

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

RAÍSSA TAINÁ FERNANDES LANDIM

AVALIAÇÃO DA DINÂMICA NEURONAL DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO
HIPOTÁLAMO DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM CUTIA
(*Dasyprocta aguti* - Linnaeus, 1766.)

NATAL, 2020

RAÍSSA TAINÁ FERNANDES LANDIM

AVALIAÇÃO DA DINÂMICA NEURONAL DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO
HIPOTÁLAMO DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM CUTIA
(*Dasyprocta aguti* - Linnaeus, 1766.)

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

Orientador

Prof. Dr. Fernando Vagner Lobo Ladd

NATAL, 2020

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

Landim, Raíssa Tainá Fernandes.

Avaliação da dinâmica neuronal do núcleo paraventricular do hipotálamo durante o desenvolvimento pós-natal em cutia (*Dasyprocta aguti* - Linnaeus, 1766.) / Raíssa Tainá Fernandes Landim. - Natal, 2020.

82 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. Fernando Vagner Lobo Ladd.

1. Hipotálamo - Dissertação. 2. Desenvolvimento pós-natal - Dissertação. 3. Núcleo paraventricular - Dissertação. 4. Envelhecimento - Dissertação. I. Ladd, Fernando Vagner Lobo. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 611.8

Dedico este trabalho aos meus pais por todo o amor e incentivo incondicional em todos os momentos. Aos meus irmãos por estarem presentes em todos os momentos de minha vida me incentivando e apoiando em tudo. E ao meu marido que está ao meu lado nesta jornada me incentivando e me apoiando em busca de novas conquistas. A todos vocês, serei sempre grata, pois sempre irão torcer e vibrar pelo meu crescimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser a minha fortaleza e por cuidar tão bem de mim.

Aos meus pais Anchieta e Terciana, pelo amor incondicional e por me abrirem os caminhos para que eu pudesse ter todas as oportunidades que me trouxeram até aqui.

Aos meus irmãos Cassius e Vinícius pelo companheirismo, amizade, incentivo e torcida.

Aos meus companheiros de laboratório, antes colegas de turma e que hoje tenho a honra de chamar de amigos, Laura e João por todo o apoio. Levarei vocês para sempre em meu coração.

Aos demais amigos, aos quais não pretendo citar nomes para não correr o risco de esquecer algum, agradeço imensamente pelas vezes que me encorajaram no decorrer desta jornada, dizendo: “Você vai conseguir!”

Ao meu orientador Fernando Ladd agradeço pela grande confiança, por tantas orientações valiosas e pela compreensão imensurável, além de tudo ter me ensinado que a resiliência é o melhor caminho para o êxito, como também que no final tudo dará certo.

Ao professor Judney Cley Cavalcante, (representando a todos os professores do LABNEURO) pela disponibilidade de sempre e pelas inúmeras contribuições.

A todos que fazem parte do DMOR (corpo docente, funcionários e alunos) por todo apoio concedido durante esse período, em especial a funcionária Regina, pelo apoio técnico.

Ao Departamento de Morfologia/UFRN e ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Estrutural e Funcional pela disponibilização de totais condições para a execução da pesquisa.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para concretização de mais esta vitória em minha vida, o meu profundo agradecimento!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthín Luther King

RESUMO

O hipotálamo é uma região da parte central do sistema nervoso (SNC) responsável pela manutenção da homeostase do organismo e é composto por vários núcleos. Dentre os núcleos que formam o hipotálamo, está o núcleo paraventricular (PVN), que é um dos centros encarregados pela regulação autonômica e endócrina do organismo. O PVN é um importante centro pré-autonômico que auxilia na regulação do sistema nervoso simpático, podendo atuar na regulação de vários sistemas, entre eles o cardiovascular. Alterações neste núcleo podem estar relacionadas a acometimentos cardiovasculares, como hipertensão e insuficiência cardíaca. Logo, com o envelhecimento, podem ocorrer alterações, a nível de PVN, que possivelmente desencadeiam alterações cardíacas nos idosos. Diante disso, analisamos o PVN de cutias (*Dasyprocta agouti*) em diferentes faixas etárias com o intuito de observar a dinâmica neuronal no núcleo durante o desenvolvimento pós-natal. Para isso, foi realizada uma análise morfoquantitativa tridimensional (análise estereológica) do PVN, tendo como base o princípio de Cavalieri, juntamente com a análise de densidade de volume (Vv) dos neurônios do núcleo baseado no princípio de Delesse, quantificação de número de neurônios por dissector óptico e volume neuronal médio por nucleator. Essas análises foram realizadas em 11 cutias machos, sendo divididos em quatro grupos etários: G1- Neonato (n=2); G2- Jovem (n=2); G3- Adulto (n=3) e G5- Senil (n=4). No PVN da Cutia foi observado duas regiões magnocelulares e seis regiões parvocelulares. A análise quantitativa demonstrou que o PVN dos animais senis, quando comparado aos neonatos, apresenta um aumento de 317% no volume total do núcleo e de 291% no volume total ocupado por componentes não neuronais. Como também, demonstrou que o número de neurônios dos jovens e senis, quando comparados com os neonatos, teve um aumento de 114% e o dos adultos, quando comparados com os neonatos teve um aumento de 109%. Portanto, nossos dados apontam que o PVN de cutias senis apresenta uma hipertrofia podendo estar associada à uma hiperplasia neuronal quando comparados aos neonatos.

Palavras-Chave: Desenvolvimento pós-natal, Núcleo paraventricular, Hipotálamo, Neurônios, Estereologia, Maturação, Envelhecimento.

ABSTRACT

The hypothalamus is a central nervous system (CNS) region, composed of several nuclei responsible for maintaining homeostasis. Among many hypothalamic nuclei there is the Paraventricular nucleus (PVN), which is one of the centers responsible for the autonomic and endocrine regulation of the organism. PVN is an important pre-autonomic center that assists in the regulation of the sympathetic nervous system, acting at the regulation of several systems, including the cardiovascular system. Changes in this nucleus may be related to cardiovascular complications, such as hypertension and heart failure. Therefore, with aging, there may be changes in PVN that can trigger cardiac changes in the elderly. Thus, we analyzed the PVN of agouti (*Dasyprocta agouti*) in different ages in order to observe the neuronal dynamics in the nucleus during the postnatal development. For this, three-dimensional morphoquantitative analysis (stereological analysis) of the PVN was performed, based on Cavalieri's principle, together with the volume density (V_v) analysis of the nucleus neurons based on Delesse's principle, quantification of number of neurons by optical dissector and average neuronal volume per nucleator. These analyzes were performed in 11 male agoutis, divided into four age groups: G1- Neonate (n = 2); G2- Young (n = 2); G3- Adult (n = 3) and G5-Senile (n = 4). In the PVN of the agouti two magnocellular regions and six parvocellular regions were observed. Quantitative analysis showed that the PVN of senile animals, when compared to neonates, shows a 317% increase in total nucleus volume and 291% increase in total volume occupied by non-neuronal components. It also showed that the number of young and senile neurons, when compared with neonates, had a 114% increase. For adults, when compared with neonates, had a 109% increase. Therefore, our data indicate that PVN of senile agouti presents hypertrophy and may be associated with neuronal hyperplasia when compared to neonates.

Keywords: Postnatal development, Paraventricular nucleus, hypothalamus, Neurons, Stereology, Maturation, Aging

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Imagem ilustrativa de uma secção sagital de encéfalo de rato, no qual esquematiza os principais núcleos e regiões do hipotálamo. (Ac) comissura anterior; (AHA) área hipotalâmica anterior; (ArC) Núcleo arqueado; (DHA) Área hipotalâmica dorsal; (DLPO) Área pré-óptica dorsolateral; (DMH) núcleo dorsomedial; (LHA) área hipotalâmica lateral; (MM) núcleo mamilar medial; (MnPO) núcleo pré-óptico mediano; (MPA) área pré-óptica medial; (och) quiasma óptico; (PHA) área hipotalâmica posterior; (PaV) núcleo paraventricular do hipotálamo; (SCh) núcleo supraquiasmático; (SO) núcleo supraóptico; (RMM) núcleo retromamilar medial; (VLPO) núcleo pré-óptico ventrolateral; (VMH) núcleo ventromedial. (Adaptado de Saper e Lowell, 2014)..... 23

Figura 2- Divisões funcionais do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). O PVN é formado por subdivisões: magnocelulares contendo neurônios que sintetizam vasopressina (VP) ou ocitocina (OT) e se projetam para a neurohipófise, da qual esses hormônios são secretados para a corrente sanguínea (anterior); parvocelulares sintetiza o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e controla as células corticotrópicas presentes na adenohipófise sintetizando o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (mediana); e uma subdivisão posterior contendo neurônios sintetizando VP, OT, CRH, angiotensina II e glutamato e projetando-se a medula ventrolateral rostral (RVLM) e a coluna intermédio lateral da medula (IML) (posterior). (Adaptado de Benarroch, et al., 2005)..... 25

Figura 3- Imagens esquemática dos Atlas Níveis 21-27 do atlas de referência (Swanson, 2004), esquematizando as subdivisões do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH: parte magnocelular anterior (PVHam), parte magnocelular medial (PVHmm), zona medial da parte posterior magnocelular (PVHpmm) e zona lateral da parte posterior magnocelular (PVHpml), parvicelular anterior (PVHap), zona dorsal da parte parvicelular medial (PVHmpd) e parte periventricular (PVHpv), zona ventral da parte medial parvicelular (PVHmpv), parte parvicelular dorsal (PVHdp), parte parvicelular lateral (PVHlp) e parte forniceal (PVHf)). Abreviaturas: (ac) comissura anterior; (AHN) núcleo hipotalâmico anterior; (BST) leito dos núcleos da estria terminal; (fx) fórnix; (Eu) área internuclear; (mct) trato cortico-hipotalâmico medial; (NMP) núcleo pré-óptico medial; (MPO) área pré-óptica medial; (DP) núcleo pré-óptico posterodorsal; (PVa) parte anterior do núcleo hipotalâmico periventricular; (PVi) parte intermediária do núcleo hipotalâmico periventricular; (PVpo) núcleo periventricular pré-óptico; (TVP) núcleo talâmico paraventricular; (RE) núcleo reuniens; (SBPV) hipotálamo da zona subparaventricular; (V3h) parte hipotalâmica do terceiro ventrículo; (VMH) núcleo hipotalâmico ventromedial; (ZI) zona incerta. (Adaptado de Simmons e Swanson, 2009). ... 28

Figura 4 Esquemas para visualizar a integração entre os vários tipos de células e as áreas do PVN. (A) visão lateral do PVN por meio de um corte sargital e (B) visão superior do NPV por meio de um corte horizontal. parte magnocelular anterior (am), parte magnocelular medial (mm), parte posterior magnocelular (pm), parvicelular anterior (ap), parvicelular medial (mp), parte periventricular (pv), parte medial parvicelular (mp), parte parvicelular dorsal (dp), parte parvicelular lateral (lp). (Adaptado de Swanson e Kuypers, 1980). 29

Figura 5 Ilustração esquemática do processo de sinalização e retransmissão de sinais para as células pré-autonômicas do PVN. A) corte sagital do encéfalo de ratos mostrando localização dos núcleos cerebrais que tem papel importante na regulação simpática por meio do PVN; B) Diagrama de fluxo esquematizando as entradas e saídas neuronais pré-simpática do NPV que são responsáveis pela regulação simpática. (SFO) Órgão subfornical; (OVLT) Órgão vasculoso da lâmina terminal; (Arc) núcleo arqueado; (NTS) Núcleo do trato solitário; (MnPO) núcleo mediano preóptico; (PVN) núcleo paraventricular do hipotálamo; (RVLM) medula rostroventrolateral. (Adaptado de Dampney, et. al, 2018). 30

Figura 6 - Demonstrativo dos mecanismos de regulação dos neurônios responsáveis pelo controle simpático no PVN. A angiotensina II circulante (Angio II) atua via receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) no órgão subfornical (SFO). Este, por sua vez, envia projeções excitatórias de Angio II e atuam via neurônios glutamatérgicos locais que ativam o neurônio do NPV por meio dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). A ativação do receptor NMDA leva à produção de óxido nítrico (NO) por meio de nNOS, que potencializa os efeitos inibitórios. Essa inibição é mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), por meio de receptores GABA_A. (Adaptado de Benarroch et al., 2005) 32

Figura 7 Representação temporal de alguns processos do desenvolvimento pré-natal e pós-natal do SNC em humanos (Adaptado Rice; Barone, 2000) 33

Figura 8 Representação temporal de alguns processos do desenvolvimento pré-natal e pós-natal do SNC em roedores (ratos e camundongos) (Adaptado de Rice; Barone, 2000). 34

Figura 9 Foto de uma Cutia macho com cerca de 12 meses de idade em cativeiro. 36

Figura 10 Encéfalo de uma Cutia macho com cerca de 12 meses de idade. 41

Figura 11 Esquema representativo do regime de amostragem para a obtenção das secções histológicas do encéfalo da cutia. Em resumo o encéfalo da cutia (1) foi dissecado e individualizado (2), cada encéfalo foi embebido em tissue tech[®] e cortado em criostato (3) obtendo secções de 30µm. Cada secção foi lavada em PBS e sequencialmente depositados em 7 poços (4), posteriormente as secções de um dos poços foram montadas imediatamente em lâminas gelatinizadas (5) não quais foram realizadas as análises estereológicas. 43

Figura 12 - Secção do NPV demonstrando a aplicação do Princípio de Cavalieri para a estimativa do volume do núcleo. Observa-se o sistema teste utilizado para a quantificação (cruzes verdes) a/p 12406,11mm². Coloração: Nissl. Escala de barra: 500 µm (4x). 46

Figura 13 – Demonstração da obtenção das imagens para a realização do método de Delesse para estimativa de densidade de volume dos neurônios. Na imagem superior tem-se a delimitação do PVN, dentro deste foram obtidas 2 imagens (aumento 40X) de ambos os lados de forma aleatória. A partir dessas imagens, foi aplicado um sistema teste (cruzes pretas). Coloração Nissl. Escala de barra 50µm. 48

Figura 14 Imagem (40x) representativa do nucleator para estimativa do volume médio neuronal. Linhas verdes são os pontos de contato. Setas amarelas representam os pontos de toque das linhas na membrana do neurônio. Coloração: Nissl; Escala de barra: 50µm... 50

Figura 15 Imagem (40x) representativa do grid do fractionator óptico para estimativa do número médio de neurônios. Linhas vermelhas são de inclusão e linhas amarelas são de exclusão; pontos amarelos correspondem aos neurônios contabilizados na área do grid. Coloração: Nissl; Escala de barra: 50µm. 51

Figura 16 Desenho esquemático mostrando (A) secção do encéfalo e delimitação da área de interesse dentro da secção. Nesta foi aplicado um Grid (B) o qual foi definido para regular os locais a serem observados, nestes serão aplicados os frames (quadrados vermelhos). Cada frame (B1) será composta por uma linha vermelha que representa uma linha de inclusão e uma amarela representando uma linha de exclusão, para realizar contagem de número de células nervosas. Paralelamente a isso, foi aplicado o nucleator de seis pontos (B2) para a quantificação do volume médio dos neurônios. De modo, que cada frame será analisado por todo o eixo Z (C). No entanto, o eixo Z de análise foi padronizado com 20 µm retirando as zonas de guardas da espessura total da secção (30µm). 52

Figura 17 Imagens mostrando seis planos focais subsequentes (1,2,3,4,5 e 6) em que aparecem três neurônios à medida que se aprofunda no eixo Z da secção e são amostrados utilizando a frame. Coloração: Nissil. Escala de barra: 50 µm..... 53

Figura 18 Fotomicrografias de secções coronais do PVN da Cutia (*Dasyprocta aguti*) delimitando as subdivisões do núcleo observadas em lâmina coradas com Tionina pela técnica de Nissl. Mostrando desde o nível mais rostral em (A) ao nível mais caudal em (H) com distancias de cerca de 210µm entre as secções. Imagem (A) porção mais anterior do núcleo em que se observa as seguintes áreas: (ap) região parvocelular anterior; (mm) região magnocelular medial; (pv) região periventricular; (3V) terceiro ventrículo. (B) porção em que se observa um aumento nas dimensões do núcleo apresentando um aumento na porção (mm) e (ap) quando comparado com a imagem (A). (C) observa-se um alongamento do núcleo ocupando mais a margem superior do 3V, podendo observar as seguintes subdivisões: (dp) região parvocelular dorsal; (mp) região parvocelular medial; (mm) região magnocelular medial; (ml) região magnocelular lateral; (vp) região parvocelular ventral. (D) e (E) nestas imagens mantem-se as regiões descritas na imagem (C), observando apenas, algumas alterações nas extensões dessas regiões. (F) observa um achatamento crânio-caudal e um alongamento medial-lateral do núcleo, podendo delimitar as seguintes regiões: (mm) região magnocelular medial; (lm) região magnocelular lateral; (Ppo) região parvocelular posterior. (G) porção posterior do PVN em que ainda se observa as regiões (mm), (lm) e (Ppo), no entanto, a região (lm) apresentam uma redução de tamanho considerável levando a crer que está chegando a sua delimitação posterior. (H) porção mais posterior do PVN em que se observa as regiões (mm) e (Ppo). Essas delimitações foram realizadas com o auxílio dos atlas Paxinos e Watson (2007), Swanson (2004) e Paxinos e Franklin (2008). 58

Figura 19 Fotomicrografias dos cortes coronais do PVN da cutia imunomarcado **Erro!**
Indicador não definido.

Figura 20 - Gráfico representativo da estimativa de volume do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) nos diferentes grupos pós-natal (G1- 01 a 03 dias; G2- 1 mês; G3- 12 meses; G4- 36 meses). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais o erro padrão da média. O (*) representa onde foi observada diferença estatisticamente significativas com $p= 0,030$ 59

Figura 21 Gráfico representativo da densidade de volume de neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) nos diferentes grupos etários (G1- 01 a 03 dias; G2- 1 mês; G3- 12 meses; G4- 36 meses). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais o erro padrão da média. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes com $p=0,442$ 60

Figura 22 - Gráfico representativo do volume total de neurônios presentes no núcleo paraventricular das cutias nos diferentes grupos etários (G1- 01 a 03 dias; G2- 1 mês; G3- 12 meses; G4- 36 meses). As barras verticais representam as médias dos grupos, as barras horizontais o erro padrão da média. $p= 0,085$ 61

Figura 23 Gráfico representativo do volume total de tecido não neuronal (células da glia, tecido conjuntivo, vasculatura, fibroblastos e outros tipos celulares) presentes no núcleo paraventricular das cutias nos diferentes grupos etários (G1- 01 a 03 dias; G2- 1 mês; G3- 12 meses; G4- 36 meses). As barras verticais representam as médias dos grupos, as barras horizontais o erro padrão da média. $p=0,042$ 62

Figura 24 Gráfico representativo do volume neuronal médio do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) nos diferentes grupos etários (G1- 01 a 03 dias; G2- 1 mês; G3- 12 meses; G4- 36 meses). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais o erro padrão da média. Não foi observado diferença estatisticamente significativa com $p= 0,224$ 63

Figura 25 Gráfico representativo do *número total de neurônios* no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) nos diferentes grupos etários (G1- 01 a 03 dias; G2- 1 mês; G3- 12 meses; G4- 36 meses). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais o erro padrão da média. Os (*) representam onde foram observadas diferenças estatisticamente significativas com $p= 0,055$ 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição dos grupos por faixa etária 39

Tabela 2 – Peso (g), comprimento, largura e altura dados em milímetros (mm) do encéfalo das cutias durante o desenvolvimento pós-natal. 55

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Comissura Anterior
a/p	Área por ponto do sistema teste utilizado
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AHA	Área Hipotalâmica Anterior
am	Parte magnocelular anterior
AMPA metil-D-aspartato)	(α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-propionato) e NMDA (N-
ANGIO II	Angiotensina II
ap	Região parvocelular anterior
ArC	Núcleo arqueado
Asf	Fração das áreas das secções histológicas amostradas
AT1	Receptor de angiotensina tipo 1
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CV	Coeficiente de variação
CVLM	Medula caudoventrolateral
DA	Dopamina
DHA	Área hipotalâmica dorsal
DLPO	Área pré-óptica dorsolateral
DMH	Núcleo dorsomedial
Dp	Região parvocelular dorsal
EPM	Erro padrão da média
f_1^{-1}	Inverso da fração da distância entre as secções utilizadas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GRH	Hormônio liberador de hormônio do crescimento
Hsf contagem	Fração da espessura do corte efetivamente utilizada para
IBAMA Renováveis	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

IML	Coluna intermédio lateral da medula
IP	Intraperitoneal
LHA	Área hipotalâmica lateral
Im	Região magnocelular lateral
Ip	Região parvicelular lateral
MM	Núcleo mamilar medial
mm	Região magnocelular medial
MnPO	Núcleo mediano preóptico
Mp	Região parvocelular medial
MPA	Área pré-óptica medial
N:	Número total de neurônios
NO	Óxido nítrico
NTS	Núcleo do trato solitário
OCH	Quiasma óptico
ONU	Organização das Nações Unidas
OT	Ocitocina
OVLT	Órgão vascularizado da lâmina terminal
PaV	Núcleo paraventricular do hipotálamo
PBS	Tampão fosfato salino
PHA	Área hipotalâmica posterior
pm	Região posterior magnocelular
PN _{PVN}	Número de pontos do sistema que tocam os corpos celulares
Ppo	Região parvocelular posterior
PT _{PVN}	Número de pontos que tocam todo o espaço de interesse
pv	Região periventricular
PVHam	Parte magnocelular anterior
PVHap	Parte parvicelular anterior
PVHdp	Parte parvicelular dorsal
PVHf	Parte forniceal
PVHlp	Parte parvicelular lateral
PVHmm	Parte magnocelular medial

PVHmpd	Zona dorsal da parte parvicelular medial
PVHmpv	Zona ventral da parte medial parvicelular
PVHpml	Zona lateral da parte posterior magnocelular
PVHpmm	Zona medial da parte posterior magnocelular
PVHpvp	Parte periventricular
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
Q ⁻ óticos	Número de partículas (neurônios) amostradas em dissector
RMM	Núcleo retromamilar medial
RVLM	Medula rostroventrolateral
SCh	Núcleo supraquiasmático
SFO	Órgão subfornicial.
SNC	Sistema Nervoso Central
SO	Núcleo supraóptico
SS	Somatostatina (SS)
ssf	Fração das secções histológicas amostradas
t	Espessura média das secções histológicas
TRH	Hormônio liberador de tireotropina
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semiárido Nordeste
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
VLPO	Núcleo pré-óptico ventrolateral
VMH	Núcleo ventromedial.
V _N	Volume neuronal médio
VP	Vasopressina
V _p	Região parvocelular ventral
V _{refPVN}	Volume total do núcleo
V _{tot}	Volume total ocupado pelos neuronal
V _v	Densidade de Volume dos neurônios
Σ _p	Somatório dos pontos que tocam o alvo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 JUSTIFICATIVA E HIPOTESE	21
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	22
3.1 Perspectiva geral do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN): estrutura e funções	22
3.1.1 Divisões funcionais e citoarquitetura do PVN	24
3.1.1.1 Divisão neuroendócrina magnocelular	26
3.1.1.2 Divisão neuroendócrina parvocelular	27
3.2 Aspectos morfofuncionais do desenvolvimento pós-natal do SNC	32
3.3 Aspectos quantitativos tridimensionais no sistema nervoso central	35
3.3 Modelo experimental	35
4 OBJETIVOS	38
4.1 Objetivo geral	38
4.2 Objetivos específicos	38
5 MATERIAS E MÉTODOS	39
5.1 Animais	39
5.1.2 Eutanásia	40
5.1.3 Perfusão	40
5.1.4 Dissecção e individualização do encéfalo	40
5.2 Processamento histológico	41
5.2.1 Técnica de Nissl	44
5.2.3 Análise das imagens	44
5.3 Estudo estereológico	45
5.3.1 Estimativa de volume do NPV	45
5.3.2 Densidade de volume dos neurônios no NPV ($V_{V_{NPV}}$)	46
5.3.3 Volume total ocupado pelos neurônios no PVN	49
5.3.4 Volume neuronal médio do PVN	49
5.3.5 Número total de neurônios do NPV	50
5.4 Análise estatística	54
6 RESULTADOS	55
6.1 Análise macromorfométrica do encéfalo	55
6.2 Citoarquitetura do PVN da Cutia (<i>Dasyprocta aguti</i>)	55

6.3	Parâmetros estereológicos	59
6.3.1	Volume referência do PVN ($V_{ref_{PVN}}$)	59
6.3.2	Densidade de Volume dos neurônios no PVN ($V_{V_{neurônios\ PVN}}$).....	60
6.3.3	Volume total ocupado pelos neurônios no PVN ($V_{tot_{neuronal}}$).....	61
6.3.4	Volume total de tecido não neuronal no PVN ($V_{tot_{outros}}$).....	62
6.3.5	Volume neuronal médio (V_N)	63
6.3.6	Número total de neurônios no PVN (N:).....	64
7	DISCUSSÃO	65
7.1	Micromorfometria	65
7.2	Dados quantitativos.....	66
7.2.1	Volume do PVN.....	67
7.2.2	Volume total neuronal e tecido não neuronal.....	68
7.2.3	Volume neuronal médio.....	69
7.2.4	Número total de neurônios.....	69
8	CONCLUSÃO	73
9	ANEXOS	74
10	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

O hipotálamo é uma região da parte central do sistema nervoso (SNC) localizada no diencéfalo, que se encontra ventralmente ao tálamo, formando o assoalho do terceiro ventrículo. É composto por vários núcleos, em que cada núcleo apresenta funções e conexões específicas, entre estes está o núcleo paraventricular (PVN) (Simerly, 2004; Biran, et al, 2015).

O PVN é crucial na integração de respostas autonômicas e neuroendócrinas mediante alguns estímulos, sendo, desse modo, um dos centros de controle autonômicos mais importantes (Ferguson; Latchford; Samson, 2008; Affleck; Coote; Pyner, 2012). Este possui papel fundamental no que se refere à regulação do tônus simpático na saúde ou na doença, estando parcialmente relacionado a desregulação do sistema nervoso encontrada na insuficiência cardíaca, por exemplo (Benarroch, 2005; Pyner, 2014; Mcbryde, et al., 2018; Dampney, et al., 2018).

O desenvolvimento é um processo que se inicia a partir do momento da concepção e permanece durante o decorrer da vida do indivíduo. Algumas etapas do desenvolvimento da parte central do sistema nervoso (SNC) tem seu fim ainda no pré-natal (ainda intra-útero), enquanto outros se prolongam durante o período pós-natal, processo esse que se observa tanto em humanos como em roedores (ratos e camundongos) (Rice; Barone, 2000).

No decorrer do desenvolvimento, ocorre ganhos e perdas de funções, como por exemplo: durante o processo de envelhecimento, ocorre uma perda progressiva de várias funções fisiológicas, que podem levar a várias alterações no organismo, como declínio no metabolismo, mudanças nas funções hormonais, no ritmo circadiano, na cognição e na reprodução. Observa-se também alterações estruturais e funcionais em sistemas regulatórios, como o sistema endócrino e autônomo (Roberts et al. 2012; Pal et al. 2014; Kim e Choe, 2018).

O PVN é um centro importante de controle simpático no SNC, pois apresenta neurônios pré-autonômicos que enviam sinais de forma direta ou indireta para os neurônios simpáticos pré-ganglionares. Diante disso, o entendimento da dinâmica neuronal desse núcleo durante o desenvolvimento pós-natal é importante para que

possa analisar se algumas das alterações autonômicas decorrentes do envelhecimento podem ser atribuídas a ela.

A cutia (*Dasyprocta aguti*) é um mamífero silvestre pertencente à ordem *Rodentia*, família *Dasyproctidae*, gênero *Dasyprocta*. Está distribuído nos biomas mundiais, são encontrados em todos os estados da região Nordeste do Brasil (Moojen, 1952; Lacher, 1981; Pinheiro, 1989; Barbosa et al., 2008) e atualmente vem sendo usada como modelo experimental em algumas pesquisas. A cutia é o terceiro maior roedor brasileiro seguido apenas da capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e da paca (*Agouti paca*) (Silva et al., 2014). Os roedores, em geral, por apresentarem aspectos característicos, tais como tamanho adequado e baixo custo de manutenção, são considerados bons modelos de animais experimentais. No entanto, o interesse pela utilização de roedores silvestres, principalmente como modelo de desenvolvimento pós-natal tem crescido nos últimos anos (Ribeiro, 2004; Melo et al., 2009; Abrahão et al., 2009; Ladd et al., 2012; Cavalcanti et al., 2014). Logo, estudo com esse roedor de médio porte poderá proporcionar correlações com mamíferos de maior superfície corpórea, que será de grande importância para a evolução da neuroanatomia veterinária, como também fornece um modelo com hábitos e comportamentos diferentes de roedores de laboratório.

Objetivamos com este estudo, por meio da análise morfoquantitativa (estereológica) do PVN de cutias em diferentes faixas etárias, avaliar a dinâmica neuronal pós-natal neste núcleo realizando a estimativa volumétrica do núcleo e seus componentes, bem como a quantificação do número de neurônios em quatro fases diferentes do desenvolvimento pós-natal, permitindo analisar o efeito deste processo sobre estes parâmetros.

Logo, buscamos fornecer dados morfoquantitativos que possam contribuir com o entendimento de como o núcleo hipotalâmico se comporta com o processo de desenvolvimento pós-natal, fornecendo bases estruturais para possíveis alterações associadas à dinâmica do PVN.

2 JUSTIFICATIVA E HIPOTESE

A população mundial encontra-se em um processo de transição que resultará em uma população predominantemente idosa, segundo a Organização das Nações Unidas (ONU). Atualmente cerca de 841 milhões de pessoas encontram-se com mais de 60 anos e estima-se que até o ano de 2050 esse número passe a 2 bilhões de pessoas. Com isso, acredita-se que até o ano de 2020 o número de pessoas acima de 60 anos será superior ao número de crianças até cinco anos (Lakatta e Sollot, 2002; Lakatta e Levy, 2003; Meersman e Stein, 2007; Nakou, et. al, 2016). Conseqüentemente, informações sobre as alterações estruturais e funcionais associadas à idade na ausência de doença têm se tornado essenciais, com o intuito de definir às características específicas do processo de envelhecimento que tornam a idade um potencial fator de risco, principalmente para doenças cardiovasculares.

Diante disso, hipotetizamos que o PVN possa sofrer alterações morfológicas durante o desenvolvimento pós-natal, podendo estas serem umas das causas das doenças que acometem o idoso com envelhecimento normal, podendo levar a uma desregulação e hiperatividade simpática. Desse modo, a observação dessas alterações pode auxiliar no entendimento da etiologia dessas doenças que aparecem no indivíduo senil.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 Perspectiva geral do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN): estrutura e funções

A homeostase é um artifício usado pelo corpo no qual responde a alterações dos estímulos ambientais por meio de respostas equilibradas. Diante disso, essas respostas são responsáveis por regular o meio interno com o intuito de manter um ambiente estável (West, 2010; Cannon, 1932). O organismo pode ser acometido por diversas patologias quando ocorre um desequilíbrio na homeostase. Variados mecanismos atuam na manutenção da homeostase, entre eles encontram-se a regulação neuroendócrina e autonômica originada no SNC.

No SNC, o hipotálamo apresenta papel crucial no processo de regulação da homeostase por meio da integração e do processamento de sinais sensoriais internos e externos que desencadeiam processos regulatórios autonômicos, neuroendócrinos, fisiológicos e comportamentais (Snell, 2011). Desempenhando também um papel importante na manutenção da homeostase cardiovascular (Swanson e Sawchenko, 1983; Biran, et, al, 2015).

O hipotálamo é uma porção do diencefalo que ocupa cerca de metade da porção ventral desta região, e se encontra ventralmente ao tálamo. Forma o assoalho e a porção inferior das paredes laterais do terceiro ventrículo, localizando-se bem acima da hipófise. Dorsalmente, é delimitado, em todo o seu comprimento, pela zona incerta e borda medial do pedúnculo cerebral e caudalmente, o hipotálamo une-se à substância cinzenta periaquedutal e à área tegmental ventral do mesencefalo (Simerly, 2004).

O hipotálamo pode ser dividido em três zonas e quatro regiões. Sendo no seu sentido rostro-caudal dividido em: região pré-óptica, região anterior, região tuberal e região mamilar (Clark, 1938). Como também, segundo Crosby e Woodburn (1939), em seu sentido látero-lateral pode ser dividido em três zonas: sendo a camada de células em torno do terceiro ventrículo nomeada de zona periventricular; o conjunto de células seguintes, onde se encontra a maioria dos núcleos, nomeado por zona medial e a camada mais externa por zona lateral (Crosby e Woodburn, 1939). Além

dessas divisões, o hipotálamo é composto por vários núcleos, entre estes está o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que tem sua porção ventral iniciando na região pré-óptica e o restante está situado na região anterior (Fig. 1) do hipotálamo, como também, tem sua maior extensão presente na zona medial (Saper e Lowell, 2014; Biran, et, al, 2015).

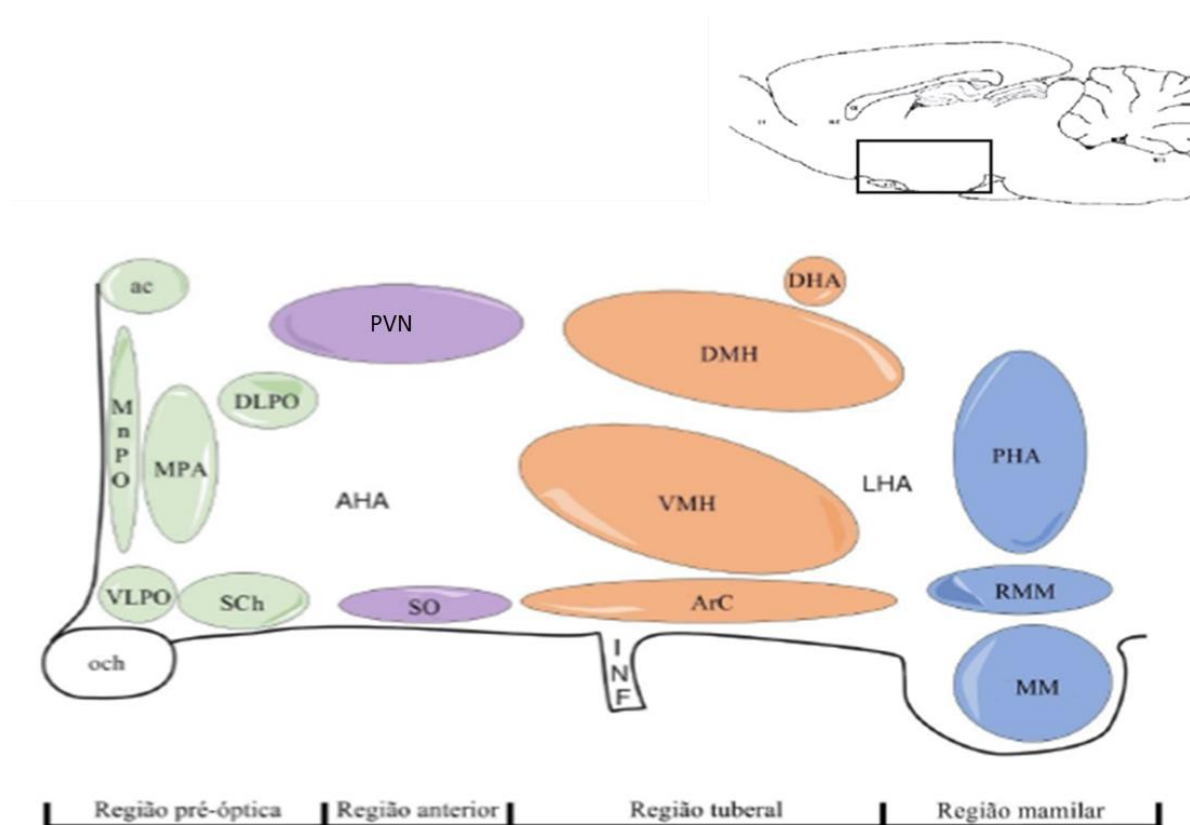


Figura 1 Imagem ilustrativa de uma secção sagital de encéfalo de rato, no qual esquematiza os principais núcleos e regiões do hipotálamo. (Ac) comissura anterior; (AHA) área hipotalâmica anterior; (ArC) Núcleo arqueado; (DHA) Área hipotalâmica dorsal; (DLPO) Área pré-óptica dorsolateral; (DMH) núcleo dorsomedial; (LHA) área hipotalâmica lateral; (MM) núcleo mamilar medial; (MnPO) núcleo pré-óptico mediano; (MPA) área pré-óptica medial; (och) quiasma óptico; (PHA) área hipotalâmica posterior; (PVN) núcleo paraventricular do hipotálamo; (SCh) núcleo supraquiasmático; (SO) núcleo supraóptico; (RMM) núcleo retromamilar medial; (VLPO) núcleo pré-óptico ventrolateral; (VMH) núcleo ventromedial. (Adaptado de Saper e Lowell, 2014)

O PVN é crucial na integração de respostas autonômicas e neuroendócrinas mediante alguns estímulos, sendo, desse modo, um dos centros de controle autonômicos mais importantes desempenhando papel fundamental na regulação do estresse, do metabolismo, do crescimento, da reprodução e de alguns sistemas como

o gastrointestinal, cardiovascular e renal, buscando sempre a homeostase (Ferguson, et. al., 2008; Affleck, et. al., 2012).

Este núcleo é uma complexa estrutura efetora que se mostra crucial para propiciar respostas endócrinas e autonômicas necessárias para a manutenção da homeostase do sistema cardiovascular, buscando adaptação aos estressores internos e externos (Benarroch, 2005; Lowen, et. al, 2017). Como também, possui papel fundamental no que se refere à regulação do tônus simpático na saúde ou na doença, estando parcialmente relacionado a desregulação do sistema nervoso encontrado na insuficiência cardíaca, por exemplo (Benarroch, 2005; Pyner, 2014). Relata-se também que o PVN está envolvido em quadros hipertensivos e de síndrome metabólica (Mcbryde, et, al, 2018; Dampney, et. al, 2018).

3.1.1 Divisões funcionais e citoarquitetura do PVN

O PVN foi observado pela primeira vez no encéfalo de gambá (Ziehen, 1901), e com o decorrer do tempo, vários pesquisadores observaram essa estrutura em outros animais como cobaia, coelho, rato e ser humano. Desse modo, essa estrutura foi inicialmente descrita como uma porção medial de células intimamente associadas com a área periventricular do hipotálamo (Simmons e Swanson, 2008).

Posteriormente, esta estrutura foi estudada e descrita mais extensivamente. Com isso, atualmente, sabe-se que o PVN do rato apresenta cerca de 10 mil neurônios em uma estrutura em forma de asa com volume de 0,5 mm³ em cada lado do terceiro ventrículo (Simmons e Swanson, 2008).

Após vários anos de estudo, conhece-se que o PVN é um núcleo integrativo, que pode ser dividido de acordo com sua estrutura e hodologia em três porções distintas com populações de neurônios separadas (Fig. 2), os quais apresentam conexões, funções, características citológicas e neuroquímicas diferentes (Simmons e Swanson, 2009). Essas divisões são denominadas como: neuroendócrina magnocelular, neuroendócrina parvocelular e descendente (Benarroch, 2005; Ferguson et. al., 2008; Simmons e Swanson, 2009; Manojlović-stojanoski et al., 2016; Lowen, 2017).

Esses conjuntos de células possuem papel importante no processo de regulação de vários sistemas, principalmente do sistema cardiovascular, tanto por meio de regulações endócrinas como regulação por meio do sistema nervoso autônomo.

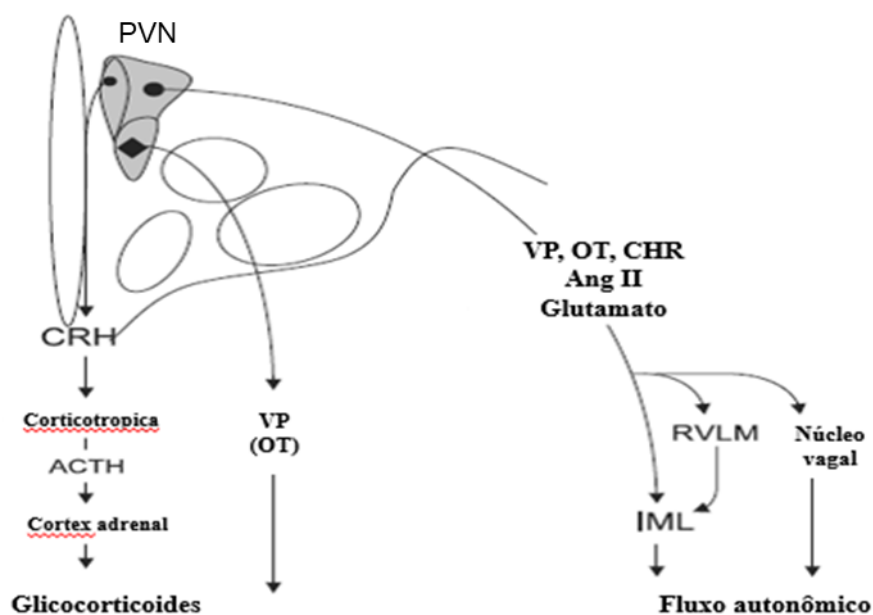


Figura 2- Divisões funcionais do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). O PVN é formado por subdivisões: magnocelulares contendo neurônios que sintetizam vasopressina (VP) ou ocitocina (OT) e se projetam para a neurohipófise, da qual esses hormônios são secretados para a corrente sanguínea (anterior); parvocelulares sintetiza o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e controla as células corticotrópicas presentes na adenohipófise sintetizando o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (mediana); e uma subdivisão posterior contendo neurônios sintetizando VP, OT, CHR, angiotensina II e glutamato e projetando-se a medula ventrolateral rostral (RVLM) e a coluna intermédia lateral da medula (IML) (posterior). (Adaptado de Benarroch, et al., 2005)

3.1.1.1 Divisão neuroendócrina magnocelular

Essa divisão é formada por dois grupos de neurônios grandes distintos que sintetizam principalmente os hormônios ocitocina (OT) e vasopressina (VP) (Simmons e Swanson, 2009). Essas células se projetam para a neurohipófise, onde, diante de estímulo, secretam as OT e VP na corrente sanguínea sistêmica (Benarroch, 2005; Baldasso et. al, 2007; Lowen, 2017). Esses hormônios quando liberadas atuam em vários receptores sistêmicos.

Também conhecido como hormônio antidiurético, a VP tem sua síntese e liberação controlada por meio da intensidade do estímulo em barorreceptores presentes no arco aórtico e no seio carotídeo que se comunicam com o SNC por meio do nervo vago. A redução do estímulo nesses barorreceptores é um grande estímulo para a produção de VP, como por exemplo em casos de hipovolemia e hipotensão (Baldasso et. al, 2007).

Ela pode proporcionar vasodilatação em alguns órgãos, vasoconstrição em alguns vasos e regulação osmótica por meio de sua atuação nos ductos renais em casos como de desidratação e queda da pressão arterial (Baldasso et. al, 2007).

Já a OT é amplamente conhecida como um hormônio que facilita a contração do músculo liso do útero no momento do parto e a ejeção de leite durante a lactação (Gimpl e Fahrenholz, 2001). No entanto, atualmente sabe-se que a OT está intimamente relacionada com a VP, desempenhando um importante papel no desenvolvimento cognitivo, no comportamento social e atuando indiretamente como antiestressor (Carter et al. 1992; Insel e Hulihan, 1995; Dacome & Garcia, 2008).

Esta divisão, por sua vez, pode ser subdividida, em 4 áreas, de acordo com sua localização: parte magnocelular anterior (PVHam), parte magnocelular medial (PVHmm), zona medial da parte posterior magnocelular (PVHpmm) e zona lateral da parte posterior magnocelular (PVHpml) (Fig.3 e 4) (Simmons e Swanson, 2009).

3.1.1.2 Divisão neuroendócrina parvocelular

É formada por populações separadas de neurônios que sintetizam o hormônio liberador de corticotropina (CRH), somatostatina (SS), o hormônio liberador de tireotropina (TRH), a dopamina (DA) e hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH) (Benarroch, 2005; Simmons e Swanson, 2009). Esses neurônios, por sua vez, se projetam para a eminência mediana onde liberam esses hormônios que irão regular a secreção de hormônios na adenohipófise. Por exemplo, O CRH irá atuar na adenohipófise sinalizando para a produção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e este, por sua vez, irá atuar na glândula adrenal, ou seja, é responsável pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Esses neurônios atuarão na produção de catecolaminas pela adrenal que podem atuar em situações de estresse como também na regulação cardiovascular (Ferguson; Latchford; Samson, 2008; Benarroch, 2005).

Assim como a divisão neuroendócrina magnocelular, esta pode ser subdividida em três regiões: parte parvicelular anterior (PVHap), zona dorsal da parte parvicelular medial (PVHmpd) e parte periventricular (PVHpv) (Fig.3 e 4) (Simmons e Swanson, 2009).

3.1.2 Divisão descendente

É formado por um conjunto de neurônios que se projetam diretamente para núcleos pré-ganglionares simpáticos presentes na medula espinal, bem como, para outros núcleos autonômicos, incluindo o núcleo do trato solitário (NTS) e a medula rostroventrolateral (RVLM), desempenhando papel crucial na regulação do sistema nervoso simpático (Simmons e Swanson, 2008; Pyner, 2014; Dampney, et. al, 2018). Semelhante as outras duas divisões do PVN, esta pode ser subdividida em quatro regiões: zona ventral da parte medial parvicelular (PVHmpv), parte parvicelular dorsal (PVHdp), parte parvicelular lateral (PVHlp) e parte forniceal (PVHf) (Fig.3 e 4) (SIMMONS e SWANSON, 2009)

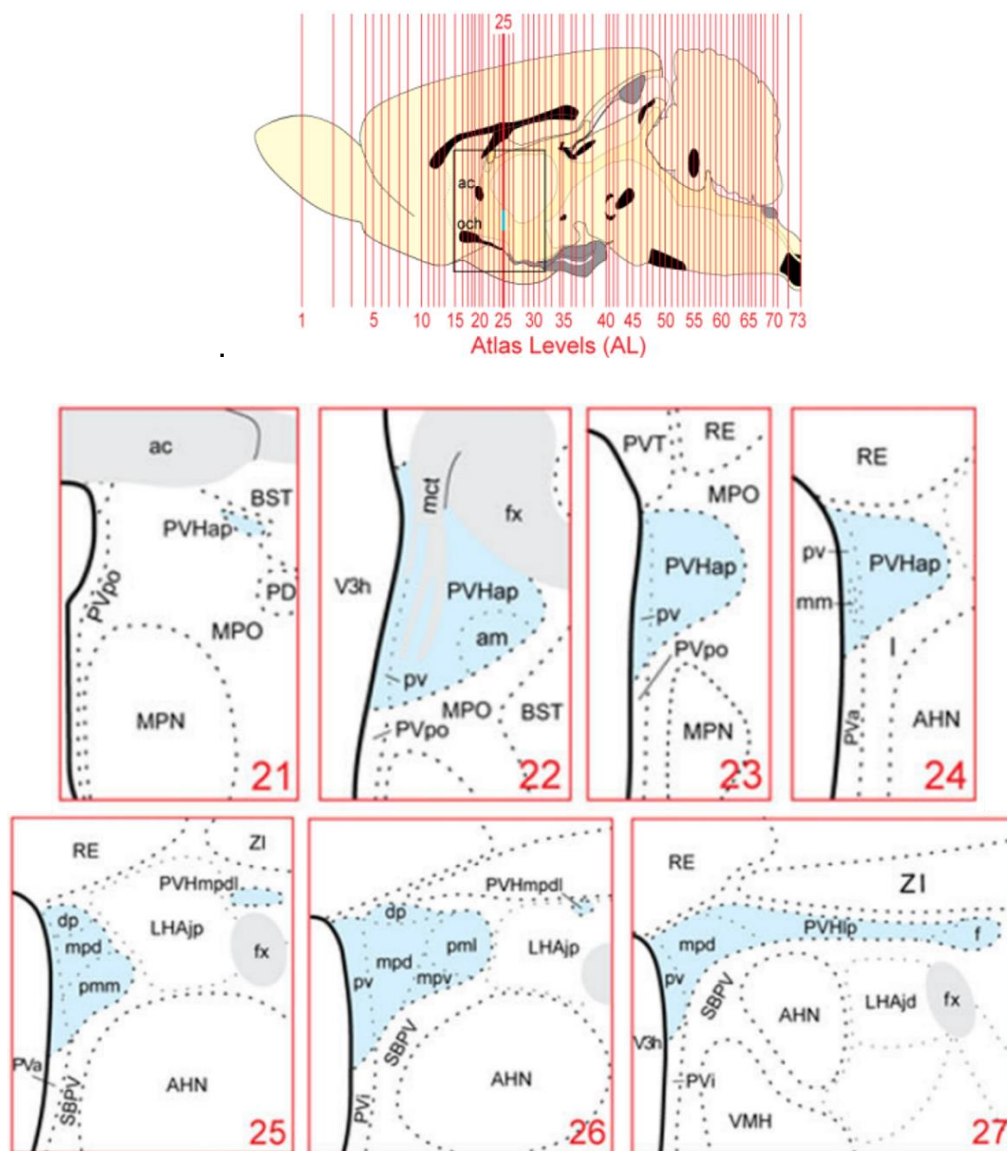
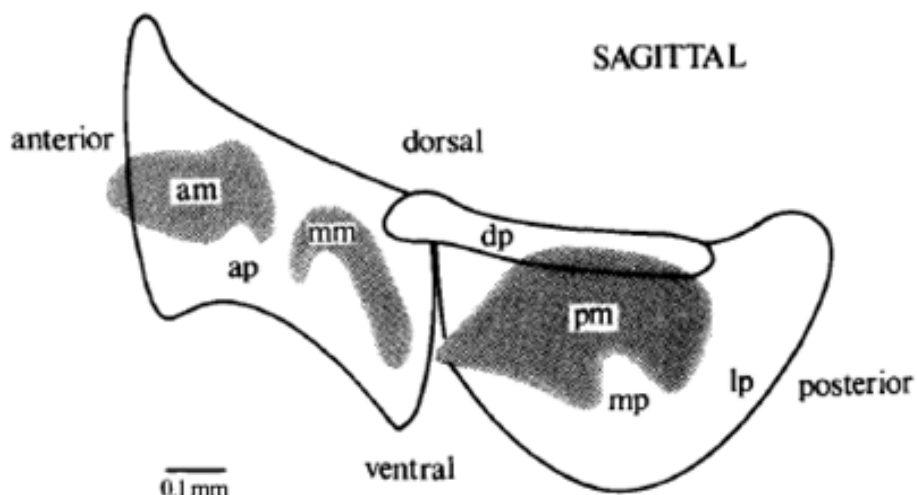


Figura 3- Imagens esquemática dos Atlas Níveis 21-27 do atlas de referência (Swanson, 2004), esquematizando as subdivisões do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH: parte magnocelular anterior (PVHam), parte magnocelular medial (PVHmm), zona medial da parte posterior magnocelular (PVHpm) e zona lateral da parte posterior magnocelular (PVHpl), parvicelular anterior (PVHap), zona dorsal da parte parvicelular medial (PVHmpd) e parte periventricular (PVHpv), zona ventral da parte medial parvicelular (PVHmpv), parte parvicelular dorsal (PVHdp), parte parvicelular lateral (PVHlp) e parte forniceal (PVHf)). Abreviaturas: (ac) comissura anterior; (AHN) núcleo hipotalâmico anterior; (BST) leito dos núcleos da estria terminal; (fx) fórnix; (Eu) área internuclear; (mct) trato cortico-hipotalâmico medial; (NMP) núcleo pré-óptico medial; (MPO) área pré-óptica medial; (DP) núcleo pré-óptico posterodorsal; (PVa) parte anterior do núcleo hipotalâmico periventricular; (PVi) parte intermediária do núcleo hipotalâmico periventricular; (PVpo) núcleo periventricular pré-óptico; (TVP) núcleo talâmico paraventricular; (RE) núcleo reuniens; (SBPV) hipotálamo da zona subparaventricular; (V3h) parte hipotalâmica do terceiro ventrículo; (VMH) núcleo hipotalâmico ventromedial; (ZI) zona incerta. (Adaptado de Simmons e Swanson, 2009).

A



B

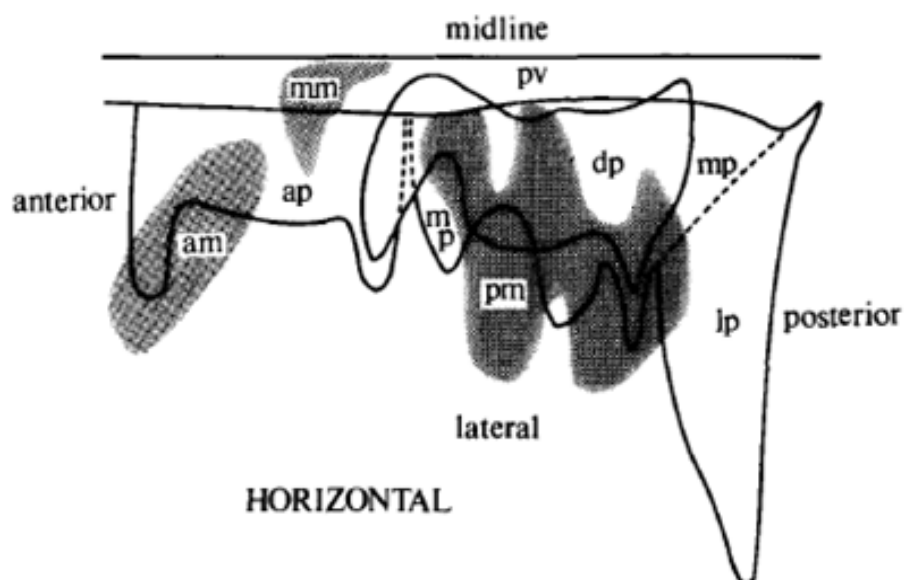


Figura 4 Esquemas para visualizar a integração entre os vários tipos de células e as áreas do PVN. (A) visão lateral do PVN por meio de um corte sargital e (B) visão superior do ~~N~~PVN por meio de um corte horizontal. parte magnocelular anterior (am), parte magnocelular medial (mm), parte posterior magnocelular (pm), parvicelular anterior (ap), parvicelular medial (mp), parte periventricular (pv), parte medial parvicelular (mp), parte parvicelular dorsal (dp), parte parvicelular lateral (lp). (Adaptado de Swanson e Kuypers, 1980).

Para que possa exercer suas funções essas células recebem informações aferentes oriundo de receptores viscerais que são retransmitidos por células do próprio NTS e do núcleo parabraquial, além da retransmissão de dados de

temperatura, angiotensina II circulante e outros fatores humorais pelo núcleo pré-óptico, o órgão subfornical e o órgão vascular da lâmina terminal. Também, recebem informações dos níveis de leptina e insulina por meio de retransmissão do núcleo arqueado (Pyner, 2014; Dampney, et. al, 2018). Desse modo, esses neurônios são responsáveis pelo controle de uma gama de variáveis fisiológicas por meio desses vários sinais recebidos (Fig 5).

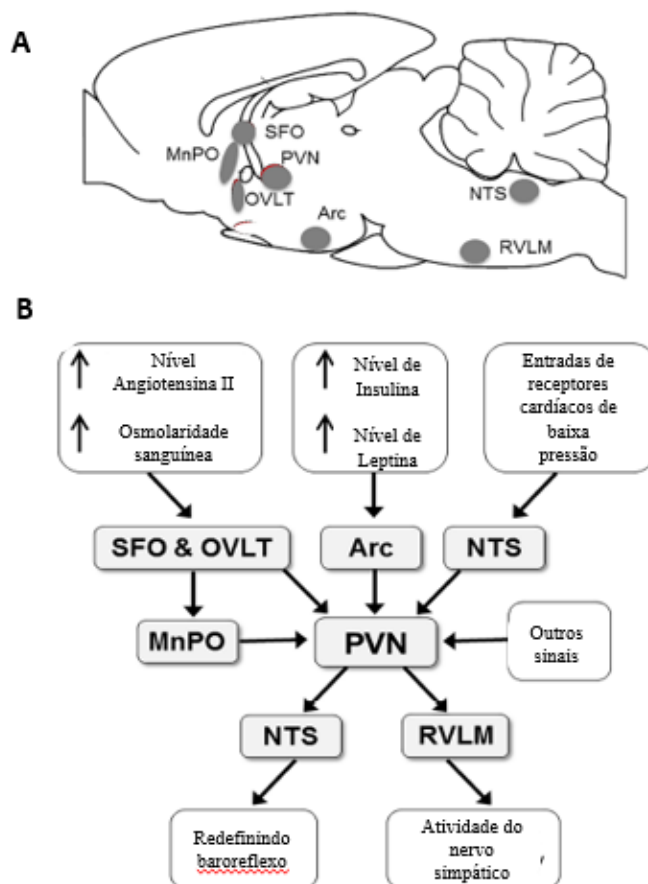


Figura 5 Ilustração esquemática do processo de sinalização e retransmissão de sinais para as células pré-autonômicas do PVN. A) corte sagital do encéfalo de ratos mostrando localização dos núcleos cerebrais que tem papel importante na regulação simpática por meio do PVN; B) Diagrama de fluxo esquematizando as entradas e saídas neuronais pré-simpática do NPV que são responsáveis pela regulação simpática. (SFO) órgão subfornical; (OVL) órgão vascular da lâmina terminal; (Arc) núcleo arqueado; (NTS) Núcleo do trato solitário; (MnPO) núcleo mediano pré-óptico; (PVN) núcleo paraventricular do hipotálamo; (RVLM) medula rostroventrolateral. (Adaptado de Dampney, et. al, 2018).

As informações enviadas para o PVN serão recebidas pelos neurônios pré-autonômicos parvocelulares que poderão enviar projeções diretas e indiretas para os neurônios pré-ganglionares simpáticos presentes na coluna intermédio lateral da medula espinal (IML). Esses, por sua vez, irão enviar fibras para os gânglios simpáticos onde sinalizarão para os neurônios pós-ganglionares participando, assim, da regulação do sistema nervoso simpático (Benarroch, 2005; Cravo, et al, 2006; Guyenet, 2006; Pyner, 2014; Dampney, et al, 2018).

Por exemplo, em quadros de alterações cardiovasculares, barorreceptores presentes no arco aórtico e no seio carotídeo, que se comunicam com o SNC por meio de fibras aferentes que seguem pelo nervo vago (nervo craniano X) e nervo glossofaríngeo (nervo craniano IX), são ativados e enviam sinais que chegam ao NTS. Neurônios presentes neste núcleo irão retransmitir o sinal para interneurônios na medula caudoventrolateral (CVLM) e este, por sua vez, enviará sinal para a RVLM e para núcleos diencefálicos incluindo o PVN. Desse modo, o PVN ao receber as informações enviará sinal para o RVLM que é responsável por regular os neurônios pré-ganglionares simpáticos presentes na IML, sendo estes a origem do tônus simpático para coração e vasos. O NPV também, pode enviar sinal para o NTS para que esse possa modular o barorreflexo (Fig 2) (Cravo, et al, 2006; Dampney, 2016; Dampney, et al, 2018).

No entanto, no processo de regulação da atividade simpática feita pelo PVN, este recebe diversas entradas inibitórias mediadas por ácido gama-aminobutírico (GABA) e entradas excitatórias mediadas por glutamato. O glutamato irá interagir e ativar receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazole-4-propionato) e NMDA (N-metil-D-aspartato) presentes em neurônios do PVN (Fig. 6). Em condições não patológicas os neurônios pré-autonômicos são regulados por interneurônios liberadores de GABA e óxido nítrico (NO) que provocam uma inibição tônica. No entanto, em quadro de insuficiência cardíaca, por exemplo, os neurônios pré-autonômicos são desinibidos por interneurônios liberadores de glutamato e angiotensina II levando a um aumento da atividade simpática. Desse modo, a atividade de disparo dos neurônios de saída do PVN é mediada pelas entradas gabaérgicas e glutamatérgicas (Ferguson; Latchford; Samson, 2008; Affleck; Coote; Pyner, 2012; Pyner, 2014; Dampney, et al, 2018).

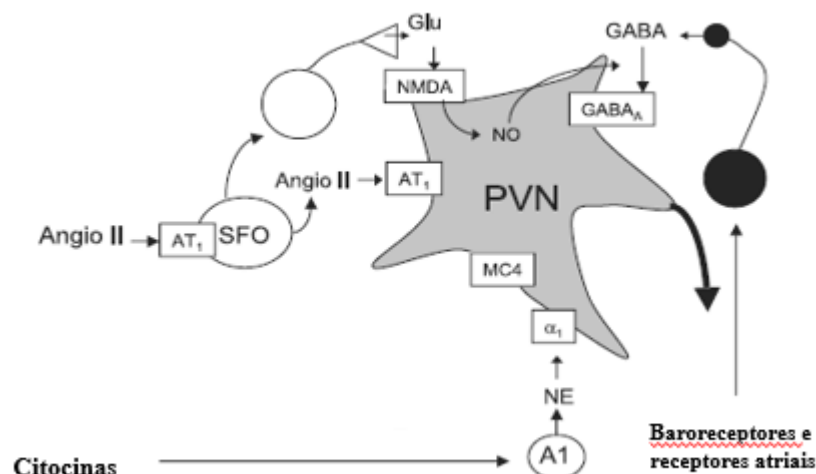


Figura 6 - Demonstrativo dos mecanismos de regulação dos neurônios responsáveis pelo controle simpático no PVN. A angiotensina II circulante (Angio II) atua via receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) no órgão subfornicial (SFO). Este, por sua vez, envia projeções excitatórias de Angio II e atuam via neurônios glutamatérgicos locais que ativam o neurônio do NPV por meio dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). A ativação do receptor NMDA leva à produção de óxido nítrico (NO) por meio de nNOS, que potencializa os efeitos inibitórios. Essa inibição é mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), por meio de receptores GABA_A. (Adaptado de Benarroch et al., 2005)

3.2 Aspectos morfofuncionais do desenvolvimento pós-natal do SNC

O desenvolvimento é um processo que se inicia a partir do momento da concepção e permanece durante o decorrer da vida do indivíduo. Durante todo esse período esse processo sofre interferência de vários fatores sejam ambientais ou genéticos. Algumas etapas do desenvolvimento do SNC têm seu fim ainda no período pré-natal (ainda intra-útero), enquanto outros se prolongam durante o período pós-natal, processo esse que se observa tanto em humanos como em roedores (ratos e camundongos) (Rice; Barone, 2000).

No entanto, o processo de desenvolvimento neural dos roedores (ratos e camundongos) difere do humano. Enquanto o desenvolvimento neural humano ocorre predominantemente no período pré-natal (Fig. 7), o dos ratos e camundongos tem uma grande parte do seu desenvolvimento neural ocorrendo no período pós-natal

(Fig.8). As duas semanas logo após o nascimento dos roedores corresponde equivalentemente ao terceiro mês de gestação para os humanos, onde ocorre um grande desenvolvimento levando a um rápido crescimento encefálico proporcionado por processos de arborização dendrítica, crescimento axonal, mielinização, e picos de variados processos, como o a maturação da neurotransmissão (Bayer et al., 1993; Dwyer; Broide; Leslie, 2008; Quinn, 2005).

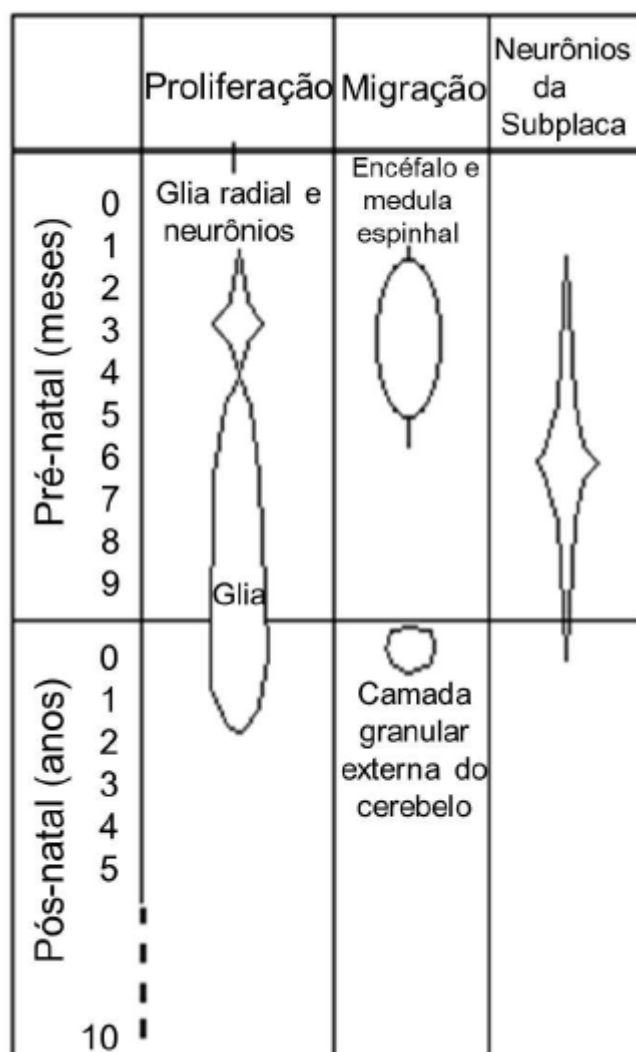


Figura 7 Representação temporal de alguns processos do desenvolvimento pré-natal e pós-natal do SNC em humanos (Adaptado Rice; Barone, 2000)

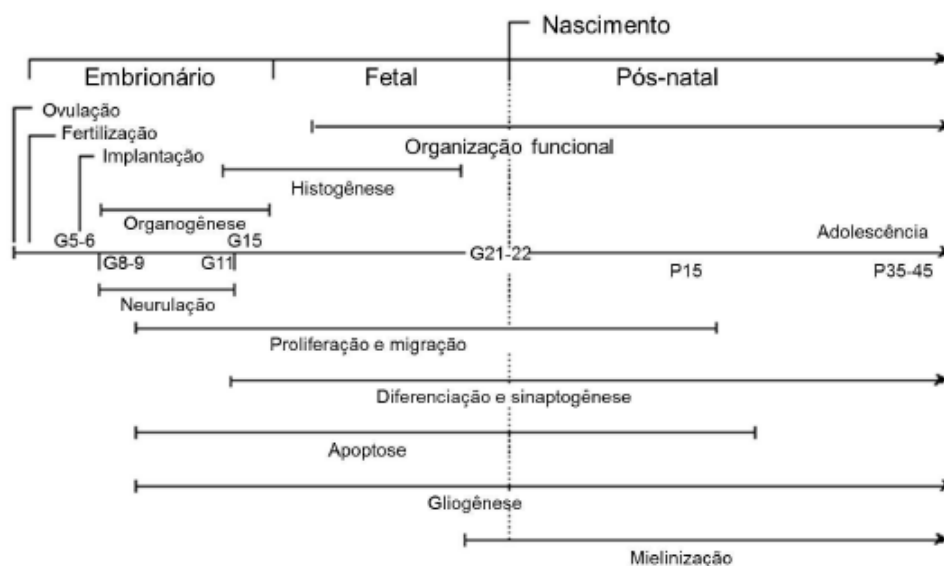


Figura 8 Representação temporal de alguns processos do desenvolvimento pré-natal e pós-natal do SNC em roedores (ratos e camundongos) (Adaptado de Rice; Barone, 2000).

Durante o processo de desenvolvimento ocorre várias etapas de transformações levando a aquisições e perdas de funções. Como, por exemplo, a senescência, que pode ser descrita como o processo de envelhecimento natural do organismo. Esse processo tem por característica perda progressiva de várias funções fisiológicas, que conseqüentemente podem levar a várias alterações no organismo, como: declínio no metabolismo, nas funções hormonais, no controle dos ritmos circadianos, na cognição e na reprodução. Observa-se também alterações estruturais e funcionais em sistemas regulatórios com o sistema endócrino e autônomo (Roberts; et al. 2012; Pal et al. 2014; Kim e Choe, 2018).

Grande parte das funções fisiológicas que alteram com o envelhecimento são governadas pelo hipotálamo. Logo, todos os processos necessitam que o hipotálamo e suas conexões se encontrem intactos para que possa exercer perfeitamente suas funções. O hipotálamo é um importante centro de controle do SNC, que com o auxílio de estruturas presentes no tronco encefálico e na medula espinal conecta o encéfalo com o corpo, fazendo com que as informações ambientais que alteram com o envelhecimento também cheguem aos órgãos periféricos, como por exemplo ao coração (Roberts et al. 2012; Kim e Choe, 2018).

3.3 Aspectos quantitativos tridimensionais no sistema nervoso central

Nos últimos anos tem crescido o interesse, das revistas científicas da área de morfologia por estudos que utilizem estimativas quantitativas que empreguem delineamento estereológico em suas análises.

O termo estereologia deriva do grego “stereos”, que significa sólido, e é uma ciência que lança mão de um conjunto de métodos que proporciona estimativas de tamanho, número, densidades, comprimentos e superfícies de praticamente todas as partículas biológicas conhecidas, a partir de uma perspectiva tridimensional (Howard e Reed, 2010), em outras palavras é uma morfometria 3D.

A estereologia baseada em design tornou-se o principal método de escolha na análise histológica quantitativa, muito por conta de seu caráter objetivo, preciso e confiável nas estimativas. Este tem um alicerce estatístico muito forte que o sustenta, baseado em princípios de amostragem aleatória, sistemática e uniforme que garantem a representatividade do órgão inteiro a partir de uma amostra pequena de secções, com o intuito de fornecer dados quantitativos, imparciais e extremamente acurados. Outro ponto importante para a utilização deste método é a possibilidade de se mensurar o coeficiente de erro do método, o que aumenta substancialmente a credibilidade e confiabilidade do método (Gundersen, et. al, 1999; Jordão, et. al, 2011).

O uso de métodos estereológicos para a análise do SNC vem contribuindo consideravelmente para a compreensão da morfologia funcional e patológica do cérebro envelhecido. Isso pode ser comprovado pelo fato de que antes do uso dessas técnicas acreditava-se que havia uma perda neuronal generalizada no encéfalo durante o envelhecimento, no entanto, com o advento dessa técnica atualmente sabe-se que não há esta perda (Schmitz e Hof., 2007; Roberts et al. 2012).

3.3 Modelo experimental

A cutia (*Dasyprocta* sp.) é um roedor silvestre de médio porte (3-6 Kg) (Fig. 9), considerado o terceiro maior roedor brasileiro seguido apenas da capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e da paca (*Agouti paca*) (Silva et al., 2014).

Taxonomicamente é classificado como pertencente à ordem *Rodentia*, subordem *Hystricomorpha*, família *Dasyproctidae* e gênero *Dasyprocta* (Moojen, 1952; Lacher, 1981; Oliveira, et al., 2017). Esse gênero é composto por várias espécies, que são amplamente distribuídos nos biomas mundiais, desse modo, no Brasil são encontradas as seguintes espécies: *Dasyprocta aurea*, *Dasyprocta azarae*, *Dasyprocta catrinae*, *Dasyprocta croconota*, *Dasyprocta fuliginosa*, *Dasyprocta leporina*, *Dasyprocta nigriclunis*, *Dasyprocta prymnolopha* e *Dasyprocta aguti* (Bonvicino, 2008). Esses são encontrados em todos os estados da região Nordeste do Brasil, na região da bacia amazônica e em algumas áreas do Rio de Janeiro e São Paulo (Moojen, 1952; Lacher, 1981; Pinheiro, 1989; Barbosa et al., 2008; Bonvicino, 2008).



Figura 9 Foto de uma Cutia macho com cerca de 12 meses de idade em cativeiro.

São animais que apresentam hábitos predominantemente diurno podendo se tornar noturno em casos de interferência humana ou de predadores (Santos, 2005). Se alimentam predominantemente de sementes e poupas de frutas, tendo preferência por sementes grandes (Jorge e Peres, 2005). Diante disso, estes animais são

considerados um dos mais importantes dispersores de sementes, pois além de se alimentarem delas acabam enterrando-as em vários locais com o intuito de reserva para períodos de escassez de comida (Jorge e Peres, 2005; Cid, et al., 2014).

As cutias possuem uma fase pré-púbere que se prolonga por um período de cinco meses a partir do nascimento, uma fase de transição entre a pré-puberdade e a puberdade com duração de 2 meses (entre os 6 e 8 meses de vida) e uma fase de puberdade que só se inicia por volta dos nove a dez meses de idade (Oliveira, et al., 2017). A gestação desses animais dura em média 120 dias, dando origem a ninhadas de um a seis filhotes (Singh; Singh; Garcia, 2018).

Além da importância como distribuidor de sementes, esse animal apresenta grande importância para a natureza por ser capaz de arejar o solo por meio de suas tocas que cavam como forma de abrigo (Oliveira, et al., 2017). Além disso, possui uma certa facilidade de adaptação em cativeiro e algumas espécies são tidas como uma importante fonte proteica para populações rurais nas regiões tropicais. Diante disso, no Brasil, já existem estabelecimentos regulamentados com criações para fins comerciais (Oliveira, et al, 2016 e 2017). Além do uso pecuário, atualmente vem sendo usado como modelo experimental em algumas pesquisas com grande significância tanto para humanos como para os animais como um todo (Oliveira, et al, 2016).

Os roedores, em geral, por apresentarem aspectos característicos, tais como tamanho adequado e baixo custo de manutenção, são considerados bons modelos de animais experimentais. No entanto, o interesse pela utilização de roedores silvestres, principalmente como modelo de desenvolvimento pós-natal tem crescido nos últimos anos (Ribeiro, 2004; Melo et al., 2009; Abrahão et al., 2009; Ladd et al., 2012; Cavalcanti et al., 2014). Logo, estudo com esse roedor de médio porte poderá proporcionar correlações com mamíferos de maior superfície corpórea, que será de grande importância para a evolução da neuroanatomia veterinária, como também fornece um modelo com hábitos e comportamentos diferentes de roedores de laboratório.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar, por meio de delineamento estereológico tridimensional, possíveis alterações morfoquantitativas no núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV) durante o desenvolvimento pós-natal utilizando quatro fases etárias distintas.

4.2 Objetivos específicos

Analisar os seguintes parâmetros do NPV em diferentes faixas etárias:

- ✓ Descrição morfológica do PVN da *Cutia* (*Dasyprocta* sp.)
- ✓ Volume referência total do núcleo (V_{refPVN})
- ✓ Densidade de volume dos neurônios (V_v)
- ✓ Volume total ocupado por neurônios ($V_{totneurônios}$)
- ✓ Número total de neurônios (N:)
- ✓ Volume neuronal médio (V_N)

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizadas onze cutias (*Dasyprocta aguti*) machos saudáveis (não apresentando sintomas clínicos compatíveis com neuropatias e cardioneuromiopatias). Os animais foram obtidos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semiárido Nordeste (UFERSA), Mossoró – RN, entidade credenciada e registrada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) como criadouro científico sob registro nº 12.492-000404. Esses animais foram separados em quatro grupos etários distintos de acordo com a fase do desenvolvimento pós-natal: neonato (n=2), jovem (n=2), adulto (n=3) e senil (n=4) (Tabela 1). Este material foi coletado em ocasião da execução de outros trabalhos científicos e todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Bioética da Universidade de São Paulo sob o número de protocolo **0936/2006** e submetido novamente ao comitê de ética em uso animal (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) (vide anexo). Vale ressaltar que o material utilizado nesse estudo foi oriundo de outros estudos, como mencionado anteriormente, desse modo, não foi realizado nesta pesquisa a eutanásia, perfusão e dissecação do encéfalo.

Tabela 1- Distribuição dos grupos por faixa etária

GRUPO	IDADE
Neonato (G1)	01 – 03 dias
Jovem (G2)	01 mês
Adulto (G3)	12 meses
Senil (G4)	36 meses

5.1.2 Eutanásia

Os animais foram previamente tranquilizados com aplicação de azaperone (4mg/kg) intraperitoneal (IP), seguida da aplicação de sulfato de atropina (0,06mg/kg) IP. Para a eutanásia ativa, o cloridrato de quetamina (20mg/kg) foi associado ao cloridrato de xilazina (1,5mg/kg), ambos na mesma seringa, e injetado também IP visando a indução da anestesia. Subsequentemente, os animais receberam uma overdose de anestésico tiopental sódico (80mg/100g) IP.

5.1.3 Perfusão

Após confirmação do óbito cada animal foi submetido a perfusão transcardíaca. O animal foi colocado em decúbito dorsal, iniciou-se o processo de toracotomia para exposição do coração. Após exposição do coração, uma cânula foi inserida dentro do ventrículo esquerdo até atingir a aorta ascendente, seguido de uma incisão no átrio direito. Primeiramente foram perfundidos 100ml de solução de lavagem composta de tampão fosfato salino (PBS) (0,1M; pH 7,4) (Synth) contendo heparina 1%. A seguir, os espécimes foram perfundidos com solução fixadora composta por formaldeído 4% (Sigma) em PBS a temperatura de 10-15 °C, com volume total perfazendo 10% do peso corpóreo.

5.1.4 Dissecção e individualização do encéfalo

Após um intervalo de 30 min, para garantir plena fixação, o crânio foi aberto para a coleta dos encéfalos, com o auxílio de um encefalótomo. Depois da remoção, os encéfalos foram pesados e medidos nos seus três eixos: comprimento, largura e espessura usando um paquímetro digital DigimessR, e mergulhados na mesma solução fixadora, por pelo menos 72h (Fig 10).



Figura 10 Encéfalo de uma Cutia macho com cerca de 12 meses de idade.

5.2 Processamento histológico

Após ficar embebido em solução fixadora por pelo menos 72h o encéfalo foi crioprottegido em sacarose (soluções de 10%, 20% e 30% em PBS, permanecendo 24h em cada solução armazenado em geladeira). Finalizado o processo de crioproteção, o encéfalo foi embebido em Tissue Tech[®] para serem seccionados em

criostato Lupetec® CM2850. Foram realizados cortes sequenciais de 30µm abrangendo toda a extensão do encéfalo. Os cortes coronais foram coletados e lavados em solução PBS a 0,01 M (pH 7,4) e sequencialmente depositados em 07 poços, de maneira cíclica e sequenciada, com o intuito de manter uma distância de 210µm entre uma secção e outra de um mesmo poço. As secções de um dos poços foram montadas imediatamente em lâminas gelatinizadas e coradas com tionina pelo método de Nissl com o intuito de garantir a delimitação da estrutura de interesse (Fig. 11). As demais secções dos outros poços foram embebidas em solução anticongelante (150 g de sacarose, 500 ml de PBS 0,05 M e pH = 7,4, 300 ml de etilenoglicérol), e armazenados no congelador a -20 °C.

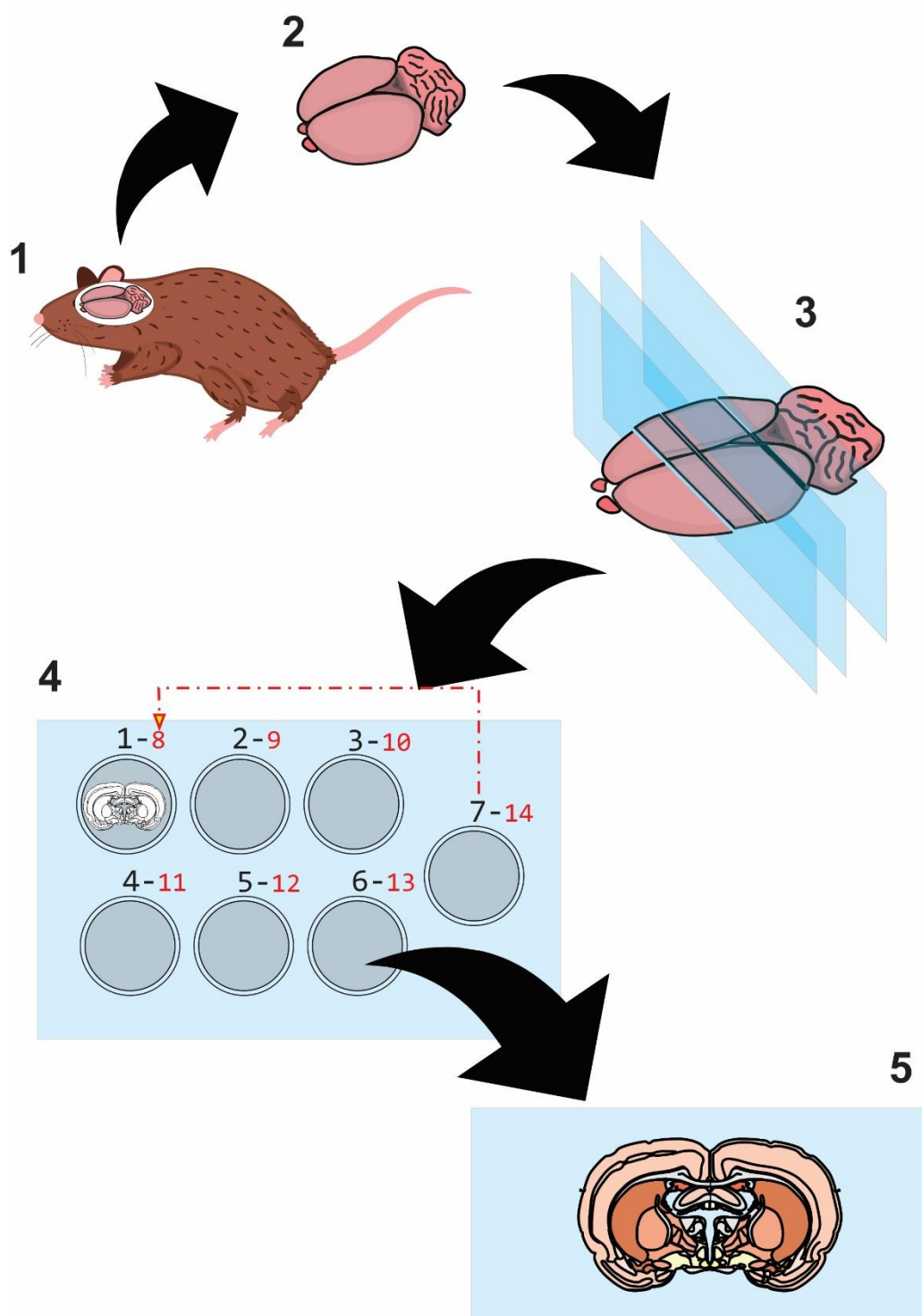


Figura 11 Esquema representativo do regime de amostragem para a obtenção das secções histológicas do encéfalo da cutia. Em resumo o encéfalo da cutia (1) foi dissecado e individualizado (2), cada encéfalo foi embebido em tissue tech® e cortado em criostato (3) obtendo secções de 30µm. Cada secção foi lavada em PBS e sequencialmente depositados em 7 poços (4), posteriormente as secções de um dos poços foram montadas imediatamente em lâminas gelatinizadas (5) não quais foram realizadas as análises estereológicas.

5.2.1 Técnica de Nissl

A coloração pelo método de Nissl é constituído por várias etapas que tem início com o processo de desidratação do tecido por meio da passagem desse material em concentrações crescentes de álcoois etílicos (álcool 70% - 1h; álcool 95% - 3 min, 2 vezes; álcool 100% - 3 min, duas vezes). Após a desidratação inicia-se o processo de diafanização para serem deslipidificados passando por dois recipientes com xilol, permanecendo 3min e 30min em cada. Posteriormente, o tecido será reidratado em concentrações decrescentes de álcoois etílicos (segue o processo inverso do anterior), submergido em água destilada por 2 min e colocados por 30 segundos na solução de tionina. Finalizando, foram submersos em água destilada por 1 mim seguido da desidratação (como descrito anteriormente) e diafanização passando por dois xilóis permanecendo 2 mim e 4 min em cada. Finalizado, foram montadas sob lamínula com Erv-Mount.

5.2.3 Análise das imagens

As secções do PVN coradas em Nissl foram observadas ao microscópio óptico (Nikon Eclipse Ni). Imagens de todas as secções foram obtidas com o auxílio da câmara digital (Nikon DS-Ri1). Essas imagens foram minimamente corrigidas em brilho e contraste, documentadas e esquematizadas utilizando o programa Canvas (versão 12.0; ACD Systems of America, inc.; 2010). Foram construídos esquemas das delimitações do PVN no Canvas tendo por base os atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (2007) e Swanson (2004), de encéfalo de camundongo de Paxinos e Franklin (2008) e de encéfalo de sagui de Paxinos e colaboradores (2012).

Para análise de número e volume de neurônios foi utilizado o microscópio (Zeiss AX10) acoplado a câmara (Zeiss AxioCam MRc 5/ mbfbioscience sistema neurolúcida) e conectada a um computador com o software Stereo Investigator® (versão 11.09) instalado.

5.3 Estudo estereológico

5.3.1 Estimativa de volume do NPV

Para a estimativa do volume total do PVN foi utilizado o Princípio de Cavalieri (Mayhew e Olsen 1991; Howard e Reed, 2010). O princípio de Cavalieri é um método que estima o volume de um objeto de forma imparcial, em que é obtido dividindo-o em séries de secções em planos paralelos com distância conhecida entre elas (Manojlović-stojanoski et al.,2016). A estimativa do volume total é obtida somando as áreas de todas as secções e multiplicada pela espessura das secções. Para isso, um sistema teste quadrático com área conhecida (**a/p**) foi aplicado sobre imagens das secções do PVN (Fig. 12) e o número de pontos que caíram dentro da delimitação do PVN foi contado bilateralmente (**Σp**), separadamente para cada lado do ventrículo. O volume do PVN foi estimado utilizando a seguinte fórmula:

$$V_{refNPV} = \Sigma p \cdot a/p \cdot t \cdot f_1^{-1}$$

Onde, **Σp** é o somatório dos pontos que tocam o alvo (NPV); **a/p** é a área por ponto do sistema teste utilizado ($2939\mu\text{m}^2$); **t** é a espessura média das secções histológicas ($30\mu\text{m}$); **f_1^{-1}** é o inverso da fração da distância entre as secções utilizadas (7). O coeficiente de erro (CE) para a estimativa do volume pelo Princípio de Cavalieri CE(V) será estimado de acordo com Gundersen e colaboradores (1999).

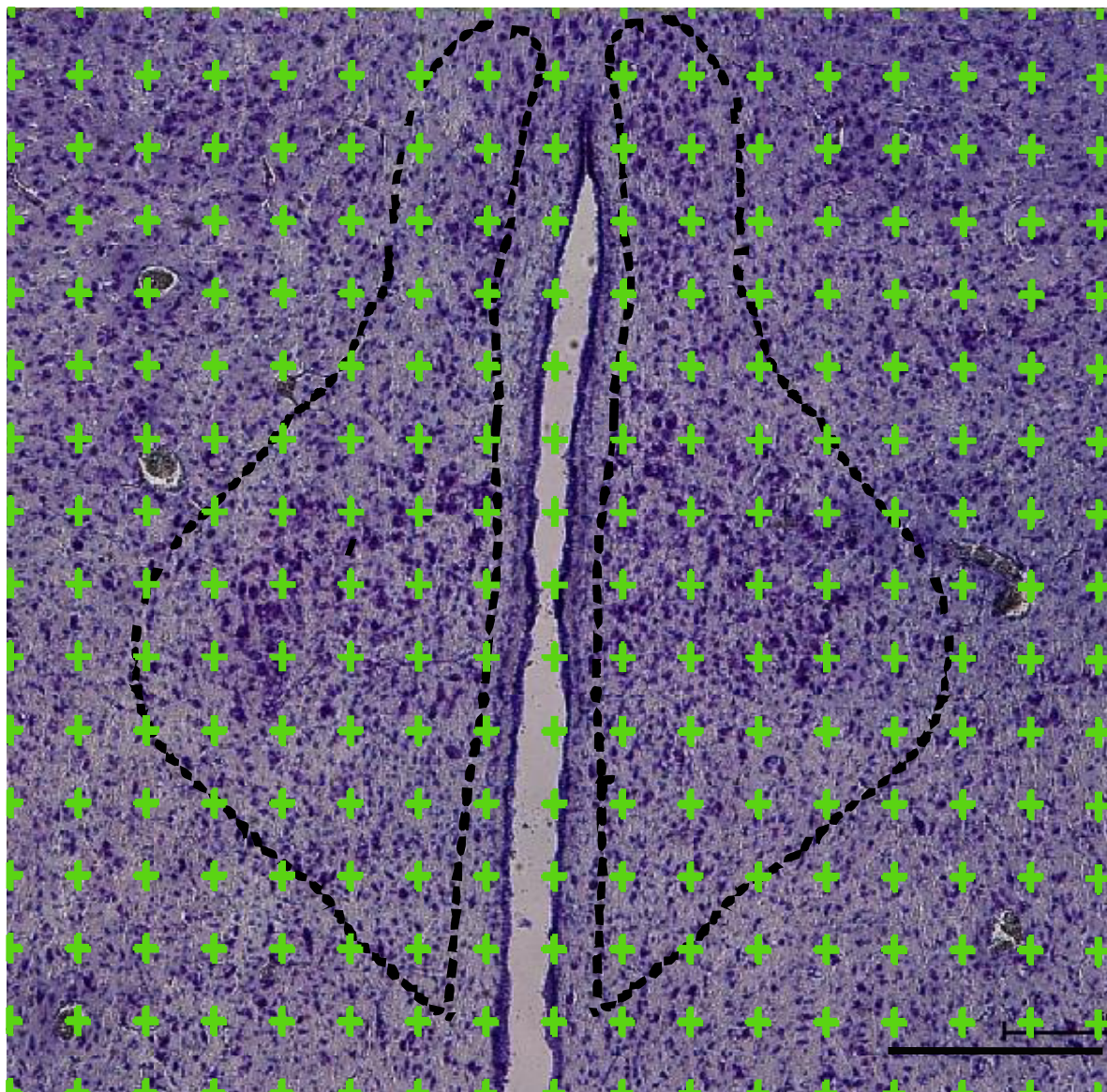


Figura 12 - Secção do NPV demonstrando a aplicação do Princípio de Cavalieri para a estimativa do volume do núcleo. Observa-se o sistema teste utilizado para a quantificação (cruzes verdes) a/p 12406,11mm². Coloração: Nissl. Escala de barra: 500 µm (4x).

5.3.2 Densidade de volume dos neurônios no NPV (V_{VNPV})

A densidade de volume foi utilizada para determinar a porcentagem do tecido que é ocupado por corpos celulares no PVN de cutias. Desse modo, foram obtidas quatro imagens dentro do espaço referência de forma sistemática, uniforme e aleatória, sendo duas imagens de cada lado do terceiro ventrículo de cada animal. Foi usado um sistema teste em que foi contado o número de pontos do sistema que tocam

os corpos celulares do PVN (PN_{PVN}) e o número de pontos que tocam todo o espaço de interesse (PT_{PVN}) (Fig. 13). Desse modo a densidade de volume (V_v) foi calculada com a seguinte fórmula:

$$V_v (\%) = \sum PN_{NPV} / \sum PT_{NPV} \times 100$$

Primeiramente, os valores médios por animal foram calculados e então a densidade de volume de neurônios foi estimada por grupo.

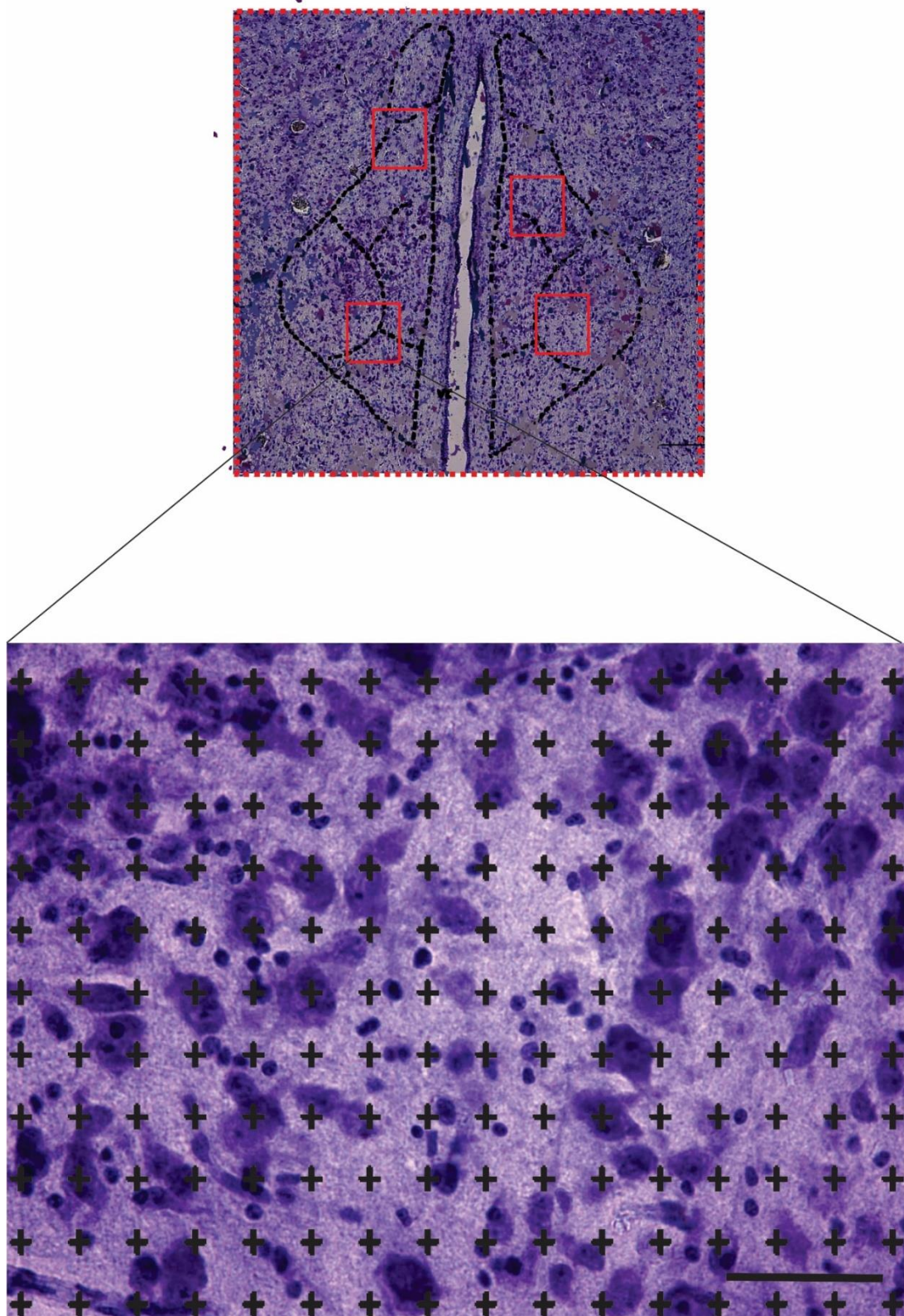


Figura 13 – Demonstração da obtenção das imagens para a realização do método de Delesse para estimativa de densidade de volume dos neurônios. Na imagem superior tem-se a delimitação do PVN, dentro deste foram obtidas 2 imagens (aumento 40X) de ambos os lados de forma aleatória. A partir dessas imagens, foi aplicado um sistema teste (cruzes pretas). Coloração Nissl. Escala de barra 50 μ m.

5.3.3 Volume total ocupado pelos neurônios no PVN

Para estimar o volume total ocupado pelos neurônios do PVN de cutias, foi utilizada a seguinte equação (Muhlfeld et al., 2010; Ostergaard *et al.*, 2013):

$$V_{tot_{neurônios}} = V_v \cdot V_{ref_{NPV}}$$

Onde, $V_{tot_{neurônios}}$ é o volume total ocupado pelos neurônios no núcleo paraventricular (PVN), V_v é a densidade de volume de neurônios nessa mesma região e $V_{ref_{NPV}}$ é o volume referência da região.

5.3.4 Volume neuronal médio do PVN

O volume neuronal será estimado localmente pelo método do nucleator (Fig. 14, Fig. 16 e Fig. 17). Este método permite estimar o volume médio e a distribuição volumétrica das partículas independentemente da sua forma, distribuição ou orientação (Vedel-Jensen e Gundersen, 1993). A seguinte formula será utilizada para a estimativa do volume neuronal:

$$\bar{V}_N = \pi \cdot t \cdot \sum_i l_i^2$$

onde, l_i^2 é uma distância medida a partir de um ponto fixo da célula ou fora dela, até uma borda arbitrariamente escolhida na mesma. O procedimento foi realizado com o auxílio do software Stereo Investigator® (versão 11.09).

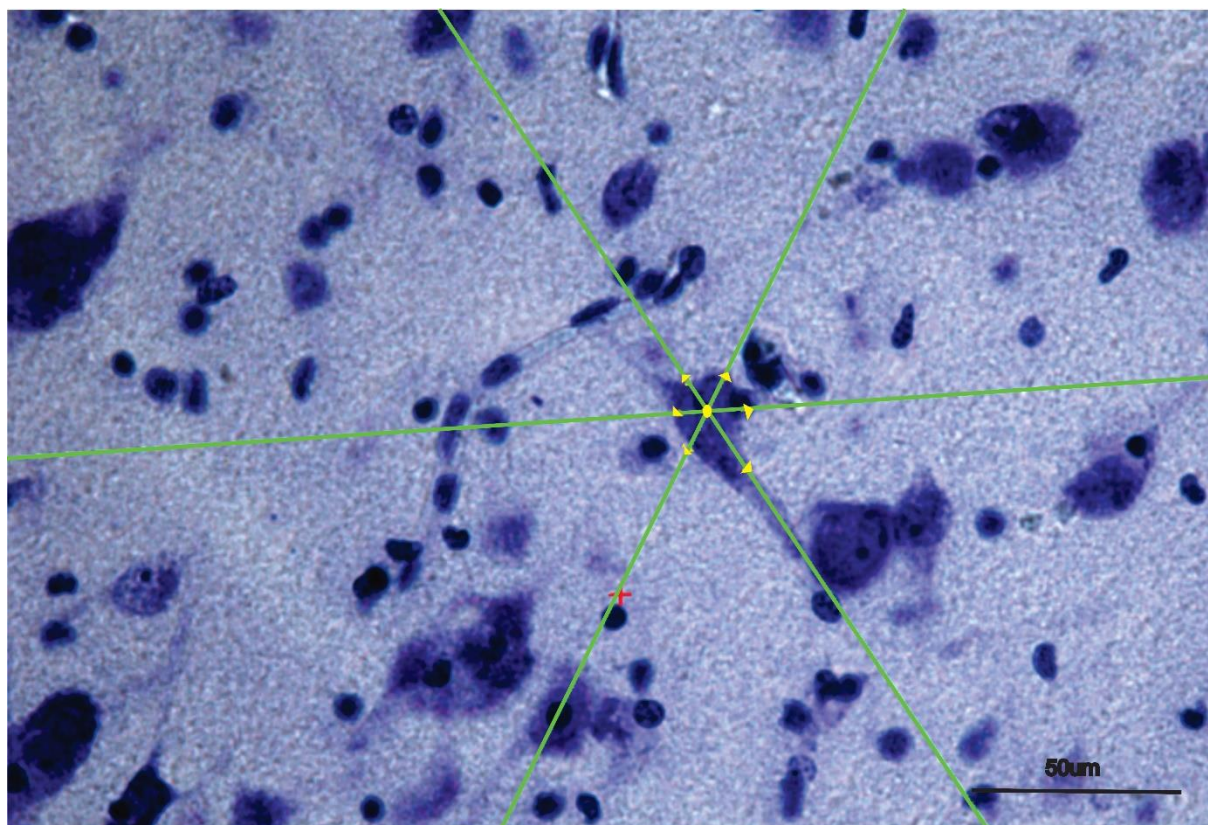


Figura 14 Imagem (40x) representativa do nucleator para estimativa do volume médio neuronal. Linhas verdes são os pontos de contato. Setas amarelas representam os pontos de toque das linhas na membrana do neurônio. Coloração: Nissl; Escala de barra: 50 μ m.

5.3.5 Número total de neurônios do NPV

O número total das partículas (neurônios) (N) foi estimado por meio do fractionator óptico (Fig. 15, Fig.16 e Fig. 17), multiplicando-se o número total de partículas contadas pelo inverso das frações de amostragem destas mesmas partículas (Gundersen et al., 1988; Gundersen, 2002; Andersen et al., 2004). A seguinte fórmula será utilizada:

$$N := \sum Q^{-} \cdot \frac{1}{ssf} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{hsf}$$

Onde:

ssf é a fração das secções histológicas amostradas (1/7)

asf é a fração das áreas das secções histológicas amostradas (56,25)

hsf é a fração da espessura do corte efetivamente utilizada para contagem (1,5)

Q- é o número de partículas (neurônios) amostradas em dissecor ópticos

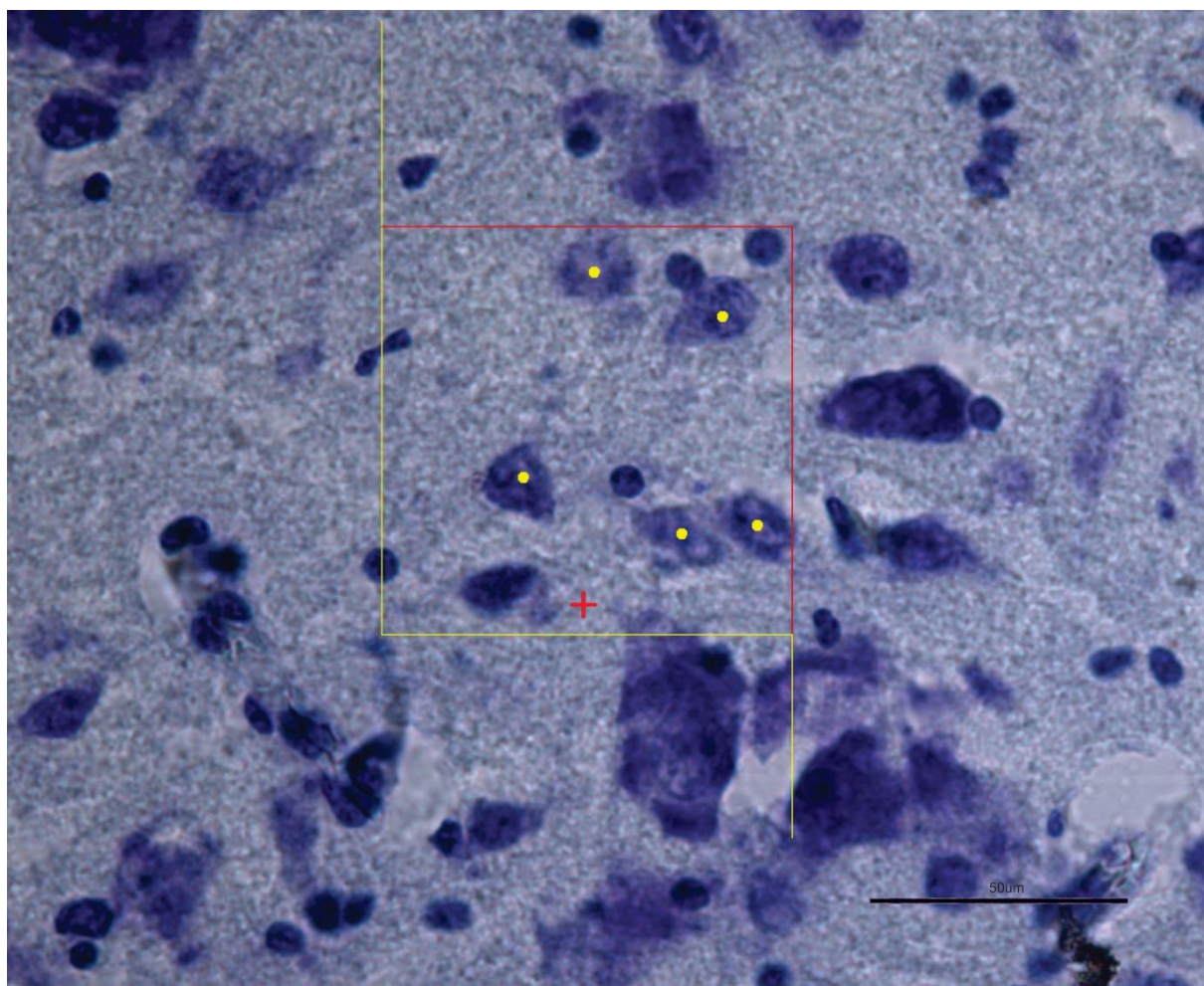


Figura 15 Imagem (40x) representativa do grid do fractionator óptico para estimativa do número médio de neurônios. Linhas vermelhas são de inclusão e linhas amarelas são de exclusão; pontos amarelos correspondem aos neurônios contabilizados na área do grid. Coloração: Nissl; Escala de barra: 50 μ m.

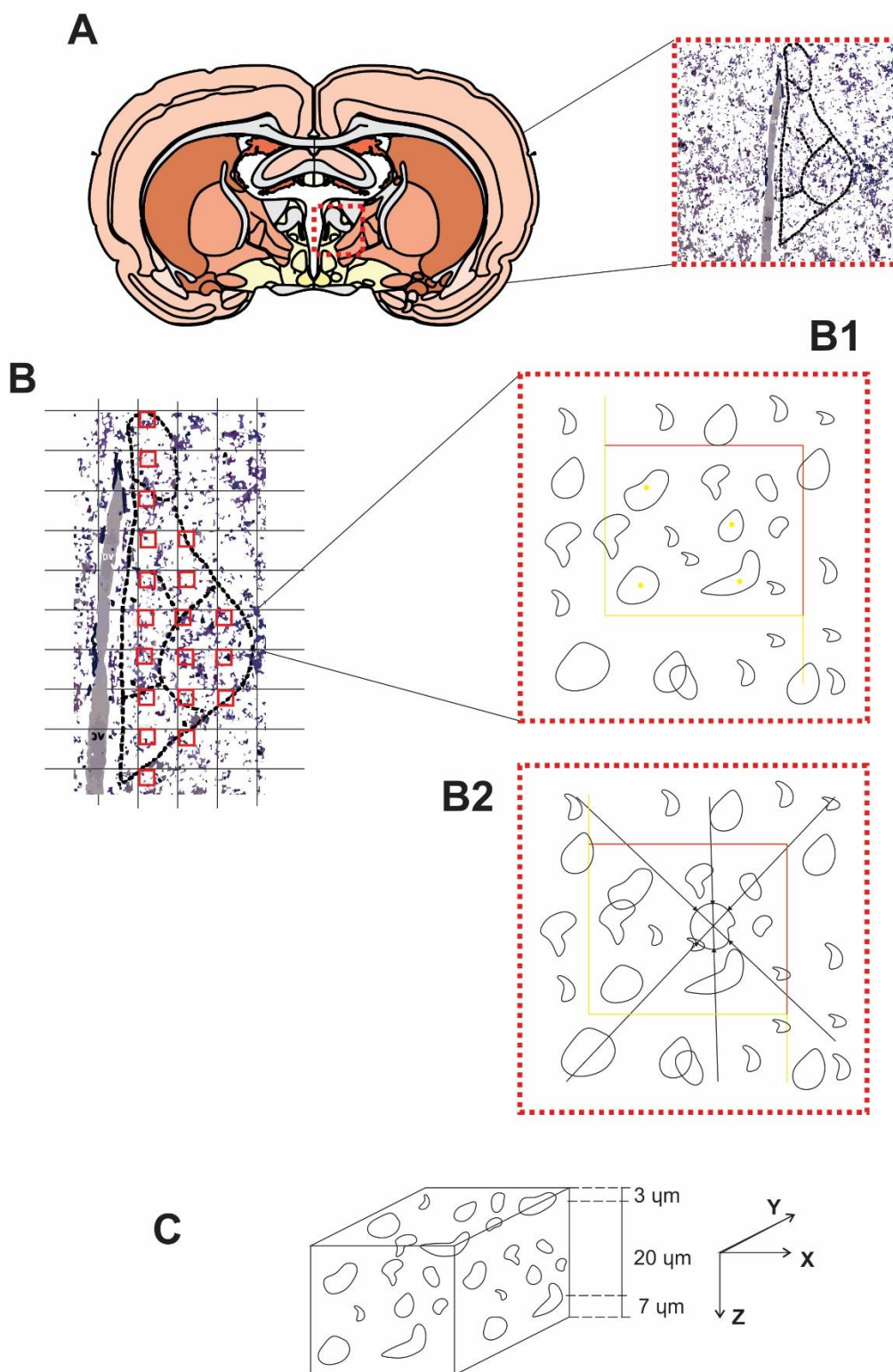


Figura 16 Desenho esquemático mostrando (A) secção do encéfalo e delimitação da área de interesse dentro da secção. Nesta foi aplicado um Grid (B) o qual foi definido para regular os locais a serem observados, nestes serão aplicados os frames (quadrados vermelhos). Cada frame (B1) será composta por uma linha vermelha que representa uma linha de inclusão e uma amarela representando uma linha de exclusão, para realizar contagem de número de células nervosas. Paralelamente a isso, foi aplicado o nucleator de seis pontos (B2) para a quantificação do volume médio dos neurônios. De modo, que cada frame será analisado por todo o eixo Z (C). No entanto, o eixo Z de análise foi padronizado com 20 μm retirando as zonas de guardas da espessura total da secção (30μm).

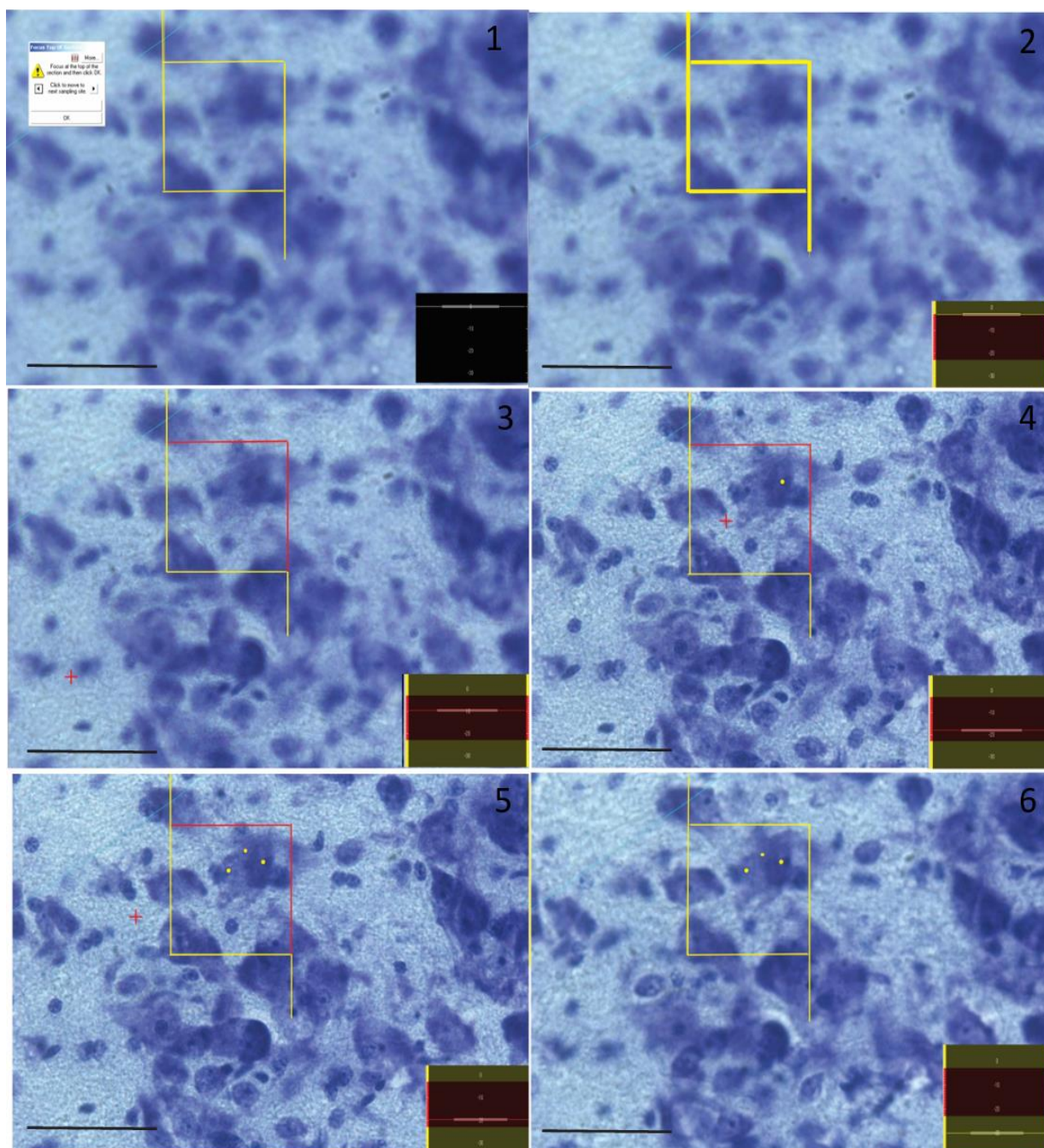


Figura 17 Imagens mostrando seis planos focais subsequentes (1,2,3,4,5 e 6) em que aparecem três neurônios à medida que se aprofunda no eixo Z da secção e são amostrados utilizando a frame. Coloração: Nissil. Escala de barra: 50 μ m

5.4 Análise estatística

A análise estatística foi conduzida com o auxílio do software estatístico Minitab 19[®]. Para as variáveis que apresentarem distribuição simétrica e igualdade de variância (homoscedasticidade), foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Fisher para comparações múltiplas. No entanto, quando as variáveis em estudo apresentaram distribuição não simétrica e/ou não apresentaram igualdade de variância, foram utilizados o teste de Mann-Whitney. Diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

As variáveis paramétricas foram apresentadas aqui como média (CV); onde CV refere-se ao coeficiente de variação observado, sendo este o quociente entre o desvio padrão e a média. Nos gráficos em barra representamos as médias dos grupos (barras verticais largas) e o erro padrão da média (\pm EPM) (barras horizontais).

6.1 Análise macromorfolométrica do encéfalo

Tabela 2 – Peso (g), comprimento, largura e altura dados em milímetros (mm) do encéfalo das cutias durante o desenvolvimento pós-natal. Não foi observado diferenças estatisticamente significativas no peso, comprimento, largura e espessura com $p= 0,015; 0,115; 0,025$ e $0,2$, respectivamente.

GRUPO	PESO ENCEFALO (g)	COMPRIMENTO (ROSTRO-CAUDAL) (mm)	LARGURA (LATERO-LATERAL) (mm)	ESPESSURA (DORSO-VENTRAL) (mm)
G1	8,5 (0,14)	34,5 (0,05)	24,8 (0,04)	18,2 (0,06)
G2	12,7 (0,08)	42,6 (0,04)	30,4 (0,02)	22,2 (0,07)
G3	13,7 (0,33)	44,4 (0,17)	31,7 (0,15)	22,6 (0,09)
G4	15,4 (0,06)	43,3 (0,03)	33,4 (0,03)	22,3 (0,07)

6.2 Citoarquitetura do PVN da Cutia (*Dasyprocta aguti*)

O PVN da Cutia (*Dasyprocta aguti*) encontra-se bilateralmente na margem do terceiro ventrículo, tendo sua porção mais rostral iniciando após o fechamento do terceiro ventrículo e juntamente com a porção mais caudal do quiasma óptico próximo ao início do trato óptico. Utilizando o método de coloração de Nissl podemos observar as seguintes subdivisões do PVN deste animal: parvocelular anterior (PVNap), magnocelular medial (PVNmm), magnocelular lateral (PVNlm), parvocelular medial

(PVNmp), parvocelular ventral (PVNvp), parvocelular dorsal (dp) e parvocelular posterior (PVNppo) (Fig. 18).

Utilizando o método de coloração de Nissl podemos observar a disposição das subdivisões do PVN deste animal, em que foi observado dois aglomerados densos de neurônios magnocelulares envolvidos em neurônios parvocelulares que consiste em seis subdivisões. Na porção mais cranial do núcleo foi observado a subdivisão magnocelular medial (PVNmm) que se prolonga por toda a extensão do PVN. A PVNmm se encontra lateralmente à subdivisão periventricular (PVNpv). A subdivisão magnocelular lateral (PVNlm) inicia na porção média do NPV, está localizada lateralmente à PVNmm e se prolonga até a porção posterior, mas finaliza antes do término do PVN.

A grande área parvocelular pode ser dividida em seis subdivisões: parvocelular anterior, parvocelular dorsal, parvocelular medial, parvocelular ventral, parvocelular posterior e periventricular. A região parvocelular anterior (PVNap) é composta por um conjunto de células de tamanhos entre pequenas e médias formando a parte rostral do PVN e acompanha toda a extensão lateral da PVNmm. A subdivisão parvocelular medial (PVNmp) é localizada logo acima das PVNmm e PVNlm e inferior à subdivisão paraventricular dorsal (PVNdp). A PVNdp é um conjunto de células localizada na porção dorsal do PVN, logo acima da PVNmp. Já a subdivisão parvocelular ventral (PVNvp) é um conjunto de células parvocelulares localizada na porção mais ventral do PVN sendo separada da PVNmp pelas PVNmm e PVNlm. Na porção mais posterior do PVN as PVNmm e PVNlm se desligam e juntamente com uma única grande área parvocelular denominada região parvocelular posterior (PVNppo), que se estende até a porção final do PVN, formam a porção posterior desse núcleo. Além dessas subdivisões descritas acima tem a subdivisão PVNpv, composta por um conjunto de células parvocelulares, que margeiam todo o terceiro ventrículo podendo ser observada em todo o comprimento do PVN.

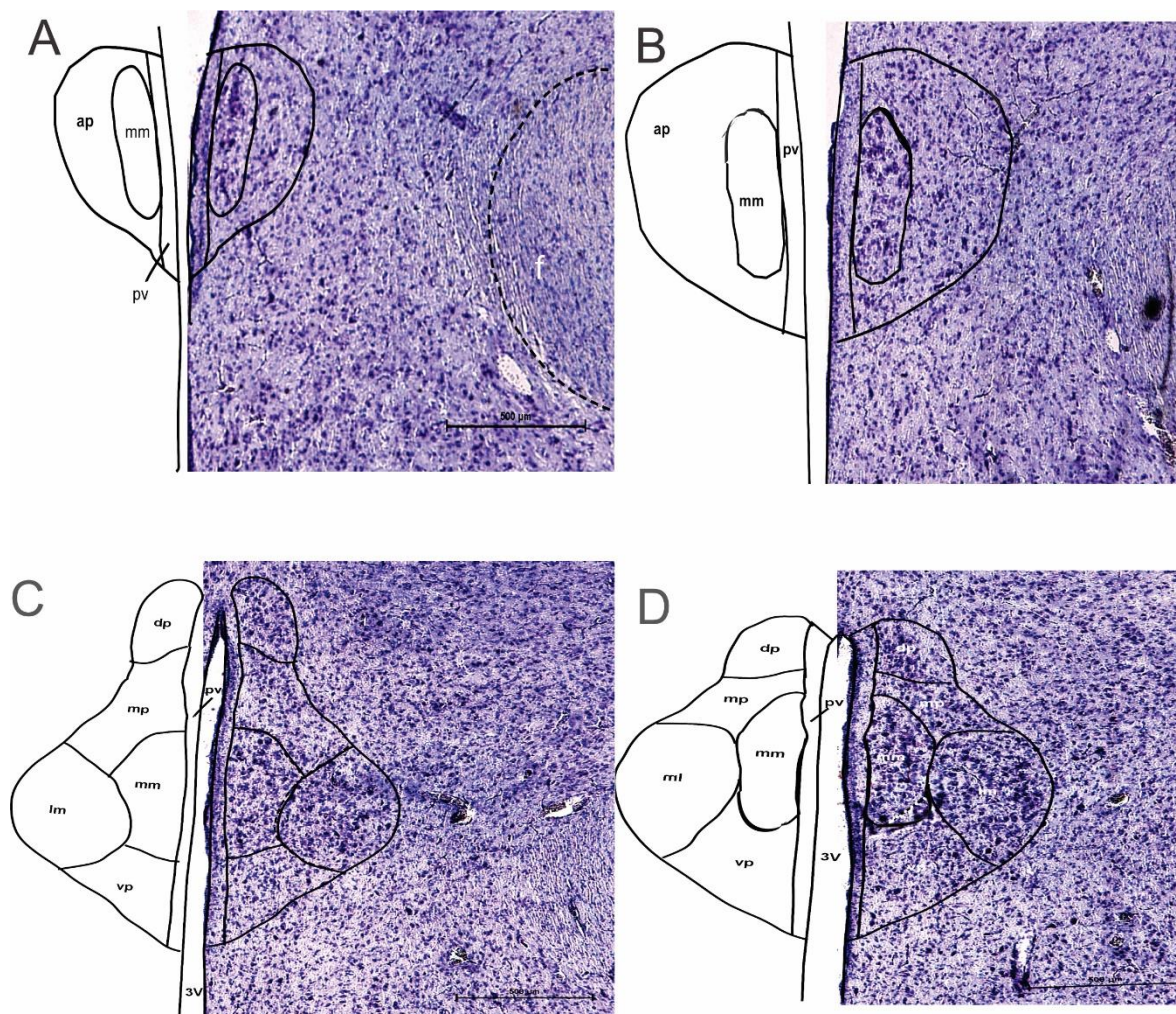


Figura 18 Fotomicrografias de secções coronais do PVN da Cutia (*Dasyprocta aguti*) delimitando as subdivisões do núcleo observadas em lâmina coradas com Tionina pela técnica de Nissl. Mostrando desde o nível mais rostral em (A) ao nível mais caudal em (H) com distancias de cerca de 210 μ m entre as secções. Imagem (A) porção mais anterior do núcleo em que se observa as seguintes áreas: (ap) região parvocelular anterior; (mm) região magnocelular medial; (pv) região periventricular; (3V) terceiro ventrículo; fornice (f). (B) porção em que se observa um aumento nas dimensões do núcleo apresentando um aumento na porção (mm) e (ap) quando comparado com a imagem (A). (C) observa-se um alongamento do núcleo ocupando mais a margem superior do 3V, podendo observar as seguintes subdivisões: (dp) região parvocelular dorsal; (mp) região parvocelular medial; (mm) região magnocelular medial; (ml) região magnocelular lateral; (vp) região parvocelular ventral. (D) e (E) nestas imagens mantem-se as regiões descritas na imagem (C), observando apenas, algumas alterações nas extensões dessas regiões. (F) observa um achatamento crânio-caudal e um alongamento medial-lateral do núcleo, podendo delimitar as seguintes regiões: (mm) região magnocelular medial; (lm) região magnocelular lateral; (Ppo) região parvocelular posterior. (G) porção posterior do PVN em que ainda se observa as regiões (mm), (lm) e (Ppo), no entanto, a região (lm) apresentam uma redução de tamanho considerável levando a crer que está chegando a sua delimitação posterior. (H) porção mais posterior do PVN em que se observa as regiões (mm) e (Ppo).

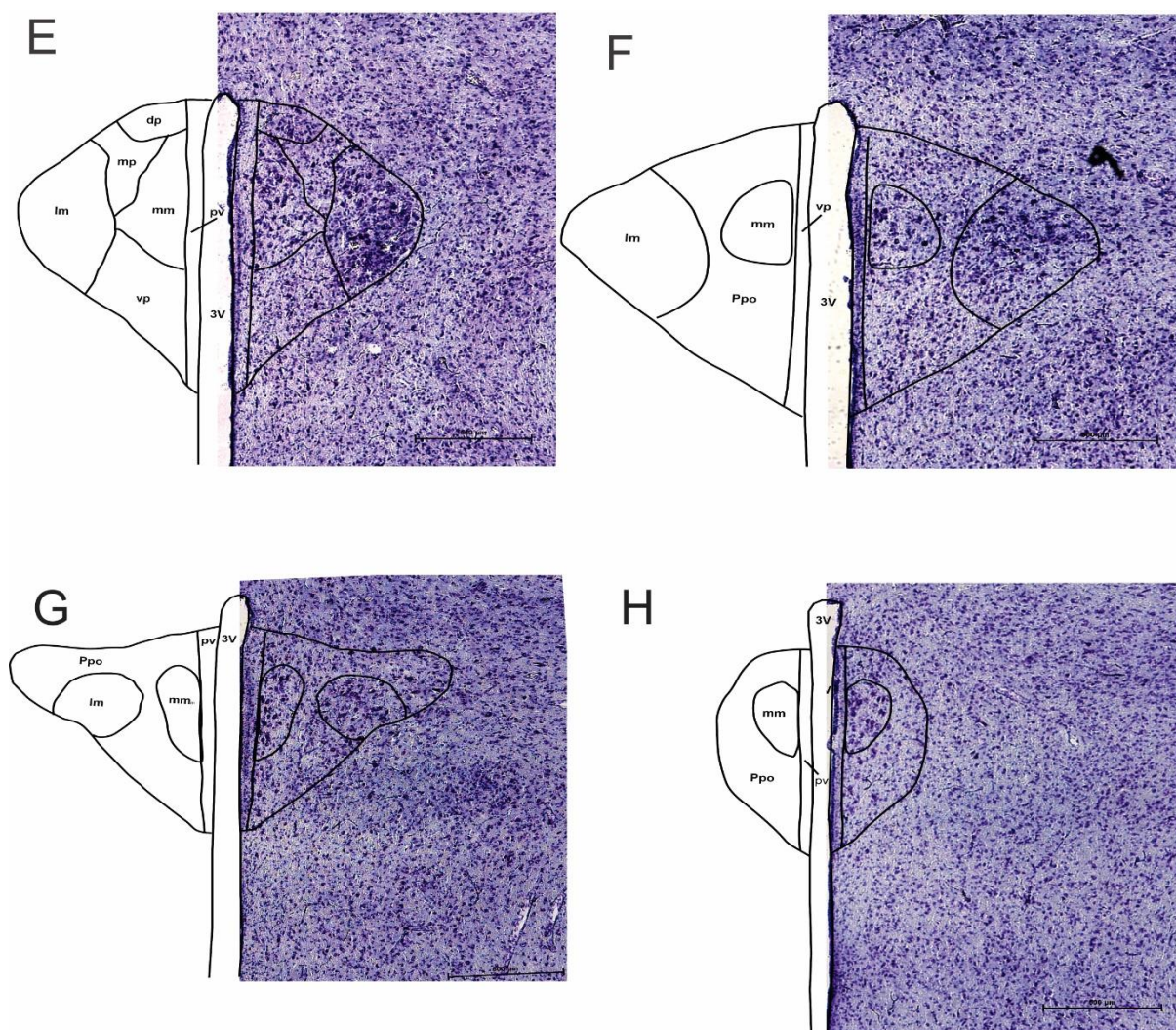


Figura 18 continuação

6.3 Parâmetros estereológicos

6.3.1 Volume referência do PVN ($V_{ref_{PVN}}$)

Para volume referência encontramos os seguintes resultados: G1: 0,43 mm³ (0,0); G2: 1,24 mm³ (0,63); G3: 1,48 mm³ (0,29); G4: 1,78 mm³ (0,10) (Fig. 20).

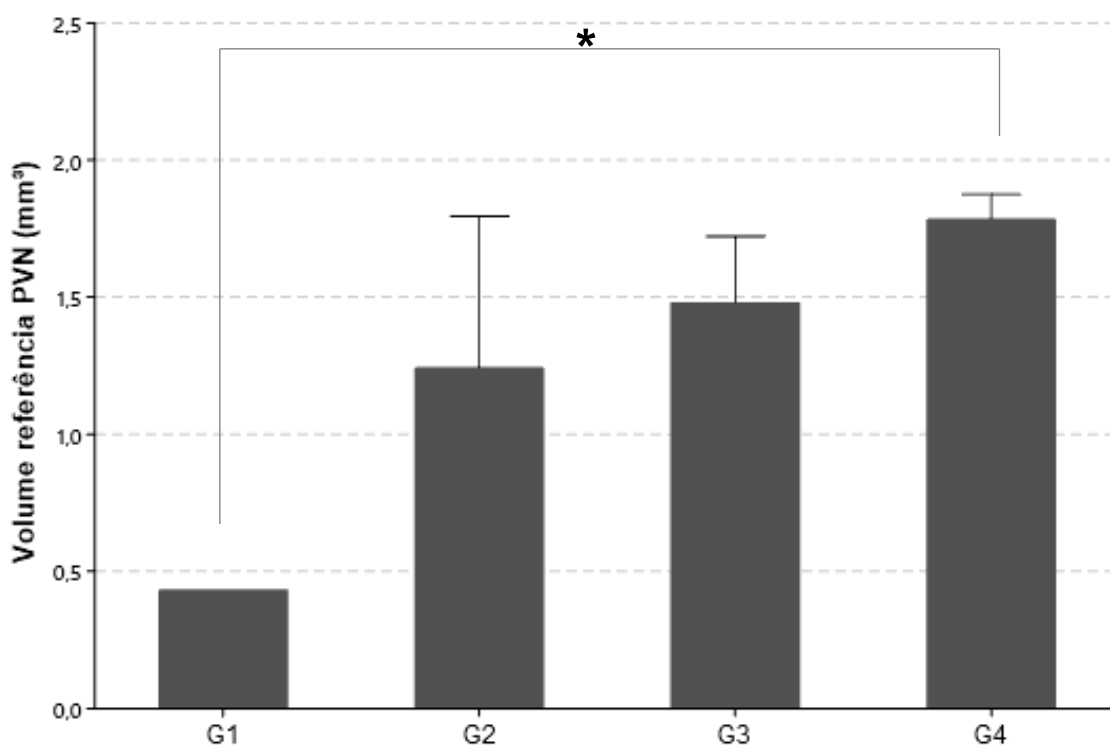


Figura 19 - Gráfico representativo da estimativa de volume do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) nos diferentes grupos pós-natal (G1- 01 a 03 dias; G2- 1 mês; G3- 12 meses; G4- 36 meses). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais o erro padrão da média. * Diferença estatisticamente significante com $p=0,03$

6.3.2 Densidade de Volume dos neurônios no PVN ($Vv_{\text{neurônios PVN}}$)

Para densidade de volume dos neurônios no PVN (Vv) encontramos os seguintes resultados: G1: 19% (0,0); G2: 17% (0,14); G3: 17% (0,27); G4: 23% (0,10). (Fig. 21)

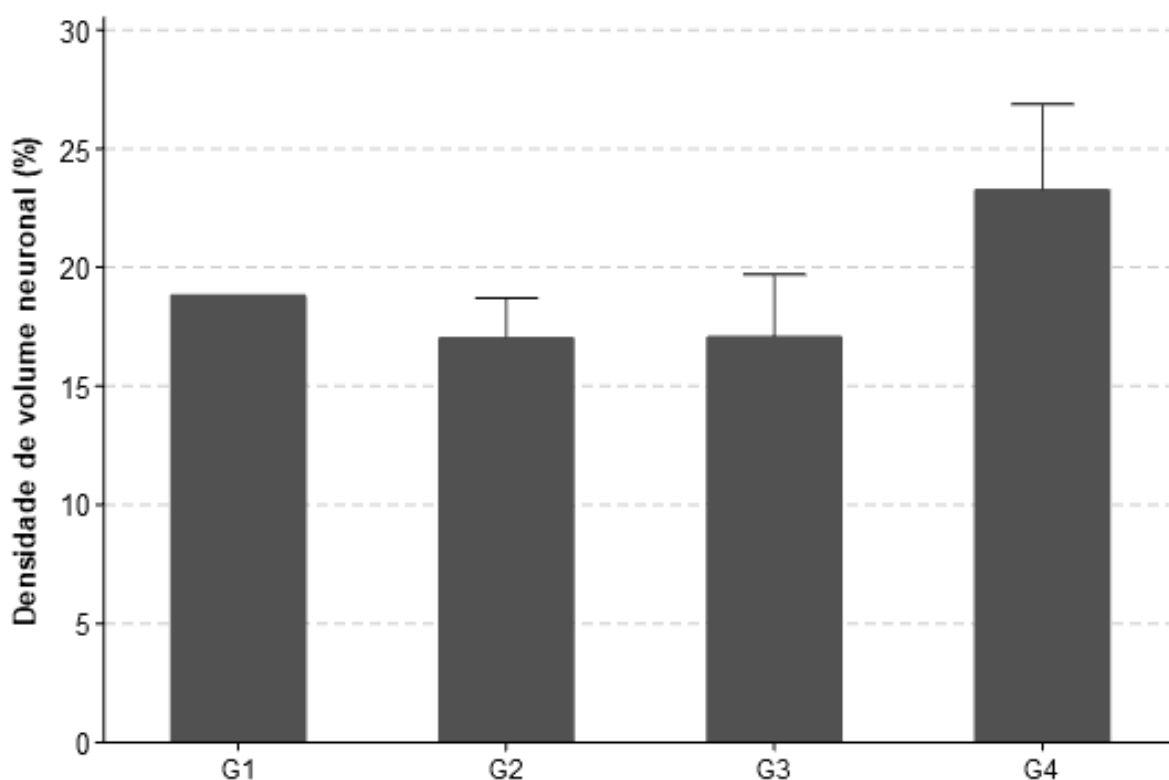


Figura 20 Gráfico representativo da densidade de volume de neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) nos diferentes grupos etários (G1- 01 a 03 dias; G2- 1 mês; G3- 12 meses; G4- 36 meses). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais o erro padrão da média. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes com $p=0,442$.

6.3.3 Volume total ocupado pelos neurônios no PVN ($V_{\text{totneuronal}}$)

Para o $V_{\text{totneuronal}}$ obtivemos os seguintes resultados: G1: 0,08 mm³ (0,0); G2: 0,22 mm³ (0,61); G3: 0,24 mm³ (0,32); G4: 0,42 mm³ (0,55) (Fig 22).

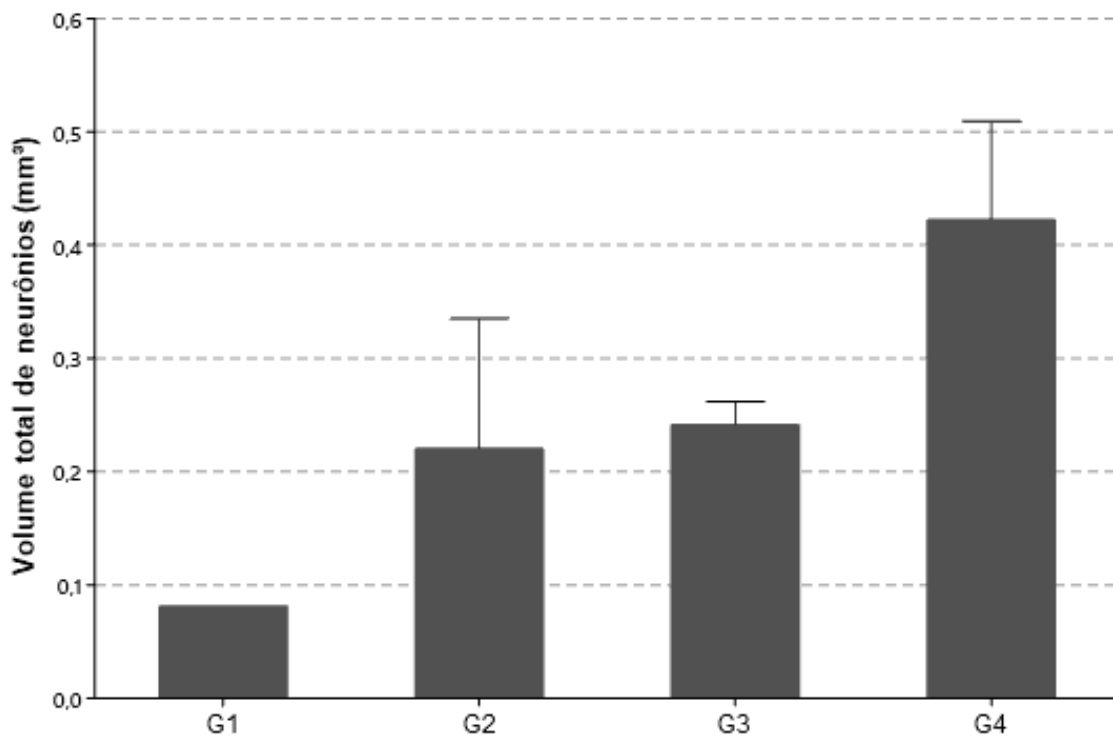


Figura 21 - Gráfico representativo do volume total de neurônios presentes no núcleo paraventricular das cutias nos diferentes grupos etários (G1- 01 a 03 dias; G2- 1 mês; G3- 12 meses; G4- 36 meses). As barras verticais representam as médias dos grupos, as barras horizontais o erro padrão da média. $p= 0,085$

6.3.4 Volume total de tecido não neuronal no PVN ($V_{tot_{outros}}$)

Para o $V_{tot_{outros}}$ obtivemos os seguintes resultados: G1: $0,35 \text{ mm}^3$ (0,0); G2: $1,02 \text{ mm}^3$ (0,74); G3: $1,24 \text{ mm}^3$ (0,15); G4: $1,36 \text{ mm}^3$ (0,41) (Fig 23).

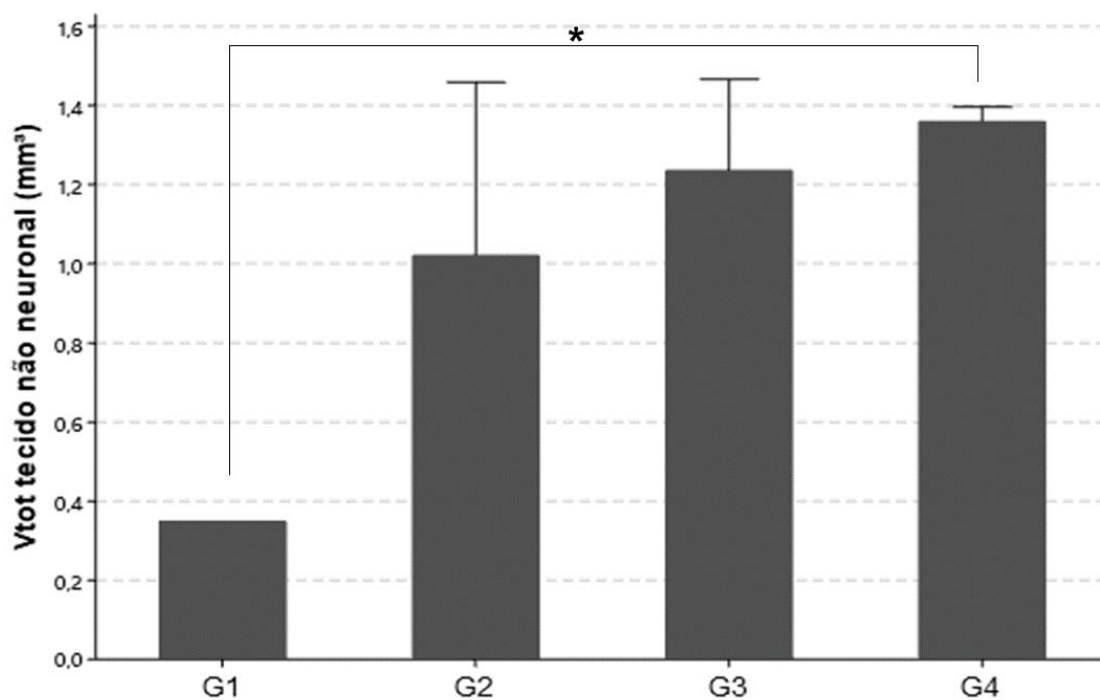


Figura 22 Gráfico representativo do volume total de tecido não neuronal (células da glia, tecido conjuntivo, vasculatura, fibroblastos e outros tipos celulares) presentes no núcleo paraventricular das cutias nos diferentes grupos etários (G1- 01 a 03 dias; G2- 1 mês; G3- 12 meses; G4- 36 meses). As barras verticais representam as médias dos grupos, as barras horizontais o erro padrão da média. $p=0,042$

6.3.5 Volume neuronal médio (V_N)

Para o V_N obtivemos os seguintes resultados: G1- $233 \mu\text{m}^3$ (0,0); G2- $272 \mu\text{m}^3$ (0,38); G3- $291 \mu\text{m}^3$ (0,16); G4- $353 \mu\text{m}^3$ (0,18) (Fig 24).

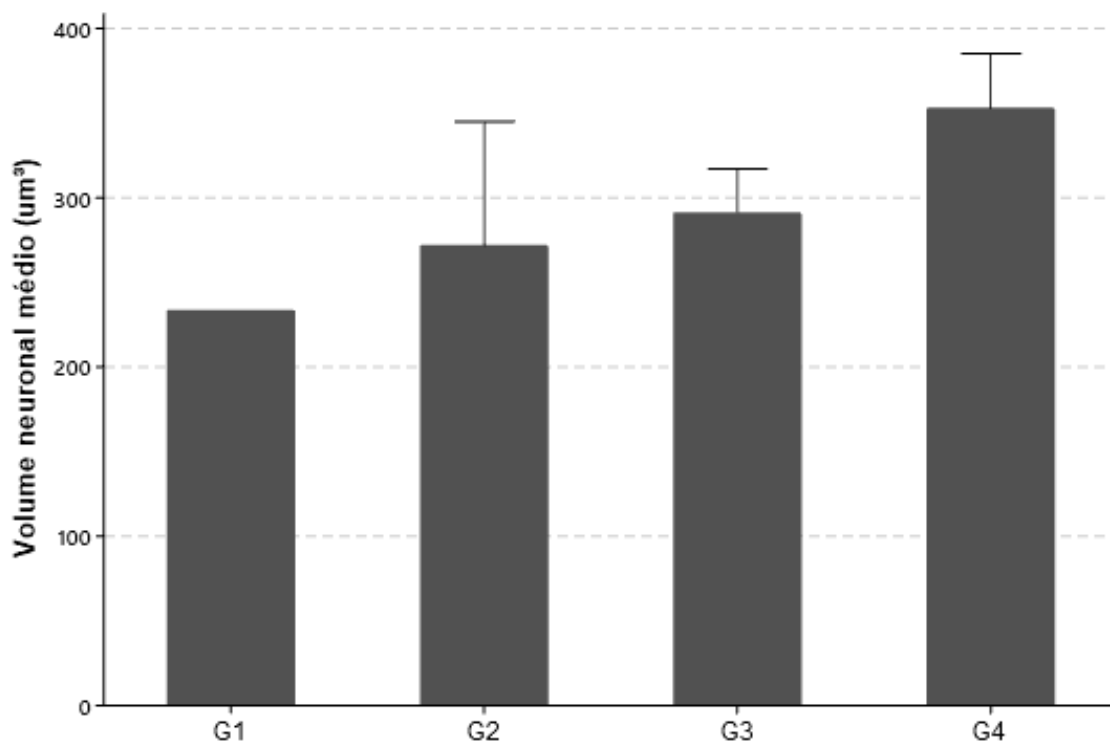


Figura 23 Gráfico representativo do volume neuronal médio do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) nos diferentes grupos etários (G1- 01 a 03 dias; G2- 1 mês; G3- 12 meses; G4- 36 meses). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais o erro padrão da média. Não foi observado diferença estatisticamente significativa com $p= 0,224$.

6.3.6 Número total de neurônios no PVN (N:)

Para o número total de neurônios obtivemos os seguintes resultados: G1- 59653 (0,0); G2- 127575 (0,22); G3- 124622 (0,24); G4- 127575 (0,18) (Fig 25).

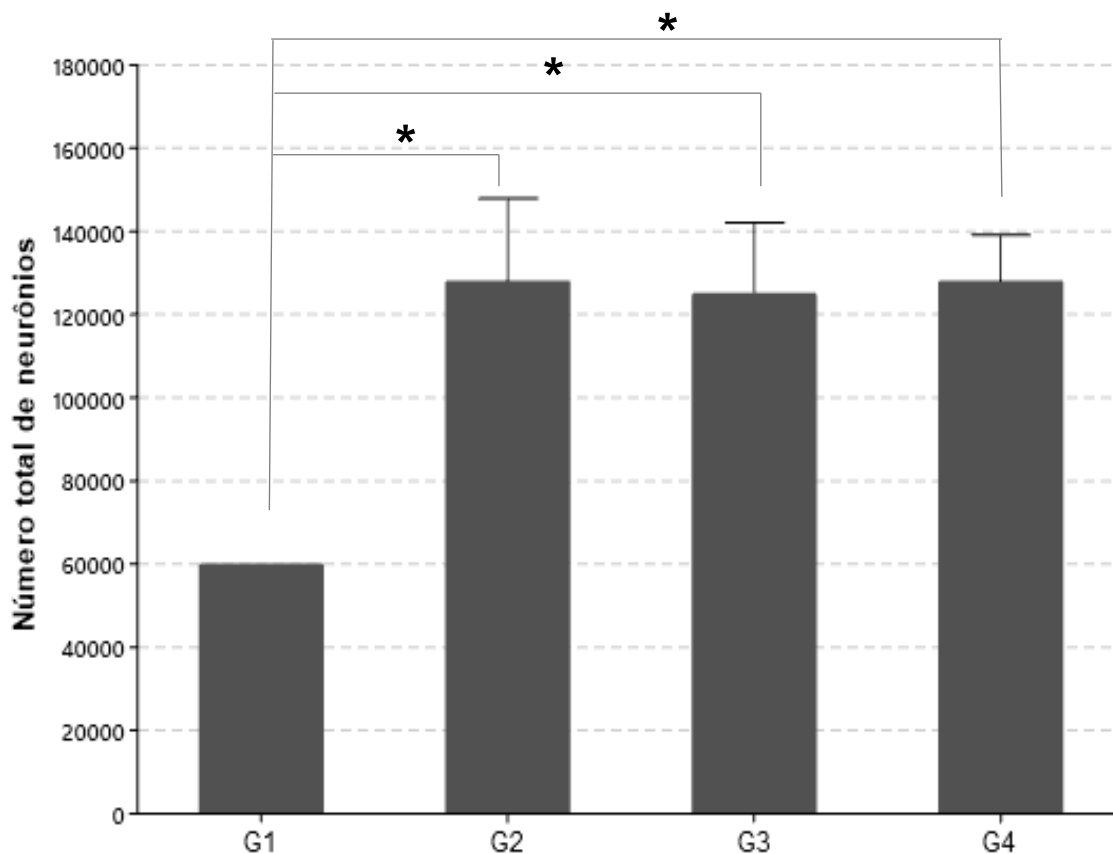


Figura 24 Gráfico representativo do *número total de neurônios* no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) nos diferentes grupos etários (G1- 01 a 03 dias; G2- 1 mês; G3- 12 meses; G4- 36 meses). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais o erro padrão da média. Os (*) representam onde foram observadas diferenças estatisticamente significativas com $p = 0,055$.

7 DISCUSSÃO

Por se tratar de uma espécie cujo PVN nunca foi estudado, todos os dados aqui apresentados são inéditos e toda a discussão será baseada em estudos comparativos com dados adquiridos em outras espécies de roedores e em primatas.

Os principais achados morfoquantitativos desse estudo foram: aumento de 317% no volume do PVN entre os grupos neonato (G1) e senil (G4) e um aumento de 114% no número total de neurônios quando comparado o neonato (G1) com o jovem (G2) e com o senil (G4) e de 109% quando comparado o neonato (G1) com o adulto (G3).

7.1 Micromorfometria

Quanto a delimitação do núcleo, observamos que o PVN da Cutia (*Dasyprocta aguti*) apresenta um formato de “asa de borboleta”, localiza-se bilateralmente na margem do terceiro ventrículo e medialmente em relação ao fórnice. Começamos a observar o PVN da cutia em uma secção na qual também está presente a porção mais dorsal do quiasma óptico muito próximo ao início do trato óptico.

Diferentemente da descrição das subdivisões magnocelulares do PVN de rato e camundongo realizada por Paxinos e Watson (2007), Swanson (2004) e Paxinos e Franklin (2008) em que observam nesses roedores as subdivisões magnocelular anterior (PVHam), magnocelular medial (PVHmm), zona medial da parte posterior magnocelular (PVHpmm) e zona lateral da parte posterior magnocelular (PVHpml), na cutia não foi observado uma região magnocelular anterior nem uma região magnocelular posterior, pois na região posterior observou-se apenas uma continuação das regiões magnocelular medial e lateral.

A subdivisão periventricular (PVNpv) nem sempre é tida como uma região do PVN (Swanson e Kuypers, 1980). No entanto, essa área tem sido descrita atualmente como pertencente a porção parvocelular do PVN (Swanson e Kuypers, 1980; Swanson, 2004; Simmons e Swanson, 2009).

De acordo com as descrições do PVN de rato e camundongo de Paxinos e Watson (2007), Swanson (2004) e Paxinos e Franklin (2008) o conjunto de células

parvocelulares podem ser subdivididos em 7 grupamentos (parte parvicelular anterior (PVHap), zona dorsal da parte parvicelular medial (PVHmpd), parte periventricular (PVHpv), zona ventral da parte medial parvicelular (PVHmpv), parte parvicelular dorsal (PVHdp), parte parvicelular lateral (PVHlp) e parte forniceal (PVHf)) entre eles tem uma subdivisão parvocelular lateral, porção ,esta, que não observamos no PVN da cutia. Além desta subdivisão, Swanson (2004) também descreve uma região fornical que também não foi observada no PVN da cutia.

Entretanto, para uma melhor delimitação e observação de todas as disposições citoarquitetônicas do PVN da cutia faz-se necessário uma análise mais avançada por meio de marcação imunoistoquímica. Processo, este, que mesmo tendo a consciência de sua importância não foi realizado no presente estudos, pois não se encontrava entre nossos objetivos

Desse modo, diferentemente do que se observa em outros roedores nas análises realizadas com a coloração de nissl o PVN da cutia apresenta apenas oito subdivisões. Mas, não observamos diferenças no formato do NPV da cutia quando comparado com outros seres vivos, pois sempre se descreve como o NPV tendo este formato de asa na lateral do terceiro ventrículo.

7.2 Dados quantitativos

Neste estudo, apresentamos a primeira investigação quantitativa do PVN de cutia em *Dasyprocta aguti*, empregando métodos estereológicos imparciais para avaliar se há alterações de volume da região de interesse, do volume total ocupado pelos neurônios, do número de neurônios e do volume dos neurônios durante os processos de maturação e envelhecimento.

7.2.1 Volume do PVN

Os efeitos do desenvolvimento pós-natal (envelhecimento) puderam ser identificados no volume do PVN ($V_{ref_{PVN}}$) onde foi observado um aumento significativo de 317% entre os grupos neonato (G1) e senil (G4). No entanto, quando comparado apenas os grupos neonato (G1), jovem (G2) e adulto (G3), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, mesmo sendo notado um pequeno aumento de volume do PVN entre estes. Fato semelhante acontece quando comparado apenas os grupos jovem (G2), adulto (G3) e senil (G4).

Desse modo, esses aumentos não significativos no volume do núcleo podem ser decorrente de um equilíbrio no número e volume dos neurônios, bem como das células da glia, mas como no presente estudo não foi realizada quantificação de células da glia, não se pode certificar como essas células se comportam durante o desenvolvimento.

Estudos não estereológicos em ratos (Hsu e Pang, 1978) e em humanos (Hofman et al., 1988; Goudsmit et al., 1990) não observaram alterações no volume do PVN com o envelhecimento, no entanto, esses estudos utilizaram apenas duas faixas etárias (adultos e idosos). Dado este que corrobora com o encontrado na presente pesquisa, nessas mesmas faixas etárias.

Não foi encontrado estudos estereológicos em ratos e camundongos que analisassem o NPV com relação a idade. Mas, de acordo com Roberts e colaboradores (2012), que analisou por meio de estudo estereológico o PVN de macaco, foi observado um aumento de volume desta área entre adultos e senis. Fato este que não encontramos no presente estudo, pois entre essas mesmas faixas etárias não foi observado alteração no volume do núcleo.

Não foi encontrado na literatura estudos que comparassem neonatos com senis. Diante disso, não temos dados que possam corroborar ou não com os dados significativos encontrados nesse estudo. Como também, vale salientar que a maioria dos estudos supracitados utilizaram como método para suas quantificações apenas a morfometria, processo este que não leva em consideração toda a extensão da estrutura, ou seja, é uma quantificação bidimensional. Diferentemente do que foi realizado neste estudo, pois utilizamos métodos estereológicos no qual leva-se em

consideração todas as dimensões da estrutura em questão, sendo assim uma quantificação tridimensional do núcleo em questão.

7.2.2 Volume total neuronal e tecido não neuronal

O desenvolvimento pós-natal (maturação e envelhecimento) não teve efeito sobre o volume total ocupado por neurônios no PVN ($V_{tot_{neurônio}}$) da cutia.

Em contrapartida, foi observado um aumento de 291% no volume do tecido não neuronal ($V_{tot_{não\ neuronal}}$), entre os grupos neonato (G1) e senil (G4). Semelhante ao que se notou na análise do $V_{ref_{PVN}}$, quando comparado apenas os grupos neonato (G1), jovem (G2) e adulto (G3), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, mesmo sendo notado um pequeno aumento de volume entre estes. Fato semelhante acontece quando comparado apenas os grupos jovem (G2), adulto (G3) e senil (G4).

Roberts e colaboradores (2012), relataram um aumento significativo de células da glia com o envelhecimento no PVN em macacos utilizando animais adultos e senis. Logo, este dado não corrobora com o que foi encontrado ao analisar o volume do conteúdo não neuronal. Pois, supõe-se que, caso este aumento das células da glia viesse a ocorrer, conseqüentemente haveria também um acréscimo no volume dos componentes não neuronais, o que não foi observado entre estas faixas etárias no presente estudo.

Diante dos dados encontrados, podemos dizer que parte do aumento do volume do núcleo ($V_{ref_{PVN}}$) pode ser proveniente do aumento do volume dos componentes não neuronais presentes no PVN. No entanto, vale lembrar que além das células da glia neste espaço não neuronal temos componentes do tecido conjuntivo, tecido epitelial, dendritos, axônios e terminações nervosas, que podem ser o causador da alteração de volume, mas não foi realizada a quantificação individual de cada componente.

7.2.3 Volume neuronal médio

O desenvolvimento pós-natal (envelhecimento e maturação) não teve efeito significativo no volume neuronal médio (V_N) do PVN da cutia. Ou seja, não foram observadas alterações significativas com relação ao volume médio dos neurônios presentes neste núcleo com o decorrer da idade.

De acordo com Lin e colaboradores (1976), o volume dos neurônios presente no PVN de ratos machos não apresenta alterações significativas quando comparado adultos com idosos. Apesar deste dado corroborar com o encontrado no presente estudo, não se pode ter uma comparação igualitária entre estes, pois o estudo realizado em rato não foi feito com método estereológico e só levou em consideração duas faixas etárias.

No entanto, apesar de não termos encontrado diferença significativa no volume neuronal, vale salientar que não realizamos a quantificação individual deste parâmetro em cada subdivisão do PVN. Logo, seria interessante a análise posterior do volume neuronal de cada porção individualmente, pois cada subdivisão tem uma grande importância fisiológica e pode sofrer alterações localizadas durante o desenvolvimento pós-natal.

7.2.4 Número total de neurônios

O processo de maturação afetou claramente o número de neurônios (N) do PVN onde foi observado um aumento significativo: de 114% quando comparado o neonato (G1) com o jovem (G2) e com o senil (G4) e de 109% quando comparado o neonato (G1) com o adulto (G3). Não foi observada diferença significativa quando comparado os grupos jovem (G2), adulto (G3) e senil (G4) entre eles.

Alguns estudos executados utilizando métodos não-estereológicos, relataram em rato (Peng e Hsu, 1982; Sartin e Lamperti, 1985) e em camundongo (Sturrock, 1992), não haver alterações no número de neurônios do PVN no decorrer do

desenvolvimento. Como também, estudos similares realizados com humanos não descreveram nenhuma mudança significativa com relação ao número dos neurônios no decorrer da idade (Hofman et al., 1988; Goudsmit et al., 1990). Vale salientar que, nesses estudos foram considerados apenas dois grupos etários (adultos e senis), o que corrobora com os dados desta pesquisa quando comparado essas mesmas faixas etárias.

Diferentemente dos dados descritos no presente estudo, uma pesquisa realizada com métodos estereológicos utilizando macaco (Roberts et al. 2012) relatou aumento no número de neurônios do PVN nos animais machos de acordo com a idade utilizando os dois grupos etários (adultos e senis).

Diante dos dados apresentados anteriormente podemos observar que o aumento do volume do PVN ($V_{ref_{PVN}}$) pode ser oriundo tanto dos componentes não neuronais quanto das alterações de número de neurônios no NPV.

7.3 Significado Funcional

O aumento de número de neurônios quando comparado o grupo neonato (G1) com as outras três faixas etárias (jovem, adulto e senil) pode ser decorrente de uma maior taxa de desenvolvimento no primeiro período pós-natal, já que não foi encontrado diferença significativa entre os grupos jovem, adulto e senil. Desse modo, isto corrobora com o que se tem descrito na literatura de que os roedores apresentam uma grande taxa de desenvolvimento do sistema nervoso no período logo após o nascimento (Bayer et al., 1993; Dwyer; Broide; Leslie, 2008; Quinn, 2005). No entanto, para a comprovação dessa hipótese seria necessário a realização de imunoistoquímica com anti-BrdU.

A manutenção de número de neurônios entre jovens, adultos e idosos pode ser decorrente de uma equilíbrio entre neurogênese e apoptose, ou uma brusca redução na taxa de proliferação neuronal nessa fase, como demonstrado por Heine, 2004 que observou uma constante no número de células no giro denteado de ratos a partir de 01 mês de vida.

No processo de desenvolvimento neuronal a apoptose é uma característica importante, no entanto, no processo de senescência não ocorre uma proeminente perda celular (Ahern, et, al, 2013). Acreditou-se, por muito tempo, que durante o envelhecimento ocorria uma perda neuronal moderada e generalizada (Brody, 1955; Ball,1977; Coleman e Flood, 1987; Cabello et al., 2002). No entanto, atualmente admite-se que mesmo havendo perda neuronal em algumas áreas, relacionada ao avanço da idade (Wellman e Sengelaub, 1995; Yates et al., 2008; Stranahan et al., 2012), não há evidências de que seja um fenômeno global para o sistema nervoso (Peters et al., 1998; Roberts et al. 2012; Ladd et al., 2012). Contudo, estudos já demonstraram alterações no número de neurônios no PVN em decorrência da idade (Swaab e Bao, 2011; Roberts et al. 2012).

Entretanto, existem evidências de que o volume do PVN e o número de neurônios podem não alterar com o envelhecimento, mas que alguns neurônios podem estar hiperativos levando a distúrbios relacionados a idade. Como por exemplo o eixo hipotálamo-hipófise pode estar hiperativo no indivíduo senil, pois pode ocorrer uma redução de receptores de glicocorticoides no PVN, o que levaria a um quadro de desregulação hormonal no indivíduo de mais idade (Gupta e Morley, 2014; Swaab e Bao, 2011).

Em contrapartida, alguns estudos têm mostrado um aumento no número de células específicas do PVN. Estudo realizado em macacos *Rhesus* (Roberts et al. 2012) relatou um aumento do número de neurônios e do volume total do PVN em machos idosos. Ainda não se sabe ao certo o motivo desse aumento, mas Swaab e Bao (2011) relataram que as células produtoras de VP estão aumentadas em número no PVN durante o envelhecimento, enquanto as células produtoras de OT encontram-se inalteradas. Já Raadsheer e colaboradores (1994) relataram um aumento do número de neurônios CRH com a idade podendo levar a crer que pode ter um aumento do número de neurônios neuroendócrinos parvocelulares do PVN.

Alterações nervosas relacionadas ao envelhecimento estão normalmente relacionadas ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e alterações sinápticas. Por exemplo, em um quadro hipertensivo observa-se um aumento da concentração de angiotensina circulante e de citocinas pró-inflamatórias que alteram a atividade sináptica no hipotálamo, mais precisamente no PVN. Isso ocorre, porque a angiotensina em grande quantidade pode levar a uma depleção de

NO, que conseqüentemente irá reduzir a neurotransmissão gabaérgica do PVN, aumentando a simpatoexcitação desencadeada por esse núcleo (Ogundele, Lee e Francis, 2016; Wv et, al, 2016).

8 CONCLUSÃO

Diante da análise dos resultados, baseado nos objetivos propostos e nos métodos empregados podemos chegar as seguintes conclusões:

- ✓ O PVN da cutia é diferente do já descrito em outras espécies;
- ✓ O PVN do grupo senil sofre uma hipertrofia quando comparado com o grupo neonato, decorrente de um processo de hiperplasia neuronal e de hipertrofia do conteúdo não neuronal;
- ✓ Há estabilidade no volume total de neurônios durante as fases de maturação e envelhecimento;
- ✓ O volume total de conteúdo não neuronal aumenta entre neonatos e senis, mas não podemos concluir se por hipertrofia, hiperplasia ou ambos.
- ✓ O volume médio de neurônios apresenta-se estável durante o desenvolvimento pós-natal;
- ✓ O número de neurônios apresenta um aumento na primeira fase de maturação.

9 ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
Fone: (84) 99229-6491 / e-mail: ceua@setoria.ufrn.br



DECLARAÇÃO


Natal (RN), 12 de setembro de 2019.

Declaramos que a proposta intitulada "Avaliação da dinâmica neuronal do núcleo paraventricular do hipotálamo durante o desenvolvimento pós-natal em cutia (*Dasyprocta aguti* – Linnaeus, 1766)", protocolo nº 054/2019, sob a responsabilidade de Fernando Vagner Lobo Ladd, está **ISENTO** de aprovação por esta Comissão. Esta proposta tem por objetivo, e para fins de pesquisa, "analisar um dos componentes centrais do controle cardíaco (núcleo paraventricular) em cutias, utilizado como modelo de desenvolvimento pós-natal (maturação e envelhecimento) do sistema nervoso", utilizando o encéfalo de *Dasyprocta aguti* (cutia) obtido a partir do protocolo 0936/2006, aprovado em 16/08/2006 pela Comissão de Biotética da Universidade de São Paulo. Tal isenção deve-se ao fato de não haver nenhuma implicação ética e moral na execução de um projeto cujo sujeito experimental já está morto, exceto para humanos. Portanto, o referido estudo não é contemplado pela Lei nº 11.794, de 2008.

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

Colocamo-nos a disposição para ulteriores esclarecimentos.

Cordialmente,


Allanda Maira Comello de Silva
Vice-Coordenadora da CEUA-UFRN
Gestão 2019-2020

10 REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO L. M. et al., **Asymmetric post-natal development of the superior cervical ganglion of pacas (Agouti paca)**. *Int J Dev Neurosci*. v. 27, p.37–45, 2009.
- AFFLECK, V. S.; COOTE, J. H.; PYNER, S. **The projection and synaptic organisation of NTS afferent connections with presympathetic neurons, GABA and nNOS neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus**. *BV. Neuroscience*, v. 219, p.48-61, 2012.
- AHERN, T. H. et al. **Cell death atlas of the postnatal mouse ventral forebrain and hypothalamus: Effects of age and sex**. *J. of Comparative Neurology*, Wiley, v. 521, n. 11, p.2551-2569, 2013.
- AKKENBERG, B. et al. **Aging and the human neocortex**. *Experimental Gerontology*, v. 38, n. [S.I], p.95-99, 2002.
- ANDERSEN, B. B. et al. **No change in neuron numbers in the dentate nucleus of patients with schizophrenia estimated with a new stereological method--the smooth fractionator**. *J Anat*. v. 205, p.313–321, 2004.
- ANDERSEN, B. B. et al. **Aging of the human cerebellum: A stereological study**. *The J. of Comparative Neurology*, v. 466, n. 3, p.356-365, 2003.
- BALDASSO, E. et al. **Hemodynamic and metabolic effects of vasopressin infusion in children with shock**. *J. de Pediatria*, v. 83, n. 8, p.137-145, 2007.
- BALL, M. J. **Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granule vacuolar degeneration in the hippocampus with a geing and dementia: a quantitative study**. *Acta Neuropathol*. V. 37, p.111–118, 1977.
- BARBOSA, P. B. B. M. et al. **Experimental infection parameters in Galea spixii (Rodentia: Caviidae) with Leishmania infantum chagasi**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 6, p. 545-548, 2008.
- BAYER, S. et al. **Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined pattern in the rat**. *Neurotoxicology*, v. 14, n.1, p.83-144, 1993.

BENARROCH, E. E. **Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease.** Springer Nature. Clinical Autonomic Research, v. 15, n. 4, p.254-263, 2005.

BIRAN, J. et al. **Role of developmental factors in hypothalamic function.** Frontiers in Neuroanatomy, v. 9, p.1-11, 21, 2015.

BONVICINO C. R.; OLIVEIRA J. A.; D'ANDREA P. S. **Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos.** Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008.

BRODY, H. **A study of aging in the human cerebral cortex.** Organization of the cerebral cortex. III J. Comp. Neurol. v. 102, p. 511–516, 1955.

CARTER, C. S. et al. **Oxytocin and social bonding.** Ann NY Acad Sci. v. 652, p. 204-211, 1992.

CAVALCANTI, J. R. L. D. P., et al. **A cytoarchitectonic and TH-immunohistochemistry characterization of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area and retrorubral field in the rock cavy (*Kerodon rupestri*).** J. of chemical neuroanatomy, 2014.

CID, B., et al., **Short-term success in the reintroduction of the red-humped agouti *Dasyprocta leporina*, an important seed disperser, in a Brazilian Atlantic Forest reserve.** Mongabay.com Open Access J. - Tropical Conservation Science Vol.7 (4), p.796-810, 2014.

CLARK, W. E. L. G. **The Hypothalamus, Morphological, Functional, Clinical and Surgical Aspects.** Pub. For the William Ramsay Henderson trust by Oliver and Boyd, 1938.

COLEMAN, P. D.; FLOOD, D. G. **Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease.** Neurobiol. Aging, v. 8, p. 521–545, 1987.

CRAVO, S. L. et al. **Cardiovascular: novas evidências e novas questões.** X Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, v. 39, n. 9, p.89-100, 2006.

CROSBY, E. C.; WOODBURN, R. T. **The comparative anatomy of the preoptic área and the hypothalamus.** Research in Nervous and Mental Disease, v.20, p. 52-169, 1939.

DACOME, O. A.; GARCIA, R. F. **Efeito modulador da ocitocina sobre o prazer.** Revista Saúde e Pesquisa. v. 1, p. 193-200, 2008.

DAMPNEY, R. A. et al. **Regulation of sympathetic vasomotor activity by the hypothalamic paraventricular nucleus in normotensive and hypertensive states.** American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2018.

DAMPNEY, ROGER A. L. **Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives.** American Physiological Society. Advances in Physiology Education, v. 40, n. 3, p.283-296, 2016.

DOUGHERTY, P. **Hypothalamus: Structural Organization.** Disponível em: <<https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/s4/chapter01.html>>. Acesso em: 20 out. 2017, 2000.

DWYER, J. B.; MCQUOWN, S. C.; LESLIE, F. M. **Nicotine and brain development.** Birth Defects Research, Part C: Embryo Today – Reviews, v. 84, n.1, p. 30-44, 2008.

FERGUSON, Alastair V; LATCHFORD, Kevin J; SAMSON, Willis K. **The paraventricular nucleus of the hypothalamus – a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction.** Expert Opinion on Therapeutic Targets, v. 12, n. 6, p. 717-727, 2008.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. **The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation.** Physiol Rev. v. 81, p. 629-683, 2001.

GOUDSMIT E. et al. **The supraoptic and paraventricular nuclei of the human hypothalamus in relation to sex, age and Alzheimer's disease.** Neurobiol Aging. V. 11, p. 529–536, 1990.

GUNDERSEN, H. J. G. et al. **The efficiency of systematic sampling in stereology – reconsidered.** Journal of Microscopy, v. 193, n 3, p. 199–211, 1999.

GUNDERSEN, H. J. G. **The smooth fractionator.** Journal of Microscopy. V. 207, p. 191-210, 2002.

GUPTA, D.; MORLEY, J. E. **Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis and Aging.** Comprehensive Physiology, p.1495-1510, 2014.

GUYENET, P. G. **The sympathetic control of blood pressure.** Nature Reviews Neuroscience, v. 7, n. 5, p.335-346, 2006.

HOFMAN M. A. et al. **Morpho-metric analysis of the suprachiasmatic and paraventricular nuclei in the human brain: sex differences and age-dependent changes.** J Anat. V. 160, p. 127–143, 1988.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Three-dimensional Measurement in Microscopy. Unbiased Stereology.** QTP Publications, Liverpool, 2010.

HSU H. K., PENG M. T. **Hypothalamic neuron number of old female rats.** Gerontology. V. 24, p. 434–440, 1978.

INSEL, T. R.; HULIHAN, T. J. **A gender-specific mechanism for pair bonding: oxytocin and partner preference formation in mono-gamous voles.** Behav Neurosci. v. 109, p. 782-789, 1995.

JORDÃO, M. T. et al. **Exercise Training Restores Hypertension-Induced Changes in the Elastic Tissue of the Thoracic Aorta.** Jornal of vascular research, p. 5213-524, 2011.

JORGE, M. S. P.; PERES, C. A. **Population Density and Home Range Size of Red-Rumped Agoutis (*Dasyprocta leporina*) Within and Outside a Natural Brazil Nut Stand in Southeastern Amazonia.** Biotropica v.37(2), p. 317–321, 2005.

KIM, K.; CHOE, H. K. **Role of hypothalamus in aging and its underlying cellular mechanisms.** Mechanisms of Ageing and Development, p.1-6, 2018.

LACHER Jr., T. E. **The comparative social behaviour of *kerodon rupestris* and *galea spixii* and the evolution of behaviour in the cavidade.** Bull Carnegie Museum Natural History, v. 17, p. 171, 1981.

LADD, A. A. et al. **SCG postnatal remodelling – hypertrophy and neuron number stability – in Spix’s Yellow-toothed Cavies (*Galea spixii*).** International Journal of Developmental Neuroscience, v.30, p. 129-137, 2012.

LAKATTA, E. G.; LEVY, D. **Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease.** *Circulation*. V. 107, n. 2, p.346-354, 2003.

LAKATTA, E. G., SOLLOTT, S. J. **Perspectives on mammalian cardiovascular aging: humans to molecules comparative.** *Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 132, p. 699–721, 2002.

LIN, K. H. et al. **Changes in the Nuclear Volume of Rat Hypothalamic Neurons in Old Age.** *Neuroendocrinology*, v. 21, p. 247-254, 1976.

MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI, M. et al. **Dexamethasone exposure affects paraventricular nucleus and pituitary corticotrophs in female rat fetuses: An unbiased stereological and immunohistochemical study.** *Tissue and Cell*, v. 48, n. 5, p.516-523, 2016.

MAYHEW, T. M.; OLSEN, D. R. **Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle.** *J Anat.*, v. 178, p. 133-144, 1991.

MCBRYDE, F. D. et al. **Hypothalamic paraventricular nucleus neuronal nitric oxide synthase activity is a major determinant of renal sympathetic discharge in conscious Wistar rats.** *Wiley. Experimental Physiology*, v. 103, n. 3, p.419-428, 2018.

MEERSMAN, R. E.; STEIN, P. K. **Vagal modulation and aging.** *Biological psychology*, v.74, n. 2, p. 165-173, 2007.

MELO, S. R.; et al. **The developing left superior cervical ganglion of pacas (Agouti paca).** *The Anatomical Record*, v. 292, p. 132-142, 2009.

MOOJEN J. **Os Roedores do Brasil.** Rio de Janeiro: Ministério de Educação e Saúde. Instituto Nacional do Livro; Biblioteca Científica Brasileira. Série A – II:214, 1952.

MÜHLFELD, C. **Effect of voluntary exercise on number and volume of cardiomyocytes and their mitochondria in the mouse left ventricle.** *Basic Res Cardiol.* V.103, n. 1, p. 12-21, 2008.

NAKOU, E. et al. **Healthy aging and myocardium: A complicated process with various effects in cardiac structure and physiology.** International Journal of Cardiology, v. 209, p.167-175, abr. 2016.

OGUNDELE, O. M.; LEE, C. C.; FRANCIS, J. **Age-dependent alterations to paraventricular nucleus insulin-like growth factor 1 receptor as a possible link between sympathoexcitation and inflammation.** Journal of Neurochemistry, v. 139, n. 5, p.706-721, 19 out. 2016.

OLIVEIRA, G. B. et al. **Post-implantation development of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758).** Animal Reproduction Science v. 182, p. 35–47, 2017.

OLIVEIRA, G. B. et al. **The lumbosacral plexus of the red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758) (Rodentia: Caviidae).** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 37, n. 6, p. 4085-4096, 2016.

PAKKENBERG B.; GUNDERSEN H. J. **Número de neurônios neocorticais em humanos: efeito do sexo e idade.** J Comp Neurol. V. 384, p. 312, 1997.

PAL, R. et al. **Age-related changes in cardiovascular system, autonomic functions, and levels of BDNF of healthy active males: role of yogic practice.** Springer Nature. Age, v. 36, n. 4, p.1-17, 2014.

PAXINOS, G. F. K. B. J.; FRANKLIN, K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.** 2nd edition. San Diego: Academic Press, 2008.

PAXINOS, G. F. K. B. J.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.** 6rd edition. Academic press, 2007.

PENG M. T., HSU H. K. **No neuron loss from hypothalamic nuclei of old male rats.** Gerontology. V. 28, p. 19–22, 1982.

PETERS A, M. J. H.; ROSENE D. L.; HYMAN B. T. **Are neurons lost from the primate cerebral cortex during normal aging?** Cereb Cortex. v. 8, p.295–300, 1998b.

PINHEIRO M. J. P.; ANDRADE S. A.; CUNHA J. N. **Preservação e exploração de animais silvestres nativos: Preás, cutia e Mocê.** Caatinga, v.6, p.28-49, 1989.

PYNER, S. **The paraventricular nucleus and heart failure.** Wiley. Experimental Physiology, v. 99, n. 2, p.332-339, 2014.

QUINN, R. **Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years?** Nutrition, V.21, n. 6, p. 775-777, 2005.

RIBEIRO, A. A. C. M. et al. **Estimate of size and total number of neurons in superior cervical ganglion of rat, capybara and horse.** Anatomy and Embryology, v.208, n. 208, p. 367-380, 2004.

RICE, D.; BERONE Jr., S. **Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models.** Environmental Health Perspectives, v. 108, suppl.3, p. 511-533, 2000.

ROBERTS, D. E.; KILLIANY, R. J.; ROSENE, D. L. **Neuron numbers in the hypothalamus of the normal aging rhesus monkey: Stability across the adult lifespan and between the sexes.** The Journal of Comparative Neurology, v. 520, n. 6, p.1181-1197, 2012.

ROBINSON, A. A. et al. **Candidate molecular pathways of white matter vulnerability in the brain of normal aging rhesus monkeys.** Springer Nature. Geroscience, v. 40, n. 1, p.31-47, 2018.

SANTOS, E. F. **Ecologia da cutia *Dasyprocta leporina* (Linnaeus, 1758) em um fragmento florestal urbano em Campinas – SP (rodentia: dasyproctidae).** f. 82, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP, 2005.

SAPER, C. B.; LOWELL, B. B. **The hypothalamus.** Current Biology, V. 24 n. 23, p. 1111-1116, 2014.

SARTIN J. L., LAMPERTI A. A. **Neuron numbers in hypothalamic nuclei of young, middle-aged and aged male rats.** Experientia. V. 41, p. 109–111, 1985.

SCHMITZ C.; HOF P. R. **Estereologia Baseada em Design em Pesquisa sobre Envelhecimento Cerebral.** Riddle DR, editor. Envelhecimento Cerebral: Modelos, Métodos e Mecanismos. Boca Raton (FL): CRC Press / Taylor & Francis; 2007. Capítulo 4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3880/>.

SCHMITZ, C.; HOF, P. R. **Design-Based Stereology in Brain Aging Research.** 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3880/>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

SILVA, A. B. S. et al. **Morfologia da laringe de cutia (*Dasyprocta* sp.).** Pesq. Vet. Bras, v. 6, n. 34, p.593-598, 2014.

SIMERLY, R. B. **Anatomical substrates of hypothalamic integration.** In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*, 3rd ed., Elsevier, San Diego, 2004.

SIMMONS, D. M.; SWANSON, L. W. **Comparison of the Spatial Distribution of Seven Types of Neuroendocrine Neurons in the Rat Paraventricular Nucleus: Toward a Global 3D Model.** *The Journal of Comparative Neurology. Research in Systems Neuroscience*. V. 516 p. 423-441. California, 2009.

SIMMONS, D. M.; SWANSON, L. W. **High-resolution paraventricular nucleus serial section model constructed within a traditional rat brain atlas.** Elsevier. *Neuroscience Letters* V. 438 p.85-89. California, 2008.

SINGH, M. D.; SINGH, S.; GARCIA, G. W. **Understanding mammary activity in red-rumped agouti and implications for management and conservation of this Neotropical game species.** *Braz. J. Biol.*, vol. 78, nº. 3, p. 540-547, 2018.

SNELL, Richard S. **Neuroanatomia clínica/** Richard S. Sneel; traduzido por Marcio Moacyr de Vasconcelos. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

STRANAHAN, A. M., JIANG, N. T., SPIEGEL, A. M.; GALLAGHER, M. **Aging reduces total number in the dorsal component of the rodent prefrontal cortex.** *J. Comp. Neurol.* V. 520, p. 1318–1326, 2012.

STURROCK R. R. **Stability of neuron number in the ageing mouse paraventricular nucleus.** *Ann Anat.* V. 174, p. 337–340, 1992.

SWAAB, D. F.; BAO, A. **(Re-)activation of neurons in aging and dementia: Lessons from the hypothalamus.** Elsevier BV. *Experimental Gerontology*, v. 46, n. 2-3, p.178-184, 2011.

SWANSON, L. W. **Brain maps: structure of the rat brain. A laboratory guide with printed and electronic templates for data, models and schematics.** 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004.

SWANSON, L. W.; KUYPERS, H. G. J. M. **The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Cytoarchitectonic Subdivisions and Organization of Projections to the Pituitary, Dorsal Vagal Complex, and Spinal Cord as Demonstrated by Retrograde Fluorescence Double-Labeling Methods.** *The Journal of Comparative Neurology*. V. 194 p. 555-570. Missouri, 1980.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. **HYPOTHALAMIC INTEGRATION: Organization of the Paraventricular and Supraoptic Nuclei.** Ann. Rev. Neurosci, v. 6, n. [], p.1-56, ago. 1983.

WELLMAN, C. L.; SENGELAUB, D. R. **Alterations in dendritic morphology of frontal cortical neurons after basal forebrain lesions in adult and aged rats.** Brain Res. V. 669, p. 48–58, 1995.

WEST, Bruce J. **The wisdom of the body; a contemporary view.** Frontiers Media SA. Frontiers in Physiology, v. 1, p.1-2, 2010.

WEST, M. J.; SLOMIANKA, L.; GUNDERSEN, H. J. **Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractinator.** The anatomical record, V.231, p. 482-497, 1991.