

LAILA BRITO TORRES

**Estudo morfológico do hipocampo de uma espécie de primata da
Amazônia: *Cebus apella*, (Linnaeus, 1758).**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

São Paulo

2010

LAILA BRITO TORRES

**Estudo morfológico do hipocampo de uma espécie de primata da
Amazônia: *Cebus apella*, (Linnaeus, 1758).**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro

**São Paulo
2010**

Torres, L.B

Estudo anatômico do hipocampo de uma espécie de primata da
Amazônia *Cebus apella* (Linnaeus, 1812).

Laila Brito Torres – São Paulo, 2010.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo.
Programa de Pós-graduação em Neurologia e Neurociência.

Título em inglês: Anatomic study of the hippocampus in a
primate species of the Amazon *Cebus apella* (Linnaeus,
1812).

1. Primatas não humanos 2. Estereologia; 3. *Cebus apella*; 4. Formação
hipocampal. 5. Parvalbumina

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA E NEUROCIRURGIA

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. Mirto Nelso Prandini

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Naffah Mazzacoratti

LAILA BRITO TORRES

**Estudo morfológico do hipocampo de uma espécie de primata da
Amazônia: *Cebus apella* (Linnaeus, 1758)**

Presidente da Banca

Prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro

Banca Examinadora

Prof^a Dra. Carla Alessandra Scorza

Prof. Dr. Fúlvio Alexandre Scorza

Prof. Dr. Nelson Antonio Bailão Ribeiro

Prof. Dr. Reinaldo de Amorim Carvalho

Suplentes

Prof. Dr. Franciso Romero Cabral

Prof. Dr. Mário Fiorani Júnior

Aprovada em: / /

Esta tese foi realizada na Disciplina de Neurologia Experimental do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, durante o curso de Pós-Graduação em Neurologia-Neurociências, com auxílio financeiro da CAPES, FAPESP e CNPq e Instituto Evandro Chagas - Secretaria de vigilância em saúde - Ministério da Saúde e da Cooperação Interinstitucional de Apoio à Pesquisa sobre o Cérebro (CInAPCe), do Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INNT). A aluna foi bolsista do CNPq.

DEDICATÓRIA

Aos meus amados Pais,

Por todo amor dedicado a família, pela companhia diária a distância, no calor de Belém e nos dias de frio paulistano. Obrigada pela espirituosa sabedoria na condução da minha formação pessoal e por confiarem sempre nas minhas escolhas. Amo vocês!

Aos meus Tios,

Tio Moda (*in memoriam*) e Tia Ricarda, pelo aceite em compartilhar a responsabilidade da minha formação desde os 12 anos de idade e por me proporcionarem uma rotina familiar tão amável.

DEDICATÓRIA

Ao Bruno Henrique Silva Araújo,

Por construirmos a melhor estória de um primeiro amor, por ser a minha melhor companhia no dia a dia, e na bancada do laboratório. Em especial, por compartilhar uma família tão especial.

DEDICATÓRIA

Ao Professor,

Dr. Esper Abrão Cavalheiro,

Orientador da presente tese,

Por mostrar o quanto a ciência é encantadora e pelas tentativas incessantes da expansão do raciocínio científico. Tenho imenso respeito e orgulho de tê-lo como orientador por sua benevolência e pelo seu fascinante dinamismo intelectual.

Obrigada Professor!

**"Para conquistarmos algo na vida não basta ter talento, não basta ter força, é preciso também viver um grande amor."
(Mozart)**

AGRADECIMENTOS

Aos amigos do laboratório pela boa convivência e troca de experiências durante todo período de pós graduação.

Aos professores do Departamento pelo apoio dado a realização desta Tese: Profa. Dra. Maria da Graça Naffah Mazzacoratti, Profa. Dra. Débora Amado Scerni, Prof. Dr. Fulvio Alexandre Scorza, Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto, Profa. Dra. Maria José Fernandes.

Aos professores colaboradores do laboratório de Neurologia Experimental: Prof. Dr. Alexandre Valotta, Prof. Dr. Ricardo Mário Arida, Profa. Dra. Elza Márcia Targas Yacubian e Profa. Dra. Roberta Cysneiros.

Ao Dr. Reinaldo por acreditar no meu potencial mesmo quando eu só chorava diante das dificuldades da iniciação a ciência.

A Andrea Carmo, em nome da BIREME, pelo direcionamento em buscas nas bases de dados, pelo conhecimento compartilhado sempre em nossos vários encontros.

A D. Laura Ferro, em nome da Biblioteca Márcio Ayres, pela seleção de documentos importantes, pela busca de artigos referentes a primatologia, quando essa ciência se estabeleceu no país, pelos cuidados quanto a minha formação acadêmica desde a Iniciação científica.

A todos os funcionários da Disciplina de Neurologia Experimental pela grande ajuda e colaboração para realização desta Tese, em particular: Marco Aurélio Gonzaga, Silvando Gomes de Novais, Luis Adolfo Vieira Pereira, Hilda da Silva Reis e Edvaldo Marques Messias.

A Marabá, minha cidadezinha, que pelo sonho de vê-la crescer, decidi prematuramente abandoná-la, para em um futuro próximo unir forças á construção do novo Estado - Carajás e da nova capital - Marabá. Em especial a câmara dos vereadores, pela homenagem de incentivo a minha carreira acadêmica.

Ao meu querido amigo Romero, meu parâmetro de certeza, confiança e segurança, pela amizade dedicada desde o primeiro dia da minha chegada em São Paulo, e sem dúvida pelos conhecimentos compartilhados a cada dia.

Ao meu amigo Bolívar, por ser tão receptivo e me acolher tão calorosamente sempre.

Ao meu grande amigo Filipe, e sua família, por serem as minhas melhores lembranças da época da pós graduação, pela sua amizade e companheirismo eternos.

Aos amigos do laboratório, José Cláudio, Telma Luciana, Eliângela, Mauricio Scussel, Henrique Alves, Daiana Correia Lima, Priscila Simões, Eduardo Ferreira de Castro Neto, Luciana Janjoppi, Sergio Gomes, Aline Pansani, Elisa Sonoda, Danizinha Suzuki, Carol Rodini, Márcia Cristina Pereira, pelas importantes contribuições acadêmicas e pela agradável convivência. Obrigado por tudo!

A nossa Cacá por irradiar alegria e tornar sempre alegre nossa rotina e convivência extra laboratório.

As amigas de longas datas, Vivian Castro, Ramayanna Rayol e Thrissy Colares Maestri, por participarem plenamente das minhas angustias e realizações mesmo a mais de 3000 km de distância.

A minha grande amiga Klena Sarges, por ter sido uma verdadeira orientadora, pelo exemplo de profissional e conhecedora da clínica em primatas, e em especial

pela companhia nas aventuras da vida acadêmica. Obrigada pela amizade verdadeira, incentivo e cuidados.

Ao Rodrigo e a Sofia, os sobrinhos mais lindos do mundo, que me fizeram conhecer a verdadeira amplitude da palavra saudade.

Aos amigos do CENP-IEC, Dr. Paulo Castro, Dr. José Muniz, Dr. Frederico Ozama, Dr. Washington, a equipe da clínica, Paulo, Miguel, Dra Aline e D. Rosa, ao incansável Jean – disponíveis a qualquer dia e hora, a equipe de compras (Serfáttil, Júlio e José Maria). Obrigada ao Diretor do CENP Dr. Carlos Faro pelo espaço sempre disponível.

A Laura Melo por simplesmente estar ao meu lado sempre.

A Luciana por tornar São Paulo um lugarzinho pequenininho, familiar e aconchegante.

A Edileuza, por ter cuidado tão bem de mim e da minha casa aqui em São Paulo durante todos esses anos dedicados a pós graduação.

A minha irmã amada Larissa. Por ter sido companheira em momentos essenciais e por conduzir a vida ao lado dos nossos pais. Amo infinitamente você!

A minha irmã Paula por tornar a vida colorida e surreal na sua companhia.

A D. Enides que me proporcionou maravilhosos finais de semana e mimos familiares em São Paulo, dos quais eu sentia muita saudade.

A Emília e ao Luis por me acolherem tão amavelmente, por serem os maiores incentivadores e exemplos de vida, e sem dúvida, nossas melhores companhias em qualquer circunstâncias da vida. Obrigada por compartilhar a família.

Agradeço infinitamente a Deus pelo equilíbrio e direcionamento da minha vida.

RESUMO

Os primatas constituem modelos animais insubstituíveis para áreas de investigação científica devido a sua estreita relação evolutiva com os seres humanos o que assegura modelos de alta fidelidade com capacidade preditiva e discriminativa que podem não estar disponíveis em outras espécies. O *Cebus apella*, uma espécie de primata do novo mundo que pertence à família Cebidae, subordem Cebinae (Linnaeus, 1758), são comumente usados em pesquisas biomédicas e comportamental sendo uma espécie eleita para muitos modelos experimentais com enfoque cognitivo. O hipocampo, estrutura límbica altamente plástica situado no lóbulo temporal é importante para a aprendizagem e consolidação da memória. Desta forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar quantitativamente e qualitativamente as células parvalbumina-positivas no hipocampo de *Cebus apella*, bem como estimar o volume e o número de neurônios em seus diferentes subcampos, utilizando o método do fracionador óptico. Os resultados obtidos em nosso estudo podem ser úteis para diversos projetos experimentais que tenham como foco a medicina translacional.

Palavras-chave: Primata não humano, estereologia, *Cebus apella*, parvalbumina, hipocampo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Vista aérea do complexo de laboratórios do prédio administrativo e das gaiolas externas do Centro Nacional de Primatas (CENP).	26
Figura 2: Cortes histológicos corados com violeta de cresila caracterizando áreas hipocampais em diferentes espécies.	33
Figura 3: <i>Cebus apella</i> .	39
Figura 4: Monitoramento cardíaco durante procedimento de intervenção cirúrgica.	40
Figura 5: Imagem do encéfalo de <i>Cebus apella</i> , após procedimento de perfusão.	41
Figura 6: Imagem esquemática do plano de corte em 2mm dos blocos amostrais do cérebro do <i>Cebus apella</i> .	41
Figura 7: Seqüência dos blocos de 2mm após processamento do encéfalo. Hipocampo assinalado pelos círculos vermelhos.	42
Figura 8: Ponto de referência na lâmina.	47
Figura 9: Delimitação das áreas investigadas na fatia do hipocampo do animal <i>Cebus apella</i> corado pela técnica de coloração de Nissl.	47
Figura 10: Representação esquemática das áreas amostrais delimitadas para contagem. A área amostral (asf) e espessura da amostra (tsf).	48
Figura 11: Caixa de contagem caracterizando as linhas de inclusão (verdes) e exclusão (vermelhas), e os respectivos neurônios aptos para a contagem segundo a metodologia.	50
Figura 12: Neurônios digitalmente reconstruídos nas regiões hipocampais.	53
Figura 13: Neurônio parvalbumina positivo considerado apto para a reconstrução e caracterização morfológica.	54
Figura 14: Célula reconstruída e analisada pelo software Neurolucida a partir dos círculos concêntricos de Sholl. Apresentação do dendrograma.	56
Figura 15: Neurônios parvalbumina positivos na camada polimórfica do giro dentado.	67

Figura 16: Neurônios parvalbumina positivo na camada polimófica do giro dentado da figura 15 em maior aumento.	68
Figura 17: Neurônio parvalbumina positivo de soma esférico localizado na camada granular do giro dentado.	69
Figura 18: Neurônio de soma esférico situado no primeiro terço interno do <i>stratum lacunosum-moleculare</i> .	70
Figura 19: Neurônio da figura 18 em maior aumento.	71
Figura 20: Imagem da região de CA2 com presença predominante de células na camada piramidal e polimórfica.	73
Figura 21: Região intensamente marcada de CA2.	74
Figura 22: Célula de CA2 emitindo projeções tanto para o <i>stratum lacunosum</i> como para o <i>stratum oriens</i> .	75
Figura 23: Possível comunicação entre as células parvalbuminas positivas na região de CA2.	76
Figura 24: Células fusiformes localizadas no <i>stratum oriens</i> .	77
Figura 25: Neurônios da camada piramidal de CA1 emitindo a maioria de suas projeções ao <i>stratum oriens</i> e <i>radiatum</i> .	78
Figura 26: Neurônio localizado na camada piramidal de CA1, emitindo suas projeções para o <i>stratum oriens</i> .	79
Figura 27: Células na camada de CA3. Término das projeções emitidas pelas células situadas na camada piramidal de CA3 em direção a ponta do <i>stratum lacunosum-moleculare</i> do giro dentado.	80
Figura 28: Neurônios da figura 27 em maior aumento.	81
Figura 29: Células na camada de CA3. Término das projeções emitidas pelas células situadas na camada piramidal de CA3 em direção a ponta do <i>stratum lacunosum-moleculare</i> do giro dentado.	82
Figura 30: Área limite entre subiculum e CA1.	83
Figura 31: Neurônios na região do Subiculum.	84
Figura 32: Reconstrução digital das células hipocampais.	86
Figura 33: Área em μm^2 do soma dos neurônios parvalbumina positivos situados em CA1, CA2, CA3 e Hilo.	88
Figura 34: Perímetro em μm^2 do soma dos neurônios parvalbumina positivos situados em CA1, CA2, CA3 e Hilo.	88

Figura 35: Número de terminações dendríticas nas regiões de CA1, CA2, CA3 e Hilo.	89
Figura 36: Quantidade de dendritos nas regiões de CA1, CA2, CA3 e Hilo.	89
Figura 37: Número total de bifurcações dos neurônios parvalbumina positivos nas regiões de CA1, CA2, CA3 e Hilo.	90
Figura 38: Comprimento total em μm dos dendritos de neurônios parvalbumina positivos nas regiões de CA1, CA2, CA3 e Hilo.	90
Figura 39: Média do comprimento em μm dos dendritos de neurônios parvalbumina positivos nas regiões de CA1, CA2, CA3 e Hilo.	90
Figura 40: Gráfico do número de dendritos que interceptam os círculos de Sholl caracterizando a distância alcançada pelas células das regiões de CA1, CA2, CA3 e Hilo.	92
Figura 41: Padrão quantitativo das regiões hipocâmpais nas diferentes espécies utilizadas para pesquisa biomédica.	97
Figura 42: Representação esquemática da distribuição espacial das células parvalbumina positivas.	101
Figura 43: Proporção do número de células parvalbumina positiva em relação a totalidade de células hipocâmpais no primata <i>Cebus apella</i> .	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Avidina-biotina peroxidase
asf	Fração da amostragem da área de cada secção
CA	Corno de Ammon
CA1	Corno de Ammon – 1
CA2	Corno de Ammon – 2
CA3	Corno de Ammon – 3
CA4	Corno de Ammon – 4
CENP	Centro Nacional de Primatas
CEPAN-IEC	Comitê de ética em pesquisa animal – Instituto Evandro Chagas
CEP-UNIFESP	Comitê de ética em pesquisa- Universidade Federal de São Paulo
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
DAB	Diaminobenzidina
DP	Doença de Parkinson
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
IBDF	Instituto Brasileiro do desenvolvimento Florestal
ICNB	Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade
IEC	Instituto Evandro Chagas
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas
MS	Ministério da Saúde
NIH	<i>National Institute of Health</i>
PB	Tampão fosfato
PBS	Tampão fosfato salina
PBS-X	Tampão fosfato salina com Triton X-100
PNH	Primatas não humano
PNM	Primata do Novo Mundo
PV	Parvalbumina

s-l-m	<i>Stratum lacunosum moleculare</i>
s.o	<i>Stratum oriens</i>
s.p	<i>Stratum pyramidale</i>
Ssf	Intervalo do número de secções investigadas
s.r	<i>Stratum radiatum</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
Tsf	Média da altura da espessura da amostra
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
WHO	<i>World Health Organization</i>
WWF-US	<i>World Wildlife Fund</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Plantel da colônia de primatas criados em cativeiro no Centro Nacional de Primatas.	27
Tabela 2: Parâmetros estereológicos utilizados no presente estudo. Σ = somatória, ssf = secções seriais da amostra, ΣQ = Pontos totais de contagem.	61
Tabela 3: Parâmetros empregados durante o primeiro ensaio estereológico. Σ = somatória, ssf = secções seriais da amostra, ΣQ = Pontos totais de contagem.	61
Tabela 4: Número total de neurônios no hipocampo do primata <i>Cebus apella</i> .	63
Tabela 5: Número total de neurônios parvalbumina positivos no hipocampo do primata <i>Cebus apella</i> .	65
Tabela 6: Número total de neurônios parvalbumina positivos nas subcamadas do hipocampo do primata <i>Cebus apella</i>	66
Tabela 7: Análise morfológica dos neurônios parvalbumina positivos reconstruídos digitalmente localizados em diferentes regiões do hipocampo do primata <i>Cebus apella</i> .	87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. O HISTÓRICO DA PRIMATOLOGIA NO BRASIL	23
1.2. O USO DE PRIMATAS NÃO HUMANOS NA NEUROCIÊNCIA TRANSLACIONAL	28
1.3. CEBUS APPELLA	29
1.4. ANATOMIA HIPOCAMPAL DE PRIMATAS NÃO HUMANOS	31
2. OBJETIVO	37
2.1 OBJETIVO GERAL:	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. ANIMAIS	39
3.2 PERFUSÃO	40
3.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	41
3.4 HISTOQUÍMICA	42
3.4.1 Método de Nissl	42
3.4.2 Imuno-histoquímica	42
3.5 ESTEREOLOGIA	43
3.5.1 Análise estereológica	46
3.5.2 Diferenciação de neurônios e glías	51
3.5.3 Estimativa do Volume	51
3.5.4 Análise estatística	51
3.6. RECONSTRUÇÃO DIGITAL DE NEURÔNIOS PARVALBUMINA POSITIVOS DO HIPOCAMPO DE PRIMATAS NÃO HUMANOS DA ESPÉCIE CEBUS APPELLA.	52
4. RESULTADOS	59
4.1 CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DO HIPOCAMPO DO CEBUS APPELLA	59
4.1.1 Parâmetros estereológicos	59
4.1.2 Número total de neurônios nas diferentes subcamadas da formação hipocampal.	62
4.1.3 Volume (Cavalieri)	64
4.1.4 Número total de neurônios parvalbumina positivos nas diferentes regiões e subcamadas da formação hipocampal.	64
4.2 ANÁLISE ESPACIAL DAS CÉLULAS PARVALBUMINA POSITIVAS NA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL.	67
4.2.1 Giro dentado	67
4.2.2 HIPOCAMPO	72
4.2.3 SUBICULUM	83
4.3 MORFOLOGIA DOS NEURÔNIOS PARVALBUMINA POSITIVOS	85
5. DISCUSSÃO	94
6. CONCLUSÃO	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
8. ANEXOS	122

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Histórico da Primatologia no Brasil

Referência aos primatólogos: Dr. Ademar Coimbra-Filho, Dr. Alcides Pissinati e Dr. Milton Thiago de Melo.

O contato entre o homem e os primatas remonta a 2.500 anos antes de Cristo no antigo Egito, quando os babuínos eram criados pelos reis para fins religiosos. Ao longo da história, o interesse por esses animais se manteve inalterado (Nunes *et al.*, 2007). A busca de cura para doenças incentivou a remoção de primatas do seu habitat natural para uso em laboratório.

A importância científica dos Primatas não Humanos (PNH) é indiscutível e eles representam valioso patrimônio cujas potencialidades óbvias são facilmente percebidas através das múltiplas investigações científicas, principalmente biomédicas e farmacêuticas. A procura de primatas pelas nações desenvolvidas destinadas a pesquisa científica foi intensa no Brasil. Exportações de primatas do Novo Mundo (PNM) começaram na década de 40, atingindo um pico em 1963, quando o primeiro vôo comercial entre Quito no Peru e Miami nos Estados Unidos da América foi estabelecido. Estima-se que aproximadamente 30.000 primatas da Amazônia foram exportados para a pesquisa biomédica (Renctas, 2001). Nesse período, a descontrolada exportação de primatas brasileiros mostrou-se desalentadora, não existia controle, inclusive para táxons ameaçados de extinção como, por exemplo, o sauí-piranga ou mico leão dourado (*Leontopithecus Rosália*). A preservação dos primatas somente começou a ser encarada com mais atenção e seriedade após algumas iniciativas e ações internacionais como a *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* em 1973, que passou a controlar de modo mais eficiente o comércio internacional das espécies da biota selvagem, além de persistentes ações objetivas de agências internacionais, tendo em vista a salvaguarda dos primatas *in situ* e *ex situ*. Nessa época, iniciaram-se pesquisas bem planejadas para o melhor conhecimento desses animais visando uma preservação mais eficiente em

seus habitats para propagá-los *ex situ* de modo mais racional, além de considerar futuros repovoamentos e reintroduções. Essas iniciativas contribuíram para fomentar o desenvolvimento da Primatologia conservacionista, principalmente quando a *International Union for Conservation of Nature* criou a *Species Survival Commission* em 1975 a qual, através do seu grupo especialista em primatas, organizou a *Global Strategy for Primate Conservation*, documento em que se avalia as prioridades relativas à preservação da fauna ameaçada.

O primeiro núcleo primatológico conservacionista brasileiro foi estabelecido em 1961, no Estado do Rio de Janeiro, que em sua evolução resultou na criação do Centro de Primatologia do Estado. O objetivo foi promover e desenvolver pesquisas para a preservação do mico leão dourado (*Leontopithecus rosalia*) *in situ* bem como sua propagação *ex situ*. Esta iniciativa foi seguida no estabelecimento de núcleos similares em outras partes do Brasil. Nas décadas de 50 e 60 desconhecia-se, no país, a importância dos primatas na pesquisa científica e ignorava-se que o EUA já dispusesse de sete bem organizados e equipados Centros de Primatas pertencentes ao *National Institute of Health* (NIH). Por fim, na década de 70, programas de pesquisa em biologia, ecologia e comportamento começaram a surgir nas universidades e institutos de pesquisa no Brasil.

É paradoxal imaginar que até a algumas décadas as pesquisas com primatas pudessem ser negligenciadas pela comunidade científica nacional, a qual deveria reconhecer a importância do estudo e da conservação desse recurso único, através da criação de centros de Primatologia bem equipados como ocorreu em outros países.

No entanto, em 1974, convocados pelo Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq), reuniram-se no Rio de Janeiro pesquisadores do Brasil e dos Estados Unidos para discutirem a possibilidade de serem construídos centros para o estudo de Primatas no Brasil. Os participantes enfatizaram unanimemente a importância de tal iniciativa para o país. Todo esse rápido interesse do CNPq pela Primatologia surgiu após uma carta de Albert Sabin ao presidente desse órgão federal, onde o ilustre cientista indagava a possibilidade de importar representantes do gênero *Callithrix*, *sagüis* amazônicos, para pesquisas sobre hepatite e certos tipos de câncer. Inteirando-se do conteúdo da carta, o CNPq

transferiu-a ao Ministro da Saúde, Paulo de A. Machado que, ao saber do assunto, enviou-a ao presidente do extinto Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal - IBDF, hoje Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, Paulo A. Berutti, autoridade que poderia atender a solicitação do cientista, já que as exportações de animais selvagens do Brasil eram proibidas. A carta de Albert Sabin ao CNPq fez com que fossem organizadas reuniões sobre a situação da Primatologia no Brasil, assunto antes discutido, em especial pelo Presidente da Academia Brasileira de Ciências, Aristides Pacheco Leão. No CNPq, ainda sediado no Rio de Janeiro, compareceram representantes do Ministério da Saúde, do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas – INPA, e do Instituto de Conservação da Natureza e Biodiversidade - ICNB, além de representantes norte-americanos, Russell A. Mittermeier, do *World Wildlife Fund - United States* (WWF-US), e Benjamin Blood, do *National Institute of Health* (NIH), para discutirem a possibilidade de serem criados centros de primatologia no país a fim de iniciar de modo criterioso estudos e propagação de primatas não humanos de ocorrência no Brasil, com a possibilidade de aproveitamento de indivíduos nascidos *ex situ* para finalidades utilitaristas ou conservacionistas. Na reunião sugeriu-se a criação inicial de três centros, na Amazônia, em Brasília e outro no Rio de Janeiro.

No encontro no CNPq foi preparado um esboço de programa para o desenvolvimento dessa ciência no país, documento aperfeiçoado ao passar pelos representantes das demais entidades envolvidas, quando seriam feitas as alterações indispensáveis às atividades de cada instituição. Apesar de sucinto, o documento compreendia ampla gama de possibilidades, incluindo o aproveitamento em pesquisas pragmáticas de indivíduos nascidos *ex situ*, e iniciativas conservacionistas, tais como repovoamento e reintroduções. Depois de um período, foi publicado no diário oficial boa parte deste documento, beneficiando o Ministério da Saúde com recursos para o estabelecimento do Centro Nacional de Primatas (CENP). Assim pela portaria 115, assinada pelo Ministério da Saúde e publicada no Diário Oficial, em 20 de março de 1978, foi criado o CENP sob responsabilidade dos serviços de saúde pública e com a finalidade de fornecer primatas não humanos para a investigação científica.

O CENP está localizado no município de Ananindeua no estado do Pará e possui uma área total de 25 hectares (Figura 1). O plantel de animais do CENP é procedente de doação mediante a prévia autorização do IBAMA (animais apreendidos ou capturados em área de risco), captura em habitats naturais (com permissão e acompanhamento fiscal do Instituto) e nascimentos na própria instituição. Atualmente, o CENP possui um plantel de aproximadamente 550 animais, divididos em 24 espécies, sendo uma pertencente ao velho mundo (Tabela 1).



Figura 1. Vista aérea do complexo de laboratórios do prédio administrativo e das gaiolas externas do Centro Nacional de Primatas (CENP), localizado no município de Ananindeua, estado do Pará.

Tabela 1: Plantel de primatas criados em cativeiro no Centro Nacional de Primatas.

FAMÍLIAS					
Cercopithecidae	Callitrichidae	Cebidae	Aotidae	Pitheciidae	Atelidae
	<i>Callimico goeldii</i>	<i>Cebus albifrons ssp.</i>	<i>Aotus a. infulatus</i>	<i>Callicebus molock</i>	<i>Alouatta b. belzebul</i>
	<i>Callithrix jacchus</i>	<i>Cebus apella ssp.</i>		<i>Chiropotes s. utahicki</i>	<i>Aloutta caraya</i>
<i>Chlorocebus aethiops</i>	<i>Callithrix penicillata</i>	<i>Cebus o. Olivaceus</i>		<i>Pithecia i. irrorata</i>	<i>Alouatta seniculus</i>
	<i>Callithrix geoffroyi</i>	<i>Cebus xanthosternus</i>			<i>Ateles marginatus</i>
	<i>Saguinus f. weddelli</i>	<i>Saimiri b. boliviensis</i>			<i>Ateles paniscus</i>
	<i>Saguinus niger</i>	<i>Saimiri s. sciureus</i>			<i>Lagothrix lagothricha</i>
	<i>Saguinus i. imperator</i>				

1.2. O uso de Primatas não humanos na neurociência translacional

Os roedores são a espinha dorsal da pesquisa biomédica, contudo, apresentam limitações quando comparados ao sistema biológico humano. Essas limitações são menos freqüentes em primatas não humanos- PNH, em especial primatas do velho mundo (Hagelin, 2005). Exemplos do gênero Macaques (*Rhesus* e *Cynomolgus*) possuem cerca de 95% de paridade em seu código genético com os humanos (Magness, *et al.*, 2005), o que nos leva a crer que ambos derivam de uma ancestralidade em comum (Franzen, 2009). Os primatas são basicamente valorizados pela similaridade com os humanos, particularmente quando se trata do sistema nervoso. A complexidade e estruturação do cérebro conferem aos primatas processos cognitivos e comportamentais sofisticados bem como relações sociais complexas e organizadas (Capitano, 2008). Neste sentido, pesquisas com PNH têm importante contribuição na área das neurociências, essencialmente na compreensão de neuropatologias e tratamento de doenças neurodegenerativas (Capitano 2008). Por exemplo, no modelo de epilepsia primária generalizada, os Babuínos (*Papio papio baboon*) tem como característica a predisposição genética à fotossensibilidade (Szabó *et al.*, 2009). Esse é um modelo animal utilizado para testar novas drogas antiepiléticas, assim como a relação entre a concentração da droga e o efeito tóxico neurológico (Smith, *et al.*, 1991; Meldrum, *et al.*, 1975; Stuzmann, 1995; Chapman, 1991; Naquet, *et al.*, 1968).

Outra característica que ressalta a importância dos modelos de primatas não humanos é o fato de possuírem uma longa vida, o que proporciona um estudo mais cuidadoso e a longo prazo de doenças neurodegenerativas correlacionadas com a idade avançada, como a doença de Parkinson (DP) e Alzheimer. A busca por tratamentos e medicamentos mais adequados tem sido frequentemente baseada em modelos experimentais de doenças. Tais como os modelos da DP que envolvem a administração de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina e 6 hidroxidopamina em animais, com a finalidade de reproduzir a perda de neurônios dopaminérgicos, bem como as características clínicas: tremor, rigidez muscular e acinesia, presentes em pacientes acometidos pela doença (Bjugstad, 2008).

Por exemplo, o *Callithrix*, gênero de Primatas do Novo Mundo – PNM, conhecido comumente no Brasil como sagüi, guia investigações de medicamentos e terapias alternativas a DP, já que fármacos convencionais como Levodopamina e agonistas de dopamina diminuem a eficácia após uso em longo prazo (Van Vliet, *et al.*, 2008a). Os efeitos anti-Parkinson do Δ^9 -tetrahydrocannabinol e modafinil em sagüis parkinsonianos foram avaliados e os resultados sugerem que esses compostos podem ser utilizados como agentes coadjuvantes na terapia da DP (Van Vliet, *et al.*, 2008b). Outros estudos referenciam à utilização desses animais na avaliação pré-clínica para novos tratamentos terapêuticos da DP, a partir da utilização de célula tronco e transferências de genes. (Redmond *et al.*, 2007; Emborg, *et al.*, 2008; 2009). A importância dos modelos desenvolvidos em PNH é, também, bem retratada em outras neuropatias (Holzer *et al.*, 2004). Investigações histopatológicas revelam que a doença de Alzheimer é caracterizada, em especial, pela identificação de placas senis (agregados de proteína beta-amilóide) e emaranhados neurofibrilares associados à hiperfosforilação da proteína tau no interior dos neurônios. Tal proteína, revela-se 99% homologa a de humanos em babuínos e 98% em *Rhesus* (Nelson *et al.*, 1996). Contudo, em roedores a identidade desta proteína é de 88% quando comparada aos humanos (Poorkaj *et al.*, 2001a).

Estima-se que anualmente em todo o mundo sejam utilizados aproximadamente 100.000 a 200.000 primatas não humanos em pesquisas, sendo que 15,5% do número total correspondem a PNM (Carlsson *et al.*, 2004). Apesar deste cenário, ainda faltam informações que possam ser utilizadas como base para futuros experimentos, principalmente na área das neurociências, que concentra a maioria dos estudos em primatas quando comparados a outras áreas do conhecimento (Torres *et al.*, 2010).

1.3. *Cebus apella*

Os primatas não humanos abrangem cerca de 270 espécies e numerosas subespécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (Hill, 1957). O Brasil é o país de maior diversidade possuindo 91 espécies

(Rylands *et al.*, 2000). Há no território nacional, exemplares de todas as 5 famílias de primatas do Novo Mundo, de 18 gêneros sendo 2 deles, o miqui (*brachyteles*) e o mico leão (*leontopithecus*), encontrados somente no Brasil (Rylands *et al.*, 2000). Dentre todos estes, a espécie *Cebus apella* (ou macaco prego, como é comumente conhecido no Brasil) se encontra amplamente difundida pelas Américas Central e do Sul (Ayres, 1982).

Esta espécie pertence à família *Cebidae*, subfamília *Cebinae* e ao gênero *Cebus* (Aurichio, 1995). Atualmente há conhecimento de quatro espécies nesse gênero: *Cebus apella*, *Cebus Olivaceus*, *Cebus capucinus*, e *Cebus albifrons* (Rylands *et al.*, 2000). Todas com dietas que incluem uma percentagem significativa de insetos, pássaros, ovos, lagartos, sapos, e vários outros pequenos animais (Mittermeier, 1988).

A diversidade na alimentação e zona de habitação entre as espécies parecem estar relacionadas ao tamanho médio do corpo e outras distinções morfológicas (Ford & Davis, 1992; Jason & Boinski, 1992). Estas características combinadas sugerem que macacos do gênero *Cebus* são frungívoros seletivos, mas diferentes de outros, consistentemente comem proteína animal (Schoeninger *et al.*, 1997). No entanto, quando comparado aos outros três representantes do gênero, o *Cebus apella* depende de uma quantidade maior de plantas na dieta (Jason & Boinski, 1992).

O *Cebus apella* é altamente adaptável a diversos habitats, com notável plasticidade comportamental e habilidade manual extremamente desenvolvida, sendo o uso de ferramentas a característica que mais o distingue das demais espécies neotropicais (Fragaszy, 1990; Napier & Napier, 1967; Visalberghi, 1993). Além disso, apresenta alto coeficiente encefálico (proporção entre peso do cérebro sobre o peso corporal), um atributo aceito como indicativo indireto da capacidade cognitiva desenvolvida (Sultan *et al.*, 1993). Devido a estes fatores, o *Cebus apella* vem despertando interesse científico nos estudos que compreendem aspectos neurocognitivos (Barros, 1998; Barros *et al.*, 2002; Santos, 2003) .

Nos primatas, as capacidades cognitivas e as relações corticais e sub-corticais cerebrais são mais comparáveis aos humanos do que em qualquer

outra espécie animal (Macphail, 1996; King *et al.*, 1988). A validade das extrapolações de resultados obtidos a partir de PNH para humanos depende basicamente de dois fatores: do paralelismo entre o padrão neurofisiológico e comportamental entre as espécies, bem como a utilização de paradigmas comuns nas situações de teste. A aplicação de paradigmas comuns na clínica humana e no campo experimental utilizando tais animais como modelo foi inicialmente empregada em estudos sobre a visão e a memória humana (Roberts, 1996). Estudos sobre as bases anatômicas da memória operacional realizados com primatas e humanos têm identificado o papel crítico do córtex pré-frontal e de estruturas a ele associadas, como a formação hipocampal, a porção basal do córtex parietal, núcleos da rafe, locus ceruleus, substância negra e núcleos basais de Meynert (Izquierdo *et al.*, 1998b; Artiges *et al.*, 2000). A integridade do córtex pré-frontal é fundamental para a manutenção das representações ao longo do tempo. Lesões nesta região em macacos provocam o comprometimento do desempenho em tarefas de memória operacional (Baddeley, 1992; Preuss & Goldman-Rakic, 1991; McDowell *et al.*, 1997). Além da participação do cerebelo que também parece estar envolvido no processamento da memória operacional, atuando na catalogação de eventos temporais com sequência ordenada (Pascual-Leone *et al.*, 1993).

1.4. Anatomia hipocampal de primatas não humanos

A formação hipocampal é uma região do cérebro associada a processos cognitivos e emocionais (Papez, 1937; Vogt, 1992; Kesner *et al.*, 2004) e um dos primeiros alvos de deterioração em doenças neurodegenerativas (Uno & Sapolski, 1975). Seu nome deriva do formato curvado semelhante a um cavalo marinho (do grego, *hippo*= cavalo e *kamos*= marinho). Em humanos, esta estrutura filogeneticamente primitiva, está localizada na porção medial do lobo temporal estendendo-se por todo o comprimento do assoalho do corno inferior (ou temporal) do ventrículo lateral (Brodal, 1979). Por outro lado, em roedores, a região hipocampal apresenta proporção e localização diferentes, emergindo dos núcleos septais até o córtex temporal (Shepherd, 1998). Contudo, em

animais como os primatas não humanos, tais particularidades anatômicas são semelhantes às visualizadas em humanos (Lavenex & Amaral, 2007) (Figura 2).

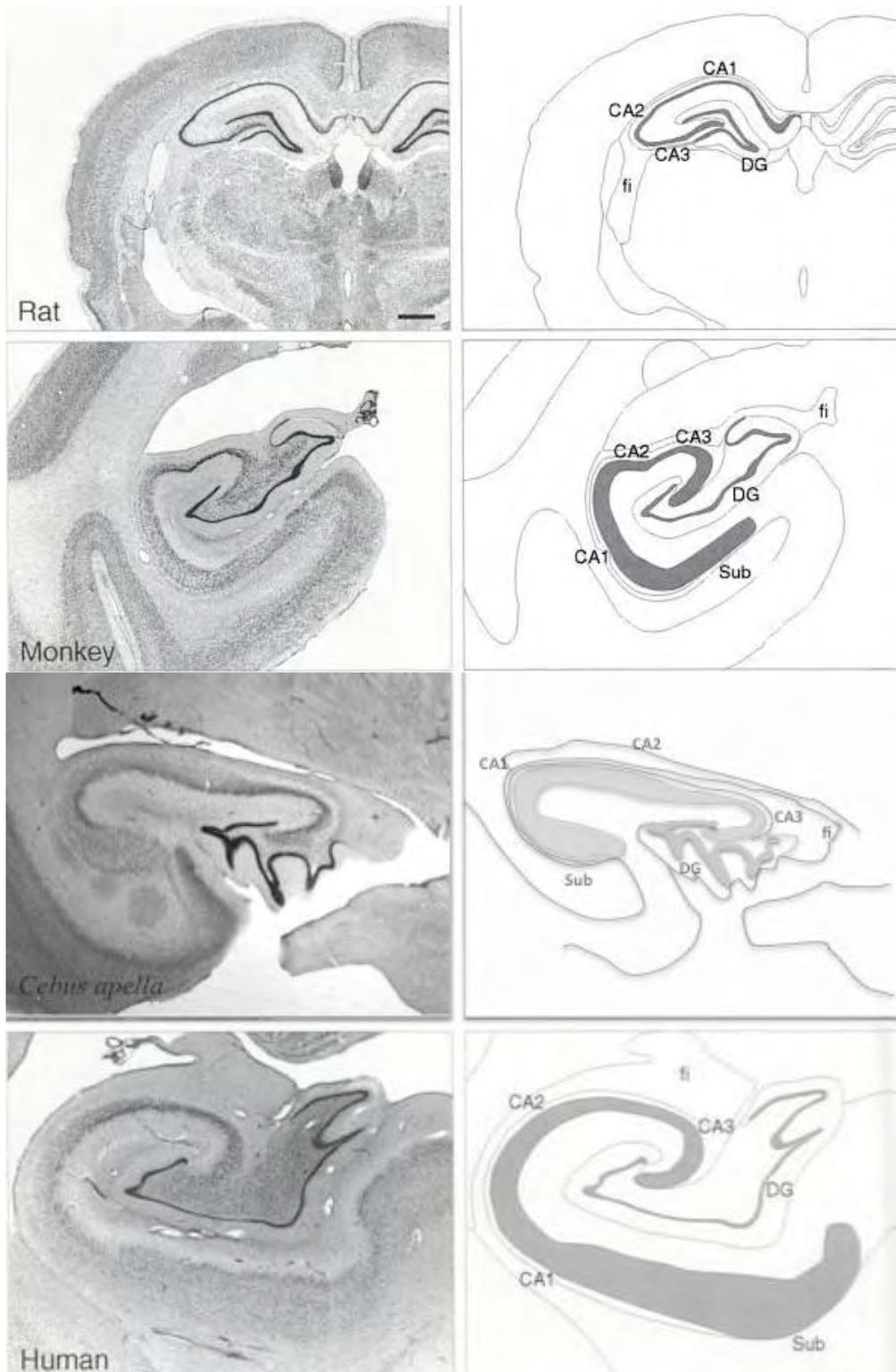


Figura 2. Cortes histológicos corados com violeta de cresila caracterizando áreas hipocâmpais em diferentes espécies. (figura adaptada do livro *Hippocampus*, autor: Andersen *et al.*, 2007). Barra = 5µm

De maneira geral, a formação hipocampal é constituída por duas regiões interligadas: o giro dentado e o hipocampo (ou Corno de Ammon). Ambos possuem uma organização interna trilaminada, composta por dois tipos de células principais: as células granulares do giro dentado e as células piramidais do Corno de Ammon (CA), divididas nos setores de CA1, CA2, CA3 e CA4 ou Hilo (Lorent de Nó, 1934). A organização trilaminar do giro dentado corresponde à camada polimórfica, camada granular ou *stratum granulosum* e camada molecular ou *stratum moleculare*. As três camadas do CA correspondem aos *stratum: oriens, pyramidale* e *radiatum* (Amaral, 1989). Os corpos celulares dos neurônios piramidais do CA e granulares do giro dentado encontram-se no estrato piramidal e granuloso, respectivamente. Os dendritos apicais dos neurônios granulares do giro dentado constituem o *stratum moleculare* e seus dendritos basais o estrato polimórfico. Os dendritos apicais dos neurônios piramidais do CA constituem o *stratum radiatum* e seus dendritos basais, o *stratum oriens*. Outros estratos da formação hipocampal são o *stratum lucidum*, formado pelos dendritos apicais proximais dos neurônios piramidais de CA3, e o *stratum lacunosum-moleculare*, formado pelos dendritos apicais distais dos neurônios granulares do giro dentado.

Cada uma dessas regiões mantém um padrão organizado de conexões intrínsecas e extrínsecas, sendo que a principal aferência para a formação hipocampal origina-se no córtex entorrinal. As fibras que deixam o córtex entorrinal em direção à formação hipocampal constituem um feixe de axônios chamado de via perfurante. Esses axônios estabelecem sinapses com os dendritos das células granulares, cujos corpos celulares estão densamente empilhados na camada granular do giro dentado. As células granulares projetam axônios através das fibras musgosas que fazem sinapses com as células piramidais da região de CA3. Os neurônios de CA3 projetam axônios que se ramificam. Um ramo deixa a formação hipocampal pela via fímbria-fórnix e o outro, chamado de colateral de Schaffer, forma sinapses com as células piramidais de CA1, que por sua vez, emitem fibras para as camadas profundas do córtex entorrinal. O circuito córtex entorrinal - giro dentado - CA, é tradicionalmente denominado como via tri-sináptica. As sinapses deste circuito são predominantemente excitatórias e a inibição se faz principalmente através

de interneurônios localizados no hilo e na região do CA. Os principais neurotransmissores envolvidos neste circuito são o glutamato (excitatório) e o ácido gama-aminobutírico (GABA – inibitório) (Witter *et al.*, 1989; Andersen *et al.*, 2007).

Todo o conhecimento anatômico, neuroquímico e funcional do hipocampo advém, em grande parte, do emprego de inúmeras técnicas histológicas. Dentre as técnicas hoje disponíveis, a imuno-histoquímica destaca-se devido a sua alta reprodutibilidade, rapidez e sensibilidade. A partir dessa técnica é possível caracterizar subpopulações celulares baseando-se nas propriedades químicas que estas expressam. Dentre as diversas subpopulações de células caracterizadas podemos destacar as que contêm proteínas ligantes de cálcio, como a parvalbumina (PV), a calretinina e a calbindina.

A proteína ligante de cálcio PV é visualizada em uma determinada subpopulação de neurônios que supostamente co-expressam o neurotransmissor GABA (Celio, 1986).

No hipocampo, esta proteína está presente em interneurônios com propriedades inibitórias. Apesar do papel fisiológico desses neurônios ainda não estar elucidado, evidências sugerem que essas células desempenham papel fundamental no controle de potenciais de ação, regulação da transmissão e plasticidade sináptica, geração e estimulação em larga escala da atividade oscilatória síncrona (Andersen *et al.*, 2007).

Técnicas histológicas são ferramentas consolidadas na análise qualitativa do sistema nervoso, porém importantes metodologias quantitativas vêm corroborando para uma melhor caracterização das estruturas cerebrais. A estereologia, ciência ainda em franco desenvolvimento, introduzida na medicina no início da década de 90, desponta como um método quantitativo eficaz.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral:

Vislumbramos a possibilidade de mapear o perfil da utilização de PNM, por meio de publicações científicas das últimas quatro décadas em bases de dados especializadas. Além de focarmos o estudo de uma espécie de PNM (*Cebus apella*), com o intuito de subsidiar conhecimento sobre a estrutura hipocampal deste animal requisitado pela neurociência.

2.2 Objetivos Específicos:

- Caracterizar quantitativamente as diferentes regiões da formação hipocampal (CA1; CA2; CA3; CA4 ou Hilo; Subiculum) do primata *Cebus apella* pela técnica de Nissl, utilizando o método estereológico.

- Caracterizar a distribuição e densidade das células parvalbumina positivas nas diversas camadas (*stratum oriens; pyramidale; radiatum, lacunosum-moleculare; granular; hilo - camada polimórfica*) e regiões da formação hipocampal (CA1; CA2; CA3; CA4 ou Hilo) do primata *Cebus apella*, bem como a morfologia estrutural destas células em cada uma das camadas e regiões .

- Analisar o perfil das publicações que utilizaram primatas do novo mundo em pesquisa biomédica nas últimas quatro décadas.

- Identificar as principais áreas de pesquisa que mais requisitam estes animais.

- Analisar a contribuição de diversos países, em especial o Brasil dentre aqueles que mais utilizaram os Primatas do Novo Mundo nas pesquisas biomédicas durante as últimas quatro décadas.

*MATERIALS &
METHODS*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Três animais da espécie *Cebus apella* (macaco-prego) (Figura 3), dois machos e uma fêmea, obtidos da colônia de primatas não humanos do Instituto Evandro Chagas (IEC) – Centro Nacional de Primatas (CENP), localizado no município de Ananindeua-Pará, na rodovia BR 316, Km 7, em um fragmento de mata primária (Floresta Amazônica) de 25 hectares, foram usados em nosso estudo. A média de peso e idade foi de $2,6 \pm 0.4$ kg e $4,4 \pm 0.8$ anos, respectivamente. Intervenções e eutanásias foram realizadas no Instituto Evandro Chagas (IEC), Centro Nacional de Primatas (CENP) - e todos os procedimentos seguiram protocolos aprovados em comitês institucionais, da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP (CEP-0379/07), do Comitê de ética em pesquisa Animal (CEPAN-039-2005), bem como autorização do IBAMA (ofício nº 221-2005).



Figura 3. *Cebus apella*.

Os animais foram submetidos à quarentena para garantir isenção de agentes patogênicos. Os primatas foram alojados em gaiolas individuais, mantidos em temperatura de $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com ciclo claro/escuro de 12h,

alimentados com alto teor de proteína da dieta comercial *Monkey Chow* (LabDiet High Protein Diet Monkey Jumbo; Megazoo), juntamente com suplementos diários de leite, ovos, frutas e água *ad libitum*.

3.2 Perfusão

Os animais foram profundamente anestesiados com mistura de cetamina (30mgKg) e xilazina (0,8mgKg) e perfundidos por via transcardíaca com solução salina heparinizada 0.9% por 10min, seguida de solução formaldeído 4% (pH 7.2-7.4) por 30min. Os parâmetros cardíacos foram monitorados e a manutenção da anestesia foi realizada com isofluorano (Figura 4).



Figura 4. Monitoramento cardíaco durante procedimento de intervenção cirúrgica.

A caixa craniana foi fixada e a musculatura da região frontal e da base da cabeça do animal foi dissecada medianamente. Removeu-se a musculatura, que envolve o crânio em sua totalidade. Com um disco de corte elétrico, realizou-se um incisão transversal no osso frontal, seguindo simetricamente no sentido lateral, nos lados direito e esquerdo, cerca de 1 cm acima da formação auricular. O corte foi contínuo até a parte posterior da cabeça do animal. Em seguida, foi introduzida uma espátula na incisão do osso frontal e alavancou-se a calota óssea. Com um bisturi, procedemos na liberação do encéfalo e das

meninges. A pós-fixação do tecido foi realizada por imersão em solução de formaldeído 4% (Figura 5).



Figura 5. Imagem do encéfalo de *Cebus apella*, após procedimento de perfusão. (A) visão ventral, (B) visão lateral. As setas brancas indicam a localização do lobo temporal, onde o hipocampo está situado. Barra = 4cm

3.3 Processamento Histológico

Devido ao método estereológico se basear em uma amostra randômica e sistemática, o processamento do tecido cerebral seguiu um padrão previamente descrito (Weibel & Gomez 1962). Resumidamente, o hemisfério cerebral de interesse foi incorporado em ágar 4% e posteriormente cortado no plano coronal (Figura 6) em blocos de 2 mm de espessura com um ponto de partida aleatório (Figura 7). Logo após, cada bloco (2mm) foi selecionado randomicamente, e secções seriadas (70 micrômetros) foram devidamente obtidas a partir de um vibrátomo (Leica). As fatias cerebrais foram então armazenadas para a posterior realização das técnicas de Nissl e imunohistoquímica.

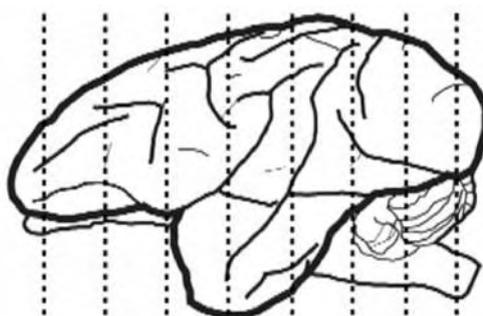


Figura 6. Imagem esquemática do plano de corte em 2mm dos blocos amostrais do cérebro do *Cebus apella*.



Figura 7. Sequência dos blocos de 2mm, após processamento do encéfalo. O hipocampo está assinalado pelos círculos vermelhos.

3.4 Histoquímica

3.4.1 Método de Nissl

O método de Nissl consiste na coloração dos corpúsculos de Nissl por um corante básico denominado violeta de cresila. Esses corpúsculos são formados basicamente por retículo endoplasmático rugoso e estão presentes no citoplasma dos neurônios. Essa coloração nos permite avaliar a citoarquitetura tecidual.

As secções coronais (70µm) foram coradas com violeta de cresila. Esse procedimento consiste na hidratação das fatias em banhos sucessivos de etanol em escala decrescente e na imersão em solução de violeta de cresila (0.5%) diluída em acetato tamponado (pH 3.8). Imediatamente após, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, clarificados com xileno e cobertos com lamínula utilizando um meio de montagem (Entellam® MERK). Posteriormente as secções foram utilizadas para a estimativa do número total de neurônios nas regiões hipocâmpais CA1, CA2, CA3, hilo e subiculum, da espécie *Cebus apella*, pelo método de contagem estereológica.

3.4.2 Imuno-histoquímica

Para o estudo dos neurônios que expressam a proteína ligante de cálcio PV, utilizou-se anticorpo primário anti-Parvalbumina (policlonal, anti-camundongo, 1:7000, Swant).

Fatias do cérebro de primatas *Cebus apella*, foram lavadas (3x10min) com tampão fosfato salina (PBS) (pH=7,4) e posteriormente tratadas com H₂O₂ a 0,5% durante 60 minutos, lavadas novamente (3x10min) em PBS (pH 7.4), pré incubadas em soro normal de cabra (NGS) 3% em PBS com Triton X-100 0,5% por 60 minutos e então incubadas em anticorpo primário durante 48h a 4°C. As secções foram novamente lavadas (3x10min) em PBS com Triton X-100 0,3% (PBS-X), incubadas à temperatura ambiente com imunoglobulina G (IgG) biotinizada (VECTOR) anti-camundongo (1:200 em NGS 1%) por uma hora e meia, lavados com PBS-X (3x10min), incubadas em complexo avidina-biotina peroxidase (ABC) por uma hora e meia e reveladas com diaminobenzidina (DAB) 0,075% em H₂O₂ 0,002%.

As secções foram finalmente lavadas em PBS (pH 7,4) (3x10min). As fatias coradas foram montadas em lâminas silanizadas, desidratadas e cobertas com lamínulas no meio de montagem (Entellam® MERK), para posterior reconstrução e quantificação estereológica dos neurônios imunomarcados. A estimativa neuronal dos neurônios parvalbumina positivos foi realizada nas diferentes camadas (*oriens*, *pyramidale*, *lacunosum moleculare*, *radiatum*) e regiões (CA1, CA2, CA3 e CA4 ou Hilo) do hipocampo do primata *Cebus apella*.

3.5 Estereologia

A análise microscópica é uma ferramenta analítica poderosa para se descrever formas normais e anormais de tecidos biológicos, particularmente se for possível gerar números a partir de secções histológicas. Entretanto é necessário considerar que se um microscópio é utilizado para analisar a estrutura de interesse é inevitável, na maioria dos experimentos, que apenas uma pequena fração da área de interesse original seja de fato analisada em detalhe (Howard & Reed, 2005). Esta é uma questão chave em neuromorfologia assim como em muitas outras áreas onde é necessária a distinção entre condições fisiológicas e patológicas (Schmitz & Hof, 2005).

A estereologia é um ramo da ciência que lida com a reconstrução das características tridimensionais de objetos a partir de reconstrução serial de

estruturas bidimensionais (Weibel, 1989). Os parâmetros de amostragem são definidos a priori em estereologia, de forma que não é necessária a coleta de dados de tamanho, forma e orientação espacial da área a ser investigada (West, 1996). Os números estimados a partir da amostragem podem ser expressos em valores relativos ou absolutos indicando volume, número, conectividade, distribuição espacial e tamanho das estruturas biológicas sem conhecimento prévio da geometria das células ou do tecido a ser investigado (Glaser & Glaser, 2000; Schmitz & Hof, 2005).

A regra geral em análises qualitativas é encontrar palavras descritivas tais como menores, maiores, mais largas, menos frequentes, mais frequentes, diferente, similar, ausência ou presença que em geral são suficientes para os propósitos investigados (Schmitz & Hof, 2005). Entretanto, outros estudos que geram análises quantitativas e expressam valores numéricos sobre contagem de células, densidades, áreas e volumes, apresentam resultados controversos que se devem a suposições prévias acerca do tecido e da geometria das células e suas distribuições no plano da secção (Geinisman *et al.*, 1995; Mayhew & Gundersen, 1996). Muitos dos estudos quantitativos introduzem vieses de amostragem e ou erro sistemático cuja magnitude é impossível de ser apreciada, qualquer que seja a resolução da análise: óptica (Mayhew & Gundersen, 1996; Gardella *et al.* 2003; Mandarin de Lacerda, 2003; Howard & Reed, 2005), confocal (Peterson, 1999; Kubinova & Janacek, 2001) ou eletrônica (Fiala & Harris, 2001; Nyengaard & Gundersen, 2006).

Em estereologia baseada em design este problema é resolvido utilizando caixas de contagem virtuais aplicadas a uma série de secções dentro das regiões de interesse. É possível seccionar opticamente as secções histológicas usando objetivas de grande abertura numérica para produzir imagens de baixa profundidade de foco. O plano de foco (ou a secção óptica) pode ser deslocado, através de distâncias conhecidas da espessura da secção, produzindo planos de foco contínuos, através dos quais a contagem é feita de acordo com regras de contagem do dissector escolhido. Na prática o que acontece é a contagem de objetos novos que entram em foco (ou saem de foco) enquanto descemos ou subimos dentro da caixa de contagem de volume conhecido.

Um dos mais recentes avanços envolvendo o dissector óptico é a combinação do dissector óptico com o fracionador de amostras. Esta combinação conhecida na literatura como fracionador óptico (West *et al.*, 1991), tem numerosas vantagens práticas, sendo a principal o fato de não ser afetado pela retração do tecido, e não requerer definições rigorosas de fronteiras estruturais que podem ser feitas em objetivas de baixo aumento. O fracionador óptico envolve contagem de objetos, com sondas de dissectores ópticos, em uma amostra sistemática uniforme que constitui uma fração conhecida do volume da região sendo analisada. Na prática isto é feito através da amostragem sistemática de uma fração conhecida da espessura da secção, de uma fração conhecida da área seccional e de uma fração conhecida do número de secções que incluem a região de interesse.

Cada análise estereológica começa com o delineamento das fronteiras da região de interesse em uma série de secções randômicas e sistemáticas (Howard & Reed, 2005). As fronteiras das regiões de interesse podem ser facilmente reconhecidas em secções coradas com Nissl, e os limites do hipocampo podem ser traçados em imagens no vídeo, em um computador acoplado ao microscópio, utilizando objetivas de baixo aumento.

Para analisar a área delimitada em baixo aumento é necessário mudar para uma objetiva de grande aumento com elevada abertura numérica e reduzida profundidade de foco (Schmitz & Hof, 2005).

É inviável contar todas as células dentro da região de interesse, para contornar esse dilema e obter estimativas confiáveis, que se aproximem do real, a partir de uma diminuta fração amostral, é necessária a utilização de coleta sistemática e aleatória de dados incluindo a terceira dimensão. Essa alternativa assegura a estimativa adequada do número total de células, dentro da área de interesse, a partir do número de células detectadas em cada caixa de contagem da amostra e da probabilidade amostral (Schmitz & Hof, 2005).

Entretanto, mesmo com todos esses cuidados, a incerteza nas estimativas, ainda permanece e decorre de outras fontes de erro possíveis, como aqueles introduzidos pelos pré-supostos do operador acerca dos grupos experimentais, pelas alterações induzidas nas secções pelo processamento do

tecido, pela ambiguidade no reconhecimento de áreas ou dos objetos de interesse. Para minimizar esse tipo de incerteza é necessário executar uma série de procedimentos controle como ensaios duplos cegos, escolhas adequadas no tipo de processamento tecidual incluindo fixação, plano de corte, imuno-histoquímicas seletivas, garantindo que a cada passo, todas as regiões da estrutura tenham a mesma probabilidade de contribuir para a amostra, reduzindo a ambiguidade no reconhecimento dos limites da região assim como dos objetos de contagem.

3.5.1 Análise estereológica

As análises estereológicas empregadas neste trabalho foram realizadas por meio do software Stereo investigator (MicrobrightField, Williston, VT, USA, versão 8.21) instalado a um computador, integrado a um microscópio óptico Zeiss (Imager M1) com objetiva de 5x e 63x, e platina motorizada para os eixos X, Y e Z.

Uma marcação referencial para cada lâmina foi cuidadosamente instituída (Figura 8) e com a utilização do programa, as áreas investigas do hipocampo foram devidamente delimitadas em objetiva de 5X, posteriormente, grades (*grid*) foram sobrepostas nas regiões de interesse e em seguida, uma caixa de contagem (*optical dissector*), foi gerada em cada um dos pontos da intersecção do *grid* com o plano onde se situa a região delimitada. A delimitação das regiões de interesse (CA1, CA2, CA3, hilo e subiculum) (Figura 9) foi guiada pelo atlas estereotáxico do PNH *Cebus apella* (Manocha, 1968).



Figura 8. Marcação do ponto referencial na lâmina histológica.

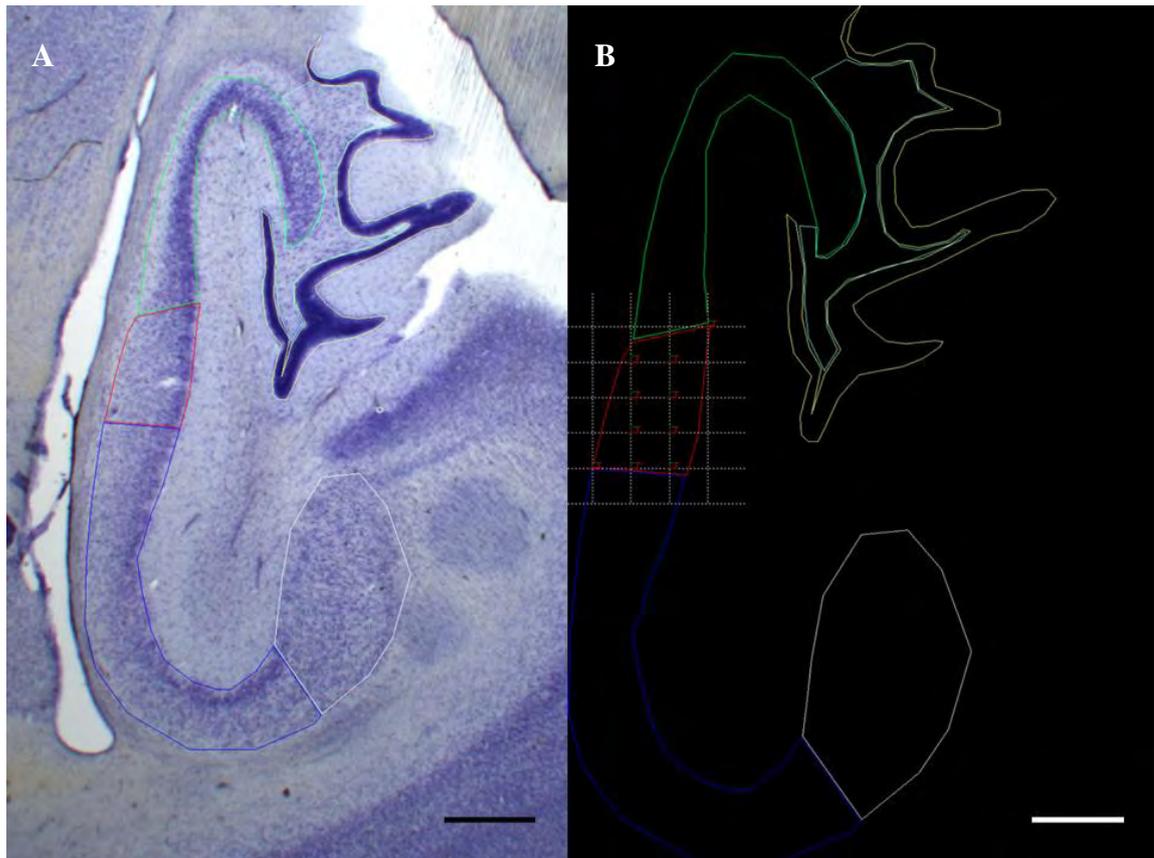


Figura 9. (A) Delimitação das áreas investigadas na fatia do hipocampo do animal *Cebus apella* corado pela técnica de Nissl. (B) Representação esquemática da grade de contagem sobreposta pelo software stereoinvestigador na região CA2 do hipocampo. Barra = 1mm

Os parâmetros dimensionais da grade, caixa de contagem e espessura foram definidos previamente pelo pesquisador.

Para a estimativa dos parâmetros levou-se em consideração os seguintes fatores: 1) intervalo do número de secções investigadas (*section sampling fraction – ssf*); 2) fração de amostragem da área de cada secção (*area sampling fraction- asf*); e 3) média da altura da espessura da amostra (*thickness sampling fraction – tsf*), (Howard & Reed, 2005) (Figura 10).

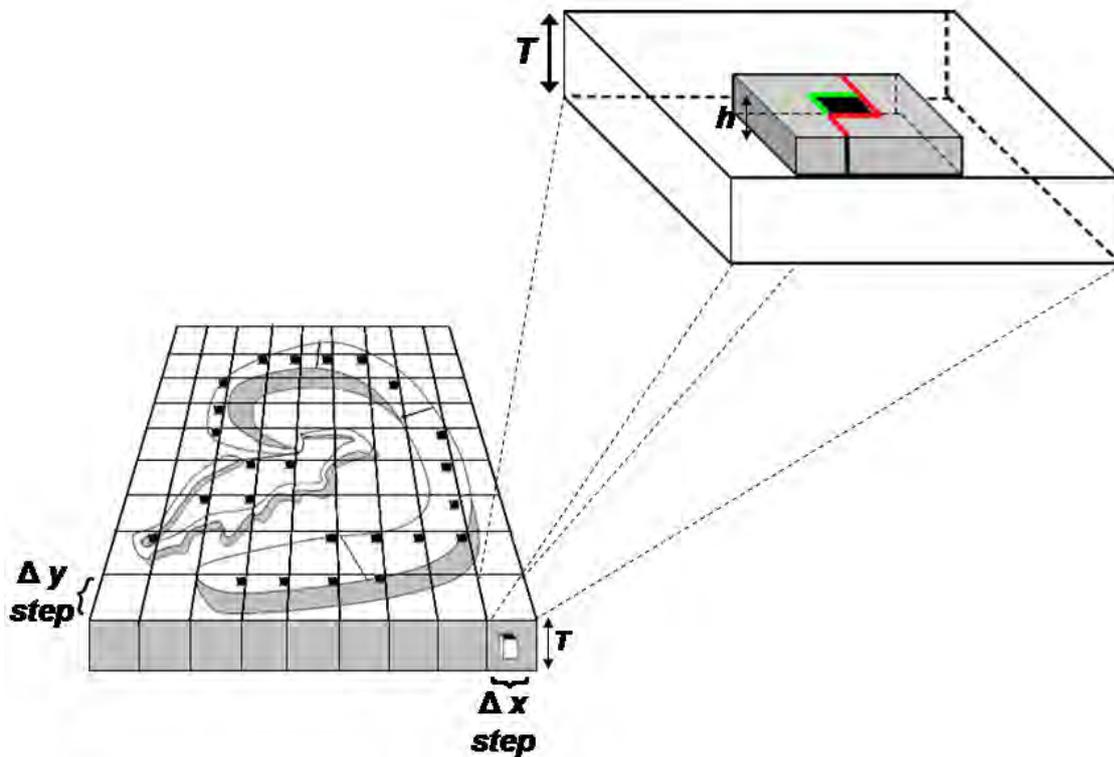


Figura 10. Representação esquemática das áreas amostrais delimitadas para contagem. A área amostral (asf) e espessura da amostra (tsf) também estão ilustradas. Quadrados pretos: Caixa de contagem (*optical dissector*); h: Altura da espessura da fração amostral; T: Espessura da amostra após o processamento do tecido; Δ x: Comprimento do passo na direção X; Δ y: Comprimento do passo na direção Y. (Figura modificada de West *et al.*, 1991 e Keuker *et al.*, 2003.

A estimativa do número total de células (N) foi calculada a partir da equação:

$$N = \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{tsf} \times \Sigma q^-$$

Onde Σq^- é a somatória de todas as células contadas em todos os dissectores da região investigada.

Em cada *optical dissector* foram marcados os objetos de interesse, neste caso, neurônios. No entanto, esta contagem seguiu um procedimento padrão, garantindo que o mesmo objeto de interesse fosse contado uma única vez.

Os neurônios foram contados, apenas quando os mesmos estavam dentro da delimitação de contagem, e fora de uma zona de guarda. A zona de guarda foi estipulada, somente após as extremidades da espessura do corte (fundo e topo) terem sido cautelosamente marcadas pelos observadores, permitindo assim conhecer o volume em toda a extensão da área de contagem. A zona de guarda foi equivalente a 10% da espessura do corte, 5% do fundo e 5% do topo de cada secção.

Outro requisito para aperfeiçoar o método de contagem foi o estabelecimento de linhas delimitadoras do *optical dissector*. Os objetos de contagem (neurônios) que estavam dentro da área delimitada e que faziam intersecção com as linhas de inclusão, de cor verde, foram selecionados. Porém, aqueles neurônios que tocam as linhas de exclusão, de cor vermelha, não foram considerados para a contagem (Figura 11).

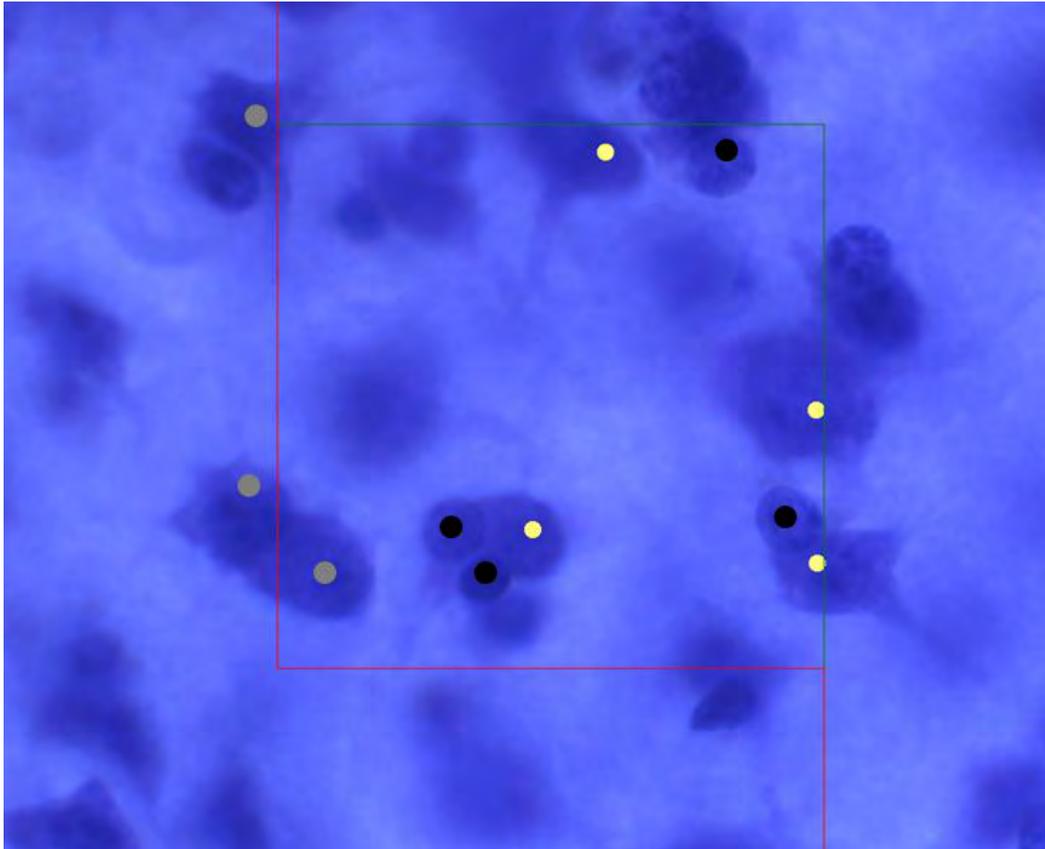


Figura 11: Caixa de contagem caracterizando as linhas de inclusão (verdes) e exclusão (vermelhas), Os círculos amarelos indicam os neurônios aptos para contagem. Circulo cinza, neurônios inviáveis a contagem por tocarem na linha de exclusão. Os círculos de cor preta caracterizam células que não foram contabilizadas no estudo (células da glia).

A partir da informação do número de pontos (neurônios), e das demais variáveis, o programa estimou o número esperado de neurônios, em toda extensão da região desejada.

Em nosso protocolo, um cuidado especial foi tomado para evitar contagens repetidas do mesmo objeto nos diferentes planos de foco. Para isso repetia-se o procedimento de focalização, visualizando os diferentes planos ao longo do eixo Z, mais de uma vez em cada caixa de contagem, particularmente quando co-existiam muitas células no *optical disector*. O corpo celular foi utilizado como unidade de contagem e o foco escolhido para posicionar o marcador foi o nucléolo do neurônio.

Os neurônios parvalbumina positivos seguiram o mesmo critério de contagem, contudo, além das áreas regiões de CA1, CA2, CA3, Hilo e

Subiculum verificamos também a quantidade de neurônios nas diferentes camadas do hipocampo (*stratum oriens; pyramidale; radiatum, lacunosum-moleculare*; granular; hilo - camada polimórfica) do primata *Cebus apella*.

3.5.2 Diferenciação de neurônios e glias

Embora seja geralmente fácil distinguir neurônios de células gliais, essa diferença entre neurônios pequenos e células da glia foi desafiadora. Os seguintes critérios foram utilizados como característica para os neurônios: nucléolo em localização central, um núcleo distintivo, citoplasma visível, presença de processos dendríticos, e maior tamanho do corpo celular. As células da glia foram identificadas pelos seguintes critérios: grupos de heterocromatina, citoplasma escasso, e menor tamanho do corpo celular (Selemon *et al.*, 1999; Lidow & Song, 2001; Andersen *et al.*, 2004; Jelsing *et al.*, 2006).

3.5.3 Estimativa do Volume

A estimativa do volume da formação hipocampal, foi calculada segundo o princípio de Cavalieri (West *et al.*, 1990). O volume estimado foi baseado na contagem de pontos, dado por:

$$Vol_{ref} = t * a(x, y - step) * \frac{1}{ssf} * \Sigma P$$

3.5.4 Análise estatística

O coeficiente de erro (CE) estimado para o número de células das camadas hipocampais foi calculado a partir da fórmula:

$$CE(N) = \sqrt{CE^2 + CE^2(t)^2}$$

A variabilidade interindividual foi estimada pela soma das medidas de variações intra e inter-seccional (CV).

*3.6. Reconstrução digital de Neurônios parvalbumina positivos do hipocampo de primatas não humanos da espécie *Cebus apella*.*

Neurônios parvalbumina positivos foram reconstruídos digitalmente por meio de um microscópio Zeiss (Imager M1) equipado com objetiva de 63x de aumento acoplado a um computador dotado do software de reconstrução digital NeuroLucida (MicroBrightField, Colchester, VT, USA), versão 8.21.

Vinte células PV positivas foram selecionadas e reconstruídas a partir do primeiro corte aleatório do hipocampo unilateral da espécie *Cebus apella* em cada área do CA (CA1, CA2, CA3), hilo (incluindo a camada polimórfica), totalizando um “n” amostral de 80 células. (Figura 12)



Figura 12. Figura representativa dos neurônios digitalmente reconstruídos nas regiões do hipocampo. Barra = 800 μ m

Para a análise morfológica, os neurônios imuno-marcados nas áreas de interesse foram selecionados com base nos seguintes critérios: (1) intensa marcação de árvores dendríticas e corpo celular; (2) ausência de neurônios nas proximidades. (Figura 13)



Figura 13. Neurônio PV positivo considerado apto (a ausência de células próximas, e a intensa marcação dendrítica) para a reconstrução e caracterização morfológica. Barra = 10 μ m

A localização dos neurônios no hipocampo do PNH *Cebus apella*, foi determinada de acordo com Manocho, 1968. A região de CA2, foi cuidadosamente avaliada, seguindo o padrão de delimitação anatômica de Guerreiro-Diniz e colaboradores (2010). Os parâmetros analisados, a partir da reconstrução digital das células foram perímetro e área do soma celular, e quanto à arborização dendrítica obtivemos a área total, volume total, número de bifurcações, comprimento total, número de terminais e comprimento médio.

Com o intuito de obtermos maiores detalhes sobre a distribuição espacial e a extensão dos dendritos em relação ao soma dos neurônios, o padrão de ramificação foi avaliado pelo método de Sholl (Sholl, 1953). Este método, consiste na sobreposição de círculos concêntricos com distância pré-determinada, tendo o centro do soma como a origem das esferas (Figura 14). Para o nosso estudo a distância entre os círculos concêntricos foi de 10 μ m.

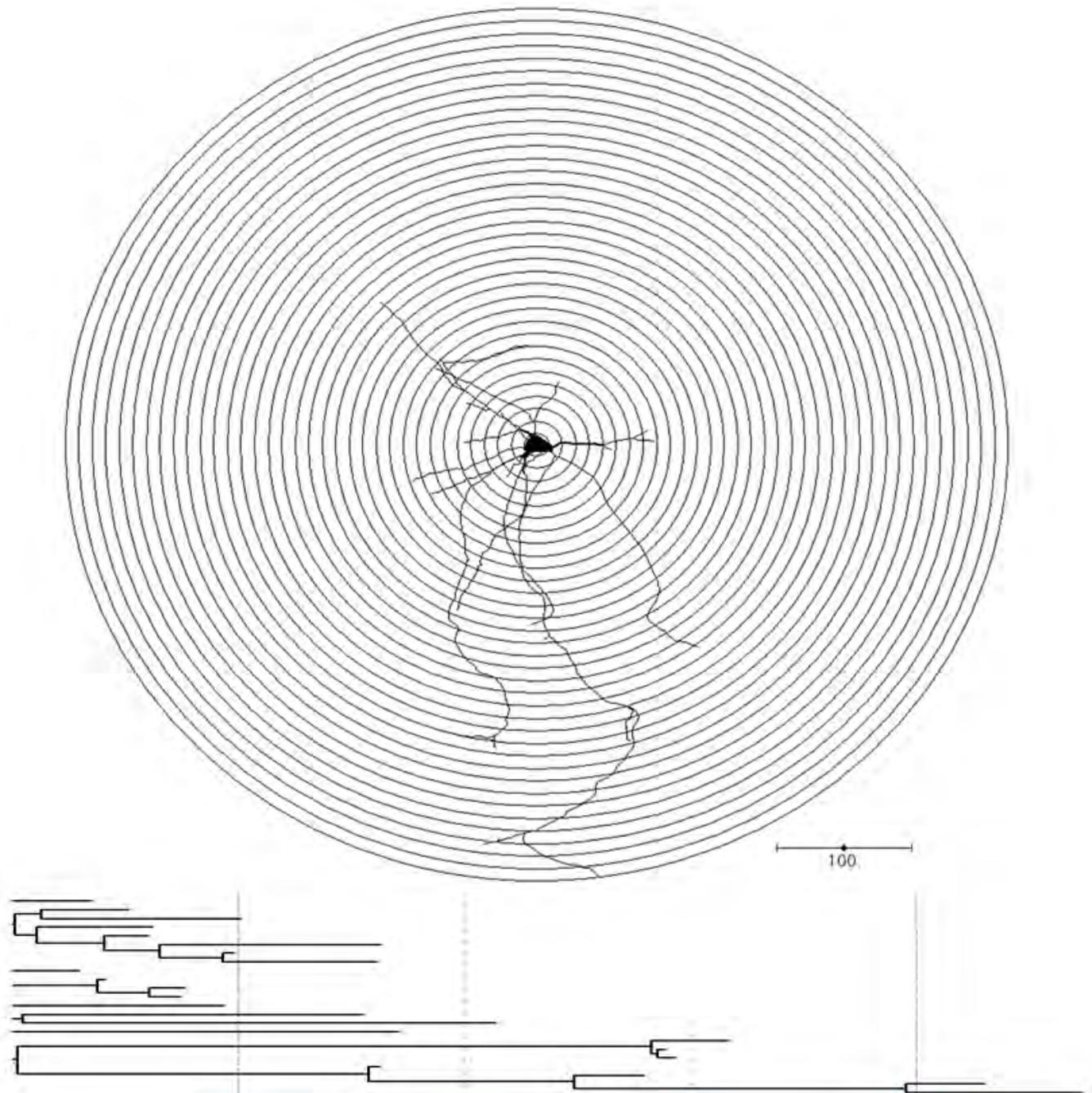


Figura 14. Célula reconstruída digitalmente e analisada pelo software Neurolucida por meio de círculos concêntricos de Sholl ($10\mu\text{m}$). Apresentação do dendrograma caracterizando a extensão dos dendritos. Barra = $100\mu\text{m}$.

O número de intersecções de cada dendrito com os círculos foram contados, e as referidas médias e erros padrões calculados e tabulados, possibilitando uma representação gráfica da distância e complexidade dos dendritos para com o soma.

Os valores obtidos em cada neurônio foram calculados pelo software “Neuroexplorer”. Em seguida, as análises estatísticas foram realizadas com o software Graph Pad Prisma, versão 5.

Para as comparações intergrupos, os dados foram submetidos ao teste de *Kolmogorov-Smirnov* e posteriormente à ANOVA seguido do teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como representativo de uma diferença significativa.

REPULSED

4. Resultados

Durante a realização desse trabalho, nós sentimos a necessidade de compreendermos como o trabalho que se iniciava se inseria no contexto das publicações científicas dedicadas ao estudo dos primatas do novo mundo. Assim, empreendemos um estudo sobre o uso dos Primatas do Novo Mundo na pesquisa biomédica. Os primatas não humanos desempenham papel fundamental na pesquisa biomédica, e isto não se deve apenas às suas similaridades anatômicas, fisiológicas, bioquímicas, e comportamentais com os humanos, mas também, por sua afinidade filogenética. Com o intuito de investigar a utilização experimental de primatas do novo mundo na pesquisa biomédica durante as últimas quatro décadas, um estudo quantitativo tendo como fonte de dados as bases literárias (ex: Medline, Pubmed) foi realizado. A pesquisa foi realizada para diversos gêneros de primatas do Novo mundo criados em cativeiro no Centro Nacional de Primatas no Brasil. O número de artigos publicado, o país de origem do estudo e as áreas científicas para as quais estes animais mais foram utilizados foram quantificados. Os resultados obtidos sugerem que o Brasil é um dos principais países em gerar conhecimento com base em modelos de primatas do novo mundo para a medicina translacional. Como se pode observar, os achados mostraram-se muito interessantes e, acreditando que eles pudessem auxiliar outros investigadores da área, nós decidimos publicá-lo em revista especializada (*American Journal of Primatology* 71: 1-7, 2010). A cópia do artigo encontra-se anexada ao final desta Tese.

4.1 Características anatômicas do Hipocampo do Cebus apella

4.1.1 Parâmetros estereológicos.

Os parâmetros estereológicos utilizados neste estudo foram estimados para evitar a contagem excessiva e assegurar a precisão do método. A Tabela 3 retrata os parâmetros utilizados durante o presente estudo. Ao comparar os dados da Tabela 3 com os parâmetros utilizados durante o primeiro ensaio estereológico (Tabela 2) percebe-se uma grande diferença no número de

pontos contados (neurônios) e de “*optical dissectors*” (caixas de contagem) em cada área investigada. Ao utilizarmos os parâmetros referentes à Tabela 3, houve uma redução no número de pontos contados de 24.9 %, 22.6%, 19%, 15.5% e 24.9% e 71.8%, 85.5%, 36.6%, 57.4% e 40.1% nos dissectores visitados nos subcampos CA1, CA2, CA3, Hilo e Subiculum, respectivamente. Apesar desta grande redução, o número total de neurônios oscilou em apenas 1.0%, 0.7%, 0.9%, 0.7% e 10% nos subcampos de CA1, CA2, CA3, Hilo e Subiculum, respectivamente. Isto demonstra que ao usarmos os parâmetros apresentados na Tabela 3, aperfeiçoamos o tempo de análise, porém sem afetar significativamente o resultado final.

Tabela 2. Parâmetros estereológicos empregados durante o primeiro ensaio estereológico. Σ = somatória, ssf = secções seriais da amostra, ΣQ = Pontos totais de contagem

Região	ssf	Área-Grid μm^2	Σ secções	Área (counting frame) μm^2	Σ dissectores	ΣQ - NEURÔNIOS
CA1	1:5	350 x 350	17	60 x 60	352	1123
CA2	1:5	350 x 350	17	60 x 60	200	830
CA3	1:5	350 x 350	17	60 x 60	311	1191
Hilo	1:5	350 x 350	21	60 x 60	307	425
Subiculum	1:5	350 x 350	21	60 x 60	306	897

Tabela 3. Parâmetros empregados utilizados no presente estudo. Σ = somatória, ssf = secções seriais da amostra, ΣQ = Pontos totais de contagem.

Região	ssf	Área-Grid μm^2	Σ secções	Área (counting frame) μm^2	Σ dissectores	ΣQ - NEURÔNIOS
CA1	1:5	500 x 500	17	35 x 35	253	254
CA2	1:5	500 x 500	17	35 x 35	171	158
CA3	1:5	500 x 500	17	35 x 35	115	207
Hilo	1:5	500 x 500	21	35 x 35	115	66
Subiculum	1:5	500 x 500	21	35 x 35	123	224

4.1.2 Número total de neurônios nas diferentes subcamadas da formação hipocampal.

Sob análise microscópica, todas as subdivisões citoarquitetônicas clássicas do hipocampo foram claramente identificadas no macaco *Cebus apella*. A estimativa do número de neurônios nas subcamadas da formação hipocampal de três *Cebus apella* utilizados no estudo, corrobora com dados prévios da literatura (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2010). Os dados obtidos em nosso estudo estão representados na Tabela 4 com o respectivo coeficiente de erro (CE). O CE para as estimativas neuronais foi 0.05 ± 0.02 e o coeficiente de variância (CV) dos animais foi de 0.02 ± 0.01 .

Tabela 4. Número total de neurônios no hipocampo do primata *Cebus apella* (hipocampo unilateral – valores em milhões).

CE= Coeficiente de erro.

CV= Coeficiente de variância.

Animal	CA1	CA2	CA3	Hilo	Subiculum
1	0,550 (0,03)	0,232 (0,03)	0,477 (0,02)	0,140 (0,04)	0,305 (0,03)
2	0,527 (0,06)	0,157 (0,08)	0,435 (0,07)	0,103 (0,12)	0,297 (0,05)
3	0,523 (0,07)	0,143 (0,07)	0,429 (0,06)	0,121 (0,08)	0,308 (0,07)
Média N (CE)	0,533 (0,05)	0,177 (0,06)	0,447 (0,05)	0,121 (0,08)	0,303 (0,05)
Densidade Neuronal (nº cél./mm³)	0,03	0,03	0,48	0,01	0,02
CV	(0,02)	(0,05)	(0,03)	(0,01)	(0,01)

4.1.3 Volume (Cavalieri)

A média do volume total do cérebro, tronco cerebral e cerebelo nos animais estudados foi $32060 \text{ mm}^3 (\pm 1615)$. O volume do complexo hipocampal (giro dentado + formação hipocampal) corresponde a 0,37% ($119,1 \text{ mm}^3 \pm 1,17$) de todo hemisfério. A média do volume de CA1, CA2, CA3, Hilo e Subiculum é $15,84 \text{ mm}^3 (\pm 2,88)$, $5,38 \text{ mm}^3 (\pm 1,52)$, $9,90 \text{ mm}^3 (\pm 0,7)$, $11,03 \text{ mm}^3 (\pm 1,19)$ e $11,52 \text{ mm}^3 (\pm 1,17)$, respectivamente. A área de CA1 corresponde a 37,6%, CA2 a 12,8%, CA3 a 23,5% e Hilo a 26,1% do volume total do complexo hipocampal.

4.1.4 Número total de neurônios parvalbumina positivos nas diferentes regiões e subcamadas da formação hipocampal.

A estimativa do número de células PV positivas nas diferentes regiões e subcamadas da formação hipocampal de três *Cebus apella* utilizados no estudo está representado na Tabela 5 e 6 , com o respectivo CE 0.05 ± 0.02 . O CV dos animais foi de 0.02 ± 0.01 .

Tabela 5. Número total de neurônios parvalbumina positivos no hipocampo do primata *Cebus apella* (hipocampo unilateral – valores em milhões).

CE= Coeficiente de erro.

CV= Coeficiente de variância.

Animal	CA1	CA2	CA3	Hilo	Subiculum
1	21382,3	21587,4	19451,3	4793,14	22265,3
2	24231,1	18842,6	20238,7	5513,1	20719,2
3	23879,6	18754,8	20847,3	4578,2	21984,7
Média	23164,3	19728,3	20179,1	4961,4	21656,4
Densidade Neuronal (nº cél./mm³)	1462,3	3666,9	2038,2	449,8	1879,8
N (CE)	0,13	0,11	0,12	0,19	0,1

Tabela 6. Número total de neurônios parvalbumina positivos nas subcamadas do hipocampo do primata *Cebus apella* (hipocampo unilateral – valores em milhões).
 CE= Coeficiente de erro.
 CV= Coeficiente de variância

Animal	<i>Oriens</i>	<i>Pyramidale</i>	<i>Radiatum</i>	<i>Lacunosum-Moleculare</i>	Granular	Hilo – Camada polimórfica
1	13181,1	33209,6	1027,1	513,5	3594,8	4793,1
2	15539,2	39355,1	1236,5	623,3	4010,1	5513,1
3	12234,9	35485,7	1047,5	678,4	4291,2	5239,4
Média	13651,7	36016,8	1103,7	605,08	3965,4	5181,8
Desnsidade Neuronal (nº cél./mm³)	1383,1	1470,6	44,3	132,2	692,0	469,7
N(CE)	(0,11)	(0,07)	(0,41)	(0,58)	(0,22)	(0,19)

4.2 Análise espacial das células parvalbumina positivas na formação hipocampal.

4.2.1 Giro dentado

A partir da análise microscópica, foi possível localizar células PV positivas em cada uma das três camadas (granular, *lacunosum-moleculare*, polimórfica) do giro dentado. Entretanto, células localizadas no *stratum lacunosum-moleculare* foram extremamente raras. A maioria dos neurônios observados está presente nas camadas polimórfica-hilo e granular, estes dados corroboram com os resultados (quantitativos) obtidos por meio da análise estereológica (tabela 6). O corpo neuronal das células da camada polimórfica são em sua grande maioria de formato fusiforme e esférico, os dendritos destas células tendem a tangenciar a camada granular, raramente se projetando para o interior da mesma (Figura 15, 16). Porém, quando as poucas projeções se direcionam para o interior da camada granular estas atravessam a camada em direção ao *stratum lacunosum-moleculare* (Figura 31).

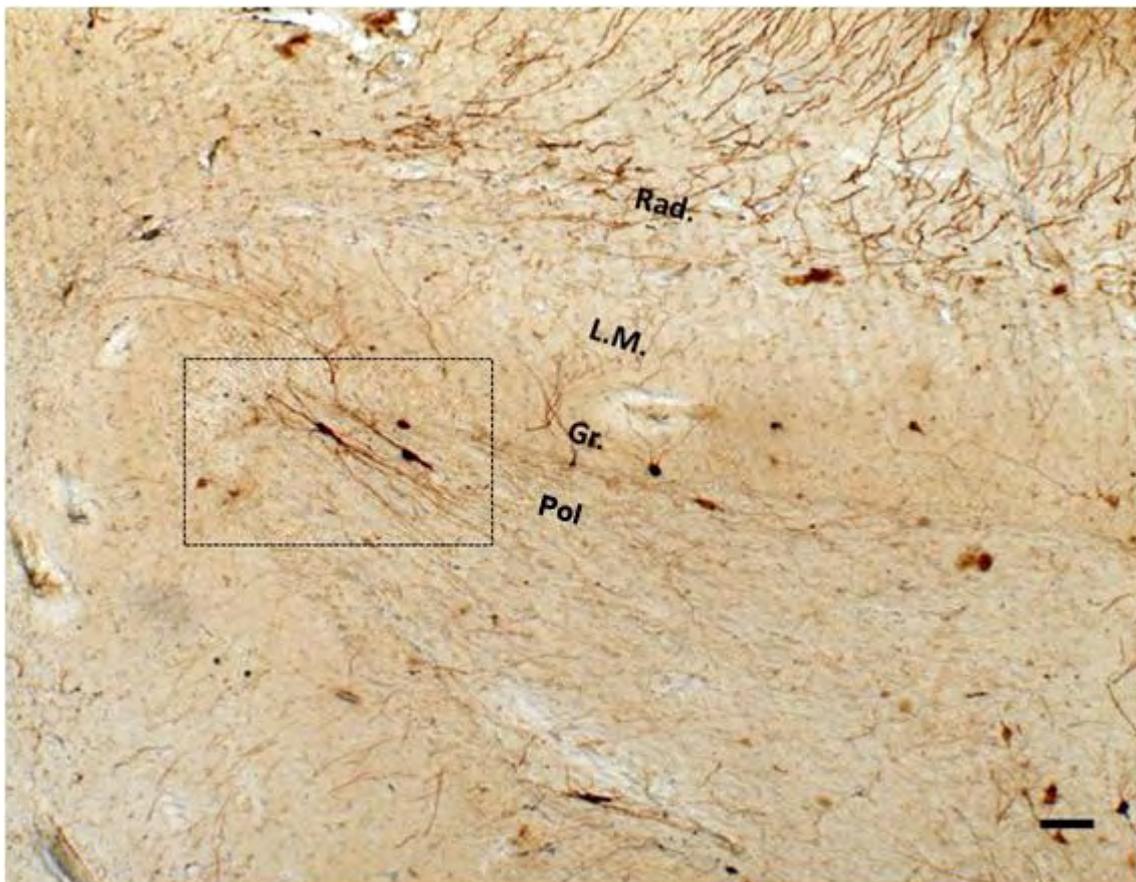


Figura 15. Neurônios PV positivos na camada polimórfica do giro dentado. Rad = *Radiatum*; L-M = *Lacunosum-Moleculare*; Gr. = Granular; Pol.= Polimórfica. Barra = 50µm

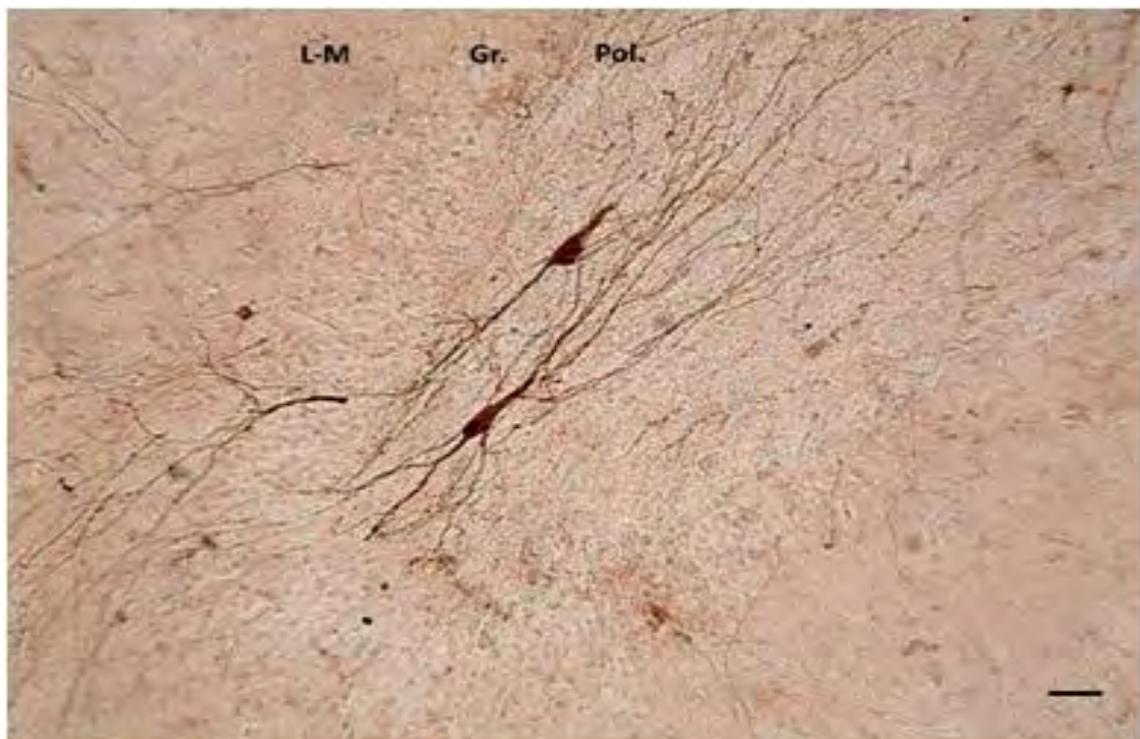


Figura 16. Neurônios PV positivo na camada polimórfica do giro dentado da (figura 15 em maior aumento). Note que a maioria das projeções dendríticas se mantém restritas à camada polimórfica. Barra = 5 μ m.

As células presentes no *stratum* granular possuem, quase que exclusivamente, corpo celular esférico e ramificações que se direcionam para as camadas mais internas do *stratum lacunosum-moleculare* (Figura 17).



Figura 17. Neurônio PV positivo de soma esférico localizado na camada granular do giro dentado. Observe os dendritos se projetando para o interior do *stratum lacunosum-moleculare*. Barra = 5 μ m

As poucas células presentes no *lacunosum-moleculare* apresentam uma forma esférica e seus dendritos estendem-se por toda a extensão da camada em direção ao *stratum radiatum*. Raras foram às observações de dendritos adentrando a camada granular. A grande maioria das células localizadas nessa camada se situa no primeiro e segundo terço do *stratum lacunosum-moleculare* (figura 18 e 19).



Figura 18. Neurônio de soma esférico situado no primeiro terço interno do *stratum lacunosum-moleculare* (Seta vermelha). Barra = 50 μ m

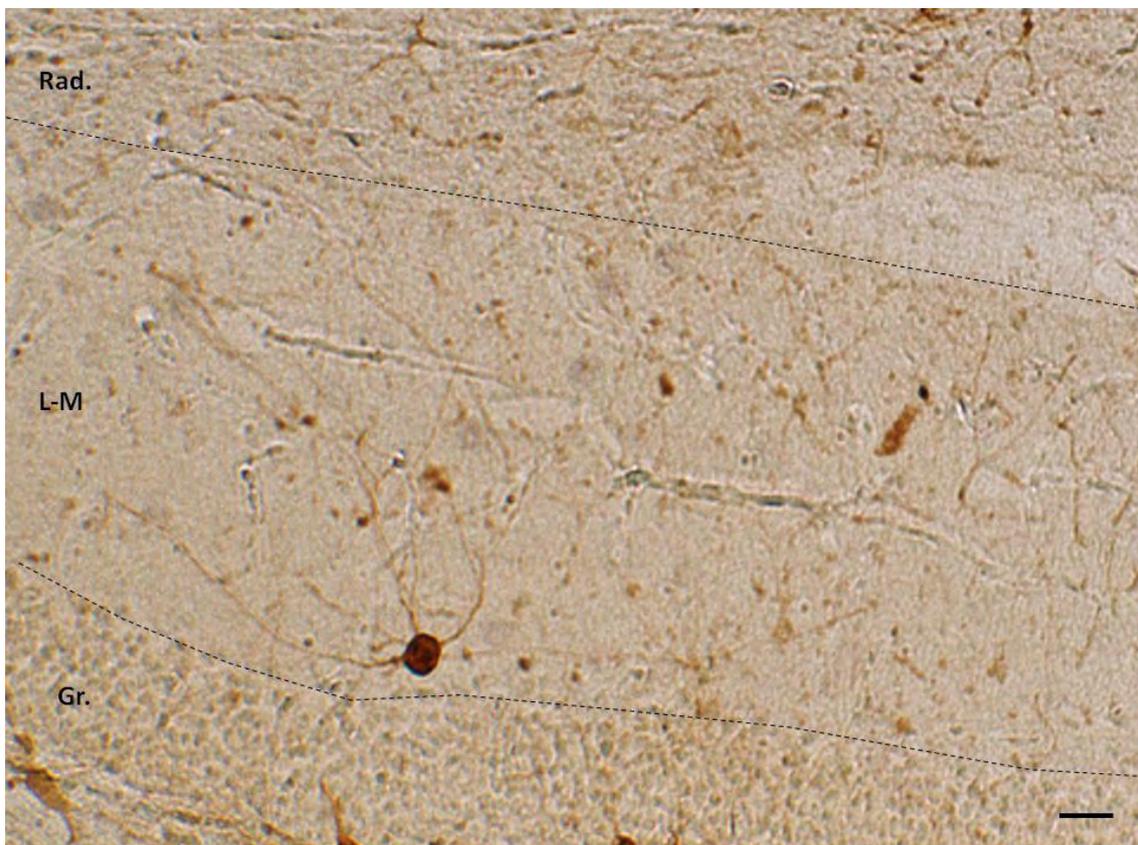


Figura 19. Neurônio da figura 18 em maior aumento. Observe as ramificações atravessando toda a extensão do *stratum lacunosum-moleculare*, direcionando-se ao *stratum radiatum*. Rad = *Radiatum*; L-M = *Lacunosum-Moleculare*; Gr = Granular. Barra = 5 μ m.

4.2.2 Hipocampo

O maior grau de imunoreatividade e fibras foram localizados na camada piramidal e *stratum oriens* do hipocampo. Por outro lado, células foram infreqüentemente observadas no *stratum radiatum*, ratificando os dados quantitativos da análise estereológica. Com relação à imunoreatividade, nota-se uma elevada densidade de células PV positivas em CA2 quando comparadas a outras áreas do hipocampo. As ramificações originárias dos neurônios localizados nesta camada se projetam através do *stratum radiatum* e terminam na parte mais externa do *stratum lacunosum-moleculare* (Figura 20 e 21).

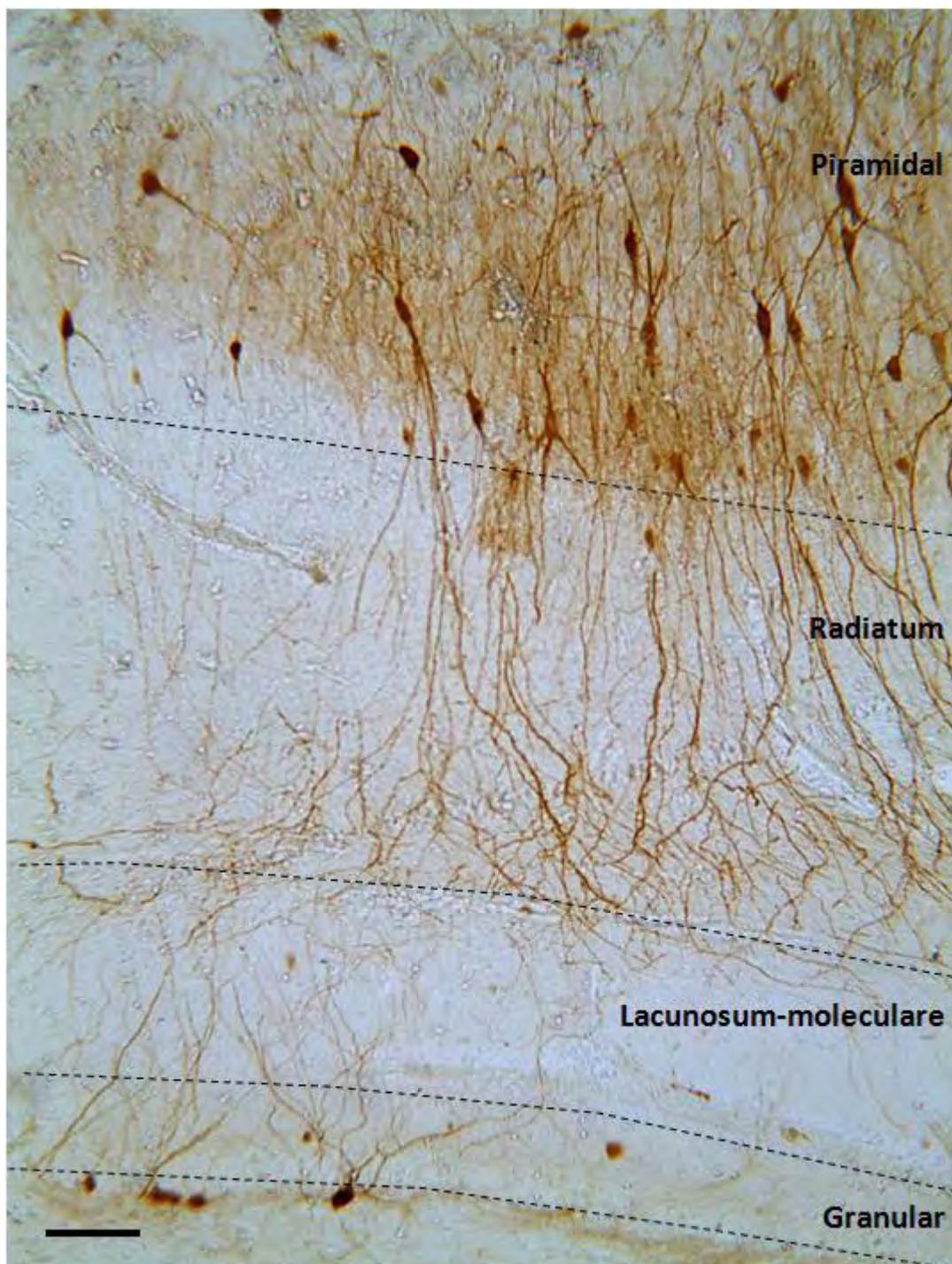


Figura 20. Imagem da região de CA2. Note a presença predominante de células na camada piramidal e polimórfica. Os neurônios de CA2 direcionam suas projeções através do *stratum radiatum* em direção ao *lacunosum-moleculare*. Neurônios localizados na camada polimórfica possuem suas ramificações em direção às ramificações das células de CA2. Barra = 10µm

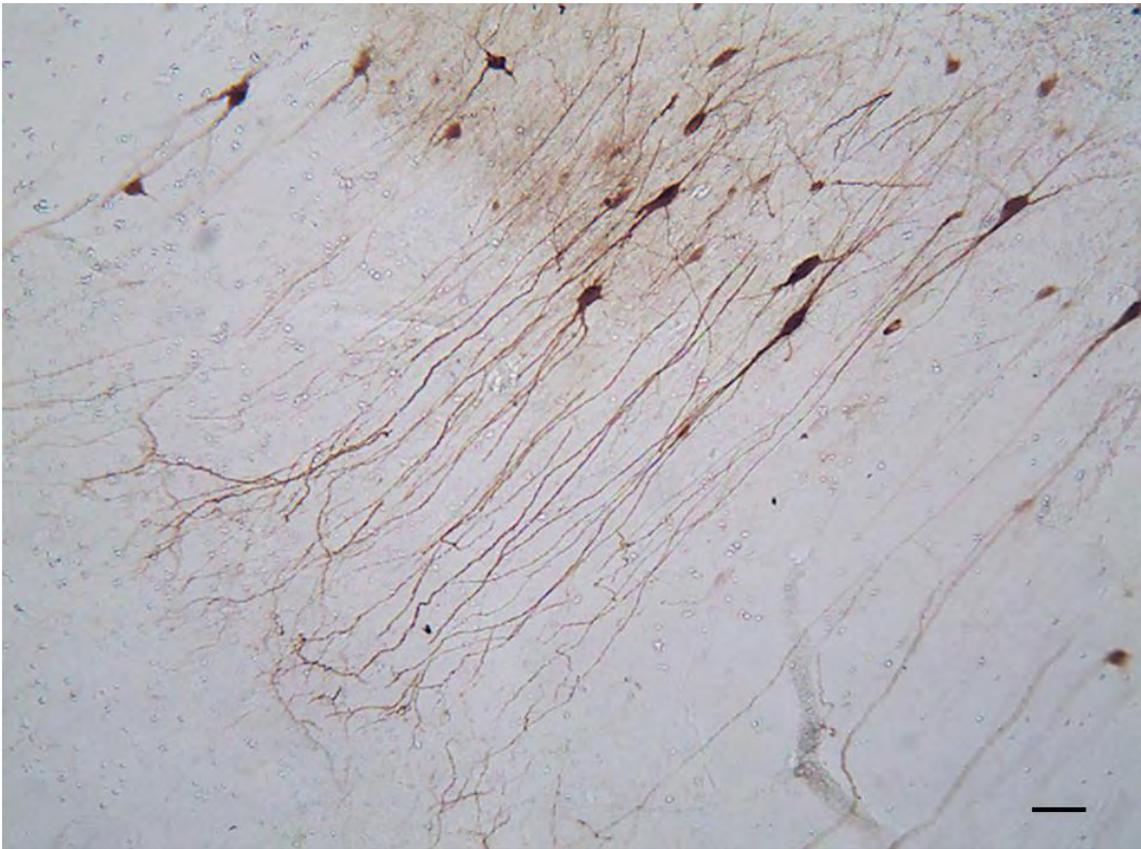


Figura 21. Região intensamente marcada em CA2. Note os dendritos que se projetam a longas distâncias, terminando no *stratum lacunosum-moleculare*. Barra = 10 μ m

Outras células também emitem projeções ao *stratum oriens*, como pode ser visualizado na figura 22. Quanto ao seu corpo celular, as células de CA2 possuem diferentes padrões de forma.

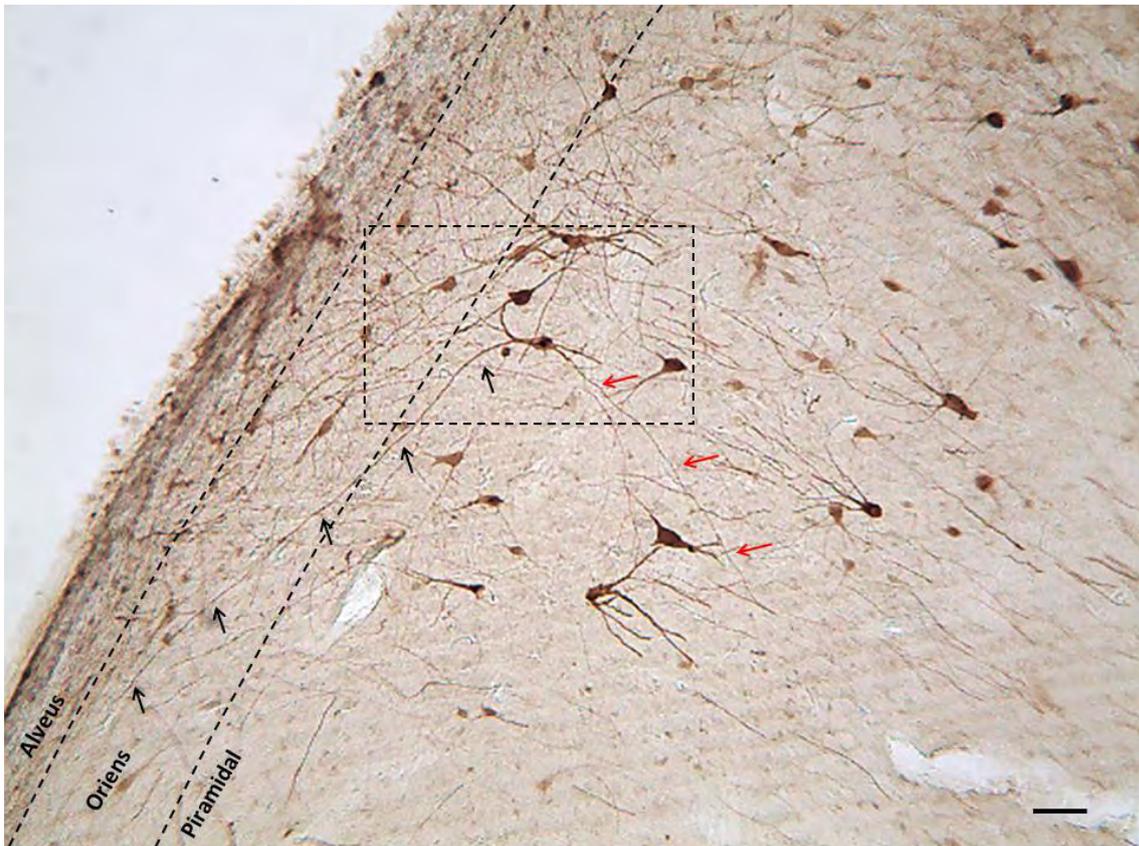


Figura 22. Célula de CA2 emitindo projeções tanto para o *stratum lacunosum* como para o *stratum oriens*. Setas preta = projeção em direção ao *stratum oriens*; Seta vermelha = projeções em direção ao *stratum lacunosum-moleculare*. Barra = 10 μ m