



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARIA GORETTI MATIAS SANTOS

**NEUROGÊNESE PÓS-NATAL E REGENERAÇÃO
NEURONAL NO CÓRTEX CEREBRAL DO LAGARTO**
Tropidurus hispidus

ARACAJU
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIA GORETTI MATIAS SANTOS

NEUROGÊNESE PÓS-NATAL E REGENERAÇÃO
NEURONAL NO CÓRTEX CEREBRAL DO LAGARTO
Tropidurus hispidus

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

Orientador: Prof. Dr. Murilo Marchioro

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

ARACAJU
2006

MARIA GORETTI MATIAS SANTOS

**NEUROGÊNESE PÓS-NATAL E REGENERAÇÃO
NEURONAL NO CÓRTEX CEREBRAL DO
LAGARTO *Tropidurus hispidus***

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: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr Murilo Marchioro

1° Examinador: Prof. Dr. Francisco Prado Reis

2° Examinador: Prof. Dr. Ricardo Fakhouri

PARECER

A Deus por todas as bênçãos concedidas, e aos meus pais pela confiança que sempre depositaram em mim.

AGRADECIMENTOS

O prazer de ressaltar a importância de pessoas queridas em momentos especiais fundamentalmente é comemorar a vida e, especialmente a arte de conviver. Estou certa que cada encontro somos passíveis de mudança e de crescimento. Se hoje me sinto agraciada com esta vitória, imperfeita enquanto obra humana, porém motivo de orgulho para esta singela autora, devo isso aos que compartilharam comigo momentos inesquecíveis desta trajetória:

À Deus, fonte inesgotável de amor, fé e bondade, por me ajudar a superar os obstáculos e comemorar a cada vitória.

Aos meus pais Severino Matias e Salomé que orientaram e iluminaram o melhor caminho a seguir com seus ensinamentos e, principalmente seus exemplos que são fundamentais para minha vida.

Ao meu esposo Roberto, por sempre se orgulhar de mim, qualquer que seja a conquista, por entender a minha ausência, pelo apoio, incentivo e amor dedicados.

Ao meu filho Gabriel que, apesar da pouca idade, colaborou bastante na confecção deste trabalho, mediante as suas possibilidades, agradeço principalmente pelo reconhecimento do esforço que faço em conciliar trabalho, estudo e vida pessoal.

A Ana Raquel, minha abençoada, sempre me proporcionado alegria, nos momentos de mais estresse ou angústia, bastava um beijinho seu para tudo se dissipar; e a Fernanda por cuidar tão bem da minha filhinha, possibilitando –me tranquilidade de realizar minhas tarefas profissionais e acadêmicas.

A minha irmã Marcia, ao meu cunhado Valberio e a minha linda sobrinha Marília, por compartilharem os momentos alegres de minha vida como se fossem seus, e por nas horas difíceis me apoiarem incondicionalmente.

Aos meus professores que desde minha graduação me mostraram a importância de fazer questionamentos e me indicaram o caminho a seguir na busca de respostas.

Ao orientador Murilo Marchioro, que sempre disponível e cooperativo me atendeu e incentivou este trabalho, além de transmitir conhecimentos que vão além dos didáticos: ética, paciência, respeito, amor a profissão, humildade, sabedoria, dentre outros.

Ao co-orientador Carlos Lopez-Garcia, que apesar da barreira geográfica, proporcionou através de seus ensinamentos contribuições relevantes a este estudo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Fakhouri por cooperar com este trabalho, disponibilizando o laboratório de Patologia da UFS e seu próprio laboratório, para realização de parte desta pesquisa, e aos seus assistentes Michell e Magna, pela preciosa colaboração.

A Jean Marcel pelo auxílio em uma parte deste trabalho, e parabéns pela alegria e determinação na realização de suas atividades, com certeza serás um ótimo profissional.

Aos companheiros de mestrado, que em busca de um sonho comum, o aperfeiçoamento profissional, compartilharam comigo os mais diferentes momentos desta jornada, guardo um carinho especial por todos vocês.

E enfim a todos que fizeram parte da minha vida e contribuíram de alguma forma para a realização desse sonho.

“O coração do homem planeja o seu caminho, mas o
Senhor lhe dirige os passos”. Pv 16:9

RESUMO

A neurogênese pós-natal é uma característica conservada durante a evolução, e o fenômeno de regeneração neuronal, que possibilita que neurônios lesionados ou destruídos sejam substituídos por outros recém-formados, gera otimismo para a estratégia de reparação neuronal. A proposta deste trabalho foi de verificar a existência de neurogênese pós-natal e analisar a potencialidade de regeneração neuronal no córtex cerebral do lagarto *Tropidurus hispidus*. Como modelo experimental o *T. hispidus* foi selecionado por apresentar córtex cerebral com relações filogenéticas ao hipocampo de mamíferos. A quantificação do número de neurônios no córtex cerebral do *T. hispidus* ao longo do desenvolvimento foi realizada através da Técnica de Fracionador Óptico. Para o estudo da neurogênese pós-natal foi utilizada a Técnica Imunohistoquímica para 5-BrDU. Com o intuito de demonstrar a existência de glia radial foi utilizada a Técnica de Golgi. Para averiguar o potencial regenerativo no córtex cerebral do *Tropidurus hispidus* as Técnicas de 3-Acetilpiridina, de Hematoxilina-eosina e Nissl foram utilizadas. Os resultados obtidos demonstraram que houve um aumento progressivo no número de neurônios no córtex medial ao longo da vida dos animais; o número de núcleos 5-BrdU positivos foi maior em lagartos adultos em relação aos jovens; a presença de glia radial foi revelada no córtex cerebral de *Tropidurus hispidus* adultos, e foi constatado um aumento do número de núcleos picnóticos para os animais com 7 dias sob ação da 3-AP, e uma diminuição aos 33 dias após 3-AP. Estes resultados sugerem o córtex cerebral do *Tropidurus hispidus* como um modelo promissor para o estudo de neurogênese pós-natal e regeneração neuronal do tecido nervoso.

PALAVRAS-CHAVE: Córtex cerebral; neurogênese pós-natal; neurônios; regeneração neuronal; *Tropidurus hispidus*.

ABSTRACT

The post-natal neurogenesis is a characteristic which is kept during evolution, and the phenomenon of neuronal regeneration allows the injured neurons to be replaced for other new ones, this phenomenon creates optimism in the strategy of neuronal repairment. The aim of his work was to verify the existence of post-natal neurogenesis and the potenciality of neuronal regeneration in the cerebral cortex of the lizard *Tropidurus hispidus*. The *T. hispidus* was choosed as experimental model because it presents philogenetic relationship with the mamalian cerebral cortex and hipocampus. The counting of the number of neurons in the cerebral cortex of the *T. hispidus* during the development was realized through the Optical Fraction Techninque. The imunohistochemical technique was used for 5-Brdu to study post-natal neurogenesis. The Golgi technique was used to demonstrate the existence of a radial glia in the adult lizard cortex. To check the regenerative potential of the T. hispidus cerebral cortex animals were injected with the antimetabolite 3-Acetilpiridine and the brain sections were stained by Hematoxiline-eosine and Nissl techniques. The results showed a progressive increase in the number of neurons in the medial cortex during the life of the animals; the number 5-BrDu positive nuclei was bigger in adult lizards, comparing to young ones; the presence of radial glia was revealed in the cerebral cortex of the adult *Tropidurus hispidus*, and it was observed an increase of the number of picnotic nuclei for animals with 7 days under the action of 3-AP, and a decrease 33 days after 3-AP. These results suggest that the cerebral cortex of the *Tropidurus hispidus* is a good experimental model to study postnatal neurogenesis and neuronal regeneration of the nervous system.

Keywords: cerebral córtex; postnatal neurogenesis; neurons; neuronal regeneration; *Tropidurus hispidus*

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Relações filogenéticas entre os vertebrados terrestres em relação à estrutura do córtex cerebral.	20
FIGURA 2: Aspecto geral da morfologia do telencéfalo de <i>T. hispidus</i> em corte transversal e corado pelo método de Niss.....	22
FIGURA 3: Relações estruturais entre o giro denteado da formação hipocampal de mamíferos e o córtex cerebral de lagarto.....	23
FIGURA 4: Organização geral do córtex cerebral de <i>Podarcis hispanica</i> em corte transversa.....	24
FIGURA 5: O lagarto tropical <i>Tropidurus hispidus</i>	29
FIGURA 6: Relação entre o comprimento (medida nariz-cloaca) e o peso de lagartos machos e fêmeas da espécie <i>T. hispidus</i>	34
FIGURA 7: Método para contagem de núcleos picnóticos: Corte transversal do telencéfalo de <i>T. hispidus</i> corado por Hematoxilina-Eosina.....	41
FIGURA 8: Variação do número de neurônios no córtex medial de <i>T. hispidus</i> dependente da idade	43
FIGURA 9: Núcleos 5-BrDu positivos no telencéfalo de <i>Tropidurus hispidus</i>	46
FIGURA 10: Número de núcleos 5-BrDu-positivos no córtex cerebral de um dos hemisférios em lagartos jovens (narina-ventre: <80 mm), adultos (>80 mm<90 mm) e	

velhos (>100 mm) eutanaziados 4 horas depois de uma injeção (i.p) de 5-BrDu.....	47
FIGURA 11: Distribuição de núcleos 5-BrDu positivos no córtex medial de <i>T. hispidus</i> em diferentes tempos de sobrevivência após o pulso de 5-BrDu..	48
FIGURA 12: Presença de glia radial no córtex cerebral de <i>Tropidurus hispidus</i>	50
FIGURA 13. Lesão do córtex cerebral de <i>T. hispidus</i> induzida pela 3-AP.....	52
FIGURA 14: Efeito dependente do tempo da 3AP sobre os neurônios do córtex medial do lagarto <i>T.hispidus</i>	53
FIGURA 15: Regeneração neuronal no córtex medial de <i>T. hispidus</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS

3-AP: 3- Acetilpiridina

ATP: trifosfato de adenosina

BrDu: bromodeoxiuridina

CVS: centro vocal superior

DNA: ácido desoxirribonucléico

EPM: erro padrão da média

GFAP: glia fibrilar ácida

HE: hematoxina-eosina

PFA: paraformaldeido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Regeneração do Sistema Nervoso em Vertebrados.....	15
1.2 Neurogênese Pós-natal em Vertebrados: Breve Histórico.....	17
1.3 Organização do Córtex Cerebral dos Vertebrados: Relações Filogenéticas.....	19
1.4 O Córtex Cerebral dos Lagartos.....	20
1.5 <i>Podarcis hispânica</i> : Um Modelo Experimental de Regeneração do Córtex Cerebral	24
1.6 <i>Tropidurus hispidus</i> : Uma Espécie de Lagarto Tropical.....	26
1.6.1 Aspectos ecológicos.....	26
1.6.2 Aspectos neurobiológicos.....	27
1.7 3-AP; Um Modelo Experimental de Lesão Neural.....	30
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Geral.....	32
2.2 Específicos.....	32
3 METODOLOGIA.....	33
3.1 Procedimentos Metodológicos e Modelo Animal.....	33
3.2 Estimativa de Idade do <i>Tropidurus hispidus</i>	33
3.3 Quantificação de Neurônios no Córtex Cerebral do <i>Tropidurus hispidus</i> jovens, adultos e velhos.....	35
3.4 Imunohistoquímica para 5-brdU e para Lectina	35
3.5 Técnica de Golgi para Identificação de Glia Radial.....	37
3.7 Lesão Neurotóxica do Córtex Cerebral pela 3APAcetilpiridina.....	38
3.6 Técnicas de Colorações: Nissl e Hematoxilina-eosina.....	39
3.8 Quantificação de Núcleos Picnóticos.....	40
3.9 Análise de Dados.....	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Número de Neurônios no Córtex Medial do <i>Tropidurus hispidus</i> ao Longo do Desenvolvimento.....	43
4.2 Neurogênese Pós-natal no Córtex Cerebral do <i>Tropidurus hispidus</i>	44

4.3 Presença de Glia Radial em Lagartos <i>Tropidurus hispidus</i>	49
4.4 Regeneração Neuronal no Córtex Cerebral do <i>Tropidurus hispidus</i>	51
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
APÊNDICE	67

1 INTRODUÇÃO

Durante várias décadas um dos principais paradoxos da neurobiologia entre vertebrados, e de maneira especial entre mamíferos, foi a neurogênese pós-natal no cérebro de animais adultos. Mais recentemente, com o avanço dos estudos, esse paradigma vem sendo reavaliado, através de evidências sobre propriedades neurogênicas no sistema nervoso de vários grupos de animais, cujas células detêm a capacidade de regeneração neuronal, minando assim o dogma no qual os neurônios são gerados apenas durante a vida fetal (CONTI et al., 2003).

Uma maior compreensão sobre os mecanismos de funcionamento do sistema nervoso, como se ajusta diante influências ambientais durante o desenvolvimento normal, e como se estabelece ou restaura-se mediante condições patológicas ou experimentais, é de fundamental importância para que experimentos e avanços tecnológicos possam ser obtidos. Novas elucidações acrescidas à adaptabilidade do sistema nervoso demonstram assim que o conceito de um sistema estagnado e imutável está realmente ultrapassado, cedendo lugar para um neuro-universo cada vez mais responsivo, dinâmico e plástico.

À medida que pesquisas começaram a esclarecer os complexos processos celulares que ocorreram mediante lesão do sistema nervoso, meios para minimizar a agressão celular sofrida por esse sistema passaram a ser mais bem instituídos, entretanto o real impacto da neurogênese e da regeneração neuronal, e a investigação mais profunda de como o ambiente pode ser explorado para que favoreça a integração e a sobrevivência celular, necessitam de análise mais aprofundada. Para Lopez-Garcia et al. (2002a) “a possibilidade de se manipular e aumentar potencialidade regenerativa oculta gera otimismo para estratégias de reparação neural”.

Estudos envolvendo a neurogênese e a regeneração neuronal, proporcionam o desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos, representando claramente importante desafio para investigação clínica e fundamental; no entanto um modelo experimental adequado para que essas alterações possam ser analisadas passa a ser um

desafio para os pesquisadores. Neste estudo optou-se pelo lagarto, uma vez que, o córtex medial desse animal e o hipocampo do mamífero demonstra compartilhar propriedades ortogenéticas, estruturais e filogenéticas comuns, que podem ser preditivas de propriedades semelhantes relativas a regeneração neuronal (LOPEZ-GARCIA et al., 2002b).

Pesquisa parcial foi realizada pelo Laboratório de Neurofisiologia da Universidade Federal de Sergipe, demonstrando que o lagarto *Tropidurus hispidus* apresenta neurogênese pós-natal (NUNES et al., 2003); além de dar continuidade a esta linha de pesquisa, este presente estudo analisou a potencialidade de regeneração neuronal no córtex de animais adultos, a partir de lesão provocada pela neurotoxina 3-Acetilpiridina.

1.1 Regeneração do Sistema Nervoso em Animais Vertebrados

Pesquisas e descobertas de fenômenos regenerativos levam a uma expectativa bastante otimista sobre a potencialidade do sistema nervoso; as células nervosas apresentam capacidade de regeneração, ou de diferenciação e passam a realizar funções antes desempenhadas por células que sofreram lesões (STEIN et al. apud FERES & CAIRASCO, 2001).

Um sistema bastante estudado quanto ao seu potencial regenerativo é o auditivo (GROSS, 2000; FERES & CAIRASCO, 2001); estudos em diferentes espécies vêm demonstrando que este sistema pode reagir diante de situações que venham perturbar seu funcionamento, tanto com tentativas de regeneração quanto com reestruturação. O potencial plástico dos neurônios que compõem os sistemas sensoriais está presente durante a fase mais precoce da vida; no entanto em peixes e anfíbios esta capacidade esta presente durante toda vida desses animais, podendo reparar perdas ou mesmo aumentar a sensibilidade auditiva (FERES & CAIRASCO, 2001).

Em estudos sobre regeneração de elementos neurais, observou-se que a formação hipocampal apresenta um importante papel no processo de aprendizagem e memória. Este fato foi constatado em inúmeras pesquisas (CONTI et al., 2003; FONT et al., 1997; 2001; LOPEZ-GARCIA et al., 2002b; MOLOWNY et al., 1995) . Utilizando marcadores em células em proliferação, averiguou-se que a produção de novos neurônios, processo denominado neurogênese, ocorre em uma variedade de mamíferos, incluindo ratos, camundongos, macacos, gorilas, e inclusive no ser humano (GOULDb, 1999).

Para Hastings (2001) em determinadas regiões do cérebro dos mamíferos, como no giro denteado, a geração neuronal perpetua-se na idade adulta; a produção e a sobrevivência desses neurônios são influenciadas por fatores neuroendócrinos e experimentais, sugerindo que o ambiente pode afetar a estrutura e função do sistema nervoso.

Kandel (1991) em seus estudos relata que:

A unidade funcional do sistema nervoso não é mais centrada apenas no neurônio, mas concebida como uma imensa rede de conexões sinápticas entre unidades neuronais, além de células gliais, as quais são modificáveis em função da experiência individual, ou seja, do nível de atividade e do tipo de estimulação recebida.

No entanto após uma lesão do sistema nervoso central a reação glial apresenta-se com comportamento dúbio, participando de uma forma inibitória ao crescimento de fibras nervosas, no que diz respeito a formação da cicatriz glial, nas bordas da lesão, e por outro lado estimulando o crescimento dessas fibras, levando-se em conta a expressão de fatores neurotróficos gliais em regiões próximas e distantes do local da lesão (LEME, 2001).

Nunes et al. (2003) averiguou presença de glia radial, em íntima relação com neurônios jovens, nas áreas consideradas como regiões de “nascimento”, e migrações neuronais do lagarto *T. hispidus*. Para Nacher (1999b) todas as áreas do sistema nervoso dos vertebrados em que a glia persiste após o nascimento, também apresenta neurogênese pós-natal; além disso , a proliferação celular desta glia no lagarto adulto,

provavelmente propicia a geração de novos neurônios no córtex medial desses animais; essas células também estão ativamente envolvidas na remoção de restos celulares gerados durante lesão no córtex medial..

1.2 Neurogênese Pós-natal em Vertebrados: Breve Histórico

Embora se detenha atualmente o conhecimento de que o sistema nervoso não é imutável, e que possui propriedades morfológicas e funcionais que sofrem influência de alterações ambientais, sexuais, de idade, dentre outras (KEMPERMANN et al., 1998); durante muito tempo o pensamento dominante na comunidade científica afirmava que a geração de novos neurônios ocorria apenas durante o desenvolvimento embrionário. Apesar de, na primeira metade do século XX já existirem relatos constatando a possibilidade de neurogênese em cérebro adulto, estes fatos tendiam a ser ignorados, possivelmente em decorrência ao grande peso das autoridades opositoras à idéia e a inadequação de métodos disponíveis para detectar a divisão celular e a distinção entre glia e neurônios pequenos.

Um avanço importante no estudo da neurogênese surgiu a partir da introdução da autoradiografia com [³H]-timidina, que proporcionou a marcação de neurônios em divisão. Estudos utilizando-se desta técnica relatavam a existência de novos neurônios em várias estruturas de ratos jovens e adultos, incluindo giro denteado da formação hipocampal, neocórtex e bulbo olfatório (ALTMAN & DAS, 1965). Entretanto, estes primeiros trabalhos não conseguiram apresentar evidências sobre o papel funcional dos neurônios de nova geração; apenas no final dos anos 70 é que o tema voltou a ser discutido em maior profundidade.

Estudos desenvolvidos nos Estados Unidos, iniciados nos anos 60, a partir da análise sistemática das bases neuronais do aprendizado musical dos pássaros, comprovaram adição de neurônios com [³H]-timidina, e comprovaram um marcante dimorfismo sexual no cérebro de canários. Observou-se que machos da espécie apresentaram repertórios musicais complexos, e que fêmeas, geralmente não cantam

ou emitem repertórios bem mais simples que os machos. Entretanto, quando as fêmeas recebem tratamento sistêmico com o hormônio testosterona elas enriquecem o seu repertório musical que se assemelha ao produzido pelos machos (NOTTEBOHM, 2002).

Estudando o Centro Vocal Superior (CVS) em canários machos, fêmeas, e em fêmeas tratadas com testosterona, pesquisadores verificaram um aumento significativo do volume do cérebro nos machos em relação às fêmeas e das fêmeas tratadas em relação às não tratadas com testosterona. Eles observaram ainda oscilações do volume do CVS durante as diferentes estações do ano. Nos meses de outubro e março o volume aumenta e em julho e dezembro ocorre uma retração (KIRN et al., 1994). Utilizando a marcação pela H³-timidina os pesquisadores demonstraram que este aumento de volume não era causado apenas por um aumento do número de sinapses formadas, mas sim um aumento do número dos neurônios de projeção que fazem parte dos circuitos responsáveis pelo aprendizado do canto.

Finalmente na década de 90, avanços estabeleceram a realidade da neurogênese em mamíferos, fato proporcionado pelo surgimento de um novo marcador de replicação do DNA; trata-se de um análogo sintético da timidina chamado Bromodeoxiuridina (BrDu) que à semelhança da H³-timidina incorpora-se ao DNA durante a fase S do ciclo celular. A vantagem desta nova substância é que um anticorpo pode ser desenvolvido contra ela favorecendo assim estudos de imunocitoquímica e imunohistoquímica os quais revelaram novos aspectos sobre o fenótipo e sobre o número de neurônios que se incorporam no cérebro a cada dia. Desde então a neurogênese pós-natal tem sido demonstrada em todas as espécies de mamíferos estudadas inclusive no cérebro humano (ERIKSON et al., 1998).

Nos últimos cinco anos diversos estudos eletroneurofisiológicos, especialmente utilizando fatias do hipocampo de ratos, revelaram que neurônios de nova geração após migrarem para as camadas celulares do giro denteado formaram sinapses, e responderam à estimulação elétrica de modo similar aos neurônios antigos, o que sugere uma completa integração à circuitaria da formação hipocampal (VAN PRAAG et al., 1999). Portanto, o fenômeno de gênese neuronal no período pós-natal

gera otimismo em decorrência da possibilidade de que esse fato possa possibilitar que neurônios lesionados ou destruídos, possam ser substituídos por outros recém-formados.

1.3 Organização do Córtex Cerebral de Vertebrados: Relações Filogenéticas

Comparando a estrutura dos hemisférios cerebrais entre os principais vertebrados amniotas, os anfíbios apresentam o encéfalo notavelmente não especializado, apresentando áreas hipocampais e piriformes primitivas formadas a partir do arquicórtex e paleocórtex, respectivamente, com células dispersas localizadas na zona periventricular (Figura 1). Projeções sensoriais vindas do tálamo terminam principalmente no palio medial e corpo estriado (MILTON, 1995).

Os répteis apresentam um córtex delgado composto por corpos celulares neuronais, que estão agrupados em sua maioria, formando uma camada celular principal intercalada entre duas camadas plexiformes, as quais são formadas por escassos interneurônios e onde as conexões aferentes finalizam de modo extremamente laminado (LOPEZ-GARCIA et al., 2002a). As porções medial e dorso-medial, são consideradas homólogas à formação hipocampal dos mamíferos, e a porção lateral corresponde ao córtex olfativo (piriforme) dessa espécie; uma pequena porção dorsal é possivelmente similar ao isocórtex. Outra estrutura importante do telencéfalo de répteis é a porção dorso-ventricular localizada acima do corpo estriado; para esta área converge a maior parte das projeções sensoriais vindas do tálamo. Muitos autores consideram a área dorso-ventricular homóloga ao neocórtex dos mamíferos (ABOITZ et al., 2002).

Os mamíferos apresentam córtex cerebral bem desenvolvido, com seis camadas (isocórtex), posicionado entre a formação hipocampal (o arquicórtex, medial) e o córtex olfativo (paleocórtex, lateral). O isocórtex abrange todo encéfalo, tanto estrutural, como funcionalmente, e para ele convergem a maioria parte das projeções sensoriais, em consequência disso experimentou uma grande expansão em relação às

outras áreas cerebrais. (ABOITIZ et al., 2002). O arquicórtex é representado pelo grande hipocampo. Os lobos ópticos, agora denominados colículos anteriores, são pequenos porque o córtex cerebral adotou grande parte de sua função.

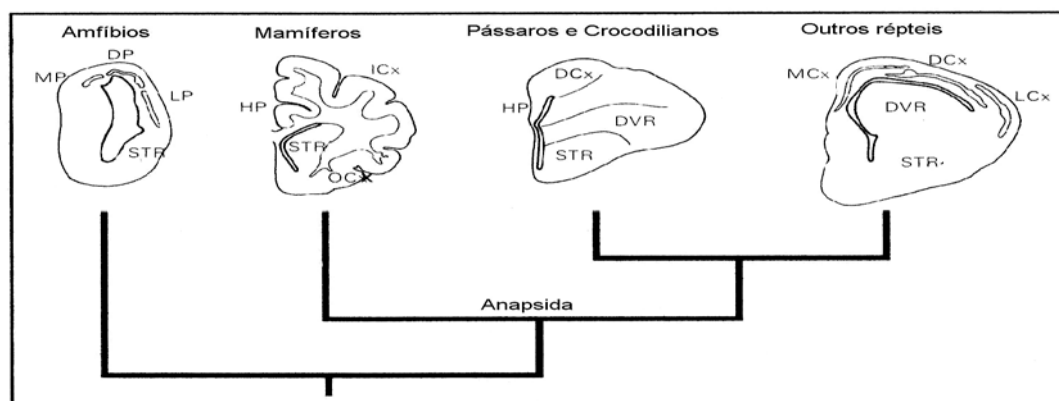


FIGURA 1: Relações filogenéticas entre os vertebrados terrestres em relação à estrutura do córtex cerebral: Para cada táxon um hemisfério cerebral de uma espécie característica é mostrado. A porção medial está à esquerda de cada figura. DCx: córtex dorsal; DVR: porção dorso-ventricular; HP: hipocampo; LCx: córtex lateral; LP: paleo lateral; MCx: córtex medial; MP: paleo medial; STR: corpo estriado; Ocx: córtex olfativo; ICx: isocórtex (ou neo-córtex). FONTE: Aboitz et al., 2002.

1.4 O Córtex Cerebral de Lagartos

Entre os animais da Classe Reptilia, a Sub-Classe Esquamata reúne as cobras e os lagartos. A figura 2 mostra um corte transversal na porção medial do telencéfalo de um lagarto adulto da espécie *Tropidurus hispidus*, corado pelo método de Nissl. O córtex cerebral é a faixa mais estreita localizada entre o ventrículo lateral e a pia máter, e é normalmente dividido em: córtex medial, dorso-medial, dorsal e lateral. Nesta espécie o córtex medial apresenta o maior agrupamento de corpos celulares (corados pelo azul de toluidina), formando a camada celular compacta, posicionada entre as camadas plexiforme interna (anexa ao ventrículo lateral) e a plexiforme externa (anexa à pia máter). As camadas plexiformes são formadas pelos dendritos,

axônios e processos de glia radial além de uma pequena quantidade de corpos celulares (neurônios e microglia) (DE LA IGLESIA^b; LOPEZ-GARCIA, 1994, 1997b). Já na camada celular uma surpreendente variedade de tipos neuronais (5 tipos e 11 subtipos) foi descrita na espécie *Podarcis hispânica* pela utilização da técnica de Golgi. (DE LA IGLESIA, 1997a).

A figura 3 mostra as relações estruturais entre o córtex medial de lagartos e o giro denteado da formação hipocampal de roedores. Os neurônios principais (ou de projeção) do córtex medial emitem projeções axonais para os córtices dorso-medial e dorsal. Estes terminais são ricos em zinco e podem ser visualizados pelo método de Timm que detecta a presença de metais pesados no tecido nervoso (LOPEZ-GARCIA et al., 2002b). As projeções zincérgicas do telencéfalo de lagartos lembram os 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) observou-se através de métodos imunohistoquímicos que estes neurônios de projeção são glutamatérgicos; portanto, quando estimulados liberam nos terminais pós-sinápticos glutamato mais zinco. Atualmente, existe um debate intenso sobre o papel fisiológico do zinco em sinapses glutamatérgicas especialmente na formação hipocampal (KAY, 2003; LOPANTSEV et al., 2003).

Uma das características marcantes do córtex medial de lagartos e da formação hipocampal dos mamíferos é a ontogênese tardia. 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 (RAKIC & NOWAKOWSKI, 1981). Em lagartos a neurogênese pós-natal tem sido demonstrada em várias espécies (LOPEZ-GARCIA, 1988). Em animais de zonas temperadas, como é o caso da espécie *Podarcis hispânica*, a neurogênese varia dependendo da estação do ano, durante os meses de inverno a taxa cai drasticamente (RAMIREZ et al., 1997).

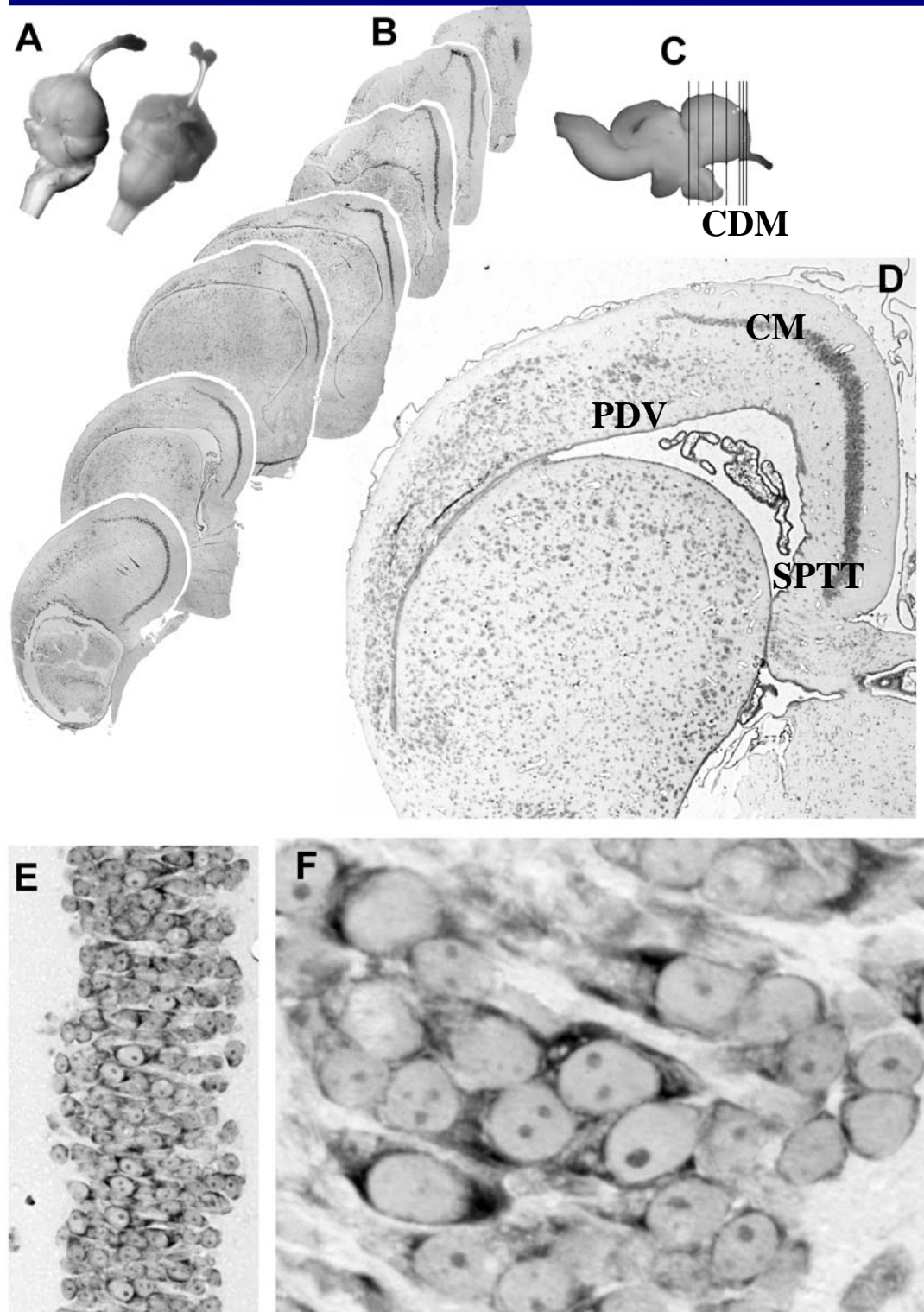


FIGURA 2: Aspecto geral da morfologia do telencéfalo de *T. hispidus* em corte transversal e corado pelo método de Nissl: A: dorso e ventre do cérebro inteiro. B: telencéfalo cortado transversalmente como mostrado em C. D: uma visão ampliada de um dos cortes transversais mostrados em B. E, F: detalhe a camada de neurônios no córtex medial. DC, córtex dorsal; DMC, córtex dorso-medial; PDV, porção dorso-ventricular; MC, córtex medial; SPT, septum. FONTE: Ramalho, 2003.

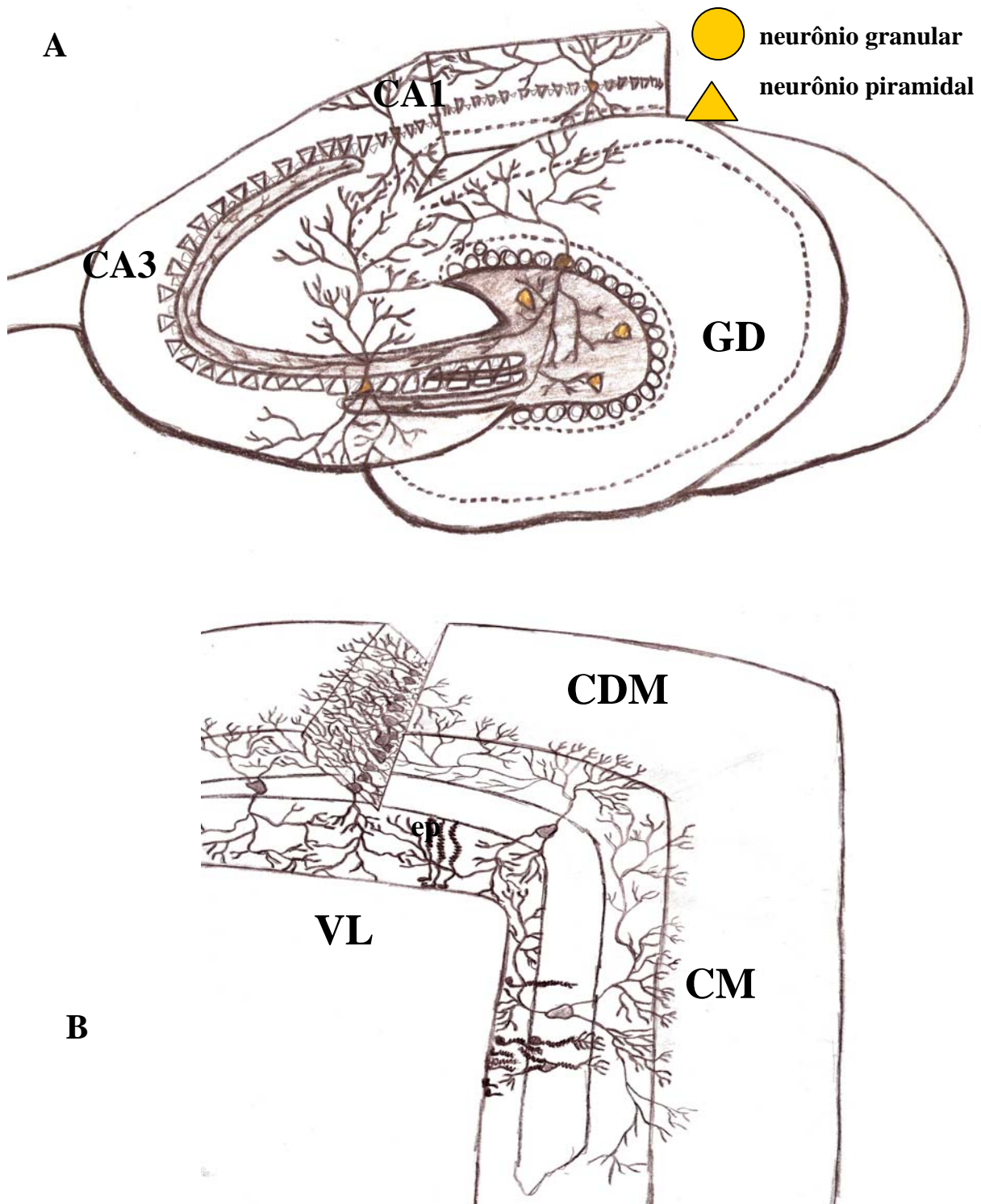


FIGURA 3: Relações estruturais entre o giro denteado da formação hipocampal de mamíferos e o córtex cerebral de lagarto. Os neurônios do córtex medial dos lagartos (B) apresentam várias similaridades com aos neurônios granulares do giro denteado da formação hipocampal dos mamíferos (A) (ver texto). GD: giro denteado da formação hipocampal; CA3: área CA3 da formação hipocampal; CA1: área CA1; CM: córtex medial; CDM: córtex dorso-medial; VL: ventrículo lateral; ep: epândima. FONTE: Marchioro, 2003.

1.5 *Podarcis hispânica*: Um Modelo Experimental de Regeneração de Córtex Cerebral

Um dos lagartos mais estudados do ponto de vista neurobiológico é a espécie *Podarcis hispanica* (BLASCO-IBANEZ et al., 1992; DE LA IGLESIA et al., 1997a; LOPEZ-GARCIA et al., 2002b; PEREZ-SANCHES et al, 1989) e o grupo de pesquisa que mais tem contribuído para isso é liderado pelo Dr. Carlos Lopez-Garcia da Universidade de Valencia na Espanha (LOPEZ-GARCIA et al., 2002b). A figura 4 mostra o aspecto geral do cérebro *P. hispânica* e a organização do córtex cerebral em corte transversal.

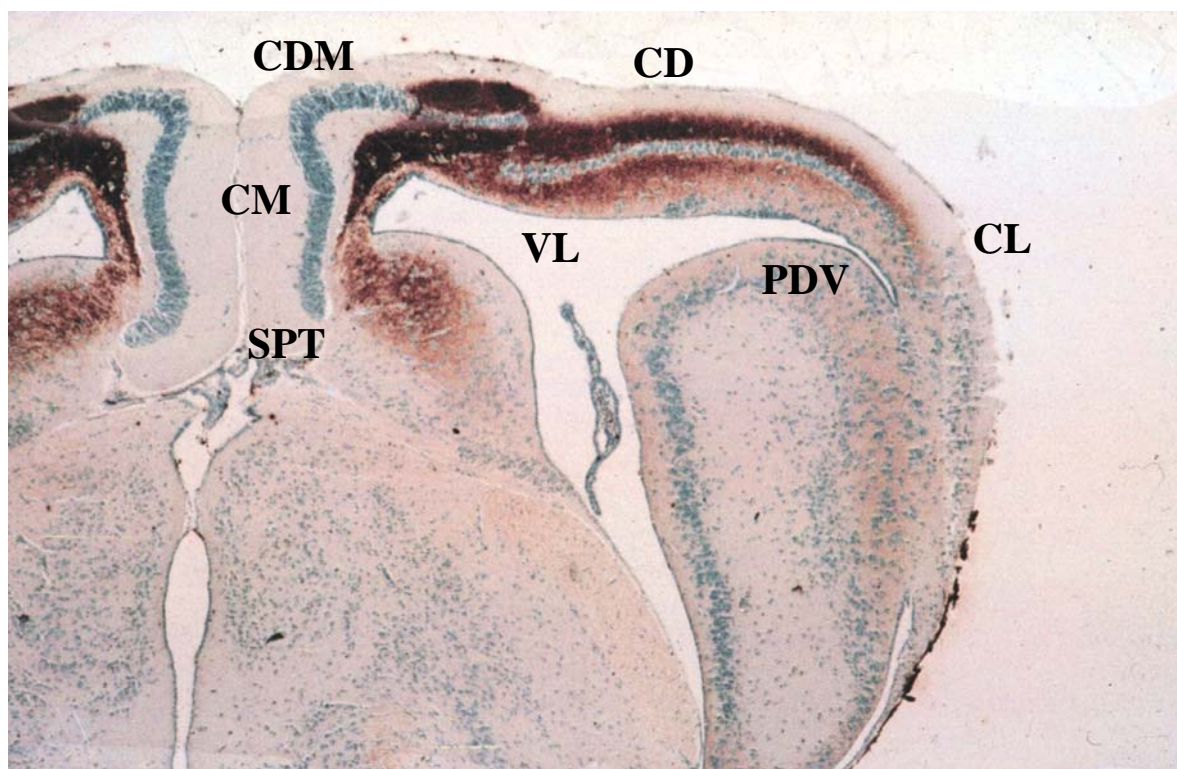


FIGURA 4: Organização geral do córtex cerebral de *Podarcis hispânica* em corte transversal.. Em escuro estão evidenciados os terminais sinápticos ricos em zinco, corados pelo método de Timm. CM: córtex medial; CDM: córtex dorso-medial; CD: córtex dorsal; CL: córtex lateral; VL: ventrículo lateral; PDV: porção dorso-ventricular. Fonte: Font, 1997.

Desde o início dos anos 80 estes pesquisadores foram atraídos por dois aspectos importantes da neurobiologia deste animal: a constatação de que o seu telencéfalo apresenta uma intensa atividade neurogenética em qualquer fase da vida adulta e uma incrível habilidade em repor neurônios perdidos por lesão neural. No início dos estudos foi verificado que existe uma correlação significativa entre a idade de *P. hispânica* e o número de neurônios no seu córtex medial. Esta constatação sugeriu que nesta espécie há adição de neurônios no parênquima cerebral durante toda a vida do animal (LOPEZ-GARCIA et al., 2002b).

Estudos demonstraram pelas técnicas de autoradiografia (H^3 -timidina) e imunohistoquímica (BrDu) a presença de neurônios de nova geração no telencéfalo de *P. hispânica* (MARCHIORO et al., 2005). Das áreas telencefálicas estudadas destaca-se em primeiro lugar o córtex medial por apresentar maior atividade neurogenética. Outras áreas como o córtex dorso-medial, dorsal, lateral e porção dorso-ventricular revelaram uma atividade neurogenética mais discreta (PEREZ-SANCHES et al., 1989).

Outro aspecto extremamente importante do córtex cerebral de *P. hispânica* é a sua capacidade de regeneração em resposta à lesão química. Estudando os efeitos da 3-AP o grupo liderado por Lopez-Garcia criou o termo “neurogênese reativa” para expressar a intensa atividade neurogenética que se seguia a uma lesão severa do córtex medial (MOLOWNY et al., 1995). Esta atividade tem origem principalmente no *sulcus arquicorticalis* dos ventrículos laterais onde surgem neurônios de nova geração, a exemplo do que ocorre na formação hipocampal de mamíferos. Este fenômeno de neurogênese pós-natal e regeneração neural é único entre os vertebrados amniotas .

Como discutido anteriormente, a neurogênese pós-natal é um fenômeno extremamente dinâmico e varia em função de uma série de fatores externos e internos ao organismo. Para a espécie *Podarcis hispânica*, que vive em um clima temperado, dois fatores importantes são a intensidade luminosa e a temperatura ambiental (RAMIREZ et al., 1997). Fotoperíodos longos, que ocorrem durante os meses de verão, aumentam o número de neuroblastos na camada neuroepitelial endimária, e temperaturas baixas, durante os meses de inverno, inibem a migração de neurônios

novos. Na verdade, *P. hispânica* passa por um período de hibernação durante o inverno europeu. Poucos estudos existem sobre a atividade neurogenética de espécies tropicais de lagartos (MARCHIORO et al., 2005; NUNES et al., 2003; SANTOS et al., 2004).

1.6 *Tropidurus hispidus*: Uma Espécie de Lagarto Tropical

1.6.1 Aspectos ecológicos

O gênero *Tropidurus* (Squamata, Tropiduridae) ocorre na savana, no cerrado, na caatinga, e em florestas da América do Sul, normalmente em ambientes abertos (RODRIGUES, 1988). A figura 5A apresenta quatro exemplares da espécie *T. hispidus* utilizada neste trabalho. A maioria das espécies do gênero é insetívora e algumas delas possuem hábitos arborícolas. Van Sluys (1998) estudou o crescimento e os hábitos da espécie *Tropidurus itambere*, em uma formação rochosa do estado de São Paulo, observou que a espécie ocorre durante todo o ano, e que os machos (0,15 mm/dia) crescem mais rápido que as fêmeas (0,11 mm/dia), são territoriais, e vivem em média 3 anos. Estes animais atingem a maturidade sexual entre 150 a 180 dias indicando que os indivíduos que nasceram no início do recrutamento (janeiro-fevereiro) alcançarão maturidade sexual na estação reprodutiva seguinte (outubro-novembro).

A dinâmica populacional da espécie *T. itambere* foi estudada por Van Sluys (2000), em Valinhos, São Paulo, pelo método de “marcação-recaptura”, entre fevereiro de 1993 e janeiro de 1995. Observou que a eclosão dos ovos ocorre na estação chuvosa (novembro-março), e o recrutamento ocorre entre janeiro e abril, quando os jovens se agregam à população. Nos meses de setembro a outubro, no início da estação reprodutiva, os animais adultos predominam. Neste estudo, as curvas relacionando idade e tamanho do animal (medida nariz-ventre) foi observado que, os maiores indivíduos da população (machos ou fêmeas) tinham aproximadamente três

anos de vida, corroborando com a estimativa feita em seu estudo anterior (VAN SLUYS, 1998).

Em outro estudo, Van Sluys e colaboradores (2004) compararam os hábitos de duas espécies do gênero *Tropidurus*: *T. hispidus* e *T. Montanus*, em um habitat rochoso do estado de Minas Gerais. As duas espécies são diurnas, e são mais comumente encontradas sobre as pedras; alimentam-se principalmente de artrópodes,

mas também consomem plantas (flores, especialmente *T. hispidus*). Para esta espécie os autores relataram uma frequência de ocorrência de 31% para os *Hymenopteras formicidae* (formigas), 26% para os *Coleópteros* (besouros), 26% para larvas de *Aranae* (aranhas) e 14% para larvas de *Lepidóptera* (borboletas). Em 21% das análises de conteúdo estomacal foram encontrados vestígios de flores em *T. hispidus*.

Para o entendimento das variações do número de neurônios no córtex cerebral de lagartos ao longo da vida, e dos possíveis significados fisiológicos da produção de neurônios na idade adulta (neurogênese pós-natal), a informação sobre a idade média de vida destes animais na natureza é muito importante. Para espécie *T. hispidus* não foi encontrada na literatura uma estimativa sobre seu tempo de vida médio.

1.6.2 Aspectos neurobiológicos

As figuras 5B e 5C mostram a morfologia externa do cérebro de *T. hispidus* em sua porção dorsal e ventral. Na vista dorsal as estruturas visíveis são os hemisférios cerebrais (hc), o tecto óptico (to) e o cerebelo (cb) que aparece como uma fina camada de tecido recobrimdo parte do tecto óptico dos lados direito e esquerdo do cérebro. A medula espinhal aparece abaixo e fora de foco nesta fotografia. Os tratos e os bulbos olfativos foram seccionados neste cérebro, mas aparecem intactos na vista ventral (5C). Bastante saliente nesta vista são os nervos ópticos.

Em trabalho recente Ramalho (2003) fez um estudo morfológico comparativo entre os cérebros da espécie tropical *Tropidurus hispidus* e a espécie europeia *Podarcis hispanica*. Em relação a *T. hispidus* a diferença mais marcante na morfologia externa do cérebro, em relação a *P. hispânica*, é a presença de um bulbo olfativo pouco desenvolvido; este fato pode estar relacionado ao hábito de vida das duas espécies: *P. hispânica* é uma espécie diurna que utiliza principalmente o olfato para a captura de suas presas e, portanto apresenta um sistema olfativo bem desenvolvido (BLASCO-IBANEZ et al., 1992; LOPEZ-GARCIA et al., 2002a). Como as projeções do sistema olfativo se dirigem para o córtex lateral, esta porção do córtex é bastante evidente (figura 4), ao contrário do que foi observado no *Tropidurus hispidus*.; esta espécie, também diurna, parece utilizar mais o sistema visual para captura de suas presas (VAN SLUYS et al., 2004); o seu córtex lateral é pouco desenvolvido, e os demais (córtices dorsal e dorso-medial) parecem estar envolvidos no processamento de informações sensoriais (RAMALHO, 2002; MARCHIORO et al., 2005). Além destes dois trabalhos, nenhuma outra referência bibliográfica sobre a neurobiologia de lagartos da espécie *Tropidurus hispidus* foi encontrada na literatura.

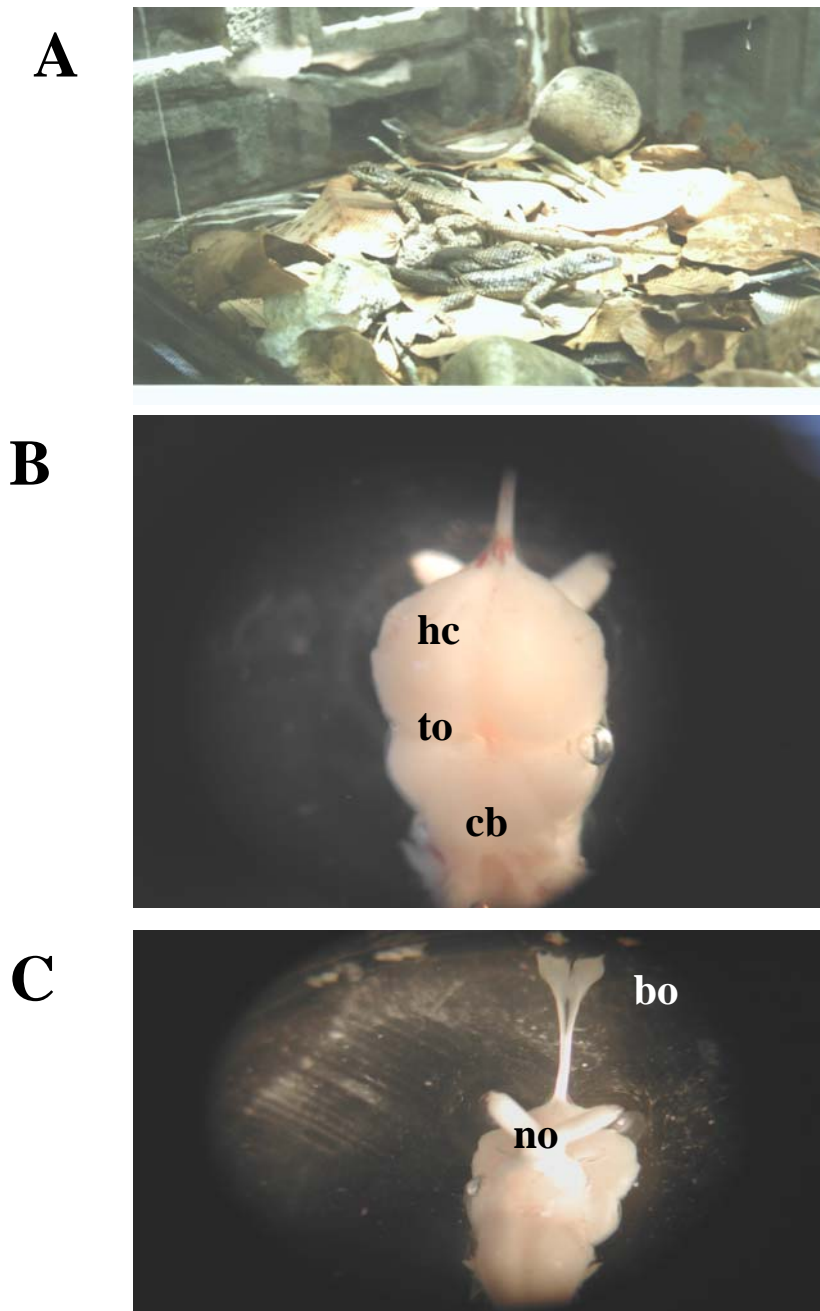


FIGURA 5: O lagarto tropical *Tropicurus hispidus*: Em A *T. hispidus* em terráreo. Em B uma fotografia da porção dorsal do cérebro de um adulto evidenciando os hemisférios cerebrais (hc), o tecto óptico (to) e o cerebelo (cb). Em C, aspecto do cérebro em vista ventral. Em destaque os nervos ópticos (no) e o bulbo olfativo (bo). Fonte: Pesquisadora, 2005.

1.7 3-Acetilpiridina: Um Modelo Experimental de Lesão Neural

A 3-Acetilpiridina (3-AP) é uma neurotoxina que atua bloqueando a síntese de ATP nas reações da cadeia respiratória. Uma vez tendo acesso ao sistema nervoso central a 3-AP atua preferencialmente nas áreas cerebrais mais ativas já que os neurônios destas áreas são aqueles que mais consomem ATP.

Os efeitos da 3-AP foram extensivamente estudados em lagartos da espécie *Podarcis hispanica* (MOLOWNY et al., 1995). Lagartos tratados com 3-AP apresentam dificuldades na capturas de presas e na discriminação espacial de tarefas aprendidas antes da injeção da neurotoxina (FONT et al., 1989; 1991). Apesar da administração sistêmica da 3-AP provocar lesão de várias regiões do telencéfalo de *P. hispânica*, a área mais afetada é o córtex medial, embora a lesão no núcleo redondo também seja importante (PEREZ-SANCHES et al., 1989).

Um experimento interessante mostrou a importância do córtex medial para o processamento de informações olfativas em *P. hispânica*. Detectando por imunohistoquímica a marcação de neurônios que expressam a proteína c-fos, um marcador de atividade neural, os pesquisadores interromperam a entrada destas aferências pela oclusão das narinas e observaram uma diminuição da expressão de c-fos especialmente no córtex medial (BLASCO-IBÁÑES et al., 1992). Estes resultados mostram que esta espécie é predominantemente olfativa, o que pode ser confirmado pelo tamanho dos seus bulbos olfativos e que o córtex medial é a área responsável pelo processamento deste tipo de informação.

Nacher et al (1999a) observou por meio de análise imunocitoquímica e microscópica, que as células endimocítica-astrogliais participam ativamente na remoção de restos celulares gerados nos processos lesionais, e que após uma ou duas semanas um processo de regeneração se estabelece, pelo surgimento de microglias ao longo do parênquima (NACHER et al., 1999b)

Logo após a administração de 3-Acetilpiridina, a lesão no córtex medial caracteriza-se pela presença de muitos núcleos picnóticos (condensação da cromatina)

no parênquima cerebral e pela formação de vacúolos na neuroglia. Cerca de um mês após a injeção da droga a neuroglia geralmente volta ao seu estado normal e o número de núcleos picnóticos diminui. Com a dose de 150 mg/Kg foi observada uma destruição de mais de 90% da população original de neurônios no córtex medial e índices comparativamente menores em outras áreas do córtex como o dorsal, dorso-medial e lateral (MOLOWNY et al., 1995); portanto, esta neurotoxina parece ter efeito quase específico sobre a área cortical mais importante para esta espécie de lagarto, e torna-se então uma importante ferramenta farmacológica para estudos de regeneração do sistema nervoso central (SANTOS, 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

- Analisar a potencialidade de regeneração neuronal no córtex cerebral de *Tropidurus hispidus*.

2.2 Específicos;

- Quantificar o número de neurônios no córtex cerebral de *T. hispidus*, jovens, adultos e velhos;

- Verificar a existência de neurogênese pós-natal no telencéfalo de *T. hispidus*;

- Demonstrar a existência de glia radial no córtex de *T. hispidus* adulto;

- Estudar o efeito da 3-AP sobre os neurônios do córtex medial de *T. hispidus*.

3 METODOLOGIA

3.1 Procedimentos Metodológicos e Modelo Animal

Pesquisa laboratorial e bibliográfica, de caráter experimental desenvolvida no Laboratório de Neurofisiologia da Universidade Federal de Sergipe com colaboração científica do Laboratório de Neurobiologia e Biologia Celular da Universidade de Valencia, na Espanha, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Lopez-Garcia, que vem desenvolvendo trabalho semelhante nesta área.

A população utilizada neste estudo foi composta de sessenta lagartos jovens, adultos e velhos, machos e fêmeas, da espécie *Tropidurus hispidus*, medindo entre 60 mm e 120 mm (medida rostro-ventral), e pesando entre 5 g e 65 g. Os animais foram capturados nos arredores do campus da Universidade Federal de Sergipe e mantidos em um terráreo medindo 8 m de comprimento, 3 m de largura e 2,5 m de altura. A alimentação desses animais consistiu de cupins, formigas e larvas do coleóptero *Tenebrio molitor*, e água potável, fornecidos regularmente.

Os procedimentos experimentais descritos neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Sergipe (CEPA-UFS) (parecer anexo) depois de obterem aprovação do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA-SE) (autorização anexa).

3.2 Estimativa de Idade do *Tropidurus hispidus*

Para realizar contagem do número de neurônios no córtex medial do *Tropidurus hispidus* em relação à idade seria necessário ter uma estimativa do tempo de vida médio desta espécie no local onde foram coletados, possibilidade de difícil averiguação; a alternativa encontrada foi correlacionar parâmetros mensuráveis, como o tamanho e o peso dos animais. A figura 6 demonstra a relação entre o nariz e a cloaca

(em mm), e o peso (em gramas) dos lagartos machos e fêmeas.

Os espécimes foram medidos com um caliper vernier com precisão de 0,1 mm e foram pesados, com uma balança tipo Pessola, para a 0,5 g mais próxima. Com a distribuição dos comprimentos e pesos para cada sexo foi construído um gráfico relacionando estes parâmetros (Figura 6). Baseando-se nesta relação, os lagartos foram divididos em três grupos de idades: fêmeas jovens de 60-70 mm; fêmeas adultas de 71-85 mm; fêmeas velhas de 86-95 mm; machos jovens de 80-90 mm; machos adultos de 91-110 mm; machos velhos de 111-120 mm. Em relação ao peso, os grupos de animais foram divididos em: fêmeas jovens de 5-12g, fêmeas adultas de 13-20g, fêmeas velhas de 21-27g, machos jovens de 12-23g, machos adultos de 24-48g e machos velhos de 49-65g.

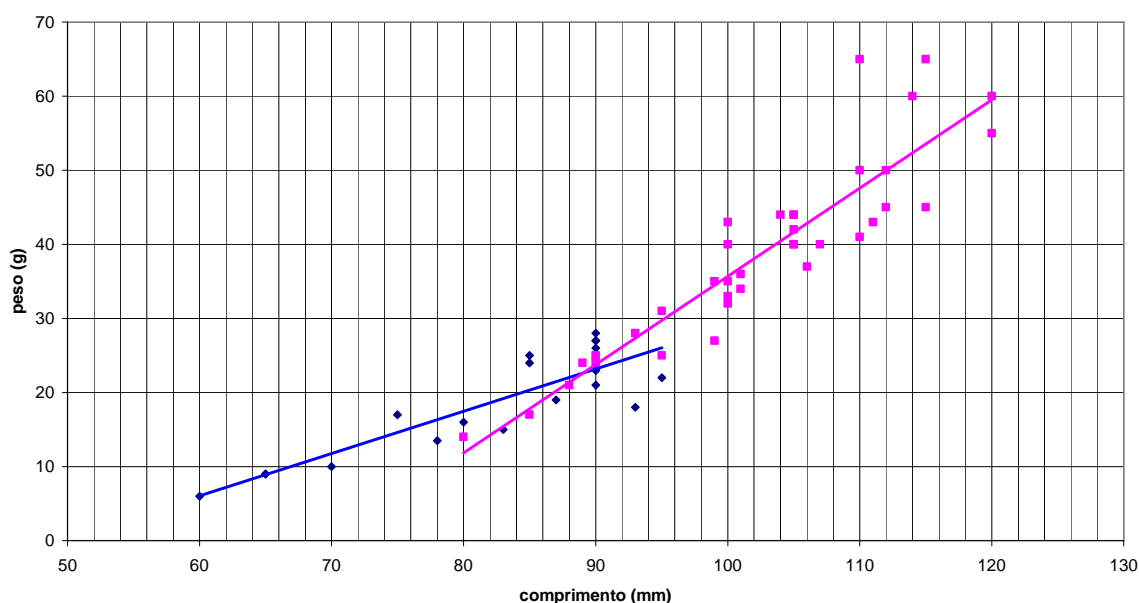


FIGURA 6: Relação entre o comprimento (medida nariz-cloaca) e o peso de lagartos machos (vermelho) e fêmeas (azul) da espécie *T. hispidus*: Os animais foram classificados jovens, adultos e velhos de acordo com seu comprimento. FONTE: Pesquisadora, 2005.

3.3 Quantificação de Neurônios no Córtex Cerebral do *Tropidurus hispidus* jovens, adultos e velhos

A estimativa do número de neurônios no córtex medial de animais jovens, adultos e velhos foi feita pela técnica do “Fracionador Óptico” (West et al 1991), na Universidade de Valencia, Espanha. Foram utilizados nove animais, machos e fêmeas, sendo cinco jovens, dois adultos e dois velhos. Cortes transversais do telencéfalo de 10 µm de espessura foram corados pelo método de Nissl, e amostras para a contagem das células foram escolhidas a cada 20 cortes. A contagem dos neurônios e de outras células (gliais e endoteliais) foi feita em volumes amostrais imaginários de 73x98x10 µm, retirados da porção superior esquerda de campos medindo 200 x 200 x 200 µm. Estes campos foram visualizados em uma tela de televisão, através de uma câmera fotográfica digital de alta resolução e uma objetiva de 40X de abertura. Novas imagens eram geradas na tela a cada movimento preciso de 200 µm no plano XY. A contagem (SQ-) do número de células em cada uma das imagens projetadas forneceu uma estimativa do número total de células no córtex medial, de acordo com a fórmula:

$$N = SQ- * (1/asf) * (1/ssf) * (1/tsf)$$

Onde, **asf**: fração de área amostrada: 5,59

ssf: fração de seção amostrada: 0,05 (1 em cada 20 seções)

tsf: fração de espessura amostrada: 1 (h=10, altura da célula e t=10, espessura do corte).

3.4 Imunohistoquímica para 5-Bromodeoxiuridina (5-BrDu) e para Lectina

O primeiro experimento foi delineado para detectar possíveis diferenças na atividade neurogênica do córtex cerebral de *T. hispidus* ao longo do desenvolvimento.

Foi injetado 5-Bromodeoxiuridina (5-BrDu, ref. B5002, Sigma, St. Louis, MO, EUA) a uma dose de 50 µg/g de peso em lagartos jovens (60-80 mm, medida narina-ventre, 7-15 g, n=4), em adultos (80-90 mm, medida narina-ventre, 17-24 g, n=4) e em velhos (100-120 mm, medida narina-ventre, 35-65 g, n=4). Quatro horas mais tarde, sob anestesia profunda (tiopental sódico, Abott, EUA, 60 mg/Kg), os animais foram perfundidos pelo coração com paraformaldeído (4%) em tampão fosfato (0,1 M, pH=7,2-7,4) durante 20 minutos. Os cérebros foram cuidadosamente extraídos e armazenados em tampão fosfato e azida sódica (0,1%, Labsynth, São Paulo, Brasil) para posterior análise histológica.

Em um segundo experimento, 16 lagartos adultos (80-90 mm, 17-24 g) foram eutanasiados em tempos seqüenciais de 2, 4, 7, 15 e 30 dias depois de uma única dose de 5-BrDu, para a seguir serem processados histologicamente.

Cinco conjuntos paralelos de cortes transversais (50 µm) foram obtidos com um vibrátomo. As sub-séries paralelas foram armazenadas em tampão fosfato com azida sódica (0,1 %) a 4°C. As sessões então foram imunomarcadas com um anticorpo monoclonal de rato anti-5-BrDu (Oxford Biotechnology, Oxfordshire, GB). Depois de bloquear a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (3%), as amostras foram expostas ao metanol (10%) de tampão fosfato (PBS) por 10 minutos. A seguir os cortes foram imersos em HCl (2N) para desnaturar o DNA (20-30 minutos). A desnaturação do DNA foi monitorada corando-se algumas secções com Acridina Laranja, verificando a mudança na fluorescência nuclear de verde para vermelho. Os cortes foram neutralizados com tampão borato (0,1 M, pH=8,5) e lavados com PBS. A seguir, foram imersos em soro murino, lisina (0,2 M) e glicina (0,2 M) por 2 horas, então os cortes foram incubados durante uma noite com o anticorpo primário (diluído a 1:200). O próximo passo foi tratar os cortes com um soro murino secundário anti-anticorpo de rato (cd 712-065-150, Jackson ImunoResearch, Cambridgeshire, GB, diluição de 1:500) e finalmente com o complexo peroxidase-avidina-biotina (ABC, Dako, Glostrup, Denmark, diluição 1:400). O tecido com a peroxidase ligada pode então ser visualizado incubando-se em diaminobenzidina tetrahidrocloro (0,05%) e peróxido de hidrogênio (0,01%) em PBS.

As marcações duplas (5-BrDu + lectina) foram feitas primeiro pela imunocoloração para a 5-BrDu, descrita anteriormente, mas utilizando-se uma mistura de diaminobenzidina tetrahidroclorato (0,05 %), peróxido de hidrogênio (0,01%), sulfato amônio de níquel (0,2 %) em PBS como cromógeno que produz uma tonalidade azul escura à preparação. As secções imunocoradas foram imediatamente incubadas com lectina de tomate biotinizada (ref LO 651, Sigma, St. Louis, MO, EUA, diluição de 1:200), a qual marca a superfície celular da microglia. Então os cortes foram expostos à diaminobenzidina tetrahidroclorato (0,05%) e peróxido de hidrogênio (0,01%) para adquirir uma coloração marrom.

As marcações duplas (5-BrDu + beta tubulina III) também foram realizadas através da imunocoloração para 5-BrDu descritas inicialmente; mas com incubação simultânea durante a noite de dois anticorpos: monoclonal de rato anti-5-BrDu (diluição de 1:200) e monoclonal de camundongo anti-tubulina III (Tuj1, ref T-8860, Sigma, St. Louis, MO, EUA, diluição 1:200). Depois de lavar a preparação os anticorpos secundários (ref A21208 Alexa Flúor 488 de murino anti IgG de rato, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA; ref A31570 Alexa Flúor 555 murino anti-IgG de camundongo, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) foram diluídos 1:100 e também foram incubados simultaneamente. As secções foram observadas e fotografadas em um microscópio confocal Leica modelo TCS (Leica, Wein, Áustria).

A contagem dos núcleos corados foi realizada em todos os cortes de uma sub-série (um corte de 50 μ m a cada 250 μ m), levando-se em consideração a forma e posição dentro da camada cortical.

3.5 Técnica de Golgi para Identificação de Glia Radial.

Depois de anestesiados com tiopental sódico (60mg/Kg, Cristália, São Paulo, Brasil), 13 animais, jovens, adultos e velhos, machos e fêmeas, foram perfundidos pelo coração com paraformaldeído (1%, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e Glutaraldeído (1%, Sigma, St. Louis, MO, EUA) em tampão fosfato (pH 7,2 – 7,4), por 20 minutos.

Os cérebros foram extraídos e os hemisférios cerebrais separados. Com o auxílio de pinças finas e de um microscópio estereoscópico, foram extraídas as endomeninges. As amostras foram a seguir mergulhadas em uma solução de dicromato de potássio (3%) e glutaraldeído (50%) e deixadas em geladeira por 3 a 5 dias, protegidas da luz. Os hemisférios foram enxugados e lavados rapidamente com algumas gotas de nitrato de prata; nesta fase observa-se a formação de um precipitado de cromato de prata (de cor vermelha). A técnica foi finalizada passando-se as amostras para uma solução de álcool etílico a 70%, para que possam ser armazenadas, sob resfriamento.

Os hemisférios foram emblocados em ágar-ágar (3%), para que fatias, de 150 a 200 μm de espessura, fossem cortadas em um vibrátomo (Camdem). As fatias foram recolhidas suavemente com um pincel de ponta fina e, a seguir imersas em álcool etílico a 70%. As melhores fatias foram selecionadas e postas em um recipiente com gotas de glicerina pura, renovadas várias vezes, até que as fatias se tornassem mais transparentes e pudessem ser observadas e fotografadas ao microscópio.

3.6 Lesão Neurotóxica do Córtex Cerebral pela 3-Acetilpiridina (3-AP)

Para lesionar o córtex medial dos lagartos utilizamos a 3-AP (Acros, EUA), um antimetabólico, que produz lesões altamente seletivas em áreas específicas do cérebro desses animais, por meio da interferência com a síntese de ATP nas mitocôndrias (FONT et al., 1997). Para comprovar os efeitos da 3-AP sobre os neurônios do córtex medial, inicialmente 1 lagartos foram injetado (i.p.) com solução salina (0,9%) e outro com 3-AP (300 mg/Kg), foram então eutanasiados e perfundidos com paraformaldeído (4%) pelo coração sete dias mais tarde para processamento histológico, os animais foram então corados pela Técnica de Nissl, no laboratório de Neurobiologia de Valencia, Espanha.

Em uma segunda etapa 8 lagartos foram injetados (i.p.) com 3-AP (200 mg/Kg) e então eutanasiados e perfundidos com paraformaldeído (4%) pelo coração 1, 7 e 33 dias depois. Os cérebros foram embebidos em parafina e os hemisférios foram

cortados transversalmente em fatias de 4 μm . Os lagartos deste grupo foram corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE), em um laboratório de patologia em Aracaju, Sergipe.

Observações de campo preliminares indicaram que o lagarto *Tropidurus hispidus* apresenta hábitos diurnos e adota uma estratégia “senta e espera” para capturar suas presas, utilizando principalmente a visão (NUNES et al., 2003); portanto, logo após a administração da 3-AP, os animais foram submetidos a intensa estimulação visual.

3.7 Técnicas de Colorações: Nissl e Hematoxilina-eosina

Para o procedimento de eutanásia foi utilizado o tiopental sódico, um tipo de barbitúrico, capaz de induzir e/ou manter a anestesia, tendo como vantagem ser rápido e confiável (ANDERSEN et al., 2004). Depois os animais foram perfundidos pelo coração com paraformaldeído (4%) em tampão fosfato (0,1 M pH=7,2). Os cérebros foram removidos do crânio e pós-fixados em paraformaldeído (4%) no mesmo tampão, com o objetivo de promover fixação e preparar o material para posterior coloração e visualização microscopia (CARVALHO & RECCO-PIMENTEL, 2004). Em seguida foram incluídos em parafina, para depois serem seccionados transversalmente em fatias de 4 μm . Em experimentos piloto, estudamos os efeitos da 3-Acetilpiridina (sessão anterior) na dose de 300 mg/Kg. Neste caso, as fatias do telencéfalo foram coradas com azul de toluidina (figura 13, sessão de resultados). Para estudarmos a capacidade de regeneração do córtex cerebral depois de um pulso de 3-Acetilpiridina (200 mg/Kg, i.p.) as fatias foram coradas pela Hematoxilina-Eosina (figura 6).

O dano neuronal foi averiguado pela aplicação destas técnicas de coloração, através da presença de núcleos picnóticos, que se caracterizam por serem hipercromáticos e condensados, envolvidos em um citoplasma altamente vacuolizado,

e quando visualizados em microscopia, sugere lesão neuronal (GARCIA-VERDUGO et al., 1986).

3.8 Quantificação de Núcleos Picnóticos

A presença de núcleos picnóticos envoltos em um citoplasma altamente vacuolizado é um indicativo de morte neuronal (Font et al., 1997). Para a quantificação da lesão neuronal, induzida pela 3-AP, utilizamos um microscópio óptico Studar Lab (Hungria), fizemos contagens do número de núcleos picnóticos em cortes transversais (4 μm) do telencéfalo de *T. hispidus*, corados pela Hematoxilina-eosina. Para cada animal foram preparadas 18 lâminas contendo de 2 a 6 cortes transversais. Foram escolhidas as lâminas 5, 10 e 15 de cada telencéfalo, e para cada uma delas o corte transversal de melhor aspecto. Os cortes foram observados ao microscópio óptico, e os neurônios do córtex medial posicionados em frente ao *sulcus medialis* foram focalizados com a objetiva de 40X (total do aumento 480X). Os núcleos picnóticos dentro deste campo visual foram então quantificados (Figura 6). O mesmo procedimento foi repetido para as outras lâminas e a média das nove contagens (3 para cada lâmina) foi calculada.

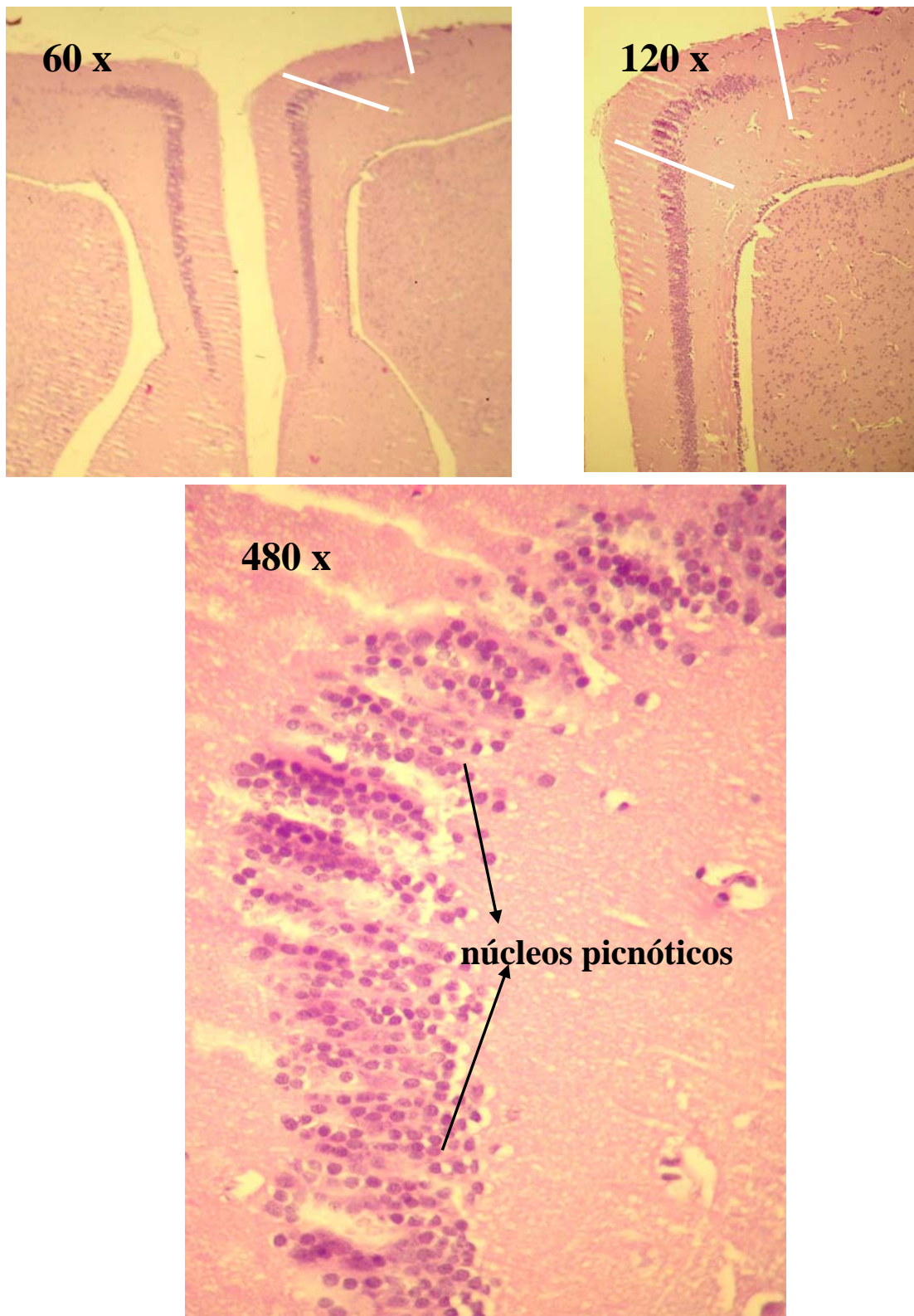


FIGURA 7: Método para contagem de núcleos picnóticos: Corte transversal do telencéfalo de *T. hispidus* corado por HE. A área do córtex medial a ser quantificada foi focalizada gradativamente até o aumento de 480X. Neste aumento o número de núcleos picnóticos dentro deste campo visual foi quantificado. Fonte: Pesquisadora, 2005.

3.9 Análise dos Dados

Para a análise quantitativa da contagem do número de neurônios no córtex medial em diferentes idades e, para a contagem de núcleos picnóticos nos animais tratados com a 3-acetilpiridina, os dados foram expressos como a média \pm EPM. A diferença estatística entre as médias nos diferentes grupos experimentais foi avaliada pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Número de Neurônios no Córtex Medial de *Tropidurus hispidus* em Diferentes Idades

O número de neurônios no córtex medial para cada grupo foi estimado pelo método do fracionador óptico (WEST, 1993). Na camada celular do córtex medial, neurônios aparecem densamente agrupados; em tamanhos grandes e pequenos. Na camada plexiforme interna os neurônios aparecem bem mais dispersos e diversos processos de células endimárias são vistos atravessando esta camada em direção à camada celular. Na camada plexiforme externa um número ainda menor de neurônios dispersos são visualizados.

Embora a ANOVA não tenha revelado diferença significativa para número de neurônios, entre jovens, adultos e velhos ($F= 4,217$; $P=0,07$), houve um aumento progressivo em relação às idades (dos jovens para os velhos) do número de células no córtex medial (jovens: $336,7 \pm 107,9 \times 10^3$; adultos: $460 \pm 68,1 \times 10^3$; velhos: $641,6 \pm 21,56 \times 10^3$) (Figura 8). Possivelmente o valor elevado do EPM, especialmente no grupo de lagartos jovens e adultos, tenha contribuído para a não significância da análise.

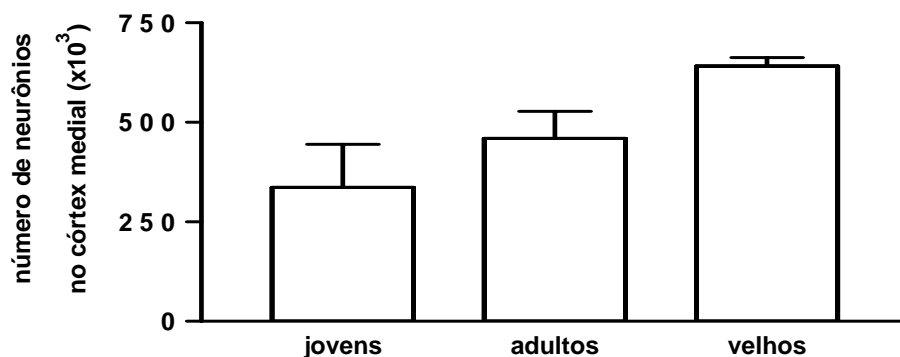


FIGURA 8: Variação do número de neurônios no córtex medial de *T. hispidus* dependente da idade: Há um aumento do número de neurônios no córtex medial ao longo da vida, embora a ANOVA não tenha mostrado diferença significativa ($F=4,217$; $p=0,07$). É observada diminuição progressiva da variabilidade (EPM) na contagem dos neurônios à medida que os animais envelhecem. FONTE: Pesquisadora, 2005.

4.2 Neurogênese Pós-natal no Córtex Cerebral do *Tropidurus hispidus*

A imunohistoquímica para 5-BrDu revelou núcleos marcados dispersos pelo revestimento endimário (Figura 9A) de animais jovens, adultos e velhos eutanasiados quatro horas após receberem uma injeção (i.p.) de 5-BrDu. Os núcleos marcados localizam-se, preferencialmente, na região dos sulcos (Figura 9B), apresentam forma oval ou arredondada; e quase sempre aparecem isolados deixando espaços entre si quando concentrados em determinada área (Figura 9C, E e F).

Os núcleos marcados apresentam a seguinte distribuição na região endimária: 41% localizam-se, subjacente ao córtex medial (*sulcus medialis*); 21% encontram-se subjacente aos córtices dorso-medial, dorsal e lateral; 27% alinhado na porção dorso-ventricular e 11% ao longo do *septum* e estendendo-se ao longo dos *sulcus ventralis* e *terminalis*. Não encontramos diferença estatística significativa no padrão de distribuição de núcleos marcados entre animais jovens, adultos e velhos.

Apenas em poucos cérebros estudados (jovens, adultos ou velhos) os núcleos marcados positivamente para a 5-BrDu aparecem reunidos em grupos. Nestes casos a sua forma é alongada e provavelmente pertence à classe das microglias, visualizadas pela marcação dupla (BrDu + lectina de tomate) (Figura 9G-I). Nos animais que mostraram este tipo de marcação normalmente estas células representam menos do que 5% das células positivas para a 5-BrDu. Na maioria dos animais estudados estas células representam cerca de 1% do total.

No córtex medial as células positivas para 5-BrDu apresentaram marcação intensa facilitando assim a sua identificação. O número total de células marcadas variou entre os animais (de 150 em um jovem a 2160 em um espécime adulto).* Lagartos adultos apresentaram o maior número de núcleos positivos quando comparados com os jovens ($p < 0,01$, teste de Tukey, depois de ANOVA de uma via), mas não quando comparados com os animais velhos ($p > 0,05$, Tukey depois da ANOVA) (Figura 10).

Quando núcleos marcados positivamente para 5 - BrDu foram analisados em

cérebros de animais eutanasiados a intervalos de sobrevivência crescentes, observou-se um deslocamento desses núcleos do revestimento ependimário para as camadas plexiforme interna e celular (Figura 11 A-D). Este deslocamento esperado tem início cerca de duas semanas após a injeção da 5-BrDu. Células presumivelmente migratórias, com forma fusiforme e orientação vertical podem ser consistentemente visualizadas em cortes com 15 dias após injeção de 5-BrDu. Elas foram observadas frequentemente a diferentes profundidades nos cortes transversais, mostrando uma organização pseudo-colunar.

Trinta dias após o pulso de 5-BrDu, núcleos positivos aparecem na camada celular, acima das “colunas” de núcleos migratórios da camada plexiforme interna. Neste período o número de núcleos positivos para a 5-BrDu é elevado na camada celular (Figura 11 C, D) e alguns deles demonstram uma marcação mais fraca, possivelmente em decorrência a sucessivas divisões celulares. O estudo com microscopia confocal revelou a presença de alguns núcleos com marcação dupla (5-BrDu + beta tubulina III), demonstrando sua natureza neuronal (Figura 11 E-G).

Apesar de algumas células microgliais demonstrarem morfologia fusiforme e orientação vertical na camada plexiforme interna, nenhum dos núcleos fusiforme mostrou marcação para a lectina, indicando que as células migratórias não pertencem à classe das microglias. Além disso, nenhuma microglia com marcação dupla (lectina + BrDu) foi vista em animais com períodos longos de sobrevivência depois da injeção de 5-BrDu (30 dias), sugerindo que as microglias marcada positivamente pela 5-BrDU em animais com períodos curtos de sobrevivência, depois do pulso, são transitórias e removidas posteriormente do parênquima cerebral.

A análise dos períodos longos de sobrevivência mostrou alterações na forma e na agregação dos núcleos positivos para a 5-BrDu no revestimento epêndimário. A maioria dos núcleos aparece isolada a intervalos curtos de sobrevivência (4 horas e 2 dias) (Figura 11H). Depois disso, a maioria dos núcleos aparecem pareados ou agrupados, como se pertencessem a uma célula filha que não conseguiu migrar para a camada celular (Figura 11 I-K). Algumas destas células não-migrantes apresentaram uma morfologia de aspecto multi-lobular e de contorno irregular (Figura 11 L-R).

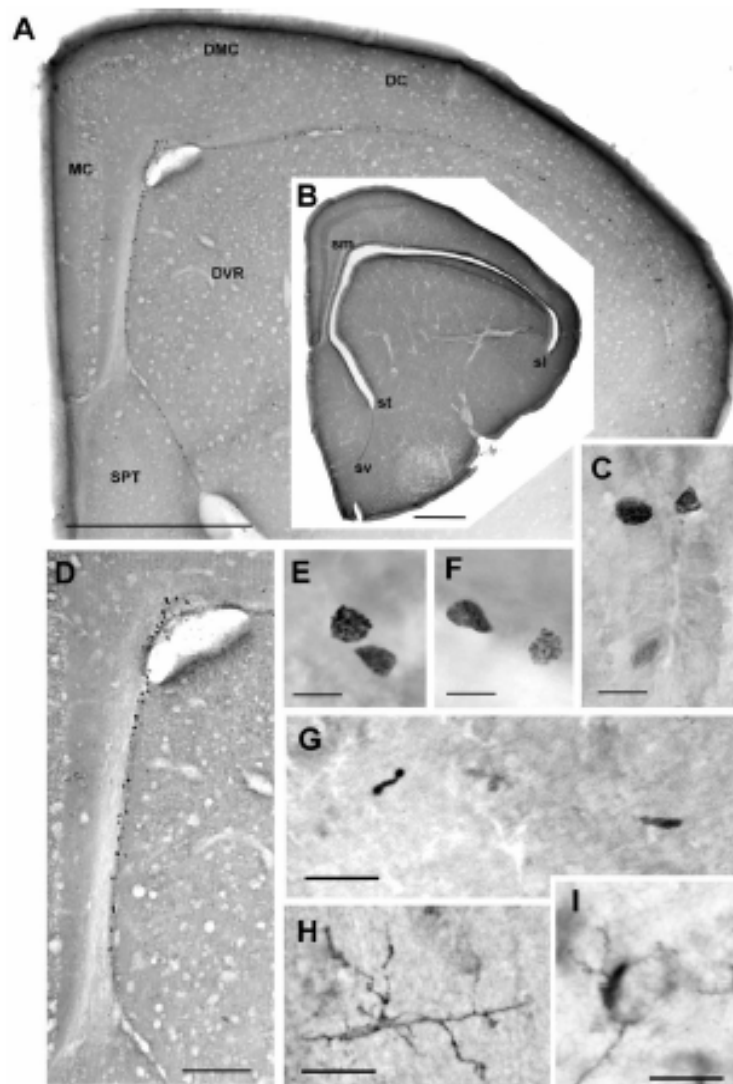


FIGURA 9: Núcleos 5-BrDu positivos no telencéfalo de *Tropidurus hispidus*: (A) Imunohistoquímica para a 5-BrDu em um corte transversal do telencéfalo de uma lagarto eutanaziado 4 horas depois de um pulso de 5-BrDu; os núcleos marcados aparecem como pontos escuros alinhados no ventrículo lateral; DC-córtex dorsal; DMC-córtex dorso-medial; DVR-fissura dorso-ventricular; MC-córtex medial; SPT-septum. (B) Corte transversal do telencéfalo de outro exemplar de *T. hispidus* mostrando a localização dos sulcos ventriculares: sl-sulcus lateralis; sm-sulcus medialis; st-sulcus terminalis; sv-sulcus ventralis. (C) Detalhes de alguns núcleos 5-BrDu-positivos no sulcus lateralis. (D) Visão aumentada do sulcus medialis mostrando o acúmulo de núcleos 5-BrDu-positivos. (E) Detalhe de dois núcleos 5-BrDU-positivos no sulcus medialis. (F) Idem, localizado no epêndima do córtex dorsal. (G) Núcleos 5-BrDu-positivo alongados (possivelmente microglia) no parênquima cortical. (H) Célula microglial marcada por lectina no córtex medial. (I) Marcação dupla de uma célula microglial com 5-BrDu (núcleo) e lectina (processos). Escalas: 500 μm em A e B, 10 μm em C, E e F, 100 μm em D, 12 μm em G-I. FONTE: Lopez-Garcia., 2005.

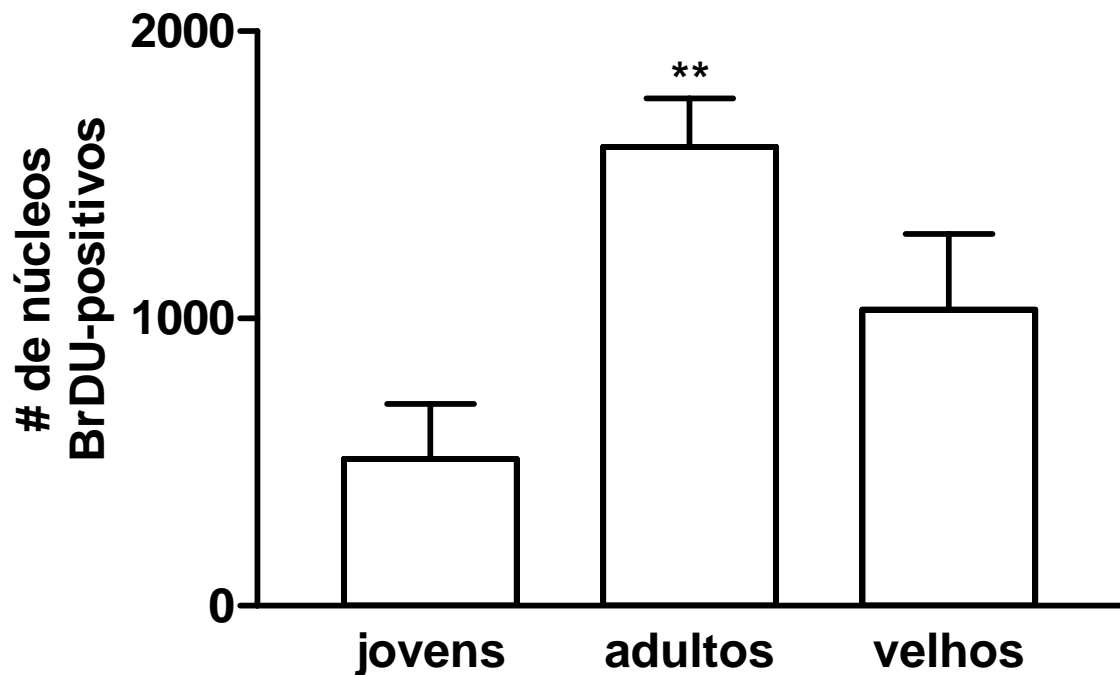


FIGURA 10: Número de núcleos 5-BrDu-positivos no córtex cerebral de um dos hemisférios em lagartos jovens (narina-ventre: <80 mm), adultos (>80mm<90 mm) e velhos (>100 mm) eutanaziados 4 horas depois de uma injeção (i.p) de 5-BrDu: Os valores representam a média \pm EPM. A ANOVA revelou diferença significativa no número de núcleos positivos para os três grupos experimentais ($F=6,618$; $p=0,007$) e o teste de Tukey demonstrou que o número de núcleos 5-BrDu positivo é maior em lagartos adultos em relação aos jovens ($q=5,143$; $p<0,01$) mas não em adultos em relação aos velhos ($q=2,458$; $p>0,05$). Não houve diferença significativa entre animais adultos e velhos ($q=2,686$; $P>0,05$). FONTE: Pesquisadora, 2005.

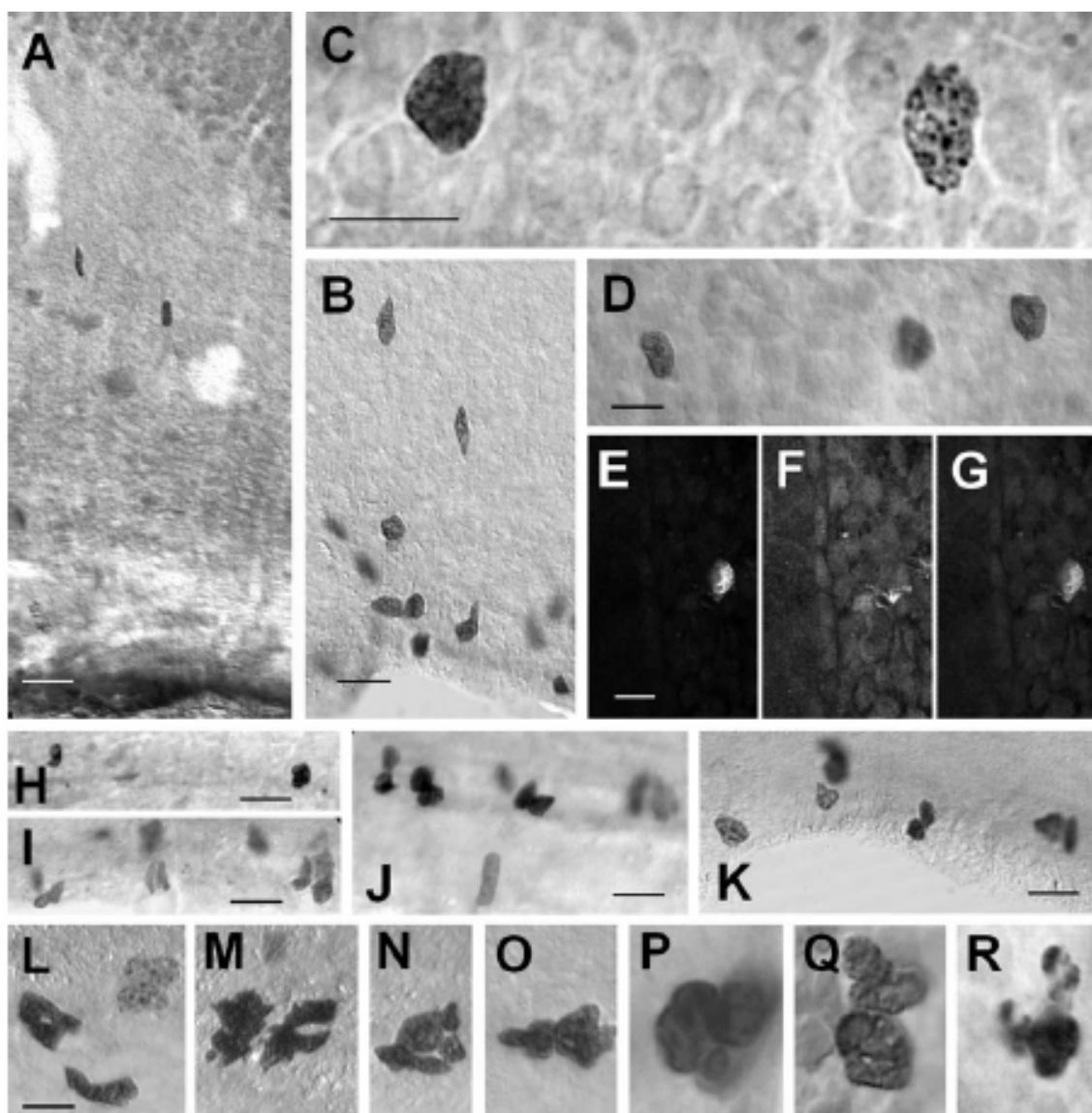


FIGURA 11: Distribuição de núcleos 5-BrDu positivos no córtex medial de *T. hispidus* em diferentes tempos de sobrevivência após o pulso de 5-BrDu: (A) 15 dias depois do pulso possíveis núcleos migratórios são vistos na camada plexiforme interna. (B) Idem 15 dias depois do pulso de 5-BrDu, observa-se muitos núcleos positivos no *sulcus medialis* e na camada plexiforme interna. (C) 30 dias após o pulso dois núcleos são observados na camada celular. (D) Idem 30 dias, núcleos positivos na camada celular. (E) Microscopia de fluorescência confocal mostrando um núcleo 5-BrDu positivo (Alexa Fluor 488, fluorescina). (F) Idem, o mesmo campo mostrando marcação para beta tubulina III (Alexa Fluor 555, rodamina). (G) Imagens simultâneas mostrando coincidência de marcação entre beta tubulina III citoplasmática e 5-BrDu nuclear. (H) Núcleo 5-BrDu positivo no *sulcus medialis* dois dias depois do pulso. (I) 4 dias depois. (J) 7 dias depois. (K) 15 dias depois. (L-O) Núcleos 5-BrDu positivos com morfologia irregular no *sulcus medialis*, 15 dias após o pulso. (P-R) Idem, 30 dias pós-pulso. Escalas: 20 μ m em A, C e H-K, 10 μ m em B, D-G e L-R. FONTE: Pesquisadora, 2005.

4.3 Presença de Glia Radial em Lagartos *Tropidurus hispidus* Adultos

A presença de glia radial foi revelada no córtex cerebral de *T. hispidus* adultos pela técnica de Golgi (Figuras 12 A e B). Em cortes transversais com espessura de 150-200 μm uma população grande de células gliais radiais é vista formando um emaranhado de fibras espinhosas em todo o córtex cerebral. Os corpos celulares destas células localizam-se na camada ependimária (Figura 12 A). Em um detalhe, com maior aumento (Figura 12B), observa-se a presença de muitas espinhas dendríticas, nos prolongamentos que se dirigem para a camada celular e para a pia máter.

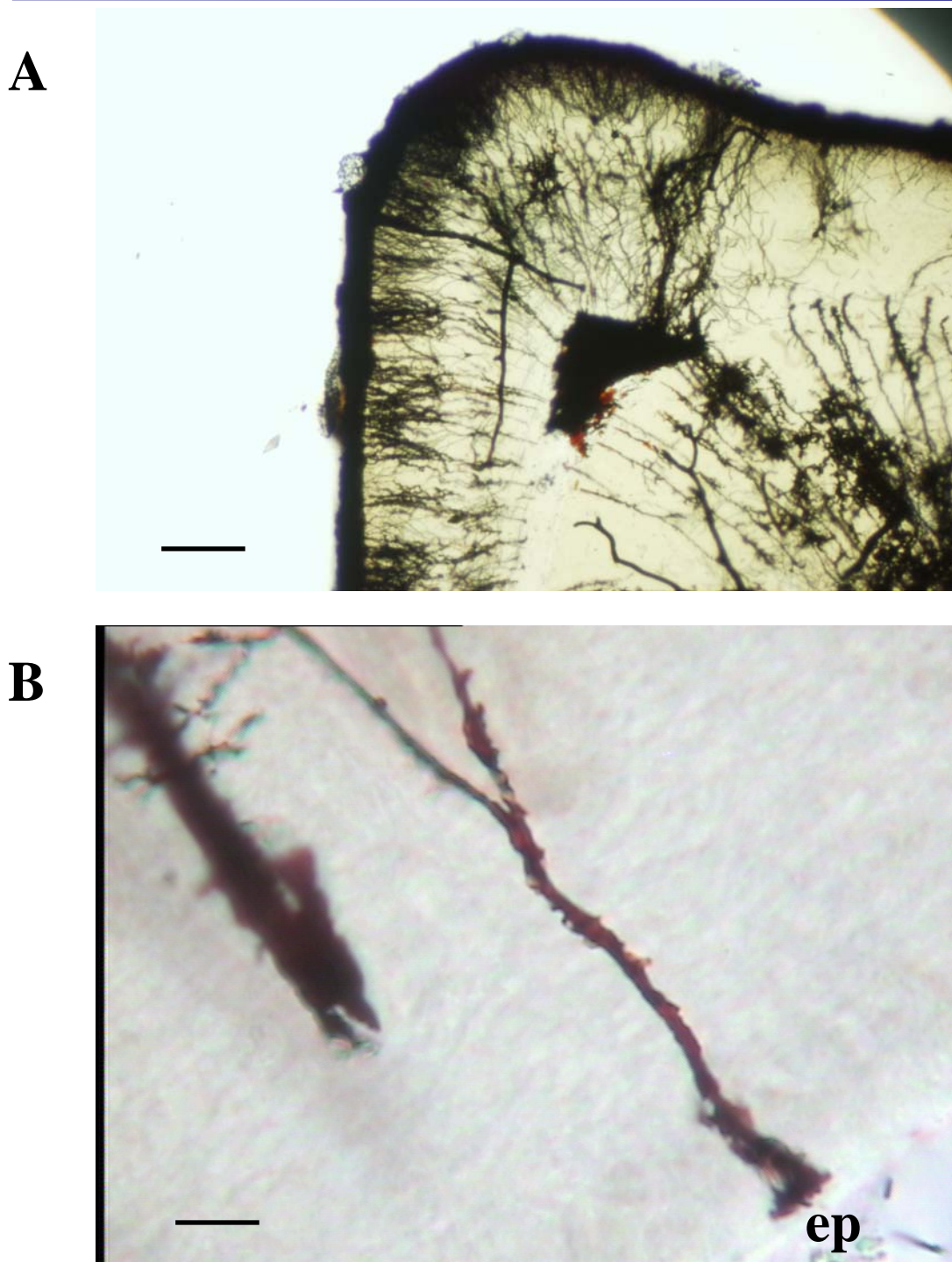


FIGURA 12: Presença de glia radial no córtex cerebral de *Tropidurus hispidus*: (A) corte transversal do telencéfalo de um lagarto adulto corado pela técnica de Golgi. Observa-se distribuição da glia radial formando um emaranhado em todo o córtex cerebral, com os corpos celulares alinhados na região ependimária. Escala: 100 μ m. (B) Detalhe em maior aumento de uma célula de glia radial com seu corpo celular próximo ao ventrículo lateral e uma ramificação transversal atravessando o parênquima cortical em direção à pia mater. Escala: 10 μ m. FONTE: Pesquisadora, 2005.

4.4 Regeneração Neuronal no Córtex Cerebral de *Tropidurus hispidus*

Em uma primeira série de experimentos testamos o efeito da 3-AP sobre os neurônios corticais na dose de 300 mg/Kg. A figura 13B mostra um corte transversal (4 μ m de espessura) do telencéfalo de *T. hispidus* adulto corada pelo método de Nissl (Azul de Toluidina). A figura 13A mostra em detalhe a camada celular do córtex medial de um lagarto injetado com solução salina (0,9%) sete dias antes de ser perfundido através do coração com uma solução de paraformaldeído (4%). Nesta camada o soma dos neurônios aparece densamente agrupado e muito poucos núcleos picnóticos podem ser observados. Já a figura 13B mostra o mesmo local da camada celular do córtex medial, porém este material consiste de um lagarto injetado com 3-AP (300 mg/Kg) sete dias antes de ser perfundido com PFA. Observa-se a presença de um grande número de núcleos picnóticos e de vacúolos na camada celular, indicando morte celular. Estes resultados iniciais mostraram que na dose de 300 mg/Kg a 3-AP destrói praticamente 100% do córtex medial do *T. hispidus*.

Com o objetivo de causar uma lesão mais branda do córtex medial, em uma segunda série de experimentos, testamos os efeitos da 3-AP na dose de 200 mg/Kg. Nesta dose, a 3-AP produziu lesão dos neurônios do córtex medial dependente do tempo de sobrevivência dos animais. Neste experimento utilizamos a coloração pelo método da hematoxilina-eosina (HE) e quantificamos o número de núcleos picnóticos de acordo com o método mostrado na figura 7 para grupos de animais injetados com solução salina (0,9%) ou 3-AP (200 mg/Kg) e perfundidos 1, 7 e 33 dias com paraformaldeído(4%)(figura 14). A ANOVA revelou diferença significativa no número de núcleos picnóticos para os quatro grupos experimentais ($F=5,321$ $p<0,05$) e o teste de comparações múltiplas de Tukey mostrou um aumento do número de núcleos picnóticos para os animais com 7 dias sob a ação da droga ($q=4,032$, $p<0,05$), indicando aumento da lesão cortical e uma reversão deste efeito nos animais com 33 dias após injeção de 3-AP ($q=1,754$, $p>0,05$), indicando uma possível regeneração do córtex medial lesionado (figura 15). Apesar de não serem quantificados, é destacado

neurônios saudáveis é destacado na figura 13A(setas) e nota-se uma diminuição deste número no grupo 3-AP durante 7 dias.

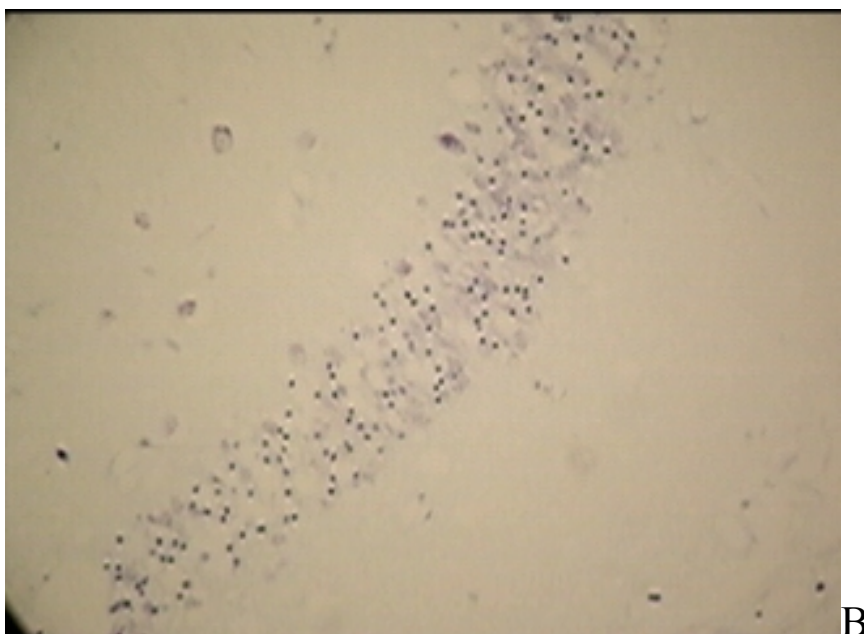
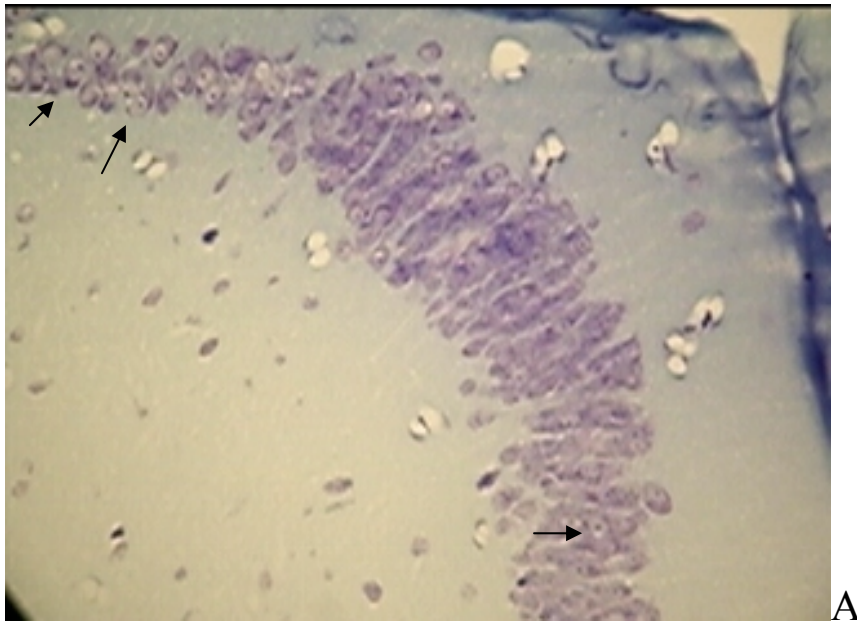


FIGURA 13. Lesão do córtex cerebral de *Tropidurus hispidus* induzida pela 3-Acetilpiridina: (A) Fotografia mostrando os neurônios do córtex medial de uma lagarto adulto injetado 7 dias antes com solução salina (0,9%, i.p.). (B) Mesma região do córtex medial de um lagarto adulto injetado 7 dias antes com uma solução de 3-Acetilpiridina (300 mg/Kg, i.p.). Observa-se presença de núcleos picnóticos e edema cortical na figura B. FONTE: Pesquisadora, 2005.

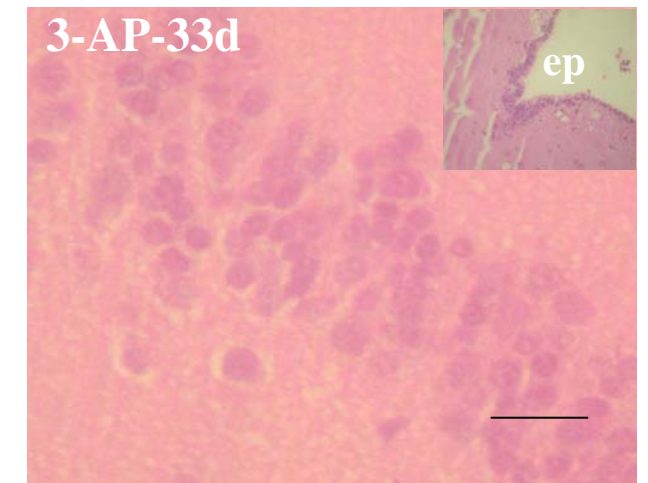
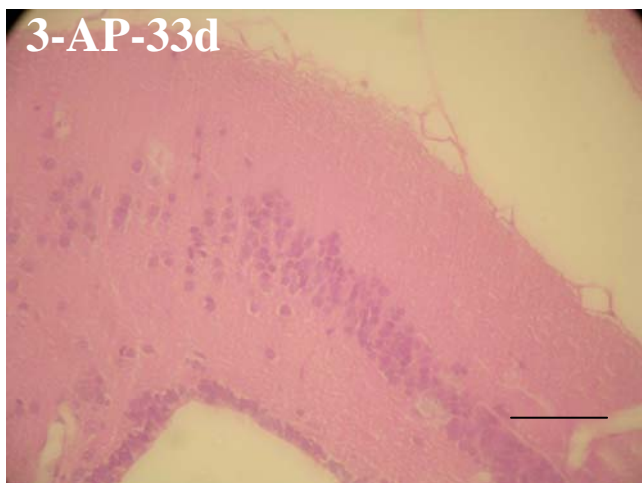
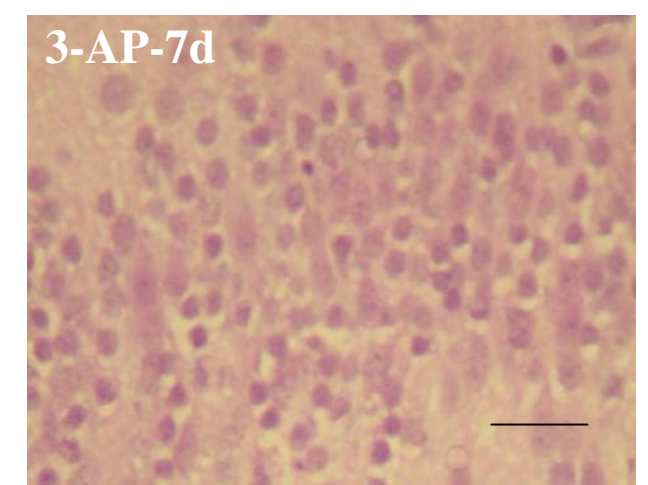
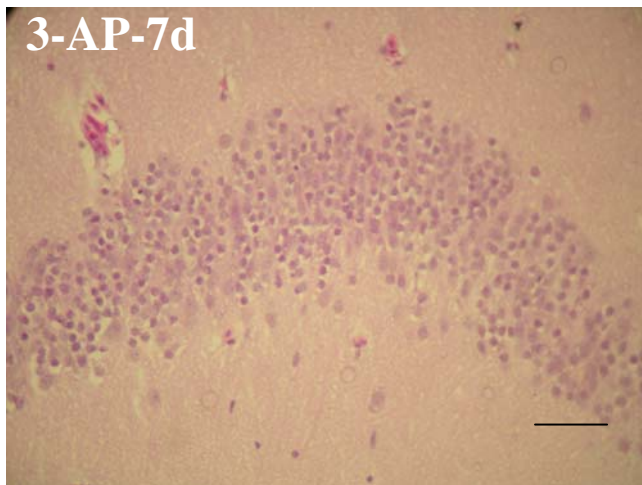
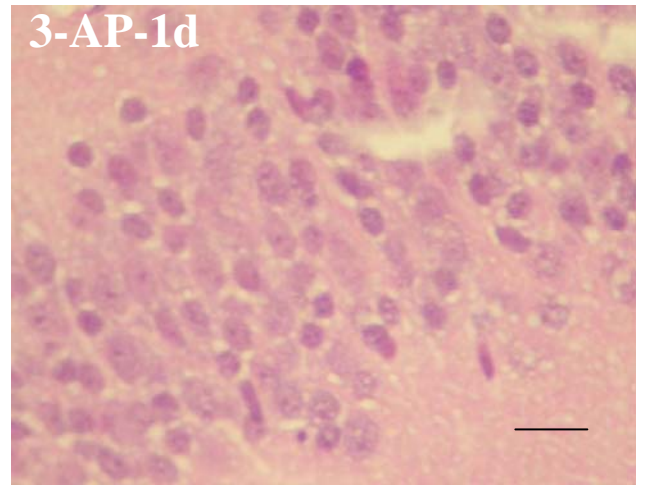
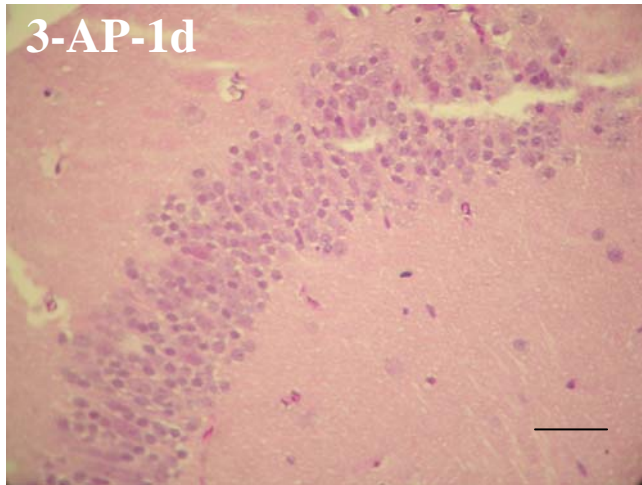
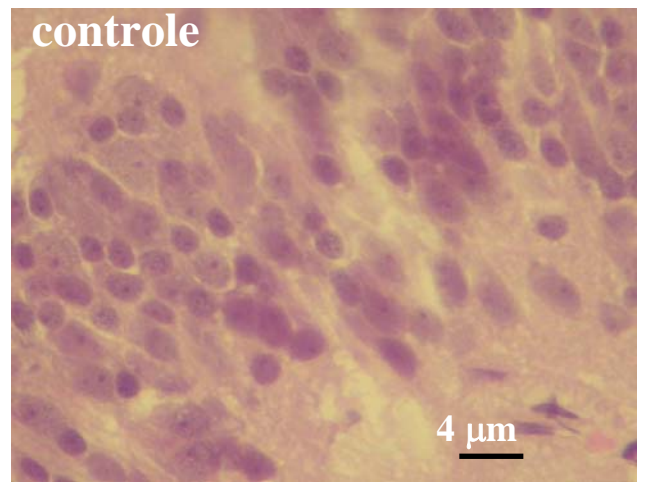
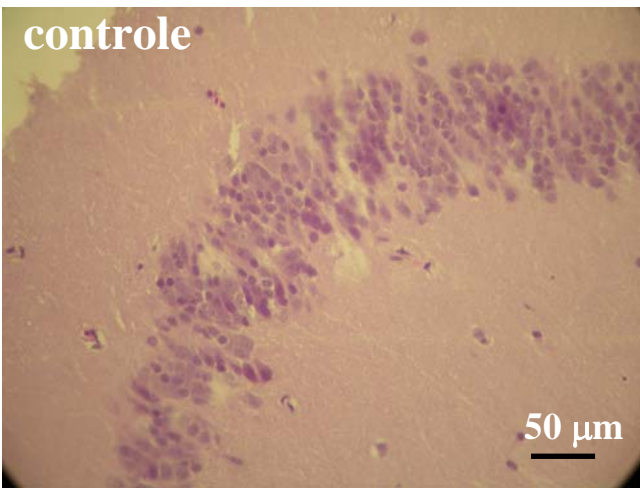


FIGURA 14: Efeito dependente do tempo da 3AP sobre os neurônios do córtex medial do lagarto *T.hispidus*: A coluna da esquerda mostra uma visão geral do córtex medial de lagartos que receberam uma injeção intra-peritoneal de solução salina (controle) ou de 3-AP, e foram perfundidos 1 dia (controle e 3-AP-1d), 7 dias (3-AP-7d) e 33 dias (3-AP-33d) depois. A coluna da direita mostra os mesmos campos em detalhe. Para cada campo visual o número de núcleos picnóticos foi registrado. FONTE: Pesquisadora, 2005.

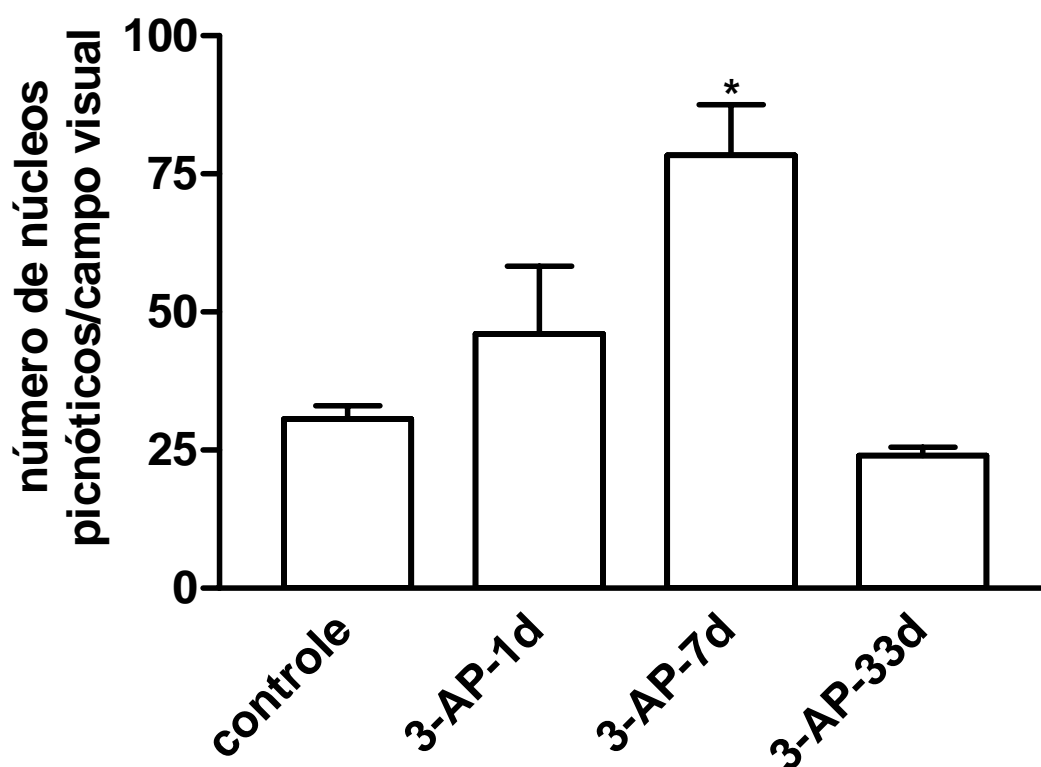


FIGURA 15: Regeneração neuronal no córtex medial de *T. hispidus*: Contagem de núcleos picnóticos no córtex medial de animais perfundidos a diferentes tempos depois da injeção da 3-AP. Observa-se a diminuição do número de núcleos picnóticos nos animais com 33 dias de sobrevivência. * $p < 0,05$, teste de Tukey depois da ANOVA de um fator. FONTE: Pesquisadora, 2005.

5 DISCUSSÃO

O lagarto da espécie *Tropidurus hispidus* foi utilizado como modelo animal para análise da potencialidade de regeneração neuronal do córtex cerebral, para averiguação de neurogênese pós-natal e de glia radial, para quantificação do número de neurônios, e para estudo do efeito da neurotoxina 3-Acetilpiridina sobre os neurônios do córtex medial.

A região medial do córtex cerebral foi objeto de estudo por apresentar relações filogenéticas estreitas com a zona matriz terciária da fâscia dentada do hipocampo do mamífero, compartilhando propriedades ortogenéticas, estruturais e filogenéticas, que podem ser preditivas de características semelhantes relativas à regeneração neuronal (LOPEZ-GARCIA et al., 2002a).

Para averiguação do número de neurônios no córtex cerebral de *Tropidurus hispidus* ao longo do desenvolvimento, foi necessário uma estimativa do tempo de vida médio desta espécie. Devido à falta de dados ecológicos sobre esta espécie na literatura especializada optou-se por correlacionar parâmetros mensuráveis, como tamanho e peso dos animais para estimar a idade dos animais utilizados neste trabalho. A partir daí efetuou-se a quantificação do número de neurônios através da “Técnica do Fracionador Óptico”, constatando-se que ocorreu um aumento do número de neurônios no córtex medial ao longo da vida desses animais. Estes dados estão de acordo com a observação do fenômeno de neurogênese pós-natal nesta espécie (MARCHIORO et al., 2005).

Perez-Canellas (1989) e Rodriguez-Serna (1987) relatam que em lagartos o volume de campos corticais sinápticos que contém zinco aumentam no decorrer da idade. No lagarto *Podarcis hispânica* há uma quadruplicação do número de neurônios no córtex medial (LOPEZ-GARCIA et al., 1992), em aproximadamente cinco anos de vida (CAETANO et al., 1986).

Para Molowny et al. (1995) características ontogenéticas em comum, e principalmente uma neurogênese pós-natal prolongada, reforçam suposta semelhança entre o córtex medial do lagarto e a fâscia dentada da formação hipocampal de mamíferos; a geração de neurônios parece persistir ao longo da vida desses reptéis. A utilização de técnicas, de autoradiografia e de imuno-histoquímica, pode ser aplicada para a averiguação de neurônios de nova geração no telencéfalo desses animais (LOPEZ-GARCIA et al., 1988; MARCHIORO et al., 2005).

Segundo Lopez-Garcia (1983) após a coloração obtida com 5-BrDu, após lesão por 3-AP, se observará uma explosão proliferativa que irá perdurar por vários dias, incluindo a presença abundante de neurônios imaturos na camada plexiforme interna do córtex medial principalmente na primeira semana, demonstrando portanto intensa neurogênese reativa.

Nesta pesquisa a técnica de imuno-histoquímica para 5-BrDu utilizada revelou núcleos marcados dispersos, localizando-se preferencialmente no revestimento endimário de lagartos jovens, adultos e velhos, eutanasiados quatro horas após receberem injeção de 5-BrDu (Figura 9). Segundo Gould et al. (1999a) células lábeis podem ser observadas ao longo do epêndima sendo abundantes em áreas específicas, como os sulcos, exibindo aspecto pseudo-colunar, onde o neuroepitélio embrionário residual ainda permanece.

No córtex medial as células positivas para 5-BrDu apresentaram marcação intensa, sendo constatado que lagartos adultos apresentaram um maior número de núcleos positivos quando comparados com animais jovens, mas não em relação a animais velhos; entretanto para Lopez-Garcia et al. (1984), em seus estudos com o lagarto *Podarcis hispanica*, o envelhecimento implica em uma diminuição do potencial gerador do revestimento endimário subjacente. Uma possível explicação para a diferença nos resultados obtidos entre essas duas espécies de lagartos pode estar no fato de que nesta pesquisa realizada com *T. hispidus* jovens, adultos e velhos, esses animais conviveram em um mesmo terrário; uma vez que os lagartos do gênero *Tropidurus* são territoriais (VAN SLUYS, 1998), é possível que os espécimes mais jovens estivessem submetidos ao domínio de adultos e velhos, e tal situação de stress

tivesse afetado a neurogênese pós-natal nesses animais, fato que têm sido sugerido por outros autores (NACHER et al., 1999b)

Lopez-Garcia et al. (1988) relataram que num tempo maior de sobrevivência após injeção do marcador de proliferação celular, estão presentes no revestimento endimário, e na camada celular do córtex medial, células lábeis indicando assim uma migração da zona germinativa; fato que corrobora os achados desta pesquisa, em que foi averiguado deslocamento de núcleos marcados positivamente para 5-BrDu, do epêndima para as camadas plexiforme interna e celular de animais eutanasiados quinze dias após a marcação. Trinta dias após o pulso de 5-BrDu quantidade significativa de núcleos positivos surgiram na camada celular, no entanto alguns apresentaram marcação fraca, sugerindo terem sido submetidos a sucessivas divisões celulares, foi averiguado também a presença de alguns núcleos com marcação dupla (5-BrDu + beta tubulina III), demonstrando sua natureza neuronal.

Para Shors et al. (2001) provavelmente, o aumento do desempenho da memória espacial de lagartos adultos decorre da participação desses novos neurônios, gerados no período pós-natal, que se diferenciam em neurônios normais, estendendo seus prolongamentos axonais para as áreas alvos adequadas do córtex medial.

Nossos achados sobre neurogênese pós-natal corroboram com Lopez-Garcia et al. (2002), quando este relata que o epêndima do córtex medial prolifera dando origem a neurônios imaturos que migram para a camada celular, onde estes se diferenciam, resultando assim em um crescimento contínuo desse córtex.

Nesta pesquisa a presença de glia radial foi revelada no córtex cerebral de *T. hispidus* adultos, tendo como aspecto um emaranhado de fibras espinhosas, cujos corpos celulares situaram-se na região endimária. Garcia-Verdugo et al. (1986) relataram que a glia endimária radial orienta os neurônios recém formados para migração para a camada celular do córtex medial. Segundo Lopez-Garcia et al. (2002b) uma cadeia de glia radial vertical desenvolvida persiste mesmo no lagarto adulto, e no hipocampo células semelhantes ainda são encontradas no giro dentado (CAMERON et al., 1993), e provavelmente estão envolvidas no processo migratório

e no desenvolvimento dendrítico de células granulares recém-formadas (SEKI & ARAI, 1999).

A 3-Acetilpiridina foi a droga administrada para provocar dano neuronal, em decorrência da sua capacidade de acarretar lesão bastante seletiva, atingindo o córtex medial preferencialmente; Font et al. (1991) relatam que essa droga acarreta bloqueio da síntese de ATP nas reações da cadeia respiratória.

A averiguação da lesão cortical, induzida pela neurotoxina 3-Acetilpiridina, revelou diferença significativa no número de núcleos picnóticos, para os grupos experimentais analisados. O número desses núcleos para os animais com 7 dias, sob ação dessa droga, foi significativo em relação aos grupos de 1 e 33 dias, indicando aumento da lesão cortical nesse período; e foi observada uma reversão desses efeitos nos animais de 33 dias após injeção de 3-AP, indicando uma possível regeneração do córtex medial lesionado.

Para Nacher et al. (1999) o córtex medial do lagarto é capaz de regeneração neuronal após ser lesionado pela 3-AP, esse anti-metabólico induz uma rápida degeneração da estrutura cortical, no entanto seis a oito semanas após lesão, os restos celulares são removidos, e a camada granular é repopulada por neurônios gerados no epêndima subjacente.

Segundo Molowny et al. (1995) uma explosão proliferativa perdura até sete dias após a injeção de 3-AP, demonstrando uma resposta mitótica altamente regulada contra a lesão, e sinais claros de um processo restaurativo é observado entre quatro e dez dias, após o uso de 3-AP; e o restabelecimento do aspecto histológico normal se desenvolve durante dois a três meses, após esse tempo, nem os núcleos lesados, nem os restos celulares são visualizados na camada celular do córtex medial do lagarto.

6 CONCLUSÃO

O entendimento detalhado sobre os processos de neurogênese pós-natal e regeneração neuronal no córtex cerebral do lagarto tropical *T. hispidus* pode contribuir de maneira significativa para o conhecimento destes mesmos fenômenos no cérebro de mamíferos, incluindo a espécie humana. A investigação sobre o envelhecimento do sistema nervoso e sobre as patologias que o acometem, assim como a busca de tratamentos mais eficazes, é de extrema relevância; neste sentido, a pesquisa básica em neurociência, como foi a proposta deste trabalho, é de extrema relevância.

Os dados demonstrados nesta pesquisa indicam que células da camada cortical do lagarto *Tropidurus hispidus* estão envolvidas no processo de proliferação celular, sugerindo haver um potencial neurogênico, observado durante toda vida desses animais. As células no epêndima do córtex medial proliferam e geram neurônios imaturos, que migram para a camada celular, sofrem diferenciação, dirigindo-se para as demais áreas corticais, e a partir daí resultam em um crescimento contínuo do córtex medial.

Outra característica importante deste animal é o fato do córtex medial recuperar-se mediante lesão química, apresentando uma subsequente neo-histogênese e regeneração neuronal, e o fato possivelmente mais interessante nesse processo regenerativo é que o mesmo acontece no cérebro de lagarto adulto.

A presença de glia radial foi outro fato demonstrado neste estudo, localizando-se em todo córtex cerebral, apresentando corpos celulares em camada ependimária; a importância deste achado reside no fato desta ser encontrada neste animal na fase adulta, e possivelmente estar envolvida no mecanismo migratório neuronal.

Observamos, portanto que o córtex cerebral do lagarto *Tropidurus hispidus* é um bom modelo para o estudo dos complexos fatores que regulam os eventos neurogenéticos e migratórios; entretanto é importante ressaltar que pesquisas com esse modelo animal necessitam de um maior aprofundamento, para que meios que minimizem a agressão celular, mediante dano neuronal possam ser melhor instituídos.

REFERÊNCIAS

ABOITIZ, F.; MONTIEL, J.M.; LOPEZ, J. Critical steps in the early evolution of the isocortex. Insights from developmental biology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 35: 1455-1472, 2002.

ALTMAN, J.; DAS, G.D. Pos-natal origin of microneurons in the brain. **Nature**, 207: 953-956, 1965

ALVAREZ-BUYLLA, A.; KIM, J.R. E NOTTEBOHM, F. Birth of projection neurons in adult avian brain may be related to perceptual or motor learning. **Science**, 249: 1444-1446, 1990.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; TRAMONTIN, A.D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. **Nat Rev Neurosci**, 2: 287-93, 2001.

ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.K.; MARTINS, P.J.F.; MAGALÃES, L.E.; TUFIK, S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. SÃO PAULO: UNIFESP, 2004.167p.

BLASCO-IBANEZ, J.M.; MARTINEZ-GUIJARRO, F.J.; LOPEZ-GARCIA, C.; MELLSTRÖM, B.; NARANJO, J.R. Narine occlusion decreases basal levels of fos protein in the cerebral cortex of the lizard *Podarcis hispanica*. **Neuroscience**. Vol. 50, No. 3, pp. 647-653, 1992.

CAETANO, M.H., CASTANET, J., CRESPO, E.G. Estimation a l'aide de la squelettchronologie de l'age de *Podarcis hispânica*, Sauria, Lacertidae, provenant d'uma population portugaise. **Rev. Suisse Zool**.93: 117-127. 1986.

CAMERON, H.A., WOOLLEY, C.S., McEwen, B.S., GOULD, E. Differentiation of newly born neurons and glia in dentate gyrus of the adult rat. **Neuroscience**. 56: 337-344, 1993.

CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL. **A célula 2001**. São Paulo: Manole, 2004. 287p.

CONTI, L.; CATAUDELLA, T. ;CATTANEO, E. Neural stem cells; a pharmacological tool for brain diseases?. **Pharmacological Research**, 47: 289-297, 2003.

DE LA IGLESIA, J.A.L.; LOPEZ-GARCIA, C. A golgi study of the principal projection neurons of the medial córtex of the lizards *Podarcis hispanica*. **The Journal of Comparative Neurology**.000: 528-564, 1997.

DE LA IGLESIA, J; LOPEZ-GARCIA, C. A golgi study of the short-axon interneurons of the cell layer and inner plexiform layer of the medial córtex of the lizards *Podarcis hispanica*. **The journal of comparative neurology**. 385: 565-598, 1997.

ECKENHOFF, M.F.; RAKIC, P. Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. **Journal of Neuroscience**, 8: 27-29, 1988.

ERICKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A., et al . Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, 4: 1313-1317, 1998.

FERES, L.C; CAIRASCO, N.G. Plasticidade do Sistema Auditivo. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** [online]. Set.2001, vol.67, no.5 [citado 05 Abril 2006], p. 716-720. Disponível na World Wide Web: < <http://www.scielo>.

FONT, E.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; MARTINEZ-GUIJARRO, F.J.; ALCÁNTARA, S.; LOPEZ-GARCI, C. Neurobehavioral effects of 3-acetylpyridine in the lizards *Podarcis hispânica*. **Eur. J. Neurosci**. 2S: 148, 1989.

FONT, E.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; ALCÁNTARA, S.; LOPEZ-GARCIA, C. Neuroregeneration reserves 3-acetylpyridine-induced cell loss in the cerebral córtex of adult lizards. **Brain Research** . 551: 230-235, 1991.

FONT, E.; DESFILIS, E.; PÉREZ-CANĒLLAS, M.; ALCÁNTARA, S.; GARCIA-VERDUGO, J.M. 3-Acetylpyridine-induced degeneration and regeneration in the adult lizard brain: a qualitative and quantitative analysis. **Brain Research**, 754: 245-259, 1997.

FONT, E.; DESFILIS, E.; PEREZ-CAÑELLAS, M.; ALCÁNTARA, S. e GARCÍA-VERDUGO, J.M. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. **Brain Behaviour and Evolution**, 58: 276-295, 2001.

GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult brain. **Journal of Neuroscience**, 22: 612-3, 2002.

GARCIA-VERDUGO, J.M. ; FARINAS, I. ; MOLOWNY, A. ; LOPEZ-GARCIA, C. Ultrastructure of putative migrating cells in the cerebral córtex of *Lacerta galloti*. **Journal of Morphology**, 189: 189-197, 1986.

GOLDMAN, S.A.; NOTTENBOHM, F. Neuronal production, migration and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. **Proceedings of Natural Academy of Sciences, USA**, 80: 2390-2394, 1983.

GOULD, E. et al. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regenerated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **Journal of Neuroscience**, 17: 2492-2498, 1997.

GOULD, E. et al. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. **Proceedings of Natural Academy of Sciences**, USA,95: 3168-3171, 1998.

GOULD, E.; BEYLIN, A.; TANAPOT, P; REEVES, A. e SHORS, T.J. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nature Neuroscience**, 2: 260-265, 1999.

GOULD, E.; TANAPAT, P.; HASTINGS, N.B.; SHORS, T.J. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. **Trends in Cognitive Sciences**. Vol. e. No. 5, 1999.

HASTINGS, N.B.; TANAPAT, P.; GOULD, E. Neurogenesis in the adult mammalian brain. **Neuroscience**. Vol. 1, ed. 3, pag. 175-182, 2001.

KAY, A.R. Evidence for chelatable zinc in the extracellular space of the hippocampus, but little evidence for synaptic release of Zn. **The Journal of Neuroscience**, 23(17): 6847-6855, 2003.

KANDEL, E.R. Nerve cells and behaviour. In: KANDEL, E.R; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principles of neural science**. 3rd edition. New York: Elsevier Publishing, 1991.

KEMPERMANN, G. ;KUHN, H.G. ; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, 386: 493-5, 1997.

KEMPERMANN, G., KUHN, H.G., GAGE, F.H Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. **J. Neurosci.** ,18, 3206-3212, 1998.

KIRN, J.R.; O'LOUGHLIN, B.; KASPARIAN, S.; NOTTEBOHM, F. Cell death and neuronal recruitment in the high vocal center of adult male canaries are temporally related to changes in song. **Proc. Natl. Acad. Sci.** U.S.A. 19: 7844-7848, 1994.

LEME, R.J.; CHADI, G. Distant microglial and astroglial activation secondary to experimental spinal cord lesion. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** [on line]. Set. 2001, vol.59, no. eA [citado 14 fev. 2006], p. 483-492. Disponível na World Wide Web: <: <http://www.scielo.br>.

LOPANTSEV, V.; WENZEL, J.H.; COLE, B.T.; PALMINTER, D.R.; SCHWARTZKROIN, A.P. Lack of vesicular zinc in mossy fibers does not affect synaptic excitability of CA3 pyramidal cells in zinc transporter 3 knockout mice. **Neuroscience**. 116: 237-248, 2003.

LOPEZ-GARCIA, C.; MOLOWNY, A.; PEREZ-CLAUSELL, J. Volumetric and densitometric study in the cerebral cortex and septum of a lizard (*Lacerta galloti*) using the Timm method. **Neurosci Lett**. 40:13-18, 1983.

LOPEZ-GARCIA, C., TINEO, P.L., DEL-CORRAL, J. Increase of the neuron number in some cerebral cortical areas of lizards, *Podarcis hispanica*, during postnatal periods of life. **J. Hirnforsch.** 25: 255-259, 1984.

LOPEZ-GARCIA, C., MARTINEZ-GUIJARRO, F.J., BERBEL, P., GARCIA-VERDUGO, J.M. Long-spined polymorphic neurons of the medial cortex of lizards: a Golgi, Timm, and electron-microscopic study. **J. Comp. Neurol.** 272: 409-423, 1988.

LOPEZ-GARCIA, C., MOLOWNY, A., MARTINEZ-GUIJARRO, F.J., BLASCO-IBANEZ, J.M., DE LA IGLESIA, J.A.I., BERNABEU, A., GARCIA-VERDUGO, J.M. Lesion and regeneration in the medial cerebral cortex of lizards. **Histol. Histopath.** 7: 725-746, 1992.

LOPEZ-GARCIA, C.; NACHER, J.; CASTELLANO, B.; DE LA IGLESIA, J.A.L.; MOLOWNY, A. Transitory disappearance of microglia during the regeneration of the lizard medial cortex. **Glia.** 12: 52-61, 1994.

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. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, 74(1): 85-104, 2002.

LOPEZ-GARCIA, C.; VAERA, E.; PALOP, J.J.; NACHER, J.; RAMIREZ, C.; PONSADA, X. E. MOLOWNY, A. Cytochemical techniques for zinc and heavy metals localization in nerve cells. **Microscopy Research and Techniques**, 56: 318-331, 2002.

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 lizards *Tropidurus hispidus*. **Neuroscience**, 134: 407-413, 2005.

MILTON, H. **Análise da estrutura dos vertebrados**. ed. São Paulo : Atheneu, 1995. p.351-396.

MOLOWNY, A.; NACHER, J.; LOPEZ-GARCIA, C. Reactive neurogenesis during regeneration of the lesioned medial cerebral cortex of lizards. **Neuroscience**. Vol. 68, No 3, pp. 823-836, 1995.

NACHER, J.; RAMIREZ-CASTILLRJO, C.; PALOP, J.J.; MOLOWNY, A.; DE LA IGLESIA, J.A.L.; LOPEZ-GARCIA, C. Radial glia and cell debris removal

during lesion-regeneration of the lizard medial córtex. **Histol Histopath.** 14: 89-101, 1999.

NACHER, J.; RAMIREZ, C.; PALOP, J.J.; ARTAL, P.; MOLOWNY, A.; LOPEZ-GARCIA, C. Microglial cells during the lesion-regeneration of the lizard medial córtex. **Histol Histopathol**, 14: 103-117, 1999.

NOTTEBOHM, F. Neuronal replacement in adult brain. **Brain Research Bulletin**, vol.57, no.6, pp.737-749, 2002.

NUNES, J.A.M.; LOPEZ-GARCIA, C.; MARCHIORO, M. Neurogênese pós-natal no córtex cerebral do lagarto *Tropidurus hispidus*. In CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC-CNPq, 5, 2003, Sergipe. Textos de trabalhos de pesquisa apresentados durante o V Congresso de Iniciação Científica PIBIC-CNPq/UFS. Aracaju, Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa: 2003. 5v, p. 195.

OLUCHA, F.; MARTINEZ-GARCIA, F.; POOH, L.; SCHWERDTFEGER, W.K. e LOPEZ-GARCIA, C. Projection from the medial cortex in the brain of lizards: Correlation of anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase with Timm staining. **Journal of Comparative Neurology**, 276: 469-480, 1988.

PEREZ-CANELLAS, M. Desarrollo postnatal tardío del sistema Timm-positivo septocortical de *Chalcides sexlineatus*. **University of Valencia**. 1989.

PEREZ-SANCHEZ, F.; MOLOWNY, A.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; LOPEZ-GARCIA, C. Postnatal neurogenesis in the nucleus sphericus of the lizards, *Podarcis hispanica*. **Neuroscience Letters**. 106: 71-75, 1989.

RAKIC P. & NOWAKOWSKI. The Time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. **J. Comp. Neurol.** 1: 99-128, 1981.

RAKIC, P. Limits of neurogenesis in primates. **Science**, 227: 1054-1056, 1985.

RAKIC, P. DNA synthesis and cell division in the adult primate brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 457: 193-211, 1985.

RAMALHO, A.M.R. **Neurogênese pós-natal em lagarto brasileiro *Tropidurus hispidus* adulto**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2003.

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 córtex. **NeuroReport**, 8: 2337-2342, 1997.

RODRIGUES, M.T. Estudos sobre a especiação e ecologia da fauna das dunas interiores do rio São Francisco, BA: implicações paleoambientais. **Boletim do Instituto de Geociências/ USP**, Brasil, v.16, p. 101-102, 1988.

RODRIGUEZ-SERNA, R. Desarrollo postnatal del sistema Timm-positivo Del telencefalo de Podarcis hispânica. **University of Valencia**. 1987.

SANTOS, M.G.M.; MARCHIORO, M.; NUNES, J.M.A.M.; MARTINEZ, E.P.; LOPEZ-GARCIA, C. Post-natal Neurogenesis in the Northeastern Brazilian Lizard, *Tropidurus hispidus*. In: International Congress on Neuroregeneration, 2., 2004, Rio de Janeiro. **Abstracts**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004. pp.80.

SCHRENER, T. W.; SCHRENER, A. Intrapecific variation in home-range size in some Anolis lizards. **Ecology**, 63:809-823.2001.

SEKI, T., ARAI, Y. Temporal and spatial relationships between PSA-NCAM-expressing, newly generated granule cells, and radial glia-like cells in the adult dentate gyrus. **J. Comp. Neurol.** 410: 503-513, 1999.

SHORS, T.J.; MIESEGAES, G.; BEYLIN, A.; ZHAO, M.R.; RYDEL, T. e GOULD, E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. **Nature**, 410: 372-376, 2001.

VAN PRAAG, H. V.; CHRISTIE, B.R.; SEJNOWSKI, T.J.; GAGE, F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **PNAS**. Vol. 96, no. 23, pp. 13427-13431, 1999.

VAN SLUYS, M. Growth and body condition of the saxicolous lizard *Tropidurus itambere* in southeastern Brazil. **Journal of herpetology**. Vol. 32, no. 3, pp. 359-365, 1998.

VAN SLUYS, M. Population dynamics of the saxicolous lizards *Tropidurus itambere* (Tropiduridae) in a seasonal habitat of southeastern Brazil. **Herpetologica**. V. 56, n.1, p. 55-62, 2000.

VAN SLUYS, M.; ROCHA, C.F.D.; VRCIBRADIC; GALDINO, C.A.B.; FONTES, A.F. Diet, activity and microhabitat use of two syntopic *Tropidurus* Species (Lacertilia: Tropiduridae) in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Herpetology**. Vol.38, no. 4, pp. 606-611, 2004.

VAREA,E.; PONSODA, X.; MOLOWNY, A.; DANSCHER, G.; LOPEZ-GARCIS, C. Imaging synaptic zinc release in living nervous tissue. **Journal of Neuroscience Methods**. 110: 57-63, 2001.

WEST, M.J.; SLOMIAANKA, L.; GUNDERSEN, H.J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **Anat. Rec.** 231, 482-497, 1991.

WEST, M.J. New stereological methods for counting neurons. **Neurobiology of Aging**. Vol. 14, pp. 275-285, 1993.

APÊNDICE

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)