em ratos foi descrita baixa densidade, com células nNOS-IR imersas numa região de alto *background*, provavelmente devido a presença de muitas terminações marcadas nessa região (RODRIGO et al., 1994), tal qual o AcbC desse trabalho.

O núcleo pálido apresentou-se de densidade moderada e fraca intensidade em mocós, corroborando com o apresentado em camundongos (GOTTI et al., 2005) e também em ratos (RODRIGO et al., 1994). Até mesmo a morfologia neuronal é similar com numerosas e longas varicosidades presentes.

O núcleo da banda diagonal de Broca na divisão horizontal apresentou-se fracamente marcada e também com baixa densidade de neurônios nNOS-IR e a divisão vertical de intensidade intermediária e baixa densidade de neurônios nNOS-IR. Em ratos (RODRIGO et al., 1994), foram descritos neurônios fortemente marcados na divisão horizontal do núcleo da banda diagonal e em camundongos (GOTTI et al., 2005), moderadamente marcados e de densidade intermediária.

Na substância inominada, descrevemos neurônios fortemente marcados e de muito baixa densidade em mocós, ao passo que, em ratos (RODRIGO et al., 1994), foram descritas células de alta densidade de marcação e fracamente marcadas.

A amígdala do mocó apresentou marcação para nNOS heterogênea e complexa. O núcleo central apresentou-se como de baixa densidade e fraca intensidade, o núcleo medial intensidade intermediária e densidade moderada, o

núcleo basomedial da amígdala apresenta-se com intensidade moderada e densidade baixa, o grupamento basolateral de intensidade variando de forte a fraca e densidade moderada e a porção lateral da amígdala apresentou-se de intensidade forte e densidade moderada. Em ratos (RODRIGO et al., 1994), a distribuição de neurônios nNOS-IR também é descrita como heterogênea. Nesse trabalho, a maior densidade foi encontrada no núcleo medial da amígdala, em todas as suas subdivisões, a saber: MeAV, MeAD, MePV e MePD. Neurônios fracamente marcados foram descritos na amígdala basolateral. Células esparsamente marcadas foram descritas na amígdala basomedial. Alta densidade foi verificada nos núcleos ventral da amígdala basolateral e ventral da amígdala basomedial. E em camundongos (GOTTI et al., 2005), houve maior intensidade de marcação na amígdala medial (MeAD, MePD e MePV).

O núcleo intersticial da estria terminal em macacos revelou-se como uma região de moderada a forte intensidade de marcação e baixa a alta densidade de neurônios nNOS-IR, ao passo que em ratos (RODRIGO et al., 1994) descreve-se um extensivo grupo de neurônios encontrado em todas as divisões do núcleo intersticial da estria terminal, com longas projeções e poucas varicosidades, e em camundongos (GOTTI et al., 2005) neurônios fracamente marcados e baixa densidade de neurônios nNOS-IR foram descritos na estria terminal.

O hipocampo e o giro denteado em nossa pesquisa apresentaram-se como regiões com baixa densidade de neurônios nNOS-IR moderadamente corados. Em ratos, o giro denteado apresentou-se com baixa densidade, exceto na camada molecular, onde relatou-se muito baixa densidade; foi descrita alta densidade de nNOS-IR em CA1, CA2 e CA3, sendo CA1 fracamente marcado, CA2 e CA3 fortemente marcados (RODRIGO et al., 1994). Já em camundongos, foram descritos CA1 e CA2 com células esparsas e fraca IR e CA3 como intensamente marcado (GOTTI et al., 2005). O giro denteado se apresentou fracamente marcado na PoDG, intensamente marcado na MoDG e intermediário na GrDG.

Células nNOS-IR foram descritas em humanos em discretos núcleos subcorticais e por todo o córtex cerebral. A marcação aconteceu em diferentes níveis de intensidade ao longo de todo o telencéfalo (ECBERONGBE et al., 1994). As células marcadas incluíram células não piramidais no córtex cerebral, piramidais

e não piramidais do hipocampo e neurônios de largas projeções no corpo estriado. Houve fraca marcação no hipocampo, marcação esparsa e heterogênea na amígdala, marcação intensa no núcleo caudado, putamen e núcleo accumbens e intensa marcação na substância inominada (ECBERONGBE et al., 1994).

Ao compararmos as três distribuições, chama a atenção o fato de haver mais similaridade entre a distribuição descrita em humanos e a descrita nesse trabalho.

5.2. Implicações morfofuncionais do NO

Como podemos observar, a distribuição de NO no telencéfalo subcortical de mocó é ampla, heterogênea e complexa, o que pode significar um amplo papel do NO nas funções cerebrais desta espécie. Além disso, o mapeamento da distribuição de nNOS está sendo importante para a definição morfológica de certas áreas encefálicas de mocó, em comparação com outras espécies de roedores e outros mamíferos.

Alguns autores propõem que o núcleo endopiriforme, em sua totalidade, seja parte do núcleo claustró, sendo nomeado claustró ventral (KOWIANSKI et al., 1999). O claustró do mocó apresenta diferenças marcantes quanto a organização citoarquitetônica quando comparado ao de rato (KOWIANSKI; TIMMERMANS; MORYS, 2001). Enquanto o DCI de ratos e camundongos apresenta-se com formato cônico e o VCI com formato arredondado, o DCI do mocó apresenta-se arredondado e o VCI, cônico. Ao mesmo tempo, particularmente nos casos observados, há muita proximidade entre o núcleo claustró e o núcleo endopiriforme no mocó, cuja organização formada pelos dois núcleos em conjunto assemelha-se a um halter.

Os resultados aqui descritos corroboram com os resultados descritos em camundongos e humanos, pertinentes a organização citoarquitetônica e ainda de morfologia celular (ECBERONGBE et al., 1994; GOTTI et al., 2005; HINOVA-PALOVA et al., 1997). A partir da análise da função desses núcleos, infere-se que o NO possui relação no processamento somatosensorial, auditivo e visual, ou ainda, no processamento de integração sensorial no claustró e endopiriforme de mocó (EDELSTEIN; DENARO, 2004).

Pelo fato das divisões do núcleo *accumbens* serem funcionalmente distintas, é provável que o papel do NO nesse núcleo também seja distinto. Enquanto o AcbSh recebe aferências da BLA e subículo ventral, a principal região de aferência do AcbC é o hipocampo (GROENEWEGEN et al., 1999; VOORN et al., 2004). Embora a via metabólica ainda seja desconhecida, há evidências do aumento da liberação de dopamina após liberação de NO no núcleo *accumbens* e sua relação com opioides, nicotina e álcool (MOTAHARI; SAHRAEI; MEFTAHI, 2016; SMITH et al., 2017) o que comprova sua relação com comportamentos de vício, inclusive intrínsecas relações com o sistema límbico. Evidências apontam que o AcbC possui um importante papel na adição induzida por pista e o AcbSh é necessário para mediar a influência do contexto em comportamentos de adição (CHAUDHRI et al., 2010). Portanto, por apresentar-se dividido morfológicamente e funcionalmente, o NO também apresenta subsídio neuroanatômico como parte da função de mecanismos que levam ao vício e de mecanismos de recompensa, haja vista a marcação também presente nos principais sítios de onde partem as aferências dessa formação neuronal.

A relação entre NO e controle do movimento vai além da expressão desse neurotransmissor pelos núcleos que controlam o movimento. Células polimorfonucleares de pacientes portadores da doença de Parkinson exibiram um aumento na síntese de NO que foi acompanhada pelo acúmulo de proteínas contendo nitrotirosina associada a baixa expressão neuronal de nNOS, relacionando ainda a um aumento da atividade da iNOS (GATTO et al., 2000). O fator neuronal derivado da glia (GDNF), que exerce um fator protetor na doença de Parkinson (TOLEDO-ARAL et al., 2003), inibe a atividade nNOS e a apoptose em neurônios (WANG et al., 2002). Evidências indicam que o NO endógeno desempenha um efeito inibitório sobre os transportadores de monoaminas, sugerindo que o NO inibe a recaptação de dopamina e aumenta a liberação desse neurotransmissor (KISS; VIZZI, 2001; ROCCHITTA et al., 2005). Há dados que sugerem que uma hiperatividade do sistema nitrérgico poderia agir paralelamente à hiperfunção da via dopaminérgica característica da esquizofrenia (WEST; GALLOWAY; GRACE, 2002). Por fim, a relação entre NO e esclerose lateral amiotrófica (ELA) e distrofia muscular de Duchenne revela que ainda há muito campo para ser explorado e que ainda o uso de inibidores de fosfodiesterases poderia alterar o paradigma dos tratamentos presentes hoje para esses casos (LIPTON, 2006; LUNDBERG; WEITZBERG;

GLADWIN, 2008; CHEN; NORTHINGTON; MARTIN, 2010; HAQUE et al., 2013; PEIXOTO; NUNES; GARCIA-OSTA, 2015). Uma disfunção em vias córtico-estriatais dependentes de NO poderia prejudicar a operação de circuitos de retropropagação estriado-nigrais envolvidos na regulação da transmissão dopaminérgica. Esta disfunção dopaminérgica poderia alterar o processamento de informações sensório-motoras em projeções neuronais e resultar em uma seleção imprópria ou inativação dos circuitos de saída do estriado envolvidos no controle de áreas pré-motoras do tronco cerebral e tálamo (SALUM; PEREIRA; GUIMARÃES, 2008). Portanto, nesses núcleos, o NO possui uma intrínseca atividade neuroprotetora, daí sua expressão difusa e ampla. A presença de NO nestes núcleos no mocó indica um papel de NO em circuitos de recompensa e de controle motor nesta espécie também.

A substância inominada associa-se a vigília e atenção (HEIMER, 1995) e sua marcação na imunoistoquímica mostrou-se de forte intensidade e de moderada densidade em mocó. Assim como o AcbC, mostrou-se com elevado background, provavelmente também devido à alta quantidade de NADPH livre na região dessa estrutura. A rápida difusão e a facilidade de passagem entre membranas facilitaria as comunicações rápidas e que cobririam uma grande área com um neurotransmissor como o NO. Alguns achados indicam que o bloqueio da atividade da NOS reduz significativamente a habilidade da estimulação do prosencéfalo basal para induzir mudanças nos mecanismos de vigília (MARIÑO; CUDEIRO, 2003), além disso, o uso de etanol inibe a atividade da NOS nesse núcleo, levando a morte celular de neurônios colinérgicos pela diminuição do efeito neuroprotetor do NO (EHRlich; PIRCHL; HUMPEL, 2012). A expressão de nNOS nesses núcleos do mocó implicam papel do NO em circuitos ligados a vigília e a atenção.

A potenciação de longo termo (LTP, do inglês *Long Term Potentiation*) é uma plasticidade dependente de atividade que resulta em um aumento persistente da transmissão sináptica (BLISS; LOMO, 1973). O *locus* pré-sináptico da LTP é dependente da despolarização sináptica, e depende da sinalização de um mensageiro retrógrado (PADAMSEY; EMPTAGE, 2014). O mensageiro mais comumente investigado, e que continua sendo, é o NO; por se tratar de uma molécula de livre difusão e que estimula a liberação glutamatérgica, provocando a facilitação da persistência na transmissão sináptica (HABIB; ALI, 2011; PADAMSEY; EMPTAGE, 2014; PFEIFFER; MAYER; HEMMENS, 1999). A depressão de longo

termo (LTD, do inglês *Long Term Depression*), por sua vez, é um mecanismo de plasticidade que provoca diminuição da ativação de fibras paralelas, principalmente, e requer principalmente a participação de neurotransmissores como o GABA (PURVES et al., 2001). Por facilitar também a liberação desse neurotransmissor, o NO também está envolvido na LTD (DANIEL et al., 1993). Em resumo, disparos de alta frequência para os mesmos axônios provocam LTP, que é evidente pelo aumento da duração e da amplitude de potenciais excitatórios; por outro lado, a redução de chegada de potenciais excitatório gera LTD. Tais mecanismos podem ser intercambiáveis e regulam diversas funções de aprendizado e memorização (PURVES et al., 2001). A LTP é inibida pela administração de inibidores da NOS, confirmando o papel do NO nesse processo (BRENMAN; BREDT, 1997; BREDT; HWANG; SNYDER, 1991), assim como a administração de inibidores de NO também diminuem a LTD (DANIEL et al., 1993) e também levam à mesma implicação. É postulado que como consequência da repetida estimulação, NO é sintetizado em elementos pós-sinápticos, trafega através do espaço extracelular e induz a formação de cGMP em terminais pré-sinápticos, assim modulando funções celulares que levam a LTP (PRAST; PHILIPPU, 2001). Os dois processos são essenciais ao aprendizado e memorização, e refletem que as funções do NO incluem formação de memórias, especialmente de longo prazo, e aprendizado, especialmente o motor.

Observou-se inibição da LTP quando injetados bloqueadores de NO e facilitação da LTP quando injetados doadores de NO especialmente no MeA (SHINDOU et al., 1993; WATANABE; SAITO; ABE, 1995; ABE; WATANABE; SAITO, 1996). Na LA, especialmente durante o condicionamento Pavloviano, a via NO-cGMP-PKG promove consolidação de memórias do medo, em parte, por regular a transcrição dirigida pelo gene ERK. A plasticidade sináptica na LA durante o condicionamento do medo promove transcrição dirigida pelo gene ERK via sinalização retrógrada de NO (OTA et al., 2010). Ainda na LA, relatou-se diminuição da ansiedade comportamental com o aumento da expressão de nNOS nesse núcleo (SIBA et al., 2017).

Além das funções relacionadas a memória e aprendizado, neurônios paracapsulares GABAérgicos que expressam nNOS são ativados durante um período de sono ininterrupto seguido de privação de sono. Assim, essas células

podem controlar a atividade de neurônios na amígdala e em regiões fora dessa formação na mudança de estado de vigília. Esses neurônios que recebem aferências de neurônios da rafe, estão envolvidos num mecanismo de regulação do estado emocional (BOCCHIO et al., 2016). Em camundongos, os interneurônios GABAérgicos da BLA que expressam NO expressam baixos níveis de proteínas ligantes de cálcio e são tratados como subpopulação distinta, possuindo papel funcional na circuitaria inibitória local (WANG et al., 2017).

Nesse trabalho, o núcleo intersticial da estria terminal demonstrou-se homogêneo na histoquímica, porém heterogêneo na imunistoquímica. A injeção de NO no núcleo intersticial da estria terminal de camundongos estimula freezing (FARIA, 2011). O núcleo intersticial da estria terminal pode ser, portanto, um sítio de importância na mediação das reações de defesa moduladas por NO. Nesta região, as funções do NO se estendem a regulação da função cardiovascular, alterando a resposta do reflexo dos barorreceptores, que pode ser alterada tanto por bloqueadores de receptores do tipo NMDA como por doadores de NO (CRESTANI et al, 2013). A expressão de NO nesse núcleo associa-se ainda a analgesia oriunda da liberação de glutamato no STLV (DEYAMA et al, 2017). A presença de neurônios nNOS-IR em subdivisões do núcleo intersticial da estria terminal de mocó nos indica que este núcleo também está envolvido em uma série de funções vitais neste animal.

Os núcleos septais no mocó apresentaram-se morfofuncionalmente de maneira semelhante aos de ratos. Neurônios que se projetam da área tegmentar ventral para o LSI e LSD estão implicados na regulação da memória com medo e emoções, interação social e ingestão de comida, o que sugere um papel do NO nesses núcleos como regulador de comportamentos sociais (KHAN et al, 2017). Altas concentrações da enzima nNOS foram descritas nessa região no cérebro de humanos, o que contribui, em parte, para acreditar que o NO também possui um papel de regulador das emoções e comportamentos sociais em humanos e roedores (BLUM-DEGENA et al, 1994). A função do NO nesse núcleo pode ainda ser associada a regulação da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e respostas ao estresse (SINGEWALD et al, 2011). No septo lateral de ratos, a inibição de NO leva a ativação do septo lateral com concomitante inibição do hipocampo e núcleos

dorsais da rafe, possuindo efeito antidepressivo (SHERWIN; GIGLIUCCI; HARKIN, 2017).

Por fim, o hipocampo e o giro denteado também mostraram homogeneidade quanto às marcações pelos processos aqui utilizados. A memória possui mecanismos complexos e muitas vias de regulação, certamente com a presença de NO. Por exemplo, a LTP hipocampal é eliminada ou parcialmente bloqueada por inibidores de nNOS, quando a injeção ocorre em elementos pós-sinápticos, em experimentos que envolviam células em cultura e utilização de eletrodos intra e extracelulares para verificação da atividade do NO e o efeito de seus bloqueadores (BÖHME et al., 1991; O'DELL et al., 1991; GRIBKOFF; LUM-RAGAN, 1992; CHETKOVICH; KLANN; SWEATT, 1993). Em ratos, há expressão constitutiva de NO em CA1, CA3 e giro denteado, mas não em CA2 (ENDO; MAIESE; WAGNER, 1994). O papel do NO nessas regiões, assim como na amígdala, está relacionado aos processos de aquisição de memórias e de aprendizagem, estando intrinsecamente relacionado a LTP e LTD nessas regiões (PRAST; PHILIPPU, 2001).

5.3. Conclusão

A NOS está presente em diversas regiões e núcleos do telencéfalo subcortical de mocó de forma heterogênea, o que sugere um papel complexo do NO no telencéfalo também nesta espécie de roedor.

De uma forma geral, vimos que no mocó NO tem substrato neuroanatômico para papel no controle do movimento, no comportamento do vício e recompensa, aprendizado, memória, vigília, atenção, regulação do comportamento social e ansiedade, dentre outras funções.

Vimos aqui também que, apesar de ser uma boa técnica, a técnica de marcação por NADPHd utilizada por nós não é a ideal para estudo da distribuição de NO em mocó.

Sendo assim, o NO possui um importante papel como neuromodulador e mensageiro neuronal, agindo por todo o encéfalo em diversos processos em diversas espécies, podendo, inclusive, ser avaliado como uma provável via para tratamento de algumas doenças, em diversos sítios neuroanatômicos. Entender a neuroanatomia desse neurotransmissor em mais uma espécie conhecida e que pode se torna/r um modelo de estudo tradicional agrega valor aos dados já obtidos e contribui para o avanço no conhecimento acerca do NO.

6. Bibliografia¹

ABE, K.; WATANABE, Y.; SAITO, H. Differential role of nitric oxide in long-term potentiation in the medial and lateral amygdala. **Eur J Pharmacol**, 297:43–46, 1996.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **Biochem J**, 357:593–615, 2001.

BARAÑANO, D.E.; FERRIS, C.E.; SNYDER, S.H. Atypical neural messengers. **TINS**, 24(2):99-106, 2001.

BLISS, T.V.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J Physiol**, 232(2):331–356, 1973.

BLUM-DEGENA, D.; HEINEMANNA, T.; LANA, J.; PEDERSENA, V.; LEBLHUBERB, F.; PAULUSC, W.; RIEDERERA, P.; GERLACHA, M. Characterization and regional distribution of nitric oxide synthase in the human brain during normal ageing. **Brain Research**, 834:128-135, 1999.

BOCCHIO, M.; FISHER, S.P.; UNAL, G.; ELLENDER, T.J.; VYAZOVSKIY, V.V.; CAPOGNA, M.. Sleep and Serotonin Modulate Paracapsular Nitric Oxide Synthase Expressing Neurons of the Amygdala. **eNeuro**, 3(5), 2016. Disponível em: <<http://www.eneuro.org/content/3/5/ENEURO.0177-16.2016>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

BÖHME, G.A.; BON, C.; STUTZMANN, J.M.; DOBLE, A.; BLANCHARD, J.C. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. **Eur J Pharmacol**, 199:379–381, 1991.

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

¹ Norma ABNT NBR 6023

BRETT, D.S.; HWANG, P.M.; GLATT, C.E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R.R.; SNYDER, S.H. Cloned and expression nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, 351:714-8, 1991.

BRETT, D.S.; HWANG, P.M.; SNYDER, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, 347:768-770, 1991.

BRENNAN, J.E.; BRETT, D.S. Synaptic signaling by nitric oxide. **Curr Opin Neurobiology**, 7:374-378, 1997.

BUTLER, A.B.; HODOS, W. **Comparative Vertebrate Neuroanatomy – Evolution and Adaptation**, 2nd edition. New Jersey: John Wiley and sons; 2005.

CABRERA, A. Catalogo de los mamíferos de América del Sur. II (Sirenia, Perrissodactyla, Lagomorpha, Rodentia, Cetacea). **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, Ciencias Zoológicas**, 4:309-732, 1961.

CARVALHO, J.M.C. Notas de viagem de um zoólogo à região das caatingas e áreas limítrofes. Fortaleza, **Imprensa Universitária do Ceará**, 1969.

CHAUDHRI, N.; SAHUQUE, L.L.; SCHAIRER, W.W.; JANAK, P.H. Separable roles of the nucleus accumbens core and shell in context- and cue-induced alcohol-seeking. **Neuropsychopharmacology**, 35:783–791, 2010.

CHEN, K.; NORTHINGTON, F.J.; MARTIN, L.J. Inducible nitric oxide synthase is present in motor neuron mitochondria and Schwann cells and contributes to disease mechanisms in ALS mice. **Brain Struct Funct**, 214(2-3):219–234, 2010.

CHETKOVICH, D.M.; KLANN, E.; SWEATT, J.D. Nitric oxide synthase-independent long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. **NeuroReport**, 4:919–922, 1993.

CRANDALL, L.S. Family caviidae, In: Management of the wild Mammals captivity. Chicago: **University of Chicago Press**, 247-250, 1964.

CRESTANI, C.C.; ALVES, F.H.F.; GOMES, F.V.; RESSEL, L.B.M.; CORREA, F.M.A.; HERMAN, J.P. Mechanisms in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis

Involved in Control of Autonomic and Neuroendocrine Functions: A Review. **Curr Neuropharmacol**, 11(2): 141–159, 2013.

DAWSON, T.M.; BREDT, D.S.; FOTUHI, M.; HWANG, P.M.; SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. **Proc Natl Acad Sci**, 88:7797-7780, 1991.

DANIEL, H.; HEMART, N.; JAILLARD, D.; CREPEL, F. Long-term depression requires nitric oxide and guanosine 3'5'cyclic monophosphate production in rat cerebellar Purkinje cells. **Eur J Neurosci**, 5:1079–1082, 1993.

DEV, K.K., MORRIS, B.J. Modulation of α -amino-3-hydroxy-5methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) binding sites by nitric oxide. **J Neurochem**, 63:946–952, 1994.

DEYAMA, S.; SUGANO, Y.; MORI, S.; AMANO, T.; YOSHIOKA, M.; KANEDA, K.; MINAMI, M. Activation of the NMDA receptor-neuronal nitric oxide synthase pathway within the ventral bed nucleus of the stria terminalis mediates the negative affective component of pain. **Neuropharmacology**, 18:59-68, 2017.

DOMINICZACK, A.F.; BOHR, D.F. Nitric oxide and its putative role in hypertension. **Hypertension**, 25:1202-1211, 1995.

DUDZINSKI, D.M.; IGARASHI, J.; GREIF, D.; MICHEL, T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 46:235–276, 2006.

ECBERONGBE, Y.I.; GENTLEMAN, T.S.M.; FALKAI, P.; BOGERTS, B.; POLAK, J.M.; ROBERTS, G.W. The Distribution of Nitric Oxide Synthase Immunoreactivity in the human brain. **Neuroscience**, 59(3):561-578, 1994.

EDELSTEIN, L.R.; DENARO, F.J. The claustrum: a historical review of its anatomy, physiology, cytochemistry and functional significance. **Cell Molec Biol**, 50:675-702, 2004.

ENDO, M.; MAIESE, K.; WAGNER, J.A. Expression of the neural form of nitric oxide synthase by CA1 hippocampal neurons and other central nervous system neurons. **Neuroscience**, 63(3):679-689, 1994.

- ERDEMLI, G., KRNJEVIC, K. Nitric oxide tonically depresses a voltage- and Ca-dependent outward current in hippocampal slices. **Neurosci Lett**, 201:57–60, 1995.
- EHRlich, D.; PIRCHL, M.; HUMPEL, C. Ethanol transiently suppresses choline-acetyltransferase in basal nucleus of Meynert slices. **Brain Res**, 1459(3): 35–42, 2012.
- FARIA, M.P. **Efeitos ansiogênicos do óxido nítrico no núcleo intersticial da estria terminal de camundongos**. 2011. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmacêutico Bioquímico). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Araraquara, São Paulo. 2011.
- FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, 33:829–837, 2012.
- FRANKLIN, K.B.J.; PAXINOS, G. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. 2nd edition. San Diego: Academic Press, 2008.
- FREIRE, M.A.M.; FABER, J.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; FRANCA, J.G.; PEREIRA, A. Morphometric variability of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase neurons in the primary sensory areas of the rat. **Neuroscience**, 205:140-153, 2012.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288:373-6, 1980.
- GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **TINS**, 14(2):60-7, 1991.
- GATTO, E.M.; RIOBO, N.A.; CARRERAS, M.C.; CHERNAVSKY, A.; RUBIO, A.; SATZ, M.L.; PODEROSO, J.J. Overexpression of neutrophil neuronal nitric oxide synthase in Parkinson's disease. **Nitric Oxide**, 4:534–539, 2000.
- GONZÁLEZ-SORIANO, J.; CONTRERAS-RODRÍGUEZ, J.; MARTÍNEZ-SAINZ, P.; MARTÍN-PALACIOS, S.; MARÍN-GARCÍA, P.; RODRÍGUEZ-VEIGA, E. NADPH-diaphorase distribution in the rabbit superior colliculus and co-localization with calcium-binding proteins. **J Anat**, 200(3):297-308, 2002.

- GOTTI, S.; SICA, M.; VIGLIETTI-PANZICA, C.; PANZICA, G. Distribution of Nitric Oxide Synthase Immunoreactivity in the Mouse Brain. **Microsc Res Techniq**, 68:13-35, 2005.
- GROENEWEGEN, H.J.; WRIGHT, C.I.; BEIJER, A.V.; VOORN, P. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. **Ann NY Acad Sci**, 877:49–63, 1999.
- GRIBKOFF, V.K.; LUM-RAGAN, J.T. Evidence for nitric oxide synthase inhibitor-sensitive and insensitive hippocampal synaptic potentiation. **J Neurophysiol**, 68: 639–642, 1992.
- HABIB, S; ALI, A. Biochemistry of Nitric Oxide. **Ind J Clin Biochem**, 26(1):3–17, 2011.
- HANSEN, M.B. The Enteric Nervous System II: Gastrointestinal Functions. **Pharmacology & Toxicology**, 92: 249–257, 2003.
- HARA, H.; WAEBER, C.; HUANG, P.L.; FUJII, M.; FISHMAN, M.C.; MOSKOWITZ, M.A. Brain distribution of nitric oxide synthase in neuronal or endothelial nitric oxide synthase mutant mice using [³H]L-N^G-nitro-arginine autoradiography. **Neuroscience**, 75(3):881–890, 1996.
- HAQUE, M.M.; BAYACHOU, M.; FADLALLA, M.A.; DURRA, D.; STUEHR, D.J. Charge Pairing Interactions Control the Conformational Setpoint and Motions of the FMN Domain in Neuronal Nitric Oxide Synthase. **Biochem J**, 450(3):607-617, 2013.
- HEIMER, L. **The human brain and spinal cord: functional neuroanatomy and dissection guide**. 2nd edition. New York: Springer Verlag, 1995.
- HINOVA-PALOVA, D.V.; PALOFF, A.; CHRISTOVA, T.; OVTCHAROFF, W. Topographical distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons in the cat's claustrum. **Eur J Morphol**, 35(2):105-16, 1997.
- HOLSCHER, C.; ROSE, S.P. An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick. **Neurosci Lett**, 145:165–167, 1992.
- HOPE, B. T.; MICHAEL, G. J.; KNIGGE, K. M.; VINCENT, S. R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci**, 88:2811-2814, 1991.

IWASEA, K.; IYAMAB, K.I.; AKAGIA, K.; YANOC, S.; FUKUNAGAC, K.; MIYAMOTOC, E.; MORIA, M; TAKIGUCHIA, M. Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic in situ hybridization. **Mol Brain Res**, 53:1-12, 1998.

IZUMI, Y.; ZORUMSKI, C.F. Nitric oxide and long-term synaptic depression in the rat hippocampus. **Neuroreport**, 4:1131–1134, 1993.

KAPP, B.S.; FRYSSINGER, R.C.; GALLAGHER, M.; HASELTON, J.R. Amygdala central nucleus lesions: effect on heart rate conditioning in the rabbit. **Physiol Behav**, 23:1109–1117, 1979.

KHAN, S.; STOTT, S.R.W.; CHABRAT, A.; TRUCKENBRODT, A.M.; SPENCER-DENE, B.; NAVE, K.A.; GUILLEMOT, F.; LEVESQUE, M.; ANG, S.L. Survival of a Novel Subset of Midbrain Dopaminergic Neurons Projecting to the Lateral Septum Is Dependent on NeuroD Proteins. **J Neurosci**, 37(9):2305–2316, 2017.

KISS, J.P.; VIZI, E.S. Nitric oxide: A novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. **TINS**, 24:211-215, 2001.

KOWAL, N.W.; FERRANTE, R.J.; BEAL, M.F.; RICHARDSON, E.P. JR; SOFRONIEW, M.V.; MARTIN, J.B. Neuropeptide Y, somatostatin and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the human striatum: a combined immunocytochemical and enzyme histochemical study. **Neuroscience**, 20:817-828, 1987.

KOWAL N.W.; BEAL, M.F. Cortical somatostatin, neuropeptide Y and NADPH-diaphorase neurons: normal anatomy and alterations in Alzheimer's disease. **Ann Neural**, 23:105-114, 1998.

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

KOWIAŃSKI, P.; DZIEWIATKOWSKI, J.; KOWIAŃSKA, J.; MORYŚ, J. Comparative anatomy of the claustrum in selected species: A morphometric analysis. **Brain Behav Evol**, 53(1):44-54, 1999.

KOWIAŃSKI, P.; TIMMERMANS, J.P.; MORYŚ, J. Differentiation in the immunocytochemical features of intrinsic and cortically projecting neurons in the rat claustrum: combined immunocytochemical and axonal transport study. **Brain Res**, 905(1-2):63-71, 2001.

LACHER JR, T.E. The comparative social behavior of *Kerodon rupestris* and *Galea spixii* and the evolution of behavior in the Caviidea. Bull. **Carnegie Museum Nat**, 17: 1-71, 1981.

LIPTON, S.A. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. **Nature Rev Drug Discov**, 5:160-170, 2006.

LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M.T. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Rev Drug Discov**, 7:156-167, 2008.

MARIÑO, J.; CUDEIRO, J. Nitric oxide-mediated cortical activation: a diffuse wake-up system. **J Neurosci**, 23(10):4299-307, 2003.

MASINI, M.A.; STURLA, M.; RICCI, F.; UVA, B.M. Identification and distribution of nitric oxide synthase in the brain of adult Antarctic teleosts. **Polar Biol**, 29:23–26, 2005.

MATSUDA, H.; IYANAGI, T. Calmodulin activates intramolecular electron transfer between the two flavins of neuronal nitric oxide synthase flavin domain. **Biochim Biophys Acta**, 1473:345-355, 1999.

MCMAHON, D.G.; PONOMAREVA, L.V. Nitric oxide and cGMP modulate retinal glutamate receptors. **J Neurophysiol**, 76:2307–2315, 1996.

MENDES, B.V. **Plantas e animais para o nordeste**. 1ª edição, Globo, Rio de Janeiro. 1987.

- MIZUKAWA, K.; VINCENT, S. R.; MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Distribution of Reduced-Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate Diaphorase-Positive Cells and Fibers in the Cat Central Nervous System. **J Comp Neurol**, 279:281-311, 1989.
- MONCADA, S. Nitric Oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. **An New York Acad Sci**, 811:60-67, 1997.
- MOOJEN, J. **Os roedores do Brasil**. Ministério da Educação e Saúde/ Instituto Nacional do Livro. Rio de Janeiro, 1952.
- MOTAHARI, A.A.; SAHRAEI, H.; MEFTAHI, G.H. Role of Nitric Oxide on Dopamine Release and Morphine-Dependency. **Basic Clin Neurosci**, 7(4):283-290, 2016.
- NATHAN, C.F.; HIBBS, J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr Opin Immunol**, 3:65–70, 1991.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3ª edição. São Paulo, 2002.
- O'DELL, T.J.; HAWKINS, R.D.; KANDEL, E.R.; ARANCIO, O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. **Proc Natl Acad Sci**, 88:11285–11289, 1991.
- OTA, K.T.; MONSEY, M.S.; WU, M.S.; YOUNG, G.J.; SCHAFE, G.E. Synaptic plasticity and NO-cGMP-PKG signaling coordinately regulate ERK-driven gene expression in the lateral amygdala and in the auditory thalamus following Pavlovian fear conditioning. **Learning & Memory**, 17:221–235, 2010.
- PADAMSEY, Z.; EMPTAGE, N. Two sides to long-term potentiation: a view towards reconciliation. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 369(1633): 20130154, 2014.
- PALMER, R.M.J.; FERRIDGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327:524-526, 1987.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 6th edition. Academic press, 2007.

PAXINOS, G.; WATSON, C.; PETRIDES, M.; ROSA, M.; TOKUNO, H. **The marmoset brain in Stereotaxic Coordinates**. 1st edition. Academic Press, 2012.

PEIXOTO, C.A.; NUNES, A.K.S.; GARCIA-OSTA, A. Phosphodiesterase-5 Inhibitors: Action on the Signaling Pathways of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Cognition. **Mediators Inflamm**, Publicado Online, 2015.

PFEIFFER, S.; MAYER, B.; HEMMENS, B. Nitric oxide: chemical puzzles posed by a biological messenger. **Angew Chem Int Ed**, 38:1714–1731, 1999.

PHILLIPS, R.G.; LEDOUX, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behav Neurosci**, 106:274–285, 1992.

PINEDA, J.; KOGAN, J.H.; AGHAJANIAN, G.K. Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. **J Neurosci**, 16:1389–1399, 1996.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in Neurobiology**, 64:51–68, 2001.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C.; LAMANTIA, A.S.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, M.S. **Neuroscience**, 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.

REUSS, S.; RIEMANN, R. Distribution and projections of nitric oxide synthase neurons in the rodent superior olivary complex. **Microsc Res Techniq**, 51(4):318–329, 2000.

ROBELLO, M; AMICO, C.; BUCOSSI, G.; CUPELLO, A.; RAPALLINO, M.V.; THELLUNG, S. Nitric oxide and GABAA receptor function in the rat cerebral cortex and cerebellar granule cells. **Neuroscience**, 74:99–105, 1996.

ROBERTS, M.; MALINI, A.K.E.; DEAL, M. The reproductive biology of the rock cavy, *Kerodon rupestris*, in captivity: A study of reproductive adaptation in a trophic specialist. **Mammalia**, 48:253-266, 1984.

ROCCHITTA, G.; MIGHELI, R.; MURA, M.P.; GRELLA, G.; ESPOSITO, G.; MARCHETTI, B.; MIELE, E.; DESOLE, M.S.; MIELE, M.; SERRA, P.A. Signaling pathways in the nitric oxide and iron-induced dopamine release in the striatum of freely moving rats: Role of extracellular Ca²⁺ and L-type Ca²⁺ channels. **Brain Research**, 1047:18-29, 2005.

RODRIGO, J.; SPRINGALL, D.R.; UTTENTHAL, O.; BENTURA, M.L.; ABADIA-MOLINA, F.; RIVEROS-MORENO, V.; MARTÍNEZ-MURILLO, R.; POLAK, J.M.; MONCADA, S. Localization of Nitric Oxide Synthase in the adult rat brain. **Phil Trans R Soc Lond**, 345:175-221, 1994.

ROSKAMS, A.J.; BREDET, D.S.; DAWSON, T.M.; RONNETT, C.V. Nitric Oxide Mediates the Formation of Synaptic Connections in Developing and Regenerating Olfactory Receptor Neurons. **Neuron**, 13:289-299, 1994.

SALUM, C.; PEREIRA, A.C.C.I.; GUIMARÃES, E.A.D.B.B. Dopamina, Óxido Nítrico e suas Interações em Modelos para o Estudo da Esquizofrenia. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, 21(2):186-194, 2008.

SCHERER-SINGLER, U.; VINCENT, S.R.; KIMURA, H.; MCGEER, E.G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **J Neurosci Methods**, 9:229-234, 1983.

SCHULZ, R.; TRIGGLE, C.R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. **Trends Pharmacol Sci**, 15:255-259, 1994.

Sherwin, E; Gigliucci, V.; Harkin, A. Regional specific modulation of neuronal activation associated with nitric oxide synthase inhibitors in an animal model of antidepressant activity. **Behav Brain Res**, 316:18-28, 2017.

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

SHIPP, S. The functional logic of corticostriatal connections. **Brain Struct Funct**, 222:669-706, 2017.

SIBA, I.P.; BORTOLANZA, M.; FRAZÃO VITAL, M.A.B.; ANDREATINI, R.; CUNHA, J.M.; DEL BEL, E.A.; ZANOVELI, J.M. Fish oil prevents rodent anxious states

comorbid with diabetes: A putative involvement of nitric oxide modulation. **Behav Brain Res**, 326:173-186, 2017.

SINGEWALD, G.M.; RJABOKON, A.; SINGEWALD, N.; EBNER, K. The Modulatory Role of the Lateral Septum on Neuroendocrine and Behavioral Stress Responses. **Neuropsychopharmacology**, 36:793-804, 2011.

SMEETS, W.J.; ALONSO, J.R.; GONZÁLEZ, A. Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in relation to catecholaminergic neuronal structures in the brain of the lizard *Gekko gecko*. **J Comp Neurol**, 377(1):121-41, 1997.

SMITH, A.C.W.; SCOFIELD, M.D.; HEINSBROEK, J.A.; GIPSON, C.D.; NEUHOFER, D.; ROBERTS-WOLFE, D.J.; SPENCER, S.; GARCIA-KELLER, C.; STANKEVICIUTE, N.M.; SMITH, R.J.; ALLEN, N.P.; LORANG, M.R.; GRIFFIN, W.C. 3RD.; BOGER, H.A.; KALIVAS, P.W. Accumbens nNOS Interneurons Regulate Cocaine Relapse. **J Neurosci**, 37(4):742-756, 2017.

SMOLENSKI, A.; BURCKHARDT, A.M.; EIGENTHALER, M.; BUTT, E.; GAMBARYAN, S.; LOHMANN, S.; WALTER, U. Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 358:134–139, 1998.

SMYTHIES, J.; EDELSTEIN, L.; RAMACHANDRAN, V. Hypotheses relating to the function of the claustrum. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, 8:1-16, 2012.

SNYDER, S.H. Nitric Oxide: First in a New Class of Neurotransmitters? **Science**, 257:494-496, 1992.

SOUSA, R.A.; MENEZES, A.A.L. Circadian rhythms of motor activity of the Brazilian rock cavy (*Kerodon rupestris*) under artificial photoperiod. **Biol Rhythm Res**, 31:443-450, 2006.

STUEHR, D.J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 37:339–359, 1997.

SWANSON, L.W. The anatomical organization of septo-hippocampal projections. **Functions of the septo-hippocampal system**. Amsterdã, Elsevier;1978.

TOLEDO, J.C.; AUGUSTO JR, O. Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. **Chem Res Toxicol**, 25:975–989, 2012.

TOLEDO-ARAL, J.J.; MENDEZ-FERRER, S.; PARDAL, R.; ECHEVARRIA, M.; LOPEZ-BARNEO, J. Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. **J Neurosci**, 23:141–148, 2003.

VILLANUEVA, C.; GIULIVI, C. Subcellular and cellular locations of nitric-oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. **Free Radic Biol Med**, 49(3): 307–316, 2010.

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

VINCENT, S.R.; SATOH, K.; ARMSTRONG, D. M.; FIBIGER, H. C. NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for the cholinergic neurons of the pontine reticular formation. **Neurosci Lett**, 43(1):31-36, 1983.

VOORN P.; VANDERSCHUREN, L.J.M.J.; GROENEWEGEN, H.J.; ROBBINS, T.W.; PENNARTZ, C.M.A. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. **TINS**, 27:468–474, 2004.

WANG, X.; ROBINSON, P.J. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signalling in the nervous system. **J Neurochem**, 68:443–456, 1997.

WANG, Y.; CHANG, C.F.; MORALES, M.; CHIANG, Y.H.; HOFFER, J. Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor in ischemic brain injury. **Ann NY Acad Sci**, 962:423–437, 2002.

WANG, X.; LIU, C.; WANG, X.; GAO, F.; ZHAN, R.Z. Density and neurochemical profiles of neuronal nitric oxide synthase-expressing interneuron in the mouse basolateral amygdala. **Brain Res**, 1663:106-113, 2017.

WATANABE, Y.; SAITO, H.; ABE, K. Nitric oxide is involved in long-term potentiation in the medial and but not lateral amygdala neuron synapses in vitro. **Brain Res**, 688:233–236, 1995.

WEST, A. R.; GALLOWAY, M. P.; GRACE, A. A. Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: Effector pathways and signaling mechanisms. **Synapse**, 44:227-245, 2002.

ZAGO, A.S.; ZANESCO, A. Óxido Nítrico, Doenças Cardiovasculares e Exercício Físico. **Arq Bras Cardiol**, 87(6) :e264-e270, 2006.

ZARRI, I.; BUCOSSI, G.; CUPELLO, A.; RAPALLINO, M.V.; ROBELLO, M. Modulation by nitric oxide of rat brain GABAA receptors. **Neurosci Lett**, 180:239–242, 1994.

ZHOU, L.; ZHU, D.Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. **Nitric Oxide**, 20:223–230, 2009.

ANEXOS



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PROTOCOLO N.º 004/2014

Professor/Pesquisador: *MIRIAM STELA MARIS DE OLIVEIRA COSTA*

Natal (RN), 02 de abril de 2014.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que se encontra em anexo o parecer emitido pela CEUA a respeito do projeto “MAPEAMENTO NEUROQUÍMICO NO ENCÉFALO DO MOCÓ”, protocolo nº 004/2014.

O referido protocolo foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos que, segundo o Regimento Interno da CEUA (Cap. 2, Art. 13), 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: **MAIO 2017** (30 dias após a conclusão do projeto).

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

Cordialmente,


John Fontenele Araujo
Coordenador da CEUA



PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

1) PROTOCOLO Nº : 004/2014

2) TÍTULO DO PROJETO:

Mapeamento neuroquímico no encéfalo do mocó

3) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Miriam Stela Maris de Oliveira Costa

4) DATA DO PARECER:

21/02/2014

5) SUMÁRIO DO PROJETO:

O projeto vai caracterizar neuroquímica do encéfalo do mocó, um roedor típico da região do nordeste brasileiro e que tem hábitos crepusculares. O projeto é avaliar os principais circuitos de neurotransmissão, principalmente o relacionado ao sistema visual e outros sensoriais.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Caracterizar neuroquimicamente o encéfalo do mocó.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS:

Título	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentários
Objetivos	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Introdução e Justificativa	<input checked="" type="checkbox"/> Adequadas	<input type="checkbox"/> Comentários
Cronograma para execução da pesquisa	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentários
Orçamento e fonte financiadora	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Referências Bibliográficas	<input checked="" type="checkbox"/> Adequadas	<input type="checkbox"/> Comentários

9) O PROJETO DESTA PESQUISA ESTA ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Adequado Comentários

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de severidade: Brando Médio Elevado

Espécie: Número Amostral:

Redução Amostral: Sim Não

Substituição de Metodologia: Sim Não

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não