



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

Milena Caroline Nunes Monteiro

**Neurogênese do lagarto *Tropidurus hispidus*: estudo
anatômico das regiões telencefálicas e análise comparativa da
morfologia do soma neuronal**

São Cristóvão (SE)

2020

Milena Caroline Nunes Monteiro

Neurogênese do lagarto *Tropidurus hispidus*: estudo anatômico das regiões telencefálicas e análise comparativa da morfologia do soma neuronal

Monografia apresentada à disciplina Iniciação da pesquisa em biologia II, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.
Orientadora: Prof. Dra. Vanessa Pereira Tortelli.

**São Cristóvão (SE)
2020**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter sido meu abrigo e esperança nos momentos difíceis, a força para recomeçar, todas as vezes em que foi necessário. E a Nossa Senhora das Graças, pela graça alcançada dessa formatura e por ser meu amparo sempre.

Aos meus pais por todo incentivo e conselhos. Por terem investido na minha educação, sem medir esforços. Meu pai, ai painho, ainda vejo seus olhos brilhando quando eu explicava minha pesquisa, sua vontade de ouvir mesmo sem entender, seu jeito de me mostrar nesse olhar que estava no caminho certo. Isso aqui é para você, é o nosso sonho, era você que inventava mil coisas legais quando criança, hoje digo que SOMOS cientistas e além disso grandes sonhadores. Te amo.

Agradeço também aos meus irmãos, Guga e Mariazinha. Guga sempre meu conselheiro, que fazia questão de fazer propaganda, falava o tema da minha pesquisa para todo mundo, tudo errado, mas falava com um sorriso orgulhoso, que me fazia dar mais valor a tudo isso. Também te agradeço, Guga por se fazer perto sempre, mesmo estando a um oceano de distância, sei que posso contar contigo e pude dividir com você as dores e as alegrias de todo esse percurso.

Minha Mariazinha, que com seu jeitinho de se inspirar em mim e brincar de cientista me fazia querer ir mais além para que você tivesse um modelo real e de perto, de que é possível uma mulher fazer seu nome na ciência. Por todas as vezes que me viu aperrada e com um sorriso disse que estava tudo bem, que ficaria tudo bem. Como amo vocês.

Queria falar das grandes mulheres que me fizeram o que sou. Primeiro **mainha**, a senhora sempre me ensinou a viver e ser tudo aquilo que eu queria, me incentivou muito a estudar para conquistar meu lugar, para estar em uma relação em igualdade, você gostava de trabalhar e parou por mim, num momento em que eu precisei, painho nunca te deixou faltar nada, nem te colocou a baixo dele, em hipótese nenhuma, mas mesmo assim você me ensinou a tentar ser mais, ir mais além de onde você foi.

Te agradeço tanto, tanto, por cada dia que você me deixou estudar o dia inteiro, que mesmo precisando da minha ajuda, deixou passar porque viu que eu precisava terminar algo, enfim, por todas as vezes que você me disse para lutar pra conseguir o meu lugar e pra não me acomodar quando eu chegasse lá, lutar sempre para ir além, todas as vezes que você me disse com medo de que eu casasse e deixasse de lado esses sonhos, pra que eu me formasse, fizesse mestrado e doutorado e só depois pensasse no resto (dá para ver em você, em cada conselho, a sua vontade e os seus sonhos de me ver sendo uma grande mulher).

E é exatamente nesse medo, que entra a outra grande mulher da qual quero falar, Vanessa, minha orientadora, que sempre, sempre foi mais que isso, foi amiga, conselheira, foi mãe (estou até no mural de filhos), com você aprendi que posso ser tudo isso, sem adiar ou deixar meus sonhos de família, você é meu exemplo vivo de que dá pra ser mãe (nesse caso de 4 e 5 comigo), cientista, professora, chefe de departamento, surfista, música e tudo mais que você quiser ser, com você percebi que no fundo eu não precisava correr tanto e adiar tanto esses sonhos como eu planejava antes, aprendi que nem sempre é fácil, mas quando era difícil era no sorriso de Isabelle e seu cabelo loiro correndo na escola que você encontrava a força de continuar o dia.

Aprendi também a não ter pressa a entender que nem sempre estamos bem para cuidar tudo, quantas reuniões viram doce, açaí e salão porque não estávamos num dia bom?! Te agradeço muito por tudo isso, por ter feito o começo da minha vida científica inesquecível, por mesmo nas mil e uma vezes que a cultura deu errado, você ter estado ali triste também, mas pronta a buscar um novo caminho, uma nova resposta.

Agradeço também a Fran (minha prima madrinha) e Clarinha que todo dia me ensinam a ter coragem, coragem para assumir minhas próprias batalhas, coragem para não desistir nem baixar a cabeça por nada. Donas de grandes feitos e da minha inspiração.

Enfim obrigada a vocês minhas grandes mulheres que levarei sempre como meu maior exemplo.

Matheus, meu menino, agradeço por ter sido meu colo, meu lar, a cada vez que perdi uma cultura (e não foram poucas as vezes), que fui mal em alguma prova, que perdi o sentido e a graça de fazer tudo isso, quando me culpei pelos animais que morreram para mais um experimento, quando vi que talvez eu não fosse tudo aquilo que achava ser, foi aquele a quem corri para contar uma novidade boa na mesma intensidade que corri para me esconder e chorar em um dia difícil. Me ouviu falando de células, relatórios, projetos e lagartos por horas, leu comigo mil vezes os meus resumos e banners até eu achar que estava perfeito. Foi meu fã e esteve comigo mesmo sem estar, no maior orgulho até nas apresentações mais simples (nunca vou esquecer daquela rosa em Campos)! Que esteve sempre disposto a me acompanhar para que eu não desistisse de nada da vida acadêmica, mestrado, doutorado... E que sonhou comigo um futuro incrível, pelo qual, cada passo desses valeu a pena, obrigada!

Também quero agradecer a katty, que sempre me cobrou organização e esforço, e esteve disponível para dúvidas sempre que precisei. Aprendi muito contigo, obrigada. A Ronaldo que me lembrou o valor da ciência de base, todas as vezes que eu me perguntei até onde eu poderia chegar estudando o cérebro de um lagarto tropical, e ao professor Murilo, que abriu as portas do seu laboratório para mim, e sempre me fez refletir que a ciência deveria ser muito mais que tudo isso, algo transcendental.

Para terminar, agradeço a minha equipe, (Heitor, Rodolfo, João, Thiago, Marcos, Auderlan, Edson, Marina, Katty, Thassya, Roberta, Isabela, Mylaine), que foi companheira nos momentos bons e difíceis, que esteve sempre disposta a ajudar e a me ensinar, com paciência. Agradeço por todos os dias de zueira e gargalhadas, por todas as discussões científicas em que todos tínhamos voz, sem distinção de graduação ou doutorado. Por todos os experimentos e conselhos. Obrigada, de verdade, vocês fazem parte dessa história.

Agradeço também ao suporte financeiro da FAPITEC que tornou possível todo esse projeto.

RESUMO

O lagarto tropical *Tropidurus hispidus* tem sido objeto de estudo da neurofisiologia por apresentar alta taxa de neurogênese pós-natal, uma característica de suma importância tendo em vista que grande parte das pesquisas que visam o tratamento da perda neural ou neurodegeneração buscam avaliar como os novos neurônios se formam. Além disso, pouco se sabe acerca de como esses neurônios se encaixam nas circuitarias neurais previamente estabelecidas. Outro fator importante na escolha desse animal são as teorias de homologias encontradas entre as regiões corticais de répteis e de mamíferos. Objetivando descrever a anatomia e a morfologia neuronal das regiões corticais do *Tropidurus hispidus*, aumentar o conhecimento de base da neurogênese pós-natal, e comparar de acordo com a morfologia somática as regiões ditas homólogas entre o encéfalo de mamíferos e répteis, os encéfalos dos lagartos *T. hispidus* foram levados a criostato, onde foram feitos cortes seguindo o padrão rostro-cloacal, tais cortes passaram parte deles, por coloração de Nissl e parte por imunohistoquímica de DCX. A partir disso foi realizado o mapeamento anatômico das áreas corticais e não corticais presentes no telencéfalo do lagarto, de acordo com esses resultados iniciamos o estudo da morfologia somática das áreas corticais, áreas mais proliferativas e com homologias comparadas ao encéfalo de mamíferos. As regiões foram comparadas por área e perímetro ao longo de todos os cortes e em seguida foi analisada a morfologia celular presente nas regiões corticais, quanto aos tipos de soma neural, a região que se encontram (comissural, pré e pós comissural), e a origem dessas células (período embrionário ou de neurogênese adulta) comparando em frequência e morfologia somática. Na análise de área e perímetro, as primeiras áreas corticais bem delineadas encontradas na porção mais rostral do telencéfalo do lagarto foram o córtex medial e o dorsomedial, seguidos pelo dorsal e o lateral, que aparecem mais tardiamente (após 600 μm). A partir do décimo quinto corte, os padrões das regiões não corticais começam a ser encontrados, dentre elas, a região ventricular dorsal, septo, área de transição estriado amigdalóide, complexo amigdalóide e estriado, indicando que as regiões não corticais ocupam um pequeno espaço de cortes do telencéfalo do lagarto e são em sua maioria áreas

de transição. Analisando a morfologia de soma neural das áreas corticais, tendo em vista que são as regiões comparadas ao encéfalo de mamíferos e mais estáveis espacialmente, foi visto que as células maduras foram mais frequentes com somas ovalados e piramidais alongados muito diferente do padrão encontrado nas regiões corticais do grupo irmão, enquanto que para as células jovens, marcadas por DCX, o resultado foi favorável a piramidais alongados e piramidais, sugerindo que esses são os tipos somáticos mais formados por neurogênese pós-natal neste animal.

Palavras-chaves: *Tropidurus hispidus*, neurogênese pós-natal, áreas corticais, morfologia somática.

ABSTRACT

The tropical lizard *Tropidurus hispidus* has been the object of neurophysiology study for presenting a high rate of postnatal neurogenesis, a characteristic of paramount importance considering that a great part of the researches aiming at the treatment of neural loss or neurodegeneration seek to evaluate how new neurons are formed. Moreover, little is known about how these neurons fit into previously established neural circuitry. Another important factor in the choice of this animal are the theories of homologies found among the cortical regions of reptiles and mammals. Aiming to describe the anatomy and neuronal morphology of the cortical regions of *Tropidurus hispidus*, to increase the basic knowledge of postnatal neurogenesis, and to compare how much according to somatic morphology the so-called homologous regions between the mammalian and reptile encephalon, the *T. hispidus*'s encephals were taken to cryostat, where cuts were made following the rostro-cloacal pattern, such cuts passed part of them, by Nissl staining and part by immunohistochemistry of DCX. Based on this, the anatomical mapping of the cortical and non-cortical areas present in the telencephalon of the lizard was performed, according to these results we began the study of the somatic morphology of the cortical areas, areas with more proliferative and homologies compared to the mammalian encephalon. The regions were compared by area and perimeter along all sections and then the cell morphology present in the cortical regions was analyzed, regarding the types of neural sum, the region they are in (commissural, pre and post commissural), and the origin of these cells (embryonic period or adult neurogenesis) comparing in frequency and somatic morphology. In the area and perimeter analysis, the first well delineated cortical areas found in the most rostral portion of the telencephalon of the lizard were the medial and dorsomedial cortex, followed by the dorsal and lateral, which appear later (after 600 μm). From the fifteenth cut, the patterns of the noncortical regions begin to be found, among them, the dorsal ventricular region, septum, striated amygdaloid transition area, amygdaloid complex and striated, indicating that the noncortical regions occupy a small space of slices of the telencephalon of the lizard and are mostly transition areas. Analyzing the neural sum morphology of the cortical areas, considering that they

are the regions compared to the mammalian encephalon and more spatially stable, it was seen that mature cells were more frequent with elongated oval and pyramidal sums very different from the pattern found in the cortical regions of the sibling group, while for the young cells, marked by DCX, the result was favorable to elongated and pyramidal pyramids, suggesting that these are the somatic types most formed by postnatal neurogenesis in this animal.

Keywords: *Tropidurus hispidus*, postnatal neurogenesis, cortical areas, somatic morphology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**-Imagem adaptada de SANTOS, 2010 (página 13) representando as homologias comparadas entre as regiões corticais do encéfalo de répteis e de mamíferos. Em vermelho o Giro Denteado, região do hipocampo comparada ao CM de répteis, em amarelo área 3 do Corno de Ammon , comparado ao CDM de répteis e em laranja o núcleo piriforme comparado ao CL de répteis. 20
- Figura 2**- *Tropidurus hispidus*, Squamata, Tropiduridae. Figura retirada de SANTOS, 2016 (página 25). 22
- Figura 3**-Imagem adaptada de PIMENTEL, 2014 (página 26), representando o encéfalo do *Tropidurus hispidus*, destacando a zona proliferativa na região do sulco medial e as duas principais rotas de migração dos neurônios, comissural (1) e radial (2). 24
- Figura 4**-Desenho esquemático demonstrando a direção em que os cortes do cérebro do lagarto *Tropidurus hispidus* foram realizados e uma foto amostral de um corte destacando um hemisfério. 27
- Figura 5**- Foto de um corte amostral e desenho esquemático das regiões corticais seguidas pelos gráficos de área (em vermelho) e perímetro (em azul) por altura do corte (pontos) feito seguindo o padrão rostro cloacal, ao longo o encéfalo do *Tropidurus hispidus*. Coluna A- córtex medial, coluna B- córtex dorsomedial, coluna C- córtex dorsal e coluna D- córtex lateral. N=6. 30
- Figura 6**- Foto de um corte amostral e desenho esquemático das regiões não corticais seguidas pelos gráficos de área e perímetro por altura do corte (pontos) feito seguindo o padrão rostro cloacal, ao longo o encéfalo do *Tropidurus hispidus*. Linha A- Regiões não corticais anteriores, nos gráficos os pontos vermelhos representam a região ventricular dorsal anterior, em azul o estriado e em preto o septo. Linha B e C- Regiões não corticais posteriores, nos gráficos os pontos em roxo representam a região ventricular dorsal posterior, em verde, a área de transição estriado-amigdalóide e em amarelo o complexo amigdalóide. N=6. 32
- Figura 7**- Gráficos de área e perímetro das regiões corticais e não corticais demonstrando a altura em cortes ao longo do encéfalo em que essas regiões foram encontradas. A- Gráficos de área e perímetro das regiões corticais, em vermelho o córtex medial, em azul o dorsomedial, em roxo o dorsal e em amarelo o lateral. B- Gráficos de área e perímetro das regiões não corticais, em vermelho a região ventricular dorsal anterior, em azul o estriado, em preto o septo, em roxo a região ventricular dorsal posterior, em verde a região de transição estriado-amigdalóide e amarelo o complexo amigdalóide. 32
- Figura 8**- Gráfico comparativo das diferentes áreas e perímetros das regiões corticais e não corticais, valores expressos em média, comparações feitas por teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn's. O símbolo # e letras iguais representam regiões sem diferença, o símbolo * e letras diferentes indicam regiões em que a comparação demonstrou que havia diferença. A- Gráfico comparativo da área das regiões corticais, B- Perímetro das regiões corticais, C- área das regiões não corticais e D- perímetro das regiões não corticais. 34
- Figura 9**- A-Desenho esquemático demonstrando as estruturas corticais observadas, com o córtex medial em destaque. Seguido pelos gráficos de neurônios marcados com Nissl (colunas pretas) e DCX (colunas brancas) de cada forma de soma celular encontrados nas regiões do córtex medial. B- Gráfico da região anterior do córtex medial. C- Gráfico da

região medial do córtex medial. D- Gráfico da região posterior do córtex medial. N=6, * e # $p > 0,001$ Teste t, * indicam diferença entre Nissl e DCX e # indicam diferença entre os tipos de soma neuronal..... 36

Figura 10- Fotomicrografias das regiões comparadas sob coloração de Nissl, a direita corte amostral do giro denteado de mamíferos, figura retirada do atlas digital de neuropatologia e neuroimagem da UNICAMP, a esquerda foto de um corte amostral do acervo desse projeto do córtex medial..... 38

Figura 11- Comparação quanto a forma do soma neuronal e a região do córtex medial avaliada. A e D- Gráfico das células de soma ovalado, coradas com Nissl (A) e imunohistoquímica de DCX (D). B e E- Gráfico das células de soma piramidal alongado, coradas segundo o protocolo de Nissl (B) e por imunohistoquímica de DCX (E). C e F- Gráfico das células de soma piramidal, Nissl em C e DCX em F. N=6, $p < 0,0001$ * representando diferença significativa encontrada por Teste t. 40

Figura 12- A-Desenho esquemático mostrando as estruturas observadas com o córtex dorsomedial em destaque. Seguido pelos gráficos de neurônios marcados com Nissl (colunas pretas) e DCX (colunas brancas) de cada forma de soma celular encontrados nas regiões do córtex dorsomedial. B- Gráfico da região anterior do córtex dorsomedial. C- Gráfico da região medial do córtex dorsomedial. D- Gráfico da região posterior do córtex dorsomedial. N=6, * e # $p > 0,001$ Teste t, * indicam diferença entre Nissl e DCX e # indicam diferença entre os tipos de soma neuronal..... 42

Figura 13- Fotomicrografias das regiões comparadas sob coloração de Nissl, a direita corte amostral da área 3 do Corno de Ammon de mamíferos, figura retirada do atlas digital de neuropatologia e neuroimagem da UNICAMP, a esquerda foto de um corte amostral do acervo desse projeto do córtex dorsomedial. 45

Figura 14- Comparação quanto a forma do soma neural e a região do córtex dorsomedial avaliada. A e D- Gráfico das células de soma ovalado, coradas com Nissl (A) e imunohistoquímica de DCX (D). B e E- Gráfico das células de soma piramidal alongado, coradas segundo o protocolo de Nissl (B) e por imunohistoquímica de DCX (E). C e F- Gráfico das células de soma piramidal, Nissl em C e DCX em F. N=6, * indica diferença significativa, por Teste t com $p > 0,0001$ 46

Figura 15- A-Desenho esquemático mostrando as estruturas observadas com o córtex dorsal em destaque. Seguido pelos gráficos de neurônios marcados com Nissl (colunas pretas) e DCX (colunas brancas) de cada forma de soma celular encontrados nas regiões do córtex dorsal. B- Gráfico da região anterior do córtex dorsal. C- Gráfico da região medial do córtex dorsal. D- Gráfico da região posterior do córtex dorsal. N=6, * e # $p > 0,001$ Teste t, * indicam diferença entre Nissl e DCX e # indicam diferença entre os tipos de soma neuronal. 48

Figura 16- A esquerda foto e desenho ilustrando as áreas paliais encontradas no encéfalo de um rato, retirada do livro Comparative vertebrate neuroanatomy, de Anna Butler e William Hodos (página 502). A direita foto de um corte amostral e desenho esquemático, visando demonstrar as estruturas comparadas nas homologias..... 50

Figura 17- Fotomicrografias das regiões comparadas, a direita corte amostral do neocórtex de mamíferos destacando as 6 camadas celulares, figura retirada do livro Comparative vertebrate neuroanatomy, de Anna Butler e William Hodos (página 355), a esquerda foto do córtex dorsal de um corte amostral do acervo desse projeto..... 51

Figura 18- Comparação quanto a forma do soma neural e a região do córtex dorsal avaliada. A e D- Gráfico das células de soma ovalado, coradas com Nissl (A) e

imunohistoquímica de DCX (D). B e E- Gráfico das células de soma piramidal alongado, coradas segundo o protocolo de Nissl (B) e por imunohistoquímica de DCX (E). C e F- Gráfico das células de soma piramidal, Nissl em C e DCX em F. N=6, * representando diferença significativa encontrada por Teste t..... 52

Figura 19- Desenho esquemático mostrando as estruturas observadas com o córtex lateral em destaque. Seguido pelos gráficos de neurônios marcados com Nissl (colunas pretas) e DCX (colunas brancas) de cada forma de soma celular encontrados nas regiões do córtex lateral. B- Gráfico da região anterior do córtex lateral. C- Gráfico da região medial do córtex lateral. D- Gráfico da região posterior do córtex lateral. N=6, * e # $p > 0,0001$ Teste t, * indicam diferença entre Nissl e DCX e # indicam diferença entre os tipos de soma neuronal. 55

Figura 20- Comparação quanto a forma do soma neural e a região do córtex lateral avaliada. A e D- Gráfico das células de soma ovalado, coradas com Nissl (A) e imunohistoquímica de DCX (D). B e E- Gráfico das células de soma piramidal alongado, coradas segundo o protocolo de Nissl (B) e por imunohistoquímica de DCX (E). C e F- Gráfico das células de soma piramidal, Nissl em C e DCX em F. N=6, * representando diferença significativa encontrada por Teste t..... 57

Figura 21- Gráficos comparando por área cortical encontrada o tipo somático e a marcação utilizada. A e B- Gráfico das células de soma ovalado, coradas com Nissl (A) e imunohistoquímica de DCX (B). C e D- Gráfico das células de soma piramidal alongado, coradas segundo o protocolo de Nissl (C) e por imunohistoquímica de DCX (D). E e F- Gráfico das células de soma piramidal, Nissl em E e DCX em F. N=6, $p < 0,0001$, * representando diferença significativa encontrada por Teste t, e # representando que não houve diferença significativa apenas entre as regiões marcadas 59

LISTA DE ABREVIATURAS

CA	Complexo amigdalóide
CD	Córtex dorsal
CDM	Córtex dorsomedial
CL	Córtex lateral
CM	Córtex medial
DCX	Proteína duplacortina
EST	Estriado
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salina
PFA	Paraformaldeído
RVDA	Região ventricular dorsal anterior
RVDP	Região ventricular dorsal posterior
SPT	Septo
TEA	Área de transição estriado-amigdalóide

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Neurogênese.....	15
1.2. Desenvolvimento cerebral e evolução	18
1.3. <i>Tropidurus hispidus</i>	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. Metodologia	25
3.1. Aspectos éticos.....	25
3.2. Exemplares.....	26
3.3. Perfusão e preparo das amostras	26
3.4. Preparação dos encéfalos	27
3.5. Marcação Imunohistoquímica para DCX.....	27
3.6. Descarte de material biológico.....	28
3.7. Aquisição de imagens e análises	28
3.7.1. Análise anatômica das áreas corticais e não corticais.....	28
3.7.2. Análise comparativa da morfologia somática neuronal	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Análise anatômica das regiões corticais e não corticais	29
4.2. Análise da morfologia do soma neuronal encontrado no córtex medial	36
4.2.1. Análise do padrão de migração celular no córtex medial	39
4.3. Análise da morfologia do soma neuronal encontrado no córtex dorsomedial	42
4.3.1. Análise do padrão de migração celular no córtex dorsomedial.....	45
4.4. Análise da morfologia do soma neuronal encontrado no córtex dorsal	48
4.4.1. Análise do padrão de migração celular no córtex dorsal.....	52
4.5. Análise da morfologia somática neuronal, encontrado no córtex lateral.....	55
4.5.1. Análise do padrão de migração celular no córtex lateral.....	56
4.6. Análise comparativa de todas as regiões corticais.....	58
5. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neurogênese

A formação de novos neurônios, processo chamado de neurogênese, ocorre principalmente no período embrionário durante a formação do sistema nervoso central momento em que existe toda uma maquinaria de suporte para essas novas células, embora seja possível ocorrer também na fase pós-natal (PURVES, 2004).

No período embrionário, após a formação do tubo neural, ocorre uma grande proliferação celular. Cada célula progenitora neural passa por todas as etapas do ciclo celular e, em algumas horas, gera 2 células filhas que reiniciarão o ciclo celular, todavia, nos neuroblastos, pode acontecer de uma delas migrar e recomeçar ou não o ciclo em outro lugar e desse modo passam a ser formadas as camadas da parede do tubo neural (LENT, 2005).

A migração acontece através da glia radial, primeiro tipo celular com distinção morfológica que surge nesse epitélio neural primitivo, ela atua como suporte físico para a passagem desses neurônios, conectando a zona ventricular à superfície pial, após o término dessa migração muitas delas se diferenciam em astrócitos seu estágio final (KANDEL, 2000).

Após a migração se inicia o processo de diferenciação morfológica, bioquímica e funcional e as células começam a sintetizar enzimas que atuarão no metabolismo de neurotransmissores e neuromoduladores; sendo as proteínas que formarão os canais iônicos da membrana (formam o potencial de ação e o de repouso) (GAGE, 2002). Na diferenciação morfológica ocorre um aumento do corpo celular, formação de dendritos e crescimento do axônio em busca de alvos sinápticos. O crescimento do axônio é extremamente importante visto que posteriormente vai gerando as circuitarias neurais. Já funcionalmente o novo neurônio começa a amadurecer os sinais elétricos que futuramente serão usados para produzir, transmitir e receber a informação (CLARK, et al., 1968).

Estudos realizados em mamíferos comprovam uma contínua formação de neurônios no hipocampo (GAGE, 2002) e no bulbo olfatório após a fase embrionária, processo chamado de neurogênese pós-natal. Todavia em humanos, o processo é mais frequente no hipocampo, visto que, a grande maioria dos neurônios do giro denteado (subdivisão do hipocampo com rotação neural) está sujeita a troca, sendo até considerado raro no bulbo olfatório, visto estudo feito com datação de carbono que encontrou neurônios de mesma idade que o indivíduo nessa região (PURVES, 2004). É válido ainda, ressaltar que a existência de neuroblastos é igualmente notória na zona subventricular e na região do estriado (provavelmente derivadas da região vizinha) (ERNST et al., 2014); (TONCHEV et al., 2005). Em outros mamíferos esses neuroblastos migram para a região do bulbo olfatório (ERNEST, *et al.*, 2014).

Essas diferenças nas regiões de neurogênese tardia, entre os mamíferos é extremamente importante pois garantem vantagens seletivas por diferenças cognitivas, como por exemplo, a falta de habilidades olfativas nos humanos, que pode ser relacionada a falta de neurogênese adulta no bulbo olfatório (ERNST et al., 2014); (TONCHEV et al., 2005).

Vários estudos sugerem que a neurogênese pós-natal é muito mais frequente em vertebrados não mamíferos. Em peixes, estudos realizados com zebrafish demonstram alta neurogênese relacionada a regeneração neural após lesões (KRAUSS *et al.*, 1991; KIZIL *et al.*, 2012). Em aves, estudos relacionam a neurogênese adulta a fatores hormonais e ambientais com base no sistema de canções dos canários; utilizando a técnica de marcação com marcadores imunológicos como “doublecortin” (DCX) para marcar novos neurônios (BALTHAZART *et al.*, 2010).

Nos répteis, é um processo bem descrito, ocorrendo geralmente e mais intensamente em regiões do telencéfalo (bulbo olfatório, prosencéfalo, regiões corticais, região ventricular dorsal anterior, septo, estriado, núcleo esférico e cerebelo), apresentando alta capacidade regenerativa a lesões no sistema nervoso central (FONT *et al.*, 2001).

Em lagartos, a neurogênese pós-natal é constante, embora ocorra de modo diferente entre eles. Na espécie *Gallotia galloti*, a formação de novos

neurônios também ocorre no telencéfalo, porém sofre influência sazonal, sendo significativamente menor no inverno e em alta na primavera (DELGADO-GONZALES, *et al.*, 2011). Na espécie *Tarentola mauritanica* além das regiões do telencéfalo abordadas anteriormente (bulbo olfatório, córtex, zona subventricular) o processo também ocorre no núcleo esférico e no estriado (PÉREZ-CAÑELLAS & GARCÍA-VERDUGO, 1996). Outra espécie de lagarto abordada em estudos nessa área é a *Pardalis hispanica*, em que a neurogênese acontece como resposta a lesões encefálicas, em um processo chamado neurogênese reativa (MOLOWNY, *et al.*, 1995).

O lagarto *Tropidurus hispidus*, espécie estudada neste trabalho, apresenta elevado grau de neurogênese. Em estudos prévios analisando a distribuição das células progenitoras neurais no cérebro do lagarto, utilizando “bromodeoxiuridine” (BrdU) (marcador de células jovens), foi observado que células com núcleos marcados pelo BrdU se distribuíram ao longo do epêndima em um padrão praticamente constante. A maior parte dessas células foram vistas subjacentes ao córtex medial (sulco medial e suas redondezas), parte revestindo o cume dorsoventricular, parte latente às áreas corticais dorsomedial, dorsal e laterais, e uma pequena parte encobrindo o septo e se alastrando pelo sulco ventral e terminal (MARCHIORO, *et al.*, 2005).

Além desse, um estudo feito com óxido nítrico (NO), fator de regulação importante na neurogênese de mamíferos e na função hipocampal, revelou a presença de neurônios NO positivos na glia radial na região ventral do CM e na camada plexiforme interna do CDM do telencéfalo do *Tropidurus hispidus* (Lima *et al.*, 2017), resultados que se relacionam também com as homologias comparadas entre essas áreas e as áreas corticais de mamíferos.

Apesar da neurogênese pós-natal já ter sido demonstrada; ainda existe muito a ser estudado, visto que, ainda é desconhecida a forma com a qual esses neurônios tardiamente gerados se encaixam e integram uma rede de circuitos formada ainda no período embrionário e como eles atuam nos processos cognitivos. O estudo e o entendimento do processo, é extremamente útil na medicina, visto que muitas doenças que afetam o sistema nervoso, tais como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, entres outras, atuam degenerando o sistema nervoso central; desse modo a neurogênese adulta usada para fins

terapêuticos poderia garantir melhores condições de vida ao indivíduo, fazendo necessária a continuidade de pesquisas nessa área, sendo mais viável estudar o processo em outros vertebrados, por apresentarem uma estrutura cerebral menos derivada e semelhante à dos mamíferos.

1.2. Desenvolvimento cerebral e evolução

Na escala filogenética mamíferos e sauropsidas (aves e répteis) formam um grupo parafilético, descendentes de um mesmo ancestral. Todavia o sistema nervoso central e periférico de mamíferos é muito mais desenvolvido, tendo em vista que são o táxon melhor adaptado (STRIEDTER, 2016) e com maior número de comportamentos complexos (SANTOS, 2016), fator que se deve ao surgimento de novos tipos celulares e estruturas além de expansões das regiões telencefálicas (FARIS, 2013).

Inúmeros estudos tentam esclarecer a evolução do neocórtex dos mamíferos, contudo não existe a possibilidade de estudar o encéfalo do ancestral, haja vista a grande dificuldade de se encontrar bons representantes fósseis além de que estruturas viscerais não são conservadas. Desse modo, a única opção viável é estudar representantes do grupo sauropsidas, na tentativa de caracterizar o encéfalo ancestral e a partir disso estudar e entender os comportamentos mais complexos.

A homologia mais discutida entre o encéfalo de répteis e mamíferos tem como base a evolução do neocórtex, sendo ele derivado do córtex dorsal dos répteis e da região ventricular dorsal ou somente do córtex dorsal (SANTOS, 2016).

O neocórtex de mamíferos é, a nível celular, caracterizado por 6 camadas bem definidas e distintas. A primeira molecular, formada por axônios, a segunda chamada granular externa, a terceira piramidal externa, quarta granular interna (junto com a segunda formam o córtex granular e recebem projeções do tálamo dorsal), a quinta piramidal interna, que origina as projeções do corpo estriado e, junto com a terceira camada, forma o córtex agranular; e a

sexta com neurônios multiformes (recebe projeções recíprocas no tálamo dorsal). Os neurônios da 2^o e 3^o camadas originam as projeções que alcançarão as camadas corticais mais profundas, seguindo de modo contralateral para corpo caloso e ipsilateral às zonas corticais (BUTLER *et al.*, 2005).

Nos sauropsidas a região ventricular dorsal é a via lemniscal telencéflica mais expansiva, servindo como ponto de integração entre a rota espino-talâmica e o tálamo visual (via que segue da retina, para a região ventricular dorsal anterior continuando até a porção posterior da região) (ABOITIZ, 2002).

A primeira hipótese tem embasamento no estudo de duas vias talâmicas. A via Lemnotalâmica, que recebe projeções do sistema lemniscal (relacionado a estímulos de trato fino) e não faz sinapses na região mesencéflica, tendo como exemplo: as vias somatossensoriais que passam pela rota espino-talâmica e a rota talâmica visual que segue direto da retina, até o núcleo geniculado lateral, e a via Colotalâmica, cujo núcleo recebe sensores capazes de fazerem sinapse no mesencéfalo, no teto ótico e no torus semicircular, a exemplo da via collicular visual tófigal que vai da retina até o teto ótico, se projetando para o núcleo talâmico. Nos sauropsidas, a via lemnotalâmica faz projeções para o córtex dorsal e em mamíferos para regiões do neocórtex, já a coltotalâmica projeta para a região ventricular dorsal anterior em sauropsidas, e para regiões ventrolaterais em mamíferos (ABOITIZ, 2002).

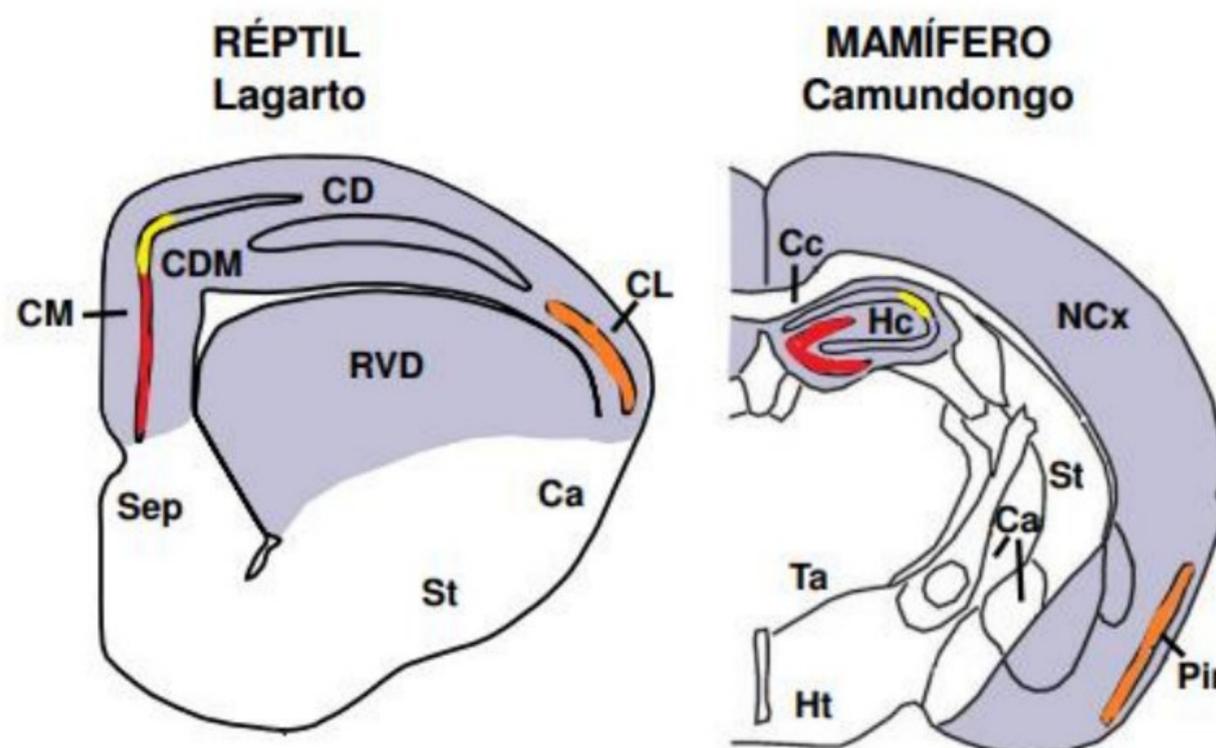
Tal hipótese implicaria que o córtex dorsal reptiliano teria a mesma origem das áreas do córtex visual primário, somatossensorial e motor de mamíferos, visto que recebem também, projeções lemnotalâmicas; e caracterizaria o ancestral comum como tendo uma região ventricular dorsal semelhante à dos répteis, que em mamíferos teria evoluído e se tornado a região lateral do neocórtex.

A segunda hipótese traz o neocórtex como derivado e homólogo apenas do córtex dorsal reptiliano (NORTHCUTT & KRASS, 1995), tendo em vista as grandes diferenças entre as regiões ventriculares de mamíferos e répteis, como o córtex visual primário dos mamíferos, por exemplo, que faz muitas projeções para o córtex visual extraestriado.

Nos répteis, as projeções do córtex dorsal que seguem para a região ventricular dorsal anterior são bastante raras, além de que o neocórtex é capaz de projetar reciprocamente para o córtex entorrinal e, em sequência, para o hipocampo enquanto que os representantes do grupo de répteis dificilmente fazem conexões entre a região ventricular dorsal anterior e o hipocampo (ABOITIZ, 2002).

Além do neocórtex as outras regiões corticais também são estudadas e ditas homólogas a regiões do encéfalo de mamíferos. O córtex medial é comparado ao Giro denteado do hipocampo de mamíferos, o córtex dorsomedial a área 3 do Corno de Ammon e o lateral possui semelhanças com o núcleo córtex piriforme de mamíferos (SANTOS, 2010).

Figura 1-Imagem adaptada de SANTOS, 2010 (página 13) representando as homologias comparadas entre as regiões corticais do encéfalo de répteis e de mamíferos. Em vermelho o Giro Denteado, região do hipocampo comparada ao CM de répteis, em amarelo área 3 do Corno de Ammon, comparado ao CDM de répteis e em laranja o núcleo piriforme comparado ao CL de répteis.



Em mamíferos humanos, o giro denteado é única área onde ocorre a neurogênese adulta, tendo em vista que é a região do hipocampo que está sujeita a troca (PURVES, 2004) povoada por duas camadas celulares, a mais externa, chamada molecular, povoada por células granulares (ovaladas), e uma camada mais interna, a polimórfica, marcada por grande quantidade de células

com soma piramidal (RAO e SHETTY, 2004); comparado e dito homólogo ao córtex medial de répteis (SANTOS, 2010).

Estudos anteriores no encéfalo do *Tropidurus hispidus*, comprovam por meio de análises de células marcadas com DCX, alta quantidade de neurônios jovens na camada celular do córtex medial, zona então considerada proliferativa, região de alta neurogênese pós-natal (PIMENTEL, 2014), resultado semelhante ao encontrado quando analisadas as células marcadas por BrdU, sendo elas encontradas em sua maioria, ao longo do epêndima e subjacentes ao córtex medial (MARCHIORO *et al.*, 2005) e por meio do estudo de neurônios óxido nítrico reativos encontrados na glia radial ventral ao CM, sendo o NO, um fator de regulação da neurogênese em mamíferos, além de atuar na função hipocampal (LIMA *et al.*, 2017), o córtex medial do *T. hispidus*, se mostrou funcionalmente semelhante ao Giro denteado de mamíferos.

Passando para o córtex dorsomedial, este é comparado a área 3 do corno de Ammon, parte do hipocampo de mamíferos (SANTOS, 2010), tal região é povoada por neurônios de soma piramidal, (MENDES, *et al.*, 2016). O hipocampo de mamíferos tem relação com formação de memórias e a memória espacial (KANDEL, 2014).

Estudos anteriores no encéfalo do *Tropidurus hispidus*, a partir do gene Zif 268 de expressão imediata que foi encontrado no córtex medial e no dorsomedial quando os lagartos eram expostos a um ambiente enriquecido, indicando funções primitivas das regiões homólogas ao hipocampo relacionadas a exploração e formação de memória espacial (SANTOS, 2010), havendo também um condicionamento aversivo relacionado a expressão do Zif 268 no CM, relacionado à formação de memórias aversivas (SANTOS, 2016). De modo que possamos considerar a semelhança funcional encontrada entre essas áreas.

O córtex lateral, por sua vez, é comparado ao córtex piriforme de mamíferos (SANTOS, 2010), que se inicia no bulbo olfatório, se estende até a amígdala e inclui as regiões estriadas (BUTLER *et al.*, 2005). O estudo de Carvalho Pimentel, 2014, feito por meio da análise das células DCX positivas e da presença da glia radial, comprovou a migração celular radial, seguindo pelo

córtex lateral, direcionada para as superfícies laterais do núcleo esférico e complexo amigdalóide; afirmando semelhanças funcionais entre as regiões.

1.3. *Tropidurus hispidus*

O lagarto *Tropidurus hispidus*, (Fig.2) é representante da ordem Squamata, subordem Sauria e família Tropiduridae; é o maior lagarto desse gênero, os machos medem aproximadamente 140 mm, na fase adulta (comprimento rostro-cloacal) e as fêmeas cerca de 90 mm (VITT, 2008). Possui habitat generalista, no solo, superfície de rochas ou borda da mata (SANTANA *et al.*, 2014). É uma espécie amplamente distribuída na América do Sul, encontrada nos países: Brasil, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela e Colômbia (SANTOS, 2016).

Figura 2- *Tropidurus hispidus*, Squamata, Tropiduridae. Figura retirada de SANTOS, 2016 (página 25).



No Brasil é encontrada em 14 estados, incluindo todos os 9 da região Nordeste, mantendo uma preferência por regiões costeiras, áreas de microclima quente, por se tratar de um animal ectodérmico (PIMENTEL *et al.* 2010), isto é, que usa a energia solar para manter a temperatura corporal (VITT *et al.* 2008), o que os faz permanecer ativos apenas em uma pequena parte do dia (8 horas às 11 horas é seu pico de atividade) (SANTANA *et al.* 2011).

O principal ecossistema habitado é a Caatinga (VIEIRA *et al.*, 2012), mas por ser um animal que se adaptou a centros urbanos e às mudanças no ambiente causadas pelo ser humano, é possível encontrá-lo em construções e prédios (DÍAZ-URIARTE, 1999), o que torna viável sua captura e manuseio. Sua dieta é a base de artrópodes (coleópteros, lepidópteros e formigas) sendo possível a ingestão de plantas (somente a flor) (SLUYS *et al.* 2004).

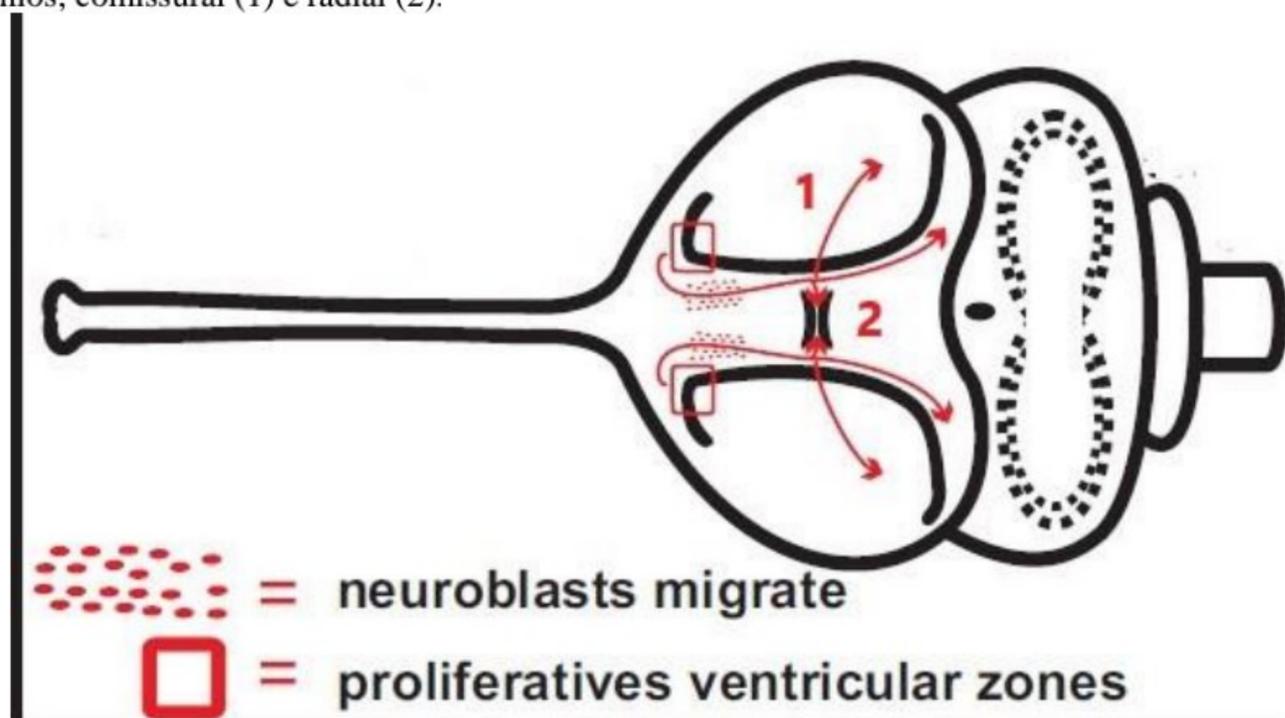
Sua estratégia de forrageamento é do tipo “senta e espera”, depende de estímulos visuais para detecção de presas, capturando somente aquelas que se locomovem em suas proximidades. Tal comportamento demonstra baixa capacidade de quimeorrecepção e destaca a visão como melhor órgão do sentido nessa espécie. Esse tipo de forrageamento pode ser correlacionado a ecologia do animal, além de à fatores morfológicos, fisiológicos e comportamentais do espécime. Seus principais predadores são o *Salvator merianae* (Teiú gigante) e a aranha *Lasiadora klugi* da família de tarântulas (VIEIRA *et al.* 2012).

O cérebro do *Tropidurus hispidus* apresenta bulbos olfatórios, pouco desenvolvidos, que se conectam aos hemisférios cerebrais do telencéfalo por dois pedúnculos olfatórios extremante finos. Em cada hemisfério telencefálico existe um ventrículo e um córtex cerebral e regiões não corticais. O córtex cerebral se divide em 4 áreas extremamente diferentes, sendo elas: Córtex Medial - CM, Córtex Dorsomedial – CDM (exclusiva dos lagartos da ordem Squamata) (DE LA IGLESIA *et al.*, 1997), Córtex Dorsal - CD e Córtex Lateral - CL e em três camadas, duas plexiformes (externa e interna) e uma camada celular (PIMENTEL *et al.* 2011).

As camadas plexiformes diferem quanto a posição, a interna é ligada ao ventrículo lateral e a plexiforme externa anexa à pia-máter, já a camada celular (posicionada entre as duas plexiformes) difere destas por apresentar maior número de células. As estruturas telencefálicas, além das regiões corticais, são: septo, uma região ventricular dorsal anterior e posterior, uma região estriatal, uma região de transição estriado-amigdalóide, um complexo amigdalóide e um núcleo esférico nas estruturas subventriculares dos hemisférios telencefálicos. (SANTOS, 2016).

Quanto a morfologia neuronal, já foram identificados tipos diferentes de neurônios nas 3 camadas corticais, granular, esférica e piramidal. Nas áreas corticais do *T. hispidus* foram encontrados diferentes tipos de neurônios, quanto a formato de soma, número de dendritos, local da projeção no soma e destino dela (PIMENTEL *et al.* 2011). Um estudo feito por Carvalho Pimentel em 2014, demonstrou a existência de neurônios granulares (unipolares, bipolares e multipolares), piramidais (normais, inversos, abertos, bipiramidais e horizontais) e horizontais (esféricos e fusiformes) no córtex desse animal, além de sulcos e rotas por onde essas células migram (radial-passando pelos sulcos lateral, região de intersulcos e medial, tangencial rostral- sulco terminal e ventral, tangencial caudal- sulco medial, além de comissural-sulco medial) fator que determina o número e tipo celular encontrado de células jovens nas diferentes regiões cerebrais (Fig. 3).

Figura 3-Imagem adaptada de PIMENTEL, 2014 (página 26), representando o encéfalo do *Tropidurus hispidus*, destacando a zona proliferativa na região do sulco medial e as duas principais rotas de migração dos neurônios, comissural (1) e radial (2).



Porém, até o momento ainda não se sabe a proporção de novos neurônios em relação aos formados durante o período embrionário e como esta neurogênese se apresenta em relação a forma dos neurônios, o que em parte determina sua função. É importante acrescentar que estes animais possuem uma baixíssima quantidade de oligodendrócitos, mielina (MARCHIORO *et al.* 2005) e glia radial (MARCHIORO *et al.*, 2012).

Sendo assim, neste trabalho quantificamos as proporções de novos neurônios no cérebro de *T. hispidus* tanto em relação a forma do soma como

discriminando as diferentes áreas corticais e a origem dessas células, embrionárias ou derivadas de neurogênese pós-natal. Nossos resultados ajudarão a propor comparações das homologias discutidas entre o neocórtex de mamíferos e áreas corticais de répteis, além de fornecer dados sobre a abundante neurogênese adulta deste animal, informação de suma importância na neurociência de base, visto que pouco se sabe sobre o processo de neurogênese adulta e sua importância.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Quantificar e classificar parâmetros relacionados a neurogênese do lagarto *Tropidurus hispidus*.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever a macro-estrutura anatômica do telencéfalo dos lagartos da espécie *Tropidurus hispidus*.
- Descrever a morfologia do soma neuronal das regiões corticais dos lagartos da espécie *Tropidurus hispidus*.
- Quantificar a proporção entre neurônios oriundos do período embrionário e de neurogênese adulta no cérebro de *Tropidurus hispidus*.
- Analisar de modo comparativo através da morfologia do soma neuronal as regiões corticais do *Tropidurus hispidus* e as áreas corticais homólogas de mamíferos.

3. Metodologia

3.1. Aspectos éticos

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa com animais (CEPA), da Universidade Federal de Sergipe (UFS) sob protocolo 69/2017.

Todos os animais foram mantidos seguindo o que determinam as Leis, Decretos, Portarias e Resoluções Normativas do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, licença SISBio 58575, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), bem como a Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca).

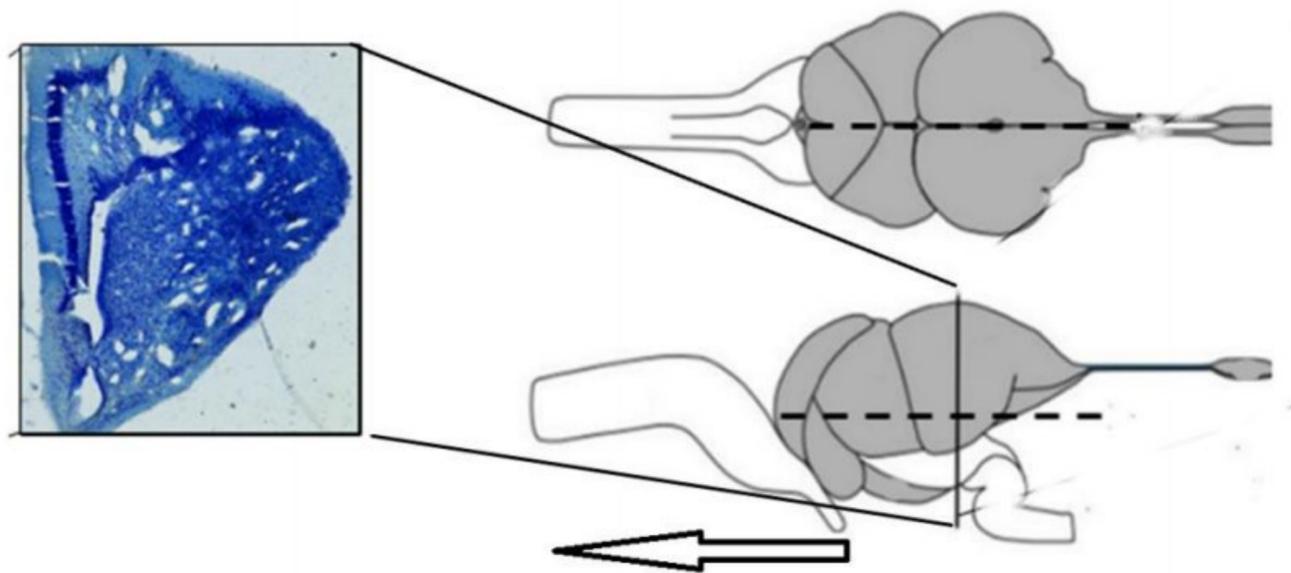
3.2. Exemplos

Foram utilizados 6 lagartos da espécie *Tropidurus hispidus* com comprimentos (rostro-cloacal) variando entre 35-120 mm. Estes, foram capturados nas proximidades da Universidade Federal de Sergipe, campus São Cristóvão, e posteriormente mantidos em um terrário, medindo 0,8 x 0,6 x 0,5 m. O pavimento do terrário, foi recoberto por uma camada de 5 cm de areia lavada e peneirada, onde os animais puderam se enterrar durante a noite além de serem submetidos a ciclos claro/escuro a cada 12 horas, de modo semelhante ao habitat natural, onde ficaram em média por 4 dias. Os lagartos foram alimentados com uma larva de besouro *Tenebrio molitor* por dia, não havendo restrição hídrica.

3.3. Perfusão e preparo das amostras

Os animais foram anestesiados com Xilazina 10% (10mg/kg) e Ketamina 10% (100mg/kg), eutanasiados por meio de perfusão transcardíaca com solução tampão fosfato salina (PBS; pH 7,2-7,4; 0,1M) por 10 minutos para a lavagem dos vasos e, posteriormente, com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (PB; pH 7,4; 0,1M) por 20 minutos para fixação dos tecidos. Os cérebros foram removidos e mergulhados em uma solução de PFA 4% + sacarose 30%, onde permaneceram por 24h. Para armazenamento, os cérebros foram preservados do congelamento em sacarose a 30% na temperatura de 4°C. Em seguida foram levados a criostato a -20 °C para obtenção de seções de 50 µm, que foram distribuídas em ordem rostro-caudal em lâminas de vidro (Fig.4). Protocolo adaptado pela equipe do laboratório.

Figura 4-Desenho esquemático demonstrando a direção em que os cortes do cérebro do lagarto *Tropidurus hispidus* foram realizados e uma foto amostral de um corte destacando um hemisfério.



3.4. Preparação dos encéfalos

Após a montagem dos cortes em lâminas cobertas com gelatina, estes permaneceram secando por aproximadamente 24 horas. Em seguida, foi iniciado o protocolo de coloração de Nissl, um marcador de soma celular, escolhido para caracterizar morfologia somática neuronal das regiões corticais do *T. hispidus* e tornar possível a comparação com a morfologia somática neuronal das regiões corticais ditas homólogas de mamíferos. O protocolo se inicia com a imersão das lâminas em água destilada com posterior imersão em azul de Toluidina, novamente em água destilada, em álcool 70 %, álcool 95% e ácido acético, álcool 95%, álcool 100% e clorofórmio, álcool 100% I, seguido de álcool 100% II, álcool 100% e Xilol I, Xilol I e, por fim, Xilol II, onde ficaram até a finalização e montagem, realizada com Entelan.

3.5. Marcação Imunohistoquímica para DCX

Para a identificação de neurônios jovens, formados na neurogênese pós-natal e por isso ainda não estabelecidos, encontrados ainda em processo de migração, foi utilizado o anticorpo primário para doublecortin (DCX), proteína associada a microtúbulos normalmente expressa no citoplasma e prolongamentos dendríticos de neurônios em diferenciação durante o desenvolvimento. Para imunohistoquímica de DCX, os cortes foram incubados

com metanol (10%) e H₂O₂ (3%) por 10 min, sendo a seguir incubados em albumina de soro bovino a 1%(BSA; Sigma-Aldrich) e Triton X-100 a 0,3% em PBS, por 1 hora sob condições normais de temperatura. Em sequência, os cortes foram incubados durante a noite em PBS com 1% de BSA e 0,3% de Triton X-100 e anticorpo anti-DCX de coelho (1: 1.000; Abcam Plc, Cambridge, MA, EUA). Posteriormente os cortes foram lavados por 15 min, incubados em IgG de cabra anticoelho biotinilada (1: 1.000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 2 horas, em sucessão por complexo de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories) por mais 1 hora. Por fim, as lâminas foram expostas a 0,15 mg/ml de 3-3'-diaminobenzidina em PBS com 0,01% de H₂O₂, e posteriormente desidratados em concentrações crescentes de etanol, clarificados com xileno e montados em DPX (Sigma-Aldrich) (RAO & SHETTY, 2004).

3.6. Descarte de material biológico

Concluída a perfusão, as carcaças dos animais foram depositadas em sacos plásticos apropriados e armazenadas no freezer de coleta de material biológico situado no biotério do Departamento de Fisiologia da UFS para posterior recolhimento durante a coleta de lixo biológico. Os resíduos perfurocortantes foram armazenados em caixas adequadas e levados até o Hospital Universitário para o descarte hospitalar.

3.7. Aquisição de imagens e análises

3.7.1. Análise anatômica das áreas corticais e não corticais

Utilizado microscópio (Olympus), na lente objetiva de 4x, para adquirir as fotomicrografias. Para a análise, os dados de área e perímetro do Image J foram convertidos de nanômetros para milímetros. Para ratificar a análise quanto a área e perímetro, calculamos a média e o desvio padrão entre os valores encontrados de área das regiões em cada animal por corte, tornando possível visualizar a diferença de espaço que essas áreas ocupam no telencéfalo do animal, além permitir comparar a diferença de posição na porção mais rostral do encéfalo ou nos cortes finais. Tendo em vista que algumas regiões não começam na porção

mais rostral do telencéfalo, a exemplo das regiões não corticais e do córtex dorsal e lateral parte da amostra possui área zero (cortes mais iniciais), sendo então não paramétrica. Os dados foram comparados por Kruskal Wallis seguido de pós-teste de Dunn's.

3.7.2. Análise comparativa da morfologia somática neuronal

Para caracterizar as regiões corticais escolhidas tendo como base o estudo da neurogênese pós-natal e as homologias, comparamos quanto a estrutura somática celular, analisamos a morfologia do soma das células encontradas nessas regiões corticais, visando aumentar o conhecimento acerca da neurogênese pós-natal, tendo como base a comparação e quantificação de acordo com o formato de soma celular, e a procedência dessas células, derivadas de neurogênese adulta (células jovens marcadas por imunohistoquímica de DCX), e os neurônios formados ainda no período embrionário (marcados segundo o protocolo de Nissl, marcador de soma celular). As fotomicrografias foram feitas utilizando microscópio (Olympus), na lente objetiva de 40x. Para a contagem e diferenciação da morfologia do soma neuronal e origem dessas células (embrionária ou neurogênese pós-natal) foi utilizado o software Image J. O número de células encontrados em cada região se mostrou próximo da média, permitindo que fosse utilizado o teste T de Student no software GraphPad Prism 5 para verificar se havia diferença entre as áreas e regiões comparadas. Para certificar os nossos resultados obtidos nas análises de número e tipo somático ao longo das regiões telencefálicas das áreas corticais, acerca da migração celular. Comparamos as áreas corticais entre si, quanto a região, tipo somático e marcação utilizada na obtenção dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

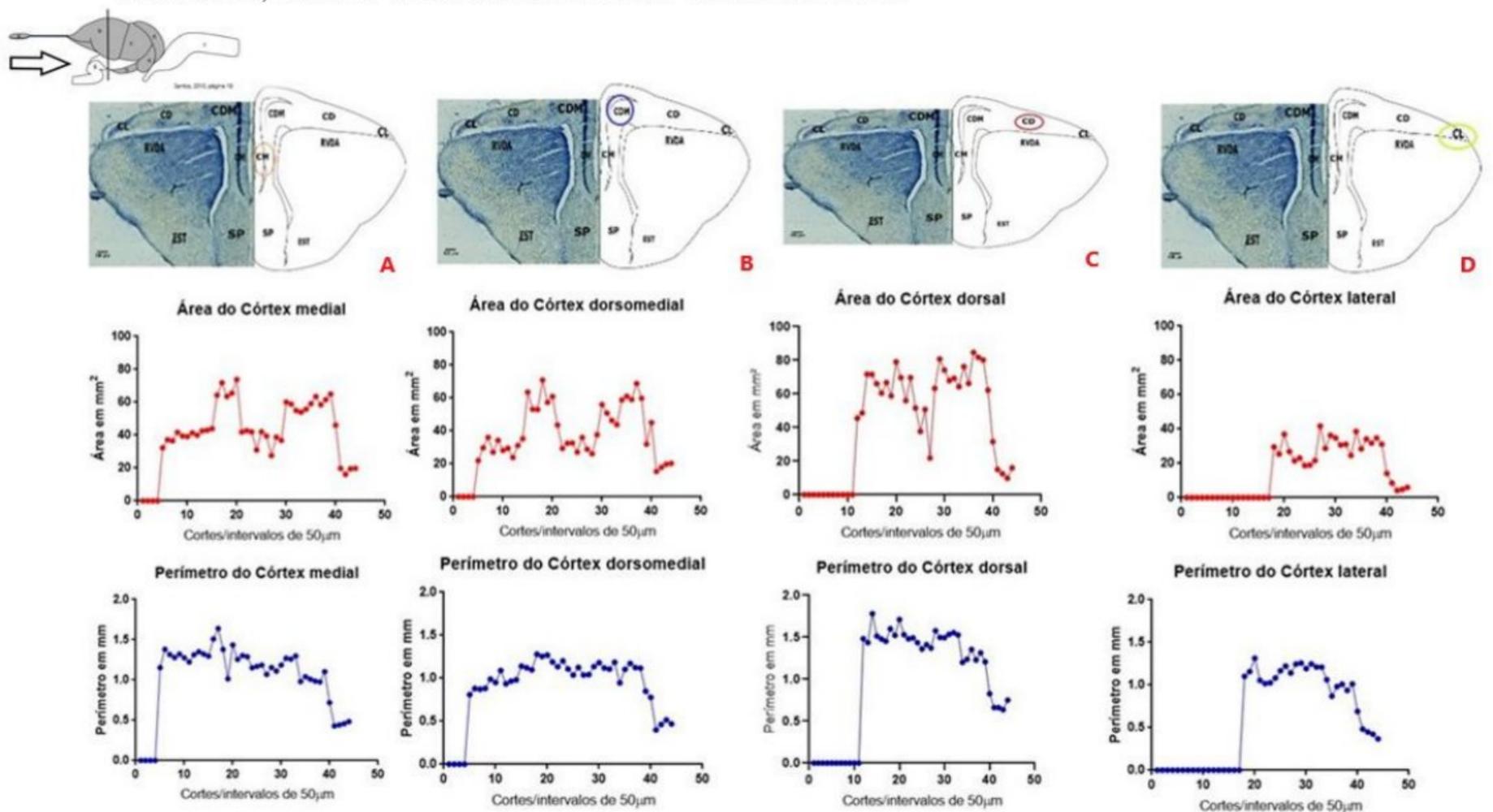
4.1. Análise anatômica das regiões corticais e não corticais

O córtex cerebral é dividido em 4 áreas extremamente diferentes, são elas: Córtex Medial - CM, Córtex Dorsomedial – CDM (única dos lagartos da ordem Squamatas) (DE LA IGLESIA *et al*, 1997), Córtex Dorsal - CD e Córtex Lateral – CL, além disso, podemos encontrar regiões não corticais, o septo, a região ventricular dorsal (tanto posterior quanto anteriormente), uma região estriatal, a área de transição estriado-amigdalóide e um complexo amigdalóide. (SANTOS L. 2016).

A área e perímetro destas estruturas foram quantificadas desde seu aparecimento na área frontal do encéfalo, seguindo em direção a região dorsal. As áreas corticais começaram a ser percebidas a partir de 250 μm (equivalente a 5 cortes) da porção mais rostral do telencéfalo do *T. hispidus*, diferente das regiões não corticais que em sua maioria só foram encontradas após a divisão comissural. O primeiro córtex a ser claramente visualizado foi o medial (Fig. 5 A) seguido pelo dorsomedial (Fig.5 B). Nessa fase, o córtex dorsal ainda não aparece nitidamente, apenas aos 600 μm (Fig.5 C) torna-se mais delineado e evidente, assim como a região ventricular dorsal anterior.

Figura 5- Foto de um corte amostral e desenho esquemático das regiões corticais seguidas pelos gráficos de área (em vermelho) e perímetro (em azul) por altura do corte (pontos) feito seguindo o padrão rostro

cloacal, ao longo o encéfalo do *Tropidurus hispidus*. Coluna A- córtex medial, coluna B- córtex dorsomedial, coluna C- córtex dorsal e coluna D- córtex lateral. N=6.



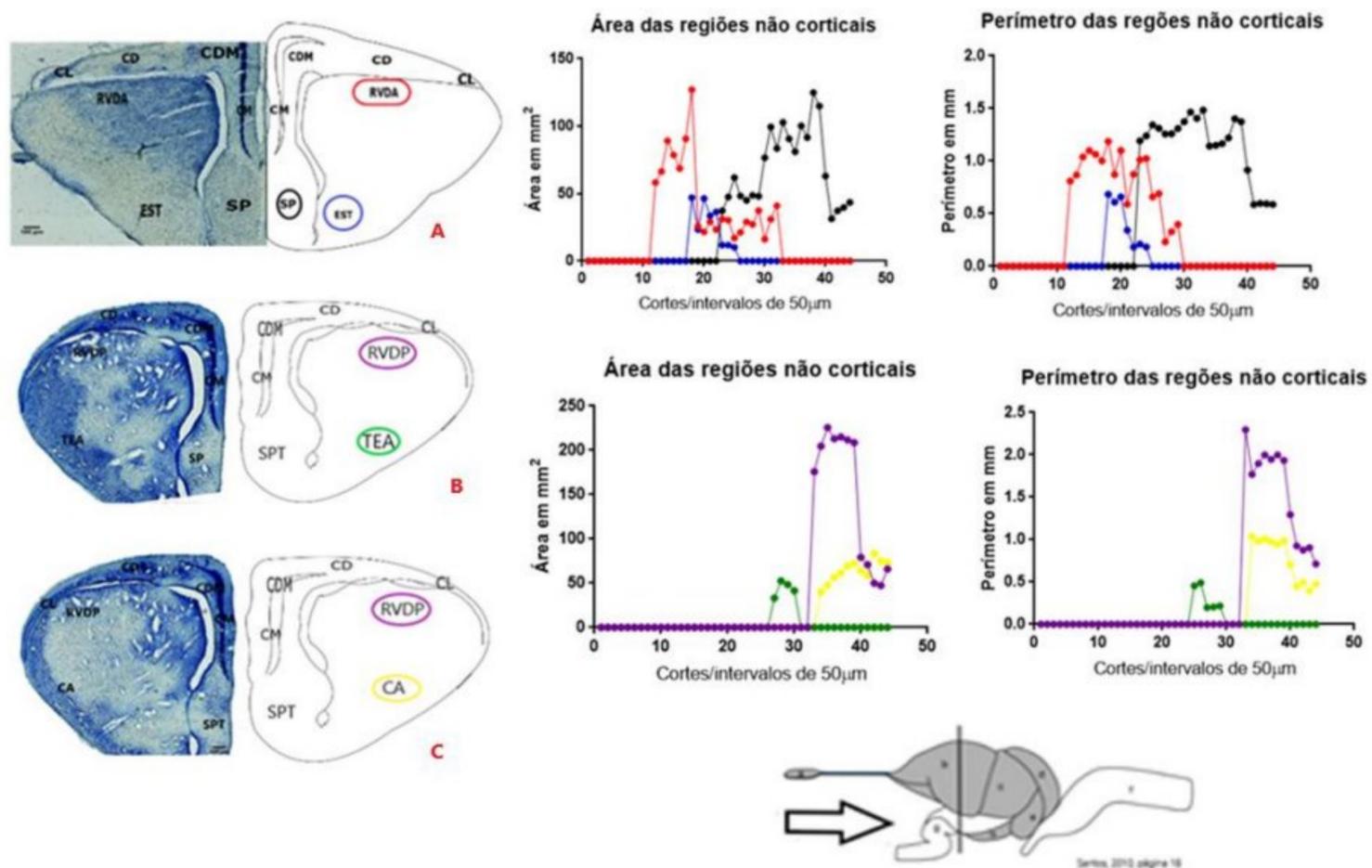
Após 900 μm , o ventrículo adjacente ao córtex dorsal encontra-se com a porção lateral do telencéfalo e o ventrículo adjacente ao córtex medial encontra-se com a porção mais ventral da região. Essa nova conformação separa momentaneamente o córtex das áreas telencefálicas.

A região ventricular dorsal anterior continua bem delimitada e nesse plano surge o estriado (Fig.5 C e Fig.6 A). Seguindo a partir de 950 μm , o ventrículo adjacente ao córtex dorsal começa a descer em direção a porção mais ventral. Essa descida do ventrículo permite que o córtex lateral (Fig.5 D) comece a aparecer. A região ventricular dorsal anterior e o estriado continuam bem delimitados.

Após 1150 μm , o córtex medial se retrai (a redução de área e perímetro pode ser vista nos gráficos das figuras 5 e 8) dando espaço para o surgimento do septo. Depois de 6 cortes, o córtex lateral está mais aparente, a região ventricular dorsal anterior encontra-se no final, e surge a área de transição estriado-amigdalóide (Fig.6 B). Após 1700 μm , o córtex lateral já é visto por

inteiro, surge a região ventricular dorsal posterior e o complexo amigdalóide. Essa conformação é vista dessa forma até os 2100 μm .

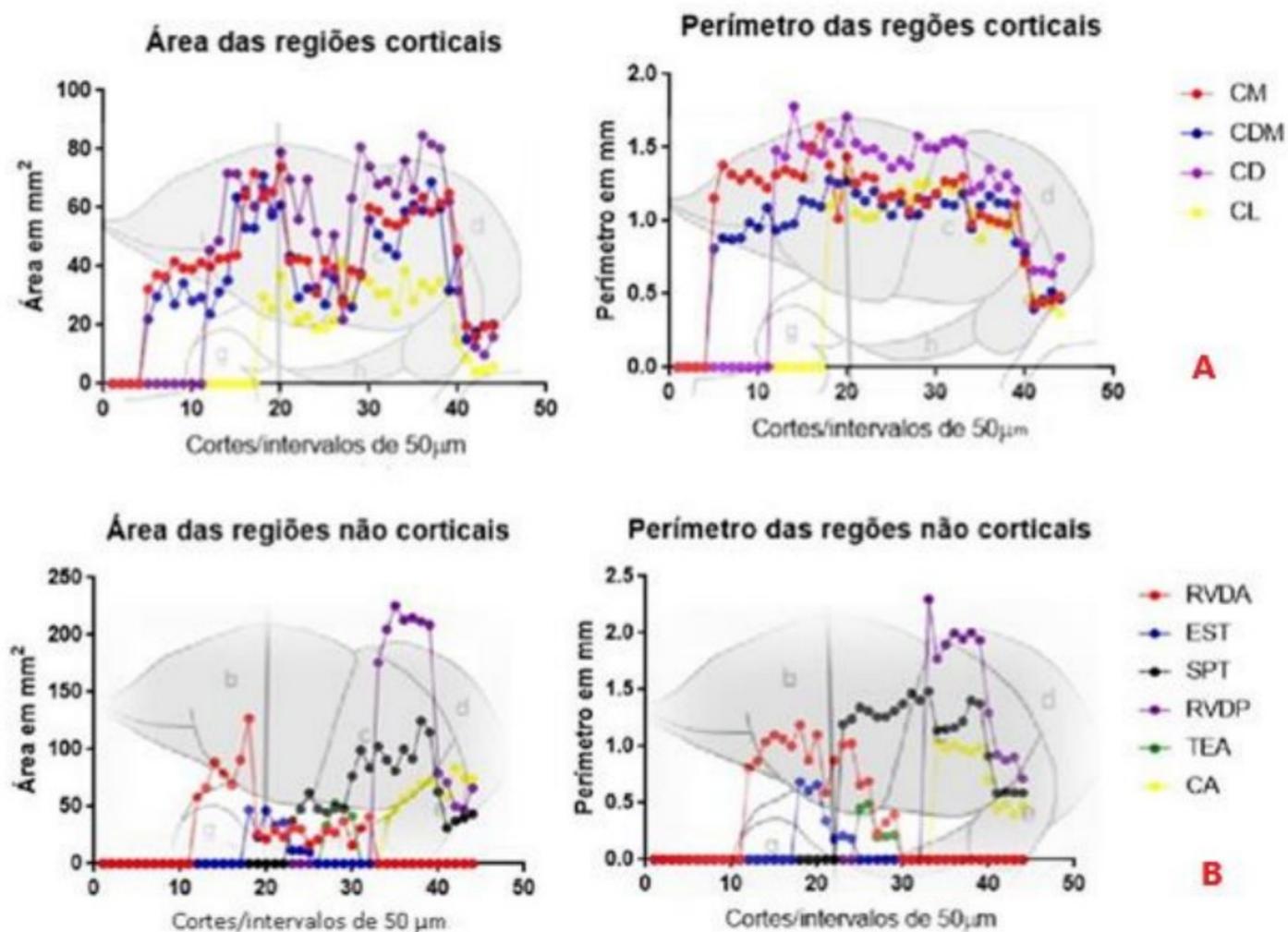
Figura 6- Foto de um corte amostral e desenho esquemático das regiões não corticais seguidas pelos gráficos de área e perímetro por altura do corte (pontos) feito seguindo o padrão rostro cloacal, ao longo o encéfalo do *Tropidurus hispidus*. Linha A- Regiões não corticais anteriores, nos gráficos os pontos vermelhos representam a região ventricular dorsal anterior, em azul o estriado e em preto o septo. Linha B e C- Regiões não corticais posteriores, nos gráficos os pontos em roxo representam a região ventricular dorsal posterior, em verde, a área de transição estriado-amigdalóide e em amarelo o complexo amigdalóide. N=6.



Nos gráficos de linhas, feitos a partir da média encontrada para cada corte das áreas corticais (Fig.7 A), podemos ver que o córtex medial e o dorsomedial começam a surgir juntos a partir do quinto corte. Também é possível visualizar que o córtex dorsal, se inicia a partir do décimo segundo corte, e o lateral próximo ao vigésimo corte muito próximo à divisão da comissura. A partir dessa análise ficam claras as oscilações de área e perímetro, que acontecem entre as regiões anterior (até o vigésimo corte), medial (do vigésimo ao trigésimo) e posterior (iniciada a partir do trigésimo corte) ao longo das regiões corticais.

Figura 7- Gráficos de área e perímetro das regiões corticais e não corticais demonstrando a altura em cortes ao longo do encéfalo em que essas regiões foram encontradas. A- Gráficos de área e perímetro das regiões corticais, em vermelho o córtex medial, em azul o dorsomedial, em roxo o dorsal e em amarelo o lateral. B- Gráficos de área e perímetro das regiões não corticais, em vermelho a região ventricular dorsal

anterior, em azul o estriado, em preto o septo, em roxo a região ventricular dorsal posterior, em verde a região de transição estriado-amigdalóide e amarelo o complexo amigdalóide.

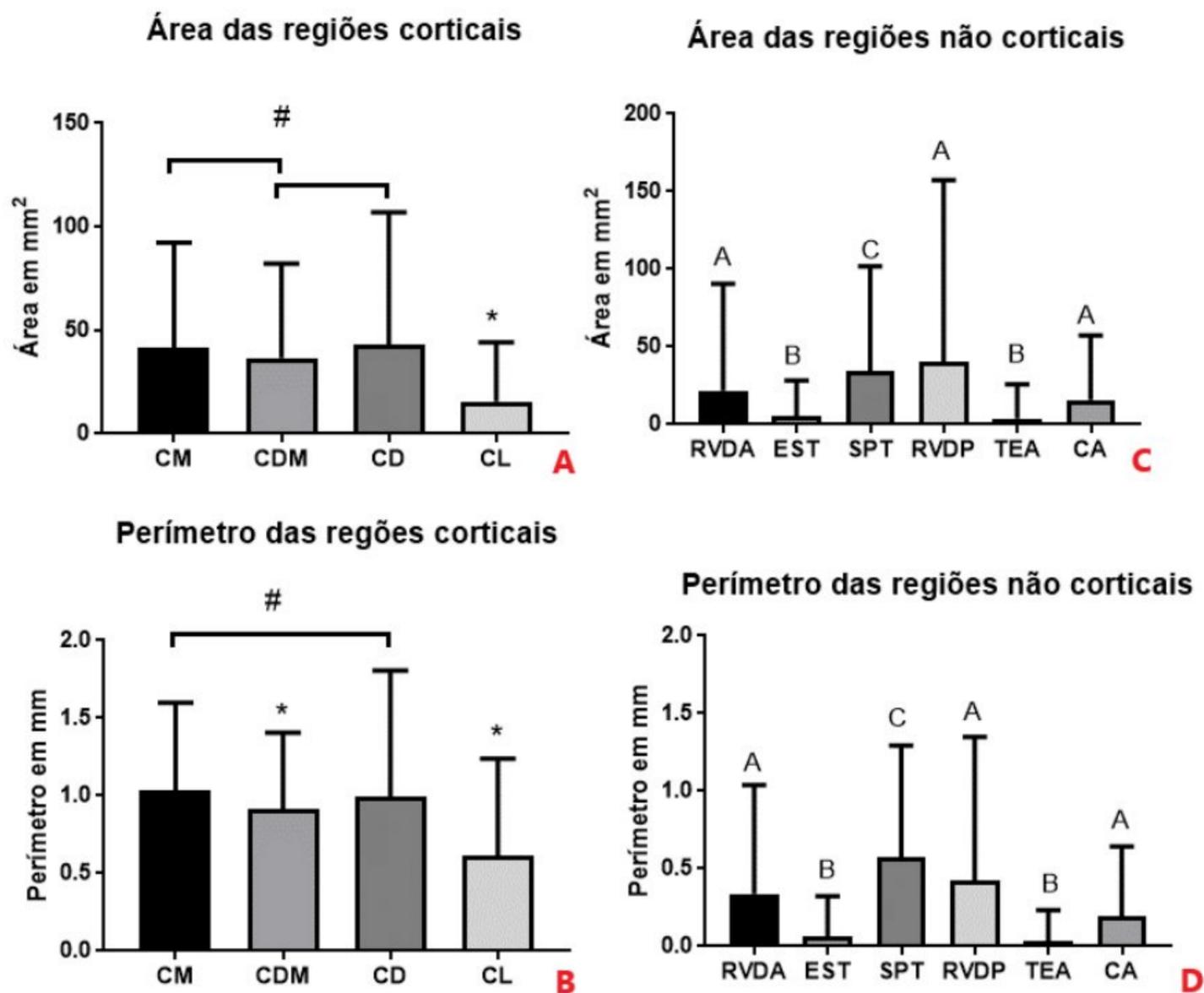


A mesma análise para as regiões não corticais (Fig.7 B), se mostrou mais significativa, nos permitindo observar as transições que acontecem entre elas. A RVDA, se inicia a partir do décimo segundo corte, junto com o córtex dorsal, contudo aproximadamente no trigésimo corte ela é substituída pela RVDP, representadas em vermelho e roxo respectivamente no gráfico. O mesmo pode ser visto entre as regiões EST, TEA e CA. O EST tem seu início a partir do décimo oitavo corte e é substituída pela TEA aproximadamente no corte 25, sendo essa a região mais efêmera em espaço de cortes (apresentou a menor área, Fig.7), iniciando no vigésimo quinto corte e encerrando no trigésimo quarto corte. A partir deste corte, o padrão do CA passa a ser mais delineado. O septo se mostrou a região mais estável, estando presente desde as regiões mais rostrais até a porção final do telencéfalo deste animal.

Para confirmar tais resultados foi feita uma análise comparativa entre as áreas e perímetros de todas as regiões. Na área das regiões corticais (Fig.8 A), foi constatado que o único córtex com área de fato diferente foi o lateral (com

média $15,62\text{mm}^2 \pm 1,91$), o córtex medial ($41,61\text{ mm}^2 \pm 3,41$) e dorsomedial ($36,51\text{ mm}^2 \pm 3,08$) não apresentaram diferença ($p=0,6390$), assim como o córtex dorsomedial e o dorsal ($42,79\text{ mm}^2 \pm 4,32$) ($p=0,0713$).

Figura 8- Gráfico comparativo das diferentes áreas e perímetros das regiões corticais e não corticais, valores expressos em média, comparações feitas por teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn's. O símbolo # e letras iguais representam regiões sem diferença, o símbolo * e letras diferentes indicam regiões em que a comparação demonstrou que havia diferença. A- Gráfico comparativo da área das regiões corticais, B- Perímetro das regiões corticais, C- área das regiões não corticais e D- perímetro das regiões não corticais.



Quanto ao perímetro (Fig.8 B), o córtex medial foi maior ($1,03\text{ mm} \pm 0,03$), seguido pelo dorsal ($0,99\text{ mm} \pm 0,05$), dorsomedial ($0,91\text{ mm} \pm 0,03$) e por fim o lateral ($0,61\text{ mm} \pm 0,04$). Houve diferença, exceto quando comparados o córtex medial e o dorsal ($p=0,3819$).

As regiões não corticais, por sua vez, apresentaram valores muito semelhantes e sem diferença tanto para área quanto para perímetro. A área (Fig.8 C) foi maior na região ventricular dorsal posterior (RVDP) ($40,2\text{ mm}^2 \pm 7,9$), seguida pela área do septo ($34,5\text{ mm}^2 \pm 4,54$), região ventricular dorsal anterior

(RVDA) ($21,84 \text{ mm}^2 \pm 4,63$), complexo amigdalóide (CA) ($15,98 \text{ mm}^2 \pm 2,79$), estriado ($5,02 \text{ mm}^2 \pm 1,56$) e por último a região de transição estriado amigdalóide (TEA) ($4 \text{ mm}^2 \pm 1,47$). Não existe diferença significativa entre a RVDA e RVDP, com $p=0,7365$, assim como entre RVDA e CA, $p=0,4749$, tornando iguais também a RVDP e o CA ($p=0,2933$); além disso o EST e a TEA também não possuem diferença ($p=0,8229$).

Estudando os dados encontrados na análise do perímetro das regiões não corticais (Fig.8 D), o septo apresentou o maior perímetro ($0,57\text{mm} \pm 0,04$), seguido pela RVDP ($0,42\text{mm} \pm 0,06$), RVDA ($0,33\text{mm} \pm 0,04$), CA ($0,19\text{mm} \pm 0,03$), TEA ($0,03\text{mm} \pm 0,01$) e EST ($0,06\text{mm} \pm 0,08$). Assim como na análise das áreas, as regiões RVDA e RVDP não foram diferentes ($p=0,8485$), assim como o RVDA e o CA ($p= 0,0835$), a RVDP e o CA ($p=0,1237$) e o EST e a TEA ($p=0,4561$).

Tais resultados confirmam a caracterização anatômica do encéfalo do *Tropidurus hispidus* encontrada em estudos anteriores (SANTOS,2016; SANTOS, 2010 & PIMENTEL *et al.*, 2011), e acrescenta dados referentes a posição em número de cortes (de espessura $50 \mu\text{m}$) em que foram encontradas as regiões corticais e não corticais iniciam, o espaço em que reduzem de tamanho pelo surgimento de outra área ou substituição e em quantos micrometros deixam de ser encontradas, servindo como base para estudos futuros e para a caracterização da morfologia do soma neuronal realizada nesse trabalho.

As regiões corticais se mostraram mais invariáveis ao longo do encéfalo, sofrendo pequenas oscilações na área e no perímetro, sendo em sua maioria encontradas antes da divisão comissural (com exceção do córtex lateral que surge na divisão) e se mantendo até o último corte realizado, tornando mais viável o estudo da morfologia somática neuronal, posteriormente comparada à morfologia encontrada nas regiões corticais de mamíferos consideradas homólogas à regiões corticais de répteis; e a evolução do número celular encontrado ao longo das regiões pré-comissural, comissural e pós-comissural, fator relacionado às migrações celulares.

As regiões não corticais, se mostraram muito passageiras, começam e terminam em um curto espaço de cortes, a maioria delas foi encontrada apenas a partir da região comissural (exceto a região ventricular dorsal anterior) inviabilizando o estudo do número celular ao longo das regiões, além de que os resultados demonstraram grandes oscilações de área e perímetro, justificado pelo fato de serem áreas de transição que logo são substituídas.

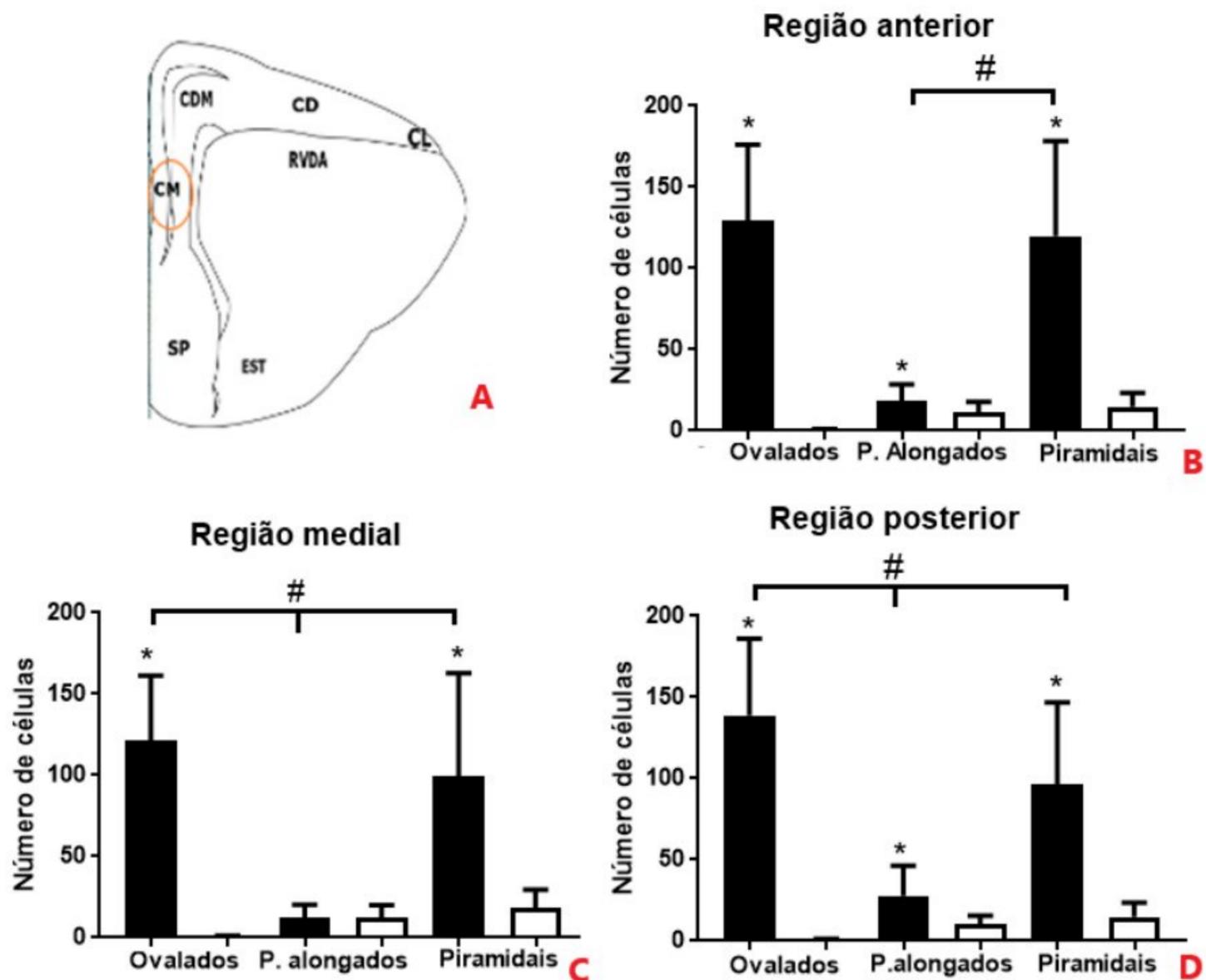
4.2. Análise da morfologia do soma neuronal encontrado no córtex medial

Seguindo o padrão em que as regiões cerebrais surgem ao longo do encéfalo do animal, encontrado no presente estudo, começamos a análise da morfologia celular pela região cortical medial, essa estrutura cortical do encéfalo de répteis é comparada ao giro denteado de mamíferos (SANTOS, 2010).

Em sua porção anterior (pré-comissural) (Fig.9 B), com a marcação de Nissl, encontramos que os tipos celulares de soma ovalado (com média $129,4 \pm 3,10$) e piramidal (média $119,7 \pm 3,90$) tiveram valores aproximados e sem diferença ($p=0,0534$), já as células piramidais alongadas foram pouco frequentes com média $18,46 \pm 0,66$, com diferença com ambas as anteriores ($p<0,0001$).

Figura 9- A-Desenho esquemático demonstrando as estruturas corticais observadas, com o córtex medial em destaque. Seguido pelos gráficos de neurônios marcados com Nissl (colunas pretas) e DCX (colunas brancas) de cada forma de soma celular encontrados nas regiões do córtex medial. B- Gráfico da região anterior do córtex medial. C- Gráfico da região medial do

córtex medial. D- Gráfico da região posterior do córtex medial. N=6, * e # $p > 0,001$ Teste t, * indicam diferença entre Nissl e DCX e # indicam diferença entre os tipos de soma neuronal.



Para a mesma região, os dados da análise da imunohistoquímica de DCX revelam como tipo de soma celular mais frequente o piramidal (média $14,84 \pm 0,97$), seguido pelo piramidal alongado (com média $11,57 \pm 0,72$), com diferença entre eles ($p=0,0079$, por fim as de soma ovalado ($0,36 \pm 0,77$, $p < 0,0001$)).

Na porção medial (também chamada comissural) do córtex medial (Fig.9 C), o tipo de soma celular formado ainda no período embrionário mais frequente foi o ovalado ($121,4 \pm 2,89$), seguido por piramidal ($99,16 \pm 4,62$), semelhante ao encontrado na porção anterior, deixando por fim o tipo somático piramidal alongado ($12,64 \pm 0,55$), com diferença entre todos eles ($p < 0,0001$).

Para as células jovens tivemos resultados semelhantes aos encontrados na porção pré-comissural. O tipo de soma mais frequente segue sendo o piramidal ($18,64 \pm 1,47$), seguido pelo piramidal alongado ($12,63 \pm 0,99$), com diferença significativa entre eles de $p = 0,0010$, o tipo somático ovalado com

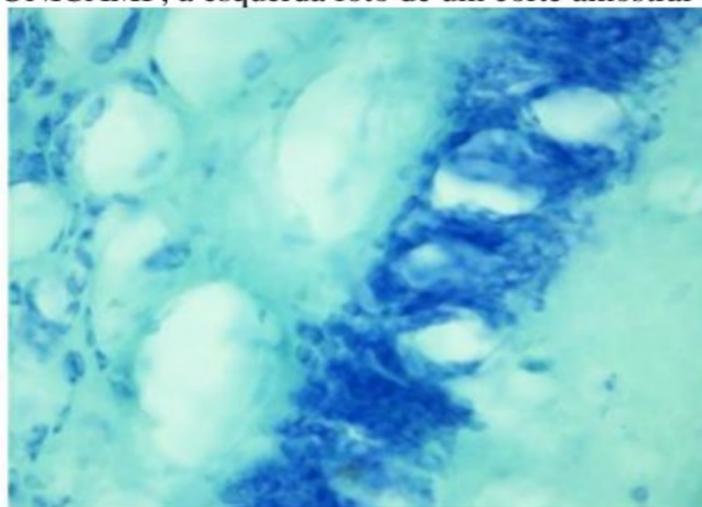
média $0,42 \pm 0,12$ foi o menos encontrado, mantendo diferença ($p < 0,0001$), com ambos os tipos de soma anteriores. Tendo em vista os valores próximos encontrados para o tipo somático piramidal alongado na marcação de Nissl e na imunohistoquímica de DCX, foi constatado que não existe diferença entre eles ($p = 0,9895$).

Encontramos um padrão de frequência para as células marcadas com Nissl (em escala de frequência: soma ovalado, piramidal e por fim piramidal alongado) e para as células jovens marcadas por DCX (piramidais, seguidas por piramidais alongados e ovalados) mantido até a região posterior (pós-comissural) (Fig.9 D).

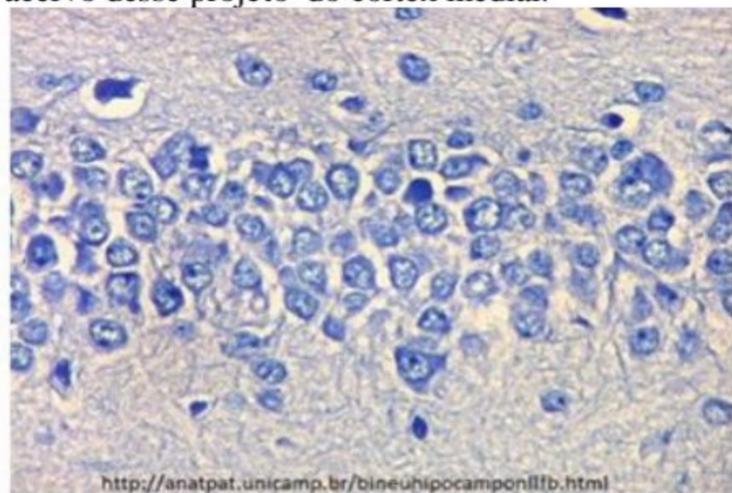
Analisando os valores encontrados na região posterior para as células cujo soma foi marcado com Nissl. Tivemos formas somáticas ovaladas ($139,5 \pm 3,16$), piramidais alongados ($27,98 \pm 1,24$) e piramidais ($96,2 \pm 3,46$), com diferença encontrada entre todos ($p < 0,0001$). Na marcação por DCX, encontramos tipo somático ovalado com menor média ($0,44 \pm 0,06$), piramidais alongados ($10,18 \pm 0,47$) e piramidais ($14,83 \pm 0,75$), com diferença ($p < 0,0001$).

A homologia discutida para essa região afirma semelhança com o giro denteado de mamíferos (SANTOS, 2010), que em humanos é única área onde ocorre a neurogênese adulta, tendo em vista que é a região do hipocampo que está sujeita a troca (PURVES, 2004) povoada por duas camadas celulares, a mais externa, chamada molecular, povoada por células granulares (ovaladas), e uma camada mais interna, a polimórfica, marcada por grande quantidade de células com soma piramidal (RAO e SHETTY, 2004) (Fig. 10).

Figura 10- Fotomicrografias das regiões comparadas sob coloração de Nissl, a direita corte amostral do giro denteado de mamíferos, figura retirada do atlas digital de neuropatologia e neuroimagem da UNICAMP, a esquerda foto de um corte amostral do acervo desse projeto do córtex medial.



Córtex medial-Tropidurus hispidus



Giro denteado-Mamíferos

Os resultados desse estudo corroboram com a teoria da homologia entre as duas áreas, tendo em vista que o CM apresenta a maior média encontrada no estudo, para neurônios de soma piramidal, o que comprova alta taxa de neurogênese desse tipo somático no local além de ser a zona proliferativa do lagarto, região de alta neurogênese pós-natal (PIMENTEL, 2014).

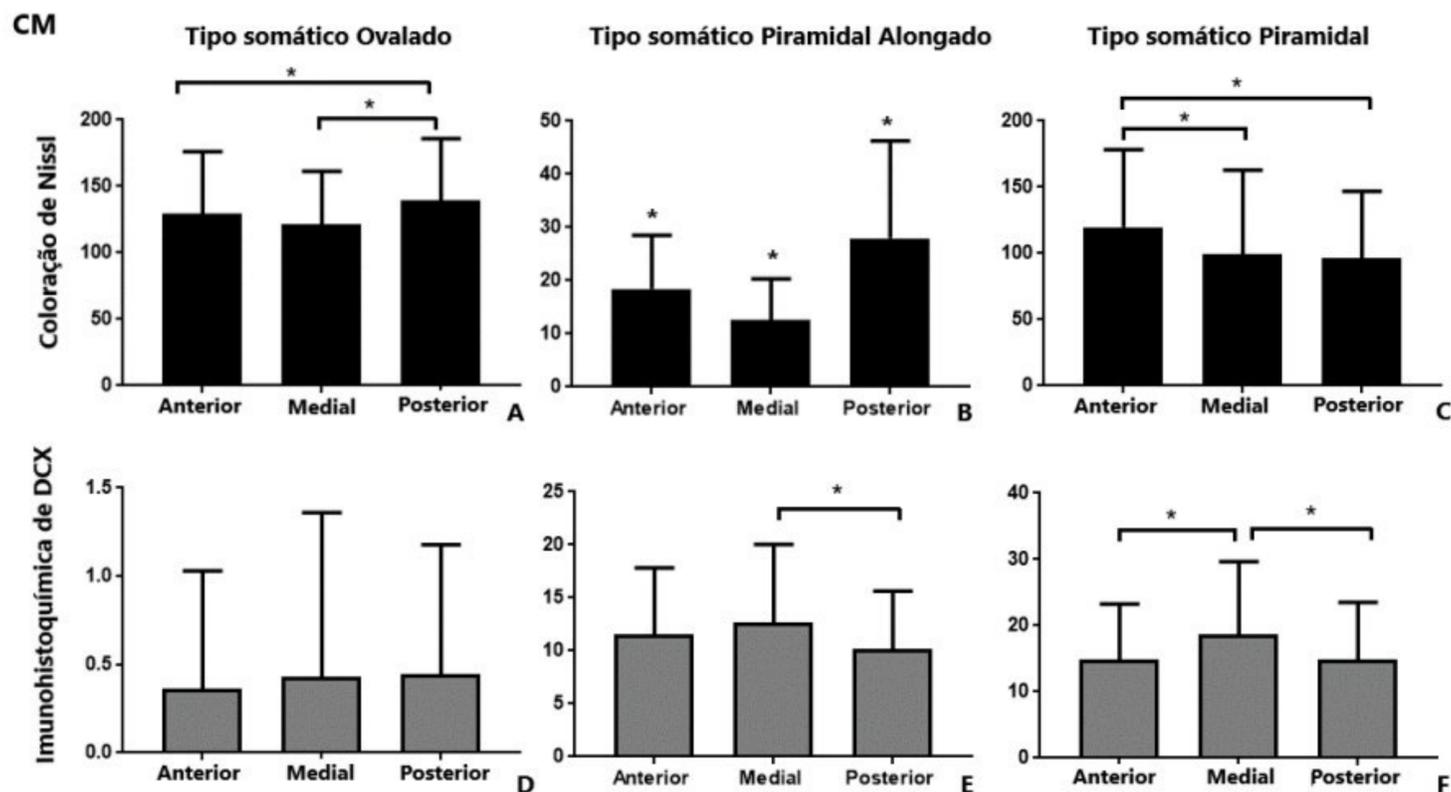
Além de tornar possível comparar a morfologia somática neuronal das regiões homólogas entre répteis e mamíferos, tal análise caracteriza quanto a morfologia somática o córtex medial do *T. hispidus*, povoado em sua maioria por neurônios de soma ovalado e piramidal, e sugere o tipo somático mais frequente formado através da neurogênese pós-natal, sendo os tipos piramidal e piramidal alongado.

4.2.1. Análise do padrão de migração celular no córtex medial

Estudos anteriores comprovam que córtex medial se localiza na região de sulco medial e é rota das migrações radial (quando esta passa pela região do sulco medial, posicionada paralelamente ao córtex), tangencial caudal (atravessa o sulco medial em direção a região do septo) e comissural (atravessa o sulco medial, passando pela camada plexiforme interna do córtex medial saindo do hemisfério) (PIMENTEL, 2014). Avaliamos os tipos de morfologia neuronal encontrada nas regiões anterior, medial e posterior do córtex, diferenciando também quanto a origem, embrionária ou jovem, para entender se de fato existe um aumento na frequência de algum tipo somático celular ao longo das regiões estudadas para cada córtex, comprovando que as células estão migrando ao longo das regiões.

Analisando os resultados obtidos com a coloração de Nissl, vimos que nas células de soma ovalado (Fig.11 A), a maior média de frequência encontrada foi na região posterior (média $139,5 \pm 3,16$), seguida pela região anterior ($129,4 \pm 3,10$) e por fim, a região medial ($121,49 \pm 2,89$). Quando comparamos as áreas entre si (teste T) observou-se que entre a região anterior e medial não há diferença ($p=0,064$), embora a diferença exista entre as regiões anterior e posterior ($p=0,023$) e entre medial e posterior ($p<0,0001$); comprovando um aumento no número de células de soma ovalado ao longo das regiões no córtex medial.

Figura 11- Comparação quanto a forma do soma neuronal e a região do córtex medial avaliada. A e D- Gráfico das células de soma ovalado, coradas com Nissl (A) e imunohistoquímica de DCX (D). B e E- Gráfico das células de soma piramidal alongado, coradas segundo o protocolo de Nissl (B) e por imunohistoquímica de DCX (E). C e F- Gráfico das células de soma piramidal, Nissl em C e DCX em F. N=6, $p < 0,0001$ * representando diferença significativa encontrada por Teste t.



As células jovens do mesmo tipo somático (Fig.11 D), mostraram valores encontrados foram muito semelhantes para todas as áreas (anterior- $0,36 \pm 0,07$; medial- $0,42 \pm 0,12$ e posterior- $0,44 \pm 0,06$) não havendo diferença entre elas, sugerindo que este tipo somático não está migrando, dado que se relaciona com o resultado anterior da análise comparativa dos tipos somáticos corados com Nissl ou DCX ao longo das regiões (Fig. 10), onde visualizamos que o tipo somático ovalado foi o menos frequente em todas as regiões estudadas quando corados por imunohistoquímica de DCX.

A frequência do tipo somático piramidal alongado, se mostrou crescente ao longo das regiões comissurais na análise da coloração de Nissl (Fig.11 B), muito embora tenha apresentado valores médios menores que os encontrados para o tipo ovalado. Na região anterior encontramos uma média de $18,46 \pm 0,66$ e houve uma baixa na região medial (com média $12,64 \pm 0,55$) seguida por um aumento na região posterior ($27,98 \pm 1,24$), com diferença ($p < 0,0001$) entre todas as regiões, comprovando o aumento desse tipo somático ao longo do córtex medial.

No entanto a mesma análise feita para células jovens (Fig.11 E), trouxe uma menor média de frequência para a região posterior ($10,18 \pm 0,47$), seguida

pela anterior ($11,57 \pm 0,72$), sendo a maior média encontrada a da região medial ($12,63 \pm 0,99$), não havendo diferença entre as regiões anterior e medial ($p=0,3804$) e entre anterior e posterior ($p=0,0967$), apenas entre as regiões medial e posterior ($p=0,0131$), comprovando um leve decréscimo em frequência celular ao longo dessas regiões, sugerindo que este tipo somático está em processo de migração.

Para o tipo somático piramidal os valores médios de frequência encontrados se mostraram tão altos quanto os do tipo ovalado. Analisando os dados obtidos na coloração de Nissl (Fig.11 C), tivemos que a região anterior apresentou a maior média ($119 \pm 3,9$) seguida pela região medial ($99,16 \pm 4,62$), havendo diferença entre elas ($p=0,0007$), deixando em último a região posterior ($96,2 \pm 3,46$), que não apresentou diferença quando comparada à região medial ($p=0,6041$), apesar de a diferença encontrada ter sido relevante entre posterior e anterior ($p=0,0001$). Todavia, a análise sugere uma pequena redução desse tipo somático ao longo do córtex.

Na imunohistoquímica para DCX (Fig.11 F), a maior média de frequência encontrada para os neurônios de soma piramidal foi na região medial ($18,64 \pm 1,47$) e a média encontrada para as demais regiões se mostrou muito semelhante (anterior- $14,84 \pm 0,97$ e posterior- $14,83 \pm 0,75$), não havendo diferença relevante entre elas ($p=0,9949$). Se comparadas as regiões anterior e medial, assim como a medial e a posterior a diferença encontrada foi significativa ($p=0,0269$ e $p=0,0103$ respectivamente).

Os resultados encontrados na análise dos somas neuronais marcados sob o protocolo de Nissl (Fig. 11 A, B e C) confirmam o resultado da análise anterior em que os tipos somáticos mais frequentes foram o ovalado e o piramidal ao longo de todas as regiões (Fig. 9).

Os dados obtidos no estudo das células jovens (Fig. 11 D, E e F), sugerem que o córtex medial não é o destino final das migrações que o perpassam, tendo em vista que para todos os tipos somáticos estudados os valores encontrados entre as regiões (anterior, medial e posterior) sofreram pequenos decréscimos, resultado que se relaciona com um estudo anterior de Marchioro (2012) que determina que o *Tropidurus hispidus* apresenta baixa

quantidade de glia radial se comparado a outros lagartos, ou seja, apresenta pouco suporte físico para a passagem desses neurônios jovens que ainda não se estabeleceram.

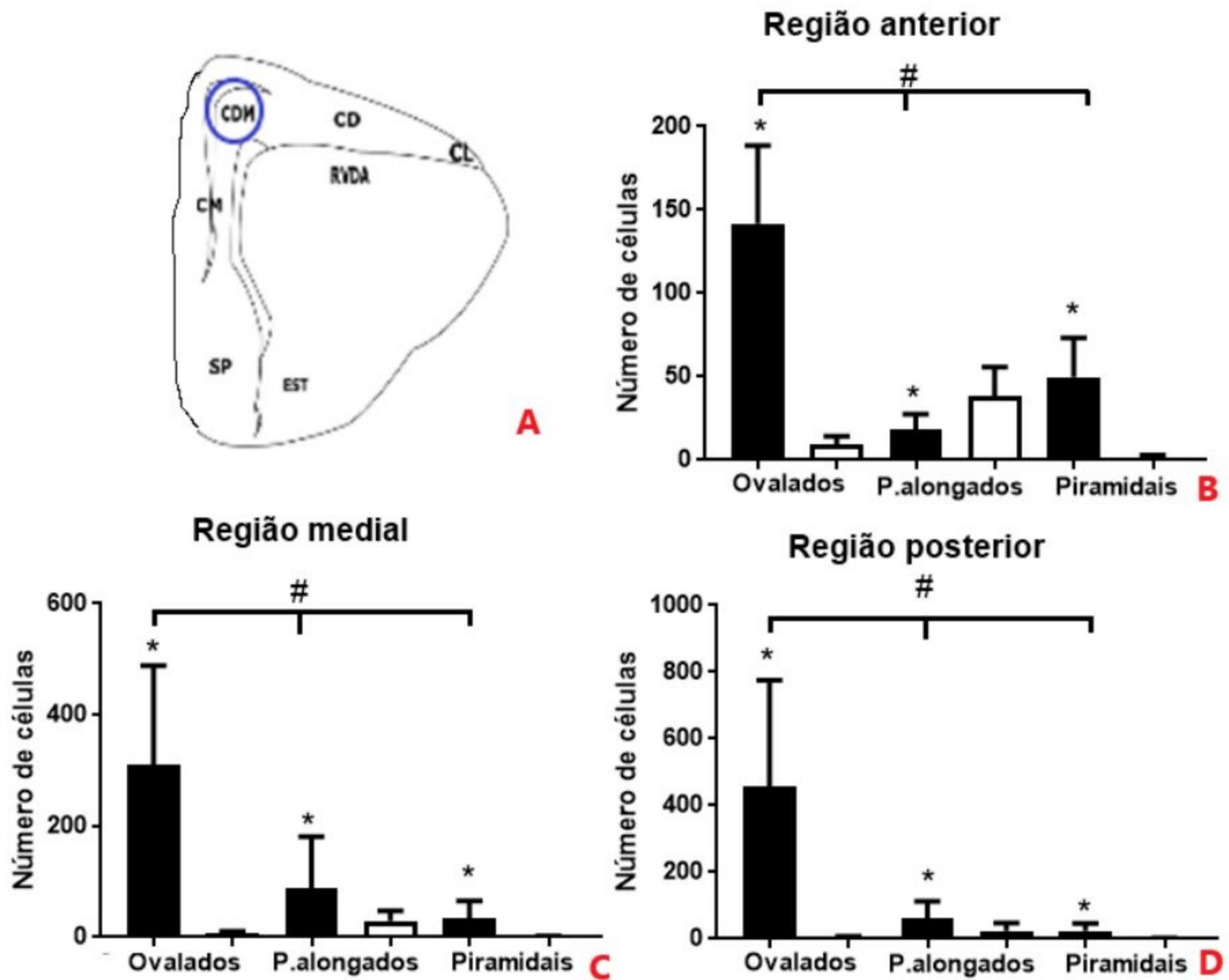
4.3. Análise da morfologia do soma neuronal encontrado no córtex dorsomedial

A próxima região cortical que surge no encéfalo do animal é o córtex dorsomedial (resultado obtido pela análise dos cortes do encéfalo em sequência rostro-cloacal), região comparada à área 3 do Corno de Ammon de mamíferos (SANTOS, 2010).

Analisando a morfologia somática embrionária encontrada na região anterior desse córtex (Fig.12 B), tivemos que o tipo somático mais frequente foi o ovalado, com média $141,8 \pm 7.92$, seguido pela forma somática piramidal, $49,91 \pm 3,96$ e piramidal alongado, $18,66 \pm 1,15$, com diferença entre todos ($p < 0,0001$).

Figura 12- A-Desenho esquemático mostrando as estruturas observadas com o córtex dorsomedial em destaque. Seguido pelos gráficos de neurônios marcados com Nissl (colunas pretas) e DCX (colunas brancas) de cada forma de soma celular encontrados nas regiões do córtex dorsomedial. B- Gráfico da região anterior do córtex dorsomedial. C- Gráfico da região medial do córtex dorsomedial. D- Gráfico da

região posterior do córtex dorsomedial. N=6, * e # p>0,001 Teste t, * indicam diferença entre Nissl e DCX e # indicam diferença entre os tipos de soma neuronal.



As células jovens, foram mais encontradas no tipo somático piramidal alongado (média $38,25 \pm 6,17$), seguido pelo tipo ovalado ($9,5 \pm 1,73$) e por fim as de soma piramidais ($1,87 \pm 0,44$). Houve diferença entre todos eles o p encontrado foi igual a 0,0005 na comparação entre ovalados e piramidais alongados, $p= 0,0008$ entre ovalados e piramidais, e $p<0,0001$ entre piramidais alongados e piramidais.

Na região medial do córtex dorsomedial (Fig.12 C), o valor médio encontrado para o tipo somático piramidais alongados na análise dos neurônios maduros começa a subir passando a ser o segundo tipo mais frequente (com média $87,3 \pm 8,93$), atrás dos ovalados ($309,2 \pm 17,7$), deixando piramidais como tipo menos encontrado ($33,58 \pm 3,01$), havendo diferença entre todos eles ($p<0,0001$).

Estudando as células jovens, mais uma vez o tipo piramidal alongado ganhou destaque, desta vez com a maior média ($29,72 \pm 2,13$), seguido pelo tipo

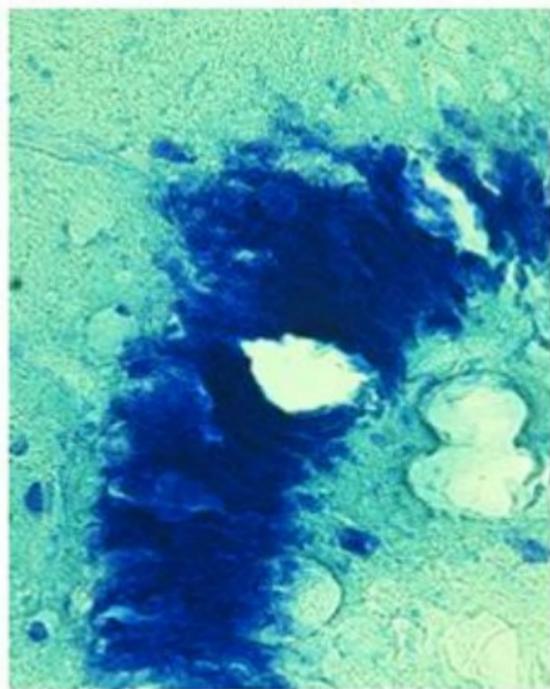
ovalado ($6,20 \pm 0,56$) e por fim o tipo somático piramidal ($1,56 \pm 0,13$), com diferença entre todos eles ($p < 0,0001$).

Na região posterior (Fig.12 D), o estudo dos valores encontrado para as células coradas com Nissl se mostrou semelhante ao encontrado na região anterior. O tipo somático mais frequente foi o ovalado ($455,8 \pm 35,31$), seguido pelo piramidal alongado ($60,56 \pm 5,76$) e por fim as de soma piramidal com menor frequência ($23,79 \pm 2,56$), com diferença significativa entre todos ($p < 0,0001$).

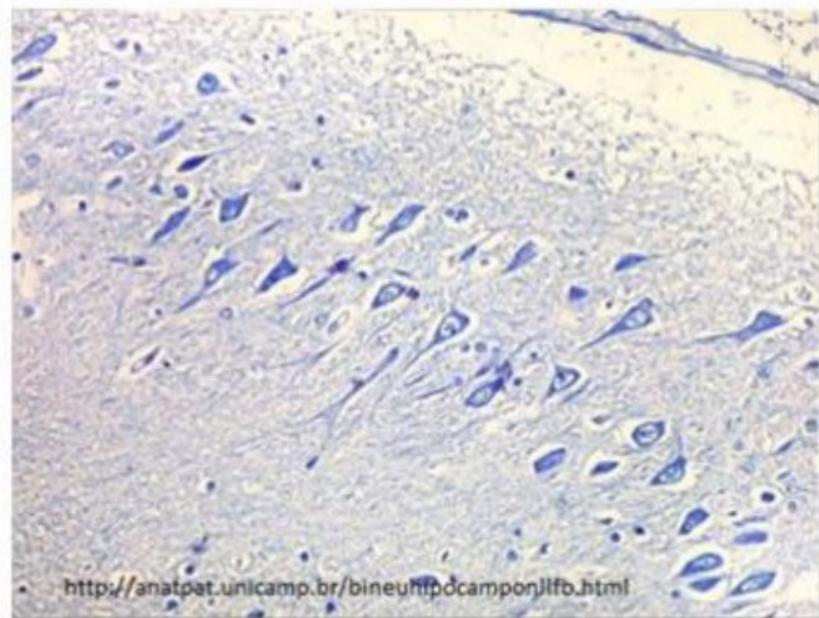
O mesmo acontece para as células jovens (DCX), assim como na região medial e na anterior, a região posterior do córtex dorsomedial apresenta mais células jovens de tipo somático piramidal alongado ($24,9 \pm 3,35$), seguido pelo tipo ovalado ($4 \pm 0,5$) e o piramidal ($1,29 \pm 0,21$), com diferença entre todos ($p < 0,0001$). Todavia, não encontramos diferença para os tipos somáticos piramidal (em Nissl) e o piramidal alongado (DCX), tendo como base a proximidade vista entre os valores ($p = 0,7944$).

O córtex dorsomedial é dito homólogo a área 3 do Corno de Ammon de mamíferos (SANTOS, 2010), região que faz parte do giro denteado, parte do hipocampo, dividido nas 4 áreas do Corno de Ammon (KANDEL *et al.*, 2000). De acordo com a literatura a área 3 é caracterizada quanto a morfologia somática neuronal por soma piramidal (Fig. 13) (MENDES *et al.*, 2016), resultado que se mostrou diferente do encontrado no córtex dorsomedial do *Tropidurus hispidus*, em que o tipo somático mais frequente encontrado nessa região cortical foi o ovalado, seguido pelo piramidal alongado.

Figura 13- Fotomicrografias das regiões comparadas sob coloração de Nissl, a direita corte amostral da área 3 do Corno de Ammon de mamíferos, figura retirada do atlas digital de neuropatologia e neuroimagem da UNICAMP, a esquerda foto de um corte amostral do acervo desse projeto do córtex dorsomedial.



Córtex dorsomedial-Tropidurus



**Área 3 do Corno de Ammon-
Mamíferos**

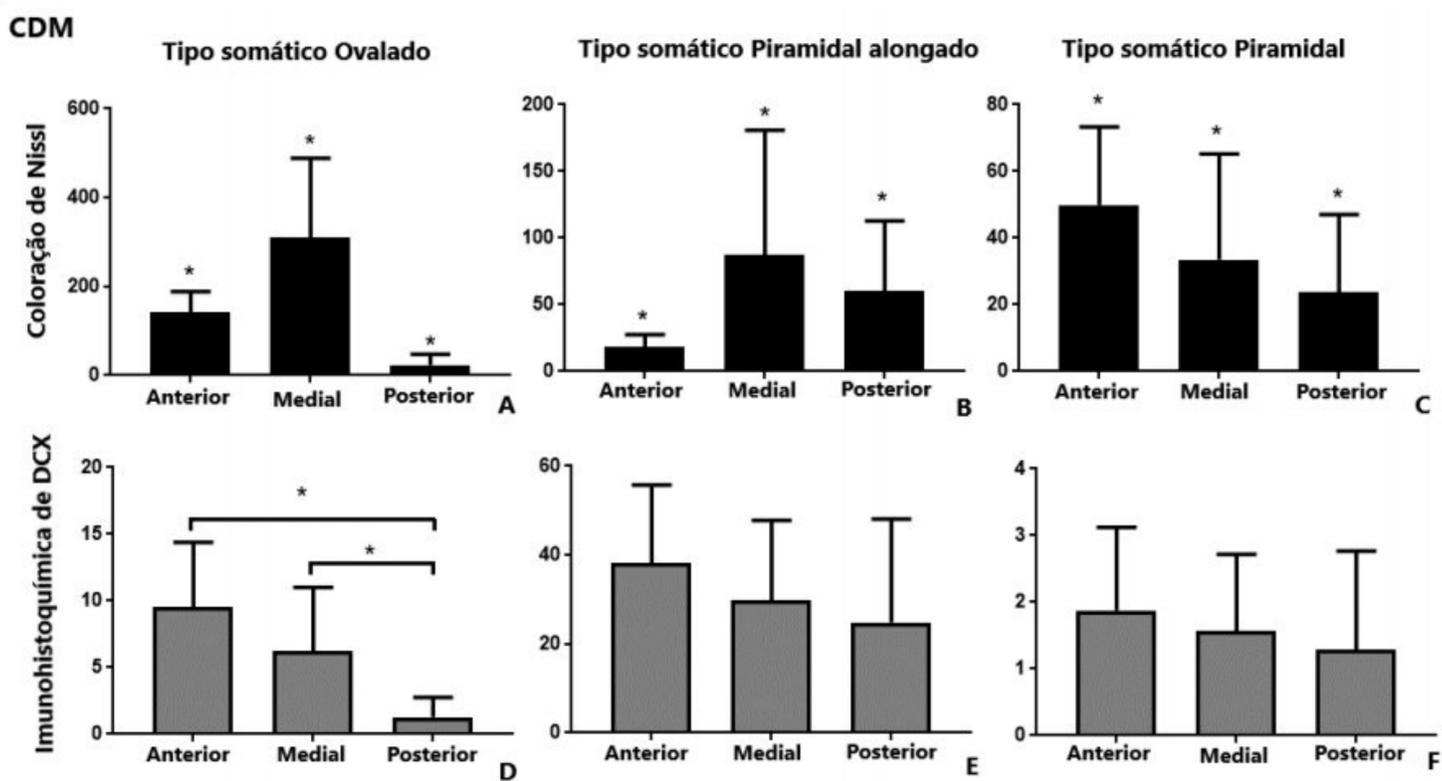
Além da comparação da morfologia somática neuronal das regiões homólogas entre répteis e mamíferos, tal análise caracteriza quanto a morfologia somática o córtex dorsomedial do *T. hispidus*, povoado em sua maioria por neurônios de soma ovalado e piramidal alongado (tipo somático que passa a ser mais frequente a partir da região medial desse córtex), e sugere o tipo somático mais frequente formado através da neurogênese pós-natal nesse córtex foi o piramidal alongado.

4.3.1. Análise do padrão de migração celular no córtex dorsomedial

Assim como o córtex medial, o córtex dorsomedial se posiciona na região do sulco medial, muito embora tenha sido caracterizado apenas como parte da rota da migração radial (PIMENTEL, 2014). Partindo desse pressuposto foram avaliadas as frequências dos tipos somáticos ao longo das regiões anterior, medial e posterior, tanto para os neurônios maduros, corados com Nissl, visando caracterizar o tipo somático mais frequente por região do córtex dorsomedial do *T. hispidus*, quanto para os neurônios jovens, marcados pela imunohistoquímica de DCX, para avaliar quantitativamente a migração.

Comparando as células de soma ovalado marcadas com Nissl (Fig.14 A), encontramos um grande aumento entre as regiões anterior e medial, seguido por redução marcante entre as regiões medial e posterior. Para a região anterior encontramos o valor de média, $141 \pm 7,92$, região medial - $309,2 \pm 17,07$ e posterior - $23,79 \pm 2,56$, havendo diferença entre todas elas ($p < 0,0001$).

Figura 14- Comparação quanto a forma do soma neural e a região do córtex dorsomedial avaliada. A e D- Gráfico das células de soma ovalado, coradas com Nissl (A) e imunohistoquímica de DCX (D). B e E- Gráfico das células de soma piramidal alongado, coradas segundo o protocolo de Nissl (B) e por imunohistoquímica de DCX (E). C e F- Gráfico das células de soma piramidal, Nissl em C e DCX em F. N=6, * indica diferença significativa, por Teste t com $p > 0,0001$



Quando analisadas as células jovens de soma ovalado (Fig.14 D), percebemos um decréscimo ao longo das regiões (anterior, $9,5 \pm 1,73$; medial, $6,20 \pm 0,56$ e posterior, $1,29 \pm 0,21$), não havendo diferença apenas entre as regiões anterior e medial ($p = 0,06$).

O mesmo foi visto para as células de soma piramidal alongado. Na análise dos tipos somáticos corados com Nissl (Fig.14 B), os valores cresceram entre as regiões anterior e medial (médias respectivas de $18,66 \pm 1,51$ e $87,3 \pm 8,93$) com diferença entre elas ($p < 0,0001$) e reduziram na região posterior ($60,56 \pm 5,76$), com diferença quando comparado à região anterior ($p < 0,001$) e à região medial ($p = 0,0209$).

Na análise das células jovens (Fig.14 E), o mesmo decréscimo foi encontrado. A região anterior teve a maior média ($38,25 \pm 6,17$), seguida pela

região medial ($29,72 \pm 2,13$) e por último a região posterior ($24,9 \pm 3,35$), sem diferença entre elas.

O tipo somático piramidal apresentou menos oscilações entre as regiões, durante a análise das células maduras (coradas com Nissl) (Fig.14 C), havendo um decréscimo direto. A região anterior apresentou a maior média ($49,9 \pm 3,96$), seguida pela região medial com $33,58 \pm 2,56$ e então pela região posterior com média igual a $23,7 \pm 2,56$, havendo diferença em todas as comparações ($p= 0,0056$ entre anterior e medial, $p<0,0001$ entre anterior e posterior e $p= 0,0191$ entre medial e posterior).

Analisando os resultados obtidos para o mesmo tipo somático marcado por imunohistoquímica de DCX (Fig.14, F), encontramos mais uma vez um decréscimo, além de que os valores médios encontrados para as regiões foram próximos, de modo que a diferença entre eles não foi significativa. A região anterior teve uma média de $1,87 \pm 0,44$ formas somáticas piramidais encontradas, a região medial, $1,56 \pm 0,13$ e a região posterior, $1,29 \pm 0,21$. Ao compararmos por teste T, a região anterior e a medial apresentaram um p igual a 0,480, entre a região anterior e posterior o p encontrado foi igual a 0,2952 e quando comparadas as regiões medial e posterior o valor de p foi 0,2492.

Os resultados obtidos se relacionam com o encontrado na análise anterior (Fig. 12) onde os tipos somáticos ovalado e piramidal se mostraram muito menos frequentes que o piramidal alongado na análise dos neurônios marcados na imunohistoquímica de DCX (Fig. 14 D, E e F), os mesmos dados confirmam o resultado encontrado no estudo de De Carvalho Pimentel (2014) que afirmam que as células DCX positivas que migram pela rota de migração radial estão ausentes na camada celular do córtex dorsomedial e escassas no córtex dorsal.

O estudo da evolução de frequência somática dos neurônios ao longo das regiões, corados sob o protocolo de Nissl (Fig. 14 A, B e C), igualmente se relaciona com a análise comparativa feita inicialmente para esta zona cortical (Fig. 12), onde foi constatado que os tipos somáticos mais frequentes foram o ovalado e o piramidal alongado a partir da região medial, onde ocorre um

crescimento na frequência desse tipo somático aliada ao decréscimo na frequência do tipo piramidal.

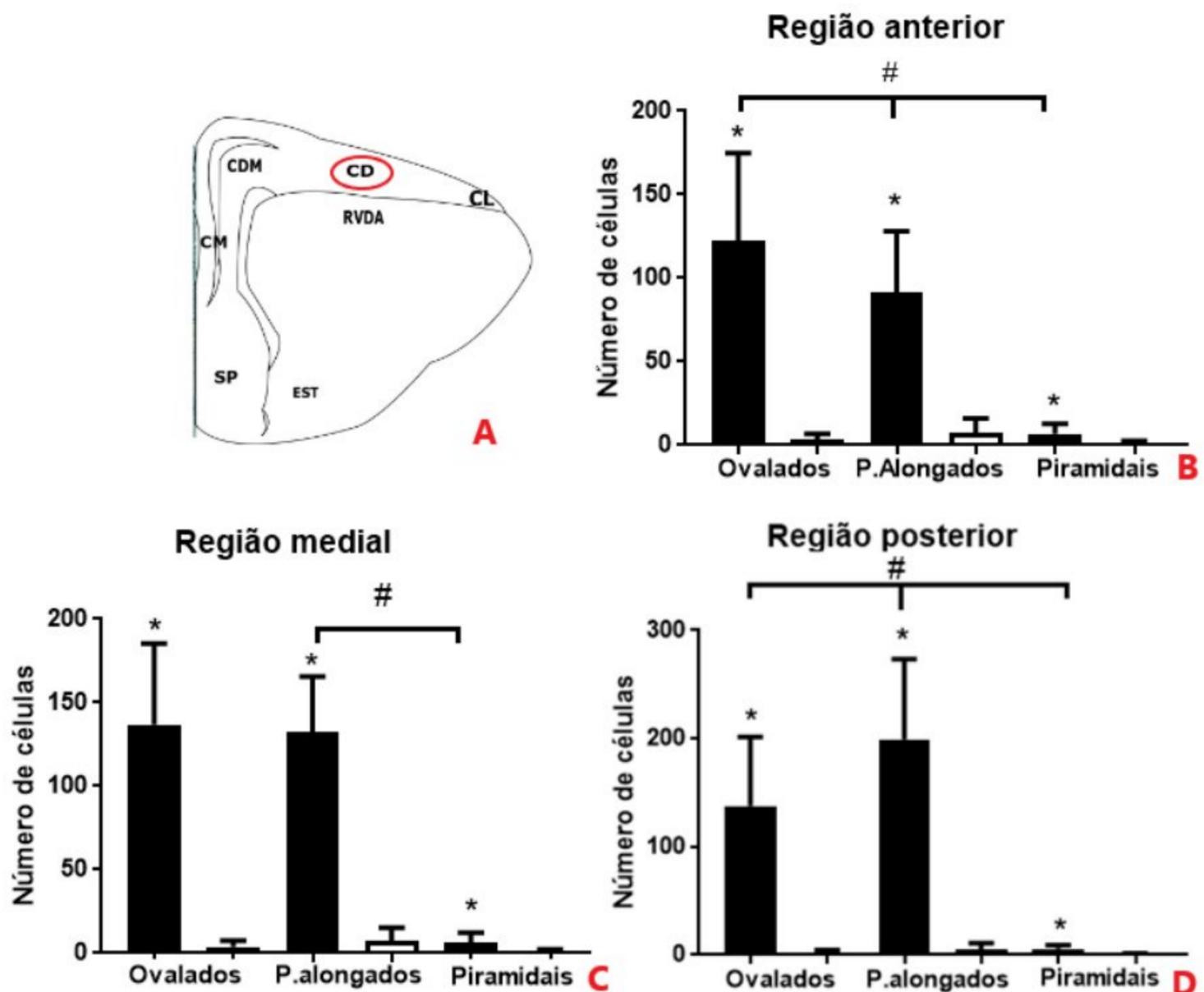
4.4. Análise da morfologia do soma neuronal encontrado no córtex dorsal

Seguindo o padrão encontrado no mapeamento anatômico das regiões corticais do encéfalo do *Tropidurus hispidus*, o próximo córtex a surgir é o córtex dorsal. Tal região é objeto da principal teoria de homologia e evolução do neocórtex de mamíferos (SANTOS, 2010). Foram analisados os tipos somáticos neuronais encontrados ao longo de todas as regiões no córtex dorsal, para tornar possível comparar de acordo com a morfologia somática essas regiões e caracterizar o córtex dorsal do *T. hispidus*.

Analisando os resultados obtidos pela marcação de Nissl para região anterior desse córtex (Fig.15 B) observamos que as células de soma ovalado são significativamente mais frequentes (média $122,3 \pm 4,02$), seguidas pelas de soma piramidal alongado (média de $91,01 \pm 2,84$) e as de soma piramidal (tipo de soma menos encontrado) (com média igual a $6,92 \pm 0,46$), havendo diferença entre todas elas ($p < 0,0001$).

Figura 15- A-Desenho esquemático mostrando as estruturas observadas com o córtex dorsal em destaque. Seguido pelos gráficos de neurônios marcados com Nissl (colunas pretas) e DCX (colunas brancas) de cada forma de soma celular encontrados nas regiões do córtex dorsal. B- Gráfico da região anterior do córtex dorsal. C- Gráfico da região medial do córtex dorsal. D- Gráfico da região posterior do córtex dorsal. N=6,

* e # $p > 0,001$ Teste t, * indicam diferença entre Nissl e DCX e # indicam diferença entre os tipos de soma neuronal.



Estudando as células jovens geradas por neurogênese pós-natal (marcadas por DCX), as células de soma piramidal alongado apresentaram o valor médio maior ($7,35 \pm 0,92$) que as de soma ovalado ($3,25 \pm 0,39$), enquanto que as de soma piramidal permanecem com o menor valor médio ($1,10 \pm 0,15$) com diferença encontrada entre todas elas ($p < 0,0001$).

Na região medial (Fig.14 C), o estudo das células maduras revelou valores médios encontrados para os tipos de soma ovalados (média $136,89 \pm 2,94$), e piramidais alongados (média $132,5 \pm 2$) próximos, sem diferença entre eles ($p=0,218$), embora a comparação com as células de soma piramidal apresente os mesmos resultados, se mantendo como tipo menos frequente (média $6,4 \pm 0,36$ e diferença significativa, com $p < 0,0001$).

Analisando as células jovens, foram encontrados valores médios de neurônios de soma ovalado ($3,68 \pm 0,34$) soma piramidal alongado ($7,53 \pm 0,65$)

(se mantiveram como tipo mais encontrado) e soma piramidal ($0,99 \pm 0,11$), com diferença encontrada entre os valores ($p < 0,0001$).

Já na região posterior (Fig.14 D), a média de neurônios de soma piramidal alongado encontrados é maior (média $199,32 \pm 5,344$) que a encontrada para os de soma ovalado (média $137,78 \pm 4,593$), com diferença ($p < 0,0001$), enquanto os neurônios de soma piramidal se mantêm como menos frequente (média $5,94 \pm 0,2289$, diferença significativa com $p < 0,0001$).

Estudando as células jovens, notamos que o padrão visto nas regiões anteriores do córtex dorsal se conserva com valores médios de ovalados (média $2,06 \pm 0,24$), piramidais alongados (média $4,79 \pm 0,59$) e piramidais (média $0,63 \pm 0,09$), com diferença entre eles ($p < 0,0001$). Quando comparados os valores médios entre somas marcados com Nissl e DCX, todas as regiões dos córtex dorsal apresentaram diferença ($p < 0,0001$).

O córtex dorsal de répteis é alvo da principal teoria de evolução do neocórtex de mamíferos (Fig. 16), sendo este considerado derivado da região ventricular e do córtex dorsal ou somente do córtex dorsal (SANTOS, 2010). Todavia analisando a morfologia do soma neuronal essas regiões se mostraram bem diferentes, o neocórtex dos mamíferos apresenta 6 camadas celulares bem distintas e divididas, visto que cada camada recebe projeções de diferentes campos periféricos (BUTLER *et al.*, 2005), enquanto que em todas as regiões corticais do lagarto estudado só foram encontradas 3 camadas celulares, duas plexiformes (uma externa- anexa a pia-máter e uma interna- anexa aos ventrículos) e entre elas, uma camada celular (Fig.17) e esse padrão só é bem delineado entre o córtex medial e o dorsomedial.

Figura 16- A esquerda foto e desenho ilustrando as áreas paliais encontradas no encéfalo de um rato, retirada do livro *Comparative vertebrate neuroanatomy*, de Anna Butler e William Hodos (página 502). A direita foto de um corte amostral e desenho esquemático, visando demonstrar as estruturas comparadas nas homologias.

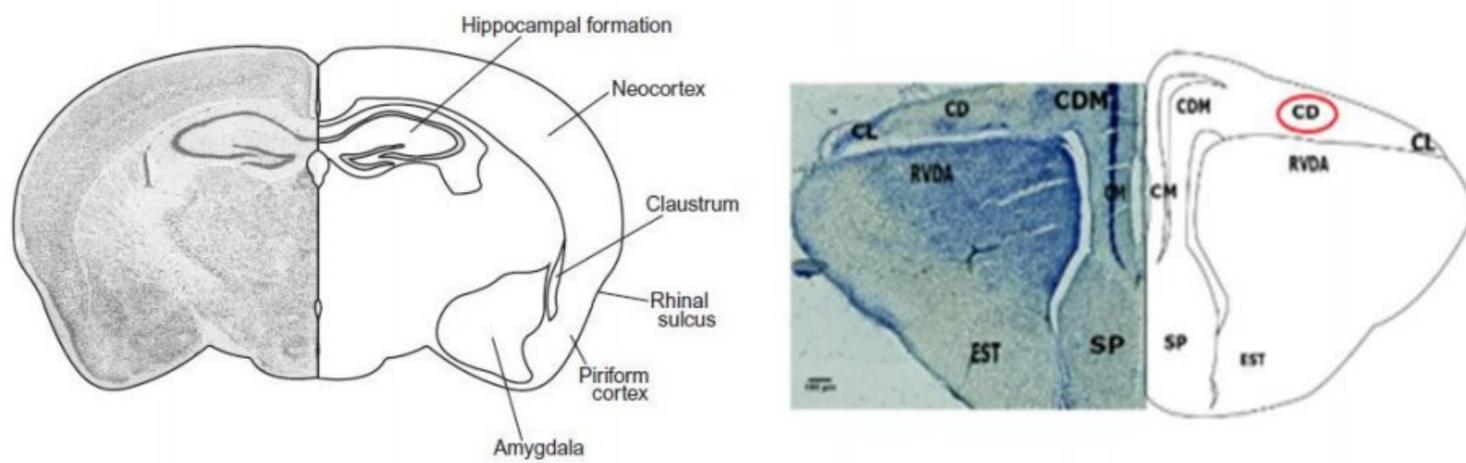
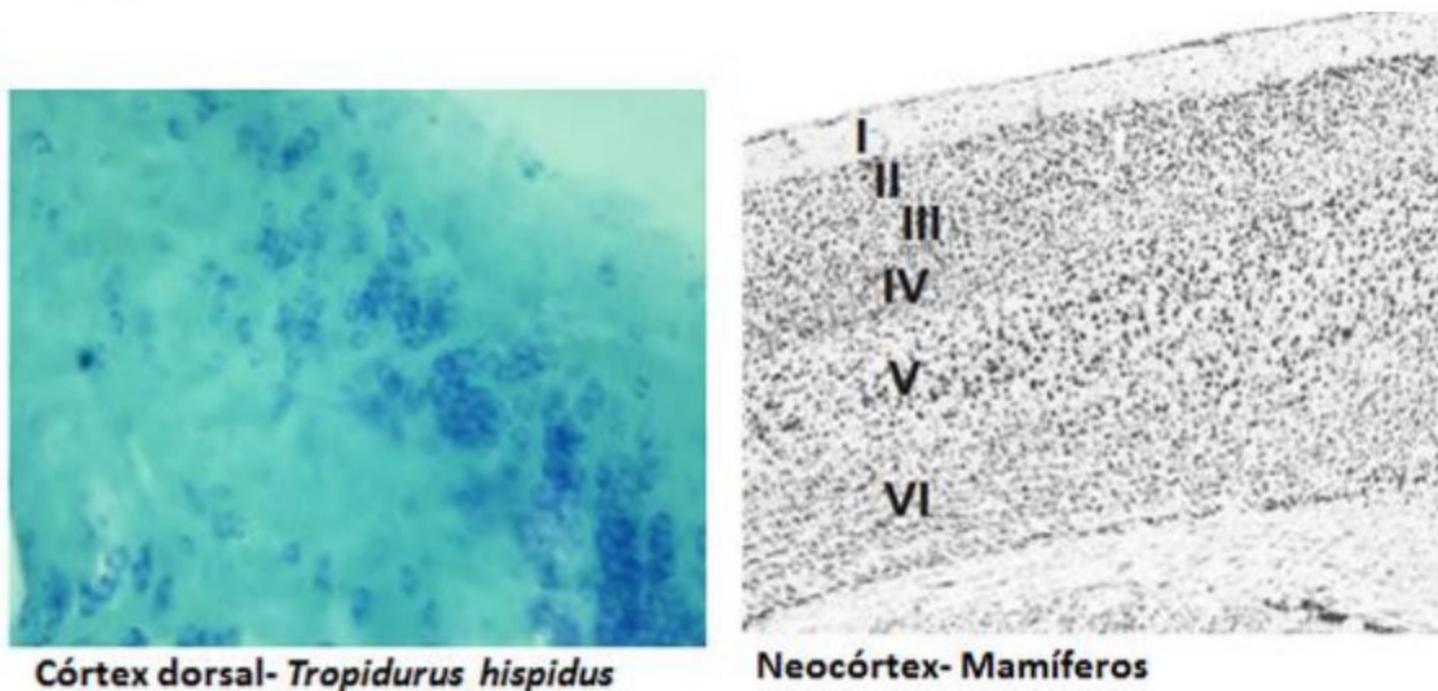


Figura 17- Fotomicrografias das regiões comparadas, a direita corte amostral do neocórtex de mamíferos destacando as 6 camadas celulares, figura retirada do livro *Comparative vertebrate neuroanatomy*, de Anna Butler e William Hodos (página 355), a esquerda foto do córtex dorsal de um corte amostral do acervo desse projeto.



A primeira camada celular do neocórtex de mamíferos, chamada molecular, é rica em axônios; a segunda (granular externa) é povoada por neurônios granulares (soma ovalado); a terceira, conhecida como piramidal externa, é rica em neurônios piramidais; a quarta seria a granular interna, que junto com a segunda camada formam o córtex granular; a quinta (piramidal interna) e a sexta formada por neurônios multiformes (fusiformes de soma alongado); sendo que a terceira e a quinta camada formam o córtex agranular (BUTLER *et al.*, 2005).

Quando comparamos os somas neuronais encontrados, sabe-se que no neocórtex de mamíferos existem duas camadas formadas por células piramidais, a piramidal externa e a piramidal interna (BUTLER *et al.*, 2005),

enquanto em nosso trabalho neurônios com soma piramidal foram significativamente menos frequentes comparados aos de soma ovalado e piramidal alongado (a exemplo da região anterior do córtex dorsal, enquanto que para neurônios de soma ovalados marcados com Nissl temos uma média $122,3 \pm 4,02$ e para os de soma piramidal tivemos média igual a $6,92 \pm 0,46$), em todas as regiões cerebrais estudadas do córtex dorsal (anterior, medial e posterior), bem como das outras áreas corticais.

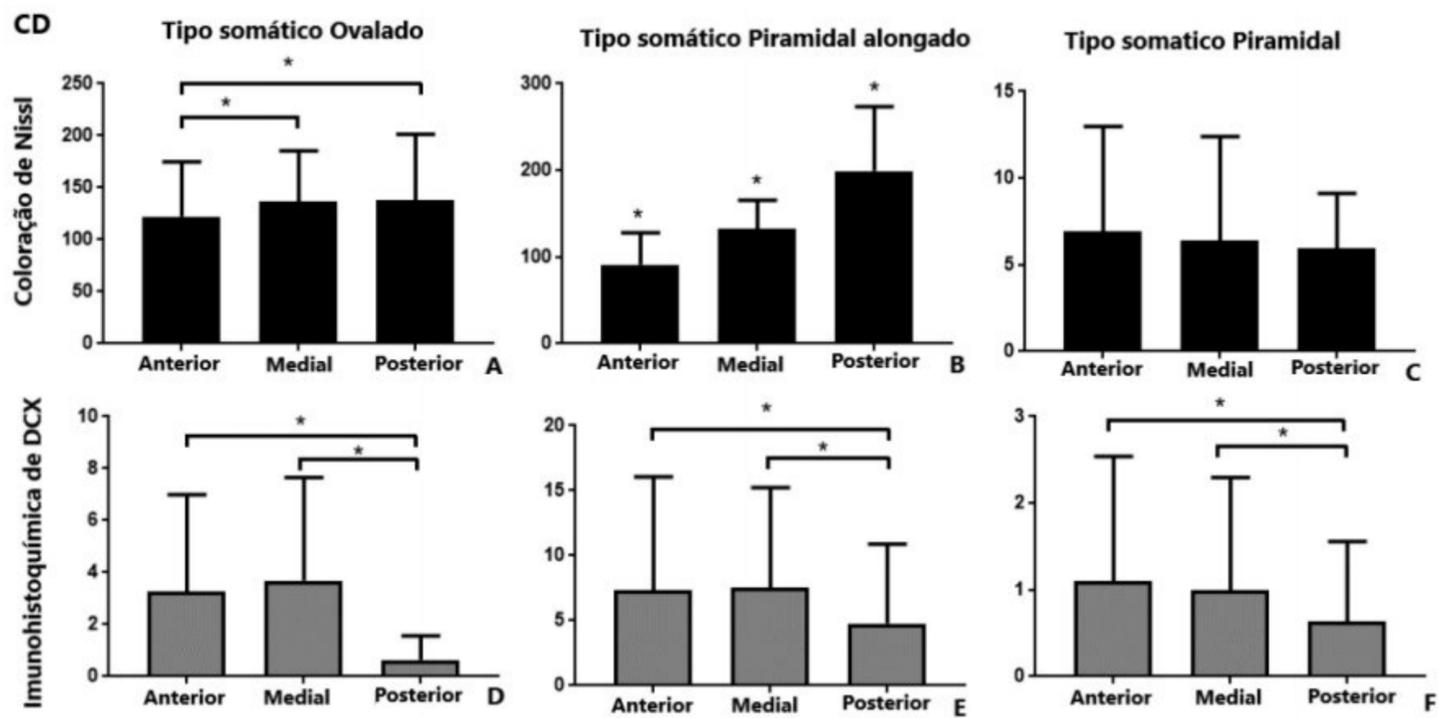
4.4.1. Análise do padrão de migração celular no córtex dorsal

O córtex dorsal ocupa a parte superior da região ventricular dorsal, se posicionando acima do ventrículo e desse modo assim, como as duas áreas corticais citadas anteriormente, faz parte da rota de migração radial (PIMENTEL, 2014), para quantificar essa migração avaliamos as frequências dos tipos somáticos ao longo das regiões anterior, medial e posterior, tanto para os neurônios maduros, corados com Nissl, visando caracterizar o tipo somático mais frequente por região do córtex dorsal do *T. hispidus*, quanto para os neurônios jovens, marcados pela imunohistoquímica de DCX, para avaliar quantitativamente a migração.

Estudando as células de soma ovalado coradas com Nissl (Fig.18 A) encontramos valores médios crescentes ao longo das regiões, na região anterior a média encontrada foi de $122,3 \pm 4,02$, na região medial $136,9 \pm 2,94$ e na região posterior $137,8 \pm 4,59$. Houveram diferenças, quando comparadas as áreas anterior e medial ($p=0,0031$) e anterior e posterior ($p=0,0129$).

Figura 18- Comparação quanto a forma do soma neural e a região do córtex dorsal avaliada. A e D- Gráfico das células de soma ovalado, coradas com Nissl (A) e imunohistoquímica de DCX (D). B e E- Gráfico das células de soma piramidal alongado, coradas segundo o protocolo de

Nissl (B) e por imunohistoquímica de DCX (E). C e F- Gráfico das células de soma piramidal, Nissl em C e DCX em F. N=6, * representando diferença significativa encontrada por Teste t.



Já para as células jovens (Fig.18 D), os valores médios foram próximos entre as regiões anterior e medial ($3,25 \pm 0,39$ e $3,68 \pm 0,34$, médias respectivas), não havendo diferença entre eles ($p=0,4155$) e decrescente na região posterior, com média $0,63 \pm 0,09$, com diferença encontrada quando comparada às outras áreas ($p<0,0001$).

O tipo somático piramidal alongado apresentou valores médios maiores que os encontrados para o tipo ovalado, na análise das formas somáticas corados com Nissl (Fig.18 B). Houve um crescimento entre as regiões, a anterior com média $91,02 \pm 2,84$, seguida pela medial, $132,5 \pm 2$ e a posterior com média iguala a $199,3 \pm 5,34$, havendo diferença entre todas elas ($p<0,0001$).

Todavia, a análise do mesmo tipo somático, marcado por imunohistoquímica de DCX (Fig.18 E), mostrou valores decrescentes entre as regiões. Para anterior o valor médio de somas marcados foi $7,35 \pm 0,92$, muito próximo do valor obtido na análise da região medial, $7,53 \pm 0,65$ (não havendo diferença entre elas, $p=0,8679$), reduzindo para $4,79 \pm 0,59$ na região posterior, que apresentou diferença na comparação com as duas outras regiões (anterior e posterior, $p=0,0182$; medial e posterior, $p=0,0031$).

O tipo somático piramidal apresentou as menores médias, em todas as regiões e em ambas as marcações, confirmando nossos resultados de

comparação direta entre somas corados com Nissl e somas marcados por imunohistoquímica de DCX no córtex dorsal.

Analisando os neurônios de soma piramidal maduros (Nissl) (Fig.18 C), encontramos valores aproximados para todas as regiões (anterior, $6,92 \pm 0,46$; medial, $6,4 \pm 0,36$ e posterior, $5,94 \pm 0,22$). Não houve diferença entre elas quando comparadas as regiões anterior e medial ($p=0,3696$) entre as regiões anterior e posterior ($p=0,0504$) e quando comparadas as regiões medial e posterior o ($p=0,3398$).

Analisando os somas marcados por DCX (Fig.18 F), tivemos valores decrescentes, sendo na região anterior a média encontrada foi de $1,1 \pm 0,15$, valor próximo ao encontrado para a região medial, $0,99 \pm 0,11$, não havendo diferença entre elas ($p=0,5556$) e média de $0,63 \pm 0,09$ na região posterior, com diferença significativa se comparado as demais regiões (com a anterior $p=0,0072$ e com a medial o $p=0,018$).

Os resultados obtidos na análise da evolução de frequência somática demonstram um aumento da frequência de neurônios maduros de soma ovalado e piramidal alongado ao longo das regiões (Fig. 18 A e B) confirmam os dados encontrados na análise anterior (Fig. 15) em que dos somas neuronais corados com Nissl, os tipos somáticos ovalado e piramidal alongado se mostraram muito mais frequentes que o tipo piramidal, demonstrando uma grande diferença da morfologia somática encontrada no neocórtex de mamíferos, tal resultado sugere os tipos somáticos neuronais característicos do córtex dorsal no *Tropidurus hispidus* sejam o ovalado e o piramidal alongado.

Já na análise dos neurônios jovens marcados por imunohistoquímica de DCX, tivemos que o tipo somático mais frequente foi o piramidal alongado, apesar do decréscimo significativo entre as regiões medial e posterior (Fig. 18 D, E e F), corroborando com o resultado da análise anterior (Fig. 15) em que os tipos somáticos ovalados e piramidais apresentaram médias de frequência extremamente baixas.

Além disso a análise da frequência de neurônios jovens ao longo das regiões do córtex dorsal, revelam um decréscimo entre as regiões medial e

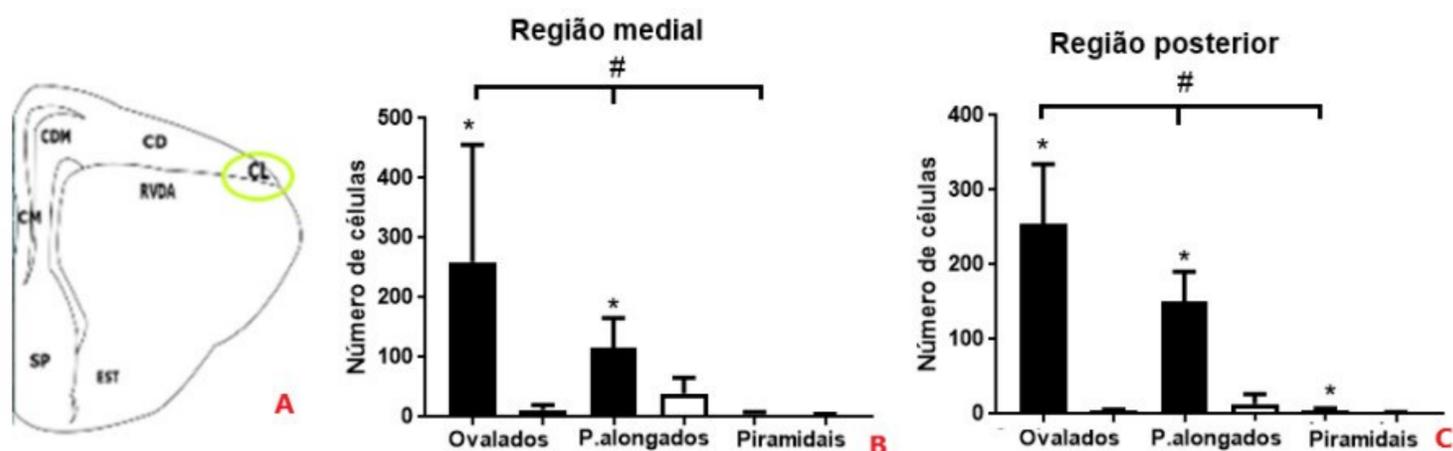
posterior para todos os tipos somáticos, confirmando que o córtex dorsal é rota de passagem da migração radial encontrada no estudo de Pimentel (2014).

4.5. Análise da morfologia somática neuronal, encontrado no córtex lateral

No córtex lateral estudamos a estrutura celular encontrada apenas nas regiões medial e posterior, tendo como base os resultados do nosso estudo de área e perímetro das regiões corticais e não corticais, onde observamos que o córtex lateral é o último córtex a aparecer no telencéfalo desse animal, sendo encontrado apenas a partir da região medial. Tal região cortical dos répteis é comparada pelas teorias evolutivas, ao núcleo piriforme de mamíferos (SANTOS, 2010). Foram analisados os tipos somáticos neuronais encontrados ao longo de todas as regiões no córtex lateral, para tornar possível comparar de acordo com a morfologia somática essas regiões e caracterizar o córtex lateral do *T. hispidus*.

Analisando as células marcadas com Nissl, na região medial (Fig.19, B), vimos que os neurônios de soma ovalado são mais constantes (média $259,7 \pm 16,67$) os de soma piramidal alongado ficaram abaixo (média $116,4 \pm 4,24$) e os neurônios de soma piramidal permaneceram como tipo somático menos encontrado (média $4,428 \pm 0,34$) a diferença entre todos foi significativa ($p < 0,0001$).

Figura 19- Desenho esquemático mostrando as estruturas observadas com o córtex lateral em destaque. Seguido pelos gráficos de neurônios marcados com Nissl (colunas pretas) e DCX (colunas brancas) de cada forma de soma celular encontrados nas regiões do córtex lateral. B- Gráfico da região anterior do córtex lateral. C- Gráfico da região medial do córtex lateral. D- Gráfico da região posterior do córtex lateral. N=6, * e # $p > 0,0001$ Teste t, * indicam diferença entre Nissl e DCX e # indicam diferença entre os tipos de soma neuronal.



Nos dados obtidos na imunohistoquímica de DCX, o tipo ovalado teve média de $12,39 \pm 1,29$, piramidais alongados $39,87 \pm 4,15$ e piramidais $3,395 \pm 0,31$ ($p < 0,0001$). A diferença encontrada entre o tipo somático piramidal marcado com Nissl e o com DCX nessa região, não foi significativa ($p = 0,1304$).

Na região posterior do córtex lateral (Fig.19 C), nas células marcadas com Nissl houve um aumento na média dos neurônios de soma piramidal alongado (média $151,0 \pm 3,03$) e manteve-se os neurônios de soma ovalados com média de $254,3 \pm 6,21$ (muito próximo ao valor encontrado na região medial, o que mostra estabilidade desse tipo celular entre as regiões) assim como o tipo somático piramidal que conservou o valor de média em $4,429 \pm 0,27$, havendo diferença entre eles ($p < 0,0001$).

No córtex lateral, os valores médios de DCX, aumentaram em todas as formas de soma neuronal. Na região posterior (Fig.19 C) encontramos o tipo ovalado com média igual a $4 \pm 0,63$, piramidais alongados, $13,5 \pm 3,77$ e piramidais, com média $1,41 \pm 0,31$ ($p < 0,0001$) assim como a diferença entre piramidais Nissl e DCX dessa região ($p = 0,0040$).

O córtex lateral de répteis é comparado ao núcleo piriforme de mamíferos (SANTOS, 2010), que se inicia no bulbo olfatório, se estende até a amígdala e inclui as regiões estriadas (BUTLER *et al.*, 2005) regiões mais associadas a projeções e não à soma neural como visto nesse estudo (Fig. 19). Diferente das outras regiões corticais por falta de dados na literatura acerca da morfologia somática neuronal encontrada no núcleo piriforme de mamíferos, a comparação entre essa região e o córtex lateral do *Tropidurus hispidus* foi feita com base nas rotas de migração que passam por essa região, o estudo de Carvalho Pimentel (2014) tenha comprova a migração celular radial seguindo pelo córtex lateral, direcionada para as superfícies laterais do núcleo esférico e complexo amigdalóide, mostrando que existe semelhança entre as duas regiões corticais consideradas homólogas.

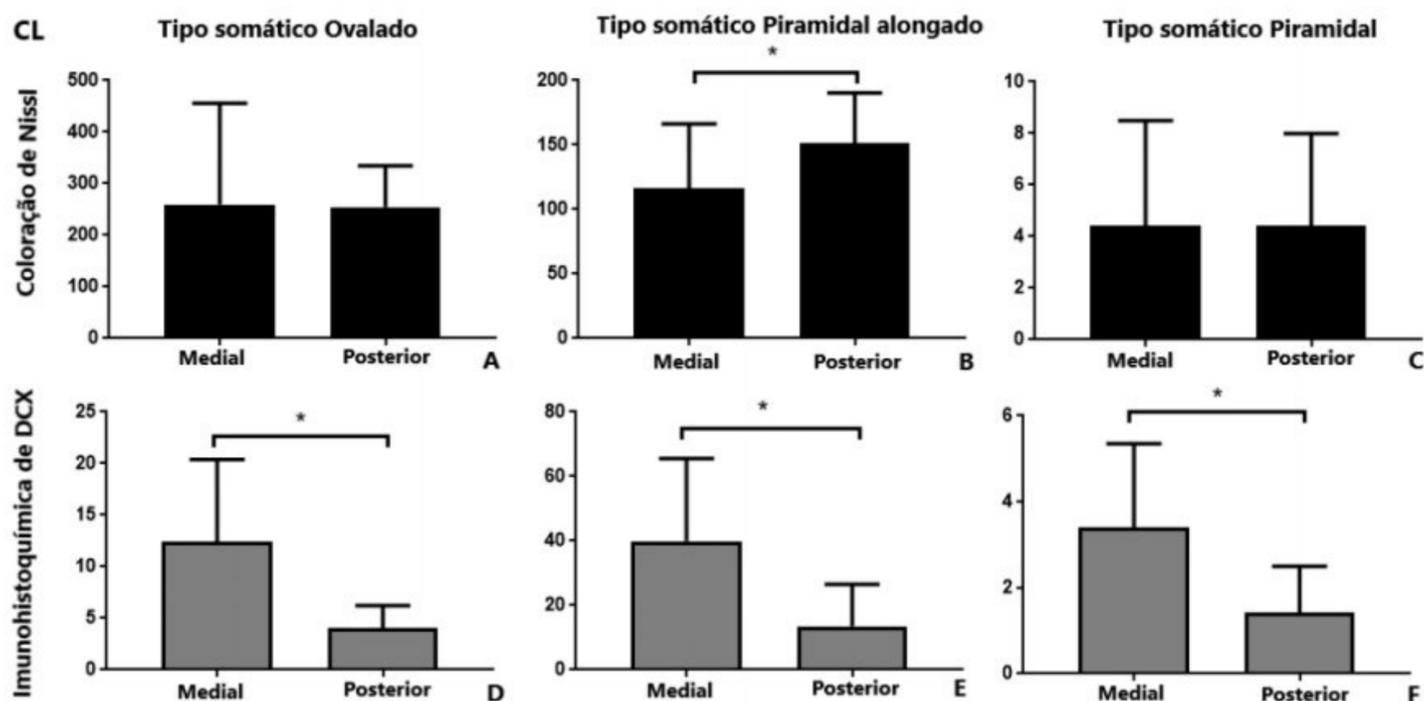
4.5.1. Análise do padrão de migração celular no córtex lateral

O córtex lateral se posiciona próximo ao sulco lateral do ventrículo, sendo assim como as outras áreas corticais passagem para a migração radial,

que nesse caso se dirige para ao complexo amigdalóide e para o núcleo esférico (PIMENTEL, 2014), para quantificar essa migração avaliamos as frequências dos tipos somáticos ao longo das regiões anterior, medial e posterior, tanto para os neurônios maduros, corados com Nissl, visando caracterizar o tipo somático mais frequente por região do córtex lateral do *T. hispidus*, quanto para os neurônios jovens, marcados pela imunohistoquímica de DCX, para avaliar quantitativamente a migração.

Para o tipo somático ovalado corados com Nissl (Fig. 20 A), a média encontrada na região medial foi $254,3 \pm 16,67$, valor próximo ao encontrado para a região posterior, $254,3 \pm 6,21$, não havendo diferença entre elas ($p= 0,7442$). Já para as células jovens (Fig. 20 D), o valor médio encontrado para as regiões foi decrescente, para a região medial, ($12,39 \pm 1,29$), enquanto que na região posterior a média foi de $4 \pm 0,63$, havendo diferença entre elas ($p=0,0008$).

Figura 20- Comparação quanto a forma do soma neural e a região do córtex lateral avaliada. A e D- Gráfico das células de soma ovalado, coradas com Nissl (A) e imunohistoquímica de DCX (D). B e E- Gráfico das células de soma piramidal alongado, coradas segundo o protocolo de Nissl (B) e por imunohistoquímica de DCX (E). C e F- Gráfico das células de soma piramidal, Nissl em C e DCX em F. N=6, * representando diferença significativa encontrada por Teste t.



O tipo somático piramidal alongado se mostrou crescente na coloração de Nissl (Fig. 20 B), com médias medial ($116,4 \pm 4,24$) e posterior ($151 \pm 3,03$), havendo diferença entre elas ($p<0,0001$). Todavia, quando analisados em DCX (Fig. 20 E) os neurônios de soma piramidal alongado encontrados no córtex lateral decresceram ao longo das regiões. Para a medial, o valor encontrado foi

de $39,87 \pm 4,15$ enquanto que para posterior, a média foi de $13,5 \pm 3,77$, havendo diferença entre elas ($p=0,0013$).

Analisando o tipo somático piramidal, os tipos somáticos corados com Nissl (Fig. 20 C) tiveram valores aproximados e sem diferença relevante entre as regiões (médias: medial – $4,42 \pm 0,34$ e posterior – $4,42 \pm 0,27$, $p=0,9981$). Já a análise das células marcadas por DCX (Fig. 20 F) tiveram valores médios distintos, mas decrescentes, a média encontrada para a região medial foi de $3,39 \pm 0,31$, enquanto que para a região posterior foi de $1,41 \pm 0,31$, com diferença ($p=0,0017$).

Os dados obtidos na análise da evolução de frequência somática de neurônios maduros (corados com Nissl) demonstram um leve decréscimo na frequência de neurônios de soma ovalado e piramidal ao longo das regiões (Fig. 20 A e B) e um pequeno crescimento na frequência de neurônios de soma piramidal alongado, confirmando os dados encontrados na análise anterior (Fig. 19) em que dos somas neuronais corados com Nissl, os tipos somáticos ovalado e piramidal alongado se mostraram muito mais frequentes que o tipo piramidal. Ainda a partir desse resultado é possível sugerir que os tipos somáticos ovalado e piramidal alongado representem a morfologia somática neuronal característica do córtex lateral no *Tropidurus hispidus*.

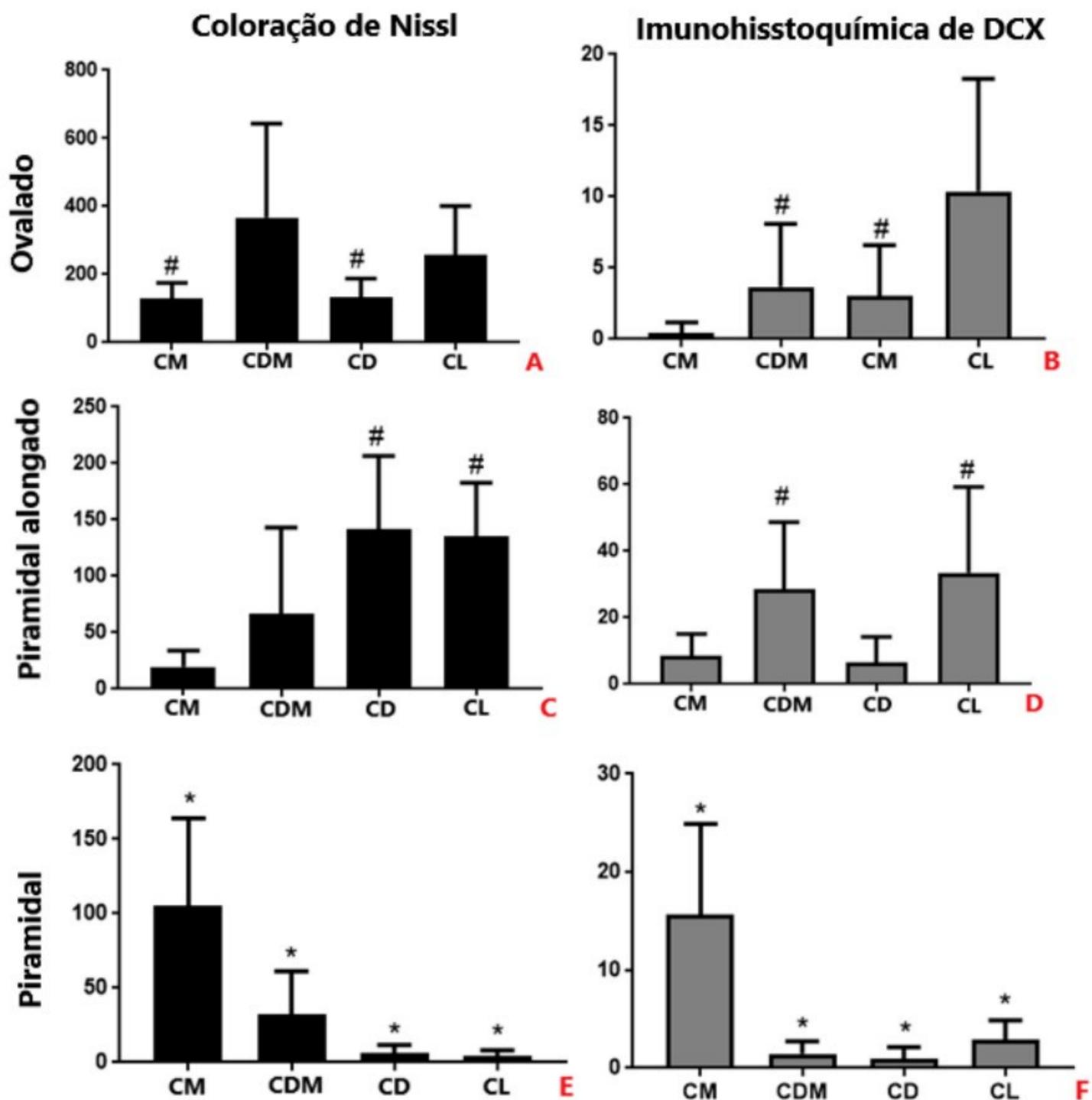
Já na análise dos neurônios jovens marcados por imunohistoquímica de DCX, tivemos que o tipo somático mais frequente foi o piramidal alongado (Fig. 20 D, E e F), corroborando com o resultado da análise anterior (Fig. 19) em que os tipos somáticos ovalados e piramidais apresentaram médias de frequência extremamente baixas. Além disso essa análise demonstrou frequências decrescentes entre as regiões medial e posterior em todos os tipos somáticos analisados, confirmando a teoria de que as células jovens estão migrando para outras regiões e não se mantendo no córtex lateral.

4.6. Análise comparativa de todas as regiões corticais

Para ratificar as análises anteriores, comparamos as regiões corticais quanto ao tipo somático neural encontrado e a marcação utilizada. Para o tipo

somático ovalado, corado sob protocolo de Nissl (Fig.21 A), o córtex com maior média encontrada foi o dorsomedial ($367,1 \pm 2,17$), seguido pelo córtex lateral ($256,8 \pm 8,24$), córtex dorsal ($133,3 \pm 2,17$), por último o córtex medial ($130,4 \pm 1,79$). Todas as comparações apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$), com exceção da comparação entre o córtex medial e o dorsal ($p = 0,3184$).

Figura 21- Gráficos comparando por área cortical encontrada o tipo somático e a marcação utilizada. A e B- Gráfico das células de soma ovalado, coradas com Nissl (A) e imunohistoquímica de DCX (B). C e D- Gráfico das células de soma piramidal alongado, coradas segundo o protocolo de Nissl (C) e por imunohistoquímica de DCX (D). E e F- Gráfico das células de soma piramidal, Nissl em E e DCX em F. N=6, $p < 0,0001$, * representando diferença significativa encontrada por Teste t, e # representando que não houve diferença significativa apenas entre as regiões marcadas



Fazendo a análise do mesmo tipo somático, só que a marcação de células jovens (Fig. 21 B), o córtex que apresentou maior valor de média foi o

lateral, com $10,38 \pm 1,11$, seguido pelo dorsomedial ($3,67 \pm 0,3113$) com valor aproximado do encontrado para o córtex dorsal ($3,055 \pm 0,19$), não havendo diferença entre eles ($p=0,0767$); o córtex com menor média encontrada foi o medial ($0,41 \pm 0,04$). A comparação entre todas as outras regiões se mostrou significativa ($p<0,0001$).

Analisando as células de soma piramidal alongado, estas se mostraram mais frequentes no córtex dorsal na coloração de Nissl (Fig. 21 C), com média $141,6 \pm 2,58$ seguido pelo córtex lateral ($135,4 \pm 2,71$); não havendo diferença significativa entre eles ($p=0,1376$). Em sequência temos o córtex dorsomedial ($67,06 \pm 5,05$) e por fim o córtex medial, com a menor média encontrada ($19,96 \pm 0,57$). A diferença nos valores encontradas para as demais regiões foi significativa ($p<0,0001$).

As células jovens de soma piramidal alongado (Fig.21 D) foram mais frequentes no córtex lateral ($33,54 \pm 3,64$), com valor próximo ao encontrado para o córtex dorsomedial ($28,45 \pm 1,79$), não havendo diferença entre eles ($p=0,1654$). O córtex medial ($8,49 \pm 0,41$) foi seguido pelo dorsal ($6,61 \pm 0,41$), havendo diferença ($p<0,0001$), quando comparados os córtex medial e dorsomedial, medial e lateral, dorsomedial e dorsal, e dorsal e lateral. A comparação entre o córtex medial e o dorsal teve $p=0,0017$.

Para o tipo somático piramidal, os valores médios encontrados foram bem distintos para ambas as marcações. Em Nissl (Fig.21 E), o córtex medial apresentou a maior média ($105,5 \pm 2,33$), seguido pelo dorsomedial ($32,56 \pm 1,91$), dorsal ($6,40 \pm 0,21$) e lateral ($4,42 \pm 0,21$). Houve diferença entre todas as comparações corticais ($p<0,0001$).

O mesmo foi visto nas células marcadas com DCX (Fig.21 F), com o córtex medial com maior média encontrada ($15,65 \pm 0,57$), córtex lateral ($2,92 \pm 0,27$) dorsomedial ($1,48 \pm 0,11$) e por último o córtex dorsal ($0,9 \pm 0,06$). A diferença entre as áreas corticais estudadas para essa marcação no tipo somático piramidal também foi significativa ($p<0,0001$).

Os dados referentes às células jovens, geradas por neurogênese pós-natal (marcadas por DCX), para todas as regiões teve valores médios de

frequência significativamente menores que os vistos nos neurônios de período embrionário (corados com Nissl), justificado pelo fato de que a imunohistoquímica de DCX marca somente as células formadas no exato momento da morte do animal.

Os valores encontrados com essa marcação para todas regiões corticais demonstraram que a maior média encontrada, apesar de baixa é sempre a dos neurônios de soma piramidal alongado (resultado encontrado na análise das regiões corticais dorsomedial, dorsal e lateral) ou piramidal (visto no córtex medial). Sugerindo maior neurogênese pós-natal destes tipos somáticos neuronais em lagarto *Tropidurus hispidus*. Tal análise traz pela primeira vez uma caracterização numérica baseada na frequência e morfologia do soma neuronal tendo em vista que nos estudos anteriores (MARCHIORO *et al.*, 2012; MARCHIORO *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2017 & PIMENTEL, 2014) acerca da neurogênese pós-natal desse animal tinham como base marcadores que permitiam caracterizar o neurônio de acordo com suas projeções.

Já os neurônios maduros (corados sob protocolo de Nissl) iniciaram seguindo um ranking de ovalados, piramidais e piramidais alongados em todas as regiões do córtex medial até a porção anterior do córtex dorsomedial a partir desse ponto o tipo somático piramidal alongado supera em frequência o tipo piramidal e permanece assim até a região posterior do córtex lateral, com exceção apenas da região posterior do córtex dorsal onde piramidais alongados superam o tipo somático ovalado. Assim como na análise de neurônios jovens esse estudo é o primeiro a caracterizar quantitativamente os tipos somáticos mais frequentes, considerados característicos de cada região tendo como base a morfologia somática. Os estudos anteriores que caracterizam os tipos celulares encontrados nas regiões corticais do *Tropidurus hispidus*, têm como base também as projeções neuronais (PIMENTEL *et al.*, 2010; SANTOS, 2010 & SANTOS, 2016).

5. CONCLUSÃO

- Na análise anatômica, nossos resultados afirmam uma maior estabilidade das regiões corticais e maiores oscilações de área e perímetro nas regiões não corticais, tendo em vista que a delas maioria são áreas de transição.
- Na análise da morfologia somática neuronal corada com Nissl os tipos somáticos mais frequentes foram ovalado e piramidal alongado. Enquanto que as células jovens foram mais frequentes de somas piramidal alongado e piramidal.
- Foi encontrado um decréscimo suave ao longo das regiões anterior, medial e posterior na análise das células jovens, comprovando a migração celular.
- Comparando de acordo com morfologia somática neuronal as regiões corticais do *T. hispidus* e as regiões homólogas de mamíferos:
 - ✓ O córtex medial do *T. hispidus* apresentou semelhanças com o giro denteado de mamíferos.
 - ✓ O córtex dorsomedial do *T. hispidus* apresentou diferenças da área 3 do corno de Ammon de mamíferos.
 - ✓ O córtex dorsal do *T. hispidus* apresentou diferenças do neocórtex de mamíferos.
 - ✓ O córtex lateral *T. hispidus* é rota de migração celular dirigida para as mesmas regiões que o núcleo piriforme de mamíferos emite projeções.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aboitiz, F.; Montiel, J.; Morales, D. and Concha, M. Evolutionary divergence of the reptilian and the mammalian brains: considerations on connectivity and development. *Brain Research Reviews* 39: 141–153. 2002.

Balthazart, J.; Charlier, T. D.; Barker, J. M.; Yamamura, T. and Ball, G. F. Sex steroid-induced neuroplasticity and behavioral activation in birds. *European Journal of Neuroscience*, 32: 2116–32. 2010.

Bruce, L. and Neary, T. The limbic system of tetrapods: A comparative analysis of cortical and amygdalar populations. *Brain, Behavior and Evolution*, 46: 224-234. 1995.

Butler, A. B. and Hodos, W. *Comparative vertebrate neuroanatomy: evolution and adaptation*, 2. Ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Hoboken. 2005.

Castro, E. R. and Galetti, M. Frugivoria e Dispersão de Sementes pelo Lagarto Teiú *Tupinambis Merianae* (Reptilia: Teiidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*. Volume 44(6):91-97, 2004.

Clark, S. L. and Ranson, S. W. *Anatomia del sistema nervioso*. México: Editorial Iternamericana, S.A, 1968.

De La Iglesia, J.A.L. and Lopez-Garcia, C. A Golgi study of the principal projection neurons of the medial cortex of the lizard *Podarcis hispanica*. *The Journal of comparative neurology*. 385 (4): 528–564, 1997.

Delgado-Gonzalez, F.J.; Gonzalez-Granero, S.; Trujillo-Trujillo, C.M.; García-Verdugo, J.M. and Damas-Hernandez, M.C. Study of adult neurogenesis in the *Gallotia galloti* lizard during different seasons. *Brain Research*, 1390: 50–8, 2011.

Díaz-Uriarte R. Anti-predator behaviour changes following an aggressive encounter in the lizards *Tropidurus hispidus*. *The Royal Society*, 266: 2457-64, 1999.

Edinger, L. The Relations of Comparative Anatomy to Comparative Psychology. The journal of Comparative Neurology and Psychology. XVIII, 5, 437- 457, 1908.

Ernst, A.; Alkass, K.; Bernard, S. Salehpour, M.; Perl, S.; Tisdale, J.; Possnert, G.; Druid, H and Frisé, J.I. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, 156 (5): 1072–83, 2014.

Faris, S.M. Evolution of complex higher brain centers and behaviors: behavioral correlates of mushroom body elaboration in insects. *Brain, Behavior and Evolution* 82 (1): 9-18, 2013.

Font, E. Desfilis, E.; Pérez-Cañellas, M.M. and García-Verdugo, J.M. Neurogenesis and Neuronal Regeneration in the Adult Reptilian Brain. *Brain, Behavior and Evolution*, 58(5): 276-295, 2001.

Gage, F.H. Neurogenesis in the adult brain. *The Journal of Neuroscience*, 22(3): 612-13. Review, 2002.

Hildebrand, M. and Goslow, G. *Análise da estrutura dos vertebrados*, 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

Hoffman, R.A. The Epiphyseal Complex in Fish and Reptiles. *American Zoologist* 1970; 10 (2): 191-99.

Kandel, E. Schwartz, J and Jessell, T. *Principles of neural science*, 4. Ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

Kardong, K.L. *Vertebrados: Anatomia comparada, função e evolução*. São Paulo: Roca, 2010.

Karten, H.J. Evolutionary developmental biology meets the brain: the origins of mammalian cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7): 2800-04. 1997.

Kierman, J.A. *Neuroanatomia humana de Barr*, 7 Ed. Manole, São Paulo, 2003.

Kizil, C.; Kaslin, J.; Kroehne, V. and Brand, M. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Developmental neurobiology*, 72 (3): 429–61, 2012.

Krauss, S.; Johansen, T.; Korzh, V. and Fjose, A. Expression of the zebrafish paired box gene *pax[zf-b]* during early neurogenesis. *Development*, 113, 1193-206, 1991.

Lent, R. *Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência*. São Paulo: Atheneu; 1. Ed. 2005.

Liem, K.F.; Bemis, W.E.; Walker Jr, W.F. and Grande, L. *Anatomia funcional dos vertebrados: uma perspectiva evolutiva*. São Paulo: Cengage Learning, 2013.

Lima, M.M.; Freire, M.A.M.; de Carvalho Pimentel, H.; Lins, L.C.R.F.; Medeiros K.A.A.L.; Viola, G.G.; Santos, J.R. and Marchioro, M. Characterization of NADPH Diaphorase- and Doublecortin- Positive Neurons in the Lizard. *Brain, Behavior and Evolution*, 88:222-234, 2017.

Marchioro, M.; Pimentel, H.C.; Santos, M.L.; Lima, M.M.; Santos, J.R.; Martí, X.P.; Molowny, A. and Garcia, C.L. Low temperature-acclimation impairs cellular migration in the adult cerebral cortex of the tropical lizard, *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825) (Squamata: Tropiduridae). *Archives Italiennes de Biologie*, 150(1):22-30. 2012.

Marchioro, M.; Nunes, J.M.; Ramalho, A.M.; Molowny, A.; Perez-Martinez, E.; Ponsoda, X. and Lopez-Garcia, C. Postnatal neurogenesis in the medial cortex of the tropical lizard *Tropidurus hispidus*. *Neuroscience*, 134 (2): 407–13, 2005.

Mendes, F.; Felício, A.; Diniz, C. and Sosthenes, M. Alteração mastigatória, ambiente enriquecido e envelhecimento: estudos estereológicos de CA1 do hipocampo de camundongos suíços albinos. *Revista Pan-Amazônica de Saúde, Ananindeua*, 7 (4): 31-40, 2016.

Molowny, A.; Nacher, J. and Lopez-Garcia, C. Reactive neurogenesis during regeneration of the lesioned medial cerebral cortex of lizards. *Neuroscience*, 68 (3): 823–36, 1995.

Naumann, R.; Ondracek, J.; Reiter, S.; Shein-Idelson, M. and Tosches M. Primer: The reptilian brain. *Current Biology Magazine*, 25: 301–27, 2015.

Northcutt, R.G.; Krass, J.H. The emergency and evolution of mammalian neocortex. *Trends in Neurosciences*. 18 (9):373-9,1995.

Pérez-Cañellas, M.M.; García-Verdugo, J.M. Adult neurogenesis in the telencephalon of a lizard: A [3H] thymidine autoradiographic and bromodeoxyuridine immunocytochemical study. *Developmental Brain Research*, 93 (1-2): 49–61, 1996.

Pimentel, Hugo de Carvalho, Caracterização das propriedades neuromorfológicas e proliferativas do telencéfalo do lagarto *Tropidurus hispidus*. 2014, 52. Dissertação de doutorado- Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.

Pimentel, H.; Santos, J.; Lima, M.M.; Almeida, F.; Santos, M.; Molowny, A.; Ponsoda, X.; Lopez-Garcia, C. and Marchioro, M. Structural organization of the cerebral cortex of the neotropical lizard *Tropidurus hispidus*. Cell and Tissue Research, 343: 329-30,2011.

Purves, D. Neuroscience. Sunderland, Massachusetts U.S.A: Sinauer Associates, Inc., 2004.

Rao, M.S. and Shetty, A. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. The European Journal of Neuroscience. 19(2): 234 – 46, 2004.

Rocha, C.F.D.; Bergallo, H.G.; Pombal Jr, J.P.P.; Geise, L.; Sluys, M.V.; Fernandes, R.; Caramaschi, U. Fauna de anfíbios, répteis e mamíferos do Rio de Janeiro. Sudeste do Brasil. Publicação avulsa do Museu Nacional., Rio de Janeiro, 104: 3-23. 2004.

Santana, D.O.; Caldas, F.L.S.; Santos, R.A.; Carvalho, C.B.; Freitas, E.B.; Rocha, S.M.; Noronha, M.V. and Faria, R.G. Morphometry of hatchlings of *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825) (Squamata: Tropiduridae). Herpetology notes, 4: 039-040. 2011.

Santana, D.O.; Caldas, F.L.S.; Gomes, F.A.; Santos, R.A.; Rocha, S.M.; Faria, R.G. Natural History aspects of *Tropidurus hispidus* in an area of Atlantic Forest, northeastern Brazil. Neotropical Biology and Conservation. 9(1):55-61, 2014.

Santos, José Ronaldo dos, Expressão de ZIF268 no cérebro do lagarto *Tropidurus hispidus* após exploração de um ambiente enriquecido. 2010.84. Dissertação de mestrado- Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN.

Santos, Luciano de Gois, Avaliação comportamental neurobiológica da memória do lagarto *Tropidurus hispidus* (SPIX, 1825, SQUAMATA: TROPIDURIDAE) 2016, 119. Dissertação de mestrado- Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2016.

Striedter, G.F. Evolution of the Hippocampus in Reptiles and Birds. *The Journal of Comparative Neurology*, 524(3):496-517, 2016.

Tonchev, A.B.; Yamashima, T.; Sawamoto, K.; Okano, H. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience Research*, 81 (6): 776–88, 2005.

Vieira, W.L.S.; Gonçalves, M.B.R. and Nóbrega, R.P. Predation on *Tropidurus hispidus* (Squamata: Tropiduridae) by *Lasiadora klugi* (Aranea: Theraphosidae) in the semiarid caatinga region of northeastern Brazil. *Biota Neotrop.* 12(4): 263-5, 2012.

Vitt, L.; Magnusson, W.; Pires, T.; Lima, A. Guide to the Lizards of Reserva Adolpho Duck. Central Amazonia. Manaus: Áttema Design Editorial Ltda. 1. Ed, 2008.

Winston, R.; Parker, S. O livro do corpo humano. São Paulo: Ciranda Cultural Editora. 1. Ed. 2012.

