



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

HUGO DE CARVALHO PIMENTEL

**NEURÔNIOS NADPH DIAFORASE POSITIVO NO CÓRTEX
CEREBRAL DA LAGARTIXA *Podarcis hispanica***

ARACAJU
2009

HUGO DE CARVALHO PIMENTEL

**NEURÔNIOS NADPH DIAFORASE POSITIVO NO
CÓRTEX CEREBRAL DA LAGARTIXA**
Podarcis hispanica

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Murilo Marchioro

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Lopez-García

HUGO DE CARVALHO PIMENTEL

**NEURÔNIOS NADPH DIAFORASE POSITIVO NO
CÓRTEX CEREBRAL DA LAGARTIXA**
Podarcis hispanica

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em _16_ / _06___ / _2009__.

Orientador: Prof. Dr. Murilo Marchioro

2º Examinador: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

3º Examinador: Prof. Dr. Catão Temistocles de Freitas Barbosa

PARECER

Dedicatória

A Deus;

*A Clícia que sempre me acompanhou
nessa jornada do mestrado.*

*Ao meus pais e irmã pelo apoio
recebido ao longo da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À agência de fomento – CAPES, através do convênio de Cooperação Internacional CAPES-DGU.

Ao orientador Prof. Dr. Murilo Marchioro, por ter apostado em mim. Além disso, gostaria de agradecê-lo pela orientação, confiança, presença constante em todas as fases deste meu projeto e, principalmente, por todo conhecimento que ele me passou;

A toda equipe do Laboratório de Neurobiologia Celular da Universidade de Valência (Espanha). São eles: Prof. Dr. Carlos Lopez-García (co-orientador e coordenador do referido laboratório), Prof^a. Dr^a. Assunción Molowny, Prof. Dr. Xavier Ponsoda e Gregori Alonso. Sou grato a todos eles, pelo conhecimento e atenção recebida, os quais foram decisivos na conclusão dessa dissertação;

Aos colegas do curso de pós-graduação;

Aqueles que me ajudaram direto ou indiretamente para a realização desse projeto.

RESUMO

O óxido nítrico (NO) constitui um dos mais importantes mediadores dos processos intra e extracelulares. Dentre suas funções biológicas, destaca-se seu papel de neuromodulador. Em *Podarcis hispanica*, diversos trabalhos descreveram a citoarquitetura do córtex cerebral desse animal, no entanto, nenhuma informação referente aos neurônios produtores da isoforma óxido nítrico neuronal (nNOS) nessa região telencefálica foi publicada até o presente momento. Neste trabalho, objetivou-se identificar os neurônios NADPHd/nNOS positivos no córtex cerebral do referido animal. Para tal, utilizou-se a técnica histoquímica NADPHd e imunohistoquímica frente a nNOS e Guanilil Ciclase Solúvel (sGC α 1). Os resultados demonstraram que o córtex cerebral de *P. hispanica* apresenta uma população de 1897 neurônios diaforase positivos, sendo, 1090 (57,5%) em animais jovens, 528 (27,8%) em adultos e 279 (14,7%) em senis. Entre os níveis telencefálicos, o pré-comissural, o comissural e o pós-comissural apresentaram 423 (22,3%); 459 (24,2%) e 1015 (53,5%) neurônios, respectivamente. Em relação as áreas corticais, o córtex medial (CM), dorsomedial (CDM), dorsal (CD) e lateral (CL) apresentaram 86 (4,5%), 530 (27,9%), 1243 (65,5%) e 38 (2%) neurônios, respectivamente. Nas camadas plexiformes interna e externa e camada celular foi verificado, respectivamente, 1264 (66,6%), 533 (28,1%) e 100 (5,3%) neurônios. 1737 (91,5%) neurônios NADPHd positivos foram encontrados nas regiões Timm-positivas e 160 (8,5%) nas Timm-negativas. 15 tipos morfológicos de neurônios NOS positivos foram identificados, são eles: piramidal, buquê duplo, estrelado, sarmentoso, polimorfo, ectópico vertical, multipolar, coral, granular unipolar, radial grande, horizontal bipolar, horizontal unipolar, vertical liso, esferoidal e fusiforme. Então, concluiu-se que: o córtex cerebral de *Podarcis hispanica* apresenta neurônios com atividade NADPHd, como também imunorreativos aos anticorpos anti-nNOS e sGC α 1; os neurônios NADPHd positivos são de três tipos: Tipo I, II e III; há uma diferença significativa na expressão do número de neurônios NADPHd positivos entre animais de diferentes faixas etárias e entre as áreas e camadas corticais; córtex cerebral de *P. hispanica* apresenta uma variedade de 15 morfologias de neurônios NADPHd positivos; os neurônios NADPHd positivos foram encontrados principalmente nas zonas Timm-positivas.

ABSTRACT

The nitric oxide (NO) constitutes one of the most important mediators of the processes intra and extracellular. Amongst its biological functions, there is a role of neuromodulator. In *Podarcis hispanica*, diverse research had described the citoarchitecture of the cerebral cortex of this animal, however, there isn't data published about neurons that producers neuronal nitric oxide synthetase (nNOS). The aim of this work was to identify the positive NADPHd/nNOS neurons in the cerebral cortex of *P. hispanica*. For such, it was used the histochemistry technique NADPHd and imunochemistry to nNOS and soluble Guanylyl Cyclase (sGC α 1). The results showed that the cerebral cortex of *P. hispanica* has a population of 1897 diaphorase positive neurons, being, 1090 (57,5%) in young animals, 528 (27,8%) in adults and 279 (14,7%) in age. Among the telencephalics levels, pre-comisural, comisural and post-comisural showed 423 (22,3%); 459 (24,2%) and 1015 (53,5%) neurons, respectively. In relation the cortical areas, the medial cortex (CM), dorsomedial (CDM), dorsal (CD) and lateral (CL) showed 86 (4,5%), 530 (27,9%), 1243 (65,5%) and 38 (2%) neurons, respectively. Inner and outer plexiforme layers showed, respectively, 1264 (66,6%), 533 (28,1%) and 100 (5,3%) neurons. 1737 (91,5%) NADPHd positive neurons had been found in the regions Timm-positive and 160 (8,5%) in the Timm-negative. 15 types of morphological NOS positive neurons were identified: piramidal, bouquet double, deep stellate, sarmentous, polymorphous, ectopic vertical multipolar, coral, granular unipolar, large radial, horizontal bipolar, horizontal unipolar, smooth vertical, spheroidal and fusiforme. In conclusion, the cerebral cortex of *Podarcis hispanica* showed neurons with NADPHd activity, as well as immunoreactive to the anti-nNOS and sGC α 1 antibodies; NADPHd positive neurons are of three types: Type I, II and III; There is a significant difference in the number of NADPHd positive neurons among animals of different ages and among the cortical areas and layers and were found mainly in the Timm-positive regions.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – Avidina biotina peroxidase
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA - Análise de variância
BO – Bulbo olfatório
CaM – Calmodulina
CC – Camada celular
CD – Córtex dorsal
CDM – Córtex dorso medial
CL - Córtex lateral
CM – Córtex medial
cNOS – Isoforma constitutiva da óxido nítrico sintase
DAB - Diaminobenzidina
ep – Epêndimo
eNOS – Isoforma endotelial da óxido nítrico sintase
GA - glutaraldeído
GC – Guanilato ciclase
GMPc - Guanosina-3',5'-monofosfato cíclico
GTP - Guanosina-5'-trifosfato
iNOS – Isoforma induzível da óxido nítrico sintase
LTP – Potenciais de longa duração
NADPHd - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase
Neo-Timm – técnica utilizada para a detecção do zinco sináptico
NBT – Nitroblue tetrazolium
NMDA – N-metil-D-aspartato
NO - Óxido nítrico
nNOS - Isoforma neuronal da óxido nítrico sintase
pe – Plexiforme externa
PFA - paraformaldeído
pi – Plexiforme interna
pm – Pia mãe
PSD – Proteína de densidade pós-sináptica

sGC – solúvel guanilato ciclase

sGC α – solúvel guanilato ciclase tipo α

sGC β – solúvel guanilato ciclase tipo β

SNC – Sistema nervoso central

SVZ – subventricular

TF - Tampão fosfato

TFS – Tampão fosfato salino

Tris - Tris-[Hidroximetil] aminometano

Timm – Técnica histoquímica de detecção do zinco e de outros metais pesados

TX – Triton X-100 0,3%

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 O Óxido Nítrico.....	15
2.1.1 Biosíntese e neurotransmissão do óxido nítrico	20
2.1.2 Regulação da atividade da enzima nNOS.....	22
2.2 O Córtex Cerebral de Répteis.....	22
3 OBJETIVOS	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Animais.....	30
4.2 Perfusão e Histologia.....	30
4.3 Histoquímica para NADPH diaforase	32
4.4 Detecção histoquímica do zinco vesicular: revelador de Danscher (Neo-Timm)	32
4.5 Imunohistoquímica frente a nNOS e GC.....	33
4.6 Registro das imagens, reconstrução neuronal e contagem dos neurônios NADPHd positivos.....	35
4.7 Tipos de neurônios NADPHd positivos.....	37
4.8 Estatística.....	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Análise quantitativa.....	39
5.1.1 Faixa etária.....	39
5.1.2 Nível telencefálico.....	40
5.1.3 Área cortical.....	41
5.1.4 Camada cortical.....	43
5.1.5 Neurônios NADPHd / Regiões Timm-positivas e Timm-negativas.....	44
5.2 Histoquímica NADPHd	45
5.2.1 Distribuição dos neurônios NADPHd positivos.....	46
5.2.2 Tipos de neurônios NADPHd positivos.....	47
5.2.3 Glíias radiais.....	51
5.2.4 Morfologias dos neurônios NADPHd positivos.....	53
5.2.5 Neurônios NADPHd positivos e as regiões Timm-positivas e Timm-negativas.....	61
5.3 Imunohistoquímica frente a nNOS e sGC α	63
6 DISCUSSÃO	65
6.1 Imunohistoquímica frente a nNOS e GC.....	71

7 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

Até a década de 80 acreditava-se que o óxido nítrico (NO) era apenas um gás com potencialidade tóxica, no entanto, a partir de descobertas realizadas no início dessa década foi possível evidenciar que o NO era um importante elemento biológico. O interesse pelas funções biológicas desse composto se deu com o desfecho, praticamente simultâneo, de três linhas de pesquisa, absolutamente independentes, que culminou com um ponto em comum, a descoberta do envolvimento desta molécula nos processos biológicos. Primeiramente descobriu-se que ela estava envolvida no relaxamento vascular e participava na proteção do endotélio (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980). Trabalhos seguintes verificaram que esse gás constituía um importante mediador citotóxico de células imunes ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais (HIBBS JR et al., 1988; MARLETTA et al., 1988). Por fim, descobriu-se que o NO possuía, ainda, um papel neuromodulador em diversos processos biológicos do sistema nervoso (BREDT e SNYDER, 1989; KNOWLES et al., 1989; MELLA et al., 2007).

O NO no sistema nervoso difere dos neurotransmissores clássicos ou neuromoduladores uma vez que: a) O NO não é armazenado em vesículas, b) não atua com mecanismos específicos de liberação e captação, c) não necessita de receptor de membrana, penetrando por afinidade lipofílica diretamente na célula alvo, onde regula muitos sistemas enzimáticos, d) não é metabolizado por enzimas específicas, sendo degradado espontaneamente por oxidação ou por composto tais como: superóxido ou oxihemoglobina, e) tem uma vida média de segundos, enquanto que outros neurotransmissores clássicos a vida média é de apenas milisegundos (IGNARRO et al., 1989)

O NO é um neurotransmissor atípico, pois sendo um gás, quando produzido a partir do aminoácido L-arginina, difunde-se através das membranas celulares para interagir com alvos distantes de sua origem (BISHOP e ANDERSON, 2005). Sua biosíntese está vinculada a um grupo de enzimas, principalmente a óxido nítrico sintase (NOS) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase (NADPHd).

Três isoformas da enzima NOS foram descritas até o momento: a NOS endotelial (eNOS) presente na parede dos vasos sanguíneos, a NOS constitutiva (cNOS), dependente de íons cálcio e calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (iNOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (DUSSE et al., 2003; BHAT e FEINSTEIN, 2006). A isoforma constitutiva compreende, além da eNOS, a NOS neuronal (nNOS), presente em diferentes tipos neuronais. Então, para a detecção de

neurônios NOS positivo é usada a técnica histoquímica de detecção da atividade enzimática NADPH diaforase, o importante nessa técnica é que além das informações morfológicas é possível verificar, quase freqüentemente, a presença de uma marcação “golgi-like” (DÁVILA et al., 1995; SMEETS et al., 1997).

Entre as funções do NO no sistema nervoso pode-se citar: a) a autorregulação do fluxo vascular tanto periférico como central (DIAS et al., 2006), b) a ativação de fibras parassimpáticas que inervam os vasos cerebrais (IRIHURA, 1994), c) participação nos mecanismos de defesa cerebral por meio das microglias, que nessas situações expressam grandes quantidade da isoforma nNOS (WOOD, 1994; BHAT e FEINSTEIN, 2006), d) participação de processos de plasticidade neuronal, neurogênese, aprendizado e memória. Certamente, estas últimas funções do NO caracteriza-o como um neurotransmissor retrógrado, uma vez que este gás pode difundir-se desde a membrana pós-sináptica até a pré-sináptica, participando, assim, da geração de potenciais de longa duração (LTP), atribuído como o substrato neuronal de algumas formas de aprendizado e memória.

Comparando o mapa de distribuição dos neurônios reativos a nNOS com aqueles de diaforase positivos, no cérebro de mamíferos e répteis, verifica-se que os dados relativos a essa correlação ainda não estão totalmente elucidados e, no caso dos répteis, esses dados são praticamente inexistentes. Há alguns trabalhos de pesquisa que apontam neurônios imunorreativos ao anticorpo nNOS e negativo para a histoquímica NADPHd (RODRIGO, 1994). No entanto, pesquisas realizadas com mamíferos, como as de Hope et al. (1991), destacaram que todos os neurônios que apresentam atividade NADPHd também foram positivos para nNOS, identificando que a atividade NADPHd podia ser verificada também em neurônios produtores de NO e que essas técnicas histoquímicas e de imunohistoquímica são um bom instrumento para a detecção de neurônios produtores de NO.

Poucos trabalhos são dedicados ao estudo da distribuição de neurônios nitrérgicos no cérebro de répteis, e, no córtex cerebral desses animais, esses dados são ainda mais reduzidos. Alguns pesquisadores como Dávila et al. (1995) demonstraram, na lagartixa *Psammodromus algirus*, a marcação de neurônios NADPHd positivos em todas as áreas corticais; dados publicados dois anos depois também verificaram resultados semelhantes na espécie de *Gecko gecko* (STMEETS et al., 1997). Outras pesquisas realizadas com a espécie de tartaruga *Trachemys dorbigni* verificaram um aumento na expressão de neurônios NADPHd positivos após transecção do nervo ciático (PARTATA, 1999). Por fim, informações publicadas pelo grupo de pesquisa liderado por Marina Bentivoglio sugeriram que há uma correlação entre a

expressão de NOS e regeneração da cauda do lagarto da espécie *Gecko gecko*, após a amputação da mesma (CRISTINO et al., 2000 a, b, c).

Um grande número de trabalhos vem demonstrando a importância neurocientífica atribuída ao cérebro de répteis. Dividido em 3 diferentes regiões corticais (córtex medial, dorsal e lateral) e duas camadas plexiformes, a interna e a externa, o córtex cerebral dos répteis vem apresentando características bastante intrigantes, uma delas está relacionada a grande capacidade neurogenética (após uma severa lesão do córtex medial) do epêndimo cortical de uma espécie de lagartixa européia, *P. hispanica*, que permite a regeneração neuronal do seu córtex medial, isto é, a substituição de neurônios mortos (lesionados experimentalmente por 3-acetilpiridina) por novos neurônios produzidos no epêndimo (RAMIREZ et al, 1997; LOPEZ-GARCIA et al, 2002). Tratam-se de neurônios glutamatérgicos e zincérgicos muito similares aos neurônios granulares do hipocampo de mamíferos, os quais estão implicados na configuração de mapas cognitivos e memória espacial dos indivíduos. Esta atividade tem origem principalmente no “sulcus arquicorticalis” dos ventrículos laterais onde são gerados os neurônios de nova geração, a exemplo do que ocorre na zona subgranular da formação hipocampal de mamíferos. Acredita-se que este fenômeno de neurogênese pós-natal induzida por lesão cortical é único entre os vertebrados amniotas (répteis, aves e mamíferos). A neurogênese pós-natal também foi evidenciada em lagartos da espécie *Tropidurus hispidus* (MARCHIORO, 2005).

Acredita-se que o estudo de neuroanatomia dos répteis tem sido a chave para a compreensão da história evolutiva do encéfalo. Inúmeros trabalhos científicos fazem referência à homologia entre o córtex cerebral de lagartos e o hipocampo de mamíferos, dentre eles destacam-se aqueles relacionados à lagartixa *P. hispanica* que se tornou, ao longo dos últimos anos, um modelo de referência para a neuroanatomia comparada, devido o grande número de dados existentes a respeito da citoarquitetura deste animal. No entanto, desconhece-se aqueles relacionados aos neurônios NADPHd/nNOS positivos no córtex cerebral desse animal, assim como sua distribuição entre as diferentes áreas corticais. Desta forma, objetivou-se a realização deste trabalho de pesquisa com a finalidade de identificar esse tipo de neurônio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Óxido Nítrico

O NO é um gás inorgânico que apresenta um elétron desemparelhado, ou seja, é um radical livre. Por ser um gás potencialmente tóxico, o NO foi largamente estudado por químicos inorgânicos em reações na atmosfera. Na temperatura e pressão ambiente é um gás incolor, com solubilidade máxima em água de aproximadamente 2mM (FUKUTO et al., 2000).

Experimentos realizados na década de 90 demonstraram que o NO é um importante neuromodulador das funções do sistema nervoso central (SNC). A identificação das enzimas produtoras de NO foi um passo importante para a comprovação dos efeitos biológicos deste composto. Sendo assim, sua biosíntese é intermediada por um grupo de enzimas que estão presentes em neurônios nitrérgicos do SNC e periférico, tais como a óxido nítrico sintase e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase (DAWSON et al. 1991; HOPE et al. 1991). Atualmente, sabe-se que existem três isoformas conhecidas de NO, duas constitutivas e uma induzível, são elas: a eNOS, presente no endotélio, a nNOS, presente nos neurônios e a iNOS, induzida a partir de fatores específicos, como algumas citocinas (FORSTERMANN et al., 1994) (Fig. 1).

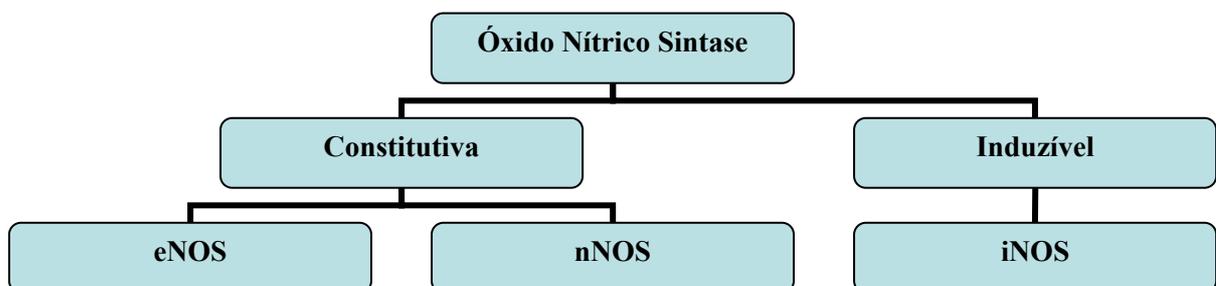


Figura 1: Isoformas da NO sintase.

Quanto às isoformas de NOS, a isoforma neuronal foi a primeira isoforma a ser identificada (BREDT et al., 1990; BREDT e SNYDER, 1990). Esta apresenta massa molecular de aproximadamente 160 kDa e apesar de ter sido descrita no tecido nervoso, pode ser encontrada em diversos outros tecidos, inclusive na célula muscular cardíaca (XU et al., 1999; BURKARD et al., 2007). A regulação da expressão de nNOS parece ser induzida por respostas neuronais à agentes físicos, químicos e biológicos, como o estresse térmico e a transecção axonal (FÖRSTERMANN, 2000).

A nNOS apresenta uma seqüência de 220 aminoácidos na extremidade N-terminal que contém um sítio de ligação chamado PDZ. Isto determina a interação desta isoforma com ligantes como, por exemplo, as proteínas de densidade pós-sinápticas (PSD, proteína de densidade pós-sináptica) PSD-95 e PSD-93 (BRENMAN et al., 1996a; BRENMAN et al., 1996b). Como os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) também se associam à PSD-95, a nNOS é provavelmente a primeira enzima ativada durante o influxo de cálcio mediado por esses receptores, durante o processo de transmissão sináptica (FÖRSTERMANN, 2000).

Nos últimos anos, o número de trabalhos a respeito da distribuição da NADPHd no cérebro de vertebrados aumentou significativamente. Uma das razões é que essa técnica histoquímica permite a visualização de uma população específica de neurônios e fibras em todo o cérebro e medula espinal. Além disso, essa técnica histoquímica permite tanto informações morfológicas como a presença de marcação “golgi-like”. Um outro fator é que a NADPHd e NOS são enzimas que estão presentes no SNC e periférico e são colocadas em neurônios nitrérgicos. Desta forma, a técnica histoquímica NADPHd tornou-se um importante instrumento para a detecção de neurônios que expressam a NOS.

Alguns trabalhos relacionados à descrição da técnica NADPHd abordam as características dos neurônios nitrérgicos marcados por ela. Na década de 90, Alonso et al. (1995) publicou dados a respeito de tais características, segundo este autor os neurônios NADPHd podem ser divididos em grupos de acordo com as características morfológicas e a intensidade de marcação de cada um deles: Tipo I, neurônios de tamanhos grandes a intermediário, que apresentam intensa coloração e muitas ramificações dendríticas; Tipo II, neurônios de tamanhos intermediários a pequeno, com mediana coloração e poucos prolongamentos dendríticos; Tipo III, neurônios pequenos que apresentam pouca coloração e quase nenhum prolongamento dendrítico.

O NO pode exercer diferentes funções de acordo com o local de síntese, quantidade produzida, tipo de isoenzima envolvida na sua liberação e microambiente onde vai atuar. Por exemplo, quando pequenas quantidades são liberadas nos terminais nervosos, o NO atua como neurotransmissor, regulando desde o relaxamento de esfíncteres no sistema gastrointestinal até a transmissão de estímulos nervosos no SNC; atua ainda em áreas que processam memória ou estímulos olfativos. Quantidades similares, porém, se liberadas pelas células endoteliais, regulam o relaxamento da musculatura lisa adjacente, possibilitando a vasodilatação. Quantidades maiores produzidas em consequência a uma cadeia de estímulos envolvem o sistema enzimático da iNOS e podem ocasionar ou ampliar processos inflamatórios em vários órgãos (SEARS et al., 2004).

Durante vários anos acreditava-se que o NO era apenas um poluente ambiental, no entanto, a partir da década de 80 descobertas científicas possibilitaram o entendimento a respeito da importância biológica desse gás. Uma das funções fisiológicas do NO foi demonstrada, inicialmente, no mecanismo de relaxamento vascular em que sugere que a sua liberação, a partir de células endoteliais, possibilita o relaxamento do vaso sanguíneo (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980).

Um dos primeiros efeitos descritos para o NO no SNC foi seu envolvimento em plasticidade neural, especificamente na geração do fenômeno de potencialização de longa duração (LTP), considerado o substrato neuronal de algumas formas de memória (SON et al., 1996). Muitas evidências demonstram que a síntese de NO é fundamental para os processos de plasticidade sináptica (SCHUMAN e MADISON, 1991), além disso, parecem demonstrar que o NO modula a liberação de neurotransmissores no cérebro (PRAST e PHILIPPU, 2001).

Pesquisas mais recentes, entretanto, têm demonstrado que o NO parece exercer influência sobre os processos de neurogênese pré e pós-natal além de está relacionado aos fenômenos de diferenciação e sobrevivência neuronal (DAWSON e DAWNSON, 1998; PACKER et al., 2003). Trabalhando com o sistema olfativo como modelo, Chen et al. (2004) observou que a enzima nNOS atua no processo de neurogênese do epitélio olfativo durante os primeiros estágios do desenvolvimento pós-natal, além disso, exerce importante influência na organização glomerular no bulbo olfativo de animais adultos. Racekova et al. (2005) estudou o papel do NO na neurogênese pós-natal no sistema migratório rostral de ratos, e mostrou que a marcação de neurônios diaforase positivos (uma indicação de ativação da NOS) aumenta com a idade do animal, como também verificou que o NO pode está envolvido no processo de neurogênese. No cerebelo, Ciani et al. (2006) demonstrou que o bloqueio farmacológico da produção de NO durante as três primeiras semanas de vida, resulta em um aumento da proliferação neuronal. Finalmente, Romero-Grimaldi et al. (2008) estudou os efeitos ontogenéticos do NO sobre precursores neuronais na zona subventricular (SVZ) e no bulbo olfativo (BO) de camundongos recém natos (P7) e adultos (P>60). Notaram que a inibição da NOS pelo L-NAME não afeta a proliferação celular na SVZ ou no BO de recém natos mas aumenta o número de células proliferativas dos adultos nas duas regiões.

A distribuição de neurônios produtores de NOS é ampla e não se assemelha com a de nenhum dos neurotransmissores conhecidos. Os primeiros trabalhos realizados em animais de laboratório descrevem uma concentração máxima desses neurônios no cerebelo, bulbos olfatórios e hipotálamo; concentrações moderadas no córtex cerebral, estriado e hipocampo e uma mínima concentração no sistema visual e na medula espinhal (SNYDER e BREDT,

1992). Posteriores estudos realizados com humanos identificaram uma maior atividade do nNOS no sistema límbico, no córtex cerebral, no estriado e no cérebro posterior, enquanto que as zonas com menor atividade se localizavam no tálamo, áreas corticais e no núcleo denteado do cerebelo (BLUM-DEGEN et al., 1999). Estes mesmos pesquisadores constataram que a atividade enzimática do NOS no cérebro humano, diferentemente de outros mamíferos, é estável durante o processo de envelhecimento e não se relaciona com o declive cognitivo (BLUM-DEGEN et al., 1999). Sobrey e Faraci (2001) constataram que a presença da enzima sintetizadora de NO em células gliais, astrócitos e microglías se relacionam com a estimulação do glutamato e com as funções macrofágicas, respectivamente.

A distribuição de neurônios NO positivo em algumas regiões do sistema SNC de mamíferos pode ser caracterizada da seguinte forma:

- a) Córtex cerebral: Somente 2% dos neurônios do córtex cerebral (todos eles interneurônios) (VINCENT e KIMURA, 1992) e alguns interneurônios córtico-subcorticais apresentam atividade NOS. Os neurônios produtores de NO são os mais antigos do córtex, o que sugere que a atividade dos receptores do tipo NMDA e do NO pode exercer um papel relevante no desenvolvimento do córtex cerebral e no restante das estruturas do sistema nervoso. Em embriões de roedores constatou-se um aumento da expressão do nNOS durante as etapas de diferenciação e estabelecimento de sinapses na medula espinhal, sistema visual e no sistema olfatório, os quais diminuíram após o nascimento (YUN et al., 1997). A difusão de NO parece que atua como uma sinal para a formação / eliminação de sinapses durante os processos de desenvolvimento e diferenciação celular que ocorrem no SNC (CONTESTABILE, 2000).
- b) Hipocampo: A estimulação repetitiva de fibras pré-sinápticas por NO possibilita a geração do fenômeno de potencialização de longa duração, principal substrato do aprendizado e da memória. Pesquisas realizadas com ratos geneticamente modificados que não expressam nNOS e eNOS parecem demonstrar que esses animais não realizam transmissão retrógrada glutamatérgica no hipocampo e apresentam déficits de aprendizado e memória (PRAST e PHILIPPU, 2001). Por outro lado, a neurogênese no hipocampo adulto também está relacionada com a atividade do glutamato; a produção de novos neurônios é iniciada em condições mínima de atividade deste neurotransmissor e conseqüentemente de NO (CAMERON, 2000).
- c) Gânglios basais: No corpo estriado, assim como no córtex cerebral, 1-2% dos interneurônios são neurônios NOS positivos. Somente 15% deles têm receptores do

tipo NMDA. O papel do NO está relacionado com a função de integração, uma vez que estes neurônios recebem aferências glutamatérgicas excitatórias do córtex cerebral. A administração de inibidores de nNOS nos gânglios basais diminui a atividade locomotora, (PEDRAZA et al., 2002), como também diminui a atividade elétrica nesses gânglios e no córtex pré-frontal (WEST et al., 2002), indicando o papel modulador do NO nas conexões fronto-estriatais que regulam a atividade motora.

Em répteis, poucas linhas de pesquisa são dedicadas ao estudo dos neurônios nitrérgicos no sistema nervoso central e artigos descrevendo neurônios produtores de NO no córtex cerebral deste grupo de vertebrados são relativamente raros. Dávila e et al. (1995) demonstrou, na lagartixa *Psammmodromus algirus*, a colocalização de neurônios NADPH diaforase positivos e GABAérgicos, no entanto, negativos para parvalbumina e somatostatina. Tais resultados evidenciam que os neurônios diaforase positivo, nessa espécie, representam uma distinta subpopulação de interneurônios GABAérgicos. Neste mesmo trabalho, eles verificaram a presença de neurônios NADPHd positivos distribuído por todo córtex, e a maior concentração deles encontravam-se nos córtices dorsomedial e dorsal. Trabalhos realizados por Valtschanoff et al. (1993) verificou, em hipocampo de ratos, que todos os neurônios NADPH diaforase positivo tinham colocalização com aqueles reativos a GABA. Em outros experimentos, Smeets et al. (1997) estudou, no cérebro do lagarto *Gecko gecko*, a distribuição de neurônios NADPHd e NOS positivos e sua dupla marcação com as células catecolaminérgicas. Seus resultados demonstraram colocalização entre neurônios NADPHd e NOS positivos.

Na medula espinhal de tartarugas *Chrysemys d'orbigny*, Radmilovich et al. (1997) demonstrou a presença de neurônios NADPHd positivos na raiz dorsal e gânglio sensorial e identificou três diferentes tipos de neurônios: a) neurônios com ramificações dendríticas organizadas radialmente, b) neurônios com ramificações dendríticas rostro-caudais, c) neurônios com duas ramificações praticamente simétricas que se projetavam do mesmo lado ou contralateralmente. Nessa mesma espécie, Fernandez et al. (1998) verificou a colocalização de neurônios NOS positivos e GABAérgicos.

Pesquisas realizadas com a espécie de tartaruga *Trachemys dorbigni* demonstraram aumento na expressão de neurônios NADPHd positivos nos gânglios da raiz dorsal e na medula espinhal lombar após transecção do nervo ciático. Esse aumento do número de neurônios positivos foi observado até 90 dias pós-transecção, passado esse tempo, o número desses neurônios pouco variou (PARTATA, 1999). Posteriormente, outro grupo de

pesquisadores desenvolveu um trabalho no qual defendiam a idéia de que há uma relação entre a expressão de NOS e regeneração da cauda do lagarto *Gecko gecko*. Esta linha de pesquisa foi demonstrada em três trabalhos elaborados pelo grupo liderado por Marina Bentivoglio, em Verona, Itália. Segundo eles, parece haver uma relação entre a expressão de NOS e a plasticidade dos motoneurônios e neurônios sensoriais da medula espinhal observada em resposta à amputação (CRISTINO et al., 2000 a, b, c). Corroborando com esta hipótese, vários trabalhos têm sugerido que a expressão de NOS ou a marcação pela NADPHd aumentam em situações de estresse, como ocorre em modelos experimentais de convulsão em roedores (BENESOVÁ et al., 2005).

2.1.1 Biosíntese e neurotransmissão do Óxido Nítrico

A ativação do mecanismo de produção do NO neuronal é exercida pelo glutamato (neurotransmissor excitatório), que é liberado de vesículas do neurônio pré-sináptico e liga-se aos receptores, principalmente os do tipo NMDA (através da proteína PSD-95), do neurônio pós-sináptico. Esta ligação abre um canal no receptor permitindo a entrada de Ca^{2+} para o interior da célula, o aumento na concentração de íons cálcio no neurônio pós-sináptico gera a ativação da proteína quinase dependente de cálcio, a calmodulina (CaM) – que é uma proteína de baixo peso molecular e age como uma subunidade para muitas enzimas dependentes de Ca^{2+} –. Esta ativação cria o complexo Ca^{2+} / calmodulina que se liga a nNOS, encontrada nas células nervosas. Esta ligação ativa a enzima nNOS que catalisa a oxidação de L-arginina em L-citrulina e NO (ESPINOZA et al., 1997). O NO produzido difunde-se então para o neurônio pré-sináptico ativando, assim, a enzima guanilato ciclase (GC). Este processo ocorre por meio da ligação do NO ao ferro do grupo prostético heme da enzima. Conseqüentemente, o NO estimula a liberação de glutamato no neurônio pré-sináptico, realizando a regulação de potenciais de longa duração (MONCADA e HIGGS, 1993) (Fig. 2, 3).

A atuação do NO nos diferentes tecidos pode ser realizada a partir da ativação da enzima GC que por sua vez, quando ativada, produz guanosina-3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) a partir da guanosina-5'-trifosfato (GTP). O GMPc é um segundo mensageiro que ativa as proteínas quinase: PKG I (solúvel) - responsável pelo controle da quantidade de Ca^{2+} intracelular; PKG II (proteína de membrana) – controla o fluxo de ânions através da membrana, principalmente de íons cloreto.

O GMPc desempenha diferentes ações fisiológicas que dependem do seu alvo no sistema nervoso (interneurônios, células gliais ou ependimócitos. A ação do GMPc é

interrompida pela ação, por exemplo, de fosfodiesterases que promovem sua degradação. Conseqüentemente, inibidores das fosfodiesterases aumentam os níveis de GMPc intracelular.

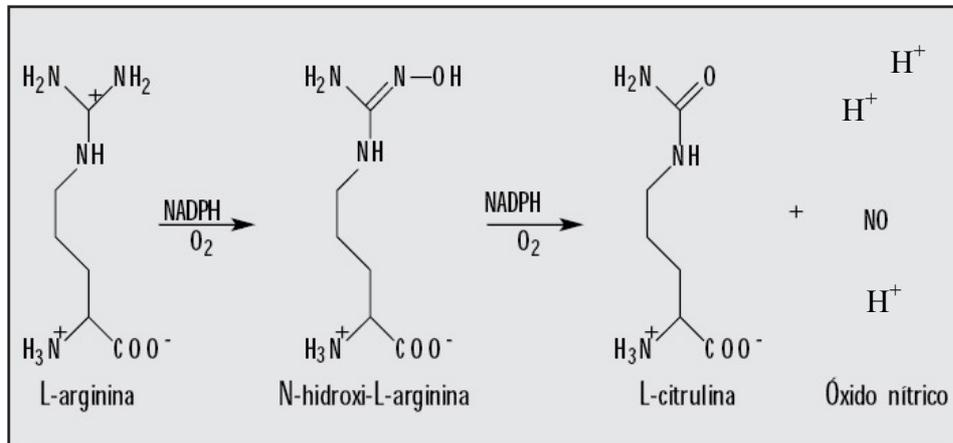


Figura 2: Reação catalisada pela NO-sintase (Adap. Dusse, 2003).

O NO também pode exercer seus efeitos biológicos através de outros mecanismos na fenda sináptica, tais como a modulação do transporte de monoaminas e a nitrozilação de receptores. Sua atuação como radical livre ocorre através da mediação da toxicidade celular danificando enzimas metabólicas críticas. Essa mediação também ocorre por meio da reação do NO com o superóxido (O₂⁻), para formar um oxidante ainda mais potente, o peroxinitrito (ONOO⁻).

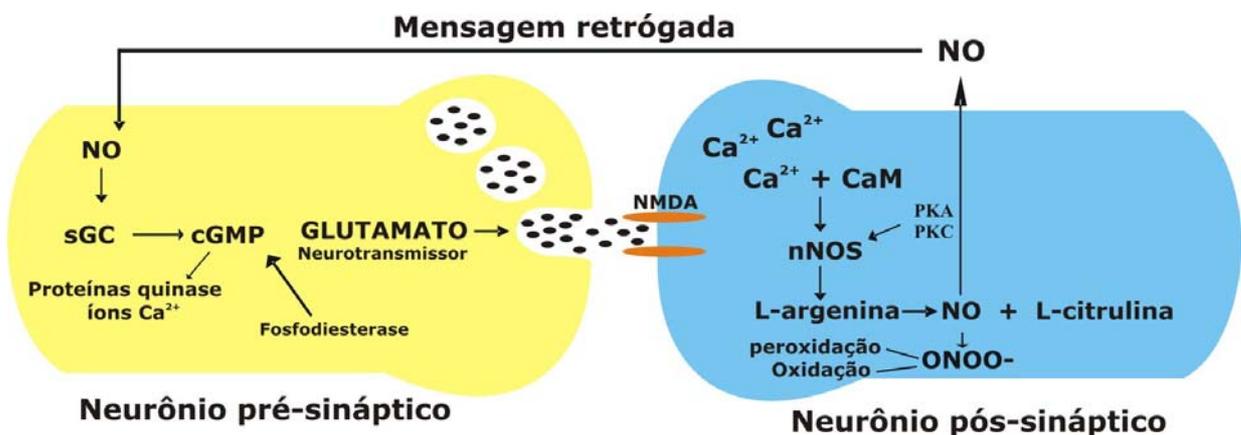


Figura 3: Esquema representando a biosíntese do óxido nítrico catalisada pela isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (nNOS). sGC (guanilato ciclase solúvel), guanosina monofosfato cíclico (GMPc), CaM (calmodulina), PKA e PKC (proteína quinase A e C). Modificado de Salum et al., 2007.

Diferente dos neurotransmissores convencionais, o NO simplesmente difunde nos terminações nervosas formando ligações covalentes com alvos potenciais, o qual inclui a

guanilato ciclase solúvel. A ação do NO é então finalizada com a sua difusão para outras áreas, onde será convertido em Nitrito / Nitrato (DAWSON e SNYDER, 1994).

2.1.2 Regulação da atividade da enzima nNOS

Em razão de sua natureza gasosa e sua alta capacidade de difusão, a formação do NO deve ser rigorosamente controlada para que haja especificidade em sua sinalização. Sobre este aspecto, a família de enzimas sintetizadoras de NO realmente dispõem de uma grande variedade de mecanismos regulatórios que incluem interações com proteínas e modificações transcricionais, pós-transcricionais, traducionais e pós-traducionais que controlam a biosíntese de NO (BREDT, 2003).

A função reguladora da atividade da nNOS é conferida, principalmente, ao Ca^{2+} , o qual estimula a enzima nNOS por meio de sua interação com a calmodulina. A ligação do glutamato aos receptores pós-sinápticos, principalmente do tipo NMDA, possibilita a entrada desse cátion para o interior da célula nervosa. O aumento da concentração do Ca^{2+} citosólico acima de 40nM promove a ligação da calmodulina à nNOS ativando a enzima. Entretanto, quando as concentrações de Ca^{2+} diminuem, este se dissocia da calmodulina que, conseqüentemente, se dissociará da enzima nNOS (ESPLUGUES, 2002; GUIX et al., 2005). Por outro lado, a regulação da nNOS também pode ser realizada via fosforilação, onde a redução da atividade catalítica desta isoenzima é mediada por quinases, tais como: proteína quinase dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), proteína quinase C, ou proteína quinase II dependente de Ca^{2+} / calmodulina (ESPLUGUES, 2002; LEDO et al., 2004; GUIX et al., 2005).

2.2 O córtex cerebral de répteis

A classe reptilia abriga a sub-classe Squamata, e esta reúne animais como cobras e lagartos (POUGHT, 2003). O córtex cerebral desses animais possui relações filogenéticas com o isocórtex (neocórtex) dos mamíferos (ABOITIZ, 1999; ABOITIZ et al., 2002a; ABOITIZ et al., 2002b).

O cérebro dos répteis pode ser dividido basicamente em 5 sub-áreas: Bulbo olfatório, telencéfalo, mesencéfalo, cerebelo e tronco encefálico. O bulbo olfatório está situado mais rostralmente, enquanto que o tronco encefálico situa-se em uma posição mais caudal. Localizado em uma posição intermediária, encontram-se o telencéfalo, o mesencéfalo (anexo ao telencéfalo) e o cerebelo (anexo ao tronco encefálico) (Fig. 4). Essas regiões se conectam a

partir de aferências que podem distribuir-se, por exemplo, desde do bulbo olfatório até níveis caudais do telencéfalo (WILHELMUS, 1986).

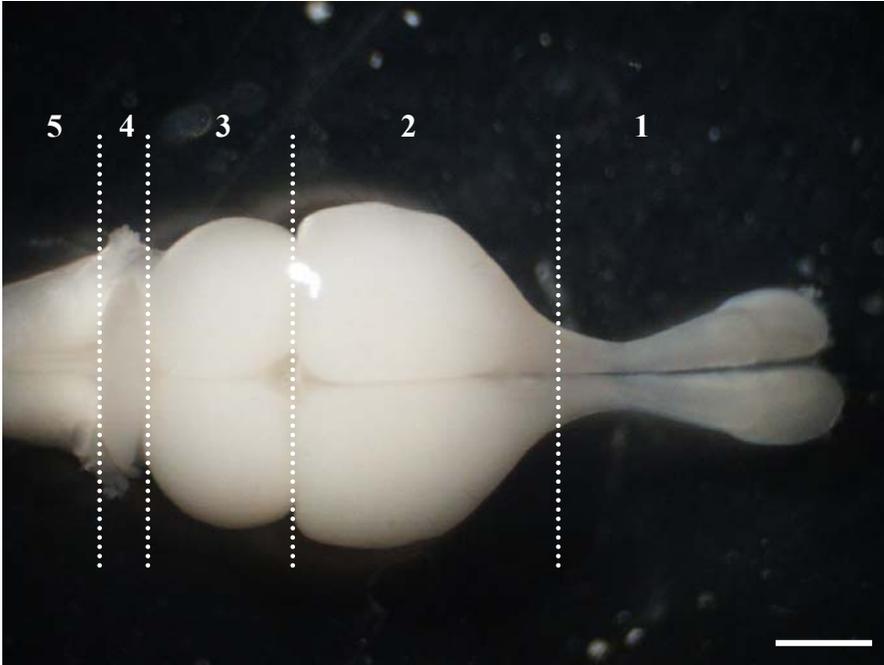


Figura 4: Fotografia do cérebro da lagartixa *P. hispanica* demonstrando as 5 sub-áreas cerebrais. 1 – Bulbo olfatório, 2 – telencéfalo; 3 – mesencéfalo; 4 – cerebelo; 5 – tronco encefálico. Barra de calibração: 1mm.

O telencéfalo por sua vez está dividido em três diferentes níveis (Fig. 5): o pré-comissural (anterior ou rostral), comissural (mediano) e o pós-comissural (posterior ou caudal). Localizado no telencéfalo, o córtex cerebral de répteis é formado por três principais áreas: a medial (CM), dorsal (CD) e lateral (CL) (Fig. 6). Contudo, em Squamata, há uma quarta área, a dorsomedial (CDM), primeiramente descrita por Ramón e Cajal (1917) como uma zona piramidal curvilínea. Apesar de apresentar uma simples organização histológica, o córtex cerebral de répteis tem uma complexa população neuronal que ao ser visualizada a partir da técnica de Golgi (técnica específica para corar neurônios, na qual consiste em fixar partículas de cromato de prata a membrana do neurônio) se assemelha ao sistema hipocampal de mamíferos (MARTÍNEZ-GUIJARRO, 1990).

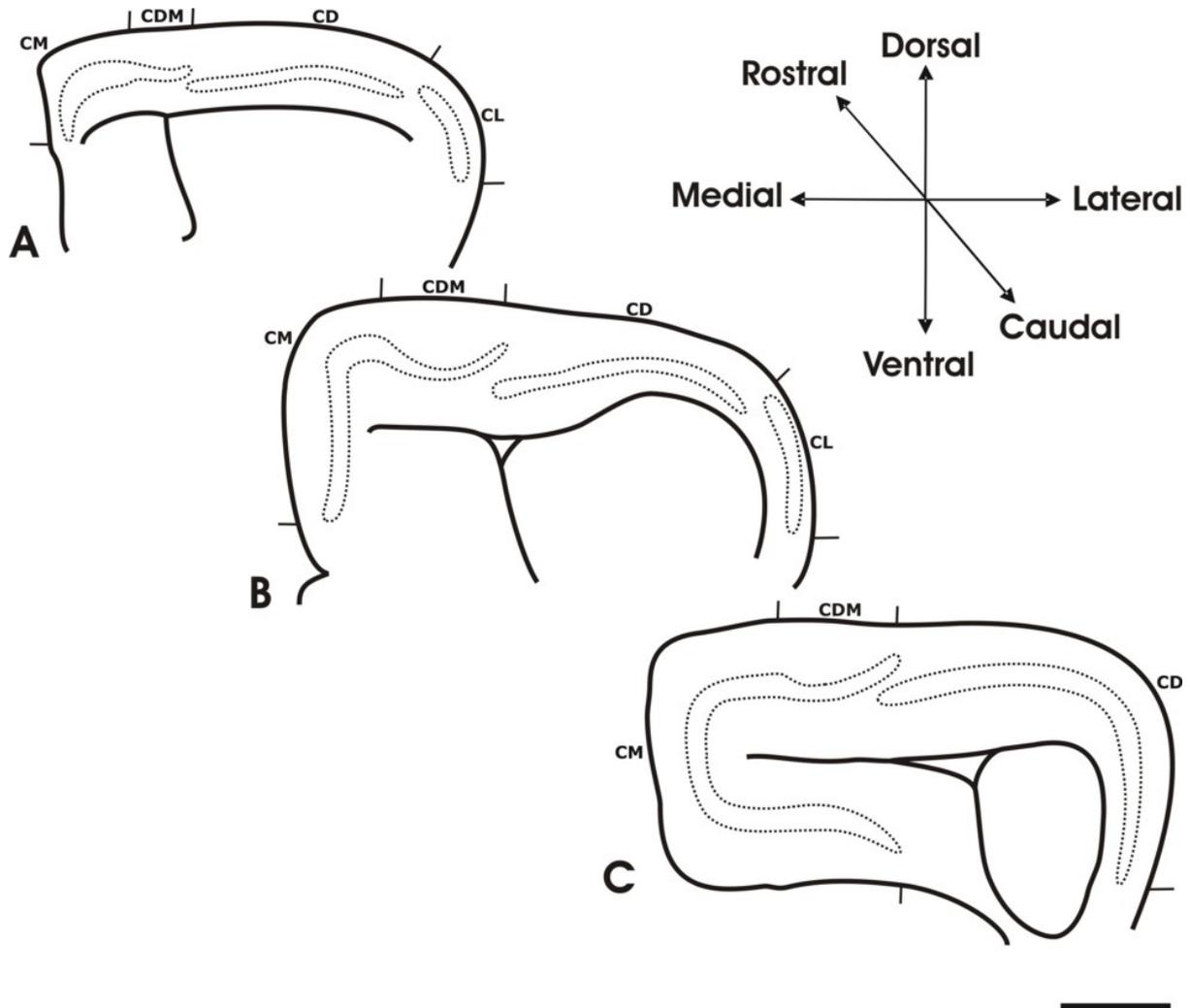


Figura 5: Desenho esquemático demonstrando os três níveis telencefálicos (A, B e C) e suas posições anatômicas. CM = córtex medial, CDM = córtex dorsomedial, CD = córtex dorsal, CL = córtex lateral, respectivamente. A – pré-comissural; B – comissural; C – pós-comissural. Barra de calibração: 500 μ m.

Além das áreas anteriormente mencionadas, o córtex cerebral de répteis apresenta ainda duas camadas plexiformes: a plexiforme interna (pi): anexa ao ventrículo e a plexiforme externa (pe): anexa a pia máter. Entre essas duas há a camada celular (Fig. 6A, B), formada basicamente por neurônios do tipo piramidal (DE LA IGLESIA, LOPEZ-GARCIA, 1997a). As camadas plexiformes são formadas por axônios, botões sinápticos, dendritos, processos de glia radial e corpos celulares de neurônios e microglias (DE LA IGLESIA; LOPEZ-GARCIA, 1994, 1997a, b). Várias pesquisas realizadas com répteis mostraram que as áreas corticais do telencéfalo desses animais são preenchidas por interneurônios imunorreativos ao Ácido Gama Amino Butírico (GABA), ou seja, uma população de interneurônios GABAérgicos positivos (SCHWERDTFEGER, LOPEZ-GARCIA, 1986; LOPEZ-GARCIA; MARTÍNEZ-GUIJARRO, 1988; DÁVILA et al., 1993; GUIRADO et al., 1994; MARTÍNEZ-GUIJARRO et al., 1994; SUÁREZ et al., 2005, KENIGFEST et al., 2007).

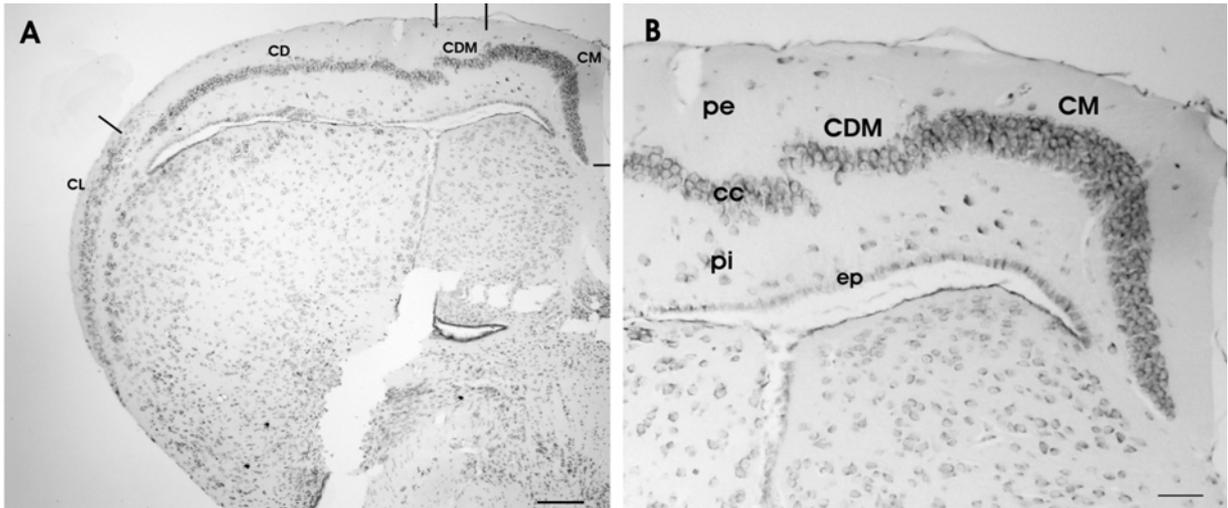


Figura 6: A - Corte transversal do telencéfalo de *P. hispanica* enfatizando as áreas corticais, CM, CDM, CD, CL = córtex medial; dorsomedial; dorsal e lateral, respectivamente. B – detalhe do córtex medial (CM) e dorsomedial (CDM), onde também observa-se a estrutura trilaminar do córtex, próximo a pia máter está a plexiforme externa (pe), voltado para o epêndimo (ep) está a plexiforme interna (pi) e entre essas duas camadas está a camada celular (cc). Barra de calibração: 500 μ m (A), 150 μ m (B)

Embora apresente uma simples histologia, o córtex cerebral de répteis possui uma complexa população de neurônios que se distribui nas diferentes áreas corticais:

- a) A plexiforme externa do CM é formada basicamente por aferências axonais e dendritos apicais dos neurônios principais. Nesta camada há a presença de uma distinta população de neurônios que são, na sua maioria, imunorreativos a GABA. Seus axônios têm uma trajetória irregular dentro da camada plexiforme, alguns deles chegam até a entrar na camada celular. Esta lâmina destaca-se ainda por receber botões e axônios de neurônios localizados no córtex lateral, dorsal e dorsomedial. Tanto o dorsal como o dorsomedial emitem projeções principalmente de neurônios bipiramidais, no entanto no dorsal esses neurônios localizam-se na plexiforme externa, enquanto que no dorsomedial, encontram-se nas duas plexiformes (LOPEZ-GARCÍA et al., 2002);
- b) A camada celular (ou camada granular) é formada pelo soma dos neurônios principais, o que a torna densamente povoada. Estes somas, que são de diferentes tamanhos, apresentam-se em forma de coluna e são distribuídos nas camadas celulares das quatro áreas corticais. Dentre os neurônios encontrados na camada granular, destacam-se: triangular, poligonal e piramidal (LOPEZ-GARCÍA et al., 2002);
- c) A plexiforme interna do CM, uma região Timm-positiva, é formada basicamente por dendritos provenientes de neurônios granulares da camada celular. Essa plexiforme recebe axônios provenientes, principalmente, de neurônios bipiramidais localizados

nas plexiformes interna e externa do córtex dorsomedial. Diferentemente da camada celular, essa sub-região não apresenta soma de neurônios, quando visualizados, são neurônios migratórios imaturos que irão formar a camada celular (GARCÍA-VERDUGO et al., 1986);

- d) A plexiforme interna do córtex medial, dorsomedial e dorsal de *P. hispanica* é formada por interneurônios GABAérgicos positivos. Esses neurônios imunorreativos ao GABA podem ser divididos em dois tipos: interneurônios contendo neuropeptídeos ou proteínas ligantes de Ca^{2+} . Esses neurônios GABAérgicos positivos tem uma distribuição diferenciada de suas arborizações axonais. Neurônios peptidérgico (Somatostatina, neuropeptídeo Y) têm suas arborizações axonais distribuídas mais periféricamente nas regiões corticais, no entanto, aqueles parvalbumina (interneurônio que contém proteína ligante de Ca^{2+} , tais como, neurônios piramidais) positivos têm seus axônios perissomaticamente distribuídos à camada celular (MARTINEZ-GUIJARRO et al., 1993).

O córtex medial de répteis, como o da lagartixa *P. hispanica*, caracteriza-se por possuir neurônios principais (ou de projeção) que recebem projeções axonais de todas áreas corticais e emitem projeções axonais recorrentes para as plexiformes interna do CM e CL e ambas as plexiformes dos córtices dorsomedial e dorsal. Estas projeções axonais possuem terminais ricos em zinco (regiões Timm-positivas) (Fig. 7) que se encontram armazenados em vesículas sinápticas dos botões pré-sinápticos; estas marcações zincérgicas podem ser visualizadas pelo método de Neo-Timm, no qual detecta a presença de metais pesados no tecido nervoso (MARTÍNEZ-GUIJARRO et al., 1987; LOPEZ-GARCÍA; MARTÍNEZ-GUIJARRO, 1988a; LOPEZ-GARCÍA et al., 2002).

As projeções zincérgicas do telencéfalo de lagartos se assemelham aos campos sinápticos do estrato lúcido da área CA3 da formação hipocampal dos mamíferos, a chamada via das fibras musgosas. Tanto no hipocampo como no córtex medial de lagartos (VAREA et al., 2001) demonstrou-se por métodos imunohistoquímicos que estes neurônios de projeção são glutamatérgicos e Timm-positivos. Portanto, quando estimulados liberam nos terminais pós-sinápticos o neurotransmissor glutamato mais o metal zinco. Atualmente, existe um intenso debate sobre o papel fisiológico do zinco em sinapses glutamatérgicas especialmente na formação hipocampal de mamíferos (KAY, 2003; LOPANTSEV et al., 2003). Em trabalhos realizados com a lagartixa *P. hispanica*, sugere-se que tanto o zinco como as células gliais participam dos processos de neurogênese no córtex cerebral do referido animal (LÓPEZ-

GARCÍA et al., 1992; LÓPEZ-GARCÍA et al., 1994). Devido essa comparativa histoquímica, ontogenia e posição da circuitaria cortical, acredita-se que o CM de répteis seja uma área homóloga ao giro denteado hipocampal de mamíferos (MOLOWNY e LÓPEZ-GARCÍA, 1978; LÓPEZ-GARCÍA et al., 1988 LÓPEZ-GARCÍA et al, 2002).

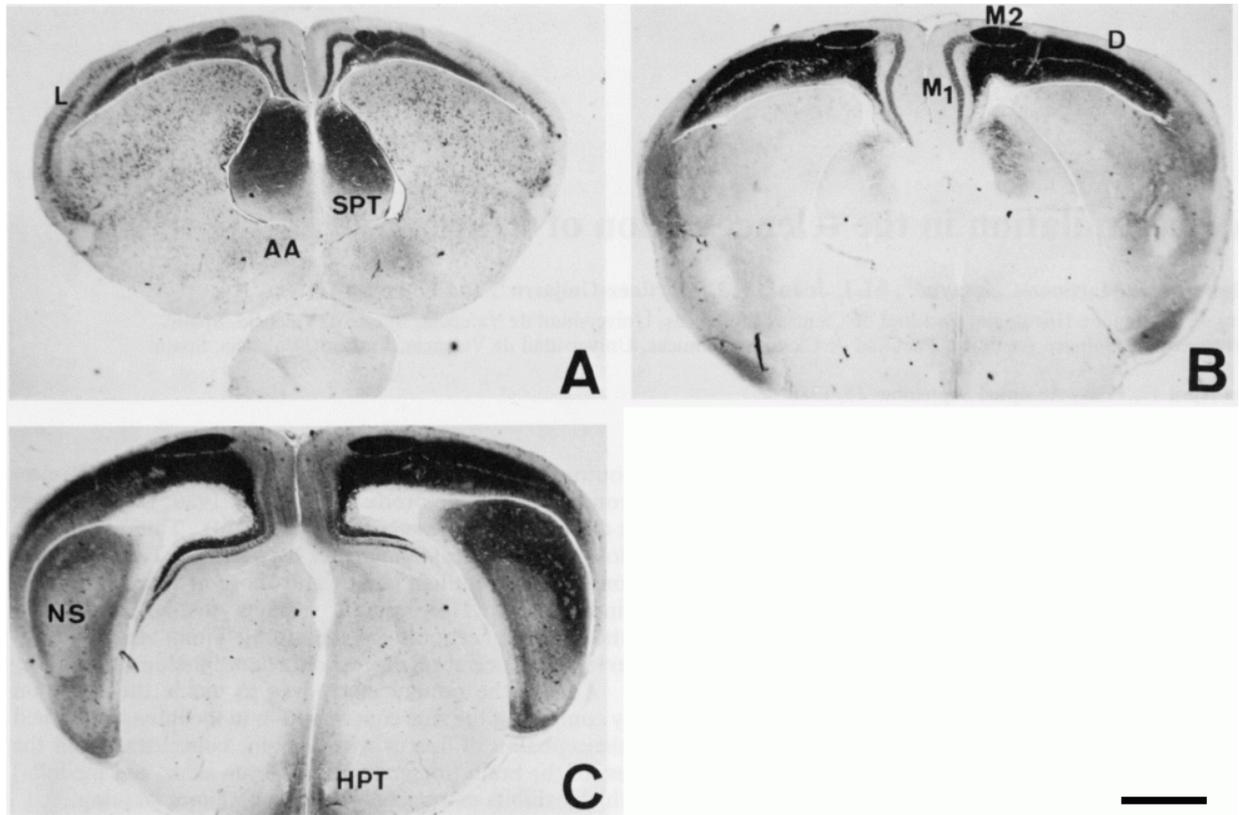


Figura 7: Fotografia do corte transversal de telencéfalo de *P. hispanica*. Nela observam-se as regiões Timm-positivas na cor preta escura, a saber: plexiforme interna dos córtices medial, dorsomedial, dorsal e lateral e grande porção da plexiforme externa dos córtices dorsomedial e dorsal. A, B e C – cortes de níveis pré-comissural, comissural e pós-comissural, respectivamente. SPT – septum; AA – amígdala; M1 e M2 – diferentes regiões do córtice medial; D – região dorsal; L – Córtex lateral; NS – núcleo esférico (ovóide); HPT – hipotálamo. Barra de calibração: 500 μ m.

Os neurônios emissores de botões pré-sinápticos ricos em zinco “neurônios rico em zinco”, podem ser identificados por transporte retrógrado do complexo selenito-zinco (HOWELL e FREDERICKSON, 1990). A maioria dos neurônios Timm-positivos é de geração tardia ou até mesmo de geração pós-natal, como os neurônios dos granos do hipocampo. Esta população de neurônios ricos em zinco de geração tardia é muito sensível a certos neurotóxicos e costumam ser vulnerável a processos de envelhecimento (XU et al., 1992). Em alguns animais, como a lagartixa *P. hispanica*, esses neurônios apresentam a surpreendente propriedade de regeneração neuronal após uma lesão (MOLOWNY et al.,

1995), de tal forma que os novos neurônios formados substituem histologicamente e funcionalmente a população lesionada (LOPEZ-GARCÍA et al., 1993).

Uma das características mais marcantes do córtex medial de lagartos e da formação hipocampal dos mamíferos é a ontogênese tardia (ou neurogênese pós-natal). A maior parte dos neurônios do hipocampo de roedores é gerada nas primeiras semanas da vida pós-natal. Em primatas, este período é ainda mais prolongado (KORNACK e RAKIC, 1999). Já em lagartos a neurogênese pós-natal tem sido demonstrada durante toda a vida do animal (MARCHIORO et al., 2005).

A capacidade de regeneração neuronal em resposta a uma lesão química foi demonstrada no córtex cerebral da lagartixa européia *P. hispanica*. Estudando os efeitos da 3-acetilpiridina (3-AP) o grupo de Lopez-Garcia, na Universidade de Valencia, demonstrou uma intensa atividade neurogênica que se seguia a uma lesão severa do córtex medial desta espécie (MOLOWNY et al., 1995). Esta atividade tem origem principalmente no “sulcus arquicorticalis” dos ventrículos laterais onde são gerados os neurônios de nova geração. A exemplo do que ocorre na zona subgranular da formação hipocampal de mamíferos. Acredita-se que este fenômeno de neurogênese pós-natal induzida por lesão cortical é único entre os vertebrados amniotas (répteis, aves e mamíferos). Outros pesquisadores, como Marchioro et al. (2005), observaram eventos semelhantes ao apresentarem dados de neurogênese pós-natal na espécie *Tropidurus hispidus*.

3 OBJETIVOS

Geral

Identificar os neurônios NADPHd/nNOS positivos no córtex cerebral da lagartixa *Podarcis hispanica*.

Específicos:

- Caracterizar, quantificar e classificar os tipos morfológicos e a distribuição dos neurônios NADPHd positivos no córtex cerebral de *P. hispanica*; mediante a técnica de histoquímica NADPH diaforase e imunohistoquímica frente a nNOS;
- Comparar o número de neurônios NADPHd positivos entre animais de diferentes faixas etárias;
- Quantificar o número de neurônios NADPHd positivos nas áreas e camadas corticais;
- Comparar o mapa de distribuição dos neurônios NADPHd positivos com aquele das regiões Timm-positivas e Timm-negativas; utilizando a técnica histoquímica de Neo-Timm;
- Identificar o padrão de reatividade dos neurônios produtores de NO frente aos anticorpos anti-nNOS e sGC $\alpha 1$.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas (n = 6) lagartixas *Podarcis hispanica* (Steindachner, 1870) (Fig. 8A) de diferentes idades (jovens, adultos e senis) e de ambos os sexos; a distribuição por faixas etárias foi realizada a partir do peso e medida (narina – cloaca) dos animais, a saber:

- Animais jovens: mediam de 30 a 45 mm e pesavam de 1 a 2 g;
- Adultos: de 45 a 55 mm e 2 a 3 g;
- Senis: de 55 a 60 mm e 3 a 4 g.

Esses animais foram capturados nos arredores da cidade de Burjasot (Valência – Espanha) e mantidos em um terrário que reproduzia um microambiente semelhante aquele onde eles viviam.

Após terem sido escolhidas aleatoriamente, as lagartixas foram submetidas aos experimentos no Laboratório de Neurobiologia da Universidade de Valência (Espanha), o qual é coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Lopez-García. Todas as etapas dos experimentos foram realizadas de acordo com as diretrizes espanholas (BOE 67/8509-12, 1988) e as normas da União Européia (86/609/UE) para o uso de animais de laboratório.

4.2 Perfusão e Histologia

Após serem anestesiados com éter, os animais foram perfundidos transcardialmente utilizando-se um sistema de perfusão (Fig. 8C - F). Durante os primeiros 5-10 minutos lavava-se os vasos com uma solução de tampão fosfato salino (TFS), para que posteriormente fossem administradas as soluções fixadoras de tecido, durante 15-20 minutos. Para os experimentos de NADPHd, aplicavam-se os fixadores paraformaldeído (PFA) e glutaraldeído (GA) a 2% em tampão fosfato (TF) 0,1 M (pH 7,2 - 7,4); para os de imunohistoquímica utilizava-se apenas PFA a 4%, enquanto que para os experimentos de Neo-Timm perfundia-se com GA a 4%.

Depois da perfusão, os cérebros foram mantidos por 30 minutos dentro da caixa craniana para que fosse finalizada a fixação do tecido. Posteriormente, os cérebros foram extraídos, os hemisférios separados (Fig. 9A - E), e destes, retirava-se as endomeninges com pinças finas e com uma lupa modelo Olympus (Fig. 8B, 10C). Então, esses hemisférios foram incluídos em ágar (Fluka) a 2% (Fig. 9F) para a realização de cortes de 60 µm em vibrátomo (Leica VT1000S) (Fig. 10A, B). Passadas as etapas de revelados histoquímicos, montavam-se

as fatias em lâminas gelatinizadas onde permaneciam em uma câmara úmida durante um intervalo de trinta minutos a uma hora, para que se fixassem na lâmina. Em seguida os cortes foram desidratados com níveis crescentes de álcool, descolorido com banhos de xilol e montados com um meio permanente (Eukit).

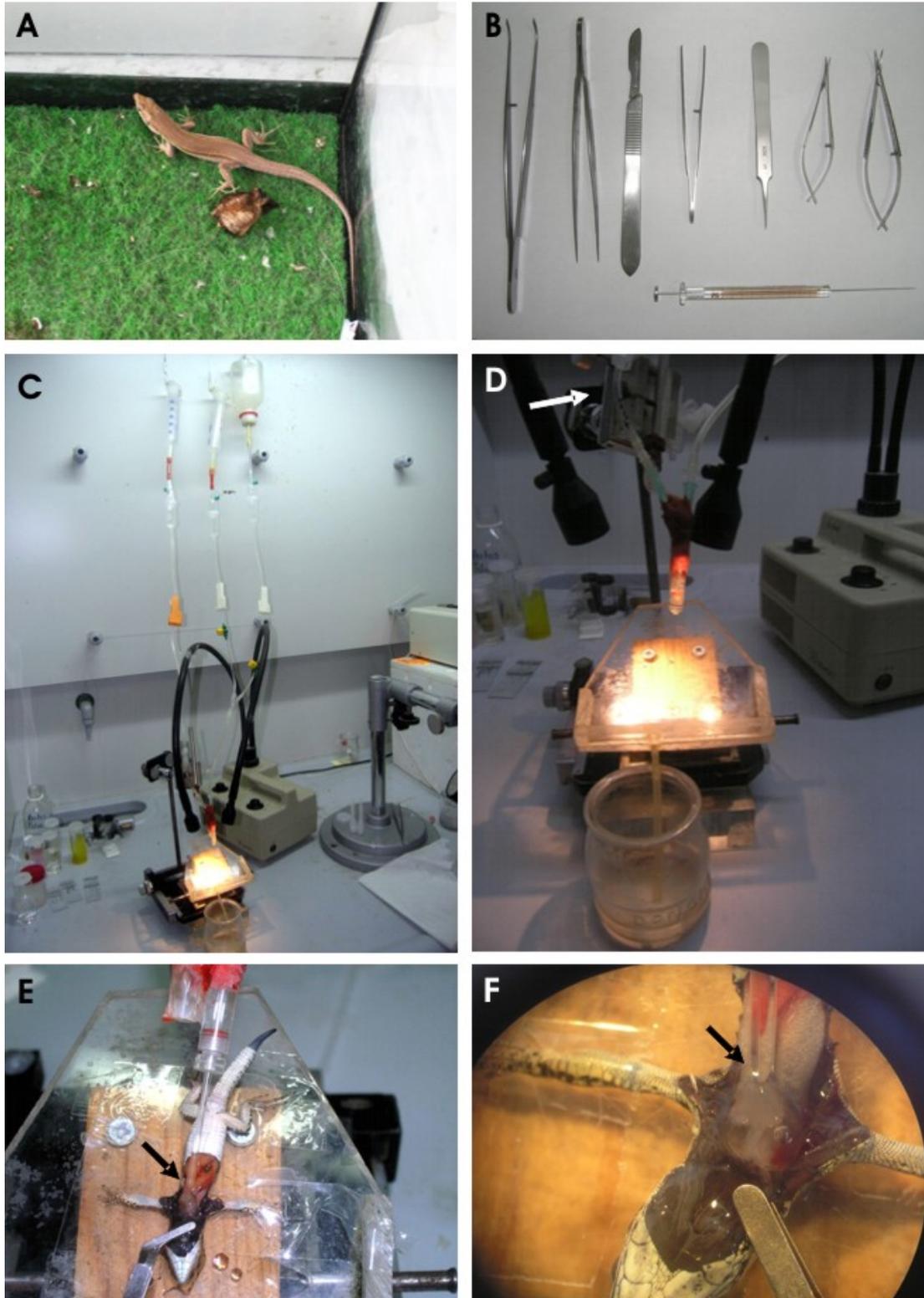


Figura 8: A – Animal de experimentação, *Podarcis hispanica*; B – instrumentário utilizado nos experimentos; C – sistema de perfusão; D – Bandeja de perfusão, onde também pode-se observar: o micromanipulador (seta) e o sistema de iluminação; E, F – Animal na posição de perfusão (ventro dorsal), observa-se a micropipeta de perfusão inserida no coração (setas).

4.3 Histoquímica para NADPH diaforase

A técnica histoquímica de NADPHd foi utilizada porque oferece marcações “Golgi-like” de células que contém a enzima NOS, responsável pela biosíntese do NO.

Nessa técnica os cortes são lavados em tampão TRIS-HCl pH 8 (3x 10min), seguido de lavados de Triton X-100 0,3% (TX) pH 8 (3x 10min), e finalmente são encubados em um meio contendo: 0,83 mg/ml de β -NADPH (Sigma), 0,25 mg/ml de nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma) e TX pH 8, por um período de 30 minutos a 2:30 horas a uma temperatura de 37°C. O Triton X-100 permeabiliza as membranas para que o NBT e a β -NADPH alcancem o interior das células, onde se localiza a enzima NOS. Nessa reação o NBT (solúvel e incolor) é reduzido em formazan (insolúvel e azul) ao receber dois hidrogênios do NADPH. Um grupo controle negativo foi criado para confirmar a especificidade da técnica histoquímica. Para tal, utilizou-se um exemplar no qual foram seguidos os mesmos procedimentos metodológicos descrito anteriormente, no entanto, as fatias provenientes deste animal foram incubadas sem β -NADPH.

Então, durante intervalos de 30 minutos, os cortes foram observados para a verificação de marcação de neurônios NADPHd positivos. Após a confirmação de uma coloração satisfatória, ou seja, quando se observava uma coloração azulada no tecido analisado e também a presença de neurônios diaforase positivos com relativos prolongamentos dendríticos, considerava-se a reação satisfatória. Passado esta fase, interrompia-se a reação com sucessivas lavagens de TF para posterior montagem das lâminas permanentes.

4.4 Detecção histoquímica do zinco vesicular: revelador de Danscher (Neo-Timm)

A detecção histoquímica do zinco vesicular se realizou mediante o método de selenito Danscher Neo-Timm. Esta técnica se baseia na formação prévia de um composto selenito-zinco (*in vivo*) e posterior amplificação autometalográfica com sais de prata (revelador de Danscher). Os animais destinados a detecção histoquímica do zinco vesicular recebiam uma injeção intraperitoneal de selenito sódico (4 mg/g) a uma concentração de 1% em água destilada, 30 minutos antes de serem perfundidos.

Fatias obtidas do cérebro desses animais foram reveladas a partir do protocolo de Danscher (Danscher, 1984), que consiste na mescla de diferentes compostos segundo uma determinada ordem: inicialmente adiciona-se a goma arábica (50%) e uma solução de tampão citrato (25,5% de ácido cítrico e 23,5% de citrato de sódio), ao composto resultante mistura-se a hidroquinona (5,7%) e, por fim, acrescenta-se ao revelador lactato de prata a 0,73%. Os

cortes de telencéfalo foram revelados durante 30 minutos, em agitação, isolados da influência luminosa e mantidos em uma temperatura quase constante. Uma vez concluído o revelado, os cortes foram lavados com água destilada e incubados, durante 5 min, em tiosulfato sódico a 10%, para estabilizar o precipitado de prata. Posteriormente realizavam-se novos lavados com água destilada e por fim, os cortes seguiam os processos histológicos mencionados no item 4.2 e montados com um meio permanente, neste caso, o DePeX (DPX).

4.5 Imunohistoquímica frente a nNOS e sGC

As técnicas de imunohistoquímica permitem classificar os elementos neuronais em função das substâncias que expressam. Estas técnicas podem ser aplicadas sobre materiais fixados sem incluí-los (imunohistoquímica pré-inclusão) ou sobre material incluídos (imunohistoquímica pós-inclusão). Em ambos os casos a fixação é um parâmetro crítico uma vez que muitos dos anticorpos desenvolvidos funcionam mal ou não funcionam na presença de certos fixadores, como o glutaraldeído.

Os experimentos de imunohistoquímica para a detecção das células que expressam NOS foram realizados mediante as seguintes etapas: primeiramente seguiram-se os processos de perfusão e elaboração das fatias; após serem cortadas, as fatias de telencéfalo foram lavadas por 3x (10 min) em TFS e posteriormente incubadas, durante 15 minutos, em uma solução contendo 3% H₂O₂ + 10% metanol em TFS, essa etapa foi realizada para o bloqueio das peroxidases endógenas; após serem novamente lavadas por 3x (10 min) em TFS, foram pré-incubadas em um meio contendo soro normal de cabra (5%), TX diluídos em TFS, durante 45 minutos à temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram incubados com: anticorpo primário policlonal anti-nNOS (Sigma) desenvolvido em rato, a uma diluição de 1:1000, soro normal de cabra (3%) e TX, diluídos em TFS. A reatividade ocorreu em agitação e temperatura ambiente, durante toda uma noite. Depois de expostos ao anticorpo primário, os cortes foram lavados com TFS (3X, 10 min) e então encubados com: anticorpo secundário biotilado de cabra anti-rato (Vector CA) a uma diluição de 1:200, soro normal de cabra (3%) e TX em TFS, por 2 horas. Finalmente, os anticorpos ligados reagem com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC), durante 45 minutos, para serem posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB) em TFS.

Para os experimentos de imunohistoquímica frente a GC foram usados os mesmos procedimentos metodológicos descritos anteriormente, no entanto, utilizou-se o anticorpo primário anti-guanilato ciclase solúvel tipo $\alpha 1$ (Sigma) (sGC α) (diluídos a 1:1500) desenvolvido em coelho e o anticorpo secundário biotilado (diluído a 1:200) desenvolvido

em cabra anti-coelho. Um grupo controle negativo foi criado para confirmar a especificidade destas técnicas imunohistoquímica. Para tal, utilizou-se um animal, sendo que metade das fatias deste foram usadas para os testes referente a sGC α e a outra metade para nNOS, então, essas fatias passaram pelos mesmos procedimentos metodológicos descrito anteriormente, no entanto, foram incubadas sem o anticorpo primário reativo a nNOS e sGC α .

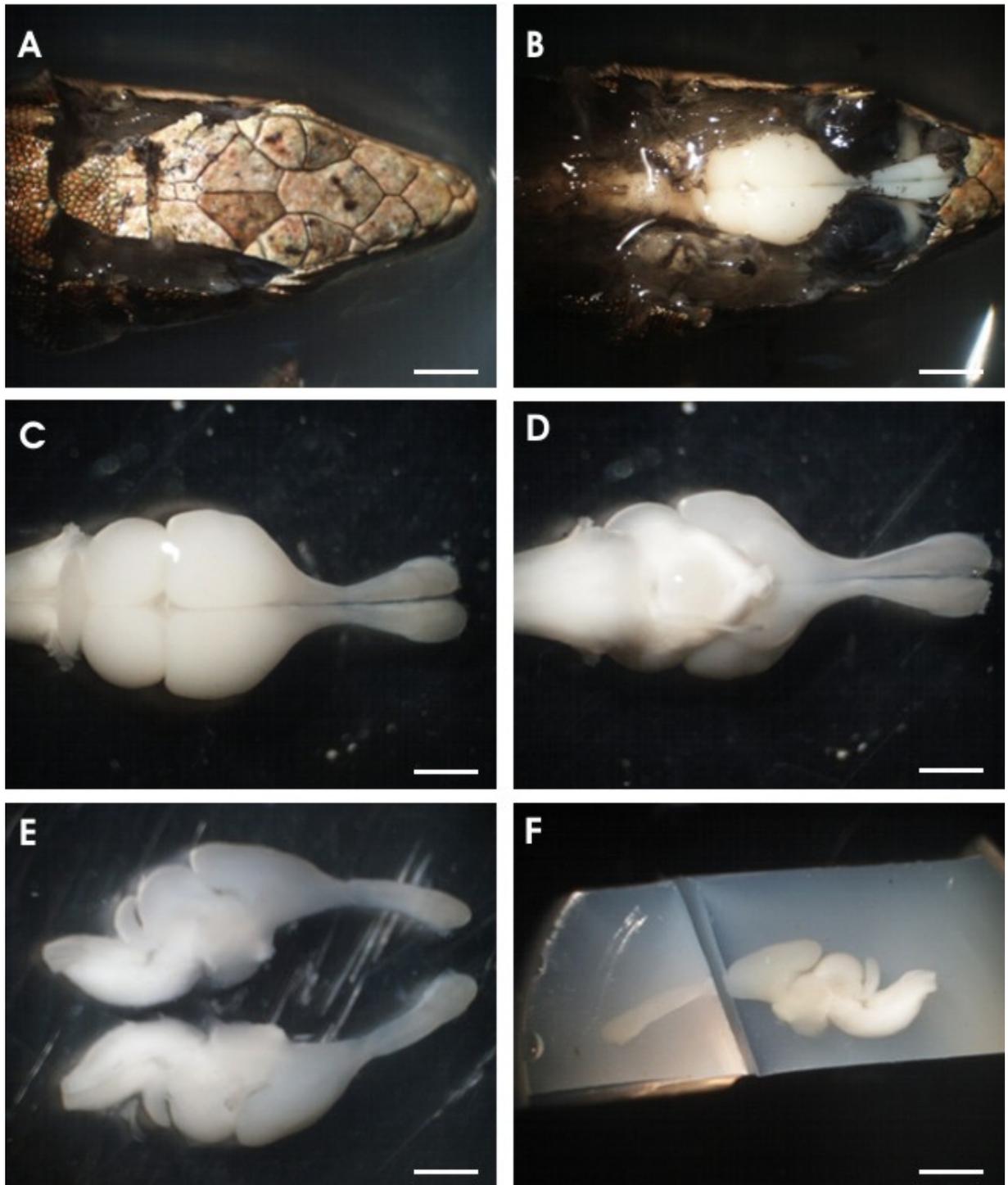


Figura 9: A, B – extração do cérebro de *P. hispanica*; C – cérebro em posição dorsal; D - cérebro em posição ventral; E – cérebro cortado sargitalmente, para posterior retirada das endomeninges e inclusão em ágar; F – hemisfério incluído em ágar. Barra de calibração: 1mm.

4.6 Registro das imagens, reconstrução neuronal e contagem dos neurônios NADPHd positivos

As imagens de neurônios NADPHd positivos foram capturadas a partir de um microscópio ótico e de fluorescência Axioplan da Zeiss, no qual possuía uma câmera digital OLYMPUS DP70 com potência máxima de 12 mega pixels (Fig. 10D).

A reconstrução dos neurônios NADPHd positivos foi realizada de duas formas: por fotos digitais e desenhos em câmara clara. Quanto ao primeiro, a reconstrução realizou-se a partir de fotos digitais das sessões seriadas obtidas do telencéfalo de *P. hispanica*. A elaboração dos desenhos foi realizada com o auxílio de uma câmera clara acoplada a um microscópio modelo OLYMPUS CH30. Em seguida, estes foram escaneados e posteriormente superpostos, orientando-os até obter uma adequada correspondência ou ajuste de todos os elementos neuronais (corpo celular e prolongamentos dendríticos), para que finalmente fosse elaborada uma imagem completa dos neurônios NADPHd positivos. Em ambos os casos utilizou-se o programa Corel Photopaint versão 12 para editoração dessas imagens. O critério de escolha desses neurônios baseou-se na qualidade de detalhes morfológicos apresentados por eles.

Para a contagem do número de neurônios diaforase positivo foi utilizado um microscópio OLYMPUS CH30. A distribuição desses neurônios contabilizados foi realizada de acordo com as seguintes variáveis: faixas etárias, áreas corticais (CM, CDM, CD e CL); camadas corticais (plexiformes e camada celular); níveis telencefálicos (pré-comissural, comissural e pós-comissural); neurônios NADPHd positivos / regiões Timm positivas e neurônios NADPHd positivos / regiões Timm negativas.

Todos os resultados do número de neurônios NADPHd positivos seguiram uma distribuição semelhante àquela apresentada no modelo do tabela 1, pois cada animal utilizado para a realização desta pesquisa permitia a elaboração de uma lâmina, essa lâmina por sua vez apresentava inúmeras fatias de telencéfalo de *P. hispanica*. Desta forma, o número de neurônios NADPHd positivos foi contabilizado por fatia conforme mostra o Esquema 1, e esses subtotais foram distribuídos de acordo com a variável que estava sendo estudada. Por fim, a análise quantitativa foi realizada com base neste padrão de distribuição.

Para que isso fosse realizado foi preciso estabelecer alguns procedimentos metodológico: a) para a realização da contagem do número de neurônios NADPHd positivos em relação as faixas etárias, primeiramente separavam-se as lâminas correspondente as faixas etárias de cada animal, em seguida realizavam-se as contagens a partir de cada fatia contida nas referidas lâminas. Esses resultados foram então distribuídos por fatia / faixas etárias e a

partir disso realizavam-se as análises estatísticas; b) a quantificação do número de neurônios diaforase positivo em relação às outras variáveis foi realizada mediante a contagem desses neurônios em todas as fatias, então distribuíam-se os valores de acordo com cada variável.

Esquema 1: contagem do número de neurônios NADPHd positivos

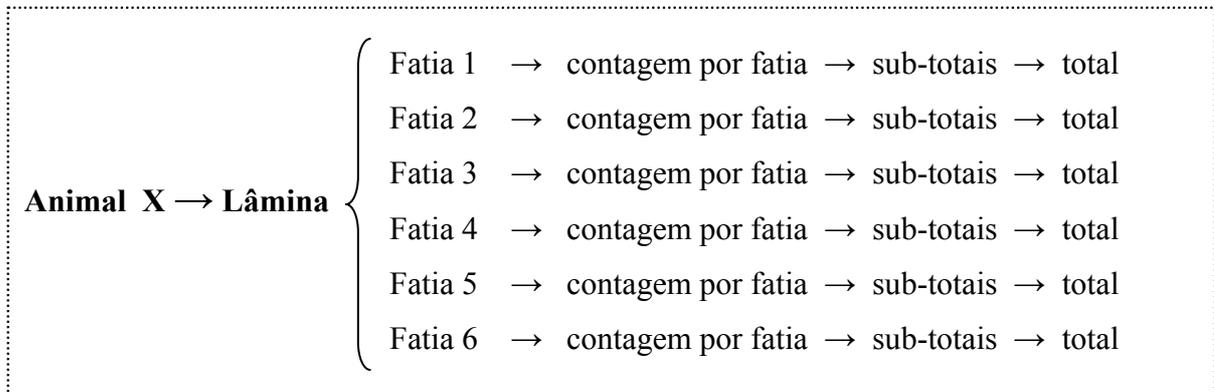


Tabela 1: modelo de distribuição do nº de neurônios NADPHd positivos

Animal	Fatias	Nº de neurônios / níveis telencefálicos			Sub-Total por fatia
		Pré-comissural	Comissural	Pós-comissural	
X	1	50	7	10	67
X	2	34	4	12	50
X	3	67	11	10	88
X	4	70	32	9	111
Y	5	26	9	3	38
Y	6	61	42	7	110
Y	7	30	14	2	46

	Sub-Total por nível telencefálico	338	119	53	
	Total	338	119	53	510

X = animal hipotético

Y = um outro animal hipotético

Os neurônios selecionados para classificação foram comparados com aqueles descritos em répteis por De La Iglesia e López-García (1994, 1997a, b) a partir da técnica de Golgi. No entanto, os trabalhos destes autores se limitam a descrever os neurônios localizados nas plexiformes interna e externa e camada celular do córtex medial, devido a isso foi necessário comparar os dados obtidos nesta pesquisa com os de mamíferos, um deles foi o de Freund e

Buzsáki (1996) que descrevem os interneurônios do hipocampo. Esses autores realizam classificações quanto a arborização dendrítica, projeção axonais etc, no entanto nesta pesquisa classificou-se os neurônios NADPHd positivos em relação a morfologia do seu corpo celular.



Figura 10: A, B – vibrátomo modelo Leica VT1000S, em B enfatiza-se a bandeja onde o cérebro, depois de incluído em ágar, é fixado para a realização dos cortes; C – lupa Olympus com resolução máxima de 80x, câmera digital acoplada (seta) (Olympus DP10); D – microscópio óptico e de fluorescência Axioplan da Zeiss, câmera digital OLYMPUS DP70 (seta).

4.7 Tipos de neurônios NADPHd positivos

Os neurônios NADPHd foram classificados segundo as descrições mencionadas por Alonso et al. (1995), dividindo-os em três diferentes tipos: Tipo I, neurônios de tamanhos grandes a intermediário, que apresentam intensa coloração e muitas ramificações dendríticas; Tipo II, neurônios de tamanhos intermediários a pequeno, com mediana coloração e poucos prolongamentos dendríticos; Tipo III, neurônios pequenos que apresentam pouca coloração e quase nenhum prolongamento dendrítico.

4.8 Estatística

Os dados primeiramente foram analisados para verificar se os mesmos seguiam uma distribuição normal, para tal foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Então, a análise dos dados foi realizada com o emprego dos testes *t* de student e análise de variância (ANOVA de uma via) para as médias, considerando-se um índice de significância de 95% ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média.

A análise estatística do número de neurônios NADPHd positivos nas faixas etárias, nos níveis telencefálicos, nas áreas e camadas corticais, foram realizadas pela ANOVA de uma via, seguida do Teste de Tukey. Já para a análise estatística do número de neurônios NADPHd positivos presentes nas regiões Timm-positivas e Timm-negativas utilizou-se o teste *t* de student.

As diferenças estatísticas entre as variáveis investigadas foram calculadas no programa estatístico Prisma versão 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Análise quantitativa

As fatias do grupo controle negativo que foram submetidas aos testes de especificidade não apresentaram nenhuma marcação de neurônio NOS positivo. No entanto, aquelas que foram submetidas aos meios de incubação que continham o β -NADPH (para a histoquímica NADPHd) e os anticorpos primários reativo a nNOS e sGC α (para imunohistoquímica) apresentaram neurônios NOS positivos.

O estudo do número de neurônios NADPHd positivos no córtex cerebral de *P. hispanica* permitiu a observação de 1897 neurônios. Analisando estes dados observou-se que esses neurônios apresentaram-se distribuídos heterogeneamente no córtex cerebral desse animal, estas diferenciações foram vistas nas seguintes variáveis: faixa etária, nível telencefálico, área cortical, camada cortical e presença de zinco sináptico.

5.1.1 – Faixa etária

Os resultados obtidos pela técnica histoquímica NADPHd mostraram que a expressão de neurônios NADPHd positivos apresenta um decréscimo com o aumento da faixa etária dos animais. Dos 1897 ($n = 80$) neurônios diaforase positivos, 1090 (57,5%) foram encontrados em animais jovens ($n = 31$), 528 (27,8%) neurônios em adultos ($n = 26$) e 279 (14,7%) neurônios em animais senis ($n = 23$) (Fig. 11). Esses dados demonstram que a faixa etária jovem apresenta a maior expressão de neurônios com atividade NADPHd.

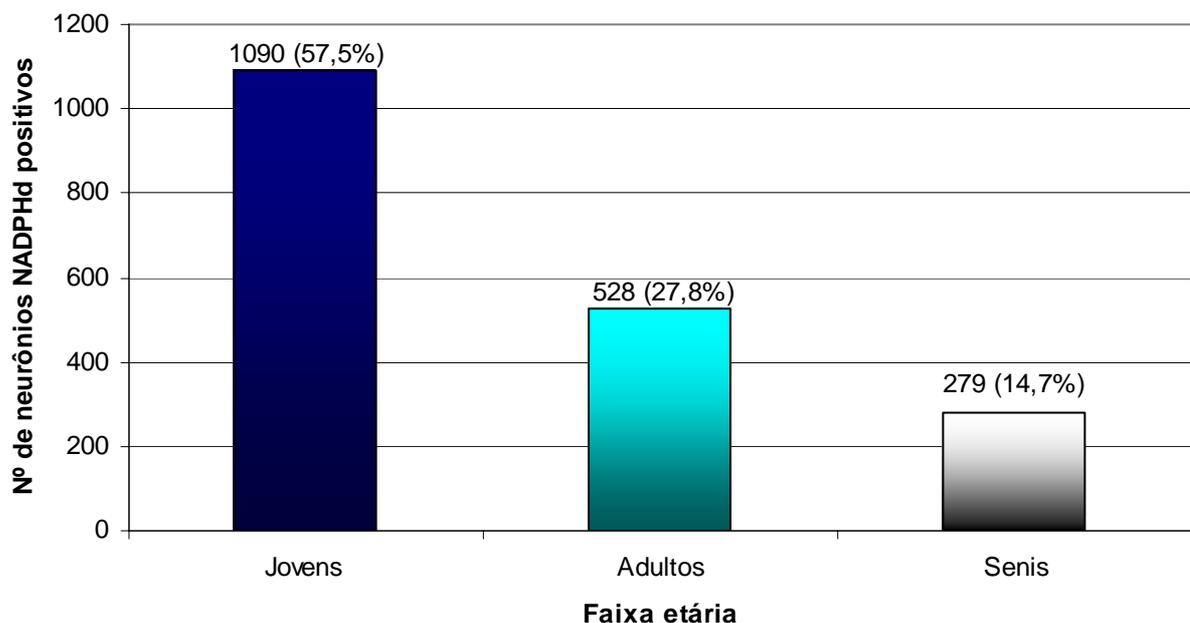


Figura 11: Número de neurônios NADPHd positivos em animais de diferentes faixas etárias.

De acordo com a figura 12, que mostra que decréscimo é significativo entre animais jovens em relação a adultos e senis, no entanto, entre animais adultos e senis esses dados não são estatisticamente significante, ou seja, o número total de neurônios para a faixa etária jovem foi de $35,16 \pm 4,38$ neurônios, no grupo dos animais adultos foi de $21,08 \pm 4,20$ e em animais senis de $10,45 \pm 1,75$.

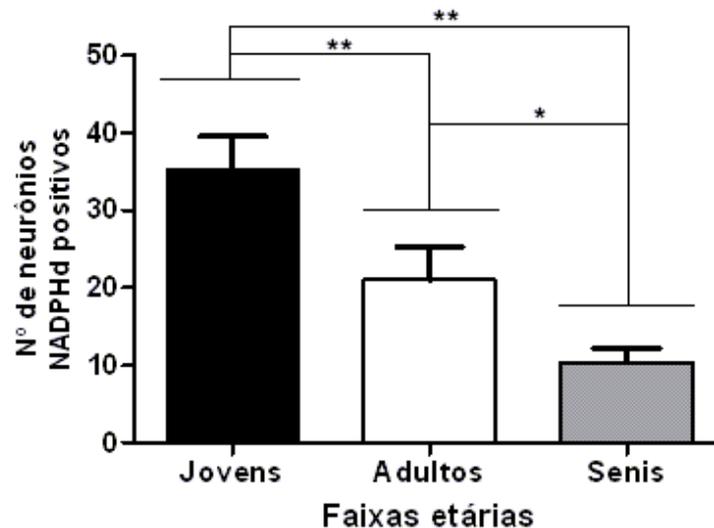


Figura 12: Número médio de neurônios NADPHd positivos em animais de diferentes faixas etárias. Notar que há uma decréscimo significativo na diferença do número de neurônios NADPHd entre animais jovens em relação a adultos e senis, já entre animais adultos e senis isso não ocorre (** $p < 0,05$; * $p > 0,05$; Teste de ANOVA).

5.1.2 – Nível telencefálico

Dados dos três níveis telencefálicos mostraram que 423 (22,3%) neurônios NADPHd positivos localizam-se no nível pré-comissural, 459 (24,2%) no comissural e 1015 (53,5%) no pós-comissural (Fig. 13). Observou-se que o número total desse tipo de neurônio no nível pós-comissural é maior do que a soma dos níveis pré-comissural e comissural.

Então, analisando a figura 14 verifica-se uma diferença significativa no número de neurônios diaforase positivos entre os níveis telencefálicos. No nível pré-comissural quantificou-se $10,07 \pm 1,64$ neurônios, já no comissural esse número foi de $28,69 \pm 5,22$ e no pós-comissural de $46,14 \pm 4,35$.

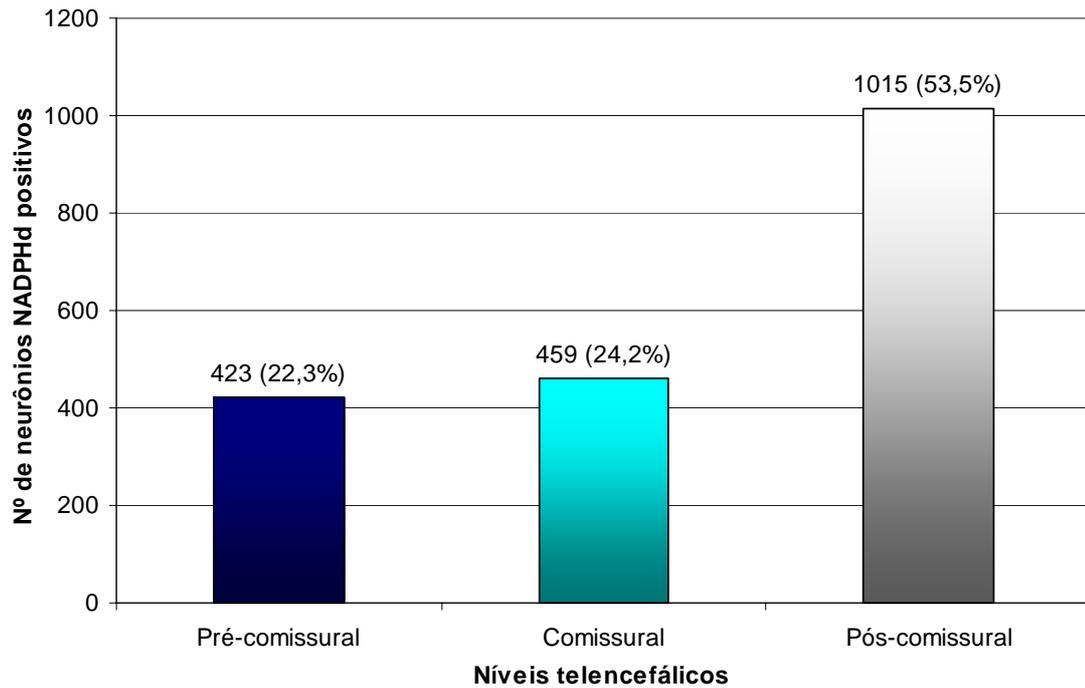


Figura 13: Número de neurónios NADPHd positivos nos diferentes níveis telencefálicos.

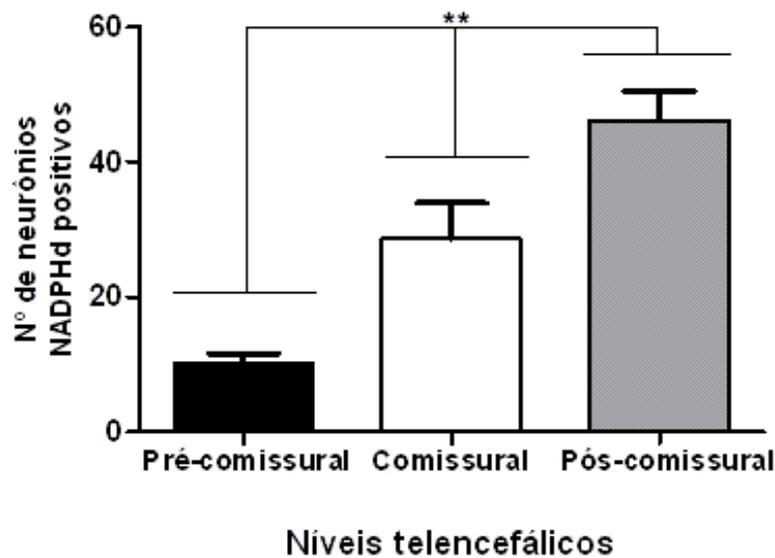


Figura 14: Número médio de neurónios NADPHd positivos em relação aos níveis telencefálicos. Verifica-se que há uma diferença estatisticamente significativa no número de neurónios diaforase positivos entre os diferentes níveis telencefálicos (**p<0,05; Teste de ANOVA).

5.1.3 – Área cortical

O número de neurónios NOS positivos nas diferentes regiões corticais foi bastante heterogêneo, sendo maior no CD [1243 (65,5%)] e CDM [530 (27,9%)] e menor no CM [86

(4,5%) e CL [38 (2%)] (Fig. 15). De acordo com a figura 15, o CD apresenta o maior número de neurônios NADPHd positivos, em contrapartida, o CL apresenta o menor valor.

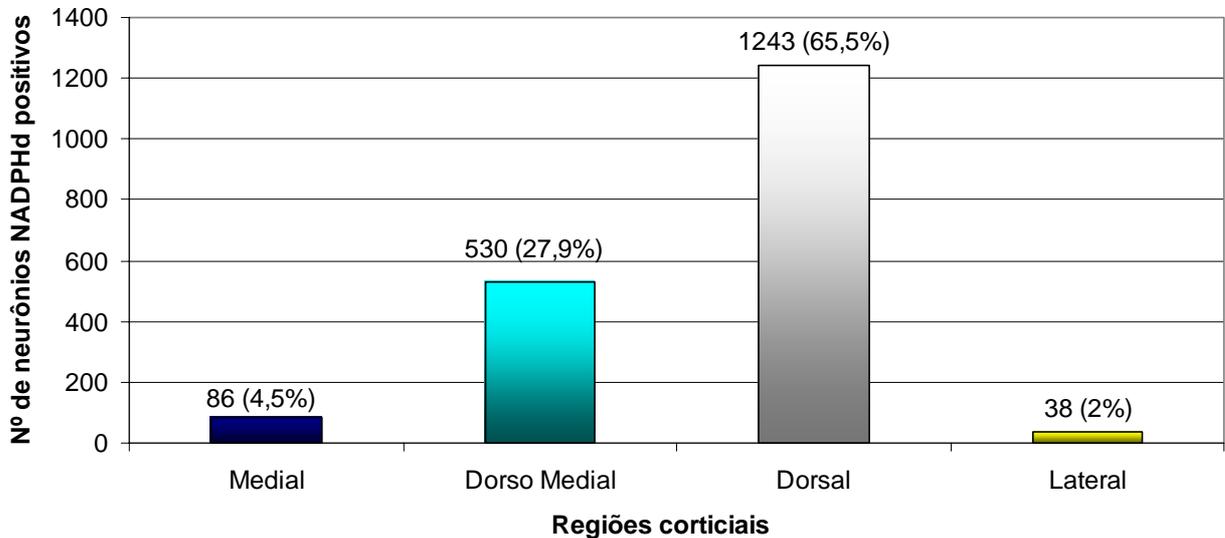


Figura 15: Número de neurônios NADPHd positivos entre as áreas corticais.

Em relação a figura 16 é possível verificar que há uma diferença significativa no número de neurônios diaforase positivos entre o CM, CDM e CD, o que não ocorre entre os córtices medial e lateral. Então, o número de neurônios NADPHd positivos no CM, CDM, CD e CL foi de $1,06 \pm 0,13$ neurônios, $6,54 \pm 0,87$, $15,35 \pm 1,70$ e $0,46 \pm 0,10$ neurônios, respectivamente.

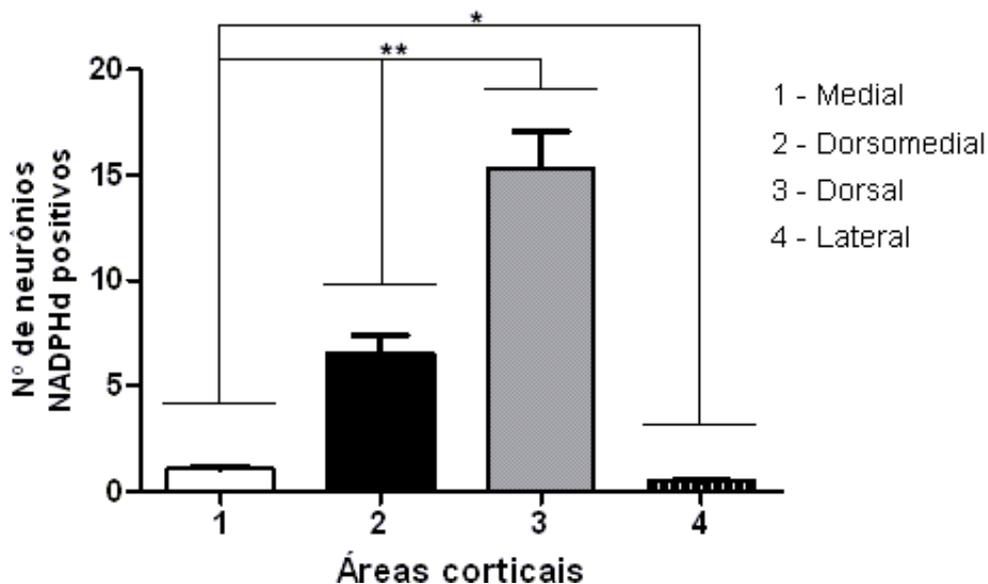


Figura 16: Número médio de neurônios NADPHd positivos entre as regiões corticais. Observa-se uma diferença significativa no número de neurônios diaforase positivos entre os córtices medial, dorsomedial e dorsal e não significativa entre o córtex medial e lateral (** $p < 0,05$; * $p > 0,05$; Teste de ANOVA).

5.1.4 – Camada cortical

Nas camadas plexiformes interna e externa e na camada celular verificou que entre os 1897 neurônios NADPHd positivos marcados em todo córtex, apenas 100 (5,3%) neurônios estavam na camada celular. Ao contrário disso, a plexiforme interna e a externa apresentaram, nesta ordem, os maiores valores do número de neurônios diaforase positivo, 1264 (66,6%) e 533 (28,1%), respectivamente (Fig. 17).

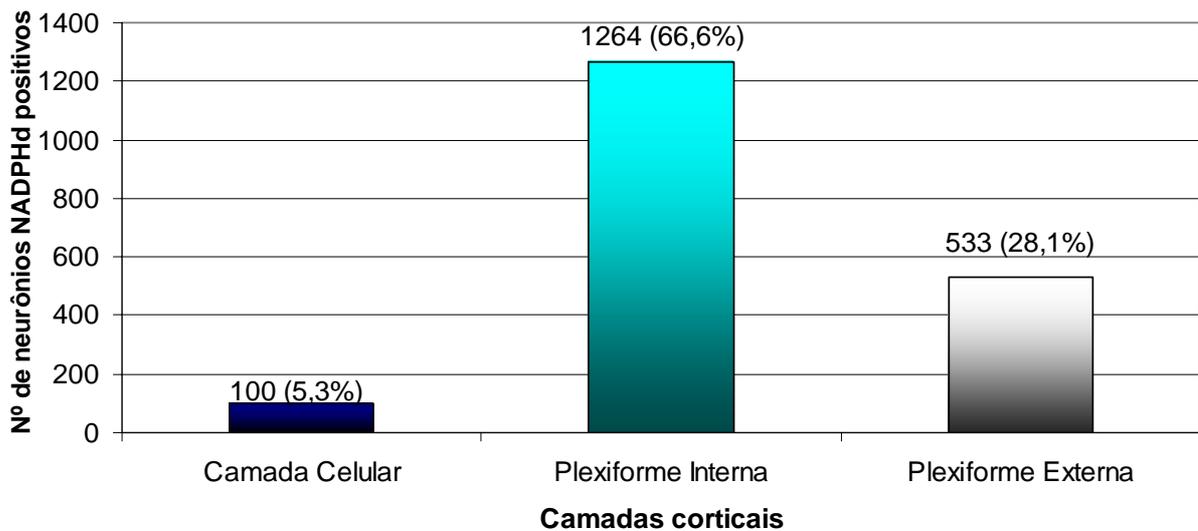


Figura 17: Número de neurônios NADPHd positivos nas camadas corticais.

A comparação dessas três camadas corticais demonstrou que a diferença no número de neurônios NADPHd positivos foi estatisticamente significativa. Na plexiforme interna foram quantificados $15,80 \pm 1,75$ neurônios, na externa $6,66 \pm 0,70$ neurônios e na camada celular $1,25 \pm 0,16$ (Fig. 18).

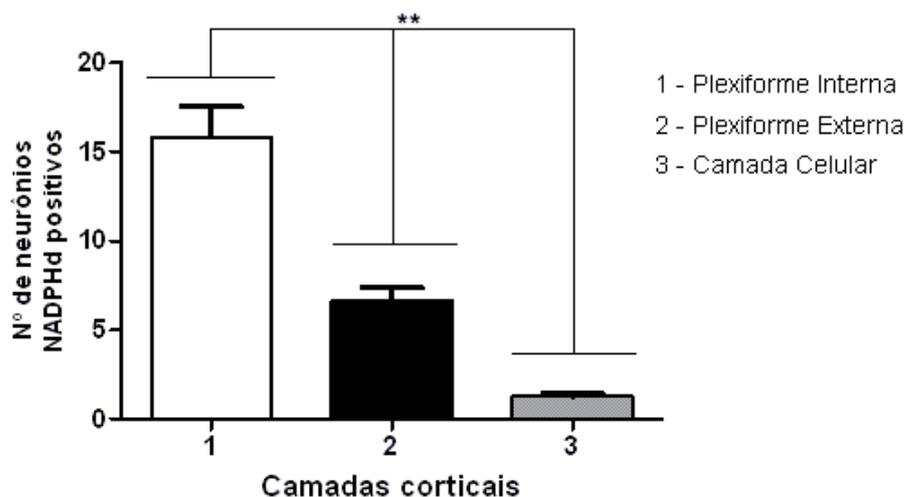


Figura 18: Número médio de neurônios NADPHd positivos nas camadas corticais. Observa-se que o número de neurônios NADPHd positivos foi significativo entre as camadas corticais (** $p < 0,05$; Teste de ANOVA).

Análises comparativas do número de neurônios NADPHd positivos entre as camadas corticais e as áreas corticais demonstraram que a camada plexiforme externa e a camada celular do CM não apresentam expressão de neurônios diaforase positivos. Além disso, verificou-se que a plexiforme interna e a camada celular do CD expressaram os maiores números de neurônios NADPHd (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição do número de neurônios NADPHd positivos entre as camadas corticais das áreas dos córtices.

Córtex	Plexiforme Interna	Plexiforme Externa	Camada Celular
Medial	86	0	0
Dorsomedial	338	154	38
Dorsal	812	372	59
Lateral	28	7	3

5.1.5 – Neurônios NADPHd / Regiões Timm-positivas e Timm-negativas

Os resultados do número de neurônios NADPHd positivos presentes nas regiões Timm-positivas e Timm-negativas demonstraram a existência de 1737 (91,5%) neurônios diaforase positivo na zona Timm-positiva e apenas 160 (8,5%) neurônios na zona negativa (Fig. 19).

Observando a figura 20, pode-se verificar que há uma diferença estatisticamente significativa no número de neurônios NADPHd positivos presentes nas regiões Timm-positivas e Timm-negativas. Os resultados demonstraram um total de $21,71 \pm 2,28$ neurônios nas regiões Timm-positivas e apenas $2,00 \pm 0,24$ neurônios nas Timm-negativas.

A distribuição dos neurônios NADPHd positivos de cada camada cortical em relação as zonas zincérgicas está descrita na tabela 3. Nela destaca-se a total colocalização existente dos neurônios nitrérgicos do CM em relação a região Timm-positiva.

Tabela 3: Distribuição do número de neurônios NADPHd positivos das camadas corticais em relação as regiões Timm-positivas e Timm-negativas.

Córtex	Região Timm-positiva	Região Timm-negativa
Medial	86	0
Dorsomedial	478	51
Dorsal	1144	101
Lateral	28	9

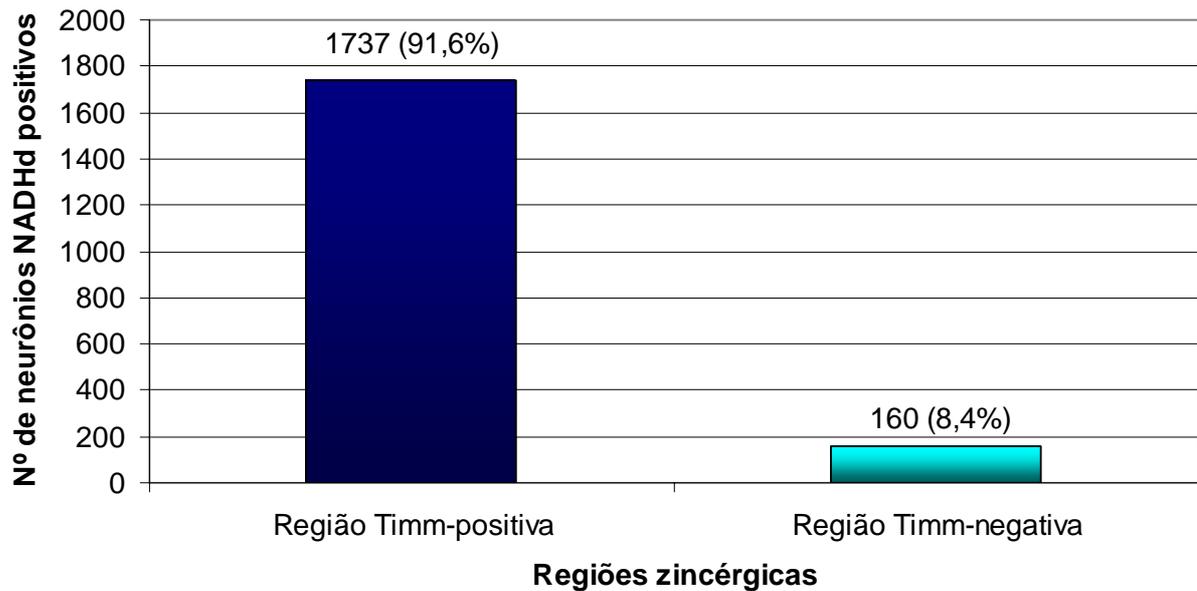


Figura 19: Número de neurônios NADPHd positivos nas regiões Timm-positivas e Timm-negativas.

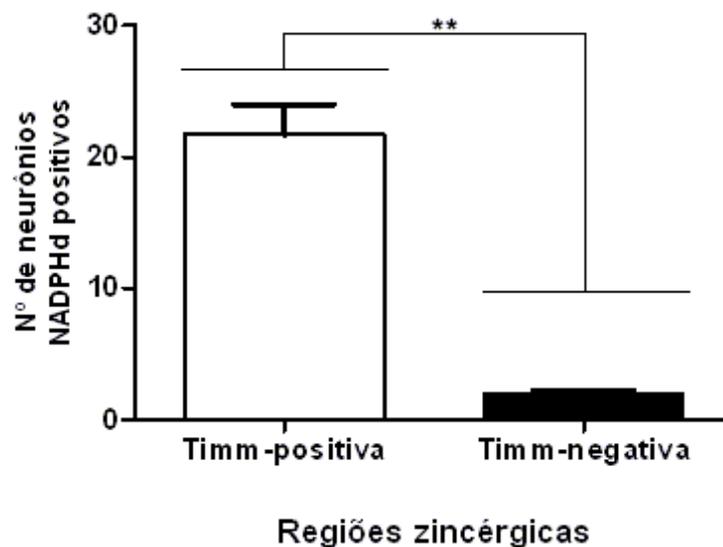


Figura 20: Número médio de neurônios NADPHd positivos distribuídos entre as regiões Timm-positivas e Timm-negativas. Verifica-se que o número de neurônios nas regiões Timm-positivas desse tipo de neurônio é bastante significativo (** $p < 0,05$; Teste t de student).

5.2 Histoquímica NADPHd

Através da técnica histoquímica NADPHd observou-se, nas quatro áreas corticais do telencéfalo de *P. hispanica*, glias radiais, corpos celulares e projeções dendríticas que apresentam atividade NADPHd. Os neurônios com atividade NADPHd positivas se

caracterizaram por terem distintas: morfologias, arborização dendrítica e níveis de coloração, que podiam ser intensos ou não.

5.2.1 Distribuição dos neurônios NADPHd positivos

Os experimentos realizados com o grupo controle negativo em relação a especificidade da técnica histoquímica NADPHd revelaram a ausência de marcação de neurônios NADPHd positivos, a única alteração visualizada foi na tonalidade de cor dos cortes, que ficou levemente amarelo (Fig. 21).

Conforme apresentado no item 5.1 (análise quantitativa) e demonstrado na ilustração 22, verifica-se que a distribuição dos neurônios marcados positivamente não foi homogênea. Desta forma, verificou-se que: a) no nível mais rostral, demonstrado na ilustração com a letra A, observa-se um número bastante reduzido de neurônios NADPHd. Nos outros níveis, a expressão desses tipos de neurônios foi bastante elevada, isso pode ser comprovado no nível pós-comissural (Fig. 22E), que expressou um total de 1015 neurônios NADPHd positivos; b) observando o esquema da figura 22 é possível verificar que o CDM e o CD apresentaram o maior número de NADPHd positivos; c) na plexiforme externa há um número menor de neurônios nitrérgicos do que a plexiforme interna, isso pode ser observado nas camadas corticais da figura 22D e 22E. Outra observação bastante importante está relacionada à ausência de neurônios nitrérgicos na plexiforme externa do córtex medial (Fig. 23).

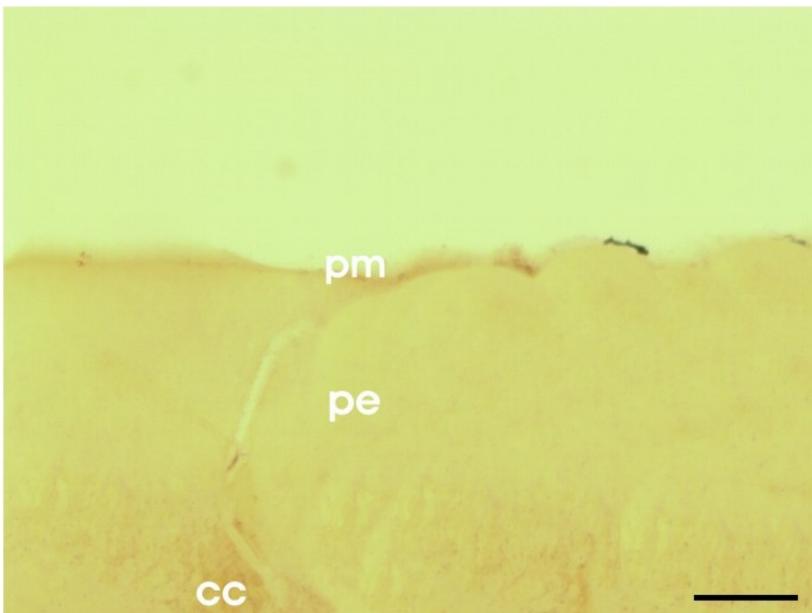


Figura 21: Corte transversal de telencéfalo de *P. hispanica* no qual se testou a especificidade da técnica histoquímica NADPHd a partir de um grupo controle negativo. Nele observa-se a ausência de neurônios NADPHd positivos. Barra de calibração: 200 μ m.

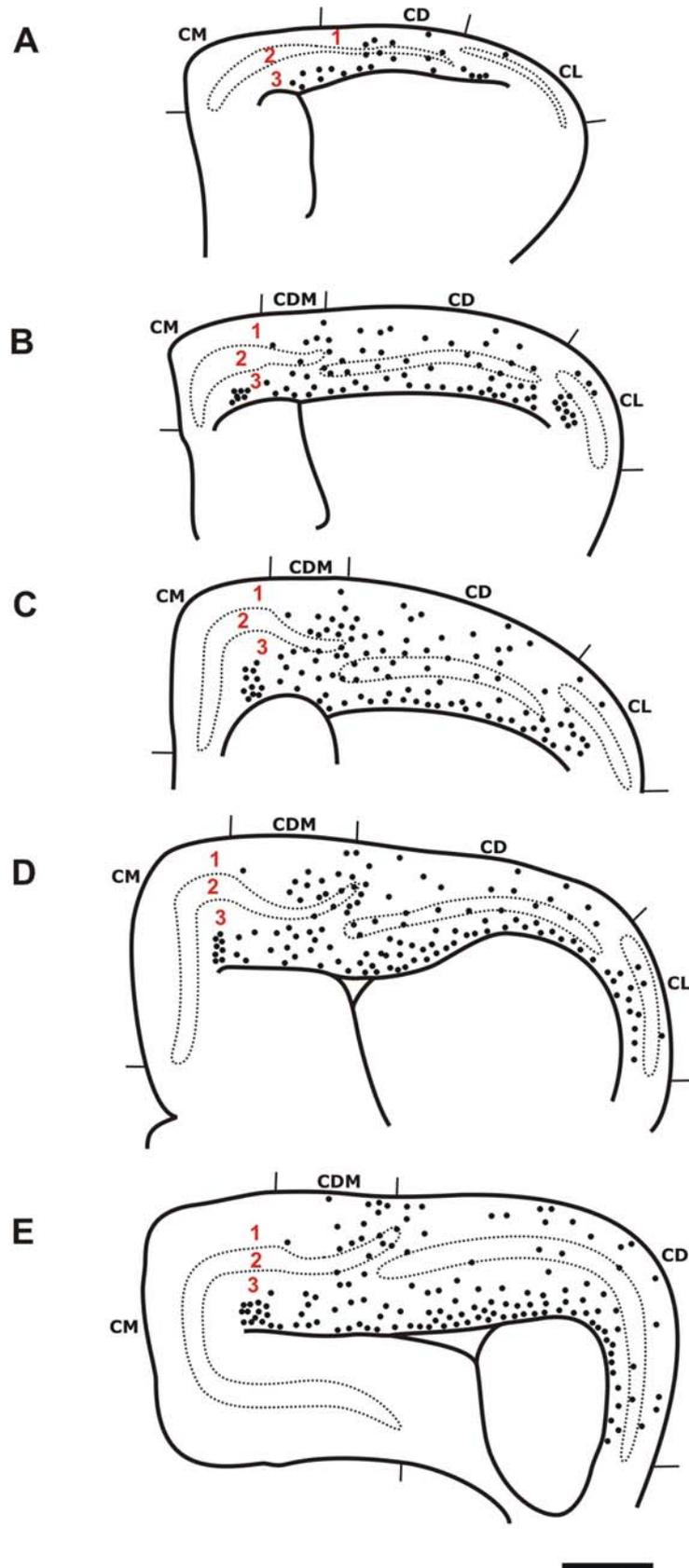


Figura 22: Diagrama de cortes transversais de telencéfalo de *P. hispanica* demonstrado em três diferentes níveis telencefálicos: pré-comissural (A – C), comissural (D) e pós-comissural (E). Observa-se a distribuição de neurônios marcados positivamente pela técnica histoquímica de NADPHd (círculos pretos). 1 – plexiforme externa, 2 – camada celular, 3 – plexiforme interna. CM, CDM, CD, CL = córtex medial; dorsomedial; dorsal e lateral. Barra de calibração: 500 μm.

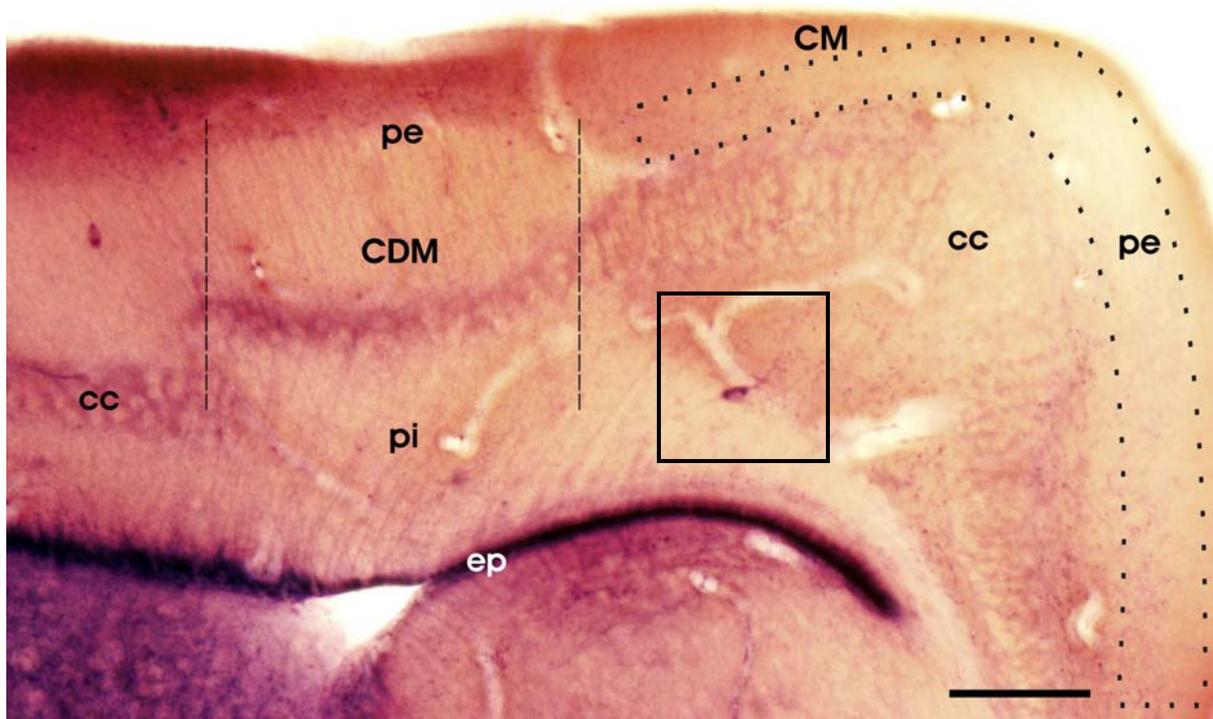


Figure 23: Fotografia enfatizando duas áreas corticais (dorsomedial e medial) do telencéfalo de *P. hispanica*, nela pode-se observar a inexistência de neurônios NOS positivos na plexiforme externa do córtex medial, enquanto que na plexiforme interna desse mesmo córtex há a presença de apenas um neurônio (quadrado). CM = córtex medial, CDM = córtex dorsomedial; pe = plexiforme externa; pi = plexiforme interna; cc = camada celular; ep = epêndimo. Barra de calibração: 250 μ m.

5.2.2 Tipos de neurônios NADPHd positivos

O estudo da marcação dos neurônios produtores da enzima NADPHd revelou a existência de 3 tipos neuronais, neurônio do Tipo I, II e III (Fig. 24). Esses tipos de neurônios foram vistos em animais de diferentes faixas etárias, nos níveis telencefálicos e nas áreas e camadas corticais.

Os dados apresentados nesta pesquisa demonstram que:

- a) entre animais de diferentes faixas etárias há uma mudança no tipo de neurônio, aqueles mais jovens apresentam um grande número de neurônio Tipo I, enquanto que os senis apresentam, principalmente, os do Tipo II e III. Ou seja, os neurônios diaforase positivos dos animais jovens apresentam, principalmente, uma intensa coloração e uma arborização dendrítica bastante evidente, já aqueles dos animais senis essas características não se repetem;
- b) os neurônios dos níveis pré-comissural e comissural apresentam características semelhantes, ou seja, são do Tipo I, II e III, no entanto, aqueles do pós-comissural são principalmente do Tipo II e III. Embora o número de neurônios diaforase positivo

tenha sido o mais elevado neste último nível, seus neurônios se caracterizam por possuir prolongamentos dendríticos bastante reduzidos e não são direcionados, como os do Tipo I de animais jovens e adultos, para a camada celular;

- c) entre as regiões corticais observou-se que o CDM e CD apresentam neurônios do Tipo I, II e III, no entanto, o CM e o CL apresenta neurônios, principalmente, do Tipo II e III. Os neurônios NADPHd positivos encontrados nos CDM e CD podem apresentar prolongamentos dendríticos que se estendem desde da plexiforme interna até a plexiforme externa, passando pela camada celular. Esse evento não foi observado nas outras duas regiões corticais. Além disso, verificou-se em algumas preparações que neurônios pertencentes ao CDM emitiam projeções contralaterais em direção a camada granular do CM. Essas mesmas observações quando realizadas em neurônios nitrérgicos do CL demonstravam apenas a existência de prolongamentos dendríticos que se projetavam paralelamente a camada celular;
- d) nas plexiformes interna e externa foram evidenciados neurônios dos três tipos, no entanto, na camada celular observou-se apenas neurônios do Tipo I (Fig 25). Esses três tipos de neurônios puderam ser vistos nas plexiformes de animais de diferentes faixas etárias, no entanto, a plexiforme interna das fatias correspondente a animais da faixa etária jovem apresentou, principalmente, neurônios do Tipo I, quando se analisaram as plexiformes dos níveis pós-comissurais, percebeu-se que a plexiforme interna possuía uma maior frequência de neurônios do Tipo II, enquanto que a plexiforme externa do Tipo III.

Observações a respeito dos neurônios NADPHd positivos localizados próximo ao epêndimo verificaram que estes, quando marcados, são todos do Tipo I, ou seja, apresentam uma coloração e prolongamentos dendríticos bastante intensos, o que não permite a diferenciação entre seu núcleo e corpo celular. Ao observar a figura 24C, verifica-se que esse tipo de neurônio emite prolongamentos dendríticos que se projetam para a camada celular. Análises comparativas entre esses três tipos de neurônios evidenciados pela técnica NADPHd com os resultados de imunohistoquímica frente a nNOS demonstram uma semelhança nos tipos de neurônios evidenciados pelas duas técnicas. Mesmo existindo essa semelhança entre ambas as técnicas, os resultados obtidos pela histoquímica NADPHd possibilitam mais detalhamento nas características dos neurônios.

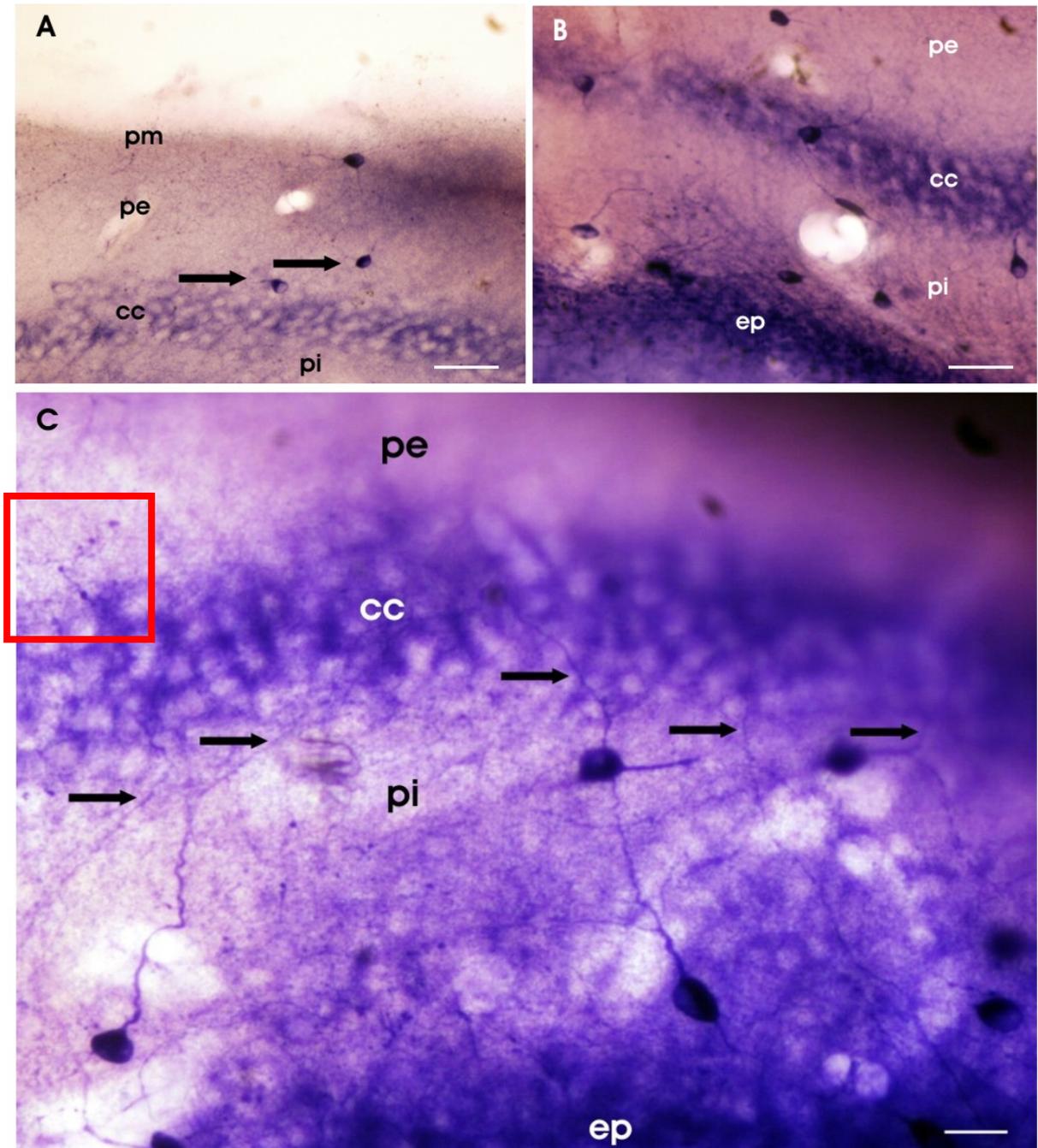


Figura 24: A, B e C - Cortes transversais do telencéfalo de *P. hispanica* apresentando neurônios com atividade NADPHd. A – Observa-se a existência de neurônios do Tipo II (setas) localizados na plexiforme externa, no entanto, nas imagens B e C pode-se observar neurônios do Tipo I povoando a plexiforme interna. Um outro resultado bastante importante faz referência aos neurônios localizados anexo ao epêndimo, como pode ser visto na imagem C. Nesta vê-se arborizações dendríticas (setas) voltadas para a camada celular, além disso, pode-se observar neurônios Tipo I próximo ao epêndimo (ep). Ainda em relação à imagem C, observa-se a presença de prolongamentos dendríticos que se iniciam na plexiforme interna e estendem-se até a plexiforme externa (retângulo em vermelho), tais características são evidentes, principalmente, em animais da faixa etária jovem. CC = camada celular; ep = epêndimo; pi = plexiforme interna; pe = plexiforme externa. Barra de calibração: 200 μ m (A), 150 μ m (B), 100 μ m (C).

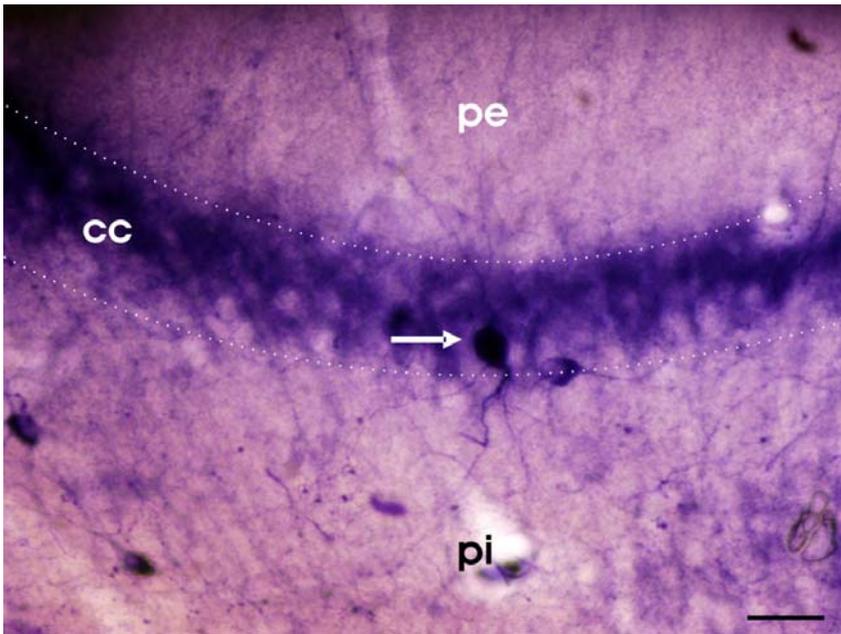


Figura 25: Fotografia enfatizando neurônio NADPHd positivo presente na camada celular (seta) do córtex dorsomedial. Pode-se observar que esse neurônio apresenta intensa coloração gerada pela marcação NADPHd, nele não é possível diferenciar o corpo celular de seu núcleo (neurônio Tipo I). pe = plexiforme externa; cc = camada celular; pi = plexiforme interna. Barra de calibração: 100 μ m.

A histoquímica NADPHd possibilitou, ainda, a marcação em duplo neurônio diaforase positivo, podendo cada um apresentar distintas intensidades de coloração (Fig. 26). Esses resultados foram quantificados com uma ocorrência bastante baixa, apenas três vezes entre todas as fatias observadas. Além disso, as características histoquímicas apresentadas por esses neurônios sugerem ou a existência de alguma forma de sinapse ou a interligação de ambos por uma estrutura que permita a livre passagem de íons ou pequenas moléculas, como as junções comunicantes. No entanto, deve-se destacar que o NO é uma molécula bastante pequena e por sua vez tem uma livre passagem pelas membranas, o que vem a permitir sua difusão entre tais neurônios.

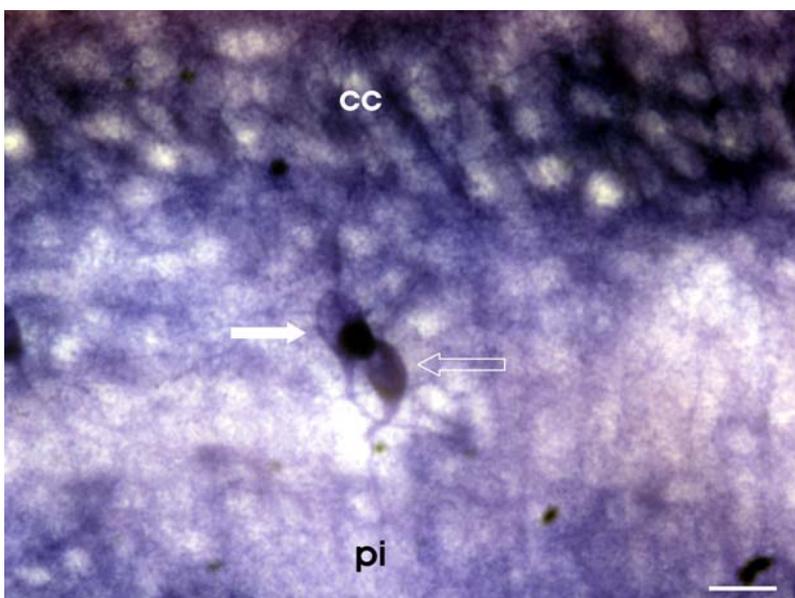


Figure 26: Corte transversal de telencéfalo apresentando dois neurônios NADPHd positivos próximo a camada celular do córtex dorsal. Eles encontram-se localizados na plexiforme interna (pi), entre a camada celular (cc) e o epêndimo (não observado na imagem). O neurônio que se observa posicionado a esquerda apresenta um nível de coloração diferenciada em relação ao da direita (Tipo II o da esquerda e Tipo I o da direita). Essa evidência sugere que mesmo havendo uma possível interligação celular entre eles, há uma diferenciação no nível de coloração de ambos. cc = camada celular; pi = plexiforme interna. Barra de calibração: 50 μ m.

As arborizações dendríticas dos neurônios NADPHd positivos foram de dois tipos: espessas ou finas. O nível de projeção dendrítica variou de acordo com a região cortical que esses neurônios ocupavam. No CM, elas foram principalmente do tipo fina, embora tenha havido a presença daquelas do tipo espessa; no CDM, CD e CL presenciou-se os dois tipos de prolongamentos dendríticos.

Quanto ao direcionamento dos prolongamentos dendríticos verificou-se que eles variavam em relação às áreas corticais. Aqueles do CD e CDM apresentavam, por exemplo, projeções dendríticas perpendiculares a camada celular, em contrapartida, verificou-se a existência de neurônios com prolongamentos contralaterais, que foram observados no CDM. Além de se projetarem em direção a camada celular, muitas fibras dendríticas distribuíam-se paralelamente ao epêndimo. Esses dados foram observados em prolongamentos dendríticos que se encontravam próximo ao epêndimo do CM e CL.

5.2.3 Glias radiais

A histoquímica NADPHd revelou, também, a marcação de glias radiais (Fig. 27). Os resultados mostraram que as projeções dessas ependimoglias iniciavam na região do epêndimo e estendiam-se pelas plexiformes interna em direção a pia máter. Elas foram observadas nas quatro regiões corticais, além disso, foram identificadas em vasos sanguíneos, formando uma malha de fibras “end-feet” ou “sucker processes”. Dessa forma, atuam como uma barreira hematopoiética cerebral, juntamente com as células endoteliais e a lâmina basal.

Resultados comparativos entre animais jovens, adultos e senis puderam mostrar que a marcação de glias radiais em senis foi bastante reduzida (Fig. 27E e F), o que não ocorria com animais das faixas etárias jovens e adultas (Fig. 27A - D). Em animais senis a pouca marcação de glias radiais começava a ocorrer depois de um período de tempo relativamente longo, ou seja, passados mais de uma hora e meia de permanência dos cortes no meio de incubação para histoquímica de NADPHd começava-se a observar a marcação das ependimoglias, e esse processo pouco se desenvolvia durante o passar do tempo. Uma outra observação bastante importante relativa a animais desta idade foi o fato de que o aparecimento dos primeiros neurônios NADPHd positivos ocorria depois de um tempo relativamente longo, no intervalo de uma a duas horas. Por fim, assim como nos animais jovens e adultos, aqueles revelavam neurônios nitrérgicos primeiramente no córtex dorsomedial e dorsal e, posteriormente, no córtex medial.

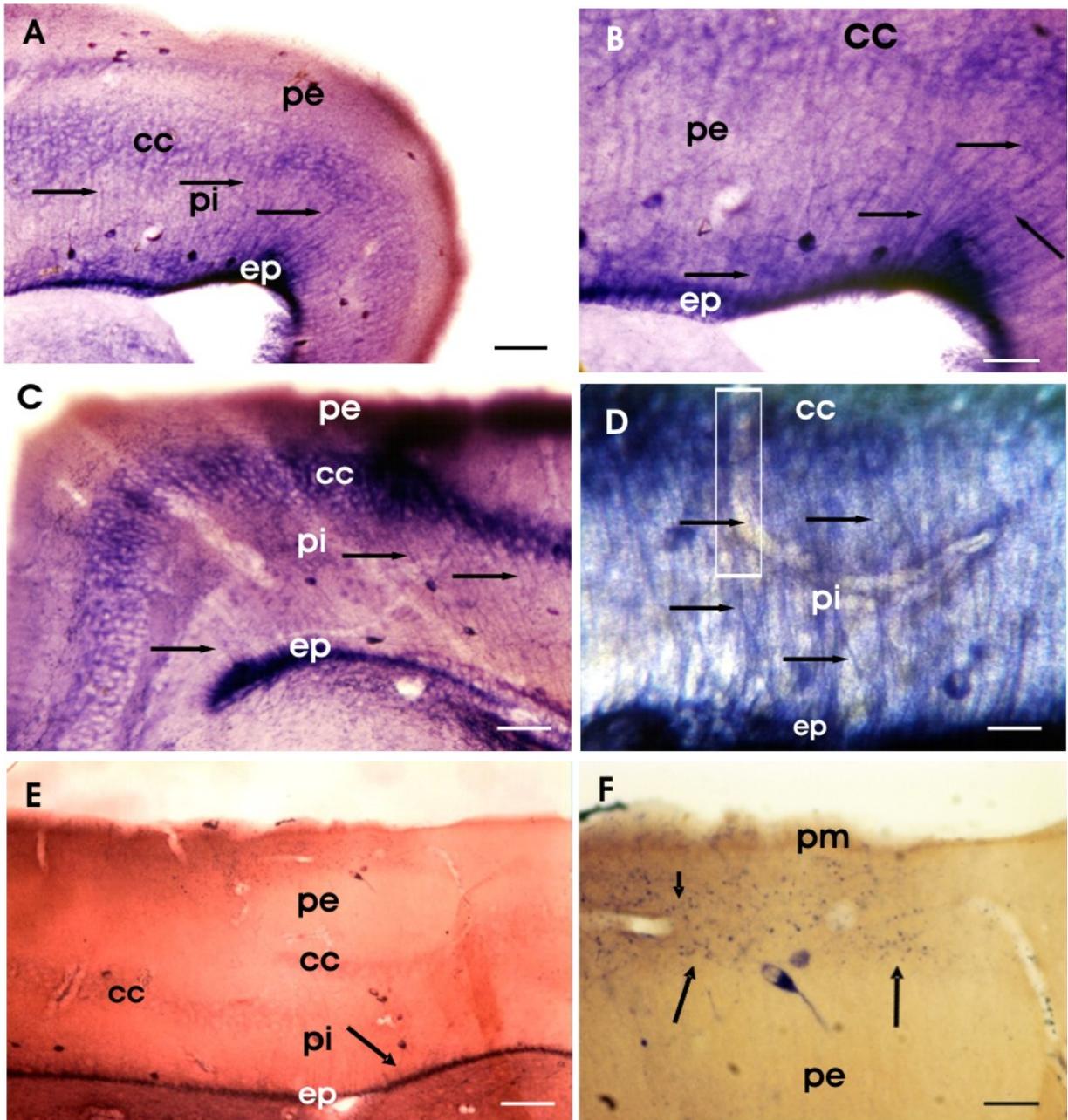


Figura 27: Fotografias de regiões corticais do cérebro de *P. hispanica* onde se demonstra a reatividade de glias radiais, entre animais jovens (A e B), adultos (C e D) e senis (E e F), diante da técnica histoquímica de NADPHd. Observa-se que em animais jovens e adultos há uma intensa marcação nas projeções de glias radiais (setas), o mesmo não ocorre em animais senis que apresentam uma marcação bastante discreta de endimoglias (seta E). Em D, nota-se a presença de glias radiais em vasos sanguíneos (retângulo). Em F é visualizado a plexiforme externa do CDM, nela e observada a presença de um neurônio NADPHd positivo e inúmeros botões sinápticos (setas) distribuídos de forma dispersa. pe = plexiforme externa; cc = camada celular; pi = plexiforme interna; ep = epêndimo. Barra de calibração: 250 μ m (A, C e E), 150 μ m (B), 50 μ m (D, F).

5.2.4 Morfologias dos neurônios NADPHd positivos

Embora a técnica histoquímica NADPHd possibilite a visualização de neurônios “golgi like”, verificou-se que nenhum dos neurônios NADPHd positivos apresentou aferências axonais, ao contrário disso, claramente observou-se botões sinápticos distribuídos

nas plexiformes. Estes botões sinápticos distribuíram de duas formas: paralelos ao epêndimo, semelhantes a feixes de fibras, ou dispersos, como aqueles visualizados próximos a camada celular da plexiforme interna (Fig. 28).

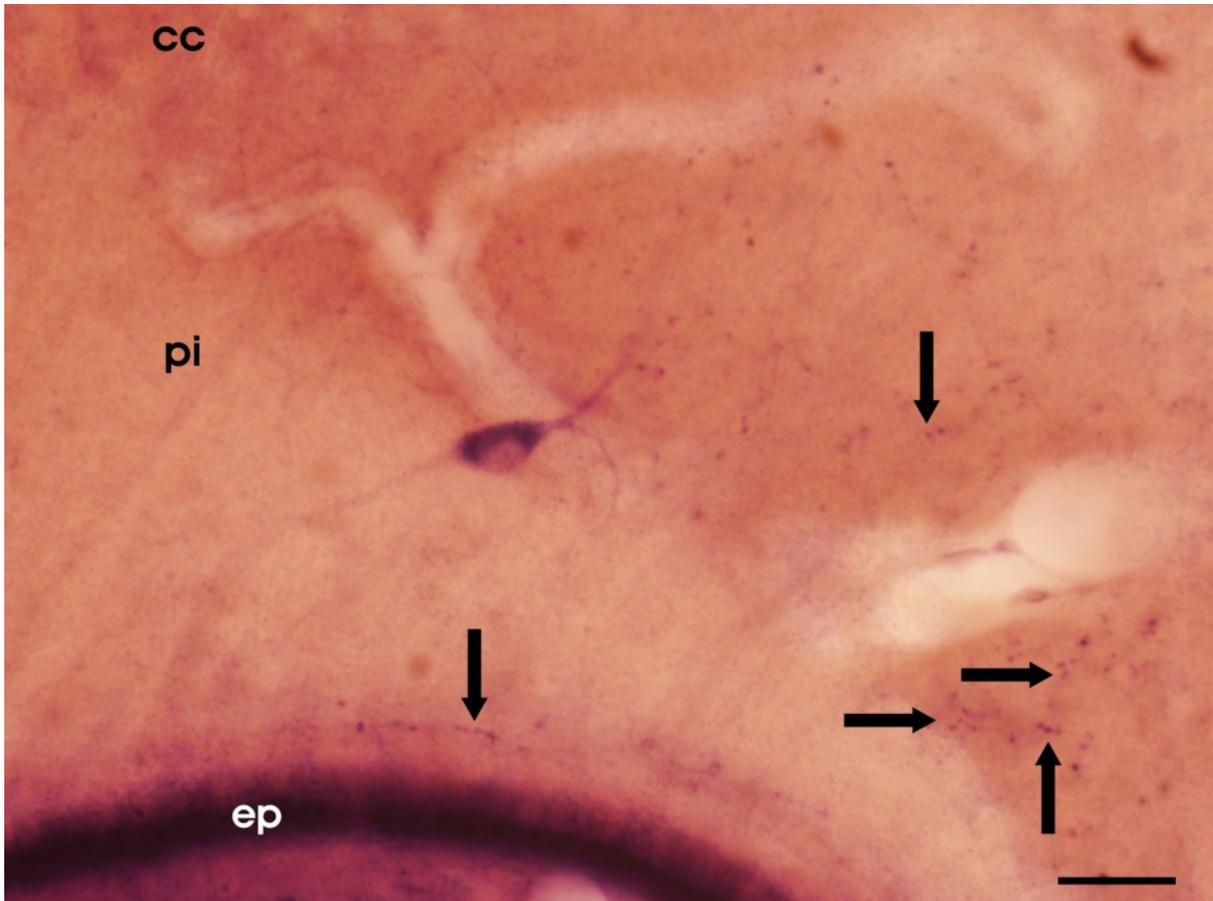


Figure 28: Corte transversal de telencéfalo de *P. hispanica* no qual se visualizam botões sinápticos (setas) e sua distribuição na plexiforme interna. Pode-se verificar que aqueles que estão próximo ao epêndimo se distribuem paralelamente a este, no entanto, os que estão localizados em regiões mais distantes apresentam uma distribuição dispersa. Vê-se ainda um neurônios NADPHd positivo com pouca arborização dendrítica (Tipo II). cc = camada celular; pi = plexiforme interna; ep = epêndimo. Barra de calibração: 50 μ m.

Conforme é apresentado nas figuras 29 e 30, a técnica histoquímica NADPHd revelou a existência de 15 tipos de neurônios morfologicamente distintos no córtex cerebral de *P. hispanica*, a saber: piramidal, buquê duplo, estrelado, sarmentoso, polimorfo, ectópico vertical, multipolar, coral, granular unipolar, radial grande, horizontal bipolar, horizontal unipolar, vertical liso, esferoidal e fusiforme.

Suas disposições nas áreas corticais, em relação à camada granular, foram de duas formas: vertical e horizontal. Aqueles que se encontravam próximo a pia máter normalmente assumiam a posição horizontal, no entanto os neurônios localizados próximos a camada celular, tanto da plexiforme interna como da externa, apresentavam as duas disposições. Diferentemente dos outros três córtices, que apresentaram neurônios diaforase positivos nas

posições verticais e horizontais, no CL esses neurônios estavam distribuídos apenas na posição horizontal.

Os diferentes tipos morfológicos de neurônios NADPHd positivos são:

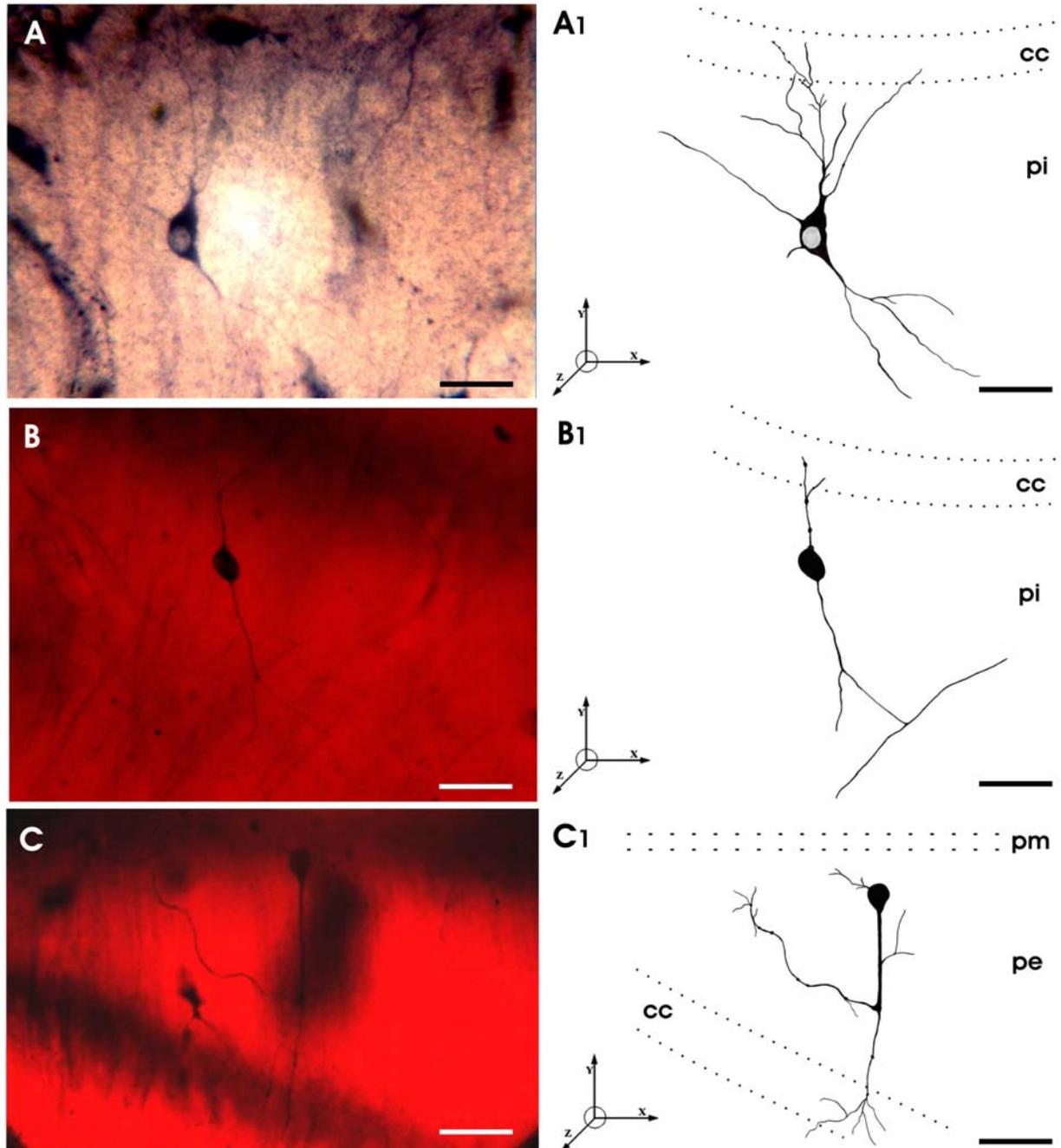


Figura 29: Fotografias digitais das diferentes morfologias de neurônios NADPHd positivos no córtex cerebral de *P. hispanica* (A – O) e seus respectivos desenhos realizados em câmera clara (A1 – O1). Podemos observar que os neurônios marcados positivamente apresentam diferentes níveis de tonalidades em seu corpo celular e núcleo, além disso, verifica-se que esses neurônios geralmente projetam sua arborização dendrítica em direção a camada celular (A – I, M – O). A – neurônio piramidal, B – neurônio double bouquet, C – neurônio deep stellate. pm = pia máter; pe = plexiforme externa; CC = camada celular; pi = plexiforme interna. Barra de Calibração: 50 μ m.

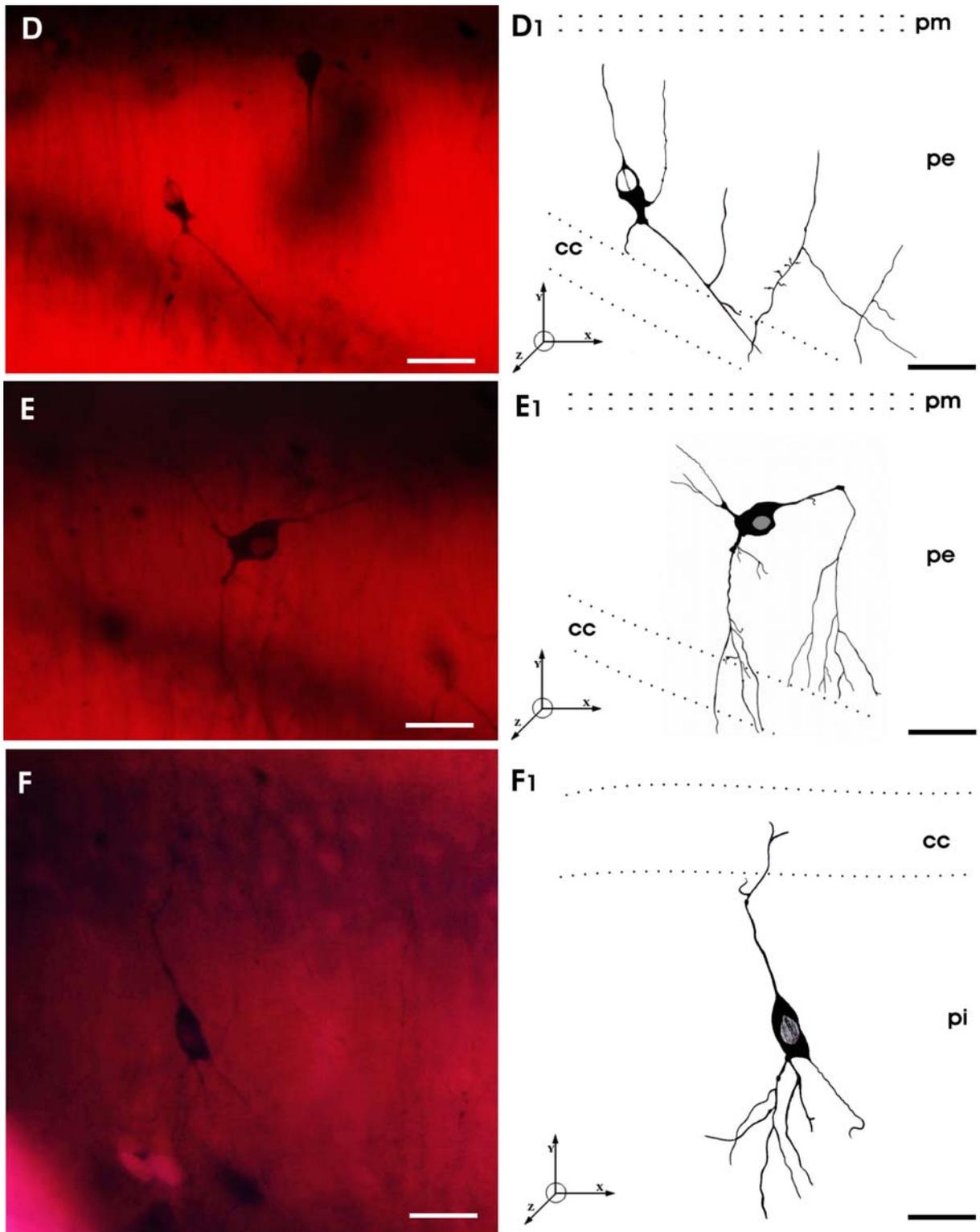


Figura 29: D – neurônio sarmentoso, E – neurônio polimorfo, F – neurônio ectópico vertical. pm = pia máter; pe = plexiforme externa; CC = camada celular; pi = plexiforme interna. Barra de Calibração: 50 μm .

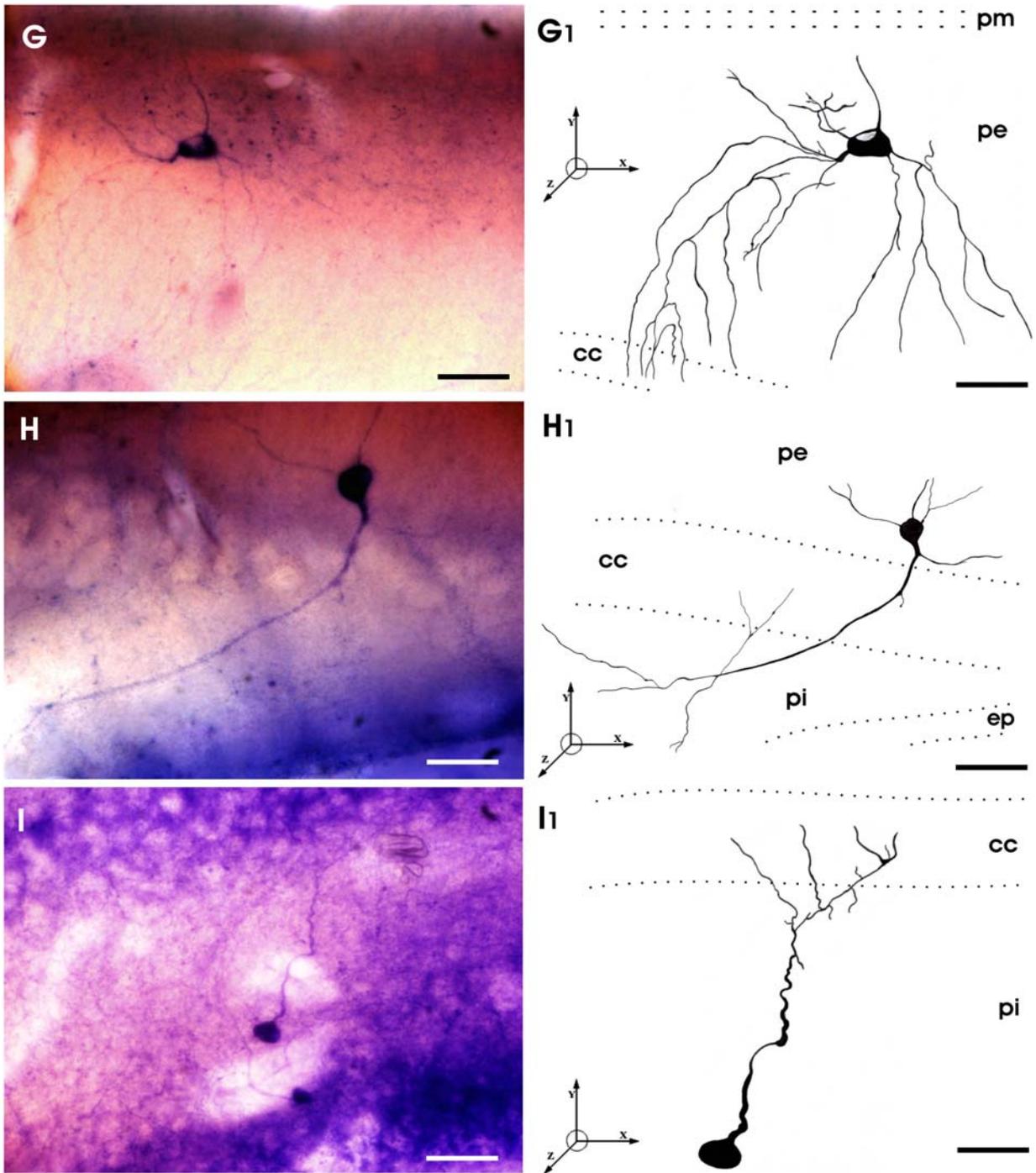


Figura 29: G – neurônio multipolar, H – neurônio coral, I – neurônio granular unipolar. pm = pia máter; pe = plexiforme externa; CC = camada celular; pi = plexiforme interna; ep = epêndimo. Barra de Calibração: 50 μ m.

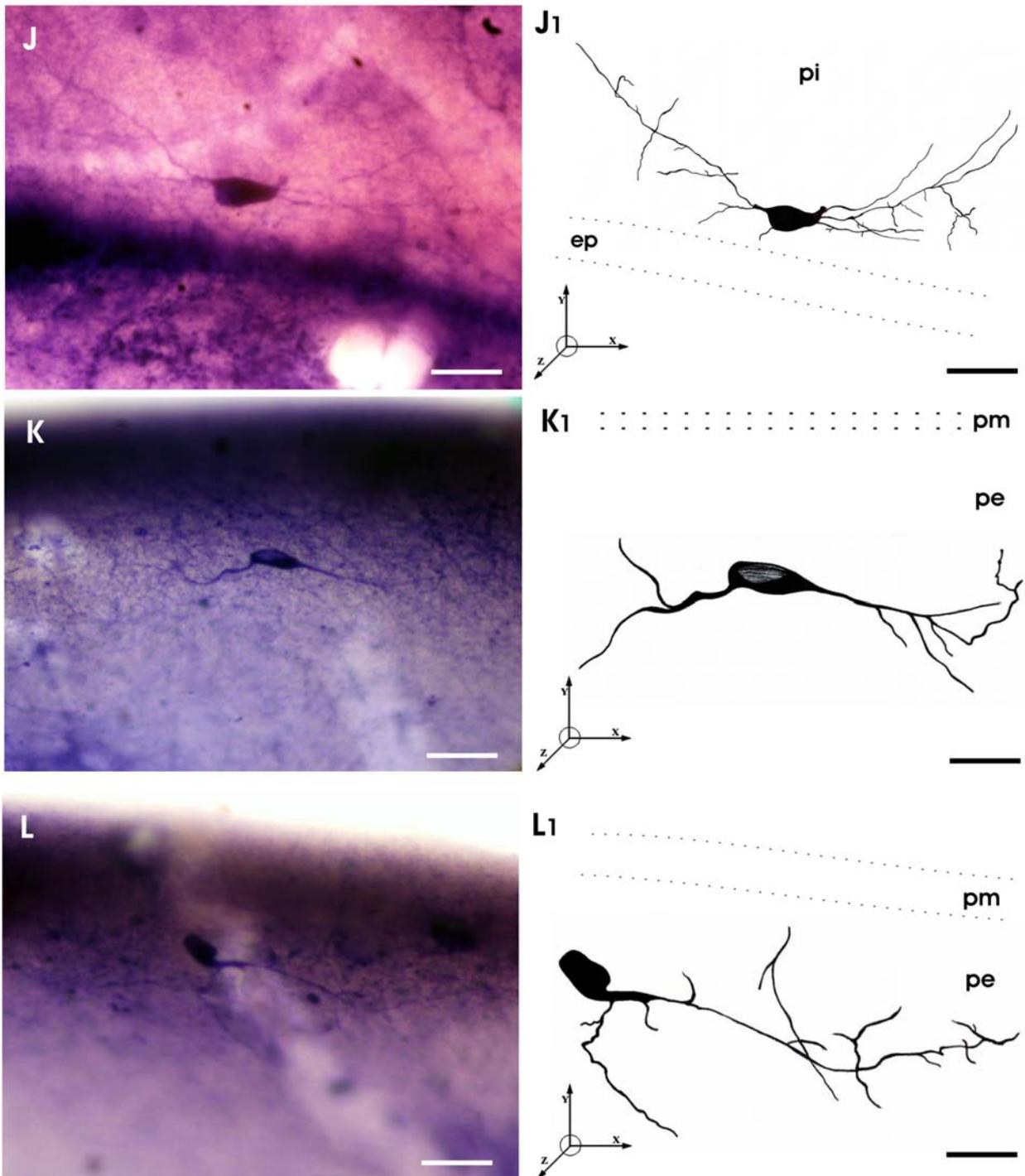


Figura 29: J – neurônio radial largo, K – neurônio horizontal bipolar, L – horizontal unipolar. pm = pia máter; pe = plexiforme externa; CC = camada celular; pi = plexiforme interna; ep = epêndimo. Barra de Calibração: 50 µm.

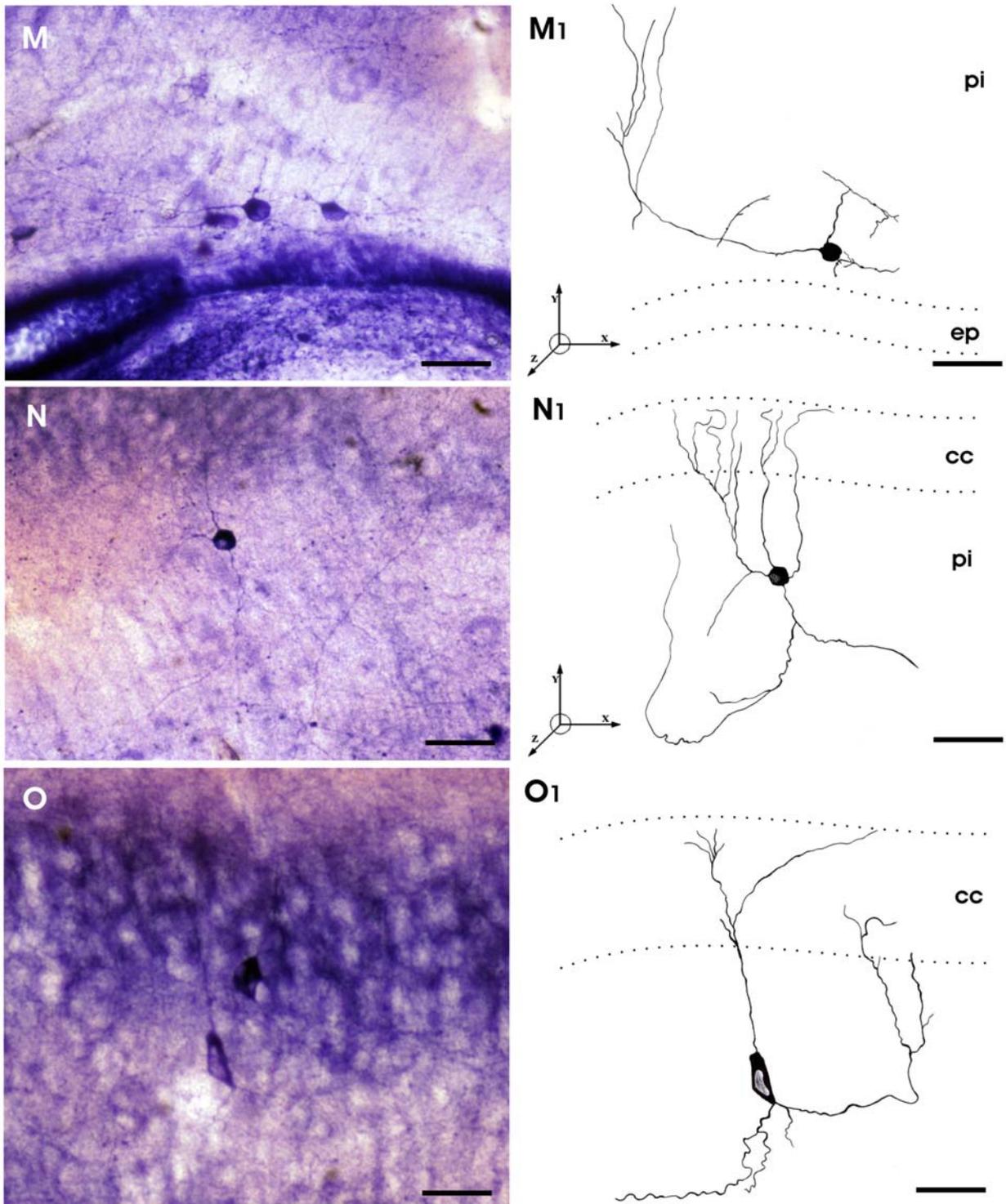


Figura 29: M – neurônio smooth vertical, N – neurônio esferoidal, O – neurônio fusiforme. pm = pia máter; pe = plexiforme externa; CC = camada celular; pi = plexiforme interna; ep = epêndimo. Barra de Calibração: 50 μ m.

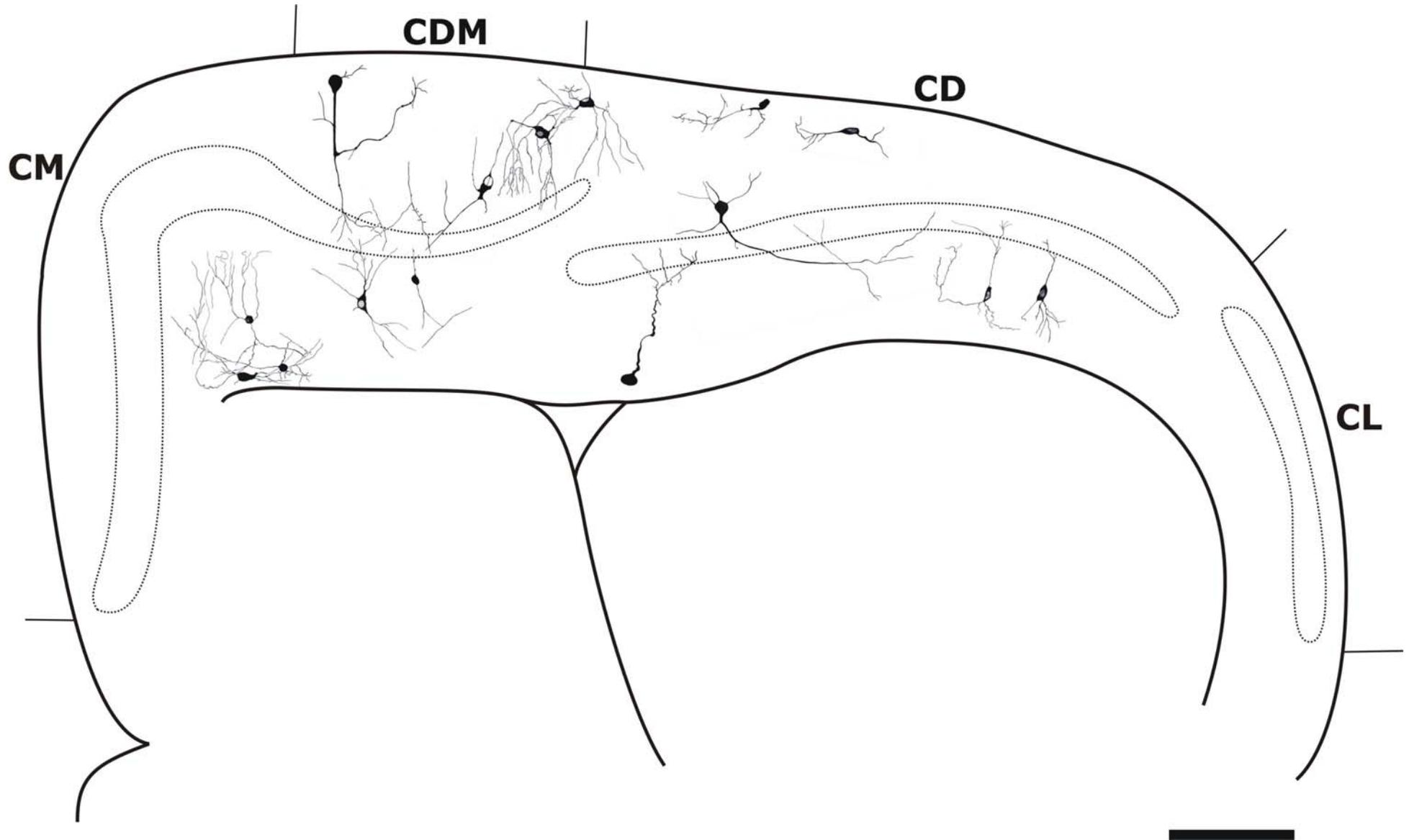


Figura 30: Figura esquemática do corte transversal de telencéfalo de *P. hispânica*, nela é demonstrada as diferentes morfologias de neurônios NADPHd positivos e suas respectivas localizações corticais. CM = córtex medial; CDM = Córtex Dorsomedial; CD = Córtex Dorsal; CL = Córtex lateral. Barra de calibração: 500 μm.

5.2.5 Neurônios NADPHd positivos e as regiões Timm-positivas e Timm-negativas

A partir de dados já publicados por Lopez-García e Martín-Guijarro (1988a) a respeito da distribuição das regiões Timm-positivas no córtex cerebral de *P. hispanica* (zona subventricular da plexiforme interna do CM e CL; plexiforme externa e interna do CDM e CD) e confirmado em nossos resultados; comparou-se o mapa de distribuição dos neurônios NADPHd positivos (publicado na pág. 44) com o das regiões Timm-positivas (Fig. 31), e então constataram-se os seguintes resultados:

- a) em concordância com os resultados apresentados pelos experimentos, verificou-se que houve uma colocalização bastante evidente entre as regiões que expressam neurônios NADPHd positivos com aquelas zinco positivas do córtex cerebral desse animal. Entre as regiões que diferem quanto a colocalização há as plexiformes externas dos córtices medial e lateral e pequena porção do dorsomedial e dorsal. No entanto, a plexiforme interna do CM, CDM e CD apresentou uma total colocalização.

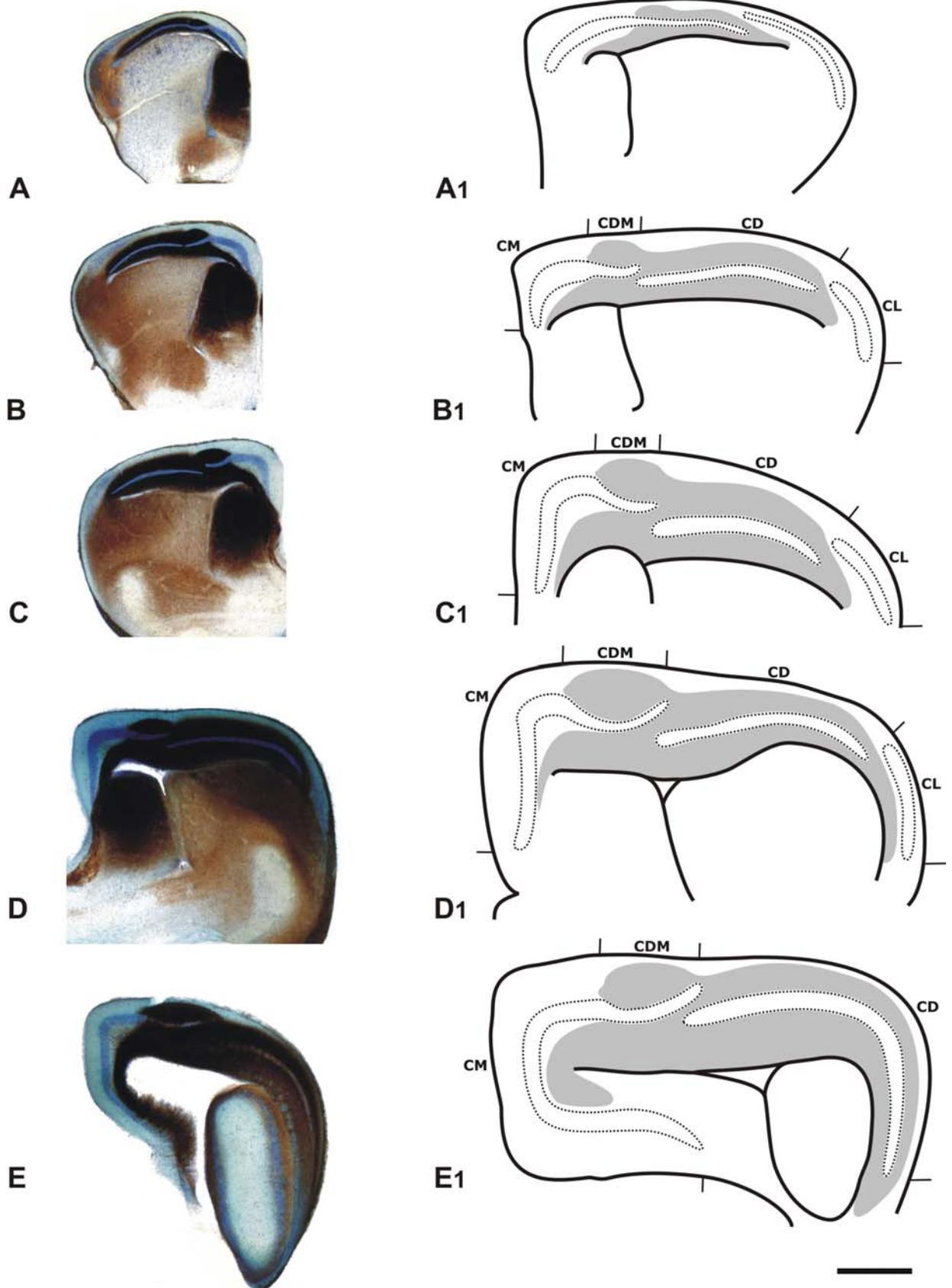


Figura 31: A – E – Fotografia de cortes transversais de telencéfalo de *P. hispanica* no qual observam-se as regiões Timm-positivas reveladas pela técnica histoquímica de Neo-timm (região negra), em azul coloração de Nissl. A1 – E1 – desenhos esquemáticos realizados em câmara clara. Em cinza observam-se as regiões Timm-positivas. Barra de calibração: 500 μ m.

5.3 Imunohistoquímica frente a nNOS e sGC

Os experimentos realizados com o grupo controle negativo, para verificação da especificidade dos anticorpos anti-nNOS e sGC $\alpha 1$, não apresentaram nenhum neurônio nNOS e sGC $\alpha 1$ positivos (Fig. 32). Os cortes elaborados a partir desses animais apenas apresentaram alteração na coloração (cor marrom), uma vez que foram reveladas com DAB. Já os resultados com as fatias submetidas aos experimentos de imunohistoquímica com os anticorpos anti-nNOS e sGC $\alpha 1$ demonstraram a presença de neurônios reativos a esses anticorpos (Fig. 33A - E).

Para a imunohistoquímica frente à sGC realizou-se o teste de dois diferentes tipos de anticorpos primário: policlonal solúvel Guanilato Ciclase $\beta 1$ e Guanilil Ciclase $\alpha 1$. Os resultados mostraram que os neurônios NO positivos não apresentam reatividade a subunidade $\beta 1$, somente a $\alpha 1$.

A distribuição de neurônios marcados por imunohistoquímica frente a nNOS e sGC $\alpha 1$ no córtex cerebral da lagartixa *P. hispanica* foi semelhante àquela encontrada em neurônios NADPHd positivos, essa semelhança também ocorreu nas morfologias desses neurônios. Os resultados desse estudo imunohistoquímico mostraram que os neurônios nNOS positivos distribuem-se, principalmente, na plexiforme interna dos CDM e CD, tendo pouca reatividade no CM, CL e camada granular. Além disso, observou-se que tanto o corpo celular como os prolongamentos dendríticos dos referidos neurônios são imunorreativos ao nNOS, em contrapartida, as glias radiais e projeções dendríticas não apresentam reatividade ao anticorpo anti-GC $\alpha 1$, que foi reativo apenas as regiões perisomáticas dos neurônios NOS positivos (Fig. 33C - E).

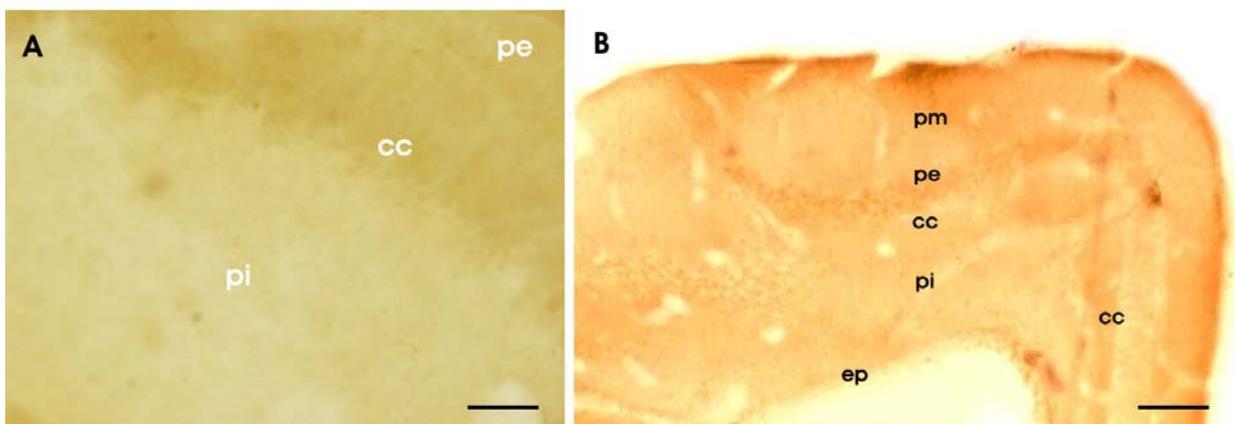


Figura 32: Fotografia de cortes transversais de telencéfalo de animais do grupo controle negativo. A e B observam-se fatias que não apresentam neurônios reativos aos anticorpos sGC e nNOS, respectivamente. pm = pia máter; pe = plexiforme externa; pi = plexiforme interna; CC = camada celular. Barra de calibração: 100 μ m (A), 250 μ m (B).

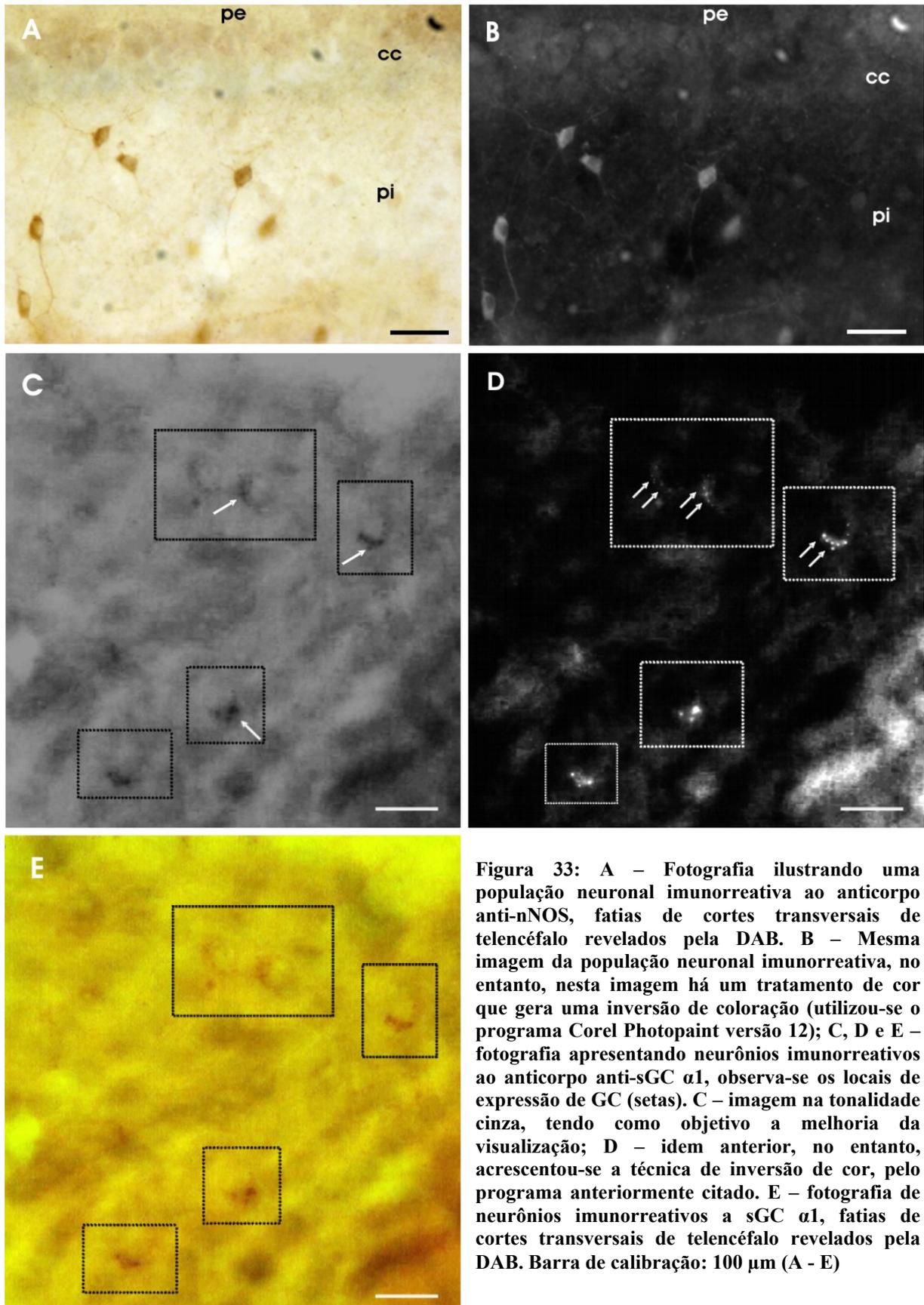


Figura 33: A – Fotografia ilustrando uma população neuronal imunorreativa ao anticorpo anti-nNOS, fatias de cortes transversais de telencéfalo revelados pela DAB. B – Mesma imagem da população neuronal imunorreativa, no entanto, nesta imagem há um tratamento de cor que gera uma inversão de coloração (utilizou-se o programa Corel Photopaint versão 12); C, D e E – fotografia apresentando neurônios imunorreativos ao anticorpo anti-sGC $\alpha 1$, observa-se os locais de expressão de GC (setas). C – imagem na tonalidade cinza, tendo como objetivo a melhoria da visualização; D – idem anterior, no entanto, acrescentou-se a técnica de inversão de cor, pelo programa anteriormente citado. E – fotografia de neurônios imunorreativos a sGC $\alpha 1$, fatias de cortes transversais de telencéfalo revelados pela DAB. Barra de calibração: 100 μ m (A - E)

6 DISCUSSÃO

Muitos estudos vêm demonstrando a importância do NO no sistema nervoso central de mamíferos. No entanto, dados relativos a expressão de neurônios NADPHd/nNOS positivos no córtex cerebral de répteis são bastante raros, há apenas dois artigos científicos (DÁVILA et al., 1995; SMEETS et al., 1997) a respeito da expressão desse tipo de neurônio no telencéfalo de répteis, dentre estes, somente um faz um estudo exclusivamente relacionado ao córtex cerebral e a expressão de neurônios NOS positivos.

Utilizando a técnica histoquímica de marcação neuronal pela enzima NADPHd foi possível evidenciar uma população de neurônios com atividade NADPHd, distribuídos entre as quatro regiões corticais. Esses neurônios apresentaram características peculiares em cada variável analisada, a saber:

- a) entre animais de diferentes faixas etárias foi evidenciado que os jovens expressam um maior número de neurônios NADPHd positivos, o que pode sugerir que a enzima NOS tenha um decréscimo em sua taxa de expressão com o decorrer da vida do animal. Um fator que pode estar relacionado a este evento é o fato de que os animais jovens estão em processo de desenvolvimento neuronal, ou seja, o NO pode estar mediando os processos de formação de novos neurônios. Dados experimentais realizados com mamíferos mencionam que a expressão neurônios NOS positivos é aumentada com a idade do animal, porém em animais senis essa expressão é reduzida (BELAI et al., 1995; KUO et al., 1997; TOPRAKÇI et al. 2000; SILES et al., 2002; RACEKOVÁ et al., 2005; TAN et al., 2006; MASLYUKOV et al., 2009). Em répteis, pesquisas similares são inexistentes. No entanto, os resultados apresentados nesta pesquisa diferem daqueles encontrados em mamíferos, uma vez que nossos dados demonstraram que o número de neurônios NOS positivos diminuiu com a idade.
- b) entre os níveis telencefálico o caudal apresentou o maior número de neurônios com atividade NADPHd. Acredita-se que isso ocorra porque: 1 – este nível recebe um alto número de aferências dos centros sensoriais do telencéfalo e tálamo; 2 – informações sensoriais do córtex dorsal são processadas principalmente nesse nível; 3 – o telencéfalo caudal recebe um grande número de projeções de regiões olfatórias, como as do bulbo olfatório principal e porção caudal do córtex lateral;

Em trabalhos realizados na década de 80, Hope e Vincente (1989) demonstraram a expressão de neurônios positivamente marcados pela técnica NADPHd. Nesse estudo eles

observaram que a histoquímica para NADPHd marcava uma variedade de organelas membranosas, além disso reportaram que a enzima NO sintase era vinculada a membrana. Em hipocampo de mamíferos é verificado uma maior expressão do mensageiro do óxido nítrico constitutivo nas regiões do giro denteado e CA3 (ENDOY et al., 1994). Em um trabalho publicado por Megías et al. (1997), é descrito que há uma maior expressão de neurônios NADPHd positivos no hilus do giro denteado, seguido pelas camadas CA3 e CA1. Korzhevskii e Otellin (1998) publicaram dados a respeito da distribuição de neurônios NADPHd positivos no córtex cerebral de ratos e seus dados reportam que a expressão desses neurônios ocorria de forma ocasional e quando existentes, estavam localizados nas regiões relacionadas a análise olfativa e visual. Segundos esses autores, tais neurônios apresentavam intensa coloração (Tipo I). Dados publicados por Garbossa et al. (2005) caracterizam a distribuição de neurônios NADPHd positivos no córtex cerebral de humanos, neste trabalho é possível observar a marcação de dois tipos de neurônios NADPHd positivos, Tipo I e II. O Tipo I foi visto principalmente no córtex frontal, com baixa expressão no temporal. Já o tipo II, foi mais visualizado no córtex occipital do que no temporal e frontal. No ano seguinte, Cruz-Rizzolo et al. (2006) publicou um trabalho que disserta a respeito da distribuição dos neurônios NADPHd positivos no córtex pré-frontal do macaco *Cebus*, segundo seus dados, mais de 90% dos neurônios do Tipo I localizavam-se na camada sub-cortical e infragranular. Já o Tipo II foi observado em todo o córtex, com grande densidade na camada II e III. Por fim, Oliveira et al. (2008) ao estudar cortes de hipocampo de pessoas normais e com depressão, desordem bipolar e esquizofrenia demonstraram, em hipocampo de pessoas normais, que há um número maior de neurônios reativos ao anticorpo anti-nNOS na camada CA2, seguida pela CA3 e CA1.

Em répteis, Dávila et al. (1995) descreveu a distribuição de neurônios NADPHd positivos no córtex cerebral da espécie *Psammmodromus*, seus resultados, assim como os desta pesquisa, mostraram uma grande marcação de neurônios NADPHd positivos nos córtices dorsomedial e dorsal, no entanto, em seu trabalho não há descrição dos tipos (Tipo I, II ou III) de neurônios diaforase positivo. Colocalização de neurônios NADPHd e GABAérgicos foram realizadas na pesquisa deste grupo, seus resultados sugerem que todos os neurônios NADPHd positivos são GABAérgicos. Recente trabalho realizado em mamíferos demonstrou que as células Ivy (Tipo hipocampal de interneurônio GABAérgico) expressa óxido nítrico sintase, neuropeptídeo Y e elevados níveis da subunidade $\alpha 1$ GABA-receptor (FUENTEALBA et al., 2008).

Na década de 90, pesquisas lideradas por Smeets et al. (1997), demonstraram a distribuição de neurônios nitrérgicos no cérebro do lagarto *Gekko gekko*. Segundos seus dados, a expressão de neurônios NADPHd positivos no córtex cerebral desse animal ocorria de forma esporádica, mesmo assim, foi verificado a presença de neurônios NADPHd positivos, por exemplo, na camada celular do CM, estes dados trazem discordância com os obtidos em nosso trabalho, pois não foi possível observar neurônios diaforase positivo na camada celular e na plexiforme externa deste córtex. Além de observarem a expressão de neurônio no CM eles verificaram uma maior expressão de neurônios diaforase positivos no CD.

Alguns outros trabalhos também revelam a marcação de neurônios nitrérgicos no sistema nervoso de répteis. Na tartaruga *Chrysemys d'orbigny*, observou-se a marcação de neurônios e fibras dendríticas NOS positivos na espinha dorsal e no gânglio sensorial desse réptil (RADMILOVICH, 1997). O grupo de Partata et al. (1999), por exemplo, demonstrou que a ruptura de fibras nervosas periféricas aumenta a expressão de neurônios NADPHd positivos.

Poucos artigos salientam a discussão quanto a arborização dendrítica dos neurônios NOS positivos de répteis. Resultados em *P. hispanica* verificaram que as projeções dendríticas desses neurônios estavam voltadas, em sua maioria, para a camada celular, o que sugere que essa camada pode exercer algum papel na regulação da expressão da enzima óxido nítrico sintetase desses interneurônios, outra observação importante foi verificada em neurônios NADPHd positivos que se encontravam na plexiforme interna e anexo ao epêndimo, pois estes emitem prolongamentos dendríticos que atravessam a plexiforme interna e podem chegar até a externa. Em trabalhos realizados na década de 90, com essa mesma espécie, os pesquisadores mostraram que projeções dendríticas de neurônios multipolares se apresentavam de forma perpendicular a camada celular, tais neurônios lançavam suas projeções por toda plexiforme interna até chegarem a plexiforme externa (BERNABEU et al., 1994). Dávila et al. (1993) menciona que arborizações dendríticas foram pouco evidentes em neurônios nitrérgicos do córtex cerebral de *Psammmodromus*, no entanto, quando visualizadas foram de dois tipos, espessas ou finas, o que está em concordância com os dados aqui apresentados. A partir de pesquisas realizadas com o lagarto *Gekko gekko*, Smeets et al. (1997) mencionam que as fibras dendríticas de neurônios NOS positivos se projetam paralelamente a camada celular do CM e CL, tais resultados estão em discordância com os observado em *P. hispanica*, uma vez que nesta espécie as fibras dendríticas se distribuem de duas formas: dispersas ou paralelas ao epêndimo do CM e CL.

As informações disponíveis sobre a morfologia dos neurônios nitrérgicos do córtex cerebral de répteis são escassas e fragmentada. Desconhece-se algum trabalho que faça menção aos tipos morfológicos de neurônios NADPHd no córtex cerebral de répteis, sendo assim, nossos resultados são pioneiros e demonstram a marcação de 15 tipos morfológicos de neurônios que apresentaram atividade diaforase. No entanto, sabe-se que as descrições dessas morfologias podem apresentar algum critério de erro, uma vez que a marcação de neurônios nitrérgicos pela técnica histoquímica NADPHd não possibilita o mesmo detalhamento morfológico observado com a técnica de Golgi, a qual é usada para realizar estudos morfológicos de neurônios. Diante disso, neste trabalho de pesquisa identificou-se a morfologia dos neurônios nitrérgicos a partir da observação do corpo celular dos mesmos.

Os dados aqui apresentados, identificou uma semelhança entre a distribuição e morfologia dos neurônios NADPHd positivos e aqueles imunorreativos a nNOS. As várias morfologias de neurônios nitrérgicos encontrados neste estudo caracterizam uma sub-população de interneurônios NADPHd positivos. Resultados obtidos por Lopez e Schwerdtfeger (1986), demonstraram a presença de uma sub-população de interneurônios imunorreativos a GABA no córtex medial, dorsomedial e dorsal de *P. hispanica*, que pode ser dividido em interneurônios contendo neuropeptídeos (DÁVILA et al., 1991) ou proteínas dependente de cálcio. Em concordância a esses dados, verificou-se uma distribuição de interneurônios NADPHd positivos nas plexiformes interna dos CM, CDM e CD desse animal.

Dentre as diferentes morfologias identificadas em nossa pesquisa, houve uma grande marcação naqueles de morfologia bipolar e multipolar, o mesmo foi observado nos trabalhos de Dávila et al. (1995). Neurônios com morfologia bipolar e multipolar foram caracterizados em pesquisas realizadas pelo grupo liderado por Lopez-Garcia, onde confirmaram a presença desses interneurônios no córtex cerebral de *P. hispanica*, a partir de injeção de HRP (intracelular horseradish peroxidase) e imunohistoquímica, assim como sua reatividade ao GABA (BERNABEU et al., 1994).

O uso da técnica histoquímica NADPHd em fatias de telencéfalo de *P. hispanica* permitiu a observação de neurônios nitrérgicos assim como a marcação de glias radiais. Estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos em répteis e em mamíferos. Segundo dados de Dávila et al. (1995), em estudos realizados com o lagarto *Psammmodromus*, a técnica histoquímica NADPHd permitiu a marcação de endimoglias que se projetam da região endimária até a pia máter. Ding e Merrill (1997), a partir de experimentos realizados com cultivo de células humanas de microglia e astrócitos, informaram que o óxido nítrico sintetase é induzido em células glia humanas 24 horas após serem estimuladas, no entanto,

48-72 horas depois de serem ativadas tornam-se praticamente inativas. Dessa forma, eles sugerem que as células gliais realizam alguma forma de regulação na produção do NO. Em outro trabalho, Gudi et al. (1999) sugerem que o NO e a GMPc regulam a expressão de genes em neurônios e em células gliais por ativação da GMPc tipo II, ou seja, GMPc dependente da proteína quinase. Com a finalidade de pesquisar potenciais pré-sinápticos de longa duração, os pesquisadores Ikeda e Murase (2004) trabalharam com fatias de cordão espinhal de ratos e seus resultados sugerem que a excitação pré-sináptica é facilitada pela liberação de NO de células gliais. Em um artigo de revisão, Bhat e Feinstein (2006), fazem uma discussão a respeito da expressão de NO em células gliais, segundo eles diferentes tipos de células gliais podem expressar tanto nNOS como iNOS. Outros autores também descrevem a importância da enzima NADPHd na ativação de gliais (QIN et al., 2004; MANDER et al., 2006).

Os resultados da marcação de gliais radiais pela técnica histoquímica de NADPHd demonstraram que elas não foram evidenciadas na plexiforme externa do CM e CL, ao contrário disso no CDM e CD elas tiveram marcação nas duas plexiformes. Diante disso, acredita-se que a marcação de gliais radiais pela histoquímica NADPHd está relacionada com a distribuição das regiões zincérgicas no córtex cerebral de *P. hispanica*, regiões zinco negativas (como a plexiforme externa dos córtices medial e lateral) também foram negativas na marcação de gliais radiais e/ou de neurônios NADPHd positivos. Vários trabalhos dissertam a respeito da função do zinco na ativação de gliais (FARBER e KETTENMANN, 2006; LUND et al., 2006). Culturas de células de microglía de rato exposta a 15-30 μM de zinco apresentaram um aumento na produção de óxido nítrico. Nesta mesma pesquisa, Kauppinen et al. (2008) observou que a injeção de uma determinada concentração de zinco diretamente no cérebro de ratos selvagens induzia a ativação de alguns tipos de células gliais, no entanto, naqueles ratos geneticamente modificados para a enzima NADPHd, isso não ocorria.

Marcações de gliais radiais e alta expressão de neurônios NADPHd positivos na plexiforme interna do CDM e CD podem está relacionadas com as regiões Timm-positivas dos córtices, uma vez que alguns trabalhos sugerem que a expressão de NO em gliais e em neurônios está relacionada com a concentração de zinco (NOH e KOH, 2000; KAUPPINEN et al., 2008).

Diversos trabalhos sugerem que o óxido nítrico está envolvido no aumento da concentração de zinco na região perissomática de neurônios. Cuajungco e Lees (1998) publicaram dados que demonstram essa função do NO. Noh e Koh (2000) sugerem que altas concentrações de zinco induz e ativa da nNOS em neurônios corticais e em astrócitos, sendo

esse mecanismo dependente de proteínas quinase C. Além disso, eles sugerem que a NOS pode ser uma enzima que contribua para a geração de ROS (espécie reativa de oxigênio) em astrócitos e em neurônios corticais submetidos a altas concentrações de zinco. Trabalhos similares também mencionam que o bloqueio do NO, em cérebros de ratos, provoca uma rápida perda da reatividade histológica do zinco que estava presente nos botões axonais Timm-positivos (FREDERICKSON et al., 2002). Neste mesmo ano, Kim e Koh (2002) publicaram dados que também sugerem que a expressão de nNOS está diretamente ligada a liberação de zinco. Em seus trabalhos, eles aplicaram uma determinada concentração de zinco em culturas de células e observaram um aumento na produção de RNA-mensageiro da isoforma nNOS, no entanto, quando aplicaram inibidores da enzima NOS esses resultados não foram notificados. Mais recentemente, Suh et al. (2008) verificaram que a liberação de zinco vesicular desencadeia uma série de eventos que possibilitam a formação do óxido nítrico, em contrapartida, quando analisaram os resultados obtidos a partir de cultivos de células que continham enzimas inibidoras de NADPHd, esses eventos não ocorriam.

No córtex cerebral de répteis há um sistema de zonas Timm positivas que são preenchidas por um tipo de botões pré-sinápticos que se assemelham com as projeções de fibras musgosas do hipocampo de mamíferos (LOPEZ-GARCÍA ET AL., 1983; LOPEZ-GARCÍA ET AL., 1983A; MARTINEZ-GUIRRADO et al., 1987; VAREA et al., 2001; LOPEZ-GARCÍA et al., 2001; LOPEZ-GARCÍA et al., 2002; LOPEZ-GARCÍA et al., 2002a). Estes botões Timm reativos originam-se em neurônios cujo soma estão localizados na camada celular do córtex medial, então no processo de formação de novos neurônios, esses enviam axônios e botões Timm reativos para as zonas Timm positivas.

Em pesquisas anteriormente realizadas por nosso grupo, observou-se que as regiões Timm positivas estão fortemente relacionadas com o processo de neurogênese de células nervosas no córtex medial de *P. hispanica*. Esses dados relatam que após uma intensa lesão causada por 3-acetilpiridina, apareciam intensos processos de proliferação celular ependimais subjacentes, dessa forma novas células eram formadas e migravam pela plexiforme interna até reconstruírem a camada celular do córtex medial (LOPEZ-GARCÍA et al., 1988, MOLOWNY et al., 1995; LOPEZ-GARCÍA et al., 2002). Outros dados a respeito da neurogênese em *P. hispanica* sugerem, ainda, a existência de uma possível ação das glias radial na regulação da plasticidade sináptica e nas neo-sinaptogênese dos axônios emitidos a partir da neurogênese (LOPEZ-GARCÍA et al., 1994; NACHER, et. al., 1999).

Inúmeros trabalhos voltados a neurobiologia do córtex cerebral de *P. hispanica* possibilitaram a criação de uma cadeia de informação. Na década de 80, por exemplo,

publicaram-se dados a respeito do mapa de distribuição das regiões Timm-positivas do córtex cerebral de *P. hispanica*, na mesma década evidenciou-se a neurogênese do córtex medial após uma severa lesão ocasionada por 3-acetilpiridina. Anos seguintes, foi demonstrado que as células glias e as regiões Timm-positivas estavam envolvidas nesses processos de neurogênese. Atualmente, tendo como referência o mapa de expressão dos neurônios NOS positivos no córtex cerebral dessa espécie, acredita-se que o NO possua um papel neuromodulador em diversos processos biológicos do sistema nervoso de *P. hispanica*, uma vez que todos os dados publicados a respeito de tal espécie convergem para esta conclusão. No entanto, em répteis, informações a respeito da influência do NO na idade, como também relacionados ao metal zinco e as células glias ainda são inexistentes, diante disso, sugerem-se a realização de mais pesquisas voltadas ao estudo da atuação do NO no sistema nervoso de répteis.

A identificação das estruturas e conexões das áreas corticais de répteis não servem apenas para o estudo da homologia entre o córtex cerebral de répteis e o hipocampo de mamíferos, mas também proporciona meios para estudar a biologia dos neurônios e suas relações de desenvolvimento. Para que duas estruturas sejam homólogas não significa que elas sejam idênticas e as variações estruturais existentes podem possibilitar conclusões acerca dos mecanismos evolutivos.

6.1 Imunohistoquímica frente a nNOS e sGC α

A imunohistoquímica frente a nNOS e sGC α foi usada positivamente para evidenciar neurônios nitrérgicos no córtex cerebral de *P. hispanica*. Semelhantemente aos resultados obtidos a partir da técnica NADPHd, neurônios reativos ao anticorpo nNOS e sGC α 1 foram revelados em todos os córtices do telencéfalo desse animal. Como esperado, a imunohistoquímica frente a nNOS marcou intensamente o soma e os dendritos de neurônios localizados, principalmente, na plexiforme interna dos córtices dorsomedial e dorsal.

As evidências dos dados aqui publicados mostraram que a técnica NADPHd apresenta maior detalhamento dos neurônios NADPHd positivos em relação aqueles revelados por imunohistoquímica frente a nNOS. Mesmo assim, usando a técnica de imunohistoquímica foi possível observar prolongamentos dendríticos de diferentes tamanhos e formas, algumas deles eram finos enquanto que outros eram mais espessos. Da mesma forma que os neurônios diaforase positivo, aqueles reativos ao anticorpo anti-nNOS apresentaram dendritos que se projetavam, em sua maioria, em direção à camada celular.

Em répteis, publicações referentes a distribuição de regiões imunorreativas ao

anticorpo anti-sGC $\alpha 1$ no córtex cerebral desses animais são inexistente. Elas resumem-se apenas a relatar a marcação de neurônios imunorreativos ao nNOS e neurônios com atividade NADPHd ou com reatividade a alguns neuropeptídeos. Lammana et al. (1999), por exemplo, identificou, em duas espécie de répteis, a colocalização de neurônios NADPHd e imunorreativos a NOS, essa mesma comprovação foi publicada por Smeets, et al. (1997).

Pesquisa a respeito da distribuição da sGC em cérebros de ratos sugere que as células de Purkinje Bergmann gliano apresentam marcação para as duas subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$. Além disso, esses resultados demonstram que células granulares e interneurônios que estavam presentes na camada molecular mostravam forte marcação para a subunidade β , no entanto, fraca marcação para a unidade α . Um outro resultado bastante evidente nesta mesma pesquisa foi o fato de que células glias apresentaram reatividade ao anticorpo anti-sGC α (DING, 2004). Segundo dados publicados por Szabadits et al. (2007), a subunidade $\beta 1$ é imunorreativa a células piramidais e interneurônios do hipocampo, já a subunidade $\alpha 1$ é imunorreativa apenas a interneurônios. Os resultados aqui apresentados estão em discordância com aqueles discutidos por Ding, pois no telencéfalo de *P. hispanica* houve uma discreta marcação de neurônios imunorreativos a sGC $\alpha 1$, além disso, não se verificou marcação em glias radiais e em dendritos. Acredita-se que em nossa pesquisa não foi encontrado imunorreatividade a subunidade $\beta 1$ porque ela é imunorreativa apenas a neurônios principais, no entanto, nossos dados revelam que apenas os interneurônios são NOS positivos.

Ariano et al. (1982), realizando pesquisa no cérebro de ratos, verificou a imunorreatividade ao anticorpo anti-sGC em soma e em dendritos proximais. Burette et al. (2002) verificou que na região CA1 do hipocampo havia a marcação de inúmeros pequenos interneurônios positivos a imunohistoquímica frente a nNOS e GC.

7 CONCLUSÕES

- O córtex cerebral de *Podarcis hispanica* apresenta neurônios com atividade NADPHd, como também imunorreativos aos anticorpos anti-nNOS e sGC $\alpha 1$.
- Os neurônios NADPHd positivos são de três tipos: Tipo I, II e III.
- O número total de neurônios NADPHd positivos no córtex cerebral de *P. hispanica* foi de 1897 neurônios.
- Há uma diferença significativa na expressão do número de neurônios NADPHd positivos entre animais de diferentes faixas etárias e entre as áreas e camadas corticais.
- O córtex cerebral de *P. hispanica* apresenta uma variedade de 15 morfologias de neurônios NADPHd positivos.
- Os neurônios NADPHd positivos foram encontrados principalmente nas zonas Timm-positivas.

REFERÊNCIAS

- ABOITIZ, F. Comparative development of the mammalian isocortex and the reptilian dorsal ventricular ridge. Evolutionary considerations. **Cerebral Cortex**, v. 9, n. 8, p. 783-791. 1999.
- ABOITIZ, F.; MONTIEL, J.; MORALES, D.; CONCHA, M. Evolutionary divergence of the reptilian and the mammalian brains: considerations on connectivity and development. **Brain Research Reviews**, n. 39, p. 141-153. 2002a.
- ABOITIZ, F.; MONTIEL, J.; LÓPEZ, J. Critical steps in the early evolution of the isocortex. Insights from developmental biology. **Brazilian Journal of medical and Biological Research**, n. 35, p. 1455-1472. 2002b.
- ALMEIDA, M. C.; BRANCO, L. G. S. Role of nitric oxide in insulin-induced hypothermia in rats. **Brain Res Bull.**, n. 54, p. 49-53. 2001.
- ALONSO, J. R.; ARÉVALO, R.; PORTEROS, A.; BRIÑÓN, J. G.; GARCÍA-OJEDA, E.; AIJÓN, J. NADPH-diaphorase staining in the Central Nervous System. **Neuroscience**. 1995.
- ARIANO, M. A.; LEWICKI, J. A.; BRANDWEINT, H. J.; MURADTT, FERID. Immunohistochemical localization of guanylate cyclase within neurons of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. n. 79, p. 1316 – 1320. 1982.
- BELAI, A.; COOPER, S.; BURNSTOCK, G. Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurones of rat ileum and proximal colon. **Cell Tissue Res**, n. 279, p. 379-383. 1995.
- BENESOVÁ, P.; LANGMEIR, M.; BETKA, J.; TROJAN, S. Long-lasting changes in the density of nitrenergic neurons following kainic acid administration and chronic hypoxia. **Physiological Research**, n. 5, p. 565-571. 2005.
- BERNABEU, A.; MARTINEZ-GUIRRADO, F. J.; DE LA IGLESIA, J. A. L.; LOPEZ-GARCIA, C. An axosomatic and axodendritic multipolar neuron in the lizard cerebral cortex. n.18, p. 567-582. 1994.
- BHAT, N. R.; FEINSTEIN, D. L. NO and Glial Cell Biology. **Antioxidants e Redox Signaling**, v. 8, n. 5 e 6. 2006.
- BISHOP, A.; ANDERSON, J. E. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. **Toxicology**, n. 208, p. 193-205. 2005.
- BLUM-DEGEN, D.; HEINEMANN, T.; LAN, J.; PEDERSEN, V.; LEBLHUBER, F.; PAULUS, W.; RIEDERER, P.; GERLACH, M. Characterization and regional distribution of nitric oxide synthase in the human brain during normal ageing. **Brain Research**, n. 834, p. 128-135. 1999.
- BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 768-770. 1990.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, n. 86, p. 9030-3. 1989.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulinrequiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v. 87, n. 2, p. 682-685. 1990.

BRETT, D.S. Nitric oxide signaling specificity – the heart of the problem. **Journal of Cell Science**, n. 116, p. 9-15. 2003.

BRENNAN, J. E. et al. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. **Cell**, v. 84, n. 5, p. 757-767, 1996a.

BRENNAN, J. E. et al. Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. **J. Neurosci.**, v. 16, n. 23, p. 7407-7415, 1996b.

BURKARD, N. et al. Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility. **Circ. Res.**, v. 100, n. 3, p. e32-e44. 2007.

BURETTE, A.; ZABEL, U.; WEINBERG, R. J.; SCHMIDT, H. H. H. W.; VALTSCHANOFF, J. G. Synaptic Localization of Nitric Oxide Synthase and Soluble Guanylyl Cyclase in the Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 20, p. 8961–8970. 2002.

CAMERON, H. Nacimiento de las neuronas. **Mundo Científico**, n. 212, p. 23-28. 2000.

CHEN, J.; TU, Y.; MOON, C.; MATARAZZO, V.; PALMER, A. M.; RONNET, G.V. The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance. **Developmental Biology**, n. 269, p. 165-182. 2004.

CIANI, E.; CALVANESE, V.; CROCHEMORE, C.; BARTESAGHI, R.; CONTESTABILE, A. Proliferation of cerebellar precursor cells is negatively regulated by nitric oxide in newborn rat. **Journal of Cell Science**, n. 119, p. 3161-3170. 2006.

CONTESTABILE, A. Roles of NMDA receptors activity and nitric oxide production in brain development. **Brain Research Reviews**, n. 32, p. 476-509. 2000.

CRISTINO, L.; PICA, A.; DELLA CORTE, F.; BENTIVOGLIO, M. Co-induction of nitric oxide synthase, BCL-2 and growth-associated protein-43 in spinal motoneurons during axon regeneration in the lizard tail. **Neuroscience**, v. 101, n. , p. 451-458. 2000a.

CRISTINO, L.; PICA, A.; DELLA CORTE, F.; BENTIVOGLIO, M. Plastic changes and nitric oxide synthase induction in neurons that innervate the regenerated tail of the lizard *Gekko gekko*: I. Response of spinal motoneurons to tail amputation and regeneration. **The Journal of Comparative Neurology**, n. 417, p. 60-72. 2000b.

CRISTINO, L.; PICA, A.; DELLA CORTE, F.; BENTIVOGLIO, M. Plastic changes and nitric oxide synthase induction in neurons which innervate the regenerated tail of the lizard *Gekko gekko* II. The response of dorsal root ganglion cells to tail amputation and regeneration. **Brain Research**, n. 871, p. 83-93. 2000c.

CRUZ-RIZZOLO, R. J.; HORTA-JÚNIOR, J. DE A. C.; BITTENCOURT, J. C.; ERVOLINO, E.; OLIVEIRA, J. A. DE; CASATTI, C. A. Distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons in the prefrontal cortex of the Cebus monkey. **Brain Research**, n. 1083, p. 118–133. 2006.

CUAJUNGCO, M.P., LEES, G.J. Nitric oxide generators produce accumulation of chelatable zinc in hippocampal neuronal perikarya. **Brain Res.** n. 799, p. 118-129. 1998.

DÁVILA, J. C.; MEGÍAS, M.; ANDREU, M. J.; REAL, M. A.; GUIRADO, S.. NADPH

diaphorase-positive neurons in the lizard hippocampus: A distinct subpopulation of GABAergic interneurons. **Hippocampus**, n. 5, p. 60-70. 1995.

DÁVILA, J. C.; MEGÍAS, M.; DE LA CALLE, A.; GUIRADO, S. Subpopulations of GABA Neurons Containing Somatostatin, Neuropeptide Y and Parvalbumin in the Dorsomedial Cortex of the Lizard *Psammodromus algirus*. **The Journal of Comparative Neurology**, n. 336, p. 161 – 173. 1993

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

DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 5147-5159. 1994.

DAWSON, V. L., DAWSON, T. M. Nitric oxide in neurodegeneration. **Prog Brain Res**, n. 118, p. 215-29. 1998.

DE LA IGLESIA, J. A.; MARTINEZ-GUIJARRO, F.J.; LOPEZ-GARCIA, C. Neurons of the medial outer plexiform layer of the lizard *Podarcis hispanica*: Golgi and immunocytochemical studies. **The Journal of Comparative Neurology**, n. 341, p. 184-203. 1994.

DE LA IGLESIA, J. A.; LOPEZ-GARCIA, C. A Golgi study of the short-axon interneurons of the cell layer and inner plexiform layer of the medial cortex of the lizard *Podarcis hispanica*. **The Journal of Comparative Neurology**, n. 385, p. 565-598. 1997a.

DE LA IGLESIA, J. A.; 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**, n. 385, p. 528-564. 1997b.

DIAS, A. C.; SILVA, L. G. da; COLOMBARI, E. O Óxido Nítrico (no) no Controle Neural da Pressão Arterial: Modulação da Transmissão Glutamatérgica no NTS. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 39, n. 1, p. 51-64, jan./mar. 2006.

DING, M; MERRILL, J. E. The kinetics and regulation of the induction of type II nitric oxide synthase and nitric oxide in human fetal glial cell cultures. **Molecular Psychiatry**, n. 2, p. 117–119. 1997.

DING, J.D.; BURETTE, A.; NEDVETSKY, P. I.; SCHMIDT, H. H.H.W.; WEINBERG, RICHARD J.. Distribution of Soluble Guanylyl Cyclase in the Rat Brain. **The Journal of Comparative Neurology**, n. 472, p. 472:437–448. 2004.

DUSSE, L. M. Sant’Ana; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. das G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

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

ESPINOZA, E.; MURO, A.; PÉREZ, J.; FRANCÉS, A.; PÉREZ, J. L. El óxido nítrico en medicina (I). Aspectos básicos. **Medicina Integral**, n. 29, p. 199-208. 1997.

ESPLUGUES, J. NO as a signaling molecule in the nervous system. **British Journal of Pharmacology**, n. 135, p. 1079-1095. 2002.

FARBER, K.; KETTENMANN, H. Purinergic signaling and microglia. **Pflügers Arch**, n. 452, p. 615– 621. 2006.

FERNANDEZ, A.; RADMILOVICH, M.; TRUJILLO-CENÓZ, O. The marginal nuclei of the spinal cord in turtles: neuron assemblies in which γ -aminobutyric acid and nitric oxide synthase are colocalized. **Experimental Brain Research**, n. 122, p. 128-130. 1998.

FÖRSTERMANN, U. Regulation of Nitric Oxide Synthase Expression and Activity. In: MAYER, B., (Ed.). **Nitric Oxide**. Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 71-91. 2000.

FORSTERMANN, U.; CLOSS, E. I.; POLLOCK, J. S.; NAKANE, M; SCHWARZ, P; GATH; I; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, n. 6, p. 1121- 1131. 1994.

FREDERICKSON ,C. J.; CUAJUNGCO, M. P.; LABUD,A. C. J.; SUH, S. W. Nitric Oxide Causes Apparent Release of Zinc From Presynaptic Boutons. **Neuroscience**, v. 115, n. 2, p. 471-474. 2002.

FUENTEALBA, Pablo; BEGUM, Rahima; CAPOGNA, Marco; JINNO, Shozo; MÁRTON, László F.; CSICSVARI, Jozsef; THOMSON,Alex, SOMOGYI, Peter; KLAUSBERGER, Thomas. Ivy Cells: A Population of Nitric-Oxide-Producing, Slow-Spiking GABAergic Neurons and Their Involvement in Hippocampal Network Activity. **Neuron**, n. 57, p. 917– 929, 2008.

FUKUTO, J. M., CHO, J. Y., SWITZER, C. H. The Chemical Properties of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides. In: IGNARRO, L. J., (Ed.). **Nitric Oxide Biology and Pathobiology**, San Diego,CA: Academic Press, p. 23-40. 2000.

FURCHGOTT, R. T.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, n. 288, p. 373-6. 1980.

GARBOSSA, D.; FONTANELLA, M.; TOMASIS, S.; DUCATI, A.; VERCELLI, A. Differential distribution of NADPH-diaphorase histochemistry in human cerebral cortex. **Brain Research**, n. 1034, p. 1– 10. 2005.

GARCÍA-VERDUGO, J. M., FARINAS, I., MOLOWNY, A. and LÓPEZ-GARCÍA, C. Ultrastructure of putative migrating cells in the cerebral cortex of *Lacerta galloti*. **J. Morphol**, n. 189, p. 189 -197. 1986.

GUDI, T.; HONG, G. K.-P.; VAANDRAGER, A. B.; LOHMANN, S. M.; PILZ, R. B.. Nitric oxide and cGMP regulate gene expression in neuronal and glial cells by activating type II cGMP-dependent protein kinase. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 2143 – 2152. 1999.

GUIRADO, S.; DÁVILA, J. C. Immunocytochemical Localization of the GABA_A Lizard *Psamodromus algirus*. **The Journal of Comparative Neurology**, n. 344, p. 610 – 618. 1994.

GUIX, F.X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUÑOZ, F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 126-152. 2005.

- HIBBS, J. B Jr; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, n. 157, p. 87-94. 1988.
- HOPE, B.T; MICHAEL G. J.; KNIGGE, K. M.; VINCENT, S. R.. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, n. 88, p. 2811–2814. 1991.
- HOPE, Bruce T.; VINCENT, Steven R. Histochemical Characterization of Neuronal NADPH-diaphorase. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 37, n. 5, p. 653-661. 1989.
- HOWELL, G. A.; FREDERICKSON, C. J. A retrograde transport method for mapping zinc-containing fiber systems in the brain. *Brain Res*, n. 515, p. 277-86. 1990.
- IKEDA, H.; MURASE, K.. Glial Nitric Oxide-Mediated Long-Term Presynaptic Facilitation Revealed by Optical Imaging in Rat Spinal Dorsal Horn. *The Journal of Neuroscience*, v. 3, n. 24, p. 44, p. 9888 –9896. 2004.
- IGNARRO, L. J.; GOLD, M. E.; BUGA, G. M.; BYRNS, R. E.; WOOD, K. S.; CHAUDHURI, G.. Basic polyamino acids rich in arginine, lysine, or ornithine cause both enhancement of and refractoriness to formation of endothelium-derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. *Circ Res*, n. 64, p. 315-329. 1989.
- IRIHURA, K; MAYNARD, K. L.; LEE, W. S.; MOSKOWITZ, N. A. L-NNA decreases cortical hyperemia and brain cGMP levels following CO₂ inhalation in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol*, n. 257, p. H837-H843. 1994.
- KATSUKI, S.; ARNOLD, W.; MITTAL, C.; MURAD, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic. Nucleotide Res.*, n. 3, p. 23-5, 1977.
- KAUPPINEN, T. M.; HIGASHI, Y.; SUH, S. W.; ESCARTIN, C.; NAGASAWA, K.; SWANSON, R. A. Zinc Triggers Microglial Activation. *The Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 22, p.5827–5835. 2008.
- KAY, A.R. Evidence for chelatable zinc in the extracellular space of the hippocampus, but little evidence for synaptic release of zinc. *The Journal of neuroscience*, v. 23, n. 17, p. 6847-6855. 2003.
- KENIGFEST, N. B.; RIO, J. P.; BELEKHOVA, M. G.; REPÉRANT, J.; WARD, R.; JAY, B.; VESSELKIN, N. P. Tectorotundal connections in turtles: An electron microscopic tracing and GABA-immunocytochemical study. *Elsevier*, v. 1186, p. 144-154. 2007.
- KIM, Y.-H.; KOH, J.-Y. The Role of NADPH Oxidase and Neuronal Nitric Oxide Synthase in Zinc-Induced Poly(ADP-ribose) Polymerase Activation and Cell Death in Cortical Culture. *Experimental Neurology*, n. 177, p. 407–418. 2002.
- KNOWLES, R. G.; PALÁCIOS, M.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, n. 86, p. 5159-62. 1989.

- KORNACK, D.R.; RAKIC, P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. **Proceedings of National Academy of Sciences**, n. 96, p. 5768-5773, 1999.
- KORZHEVSKII, D. E.; OTELLIN, V. A. Distribution of Nitric Oxide Synthetase in Rat Cerebral Cortex Cells. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 28, n. 1, p. 90-93. 1998.
- KUO, H.; HENGEMIHLE, J.; INGRAM, D. K. Nitric Oxide Synthase in Rat Brain: Age Comparisons Quantitated with NADPH-Diaphorase Histochemistry. **Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES**, v. 52A, n. 3. p. B146-B151. 1997.
- LAMANNA, C.; COSTAGLIOLA, A.; VITTORIA, A; MAYER, B.; ASSISI, L.; BOTTE, V.; CECIO, A. NADPH-diaphorase and NOS enzymatic activities in some neurons of reptilian gut and their relationships with two neuropeptides. **Anat Embryol**, n. 199, p. 397-405. 1999.
- LEDO, A.; FRADE, J.; BARBOSA, R.M.; LARANJINHA, J. Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. **Molecular Aspects of Medicine**, n. 25, p. 75-89. 2004.
- LOPANTSEV, V.; WENZEL, H. J.; COLE, T. B.; PALMITER, R. D.; SCHWARTZKROIN, P. A. Lack of vesicular zinc in mossy fibers does not affect synaptic excitability of CA3 pyramidal cells in zinc transporter 3 knockout mice. **Neuroscience**, n. 116, p. 237-248. 2003.
- LÓPEZ-GARCÍA, C. Postnatal neurogenesis and regeneration in the lizard cerebral cortex. In Cuello AC, ed. Neuronal cell death and repair. Amsterdam: **Elsevier Sci Pub**, p. 237-46. 1993.
- LOPEZ-GARCIA, C.; MOLOWNY, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; FERRER, I. Delayed postnatal Neurogenesis in the Cerebral Cortex of Lizards. **Developmental Brain Research**, n. 43, p. 167-174. 1988.
- LOPEZ-GARCIA C.; MARTINEZ-GUIJARRO F. J. Neurons in the medial cortex give rise to Timm-positive boutons in the cerebral cortex of lizard. **Brain Research**, n. 463, p. 205-217. 1988a.
- LOPEZ-GARCIA, C.; MOLOWNY, A.; MARTINEZ-GUIJARRO, F. J.; BLASCO-IBAÑEZ, J. M.; DE LA IGLESIA, L.; BERNABEU, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M. Lesion and Regeneration in the medial cerebral cortex of lizards. **Histol.Histopath**, n. 7, p. 725-746. 1992.
- LOPEZ-GARCIA, C.; NACHER, J.;CASTELLANO, B.; DE LA IGLESIA, L.; MOLOWNY, A. Tansitory Disappearance of Microglia During the Regeneration of the Lizard Medial Cortex. **GLIA**, n. 12, p. 12-61. 1994.
- LOPEZ-GARCIA C.; SORIANO E.; MOLOWNY A.; GARCIA-VERDUGO J.M.; BERBEL, P.; REGIDOR J.. The Timm-positive System of Axonic Terminals of the Cerebral Cortex of *Lacerda*. In Ramon y Cajal's Contributions to the Neurociences (ed. S. Grisolia, C. Guerri, F. Samson, S. Norton e F. RenNOSo-Suarez), p. 137-148. Amnterdam: **Elsevier**. 1983a.

- LOPEZ-GARCIA C.; MOLOWNY, A.; PÉREZ-CLAUSELL J. Volumetric and densitometric study in the cerebral cortex and septum of a lizard (*Lacerta galloti*) using the Timm method. **Neurosci. Lett.**, n. 40, p. 13-18. 1983.
- LÓPEZ-GARCÍA, C.; MOLOWNY, A.; PONSODA, X.; NÁCHER, J.; SANCHO-BIELSA, F. Zinc sináptico en sistema nervioso central. **Rev Neurol**, v. 33, n. 4. 2001
- LOPEZ-GARCIA, C.; MOLOWNY; NACHER, J.; PONSADA, X. E.; SACHO-BIELSA, F.; ALLONSO-LLOSA, G. The lizard cerebral cortex as a model to study neuronal regeneration. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 1, p. 85-104. 2002.
- LÓPEZ-GARCÍA, C.; VAREA, E.; PALOP, J. J.; NACHER, J.; RAMIREZ, C.; PONSODA, X.; MOLOWNY, A. Cytochemical Techniques for Zinc and Heavy Metals Localization in Nerve Cells. *Microscopy Research and Technique*, n. 56, p. 1–14. 2002a.
- LUND, S.; CHRISTENSEN, K. V.; HEDTJARN, M.; MORTENSEN, A. L.; HAGBERG, H.; FALSIG, J.; HASSELDAM, H.; SCHRATTENHOLZ, A.; PORZGEN, P.; LEIST, M. The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. **J Neuroimmunol**, n. 180, p. 71– 87. 2006.
- MANDER, P. K.; JEKABSONE, A.; BROWN, G. C. Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. **J Immunol**, n. 176, p. 1046–1052. 2006.
- MARCHIORO, M.; NUNES, J-M, A.M.; RAMALHO, A.M.R.; MOLOWNY, A.; PEREZ-MARTINEZ, E.; PONSODA, X.; LOPEZ-GARCIA, C. Postnatal neurogenesis in the medial cortex of the tropical lizard *Tropidurus hispidus*. **Neuroscience**, n. 134, p. 407-413. 2005.
- MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, n. 27, p. 8706-11. 1988.
- MARTÍNEZ-GUIJARRO, F. J.; BLASCO-IBAIEZ, J. M.; LOPEZ-GARCÍA, C. **Postnatal increase of GABA- and PV-IR cells in the cerebral cortex of the lizard Podarcis Hispanica**. *brain research*, v. 634, n. 1, p. 168-72. 1994.
- MARTÍNEZ-GUIJARRO, F. J.; DESFILIS, E.; LOPEZ-GARCÍA, C. Organization of the dorsomedial cortex in the lizard *Podarcis hispanica*. In: *The forebrain in non-mammals. New aspects of structure and development*. **Springer-Verlag**. Berlin, p. 77-92. 1990.
- MARTINEZ-GUIJARRO, F. J., MOLOWNY, A., LOPEZ-GARCÍA, C. Timm-staining is correlated with the density of Timm-positive presynaptic structures in the cerebral cortex of lizards. **Histochemistry**, n. 86, p. 315-319. 1987.
- MARTINEZ-GUIJARRO, F. J.; SORIANO, E.; DEL RIO, J. A; BLASCO-IBAIEZ, J. M.; LOPEZ-GARCIA, C. Parvalbumin containing neurons in the cerebral cortex of the lizard *Podarcis hispanica*: morphology, ultrastructure and coexistence with GABA, somatostatin and neuropeptide Y. **Journal of Comparative Neurology**, n. 336, p. 447-467. 1993.
- MARTINEZ-GUIJARRO, F. J., MOLOWNY, A., LOPEZ-GARCÍA, C. Timm-staining is correlated with the density of Timm-positive presynaptic structures in the cerebral cortex of lizards. **Histochemistry**, n. 86, p. 315-319. 1987.

- MASLYUKOV, P. M.; EMANUILOV, A. I.; KORZINA, M. B.; SHILKIN, V. V.; RUMYANTSEVA, T. A. NADPH-Diaphorase-Positive Neurons in Sympathetic Ganglia during Postnatal Ontogenesis. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 39, n. 2. 2009.
- MEGÍAS, M.; VERDUGA, R.; FERNÁNDEZ-VIADERO, C.; CRESPO, D. Neurons co-localizing calretinin immunoreactivity and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase_NADPH-d.activity in the hippocampus and dentate gyrus of the rat. **Brain Research**, n. 744, p.112–120. 1997.
- MELLA, E. A. C. **Efeitos do Óxido Nítrico (NO) e da L- Citrulina Sobre a Autoregulação Neuronal Mediada por Receptores Muscarínicos e Adenosinérgicos em Preparações Neuromusculares de Ratos**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Maringá, São Paulo, 2007.
- MOLOWNY, A.; NACHER, J.; LOPEZ-GARCIA, C. Reactive neurogenesis during regeneration of the lesioned medial cerebral cortex of lizards. **Neuroscience**, v.68, n. 3, p. 823-836. 1995.
- MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The L-Arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal Medicine**, v.27, p. 2002-2012. 1993.
- NACHER, J.; RAMÍREZ, C.; PALOP, J. J.; MOLOWNY, A.; DE LA IGLESIA, J. A. L. LÓPEZ-GARCÍA. Radial Glia and Cell Debris Removal During Lesion-regeneration of the Lizard Medial Cortex. **Histol. Histopathol**, n. 14, p. 89-101. 1999.
- NOH, K.-M.; KOH, J.-Y. Induction and Activation by Zinc of NADPH Oxidase in Cultured Cortical Neurons and Astrocytes. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 1-5. 2000.
- OLIVEIRA, R. M. W.; GUIMARÃES, F. S.; DEAKIN, J. F. W. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. Hippocampal nNOS in affective disorders. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 41, p. 333-341. 2008.
- PACKER, M. A.; STASIV, Y.; BENRAISS, A.; CHMIELNICKI, E.; GRINBERG, A., WESTPHAL, H.; GOLSMAN, S. A.; ENIKOLOPOV, G. Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. **PNAS**, v. 100, n. 16, p. 9566–9571. 2003.
- PARTATA, W. A.; KREPSKY, A. M. R.; MARQUES, M.; ACHAVA, M. Axotomy increases NADPH-diaphorase activity in the dorsal root ganglia and lumbar spinal cord of the turtle *Trachemys dorbigni*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 32, p. 489-493. 1999.
- PEDRAZA, C.; NAVARRO, J. F.; ARIAS, J. L. Effects of L-NOARG, a nitric oxide synthase inhibitor, on Ag-NOR activity in striatum of mice. **Psicothema**, n. 14, p. 605-607. 2002.
- POUGH, F.H. **A vida dos vertebrados**. Atheneu Editora, 2.ed. São Paulo, 1999.
- PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress Neurobiology**, n. 64, p. 51-68. 2001.

- QIN, L.; LIU, Y.; WANG, T.; WEI, S. J.; BLOCK, M. L.; WILSON, B.; LIU, B.; HONG, J. S. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. **J Biol Chem**, n. 279, p. 1415–1421. 2004.
- RACEKOVA, E.; MARTONCIKOVA, M.; MITRUSKOVÁ, B; CIZKOVÁ, D.; ORENDAKOVÁ, J. Age-related changes of NAPH-diaphorase positivity in the rat rostral migratory stream. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 25, n. 7, p. 1093-1104. 2005.
- RADMILOVICH, M.; FERNÁNDEZ, A.; TRUJILLO-CENÓZ, O. Localization of NADPH-diaphorase containing neurons in the spinal dorsal horn and spinal sensory ganglia of the turtle *Chrysemys d'orbigny*. **Exp Brain Res**, n. 113, p. 455–464. 1997.
- RAMIREZ, C.; NACHER, J.; MOLOWNY, A.; SANCHEZ-SANCHEZ, F.; IRURZUN, A. e LOPEZ-GARCIA, C. Photoperiod-temperature and neuroblast proliferation-migration in the adult lizard cortex. **NeuroReport**, n. 8, p. 2337-2342. 1997.
- RAMÓN e CAJAL, P. Nuevo estudio del encefalo de los reptiles. **Trab. La. Inv. Biol.** Univ. Madrid, n. 15, p. 83-99. 1917.
- RODRIGO, J.; SPRINGALL, D.; UTTENTHAL, L. O.; BENTURA, M. L.; ABADIA-MOLINA, F.; RIVEROS-MORENO, V. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. **Philos Trans R Soc Lond B**, n. 345, p. 175-221. 1994.
- ROMERO-GRIMALDI, G.; MORENO-LÓPEZ, B.; ESTRADA, C. Age-dependent effect of nitric oxide on subventricular zone and olfactory bulb neural precursor proliferation. **The Journal of Comparative Neurology**, n. 506, p. 339-346. 2008.
- SALUM, C.; PEREIRA, A. C. de C. I.; GUIMARÃES, E. A. D. B. B. Dopamine, Nitric Oxide and their Interactions in Models for the Study of Schizophrenia. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 21, n. 2, p.186-194. 2007.
- SCHUMAN, E. M.; MADISON, D. V. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. **Science**, n. 254, p. 1503-1506. 1991.
- SCHWERDTFEGER W.K.; LOPEZ-GARCIA, C. GABAergic neurons in the cerebral cortex of the brain of a lizard (*Podarcis hispanica*). **Neuroscience Letters**, n. 68, p. 117-121. 1986.
- SEARS, C. E.; ASHLEY, E. A.; CASADEI, B. Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? **Philosophical Transactions Royal Society of London**, London, v. 359, p.1021-1044. 2004.
- SILES, E.; MARTÍNEZ-LARA, E.; CAÑUELO, A.; SÁNCHEZ, M.; HERNÁNDEZ, R. LÓPEZ-RAMOS, J. C.; DEL MORAL, M. L.; ESTEBAN, F. J.; BLANCO, S.; PEDROSA, J. A.; RODRIGO, J.; PEINADO, M. A. A ge-related changes of the nitric oxide system in the rat brain. **Brain Research**, n. 956, p. 385–392. 2002.
- SMEETS, W. J. A. J.; ALONSO, J. R.; GONZÁLEZ, A. Distribution of NADPH-Diaphorase and Nitric Oxide Synthase in Relation to Catecholaminergic Neuronal Structures in the Brain of the Lizard *Gekko gekko*. **The Journal of Comparative Neurology**, n. 377, p. 121–141. 1997.
- SNYDER, S. H.; BREDT, D. S. Funciones biológicas del óxido nítrico. **Investigación y Ciencia**, n. 190, p.12-20. 1992.

- SON, H.; HAWKINS, R. D.; MARTIN, K.; KIEBLER, M.; HUANG, P. L.; FISHMAN, M. C.; KANDEL, E. R. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. **Cell**, n. 87, p. 1015–1023. 1996.
- SUÁREZ, J.; DÁVILA, J. C.; REAL, M. Á.; GUIRADO, S. Distribution of GABA, calbindin and nitric oxide synthase in the developing chick entopallium. **Brain Research Bulletin**, n. 66, p. 441–444. 2005.
- SUH, S. W.; HAMBY, A. M.; GUM, E. T.; SHIN, B. S.; WON, S. J.; SHELINE, C. T.; CHAN, P. H.; SWANSON, R. A. Sequential release of nitric oxide, zinc, and superoxide in hypoglycemic neuronal death. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, n. 28, p. 1697–1706. 2008.
- SZABADITS, E.; CSERÉP, C.; LUDÁNYI, A.; KATONA, I.; GRACIA-LLANES, J.; FREUND, T. F.; NYÍRI, G. Hippocampal GABAergic Synapses Possess the Molecular Machinery for Retrograde Nitric Oxide Signaling. **The Journal of Neuroscience**, July 25, v. 27, n. 30, p. 8101–8111. 2007.
- TAN, H. HE, J.; WANG, S.; HIRATA, K.; YANG, Z.; KURAOKA, A. KAWABUCHI, M. Age-related NADPH-diaphorase positive bodies in the lumbosacral spinal cord of aged rats. **Arch Histol Cytol**, v. 69, n. 5, p. 297-310. 2006.
- TOPRAKÇI, M.; ÖZMEN, D.; MUTAF, I.; TURGAN, N.; PARILDAR, Z.; HABIF, S.; GÜNER, I.; BAYINDIR, O. Age-associated changes in nitric oxide metabolites nitrite and nitrate. **Int J. Clin. Lab. Res**, 30, p. 83-85. 2000.
- VALTSCHANOFF, J. G.; WEINBERG, R. J.; KHARAZIA, V. N.; NAKANE, M.; SCHMIDT. Neurons in rat hippocampus that synthesize nitric oxide. **J. Comp Neurol**, n. 331, p. 111-121. 1993.
- VAREA, E.; PONSODA, X.; MOLOWNY, A.; DANSCHER, G.; LOPEZ-GARCIA, C. Imaging synaptic zinc release in living nervous tissue. **Journal of Neuroscience Methods**, n. 110, p. 57-63. 2001.
- VINCENT, S.,R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, n. 46, p. 755-784. 1992.
- WEST, A. R.; GALLOWAY, M. P.; GRACE, A. A. Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. **Synapse**, n. 44, p. 227-245. 2002.
- WILHELMUS, J. A. J.; SMEETS, P. V. H.; ANTHONY, H. M. L. A Forebrain Atlas of the Lizard *Gekko gekko*. **The Journal of Comparative Neurology**, n. 254, p. 1 – 19. 1986.
- WOOD, P. L.; CHOKSI, S.; BOCCHINI, V. Inducible microglial nitric oxide synthase: a large membrane pool. **Neuroreport**, n. 5, p. 977-980. 1994.
- XU, K. Y. et al. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v. 96, n. 2, p. 657-662, 1999.
- XU, M.; SHIBAYAMA, H.; KOBAYASHI, H.; YAMADA, K.; ISHIHARA, R.; ZHAO, P. Granulovacuolar degeneration in the hippocampal cortex of aging and demented patients -A quantitative study. **Acta Neuropathol**, n. 85, p. 1-9. 1992.

YUN, H-Y.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. **Molecular Psychiatry**, n. 2, p. 300-310. 1997.