



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS
RELACIONADAS ÀS TENEURINAS NO SISTEMA NERVOSO
CENTRAL DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS (*Sapajus spp*) E
RATOS (*Rattus norvegicus*)

KELLY REGINA TORRES DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área
de concentração *Biologia Celular Estrutural e
Funcional*.

Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti

**BOTUCATU – SP
2016**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS
RELACIONADAS ÀS TENEURINAS NO SISTEMA NERVOSO
CENTRAL DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS (*Sapajus spp*) E
RATOS (*Rattus norvegicus*)

KELLY REGINA TORRES DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área
de concentração *Biologia Celular Estrutural e
Funcional*.

Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti

**BOTUCATU – SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Kelly Regina Torres da.

Estudo da distribuição das proteínas relacionadas às teneurinas no sistema nervoso central (SNC) de primatas não-humanos (*Sapajus spp*) e ratos (*Rattus norvegicus*) / Kelly Regina Torres da Silva. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Cláudio Aparecido Casatti
Capes: 20100000

1. Macaco. 2. Primatas não humanos. 3. Ratos. 4. Sistema nervoso central. 5. Proteínas - Pesquisa.

Palavras-chave: Macaco; Rato; Sistema nervoso central; Teneurina.

KELLY REGINA TORRES DA SILVA

ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS RELACIONADAS ÀS TENEURINAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS (*Sapajus spp*) E RATOS(*Rattus norvegicus*)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP/Araçatuba.

Prof. Dr. Edilson Ervolino

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP/Araçatuba.

Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim

Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru- USP/Bauru.

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências- UNESP/Botucatu.

Profa. Dra. Camila Contin Diniz de Almeida Francia

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências- UNESP/Botucatu.

Dedicatória

À Deus

Dedico toda a minha vida, pois sem Ele nada existiria.

Aos meus pais

Dedico esta conquista aos meus queridos pais Osmar Torres, exemplo de força e coragem, e a minha mãe Sônia Ap. J. Torres, exemplo de fé e doçura, que sempre estiveram ao meu lado oferecendo o melhor da vida: o amor. Em especial dedico a minha mãezinha que infelizmente não está mais conosco, mas tenho certeza que todas as conquistas que tive e terei sempre foram e serão regadas das suas preciosas orações e interseções que me fazem caminhar ao lado de Deus. Por meio dela Deus me concedeu a vida que foi expressa pelo meu primeiro suspiro e através do seu último suspiro Deus me permitiu vê-la partir. Saudades para sempre.

Ao meu esposo

Ao meu amado esposo André V. da Silva presente nas etapas mais importantes da minha vida, sejam elas repletas de alegria ou tristeza. Sem seu carinho, amor, ajuda e paciência sei que não conseguiria alcançar muitos dos nossos sonhos. Obrigada por cada momento de nossas vidas.

Agradecimentos

À minha família que é o alicerce de tudo. Em especial ao meu irmão Cléber, cunhada Maria Lucia e sobrinha Isabella por todo apoio, incentivo e amor e a minha sogra Terezinha e meu sogro Sebastião por todo carinho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por ter proporcionado o auxílio à pesquisa (2012/03067-6) e a bolsa de estudo (2012/08833-9) para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

Ao meu orientador prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti. Palavras não serão suficientes para agradecer toda a ajuda e aprendizado oferecido. Por meio de seus conhecimentos consegui completar o ciclo acadêmico da graduação ao doutorado e através da sua compreensão e apoio pude enfrentar os obstáculos que apareceram no decorrer destas etapas. Muito obrigada.

Aos professores e funcionários do departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, em especial prof. Dr. Edílson Ervolino, prof. Dr. José Américo de Oliveira e a profa. Dra. Alaíde Gonçalves e aos técnicos Eliseide, Sandra, André e Arnaldo pela sincera amizade que se iniciou desde a minha graduação. Destaco meus agradecimentos ao prof. Dr. José Américo de Oliveira pela contribuição neste trabalho e pelo zelo e esforço para manter o núcleo de procriação de macacos-prego da referida Faculdade.

Ao professor do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) prof. Dr. José de Anchieta e a professora da Faculdade de Medicina de Botucatu profa. Dra. Patrícia Reis por sempre nos oferecerem ajuda através de sugestões e uso do laboratório.

Aos funcionários do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) em especial ao David Muller da secretaria de pós-graduação obrigada pela eficiência e prestatividade e a Shelly Carvalho do Centro de Microscopia Eletrônica muito obrigada pelo auxílio durante o uso do Confocal.

À Casa de Estudantes mantida pela Associação Botucatuense de Cultura Japonesa zelosamente administrada pela Sra. Raquel e Juliana. Muito obrigada pela acolhida durante as estadias necessárias para o desenvolvimento deste trabalho e pelas agradáveis companhias dos moradores: Laura, Stéphaní, Juliana, Vanessa e Catarine.

Aos alunos de graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba que me acompanharam nesta trajetória Luan, Hayumi, Isabella e Camila e aos amigos de pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu Gestter e Nicole muito obrigada pela força, companheirismo e pelos bons momentos de convivência.

Epígrafe

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade”.

Santo Agostinho

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

Marthín Luther King

RESUMO

Estudo da distribuição das proteínas relacionadas às teneurinas no sistema nervoso central de primatas não-humanos (*Sapajus spp*) e ratos (*Rattus norvegicus*). Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

As teneurinas (TENs) representam uma família de proteínas transmembrana preservada entre as espécies, presente principalmente no sistema nervoso central (SNC). Nos vertebrados essa família é composta por quatro homólogos, denominados de teneurina-1 a -4 (Ten-1, Ten-2, Ten-3 e Ten-4). Estudos mostraram a presença das TENs em vias motoras, olfatórias e visuais, especialmente durante a neurogênese em aves e roedores. A análise da distribuição neuroanatômica das TENs em primatas poderia ampliar o conhecimento destas proteínas, contribuindo com achados funcionais recentes. Portanto, os propósitos deste estudo foram: 1) avaliar a distribuição dos neurônios que exibem imunorreatividade relacionada às TENs-“like immunoreactivity” (TENs-LI), em particular Ten-2-LI, Ten-3-LI e Ten-4-LI no SNC do primata não-humano (*Sapajus spp*); 2) realizar análise comparativa dos sítios de distribuição da proteína Ten-3 entre o SNC de primatas (*Sapajus spp*) e roedores (*Rattus norvegicus*), uma vez que a Ten-3 apresentou distribuição significativa no SNC de primatas; 3) correlacionar a distribuição das TENs com seus ligantes endógenos denominados de latrofilinas (LPHNs-1, 2 e 3) em áreas do SNC de primatas. Para isso, cortes coronais do SNC de macacos (n=3) e de ratos (n=4) foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica e analisados em microscopia de luz ou confocal. Os resultados demonstraram a distribuição de neurônios e fibras nervosas exibindo TENs-LI em todo o neuroeixo de primatas. Neurônios exibindo Ten-2-LI estiveram principalmente no tronco encefálico, como notado nos núcleos facial, oculomotor e coclear. Neurônios exibindo Ten-4-LI foram evidentes no tronco encefálico como núcleo de Edinger-Westphal, núcleo oculomotor e núcleos vestibulares; entretanto, a distribuição de fibras Ten-4-LI foi significativa em alguns tratos do tronco encefálico, tais como no trato solitário e trato espinal do nervo trigêmeo. A distribuição dos neurônios e fibras nervosas Ten-3-LI foram difusamente distribuídas ao longo do SNC, sendo que esta imunomarcagem se assemelhou a neuropeptídios secretores nos neurônios e fibras nervosas presentes nos núcleos hipotalâmicos, tais como no núcleo paraventricular e supra-óptico. Os resultados para Ten-3-LI em ratos foram em sua maioria correspondentes aos verificados em primata embora sendo neste último mais abrangente. A correlação da distribuição entre LPHNs e TENs em territórios do SNC de primatas evidenciou que a LPHN-1 e Ten-3-LI estiveram em áreas e neurônios correspondentes como núcleo paraventricular, supra-óptico e medula espinal. Estes resultados demonstraram que as TENs estão conservadas no SNC de primatas, apresentando imunomarcagens associadas a membrana plasmática, assim como similar a neuropeptídios secretores, sugerindo que esta família de proteínas seja capaz de exercer outras funções, além da interação intercelular. As áreas que apresentaram correlação entre TENs e LPHNs no SNC de primatas reforçam a possível interação destas proteínas como tem sido sugerido na literatura e contribui para futuras perspectivas funcionais.

Palavras-chave: Sistema Nervoso Central; Macaco; Ratos; Teneurinas.

ABSTRACT

Distribution of teneurin-related proteins in the central nervous system of non-human primates (*Sapajus spp*) and rats (*Rattus norvegicus*). Thesis (Doctoral degree) – Botucatu Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu, 2016.

Teneurins (TENs) represent a transmembrane protein family preserved along animal species, mainly in the central nervous system (CNS). This protein family is constituted by four homologues, named as teneurin 1 to 4 (Ten-1, Ten-2, Ten-3 and Ten-4). Previous studies pointed out presence of TENs in motor, olfactory and visual systems in chicken and rodents, especially during neurogenesis. The neuroanatomic distribution analysis of TENs in the primate brain could provide additional information on this protein system, as well as support functional data from recent studies. Therefore, the purposes of the present study were: 1) to evaluate the distribution of neurons exhibiting TENs-like immunoreactivity (TENs-LI), in particular, Ten-2-LI, Ten-3-LI and Ten-4-LI in the CNS of non-human primates (*Sapajus spp*); 2) to comparatively analyze the main brain regions exhibiting Ten-3-LI between primates (*Sapajus spp*) and rodents (*Rattus norvegicus*), since Ten-3-LI showed significant distribution in the CNS of primates; 3) To correlate TENs-LI neurons with latrophilins (LPHNs-1, 2 and 3), an endogenous TENs ligand, in the CNS of primates. For this purpose, coronal histological sections of the CNS of non-human primates (n=3) and rats (n=4) were submitted to immunohistochemistry techniques and analyzed under light or confocal microscopes. Neurons and nerve fibers exhibiting TENs-LI were observed in all parts of the CNS in primates. Neurons showing Ten-2-LI were present mainly in the brainstem, such as facial, oculomotor and cochlear nuclei. Neurons exhibiting Ten-4-LI were evident in the brainstem such Edinger-Westphal nucleus, oculomotor and vestibular nuclei; whereas immunoreactive nerve fibers were significant in the brainstem tracts, such as solitary and trigeminal nerve tracts. The distribution of neurons and nerve fibers exhibiting Ten-3-LI were widely distributed in the CNS and a particular immunolabeling pattern similar to a secretory neuropeptide was present in hypothalamic nuclei, especially in paraventricular and supraoptic nuclei. Ten-3-LI distribution in the rat CNS was quite similar to that in primates; however, the latter showed a more pronounced and exuberant immunolabeling. In relation to LPHNs and TENs colocalization in the CNS of primates, the main data showed LPHN-1 and Ten-3-LI colocalization in neurons from paraventricular and supraoptic nuclei as well as in the spinal cord. These data demonstrated that TENs are preserved in the CNS of non-human primates, showing immunolabeling associated with the plasmatic membrane or similar to secretory neuropeptides, suggesting that the TENs system can exert other functions besides cellular interaction among neurons. The colocalization between TENs and LPHNs in the CNS of primates reinforces the possible interaction of these proteins, as suggested in recent studies.

Keywords: central nervous system; monkeys; rats; teneurins.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ANÁLISE DO MODELO ESTRUTURAL DAS TENEURINAS (TENS).	19
FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS NEURONAIS COM IMUNORREATIVIDADE RELACIONADA À TEN-2 (TEN-2-LI) ATRAVÉS DOS ANTICORPOS COMERCIAIS R&D SYSTEMS® E SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY® NA REGIÕES HIPOCAMPAIS E CEREBELARES DO <i>SAPAJUS SPP.</i>	37
FIGURA 3. DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS NEURONAIS COM IMUNORREATIVIDADE RELACIONADA À TEN-3 (TEN-3-LI) ATRAVÉS DOS ANTICORPOS COMERCIAIS NOVUS BIOLOGICALS® E SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY® NAS REGIÕES HIPOCAMPAIS E CEREBELARES DO <i>SAPAJUS SPP.</i>	38
FIGURA 4. DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS NEURONAIS E FIBRAS COM IMUNORREATIVIDADE RELACIONADA À TEN-4 (TEN-4-LI) ATRAVÉS DOS ANTICORPOS COMERCIAIS R&D SYSTEMS® E SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY® NAS REGIÕES HIPOCAMPAIS E CEREBELARES DO <i>SAPAJUS SPP.</i>	39
FIGURA 5. ILUSTRAÇÃO DO SÍTIO DE RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS ANTI-TENS.	40
FIGURA 6. TESTE DE ADSORÇÃO DO ANTICORPO PRIMÁRIO PARA TEN-2 E TEN-3.	42
FIGURA 7. DISTRIBUIÇÃO DOS PROLONGAMENTOS (DENDRITOS/SEGMENTO INICIAL DE AXÔNIO) E CORPOS NEURONAIS COM IMUNORREATIVIDADE RELACIONADA À TEN-2 (TEN-2-LI).	43
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DA DENSIDADE DE FIBRAS COM IMUNORREATIVIDADE RELACIONADA À TEN-4 (TEN-4-LI).	44
FIGURA 9. DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS NEURONAIS COM IMUNORREATIVIDADE RELACIONADA À TEN-2 (TEN-2-LI) EM REGIÕES TELENCEFÁLICAS.	45
FIGURA 10. DISTRIBUIÇÃO DE PROLONGAMENTOS E CORPOS NEURONAIS TEN-2-LI EM ÁREAS DIENCEFÁLICAS E DO TRONCO ENCEFÁLICO DO <i>SAPAJUS SPP.</i>	46
FIGURA 11. DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS E PROLONGAMENTOS NEURONAIS TEN-2-LI NA MEDULA ESPINAL DO <i>SAPAJUS SPP.</i>	48
FIGURA 12. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS E CORPOS NEURONAIS TEN-4-LI EM REGIÕES TELENCEFÁLICAS DO PRIMATA NÃO-HUMANO <i>SAPAJUS SPP.</i>	50
FIGURA 13. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS NERVOSAS TEN-4-LI EM REGIÕES TELENCEFÁLICAS DO PRIMATA NÃO-HUMANO <i>SAPAJUS SPP.</i>	51
FIGURA 14. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS NERVOSAS E CORPOS NEURONAIS TEN-4-LI EM REGIÕES DIENCEFÁLICAS E MESENCEFÁLICAS DO PRIMATA NÃO-HUMANO <i>SAPAJUS SPP.</i>	52
FIGURA 15. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS E CORPOS NEURONAIS TEN-4-LI NO TRONCO ENCEFÁLICO DO PRIMATA NÃO-HUMANO <i>SAPAJUS SPP.</i>	54
FIGURA 16. DISTRIBUIÇÃO DE PROLONGAMENTOS E CORPOS NEURONAIS TEN-4-LI NO CEREBELO DO PRIMATA NÃO-HUMANO <i>SAPAJUS SPP.</i>	55
FIGURA 17. DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS NEURONAIS E FIBRAS TEN-4-LI NA MEDULA ESPINAL DO <i>SAPAJUS SPP.</i>	56
FIGURA 18. REPRESENTAÇÃO DA DENSIDADE DE FIBRAS NERVOSAS TEN-3-LI.	58
FIGURA 19. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS NERVOSAS TEN-3-LI EM REGIÕES TELENCEFÁLICAS DO PRIMATA NÃO-HUMANO <i>SAPAJUS SPP.</i>	60
FIGURA 20. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS E CORPOS NEURONAIS TEN-3-LI NA ZONA LATERAL DO HIPOTÁLAMO DO PRIMATA NÃO-HUMANO <i>SAPAJUS SPP.</i>	62
FIGURA 21. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS NERVOSAS E CORPOS NEURONAIS TEN-3-LI NA ZONA PERIVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO DO PRIMATA NÃO-HUMANO <i>SAPAJUS SPP.</i>	62
FIGURA 22. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS NERVOSAS E CORPOS NEURONAIS TEN-3-LI EM NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS DO PRIMATA NÃO-HUMANO <i>SAPAJUS SPP.</i>	63
FIGURA 23. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS TEN-3-LI NO TRONCO ENCEFÁLICO DO PRIMATA NÃO-HUMANO <i>SAPAJUS SPP.</i>	64
FIGURA 24. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS E CORPOS NEURONAIS TEN-3-LI NO TRONCO ENCEFÁLICO DO PRIMATA NÃO-HUMANO <i>SAPAJUS SPP.</i>	65
FIGURA 25. DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS NEURONAIS E FIBRAS TEN-3-LI NA MEDULA ESPINAL DO <i>SAPAJUS SPP.</i>	67

FIGURA 26. DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS ENDÓCRINAS TEN-3 (TEN-3-LI) NA HIPÓFISE DO <i>SAPAJUS SPP</i>	68
FIGURA 27. DESENHO ESQUEMÁTICO MOSTRANDO O ENCÉFALO DO <i>SAPAJUS SPP</i> EM CORTE SAGITAL.	70
FIGURA 28. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS NERVOSAS E CORPOS NEURONAIS TEN-3-LI NO TELENCEFALO DE RATOS..	71
FIGURA 29. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS E CORPOS NEURONAIS TEN-3-LI NO DIENCEFALO DE RATOS..	72
FIGURA 30. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS E CORPOS NEURONAIS TEN-3-LI NO TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS.....	73
FIGURA 31. DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS NEURONAIS TEN-3-LI NO TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS.	73
FIGURA 32. DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS NEURONAIS TEN-3-LI NO CEREBELO DE RATOS..	74
FIGURA 33. DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS NERVOSAS E CORPOS NEURONAIS TEN-3-LI NA MEDULA ESPINAL DE RATOS.	75
FIGURA 34. DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS ENDÓCRINAS TEN-3 (TEN-3-LI) NA HIPÓFISE DE RATOS..	75
FIGURA 35. DESENHO ESQUEMÁTICO DO ENCÉFALO DE <i>RATTUS NORVEGICUS</i> (A) E <i>SAPAJUS SPP</i> (B) EM CORTE SAGITAL MOSTRANDO OS TERRITÓRIOS QUE APRESENTAM CORPOS NEURONAIS IMUNORREATIVOS PARA TEN- 3.	76
FIGURA 36. DISTRIBUIÇÃO DA LATROFILINA-1 (LPHN-1) EM TERRITÓRIOS TELENCEFÁLICOS DO <i>SAPAJUS SPP</i>	80
FIGURA 37. DISTRIBUIÇÃO DA LATROFILINA-1 (LPHN-1) EM TERRITÓRIOS DIENCEFÁLICOS E DA MEDULA ESPINAL DO <i>SAPAJUS SPP</i>	81
FIGURA 38. DISTRIBUIÇÃO DA LATROFILINA-2 (LPHN-2) EM TERRITÓRIOS TELENCEFÁLICOS E DA MEDULA ESPINAL DO <i>SAPAJUS SPP</i> . A.....	82
FIGURA 39. COLOCALIZAÇÃO DA TEN-3 E LPHN-1 EM NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS DO <i>SAPAJUS SPP</i>	83
FIGURA 40. COLOCALIZAÇÃO DA TEN-3 E LPHN-1 NA MEDULA ESPINAL DO <i>SAPAJUS SPP</i>	83
FIGURA 41. ESQUEMA DA LOCALIZAÇÃO E DA INTERAÇÃO ENTRE TENS E LPHNs NA MEMBRANA NEURONAL.. .	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ANTICORPOS PRIMÁRIOS ANTI-TENEURINAS (TENS) E ANTI-LATROFILINAS (LPHNs) OBTIDOS COMERCIALMENTE E EMPREGADOS NO PRESENTE ESTUDO.	32
TABELA 2. DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS E PROLONGAMENTO NEURONAIS COM IMUNORREATIVIDADE RELACIONADA À TEN-2 (TEN-2-LI) NO SNC DO <i>SAPAJUS SPP</i>	49
TABELA 3. DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS NEURONAIS E FIBRAS NERVOSAS COM IMUNORREATIVIDADE RELACIONADA À TEN-4 (TEN-4-LI) NO SNC DO <i>SAPAJUS SPP</i>	57
TABELA 4. DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS NEURONAIS E FIBRAS NERVOSAS COM IMUNORREATIVIDADE RELACIONADA À TEN-3 (TEN-3-LI) NO SNC DO <i>SAPAJUS SPP</i>	69
TABELA 5. DISTRIBUIÇÃO DE CORPOS E FIBRAS NERVOSAS IMUNORREATIVAS À TEN-3 NO SNC DE <i>RATTUS NORVEGICUS</i> TRATADOS COM COLCHICINA..	77

LISTA DE ABREVIATURAS

μm - micrômetro	DMD - núcleo hipotalâmico dorso medial parte dorsal
10N - núcleo motor dorsal do nervo vago	DMV - núcleo hipotalâmico dorsomedial parte ventral
11N - núcleo acessório	DPGi - núcleo paragigantocelular dorsal
3N - núcleo oculomotor	ECu - núcleo cuneiforme externo
3V - terceiro ventrículo	ECu - núcleo cuneiforme
4(F1) - área 4 do córtex (motor primário)	EGF - fator de crescimento epidermal
7N - núcleo facial	EGP - globo pálido externo
9n - núcleo do nervo glossofaríngeo	EW - núcleo de Edinger-Westphal
A1 - área noradrenérgica A1	f - fórnice
aa - aminoácidos	FAK - quinase de adesão focal
AD - núcleo talâmico anterodorsal	FITC- isotiocianato de fluoresceína
AMPO - núcleo pré-óptico anteromedial	GDP - guanosina difosfato
APir - área de transição amigdalopiriforme	Gi - núcleo reticular gigantocelular
APT - núcleo pré-tectal anterior	Gr - núcleo grácil
Arc - núcleo arqueado	GrCb - camada granular do cerebelo
ArcL - núcleo arqueado lateral	GrDG - camada granular do giro denteado
ArcM - núcleo arqueado medial	H2 - fascículo lenticular campo 2
AHiMC - área amigdalohipocampal	H ₂ O – água
B - núcleo basal (Meynert)	HBD- domínio ligante de hormônio (“hormone-binding domain”)
BLVM - núcleo basolateral da amígdala parte ventromedial	HCl - ácido clorídrico
BMPC - núcleo basomedial da amígdala parte parvicelular	HDB - núcleo horizontal da banda diagonal
Ca ⁺² - cálcio	ICj - ilhas de Calleja
CA1 - camada CA 1 (corno de Ammon 1) da formação hipocampal	icp - pedúnculo cerebelar inferior
CA2 - camada CA 2 (corno de Ammon 2) da formação hipocampal	Ig - imunoglobulina
CA3 - camada CA 3 (corno de Ammon 3) da formação hipocampal	IGP - globo pálido interno
CA4 - camada CA 4 (corno de Ammon 4) da formação hipocampal	IntA - interpósito parte anterior
Cd - núcleo caudado	IOA - núcleo olivar inferior subnúcleo A
CeI - núcleo motor dorsal do nervo vago	IP - núcleo interpeduncular
cp - pedúnculo cerebral	IPul - núcleo pulvinar inferior
CRF - fator liberador da corticotropina	Lat - núcleo cerebelar lateral
CRN - neurônios da raiz coclear	LEC - domínios de lectina
Cu - núcleo cuneiforme	LH - hipotálamo lateral
DC - núcleo coclear dorsal	LPAG- substância cinzenta periaquedutal lateral
DLG - núcleo geniculado lateral dorsal	LPBV - núcleo parabraquial lateral parte ventral

LPHN-1 - latrofilina 1
 LPHN-2 - latrofilina 2
 LPHN-3 - latrofilina 3
 LPHNs - latrofilinas
 LRt - núcleo reticular lateral
 LRtS5 - núcleo reticular lateral parte subtrigeminal
 LSD - núcleo septal lateral dorsal
 LSI - núcleo septal lateral intermédio
 LSV - núcleo septal lateral parte ventral
 LTu - núcleo tuberal lateral
 LV- ventrículo lateral
 MCLH - núcleo magnocelular do hipotálamo lateral
 MD - núcleo talâmico mediodorsal
 MDC - núcleo talâmico mediodorsal parte central
 Me5 - mesencefálico trigeminal
 Med - núcleo cerebelar medial
 MG - núcleo geniculado medial
 mlf - fascículo longitudinal medial
 Mo5 - núcleo motor do trigêmeo
 MoCb - camada molecular do cerebelo
 MVe - núcleo vestibular medial
 NaCl - cloreto de sódio
 OLF- domínios de olfactomedina
 opt - trato óptico
 ox - quiasma óptico
 PaM - núcleo paraventricular do hipotálamo magnocelular
 PaMD - núcleo paraventricular do hipotálamo parte magnocelular divisão dorsal
 PaMP – núcleo paraventricular do hipotálamo parte parvicelular divisão medial
 PaP - núcleo paraventricular do hipotálamo parvicelular
 PaPD - núcleo paraventricular do hipotálamo parte parvicelular divisão dorsal
 PBP - núcleo parabraquial pigmentado
 PBS - tampão fosfato de sódio
 PF - núcleo parafasciular do tálamo
 Pk - camada de Purkinje do cerebelo
 PoDG- camada polimófica do giro denteado
 Pu - putame
 PV - núcleo paraventricular do tálamo
 PVP - núcleo paraventricular do tálamo parte posterior
 Re - núcleo reuniens
 RGCs - células ganglionares da retina
 RMC - núcleo rubro
 RRF - campo retrorubral
 Rt – núcleo reticular do tálamo
 SC - colículo superior
 SCh - núcleo supraquiasmático
 scp - pedúnculo cerebelar superior
 SIB - substância innominata
 SN - substância negra
 SNC- sistema nervoso central
 SNL - substância negra parte lateral
 SNR - substância negra reticular
 SO - núcleo supra-óptico
 Sol - núcleo solitário
 sol -trato solitário
 Sold - núcleo solitário subnúcleo dorsal
 sp5 - trato espinal do nervo trigêmeo
 SpVe - núcleo vestibular espinal
 STh - núcleo subtalâmico
 STLV - núcleo da estria terminal divisão lateral parte ventral
 STMA - núcleo da estria terminal divisão medial parte anterior
 STMP - núcleo da estria terminal divisão medial parte posterior
 TCAPs - peptídeos associados ao terminal carboxila das teneurinas
 Ten-1 - teneurina-1
 Ten-2 - teneurina-2
 Ten-2-LI – teneurina-2 “like immunoreactivity” (imunoreatividade relacionada à teneurina-2)

Ten-3 - teneurina-3

Ten-3-LI – teneurina-3 “like immunoreactivity” (imunorreatividade relacionada à teneurina-3)

Ten-4 - teneurina-4

Ten-4-LI – teneurina-4 “like immunoreactivity” (imunorreatividade relacionada à teneurina-4)

TENs - teneurinas

VCA - núcleo coclear ventral anterior

VCo - núcleo amigdalóide cortical ventral

VP - pálido ventral

VTA - área tegmental ventral

YD - tirosina e ácido aspártico

ZI - zona incerta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Descoberta das teneurinas.....	18
1.2 Estrutura e função das teneurinas	19
2 OBJETIVOS	24
Objetivo 1:	24
Objetivo 2:	24
Objetivo 3:	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Animais	25
3.2 Processamento histológico do sistema nervoso central (SNC).....	26
3.3 Imuno-histoquímica pelo método de imunoperoxidase e imunofluorescência indireta.....	29
3.4 Coloração pela técnica de Nissl.....	33
3.5 Análise dos resultados, aquisição e edição de imagens.....	33
4 RESULTADOS	35
4.1 Imuno-histoquímica: procedimentos controles.....	35
4.2 Resultados do objetivo 1:	43
Distribuição da teneurina-2 e teneurina-4 no SNC de primatas não-humano (<i>Sapajus spp</i>).....	43
4.3 Resultados do objetivo 2.....	58
Distribuição da teneurina-3 no SNC de primatas não-humano (<i>Sapajus spp</i>) e ratos (<i>Rattus norvegicus</i>)	58
4.4 Resultados do objetivo 3.....	78
Correlação da distribuição das teneurinas e latrofilinas em áreas do SNC de primatas não-humano (<i>Sapajus spp</i>).....	78
5. DISCUSSÃO	84
5.1 Considerações metodológicas.....	84

5.2 Distribuição das teneurina-2 e teneurina-4 no SNC de primatas não-humano (<i>Sapajus spp</i>)	88
5.3 Distribuição da teneurina-3 no SNC de primatas não-humano (<i>Sapajus spp</i>) e ratos (<i>Rattus norvegicus</i>)	93
5.4 Correlação da distribuição das teneurinas e latrofilinas em áreas do SNC de primatas não-humano (<i>Sapajus spp</i>)	96
6 CONCLUSÕES.....	100
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXOS	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 Descoberta das teneurinas

As teneurinas (TENs) são proteínas transmembrana principalmente distribuídas no sistema nervoso central (SNC). A descoberta destas proteínas ocorreu através de estudos que visavam encontrar proteínas homólogas as tenascinas em invertebrados, uma vez que as tenascinas são proteínas da matriz extracelular exclusiva de vertebrados (BAUMGARTNER e CHIQUET-EHRISMANN, 1993; BAUMGARTNER et al., 1994; CHIQUET-EHRISMANN, 2004). Estes estudos mostraram a existência de uma nova família de proteínas transmembrana denominada de teneurinas (TENs), com alguns poucos domínios homólogos aos das tenascinas, além de alta conservação e expressão entre as espécies, principalmente no SNC. Nos invertebrados as TENs são compostas por um ou dois membros (denominados de ten-1 em nematelmintos e ten-a e ten-m nos artrópodes) e por quatro membros nos vertebrados (denominados de teneurina-1 a -4) (MINET et al., 1999; OOHASHI et al., 1999; MINET e CHIQUET-EHRISMANN, 2000; ZHOU et al., 2003; DRABIKOWSKI et al., 2005; TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2006; TUCKER et al., 2007). Várias denominações e abreviaturas tem sido empregada referente às TENs, tanto em vertebrados como em invertebrados, uma vez que estas foram descobertas por laboratórios independentes (CHAND, 2013). Recentemente, foram propostas as abreviaturas Ten-1, Ten-2, Ten-3 e Ten-4 para as proteínas de humanos e camundongos, as quais são oriundas dos respectivos genes das teneurinas 1 a 4 (ISHII et al., 2015; MOSCA, 2015). Portanto, neste presente trabalho foi padronizado o uso das abreviaturas da TENs propostas por ISHII et al. (2015) e MOSCA (2015). Entretanto, ressaltamos que é verificada na literatura abreviaturas sinônimas para descrever esta família como ten-m1 a ten-m4, Odz1 a Odz4 e neurestina (MINET et al., 1999; MINET e CHIQUET-EHRISMANN, 2000; TUCKER et al., 2007).

Um aspecto interessante que também ampliou o interesse pelo estudo das TENs foi a descoberta que na região carboxi-terminal das TENs, presente nos vertebrados, há sequências de aminoácidos com identidade com a família de peptídeos do fator liberador da corticotropina (CRF) sendo esses denominados de TCAPs (**T**eneurin **C**-terminal-**A**ssociated **P**eptides) (QIAN et al., 2004; LOVEJOY et al., 2009; CHEN et al., 2013). Além disso, foi constatado que esta sequência carboxi-terminal das TENs podem ser liberadas na forma de peptídeos bioativos devido a existência de potenciais domínios de clivagem (Figura 1) ou

pode ser transcrita separadamente a partir do último éxon do gene de cada TENS (LOVEJOY et al., 2006).

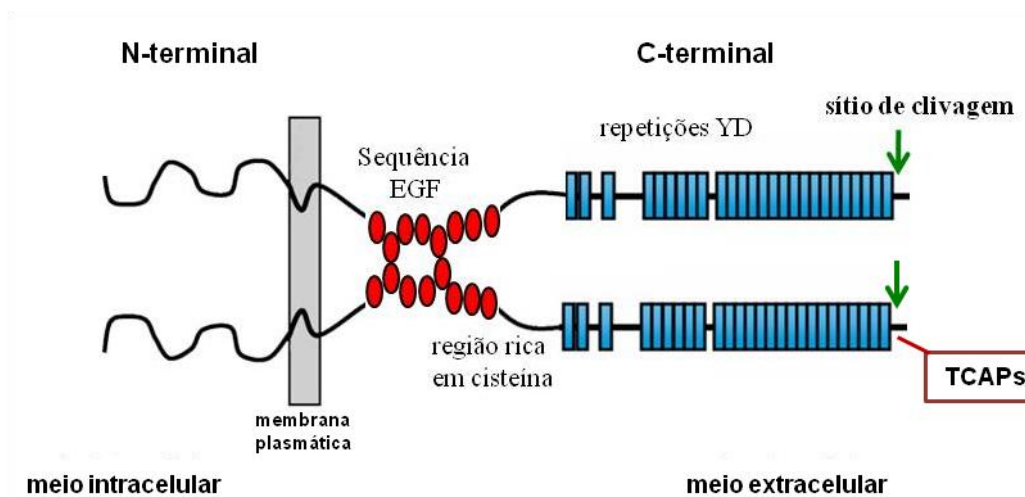


Figura 1. Análise do modelo estrutural das teneurinas (TENS). O modelo esquemático apresentado é referente à Ten-1 e ilustra a constituição e a organização dimérica homotípica, semelhante para as demais teneurinas (TENS). A seta mostra o sítio de clivagem localizado na região carboxi-terminal que poderia resultar na liberação dos TCAPs. Esse modelo também é similar aos outros membros das TENS. Ilustração extraída e adaptada de Lovejoy et al., 2006.

1.2 Estrutura e função das teneurinas

Estruturalmente todos os membros da família das teneurinas (TENS) compartilham de características comuns, exibindo peso molecular de aproximadamente 300 kDa e constituição entre 2500 a 2800 aminoácidos. A análise da identidade mostra que entre os vertebrados as TENS apresentam de 60% a 98% de sequências de aminoácidos idênticos revelando a consistente conservação filogenética destas proteínas. As TENS apresentam seu terminal carboxila e amino-terminal com orientação extracelular e intracelular, respectivamente (Figura 1); portanto, sendo classificada como uma proteína transmembrana do tipo II (OOHASHI et al., 1999; TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2006). A região intracelular é composta por aproximadamente 300-375 aminoácidos enquanto que a região transmembrana é composta por 300-400 aminoácidos hidrofóbicos. A região extracelular é constituída por aproximadamente 2300 aminoácidos apresentando domínios semelhantes ao fator de crescimento epidermal (“epidermal growth factor-like”- EGF) análogo aos das

tenascinas, seguido por uma região rica em cisteínas e sequências repetidas de aminoácidos tirosina e ácido aspártico (região YD) (Figura 1) (TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2006). Esta região apresenta significativa identidade tanto em tamanho quanto em estrutura quando comparada às TENS de vertebrados e invertebrados (OOHASHI et al., 1999; TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2006; KENZELMANN et al., 2008). Além disso, é verificado nesta região carboxi-terminal a possibilidade das TENS formarem dímeros logo após serem transportadas para a membrana plasmática através de interações entre o segundo e o quinto domínio semelhante ao EGF (Figura 1) (LOVEJOY et al., 2006). Ensaios *in vitro* confirmaram que as TENS de vertebrados são capazes de formarem dímeros homotípicos e heterotípicos (FENG et al., 2002; RUBIN et al., 2002) além de serem capazes de associarem com TENS presente nas membranas celulares opostas através da interação celular homofílica e heterofílica (OOHASHI et al., 1999; RUBIN et al., 2002; MOSCA, 2015). Esta capacidade de formar diferentes tipos de dímeros e interações celulares sugere a complexidade funcional na qual as TENS possam estar envolvidas devido a formação de várias moléculas a partir de um conjunto limitado de genes (FENG et al., 2002). Além disso, estudos verificaram que os genes das TENS podem codificar “splice variants” (OOHASHI et al., 1999; SILVA et al., 2011; WOELFLE et al., 2015) devido a tradução de parte do gene que codifica as proteínas TENS assim como a possibilidade de clivagem em sítios destas proteínas gerando peptídeos relacionados as TENS como os TCAPs (QIAN et al., 2004; LOVEJOY, 2009).

Estudos pioneiros verificaram que as TENS possuem papel fundamental no desenvolvimento de embriões de *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* e *Caenorhabditis elegans* sendo notado nestes estudos que animais mutantes para TENS apresentam defeitos no desenvolvimento e diferenciação embrionária, principalmente no SNC, que podem resultar na letalidade embrionária (BAUMGARTNER et al., 1994; LEVINE et al., 1994; DRABIKOWSKI et al., 2005; LOSSIE et al., 2005). Estes dados demonstram que essa família de proteínas possui alguma função indispensável na embriogênese, aparentando não possuir mecanismos compensatórios para minimizar sua ausência (BAUMGARTNER et al., 1994; LEVINE et al., 1994; DRABIKOWSKI et al., 2005; LOSSIE et al., 2005).

Além dos trabalhos descreverem a presença das TENS nos tecidos neuronais e não neuronais em condições de normalidade, é verificado a expressão alterada das Ten-2 e Ten-4 em tecidos e em cultura de células tumorais humanas, sendo sugerida sua participação na proliferação das células tumorais e seu potencial uso como biomarcador tumoral (ZIEGLER

et al., 2012). Isto foi verificado comparando-se a expressão das TENS com tecidos e cultura de células normais, sendo constatado que a expressão da Ten-2 está aumentada em tumores de origem linfática e ovariana, e a Ten-4 em tumores encefálicos oriundos de células da glia (ZIEGLER et al., 2012). Alguns estudos também apontam a participação dos membros da TENS em quadros de microftalmia, retardos mentais, anosmia, doenças neurodegenerativa como doença de Alzheimer, além de quadros de distúrbios psiquiátricos associado com prejuízos sinápticos como autismo, distúrbio bipolar e esquizofrenia (DUBOVSKY et al., 1994; VIK e YATHAM, 1998; BUERVENICH et al., 2001; TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2006; ALDAHMesh et al., 2012; BASTÍAS-CANDIA et al., 2015; MOSCA, 2015; SCHOLER et al., 2015) sugerindo futuras perspectivas clínicas (MOSCA, 2015; ALKELAI et al., 2016).

Outro dado que tem subsidiado a relação da TENS com alterações neurológicas e visuais reside na localização do gene da Ten-1 na região Xq25, cujas mutações resultam em pacientes com retardo mental associados a severos danos visuais, consistente com o que tem sido descrito sobre a participação das TENS no desenvolvimento do SNC de animais de laboratório (GUSTAVSON et al., 1993; MALMGREN et al., 1993; BUERVENICH et al., 2001; LEAMEY e SAWATARI, 2014; MOSCA, 2015). Além disso, outras anormalidades mentais associadas a malformações faciais e dos membros têm sido mostradas em translocações e trissomias envolvendo o locus 5q34, que aloja o gene da Ten-2 (DUBOVSKY et al., 1994; VIK e YATHAM, 1998). Também tem sido sugerido que mutações no gene da Ten-4 aumentam a susceptibilidade a desordens bipolares (SKLAR et al., 2011; HEINRICH et al., 2013), possivelmente devido a mudanças no processamento do estado de recompensa exercido pela amígdala (HEINRICH et al., 2013), ou devido a malformações da rede neuronal resultando em prejuízos na sinalização sináptica ou no desenvolvimento glial (SUZUKI et al., 2012; SUZUKI et al., 2014). Desta forma, muitos estudos buscam associar as TENS com distúrbios neurológicos verificados em humanos devido sua predominante expressão no SNC. Entretanto, até o momento a participação dos membros das TENS em distúrbios relacionados com a via visual somente foi confirmado em quadros de microftalmia (ALDAHMesh et al., 2012). A microftalmia é uma condição clínica presente em pacientes síndrômicos ou não que acarreta na malformação do globo ocular, na qual os mesmos apresentam tamanho reduzido estando associado a quadros de cegueira (ALDAHMesh et al., 2012). Mutações no gene que codifica a Ten-3 têm sido relacionadas a quadros de microftalmia em humanos

(ALDAHMESH et al., 2012) sendo também verificada a participação da Ten-1 na regulação de fatores de transcrição associado à microftalmia (SCHOLER et al., 2015). Estes dados confirmam a importância de membros pertencentes à família das TENs em vias visuais outrora mencionada em modelos experimentais.

A possível participação das TENs na organização sináptica foi evidenciada em *Drosophila melanogaster* na qual foi verificado o envolvimento das TENs na interação pré e pós-sináptica de neurônios olfatórios assim como entre motoneurônios e células musculares através de interação celular homofílica (HONG et al., 2012; MOSCA et al., 2012). Entretanto, a participação na organização sináptica através da interação heterofílica também foi sugerida principalmente após a descoberta dos ligantes endógenos das TENs denominados de latrofilinas (LPHNs) (SILVA et al., 2011). As LPHNs pertencem a uma família de receptores acoplados à proteína-G e composta por três membros (LPHN-1 a 3), sendo proposto que sua interação com as TENs ocorra pela extremidade carboxi-terminal de ambas famílias (SILVA et al., 2011; BOUCARD et al., 2014; O'SULLIVAN et al., 2014; WOELFLE et al., 2015). Isto foi evidenciado devido a específica e forte interação verificada em cultura de células hipocâmpais entre parte de um transcrito da Ten-2 (“splice variant”) denominada de Lasso, com a latrofilina 1 (LPHN-1) (SILVA et al., 2011).

Os mecanismos moleculares das funções na qual as TENs estão envolvidas ainda são incertos, porém é sugerido que participação da Ten-4 na diferenciação neuronal, através da regulação da protrusão celular e da formação de neuritos, ocorra por meio da via de sinalização da quinase de adesão focal, conhecida como FAK (“focal adhesion kinase”) (SUZUKI et al., 2014). Além disso, foi verificada a presença de domínios de clivagem intracelular na Ten-1 e Ten-2, resultando em proteínas intermediárias que são translocados para o núcleo, onde podem atuar como fator de transcrição gênica (BAGUTTI et al., 2003; NUNES et al., 2005; SCHOLER et al., 2015). Estudos recentes verificaram os possíveis mecanismos moleculares dessa regulação gênica na qual constataram que a porção amino-terminal da Ten-1 não contém sequência de ligação direta ao DNA necessitando interagir com outras proteínas codificantes como a proteína 1 da tríade de histidina de ligação do nucleotídeo (HINT1) para assim regular a expressão de fatores de transcrição como a glicoproteína não metastática b (GPNMB) que é um fator de transcrição associado a quadros de microftalmia (SCHOLER et al., 2015). Também foi verificado que o domínio intracelular da Ten-2 é capaz de associar a proteínas ligantes citoplasmática de ação nuclear, como o fator

de transcrição gênica “dedo de zinco” (“zinc-finger transcription factor”) (BAGUTTI et al., 2003).

Desta forma, até o momento as funções descritas para as TENS estão relacionadas a orientação axonal (YOUNG e LEAMEY, 2009), crescimento dos neuritos (RUBIN et al., 1999; LEAMEY et al., 2008), participação na regulação da transcrição proteica (BAGUTTI et al., 2003; NUNES et al., 2005; KENZELMANN et al., 2008; SCHOLER et al., 2015), proliferação e adesão celular (RUBIN et al., 2002; KINEL-TAHAN et al., 2007; LEAMEY et al., 2008) e organização sináptica (MOSCA, 2015), porém, com mecanismos de ação ainda incertos tanto em animais em desenvolvimento quanto em adultos. Portanto, é sugerido que as TENS representem um novo e altamente conservado sistema de regulação que atua principalmente no SNC de vertebrados (BASTÍAS-CANDIA et al., 2015).

A distribuição neuroanatômica dos quatro membros das TENS é descrita na literatura porém sendo os resultados incompletos, pouco detalhado e principalmente realizados durante a fase de desenvolvimento embrionário de vertebrados como camundongos, ratos, peixes e aves (RUBIN et al., 1999; MIEDA et al., 1999; OTAKI e FIRESTEIN, 1999; ZHOU et al., 2003). Sendo assim, ainda é necessário um detalhado mapeamento neuroanatômico da distribuição das TENS no SNC de vertebrados durante a fase adulta. Além disso, os dados de distribuição das TENS no SNC de primatas não-humano seriam de grande valor pois poderiam subsidiar futuros estudos e modelos funcionais envolvidos com alterações neurológicas em humanos.

2 OBJETIVOS

Objetivo 1:

Realizar mapeamento neuroanatômico das teneurinas 2 e 4 visando suprir a ausência destes dados no sistema nervoso central (SNC) de animais adultos de uma mesma espécie de primatas não-humano (*Sapajus spp*), através do método da imunoperoxidase indireta.

Objetivo 2:

Realizar mapeamento neuroanatômico da teneurina 3 no SNC de primatas não-humano (*Sapajus spp*) e análise comparativa com roedores (*Rattus norvegicus*), através do método da imunoperoxidase indireta.

Objetivo 3:

Correlacionar a distribuição dos membros das TENs com as latrofilinas (LPHNs), ligantes endógenos das TENs, em áreas do SNC de primatas não-humano (*Sapajus spp*), através dos métodos de imunoperoxidase e dupla imunofluorescência indireta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para este trabalho foi utilizado o SNC de animais adultos da espécie de primata não-humano *Sapajus spp.* Inicialmente é válido salientar que a nomenclatura adotada para esta espécie foi recentemente alterada passando os animais outrora denominados de *Cebus apella* para *Sapajus spp* (ALFARO et al., 2012; IZAR et al., 2012; WHEELER et al., 2013). Isso ocorreu, pois, de modo geral, os primatas popularmente conhecidos como macacos-prego são divididos em dois grandes grupos que são os gráceis (devido ausência de pelagem em forma de crista no topo da cabeça) e robustos (presença de pelagem em forma de crista no topo da cabeça), sendo que, desde 1960 são nomeados de *Cebus apella* todas as espécies do grupo robusto (HILL, 1960; ALFARO et al., 2012). Porém, em 2011 foi verificada a existência de tipos distintos dentro deste grupo, sendo sugerido o gênero *Sapajus* para denominar o grupo robusto e *Cebus* o grupo grácil (ALFARO et al., 2012). Esta alteração se deve aos estudos morfológicos, genéticos, comportamentais, ecológicos e biogeográficos, os quais verificaram uma diversidade de tipos de primatas dentro do gênero *Cebus* que impulsionaram a colocação dos mesmos em um gênero separado. Portanto, em nosso trabalho será empregado a nomenclatura *Sapajus spp* para se referir ao grupo anteriormente denominado de *Cebus apella* como proposto na literatura (WHEELER et al., 2013).

Neste estudo foram utilizados macacos machos adultos (idade entre 4 a 5 anos) da espécie *Sapajus spp* (n=3) que apresentavam peso corpóreo entre 2.200 a 2.700 g. Através da verificação do peso corpóreo é possível estimar a maturidade sexual desta espécie sendo constatado que para os machos a completa maturidade é atingida após 2.500g (NAGLE, 1982). O uso e fornecimento para pesquisa desses animais foram fiscalizados e orientados segundo normas e procedimentos do Núcleo de Procriação de Macacos-prego associado ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia – UNESP, Campus de Araçatuba, segundo a portaria 016/94 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) de 04 de abril de 1995. Ressaltamos que o tecido nervoso do primata utilizado neste trabalho foi coletado anteriormente para a realização de outros trabalhos de pesquisa e se encontram adequadamente armazenados em sistema de congelamento no setor de Morfologia do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de

Odontologia de Araçatuba – UNESP sob responsabilidade do Prof. Dr. Cláudio A. Casatti. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (protocolo 02257-2012, Anexo 1).

Neste trabalho também foi utilizado o tecido nervoso de roedores que foram obtidos de ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* (n=4) por volta dos 4 meses de idade e com peso corpóreo entre 270g a 300g. Estes animais foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os procedimentos experimentais para o uso desta espécie foram aprovados pelo CEUA da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (protocolo 02401-2012, Anexo 2).

3.2 Processamento histológico do sistema nervoso central (SNC)

Sapajus spp

Os procedimentos realizados para a obtenção do SNC do primata iniciaram com a tranquilização dos animais através da injeção intramuscular de cloridrato de cetamina (10 mg/kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) seguido de anestesia profunda pela injeção intraperitoneal de tiopental sódico (30 mg/kg Thionembital® - Fontoveter, Brasil) e injeção intramuscular de diazépínic (0,3 mg/kg Diazepan® - União Química Farmácia Nacional S.A., Brasil). Em seguida os procedimentos de fixação e preparo histológico do tecido nervoso seguiram os protocolos estabelecidos para o SNC de macacos (ROSENE et al., 1986; ST JOHN JL, 1997). Os animais foram perfundidos através da parte ascendente da aorta por punção cardíaca, primeiramente com solução salina (0,9%) e em seguida com soluções fixadoras constituídas de formaldeído 4% preparado em tampão acetato 0,1 M (pH 6,5, 3L) e finalmente formaldeído a 4% em tampão tetraborato de sódio 0,1M (pH 9,5, 3L). Após a perfusão o encéfalo, medula espinal e hipófise dos primatas foram transferidos para solução crioprotetora constituída de 10% de glicerol e 2% dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical, MO, USA) em tampão tetraborato de sódio 0,1 M (pH 9,5) por 3 dias a 4°C. Uma segunda crioproteção foi realizada através de solução crioprotetora constituída de 20% glicerol e 2% de DMSO em tampão tetraborato de sódio 0,1 M (pH 9,5) a 4°C, durante 7 a 10 dias. A microtomia do encéfalo e da medula espinal foi realizada em micrótomo de congelamento (SM 2000R, Leica, Alemanha) com obtenção de secções de 40 µm de espessura em plano

coronal. As secções foram acondicionadas em oito séries com seis compartimentos cada contendo solução tamponada de anticongelante livre de RNase (0,5x PBS 0,1M, 30% etileno glicol e 20% glicerol) e armazenadas em congelador (freezer) a -20°C. Séries adjacentes com cortes histológicos representativos do neuroeixo foram utilizadas para técnica de imuno-histoquímica e Nissl.

Para obtenção dos cortes histológicos da hipófise do primata foi realizado o processamento histológico para inclusão em parafina através das seguintes etapas: a) desidratação em série crescente de alcoóis (70%, 80%, 90%, 100% I a 100% III – 40 minutos em cada banho em sistema de vácuo); b) banho em solução de álcool-xilol (40 minutos em sistema de vácuo); c) banho em soluções de xilol I a xilol III (40 minutos cada banho em sistema de vácuo); d) impregnação em parafina I-III (40 minutos cada banho) em estufa a 56°C; e) inclusão e emblocamento da hipófise em parafina (Histosec, Merck, Alemanha). O seccionamento da hipófise foi realizado em micrótomo automático Leica (RM2155, Leica Microsystems Inc, SP, Brazil) para obtenção de cortes com 5 µm de espessura sendo os mesmos coletados em lâminas de vidro (Brain Research Laboratories® microscope slides 25x75x1.0 mm adhesion superfrost plus). As lâminas histológicas da hipófise foram armazenadas em caixas porta-lâminas a temperatura ambiente, livre de umidade, até a realização da técnica de imuno-histoquímica.

Rattus norvegicus

Para obtenção do encéfalo, medula espinal e hipófise de ratos foram realizadas as seguintes etapas laboratoriais (descrição metodológica empregada no laboratório do prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta-Júnior, Departamento de Anatomia – Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP): alojamento dos animais em gaiolas (33x17x18cm) com livre acesso à água e ração, em biotério com temperatura controlada (21 a 23°C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7:00h). Para administração do agente antimitótico colchicina (Sigma #C9754) os animais (n=2) foram previamente anestesiados com uma solução anestésica constituída de 5 ml de cloridrato de xilazina (Anasedan® 2%, Ceva) a 20mg/ml (concentração final = 5mg/ml), 5 ml de cloridrato de ketamina (Dopalen® 10%, Ceva) a 100mg/ml (concentração final = 25mg/ml) e 2 ml de acepromazina (Acepran® 1%, Vetnil) a 10mg/ml (concentração final = 1mg/ml), em quantidade suficiente de água

bidestilada para 20ml. A solução anestésica foi ministrada por via subcutânea na dose de 0,2ml para cada 100g de peso corporal do animal. Depois de verificada a completa anestesia dos animais, através da ausência do reflexo córneo-palpebral e reflexo de retirada da pata traseira, foi removido os pêlos da região da cabeça e ao redor da orelha. O animal foi posicionado no aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, #963) e seus olhos foram mantidos umedecidos com soro fisiológico durante todo o procedimento. A altura do apoio incisal do aparelho estereotáxico foi ajustada para 3,3mm abaixo da linha interauricular de forma que os pontos craniométricos Bregma e Lambda estivessem no mesmo nível (PAXINOS e WATSON, 2007). Foi realizada uma incisão sagital mediana de aproximadamente 3 cm na cabeça do animal e os tecidos que recobrem a calota craniana, inclusive o periósteo, foram divulsionados e afastados lateralmente com bastonetes de algodão expondo os ossos parietais e occipital, seguida da craniotomia. Antes do início da administração do agente antimitótico colchicina o animal foi posicionado verificando a projeção da coordenada ântero-posterior (AP) 0,0 e médio-lateral (ML) 0,0 sobre a calota craniana, no centro do triângulo formado pela sutura lambdóide como preconizado por PAXINOS e WATSON (2007). Para administração da colchicina no ventrículo lateral os animais foram posicionados segundo as coordenadas: AP: -0,72mm; ML: 2mm; dorsoventral (DV): \pm 4mm e a injeção de 7 μ l colchicina foi realizada utilizando uma seringa de 10 μ l (Hamilton 1700 series) controlada por uma bomba de microinjeção (micropump III – WPI) com ponta em aço de 60 μ m de diâmetro interno. Após a remoção da micropipeta, os tecidos divulsionados foram reposicionados e a incisão fechada com grampos cirúrgicos. Decorrido 48 horas da administração da colchicina todos os animais (n=4), tanto controle quanto pré-tratado com colchicina, foram sacrificados por perfusão transcardíaca utilizando fixador histológico após sobredose anestésica de hidrato de cloral a 10% por via intraperitoneal (aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal). Previamente ao uso do fixador os animais foram perfundidos com solução salina composta por NaCl a 0,9% em água destilada (150ml, aproximadamente) acrescida de 1 ml de heparina sódica (Hepamax-S® - Blau, 5000U.I.) imediatamente antes da perfusão. A administração da solução salina com heparina foi realizada em temperatura ambiente durante 3 minutos e em quantidade suficiente para permitir um retorno vascular quase transparente. Em prosseguimento, foi administrado solução fixadora filtrada (aproximadamente 1000 ml por animal) composta de formaldeído a 4%, recém-preparada a partir de paraformaldeído (Sigma #P6148) em tampão fosfato de sódio

0,1 M, pH 7,4 em temperatura ambiente. Posteriormente o encéfalo, a medula espinal e a hipófise foram submetidos à crioproteção em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M pH 7,4 por 48h. Após a crioproteção o encéfalo e a medula espinal foram cortados no plano coronal em secções seriadas de 30µm, obtidas em micrótomo de deslizamento (Leica SM2010R) equipado com platina congeladora (Physitemp, BFS-30MP). Os cortes foram recolhidos sequencialmente, em uma série de 10 frascos preenchidos com solução anticongelante (0,5x PBS, 30% etileno glicol e 20% glicerol) e armazenadas em congelador (freezer) a -20°C. Para obtenção dos cortes histológicos da hipófise foram realizadas as etapas de processamento em parafina descrita acima para a hipófise de primata.

3.3 Imuno-histoquímica pelo método de imunoperoxidase e imunofluorescência indireta

Imunoperoxidase

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica pelo método da imunoperoxidase indireta foram inicialmente testados diferentes protocolos experimentais de bloqueio da peroxidase e da avidina/biotina endógena com intuito de minimizar a marcação de fundo e facilitar a visualização de corpos neuronais e fibras imunorreativas aos membros da família das teneurinas (TENS). Estes bloqueios juntamente com os demais métodos de controle da técnica de imuno-histoquímica (teste de titulação, adsorção e omissão do anticorpo primário) contribuem para confirmar a fidelidade dos resultados de distribuição dos membros das TENS.

Após a análise dos protocolos e adequação dos mesmos foi preconizado a lavagem prévia dos cortes do SNC em tampão fosfato de sódio 0,1M (PBS 0,1M, pH 7,4) por 24 horas para remoção da solução anticongelante na qual os cortes estavam armazenados.

Para os cortes em parafina da hipófise foi inicialmente realizado a desparafinização e a recuperação do antígeno. Para esta etapa os cortes histológicos montados em lâminas foram mantidos em estufa por um período de 30 minutos a 56°C e submetidos a uma sequência de banhos em xilol I-III durante 5 minutos em cada banho. Após foi realizada a desidratação em álcool 100%, 95%, 70% por 2 minutos em cada banho. Em seguida foi realizada 3 lavagens de 5 minutos em PBS 0,1M e a recuperação antigênica através de calor úmido em câmara pressurizada (Decloaking Chamber – Biocare Medical, CA, USA)

utilizando tampão citrato a 1% (100x Citrate Buffer, pH 6,0 - Spring Bioscience, CA, USA) e programação de 95°C por 5 minutos e 70°C por 3 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, por um período de 2 horas, os cortes foram processados segundo o protocolo estabelecido para o método da imunoperoxidase.

Para o método da imunoperoxidase, as seguintes etapas foram obedecidas: a) 3 lavagens de 10 minutos em PBS 0,1M; b) inibição da peroxidase endógena por 1 hora com solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% obtida pela diluição de 0,5 ml de peróxido de hidrogênio a 30% em 50 ml de PBS-TX (PBS 0,1M acrescido de 0,3% de triton X-100); c) 3 lavagens de 10 minutos em PBS 0,1M até que não haja mais bolhas no tecido; d) inibição da avidina endógena por 30 minutos, seguida de lavagens em PBS 0,1M e do bloqueio da biotina endógena por 30 minutos (avidin/biotin kit blocking, Invitrogen, CA, USA); e) bloqueio das marcações inespecíficas por 4h através da solução contendo PBS-TX e 5% de leite em pó desnatado; f) 3 lavagens de 10 minutos em PBS 0,1M seguidas de incubação em solução contendo PBS-TX e 2% soro normal de burro por 24 horas; g) incubação do anticorpo primário anti-teneurina (Ten-2, 3 e 4) e anti-latrofilina (LPHN-1, 2 e 3) (informações complementares sobre os anticorpos primários comerciais utilizados estão descritas na tabela 1) por 24 horas em temperatura ambiente. Ressaltamos que para determinação e padronização da concentração empregada do anticorpo primário foi inicialmente realizado o teste de titulação no qual foram utilizadas as seguintes concentrações iniciais 1:100, 1:500 e 1:1000 sendo a melhor concentração de cada anticorpo apresentada na tabela 1; h) Após incubação do anticorpo primário por 24 horas, seguem 3 lavagens de 10 minutos em PBS 0,1M; i) preparo da solução de anticorpo secundário biotilado (anti-coelho, anti-cabra e anti-ovelha - Santa Cruz Biotechnology) na concentração de 1:800 em solução contendo PBS-TX e 2% soro normal de burro e incubação dos cortes nesta solução por 1 hora; j) 3 lavagens de 10 minutos em PBS 0,1M; k) incubação em solução do complexo avidina-biotina (ABC) (Vector Laboratories, CA, USA), ambas na concentração de 1:500, em solução de PBS 0,1M por 1h; l) 3 lavagens de 10 minutos em PBS 0,1M; m) Revelação da reação de imuno-histoquímica através da solução de tetracloro de diaminobenzidina (0,05%) (Sigma Chemical, MO, USA) acrescida de peróxido de hidrogênio a 30% (0,006%) e uso opcional de sulfato-níquel-amônia (0,05%) (Fisher Scientific, NJ, USA); n) após, os cortes foram lavados em PBS 0,1M, montados em lâminas gelatinizadas, com exceção dos cortes da hipófise que já se encontravam em lâminas, e em seguida secos a temperatura ambiente por 3 dias ou em estufa

a 37°C por aproximadamente 18h, sendo posteriormente submetidos a bateria de desidratação que inicia-se com banhos de 3 minutos em álcool 50% ,70% e 95%; 3 banhos de 5 minutos em álcool 100%; banhos de 5, 10 e 15 minutos em xilol, sendo logo após as lâminas cobertas com meio de montagem (Entellan, Merck) e lamínulas de vidro. Este protocolo foi realizado nos cortes histológicos de primata e ratos, sendo que neste último a etapa de bloqueio da avidina e biotina endógena não foi necessária.

Como mencionado anteriormente este protocolo também foi utilizado para estabelecer a concentração ideal do anticorpo primário, através do teste de titulação, assim como foi utilizado para determinar a especificidade do anticorpo primário empregado através do teste de adsorção e omissão do anticorpo primário. No que se refere ao teste de adsorção, foi realizada nas etapas iniciais da técnica de imunoperoxidase a ligação do anticorpo primário com a porção do antígeno a qual reconhece (peptídeo obtido comercialmente). Desta forma para os anticorpos anti-Ten-2 e anti-Ten-3 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) adicionamos aos mesmos concentrações de 0,1 mg/ml a 0,001 mg/ml do respectivo antígeno Ten-2 e Ten-3 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) por 24 horas em mesa agitadora a 4°C. Em prosseguimento, foi obedecido o protocolo de imuno-histoquímica já descrito acima iniciando com as lavagens dos cortes histológicos seguida da incubação do anticorpo primário adsorvido com seu peptídeo seguindo os passos até revelação e montagem. Este teste de adsorção não foi aplicado aos demais anticorpos comerciais testados devido a ausência de peptídeos comerciais disponíveis. No teste de omissão do anticorpo primário foram realizadas todas as etapas da técnica de imuno-histoquímica com exceção da incubação do anticorpo primário nos cortes histológicos.

Antígeno	Fonte (código)	Hospedeiro	Concentração empregada	Área de reconhecimento
Teneurina-2	Santa Cruz Biotechnology (165674)	cabra	1:100	amino-terminal (50-100 aa)
Teneurina-3	Santa Cruz Biotechnology (136918)	coelho	1:500	carboxi-terminal (1300-1350 aa)
Teneurina-4	Santa Cruz Biotechnology (H-50/ 134883)	coelho	1:1000	carboxi-terminal (2515-2564 aa)
Teneurina-2	R&D Systems (AF4578)	ovelha	1:500	amino-terminal (1-183 aa)
Teneurina-3	Novus Biologicals (NBP1-20956)	cabra	1:2000	carboxi-terminal (2390-2402 aa)
Teneurina-4	R&D Systems (AF6320)	ovelha	1:500	amino-terminal (61-340 aa)
Latrofilina-1	Santa Cruz Biotechnology (34484)	cabra	1:500	amino-terminal
Latrofilina-2	Santa Cruz Biotechnology (47091)	cabra	1:250	amino-terminal
Latrofilina-3	Santa Cruz Biotechnology (47095)	cabra	1:250	amino-terminal

Tabela 1. Anticorpos primários anti-teneurinas (TENS) e anti-latrofilinas (LPHNs) obtidos comercialmente e empregados no presente estudo. A concentração empregada de cada anticorpo foi determinada através do teste de titulação utilizando cortes histológicos do neuroeixo do *Sapajus spp*, demais informações foram obtidas do próprio fabricante.

Imunofluorescência

Para o estudo da colocalização das TENS e LPHNs foi realizado o método da dupla imunofluorescência indireta utilizando séries de cortes histológicos que continham os principais locais de distribuição das TENS sendo realizada as seguintes etapas: a) lavagem dos cortes histológicos em PBS 0,1M por 24 horas para remoção da solução anticongelante na qual os cortes estavam armazenados; b) 3 lavagens de 10 minutos em PBS 0,1M; c) bloqueio das marcações inespecíficas por 1h através da solução contendo PBS-TX e 5% de leite em pó desnatado; d) 3 lavagens de 10 minutos em PBS 0,1M seguidas de incubação em solução contendo PBS-TX e 2% soro normal de burro por 24 horas; e) incubação do anticorpo primário anti-latrofilina (LPHN-1,2 e 3) utilizando as mesmas concentrações empregadas na imunoperoxidase (tabela 1) por 24 horas em temperatura ambiente; f) após incubação do

anticorpo primário, seguem 3 lavagens de 10 minutos em PBS; g) preparo da solução de anticorpo secundário biotilado (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) na concentração de 1:200 em solução contendo PBS-TX e 2% soro normal de burro e incubação dos cortes nesta solução por 1 hora; h) 3 lavagens de 10 minutos em PBS; i) incubação do tecido por 1 hora em solução contendo Cy³ conjugado com estreptavidina (1:200, Jackson ImmunoResearch, USA); j) 3 lavagens de 10 minutos em PBS seguida da incubação do anticorpo primário anti-teneurina (Ten-2, 3 e 4) em solução contendo PBS-TX e 2% soro normal de burro por 24 horas; k) 3 lavagens de 10 minutos em PBS e incubação do anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA); l) 3 lavagens de 10 minutos em PBS, montagem do tecido em lâminas gelatinizadas, secagem em temperatura ambiente e proteção com lamínulas e meio de montagem a base de glicerol tamponado.

3.4 Coloração pela técnica de Nissl

Para auxiliar no mapeamento da distribuição das TENs e LPHNs foi utilizado cortes histológicos de primatas e ratos corados pela técnica de Nissl para referência citoarquitetônica dos grupamentos neuronais. Esse método consiste na utilização de um corante básico que possui afinidade aos ácidos ribonucléicos (RNAs) que estão abundantes no citoplasma dos neurônios. Para esta técnica foi realizada as seguintes etapas: a) banhos de desidratação das lâminas com os cortes histológicos em álcool 95% por 6 minutos, álcool 100% por 9 minutos e deslipidificação em xilol por 40 minutos; b) reidratação com banhos de 6 minutos em álcool 100%, 6 minutos em álcool 95%, 3 minutos em álcool 70% e 3 minutos em álcool 50%; c) mergulho das lâminas em tionina a 0,25% por 1 minuto; d) banhos em água destilada (10 banhos); e) desidratação das lâminas como mencionado acima sendo que o tempo de cada banho nessa etapa é de 2 minutos; f) após banho em xilol as lâminas foram cobertas com meio de montagem (Entellan, Merck) e lamínulas de vidro.

3.5 Análise dos resultados, aquisição e edição de imagens

As análises dos tecidos submetidos à técnica de imunoperoxidase e a técnica de Nissl foram feitas através de microscopia de luz (Leica DMR, Wetzlar, Alemanha) em campo

claro. A localização e denominação das regiões analisadas basearam-se no atlas de referência neuroanatômica para primatas não-humanos (PAXINOS et al., 2009) e roedores (PAXINOS e WATSON, 2007) e em cortes histológicos corados pela técnica de Nissl que auxiliaram na localização citoarquitetônica. Para Ten-2, 3 e 4 foram analisados na microscopia de campo claro fibras e corpos celulares imunorreativos. Baseado na metodologia de apresentação dos resultados de distribuição neuroanatômica empregada por VASCONCELOS et al. (2003), os dados do presente estudo foram dispostos em tabelas contendo a região/núcleo e a presença ou ausência da imunomarcagem em corpos neuronais através do método qualitativo de distribuição. No caso de densidade de fibras nervosas imunorreativas, foi acrescentada a análise semiquantitativa, considerando o padrão de distribuição de pouco (+), moderada (++) e intensa (+++) densidade de fibras imunorreativas.

A aquisição das imagens microscópicas foi realizada através de uma câmera digital (AxioCam HRc, Carl Zeiss, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico (Scope.A1, Carl Zeiss, Alemanha) utilizando-se o software de captura de imagens AxioVision (Carl Zeiss, Alemanha). Todas as imagens capturadas através deste sistema foram editadas no programa Adobe Photoshop CS2 para melhor apresentação e organização dos resultados e somente ajustadas com relação ao brilho e contraste das mesmas quando necessário.

Para análise de colocalização entre teneurinas e latrofilinas pelo método de dupla imunofluorescência as lâminas foram analisadas em microscópio confocal (modelo TCS-SP5 AOBS Tandem Scanner, LEICA, Germany) acoplado a um microscópio óptico invertido (Leica DMI 6000CS) do centro de microscopia eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (Projeto Fapesp EMU 2009/54141-9). O microscópio confocal está equipado com lasers Diodo, Hélio-Neon e Argônio possibilitando as linhas de excitação de comprimento de onda de 405, 458, 476, 488, 496, 514, 543, 594, 594 e 633 nm. Foram utilizadas objetivas Planapochromat de 20x, 40x e 63x (abertura numérica 1,30) com imersão a óleo, que possibilitaram uma resolução de até ~150nm nos eixos x, y e ~300nm no eixo -z (*pinhole* de 1 unidade *Airy*).

4 RESULTADOS

4.1 Imuno-histoquímica: procedimentos controles

De modo geral, verificamos que os anticorpos de ambas as marcas comerciais apresentaram correspondência de distribuição da imunorreatividade no SNC; entretanto, os anticorpos da marca comercial Santa Cruz Biotechnology® mostrou imunorreatividade mais intensa e melhor definida.

Foi observado que o anticorpo anti-Ten-2 da R&D Systems® apresentou especificidade similar com o anticorpo anti-Ten-2 da Santa Cruz Biotechnology®, mostrando territórios imunomarcados na formação hipocampal com evidente presença de corpos neuronais com imunorreatividade relacionada à Ten-2 (Ten-2-LI) localizados nas camadas CA1-CA4 na camada granular do giro denteado (GrDG) (Figura 2). No cerebelo, foram verificados que ambos os anticorpos marcaram seletivamente os neurônios da camada de Purkinje do cerebelo (Pk) (Figura 2) e dos núcleos profundo do cerebelo.

Os resultados verificados para Ten-3 no hipocampo e cerebelo evidenciaram territórios e padrão de marcação totalmente distinta como constatado para o anticorpo comercial da Ten-3 da Novus Biologicals® que apresentou imunorreatividade localizada ao núcleo celular. Essa imunorreatividade foi verificada na camada granular do giro denteado do hipocampo (GrDG) e camada granular do córtex cerebelar (GrCb) (Figura 3). Por outro lado, o anticorpo para Ten-3 da Santa Cruz Biotechnology® evidenciou a presença de fibras imunorreativas com escassos corpos neuronais nas camadas CA2-CA4 e na camada polimórfica do giro denteado do hipocampo (PoDG), além de corpos neuronais imunorreativos na camada de células de Purkinje do córtex cerebelar (Pk) (Figura 3).

Neurônios fracamente imunomarcados foram verificados com o uso dos anticorpos anti-Ten-4 de ambas as marcas comerciais, sendo verificada correspondência nos territórios imunomarcados. Algumas áreas ilustram esta similaridade, tais como, nos neurônios da formação hipocampal como verificado nas camadas CA1-CA4 (Figura 4) enquanto que no cerebelo verificamos que a imunorreatividade na camada de Purkinje (Pk) foi evidente para Santa Cruz Biotechnology® (Figuras 4).

Além disso, através do desenho esquemático das proteínas TENS foi possível visualizar a localização do sítio de reconhecimento dos anticorpos da Santa Cruz

Biotechnology que foram selecionados para serem empregados no mapeamento neuroanatômico das TENSs devido a melhor definição da imunorreatividade (Figura 5). Ressaltamos que nesta ilustração foi utilizada a sequência de aminoácidos de humanos uma vez que os anticorpos desta marca comercial reconhecem epítomos presentes nos domínios das TENSs de humanos. Verificamos que os anticorpos anti-Ten-3 e anti-Ten-4 da marca comercial Santa Cruz Biotechnology® reconhecem aminoácidos presente na extremidade carboxi-terminal, entretanto distante do possível sítio de clivagem capaz de originar os TCAPs. Para Ten-2 verificamos que o anticorpo comercial é capaz de reconhecer os aminoácidos desta proteína voltados para a porção amino-terminal.

Teneurina-2

R&D Systems®

Santa Cruz Biotechnology®

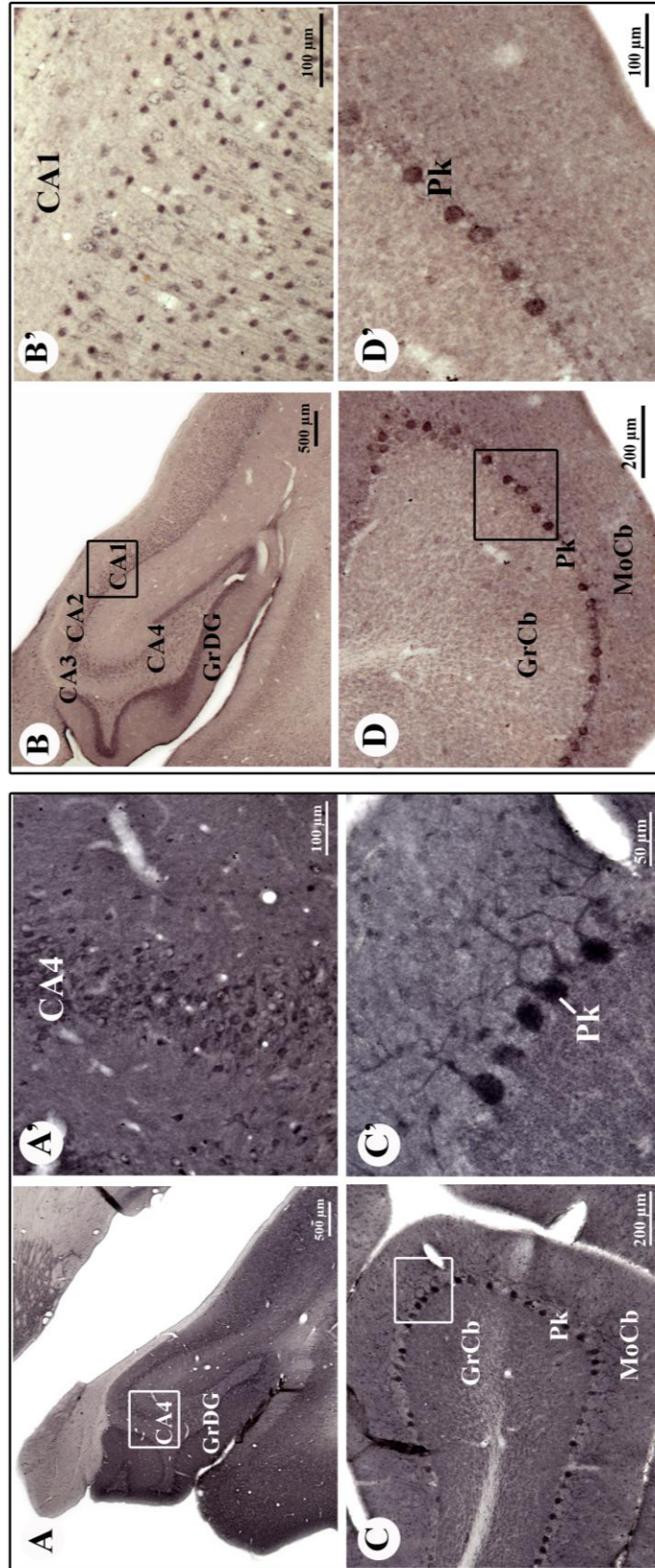


Figura 2. Distribuição de corpos neuronais com imunorreatividade relacionada à Ten-2 (Ten-2-LI) através dos anticorpos comerciais R&D Systems® e Santa Cruz Biotechnology® nas regiões hipocâmpais e cerebelares do *Sapajus spp.* Abreviaturas: CA1, camada CA1 do hipocampo; CA2, camada CA2 do hipocampo; CA3, camada CA3 do hipocampo; CA4, camada CA4 do hipocampo; GrCb, camada granular do cerebelo; GrDG, camada granular do giro denteado; MoCb, camada molecular do cerebelo ; Pk, camada de Purkinje do cerebelo.

Teneurina-3

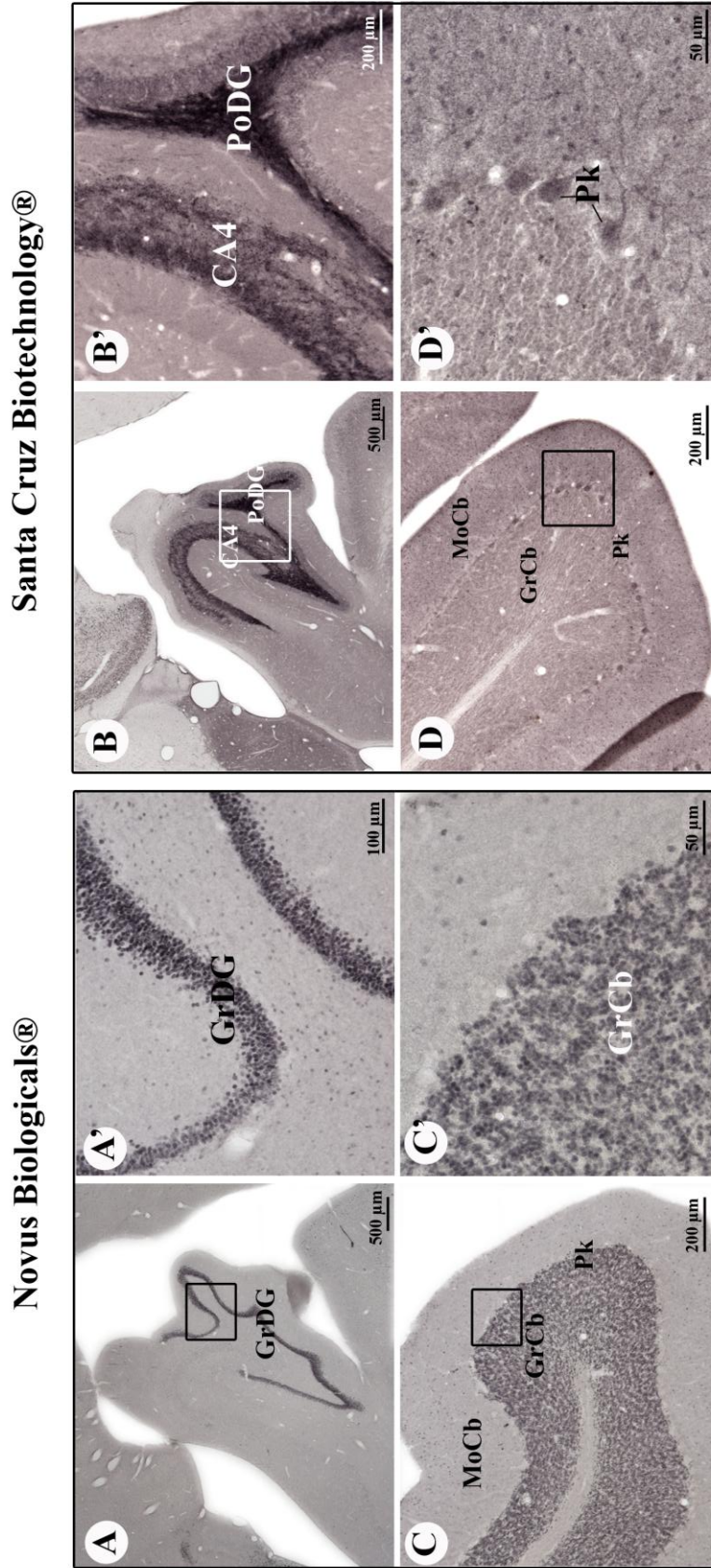


Figura 3. Distribuição de corpos neuronais com imunoreatividade relacionada à Ten-3 (Ten-3-LL) através dos anticorpos comerciais Novus Biologicals® e Santa Cruz Biotechnology® nas regiões hipocámpais e cerebelares do *Sapajus spp.* Fibras imunorreativas também foram evidentes com o uso do anticorpo comercial Santa Cruz Biotechnology®. Abreviaturas: CA4, camada CA4 do hipocampo; GrCb, camada granular do cerebelo; GrDG, camada granular do giro denteado; MoCb, camada molecular do cerebelo; Pk, camada de Purkinje do cerebelo; PoDG, camada polimórfica do giro denteado.

Teneurina-4

R&D Systems®

Santa Cruz Biotechnology®

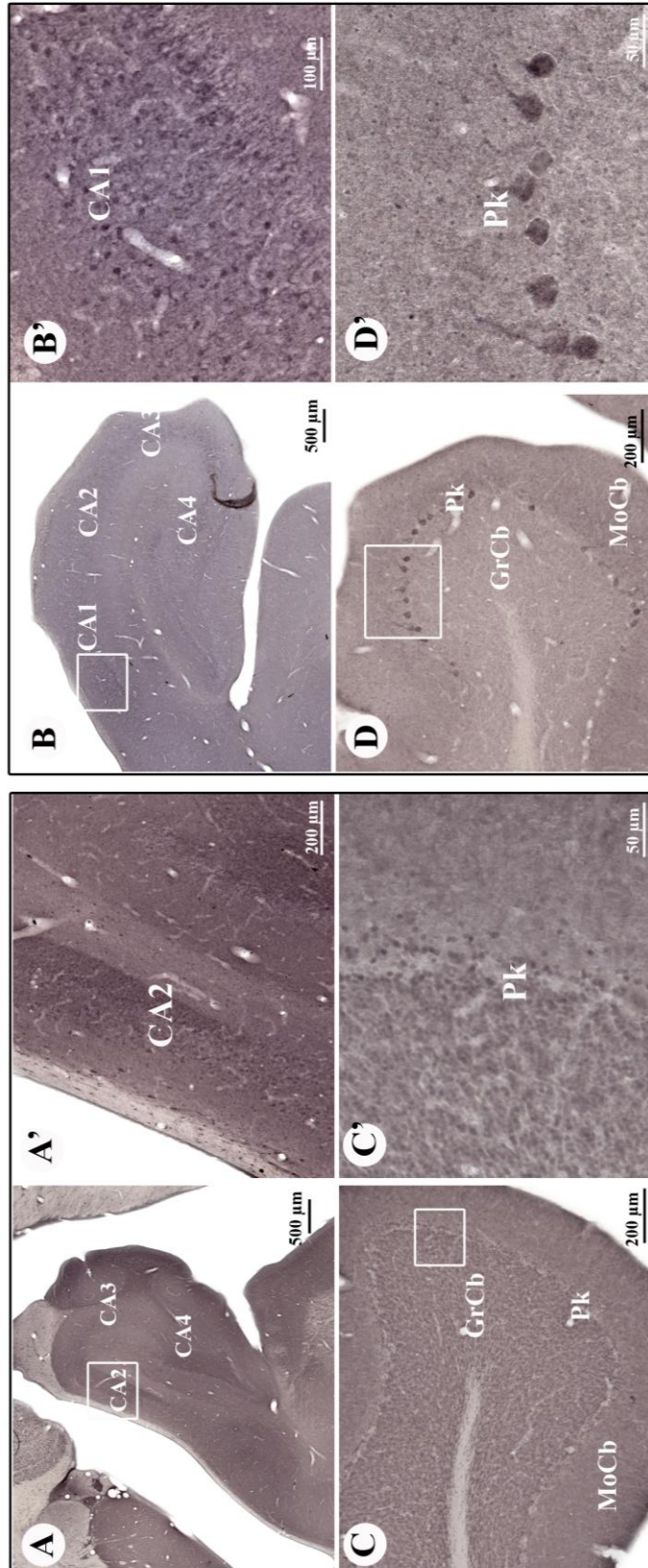


Figura 4. Distribuição de corpos neuronais e fibras com imunoreatividade relacionada à Ten-4 (Tn-4-LI) através dos anticorpos comerciais R&D Systems® e Santa Cruz Biotechnology® nas regiões hipocámpais e cerebelares do *Sapajus spp.* Abreviaturas: CA1, camada CA1 do hipocampo; CA2, camada CA2 do hipocampo; CA3, camada CA3 do hipocampo; CA4, camada CA4 do hipocampo; GrCb, camada granular do cerebelo; MoCb, camada molecular do cerebelo; Pk, camada de Purkinje do cerebelo.

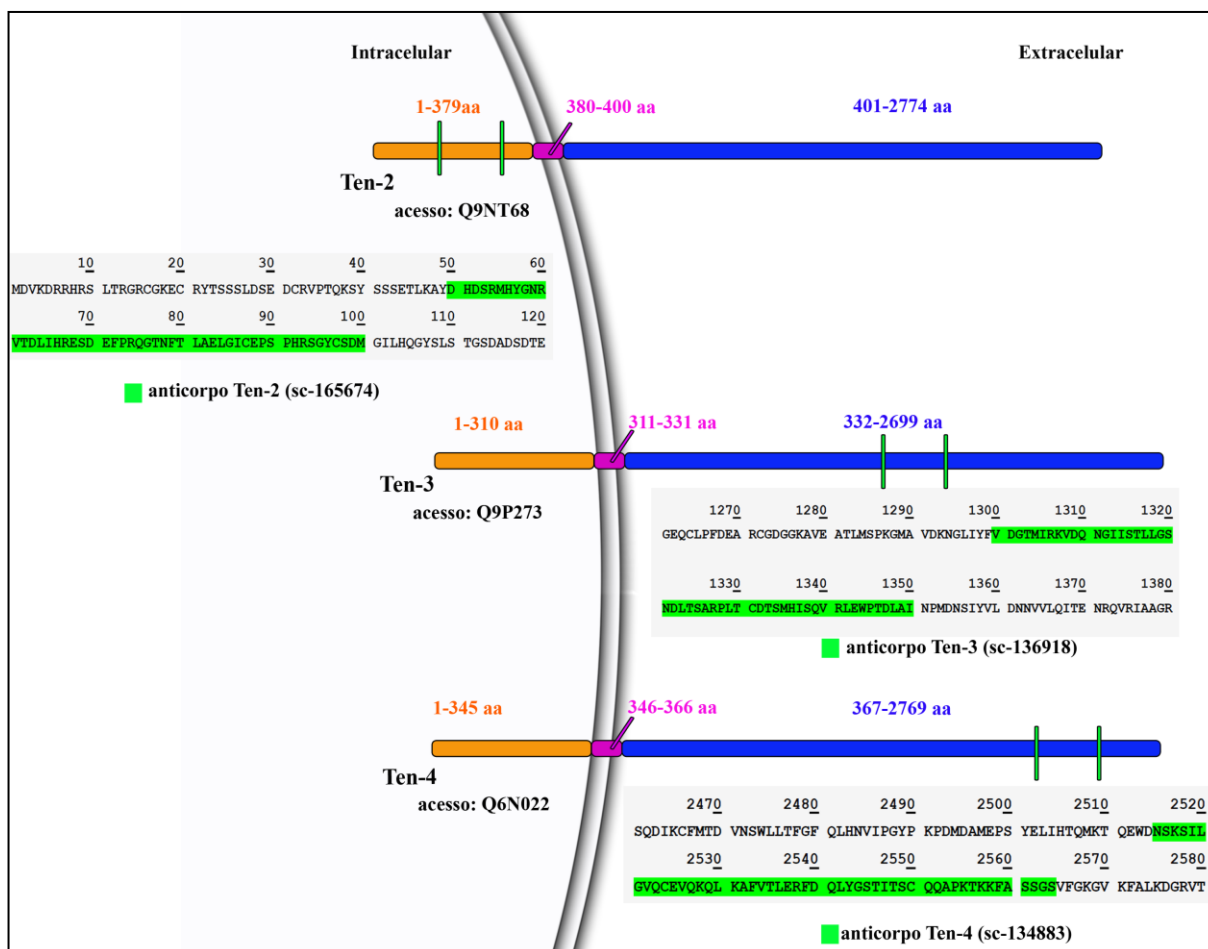


Figura 5. Ilustração do sítio de reconhecimento dos anticorpos anti-TENs. Em laranja, rosa e azul estão representados os domínios intracelular, transmembrana e extracelular, respectivamente, da Ten-2, Ten-3 e Ten-4 com seus tamanhos em termos de número total de aminoácidos. A sequência analisada corresponde as TENs de humanos sendo que o número de acesso está descrito para cada teneurina. Em verde destaca-se a sequência de aminoácidos reconhecida pelos anticorpos da marca comercial Santa Cruz Biotechnology® empregado neste estudo sendo verificado que ambos estão longe do sítio de clivagem capaz de gerar os respectivos TCAPs.

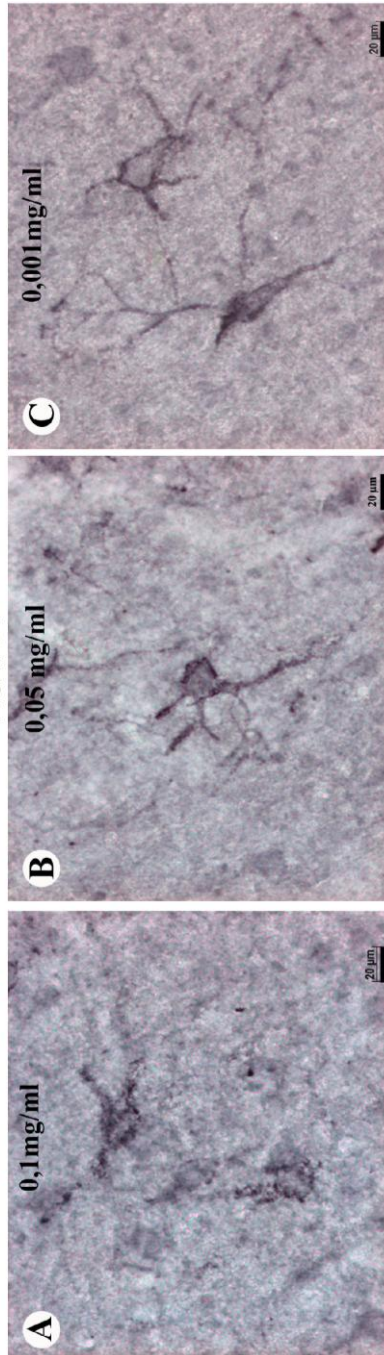
Além da análise da imunorreatividade advinda do uso de diferentes anticorpos primários comerciais que reconhecem regiões diferentes do mesmo antígeno também foi realizada a omissão do anticorpo primário que também é um dos métodos de controle da reação de imuno-histoquímica conhecido como controle negativo. Para tanto, séries de cortes histológicos do sistema nervoso central (SNC) foram submetidas ao protocolo da técnica de imuno-histoquímica retirando apenas a etapa de incubação do anticorpo primário. Em nossos

resultados verificamos que os anticorpos secundários comerciais anti-coelho, anti-cabra e anti-ovelha (Santa Cruz Biotechnology®) não resultaram em imunomarcações do SNC, confirmando a especificidade dos anticorpos secundários em reconhecer apenas os anticorpos primários empregados na técnica de imuno-histoquímica (dados não mostrados).

Uma vez definido o uso dos anticorpos da marca comercial Santa Cruz Biotechnology®, uma segunda análise quanto à especificidade destes foi realizada através do teste de adsorção. Para isso foi realizado a pré-incubação do anticorpo primário, cuja concentração já havia sido padronizada na titulação, em diferentes concentrações do seu peptídeo antes da incubação nos cortes histológicos. O teste de adsorção para a Ten-2 evidenciou que houve ausência de imunorreatividade em grande parte dos territórios neuronais analisados, entretanto, mesmo nas concentrações mais elevadas do peptídeo não houve a total saturação dos sítios de ligação do anticorpo primário anti-Ten-2 nos neurônios do córtex cerebral (Figura 6). O teste de adsorção para Ten-3 não mostrou imunomarcações, como observado na região hipotalâmica que apresentou intensa densidade de fibras imunorreativas para Ten-3 e, após adsorção houve ausência desta imunomarcação (Figura 6). Com relação à Ten-4 o anticorpo comercial anti-Ten-4 fornecido pela empresa Santa Cruz Biotechnology® não possui peptídeo correspondente o que impossibilitou a confirmação da interação do anticorpo com seu peptídeo pelo método de adsorção.

Teste de Adsorção

Ten-2



Ten-3

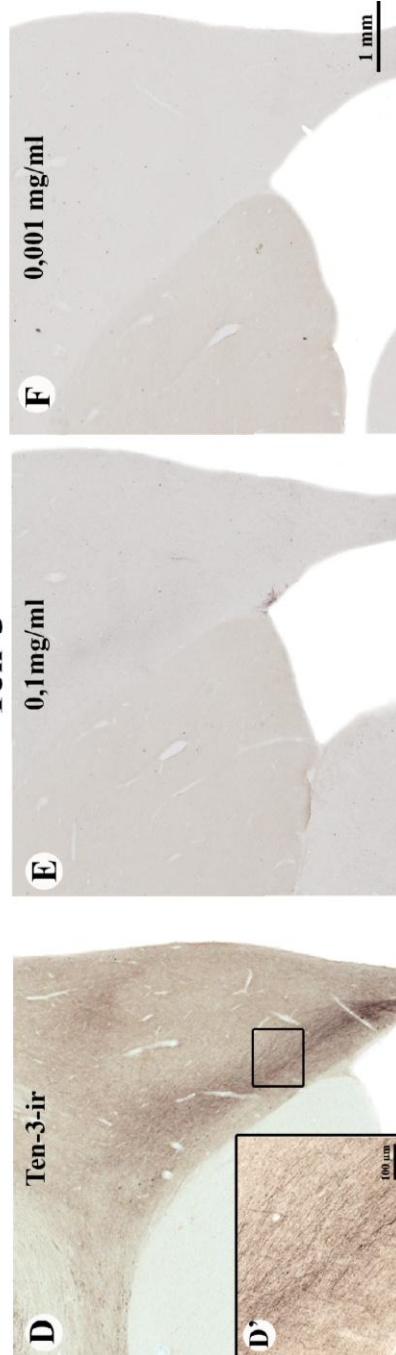


Figura 6. Teste de adsorção do anticorpo primário para Ten-2 e Ten-3. Fotomicrografias em campo claro evidenciando a camada piramidal interna do córtex cerebral (A-C) e a região do núcleo arqueado presente no hipotálamo (D-F). Na fotomicrografias de A-C verifica-se a imunorreatividade após adsorção do anticorpo primário anti- Ten-2 (Santa Cruz Biotechnology®). Em (D) é demonstrado intensa imunorreatividade em fibras presente no núcleo arqueado parte lateral (ArcL) observado em maior aumento em D'. Nas demais fotomicrografias (E e F) verificou-se ausência de imunomarcacão quando da adsorção do anticorpo primário anti- Ten-3 (Santa Cruz Biotechnology®).

4.2 Resultados do objetivo 1:

Distribuição da teneurina-2 e teneurina-4 no SNC de primatas não-humano (Sapajus spp)

Para o mapeamento neuroanatômico da distribuição da proteína Ten-2 e Ten-4 foi realizada a submissão de séries completas de cortes histológicos do SNC de três animais à técnica de imuno-histoquímica pelo método de imunoperoxidase indireta. O mapeamento da distribuição da proteína Ten-2 foi realizada através do uso do anticorpo comercial anti-Ten-2 (165674, Santa Cruz Biotechnology®) na concentração de 1:100, e para Ten-4 foi empregado o anticorpo comercial anti-Ten-4 (H-50/134883, Santa Cruz Biotechnology®) na concentração de 1:1000.

A distribuição de fibras (campos terminais e de passagem) com imunorreatividade relacionada à Ten-2 (teneurina-2-“like immunoreactivity”- Ten-2-LI) não foi evidente, desta maneira não foi possível adotar o padrão semi-quantitativo de distribuição de fibras como adotado para as demais TENs analisadas. Apesar da ausência de fibras Ten-2-LI a imunomarcagem foi evidenciada em dendritos e porção inicial de axônio que estiveram entremados a corpos neuronais imunomarcados, como notado no núcleo facial (7N) e núcleo pálido ventral (VP) (Figura 7). A distribuição de corpos e prologamentos neuronais (dendritos e segmento inicial do axônio) Ten-2-LI são mostradas na tabela 2.

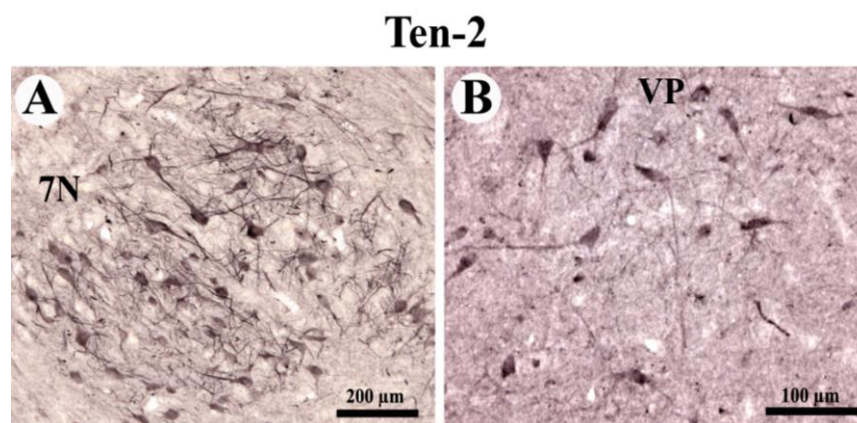


Figura 7. Distribuição dos prolongamentos (dendritos/segmento inicial de axônio) e corpos neuronais com imunorreatividade relacionada à Ten-2 (Ten-2-LI). Em (A) e (B) fotomicrografias em campo claro do núcleo facial (7N) e pálido ventral (VP).

A distribuição de fibras nervosas Ten-4 imunorreativas (teneurina-4-“like immunoreactivity” - Ten-4-LI) mostrou-se ampla, enquanto que a presença de corpos neuronais imunorreativos foi restrita a poucas regiões, principalmente concentrada em alguns territórios do córtex cerebral, tronco encefálico e cerebelo. Para a análise da densidade de fibras foi adotado o padrão semi-quantitativo de pouca, moderada e intensa densidade (Figura 8). Na tabela 3 são mostrados os territórios neuronais imunorreativos para Ten-4 no SNC do *Sapajus spp.*

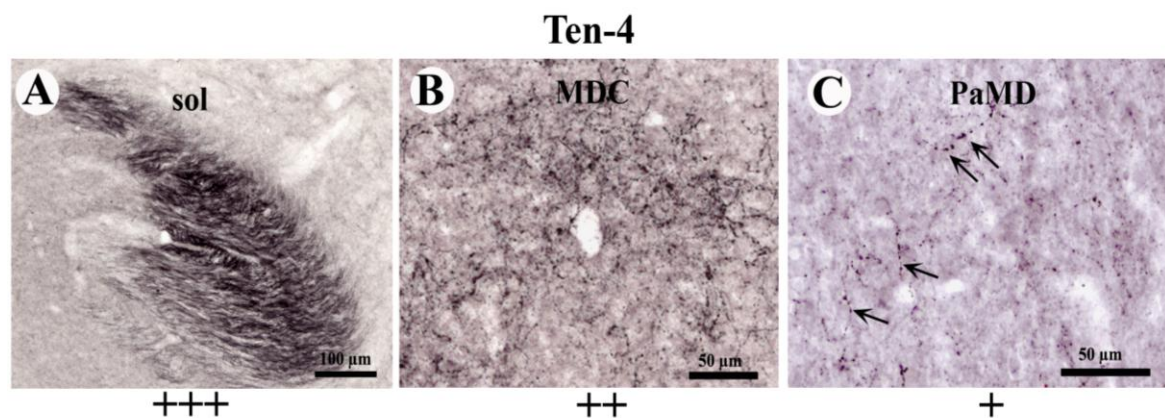


Figura 8. Representação da densidade de fibras com imunorreatividade relacionada à Ten-4 (Ten-4-LI). Fotomicrografias em campo claro demonstrando o padrão de três densidades de fibras em diferentes regiões do sistema nervoso central do *Sapajus spp.* (A) +++, intensa densidade; (B) ++, moderada densidade; (C) +, pouca densidade. Abreviaturas: sol, trato solitário; MDC, núcleo talâmico mediodorsal parte central; PaMD, núcleo paraventricular magnocelular divisão dorsal.

4.2.1. Teneurina-2 no SNC do *Sapajus spp*

Telencéfalo. Na região do córtex cerebral nota-se a presença de corpos neuronais Ten-2-LI principalmente nas células das camadas piramidal interna e externa. Este padrão de imunorreatividade mostrou associado à membrana plasmática, assim como distribuído no citosol dos perfis neuronais (Figura 9). Na área amigdalóide anterior e núcleo medial da amígdala foram constatados poucos neurônios e prolongamentos neuronais Ten-2-LI, assim como em algumas áreas dos núcleos da base como pálido ventral (Figura 7) e região septal. Uma evidente presença de corpos neuronais Ten-2-LI foi notada na formação hipocampal nas camadas CA1 a CA4 e camada polimórfica (PoDG), além de granular do giro denteado (GrDG) (Figura 9). Discreta presença de prolongamentos neuronais Ten-2-LI foram observados na CA1 a CA4.

Diencéfalo

Tálamo e Subtálamo. Somente foram verificados corpos neuronais Ten-2-LI nos núcleos geniculado lateral (Figura 10) e medial e núcleo subtalâmico.

Hipotálamo. Não foram observados resultados relevantes tanto para corpos neuronais quanto para prolongamentos imunorreativos à Ten-2, sendo apenas notada discreta imunorreatividade para corpos neuronais no núcleo supra-óptico.

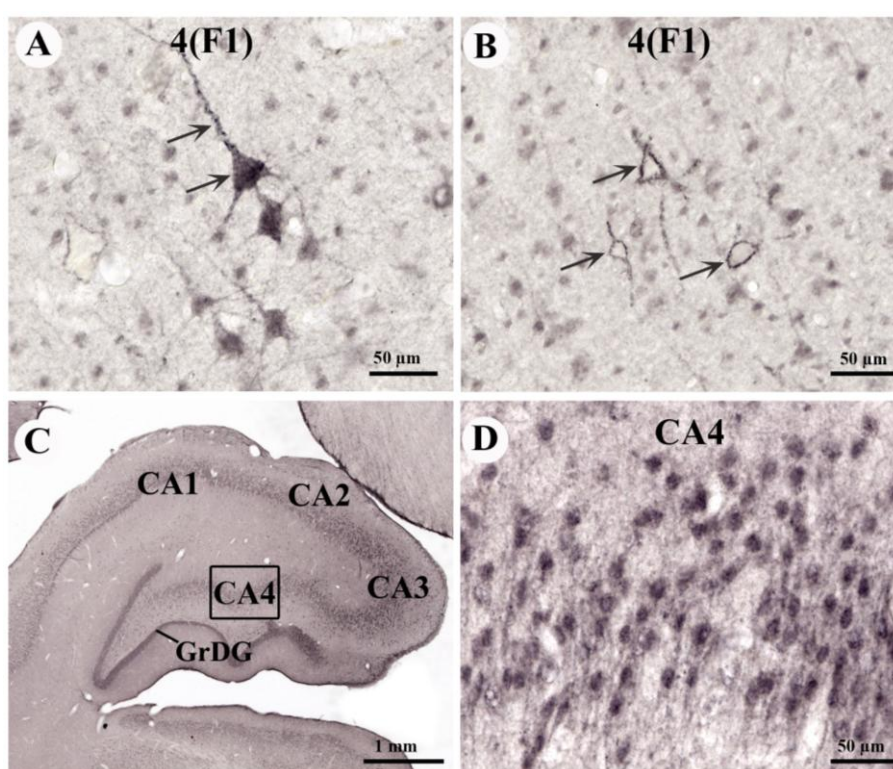


Figura 9. Distribuição de corpos neuronais com imunorreatividade relacionada à Ten-2 (Ten-2-LI) em regiões telencefálicas. As fotomicrografias em campo claro como verificado em (A) e (B) mostram neurônios da camada piramidal interna do córtex cerebral do *Sapajus spp.* As setas indicam a imunomarcagem encontrada no citosol, prolongamentos neuronais e na membrana plasmática do corpo neuronal. Em (C) formação hipocampal imunomarcada com destaque na figura (D) para neurônios Ten-2-LI na camada CA4 do hipocampo. Abreviaturas: 4(F1), área 4 do córtex (motor primário); CA1, camada CA1 do hipocampo; CA2, camada CA2 do hipocampo; CA3, camada CA3 do hipocampo; GrDG, camada granular do giro denteado.

Tronco encefálico. A presença de corpos neuronais Ten-2-LI foi destacada na porção mesencefálica, em particular no núcleo oculomotor (3N) (Figura 10) e núcleo rubro (RMC).

Nas porções de ponte e bulbo, neurônios imunorreativos foram evidentes nos núcleos cocleares, núcleo facial (7N) e núcleo acessório (11N) (Figura 10). Os demais territórios do tronco encefálico com presença de Ten-2-LI estão descritos na tabela 2. Ressaltamos que os resultados da distribuição de prolongamentos imunorreativos foram evidentes no núcleo facial (7N) e núcleo acessório (11N).

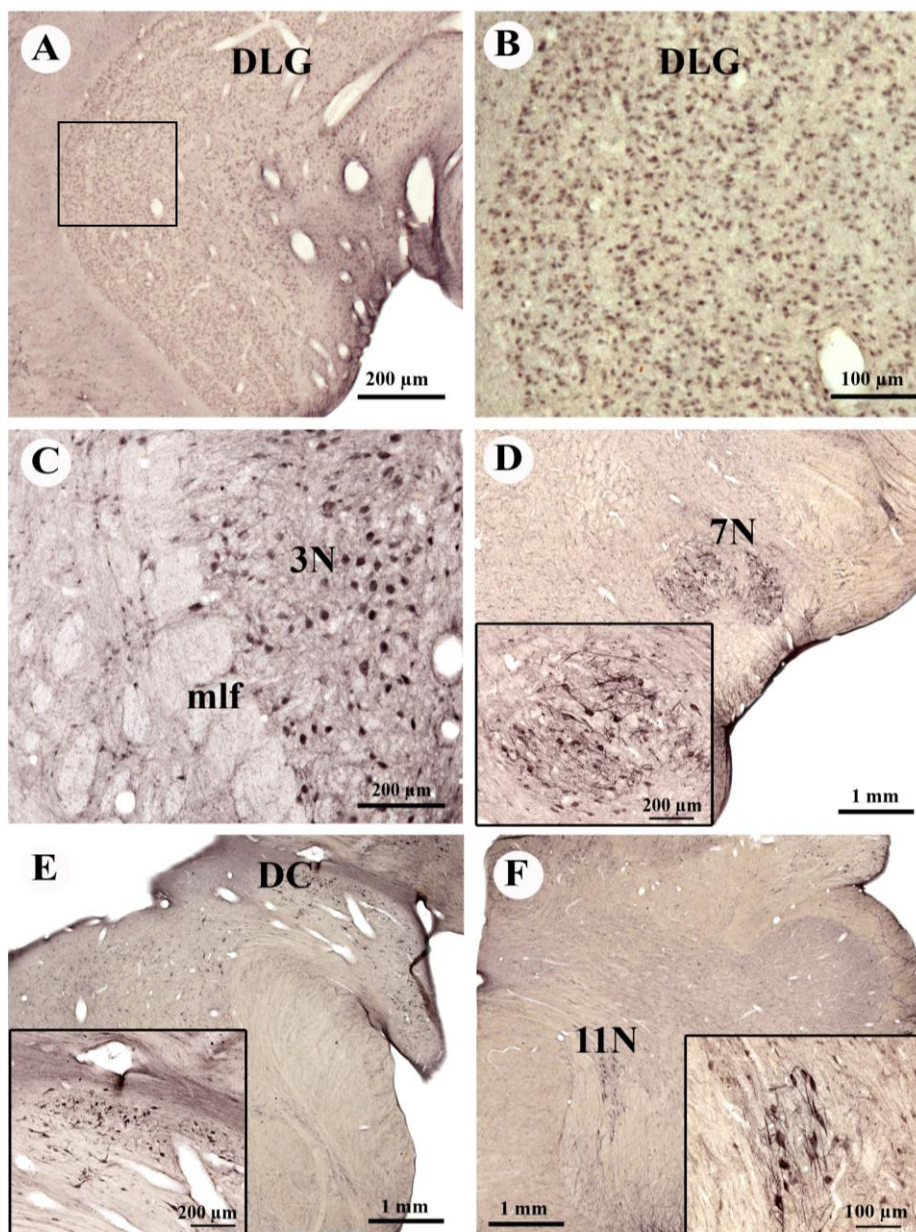


Figura 10. Distribuição de prolongamentos e corpos neuronais Ten-2-LI em áreas diencefálicas e do tronco encefálico *do Sapajus spp.* As fotomicrografias em campo claro como verificado em (A) evidenciam neurônios Ten-2-LI no núcleo geniculado lateral dorsal (DLG), destaque dos neurônios na Figura (B); em (C) neurônios Ten-2-LI no núcleo oculomotor (3N); em (D) neurônios e prolongamentos neuronais Ten-2-LI no núcleo facial (7N), destaque em maior aumento; em (E) e (F) neurônios e prolongamentos Ten-2-LI no núcleo coclear dorsal (DC), destaque em maior aumento e núcleo acessório (11N), destaque em maior aumento. Abreviaturas: mlf, fascículo longitudinal medial.

Cerebelo. Corpos neuronais Ten-2-LI foram encontrados na camada de células de Purkinje (Pk) (Figura 2) e nos núcleos profundos do cerebelo.

Medula espinal. A distribuição de neurônios e prolongamentos Ten-2-LI foi evidente na porção ventral de todos os segmentos da medula espinal, como constatado nas lâminas medulares V-IX (Figura 11).

Hipófise. Não foi constatada imunorreatividade para Ten-2.

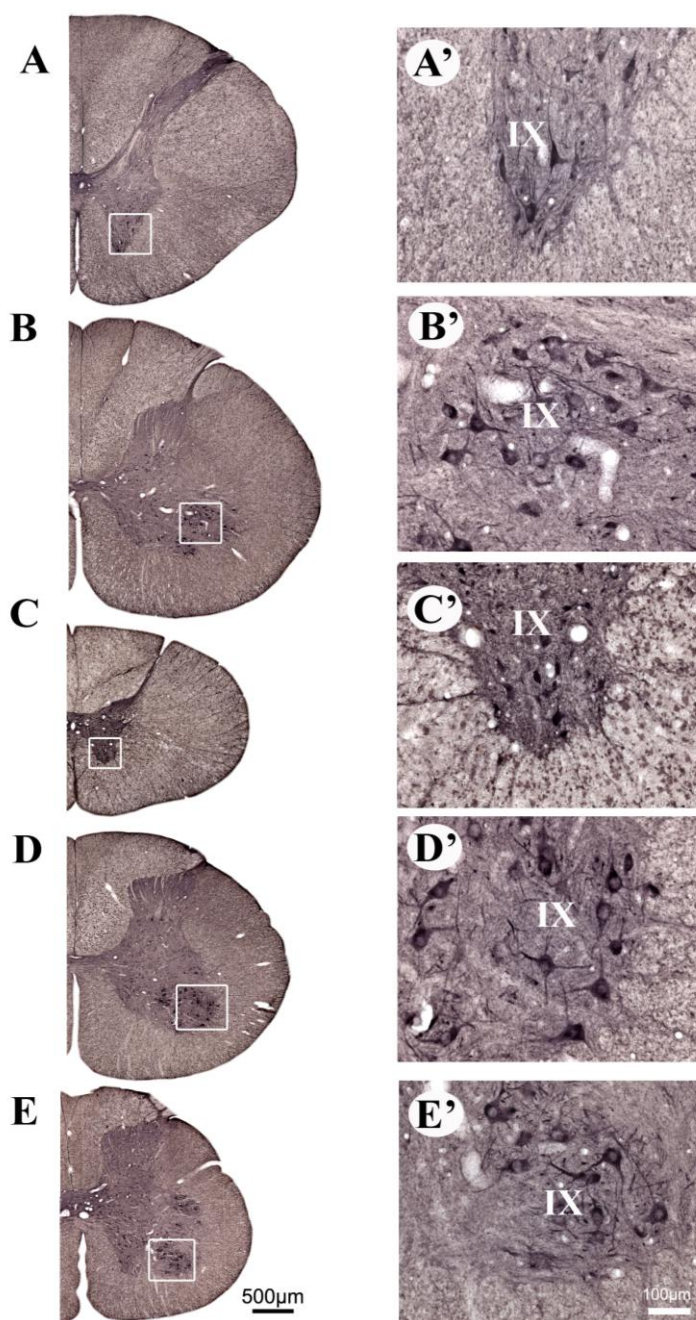


Figura 11. Distribuição de corpos e prolongamentos neuronais Ten-2-LI na medula espinal do *Sapajus spp.* As fotomicrografias em campo claro mostram na coluna à esquerda uma visão panorâmica dos segmentos cervical alto (A), cervical baixo (B), torácica (C), lombar (D) e sacral (E). Na coluna à direita é evidenciado em maior aumento as áreas delimitadas na coluna esquerda que mostram corpos e prolongamentos neuronais Ten-2-LI na lâmina IX de cada segmento medular. Organização citoarquitetônica de acordo com REXED (1952).

Regiões/núcleos	Ten-2 Corpo/dendritos-axônio	Regiões/núcleos	Ten-2 (Corpo /dendritos-axônio)
Telencéfalo		n. oculomotor parvicelular	+/+
Córtex cerebral		substância negra lateral	+/+
área 1 do córtex (somatosensorial)	+/-	substância negra compacta	+/+
área 2 do córtex (somatosensorial)	+/-	substância negra reticular	+/+
área 4 (F1) (motor primário)	+/-	colículo superior	+/-
área 6M (suplemento motor)	+/-	n. dorsal da rafe	+/-
área 6 dorsorostral	+/-	n. mediano da rafe	+/-
área 6 dorsocaudal	+/-	n. mesencefálico trigeminal	+/-
área visual	+/-	Ponte e bulbo	
Amígdala		n. motor do trigêmio	+/-
área amigdalóide anterior	+/-	n. vestibular espinal	+/-
n. medial da amígdala	+/-	n. vestibular superior	+/-
Núcleos da Base		n. vestibular medial	+/-
pálido ventral	+/+	campo retrorubral	+/+
globo pálido externo	+/+	n. coclear dorsal	+/+
globo pálido interno	+/-	n. coclear ventral	+/+
Região Septal		n. paragigantocelular dorsal	+/-
substantia innominata	+/-	n. paragigantocelular lateral	+/-
n. basal (Meynert)	+/-	n. reticular gigantocelular	+/-
n. horizontal da banda diagonal	+/-	n. reticular lateral	+/+
Formação Hipocampal		n. cuneiforme	+/+
camada CA4 do hipocampo	+/+	n. grácil	+/+
camada CA3 do hipocampo	+/+	n. facial	+/+
camada CA2 do hipocampo	+/+	n. acessório	+/+
camada CA1 do hipocampo	+/+	n. hipoglosso	+/+
camada polimórfica do giro denteado	+/-		
camada granular do giro denteado	+/-	Cerebelo	
Diencéfalo		Córtex	
Tálamo		camada de Purkinje	+/-
n. geniculado lateral	+/-	Núcleos cerebelares	
n. geniculado medial	+/-	n. cerebelar medial	+/-
Subtálamo		n. interpósito	+/-
núcleo subtalâmico	+/-	n. cerebelar lateral	+/-
Hipotálamo		Medula espinal	
Zona lateral		lâmina V	+/+
n. supraoptico	+/-	lâmina VI	+/+
Tronco encefálico		lâmina VII	+/+
Mesencefalo		lâmina VIII	+/+
n. tegmental pedunculopontine	+/-	lâmina IX	+/+
n. rubro, parte magnocelular	+/+	Hipófise	
n. oculomotor	+/+	lobo anterior	-/-
		lobo posterior	-/-
		lobo intermédio	-/-

Tabela 2. Distribuição de corpos e prolongamento neuronais com imunorreatividade relacionada à Ten-2 (Ten-2-LI) no SNC do *Sapajus spp.* Sinal de (+) presença ou ausência (-) de corpos e prologamentos neuronais Ten-2-LI.

4.2.2 *Teneurina-4* no SNC do *Sapajus spp*

Telencéfalo. Pouco a moderada densidade de fibras nervosas com imunorreatividade relacionada à Ten-4 (Ten-4-LI) estavam concentradas na área amigdalóide, na região correspondente ao núcleo central da amígdala (Ce) e área amigdalohipocampal (AHiMC), sendo que nesta área também foram encontrados corpos neuronais imunopositivos (Figura 12). Fibras nervosas imunorreativas com densidade que oscilavam de moderada a intensa estavam presentes nos núcleos da base, em particular no pálido ventral (VP) e globo pálido externo (EGP) (Figura 12). Similar disposição de fibras nervosas imunorreativas foram

observadas na região septal como verificado no núcleo septal lateral parte ventral (LSV), na substância inominata (SIB), nas ilhas de Calleja (ICj) e no núcleo basal (Meynert) (B) (Figuras 12 e 13). Corpos neuronais imunorreativos também foram encontrados no núcleo amigdalóide cortical ventral (VCo), no núcleo caudado (Cd), putame (Pu) e globo pálido interno (IGP). Na formação hipocampal verificamos discreta presença de corpos neuronais Ten-4-LI nas camadas CA1 a CA4 do hipocampo, além da camada granular do giro denteado (GrDG).

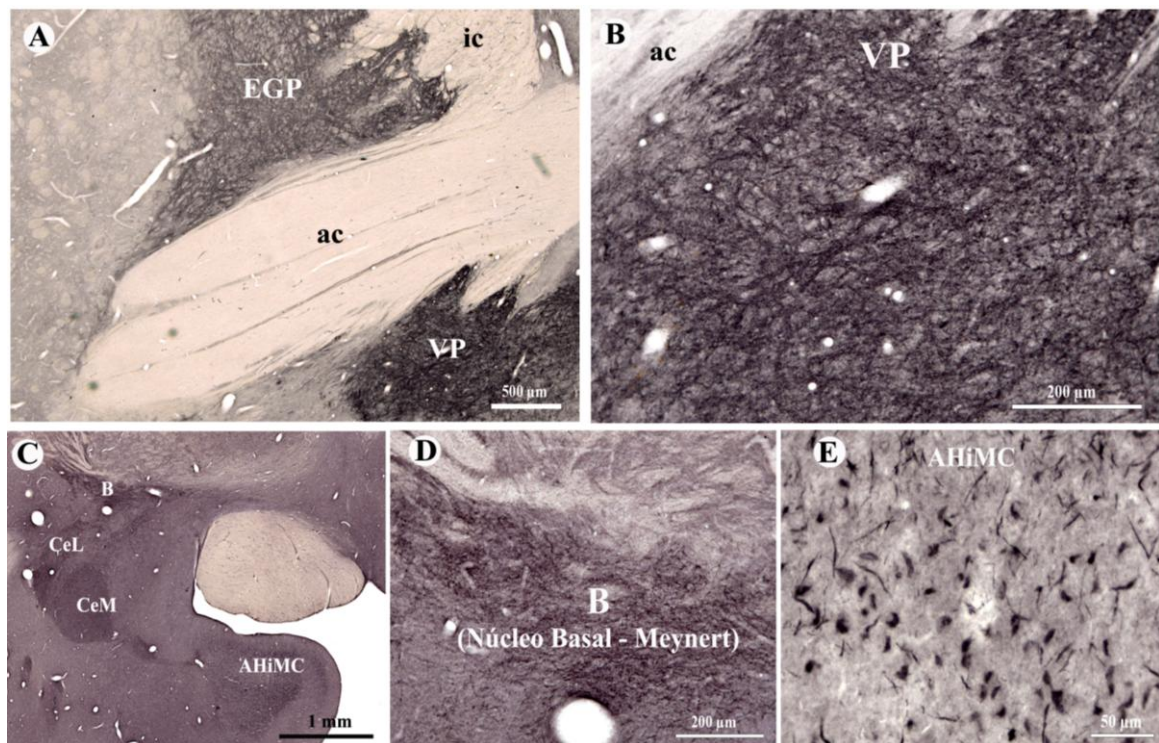


Figura 12. Distribuição de fibras e corpos neuronais Ten-4-LI em regiões telencefálicas do primata não-humano *Sapajus spp.* Em (A) fotomicrografia em campo claro evidenciando a distribuição panorâmica da Ten-4 em territórios telencefálicos. Em (B) nota-se a presença de intensa densidade de fibras nervosas Ten-4-LI no pálido ventral (VP). Em (C) visão panorâmica da distribuição de fibras Ten-4-LI, evidenciando na figura (D) moderada densidade no núcleo Basal de Meynert. Em (E) é verificada a área amigdalohipocampal (AHiMC) com poucas fibras e corpos neuronais Ten-4-LI. Abreviaturas: ac, comissura anterior; CeL, núcleo amigdalóide central divisão lateral; CeM, núcleo amigdalóide central divisão medial; EGP, globo pálido externo; ic, cápsula interna.

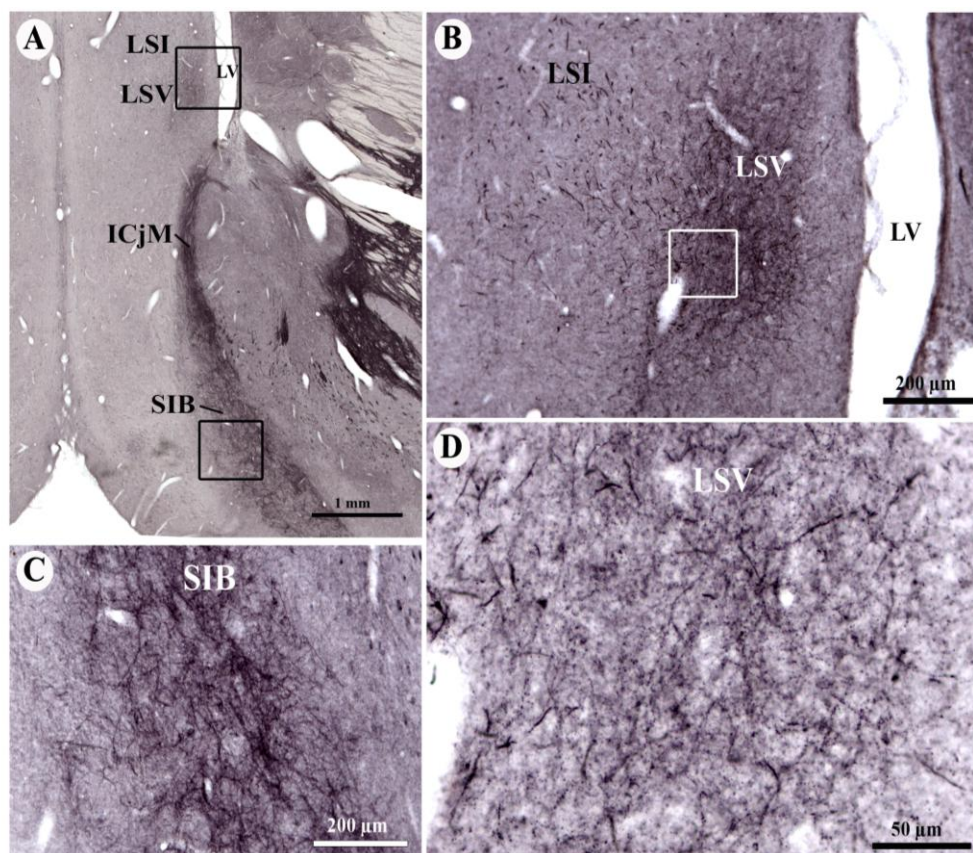


Figura 13. Distribuição de fibras nervosas Ten-4-LI em regiões telencefálicas do primata não-humano *Sapajus spp.* Em (A) fotomicrografia em campo claro evidenciando a distribuição panorâmica da Ten-4 em territórios telencefálicos. Em (B) nota-se a distribuição de pouca densidade de fibras Ten-4-LI no núcleo septal lateral parte intermédia (LSI); enquanto distribuição moderada de fibras nervosas pode ser observada no núcleo septal lateral parte ventral (LSV), evidenciada com maior resolução em (D). Em (C) distribuição moderada a intensa de fibras nervosas Ten-4-LI na substância inominata (SIB). Abreviaturas: ICjM, ilhas de Callejas; LV, ventrículo lateral.

Diencefalo

Tálamo e Subtálamo. Pouca a moderada concentração de fibras nervosas Ten-4-LI foram observadas no núcleo talâmico mediodorsal parte central (MDC) (Figura 14). Corpos neuronais Ten-4-LI foram localizados no núcleo talâmico ventral lateral (VL), núcleo reticular do tálamo (Rt) e no núcleo geniculado lateral dorsal (DLG) (Figura 14) e medial (MG) e região no núcleo subtalâmico (STh).

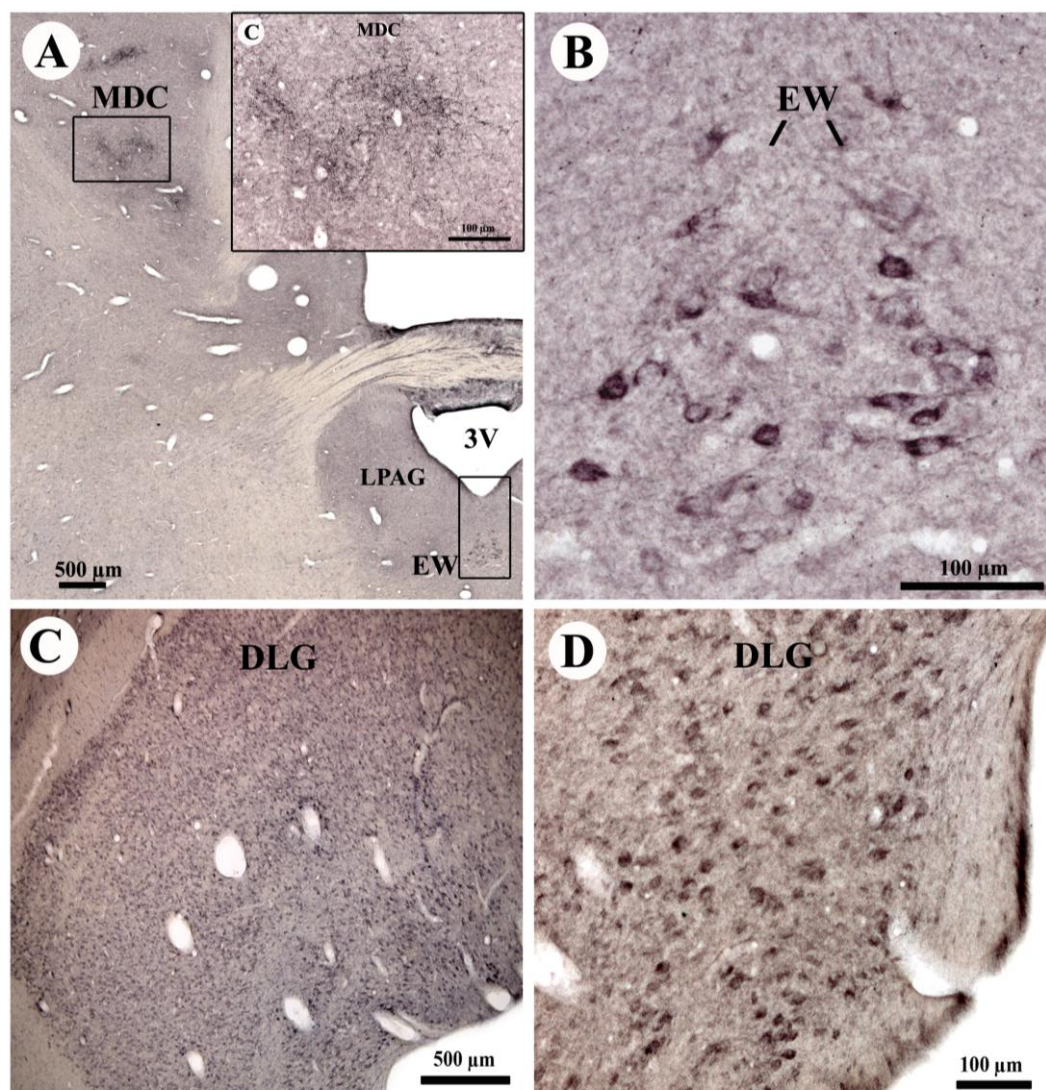


Figura 14. Distribuição de fibras nervosas e corpos neuronais Ten-4-LI em regiões diencefálicas e mesencefálicas do primata não-humano *Sapajus spp.* Em (A) fotomicrografias em campo claro evidenciando a distribuição panorâmica da Ten-4 nestes territórios, destacando a região do núcleo talâmico mediodorsal parte central (MDC) com pouca a moderada concentração de fibras imunorreativas. Em (B) nota-se a presença de corpos neuronais Ten-4-LI no núcleo de Edinger-Westphal (EW). Em (C) são mostrados corpos neuronais exibindo Ten-4-LI no núcleo geniculado lateral dorsal (DLG), mostrado em maior resolução em (D). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; LPAG, substância cinzenta periaquedutal lateral.

Hipotálamo. Pouca a moderada densidade de fibras Ten-4-LI foram presentes na zona periventricular do hipotálamo, em particular no núcleo arqueado lateral (ArcL), núcleo arqueado medial (ArcM), núcleo paraventricular magnocelular (PaM) e parvicelular (PaP). Na zona lateral e medial do hipotálamo foram observadas poucas fibras nervosas Ten-4-LI. É interessante ressaltar que as fibras nervosas Ten-4-LI apresentaram padrão morfológico

característico de fibras de passagem, porém sendo constatada em poucos territórios hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos a presença de fibras varicosas que são sugestivas de possíveis campos terminais sinápticos.

Tronco encefálico. A maior concentração de corpos imunorreativos foi observada na porção mesencefálica, em particular, no núcleo interpeduncular (IP), núcleo oculomotor (3N), no colículo superior (SC), e núcleo de Edinger-Westphal (EW) (Figura 14). Na porção correspondente a ponte e bulbo, os corpos neuronais imunorreativos foram notados no complexo olivar inferior (núcleo olivar inferior subnúcleo A, IOA) (Figura 15), núcleos vestibulares, núcleos cocleares, em particular no núcleo coclear ventral anterior (VCA) (Figura 15), núcleos pontinos, campo retrorubral (RRF), núcleo paragigantocelular dorsal (DPGi), núcleo reticular gigantocelular (Gi), núcleo cuneiforme (ECu) e grácil (Gr). Em relação à distribuição de fibras nervosas Ten-4-LI foram observadas moderada a intensa densidade de fibras no trato solitário (sol), trato espinal do nervo trigêmeo (sp5), núcleo reticular lateral parte subtrigeminal (LRtS5) (Figura 15) e no núcleo do nervo glossofaríngeo (9n). Nos demais territórios do tronco encefálico foram evidenciados a presença de moderada a pouca densidade de fibras Ten-4-LI.

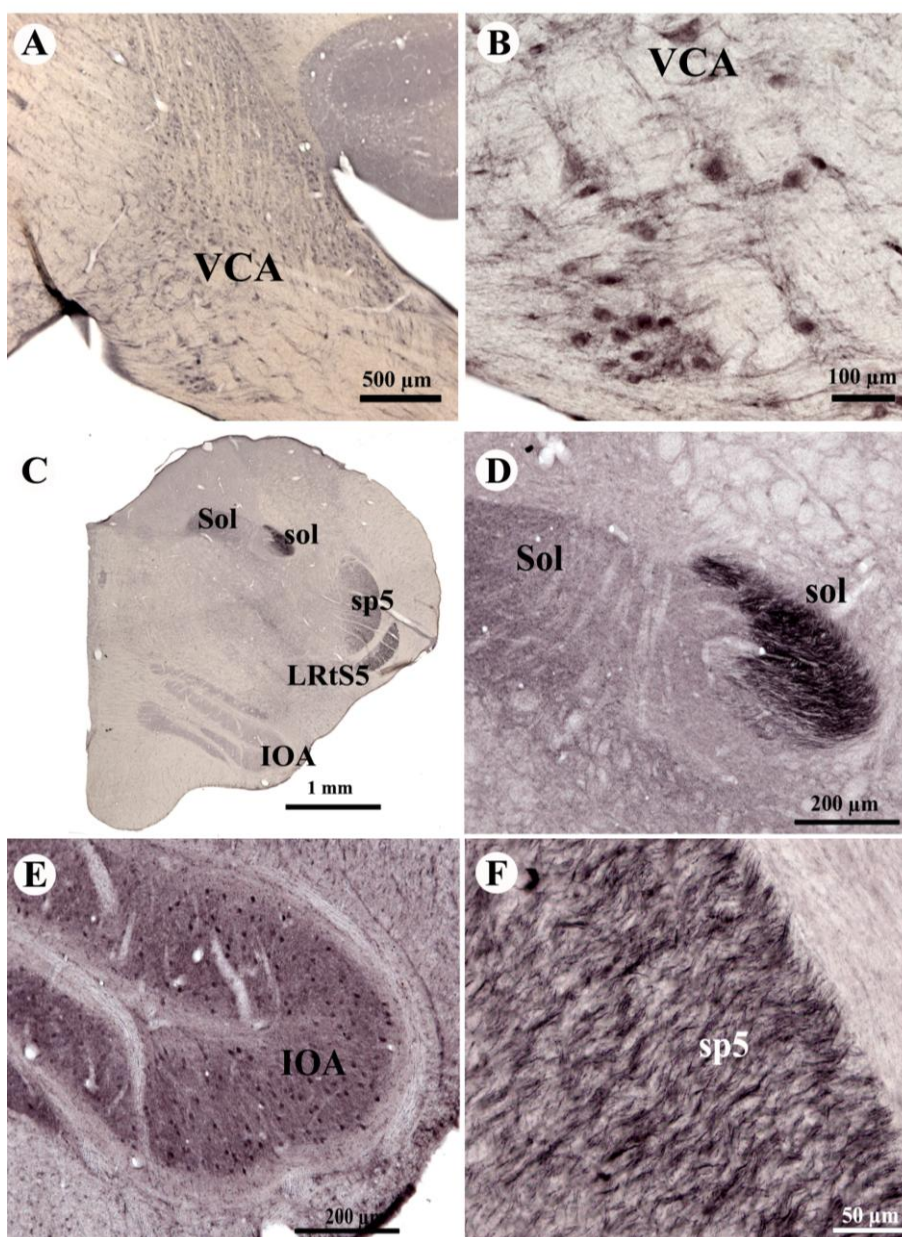


Figura 15. Distribuição de fibras e corpos neuronais Ten-4-LI no tronco encefálico do primata não-humano *Sapajus spp.* Em (A) fotomicrografia em campo claro demonstrando a distribuição da Ten-4-LI no núcleo coclear ventral anterior (VCA), evidenciado em maior aumento em B. Em (C) fotomicrografia em campo claro referente a distribuição panorâmica da Ten-4-LI, notando-se intensa distribuição de fibras Ten-4-LI no trato solitário (sol) em (D) e no trato espinal do nervo trigêmeo (sp5) em (F). Em (E) é mostrado corpos neuronais Ten-4-LI no núcleo olivar inferior subnúcleo A (IOA). Abreviaturas: LRtS5, núcleo reticular lateral parte subtrigeminal; Sol, núcleo solitário.

Cerebelo. Corpos neuronais Ten-4-LI foram observados na camada de células de Purkinje (Pk) e nos núcleos cerebelares medial, lateral e interpósito, não sendo evidente a presença de fibras imunorreativas (Figura 16).

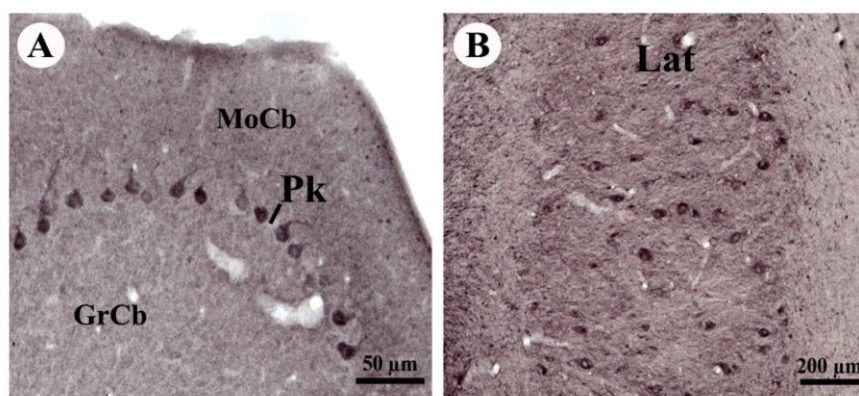


Figura 16. Distribuição de prolongamentos e corpos neuronais Ten-4-LI no cerebelo do primata não-humano *Sapajus spp.* As fotomicrografias em campo claro vistas em (A) e (B) mostram corpos neuronais imunorreativos na camada de células de Purkinje do cerebelo (Pk) e no núcleo cerebelar lateral (Lat). Abreviaturas: GrCb, camada granular do cerebelo; MoCb, camada molecular do cerebelo.

Medula espinal. Em todas as lâminas medulares foram verificadas fibras nervosas Ten-4-LI, porém maior densidade foi encontrada na lâmina X seguida das lâminas I, II e III. A presença de corpos neuronais imunorreativos foi restrita as lâminas VIII e IX (Figura 17).

Hipófise. Escassas células Ten-4-LI foram visualizadas no lobo intermédio (dados não mostrados).

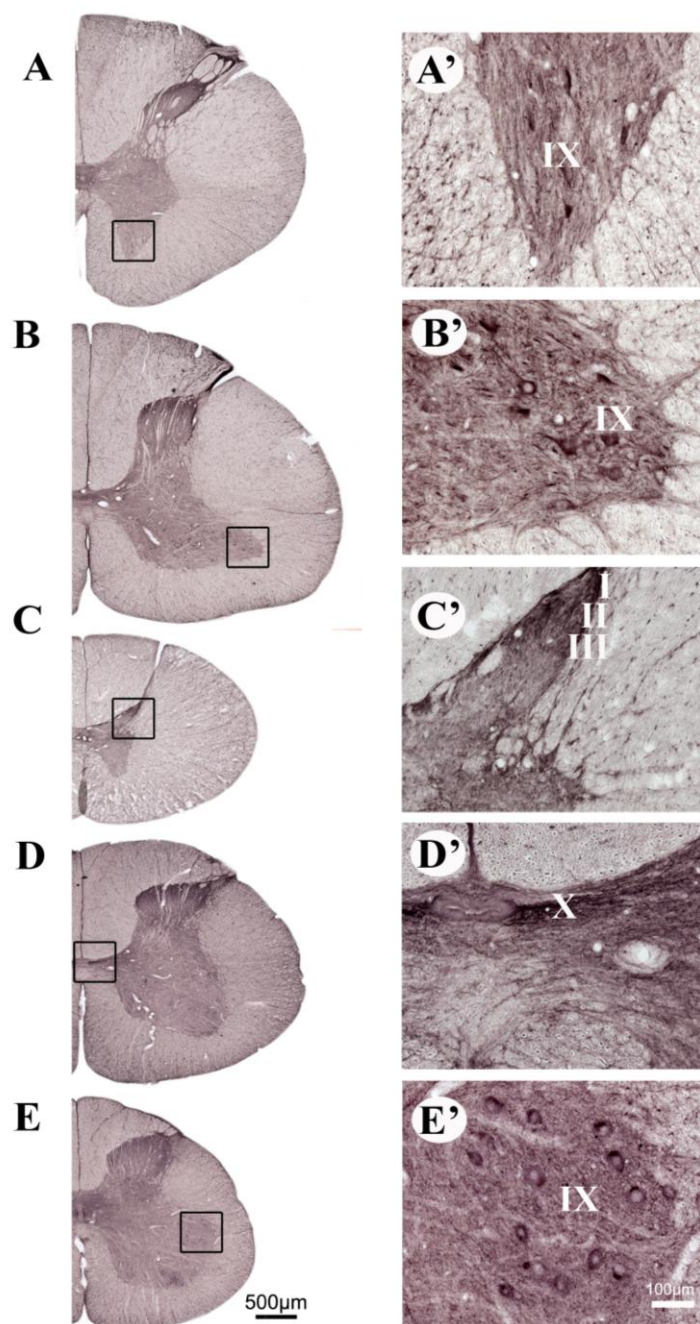


Figura 17. Distribuição de corpos neuronais e fibras Ten-4-LI na medula espinal do *Sapajus spp.* As fotomicrografias em campo claro mostram na coluna à esquerda uma visão panorâmica dos segmentos cervical alto (A), cervical baixo (B), torácica (C), lombar (D) e sacral (E). Na coluna à direita é evidenciado em maior aumento as áreas delimitadas na coluna esquerda que mostram corpos e fibras Ten-4-LI. As fotomicrografias em campo claro (A') (B') e (E') mostram corpos neuronais Ten-4-LI na lâmina IX, enquanto que (C') e (D') demonstram fibras Ten-4-LI nas lâminas I,II,III e X, respectivamente. Organização citoarquitetônica de acordo com REXED (1952).

Regiões/núcleos	Ten-4 (Corpo/fibras)	Regiões/núcleos	Ten-4 (Corpo / fibras)
Telencéfalo		Zona lateral	
Córtex cerebral		n. tuberal lateral	-/+
área 1 do córtex (somatosensorial)	+/-	área hipotalâmica lateral	-/+
área 4 do córtex (motor primário)	+/-	n. perifornical	-/+
área 6/32 do córtex	+/-		
área 6M (suplemento motor)	+/-	Tronco encefálico	
área 6 dorsocaudal	+/-	Mesencéfalo	
área 6 ventral	+/-	área tegmental ventral	-/+
área 8B do córtex	+/-	substância periaqueductal lateral	-/+
córtex entorrinal	-/+	substância periaqueductal dorsolateral	-/+
perialocórtex orbital	+/-	substância periaqueductal dorsomedial	-/+
Amígdala		substância periaqueductal ventrolateral	-/+
área amigdalóide anterior	-/+	n. tegmental pedunculopontine	-/+
n. central da amígdala	-/+	n. tegmental dorsal, central	-/+
n. medial da amígdala	-/+	n. tegmental dorsal, lateral	-/+
n. basomedial da amígdala	+/>+	n. interpeduncular	+/>+
área amigdalopiriforme	-/+	n. oculomotor	+/>+
área amigdalohipocampal	+/>+	n. mesencefálico profundo	-/+
n. amigdalóide cortical ventral	+/>+	colículo superior	+/>+
Núcleos da Base		n. dorsal da rafe	-/+
n. caudado	+/>+	n. Edinger-Westphal	+/>-
putame	+/>-	n. mediano da rafe	-/+
pálido ventral	-/+	Ponte e bulbo	
globo pálido externo	-/+	n. olivar inferior subnúcleo A	+/>-
globo pálido interno	+/>-	n. olivar inferior dorsal	+/>-
Região Septal		n. acessório olivar medial	+/>-
n. septal lateral, parte dorsal	-/+	n. pontinos	+/>-
n. septal lateral, intermédio	-/+	n. linear caudal da rafe	-/+
n. septal lateral, parte ventral	-/+	n. solitário	-/+
n. septal medial	-/+	trato solitário	-/+
substantia innominata	-/+	n. vestibular superior	+/>-
ilhas de calleja	-/+	n. vestibular lateral	+/>-
n. acumbens, parte shell	-/+	n. vestibular medial, magnocel.	+/>-
n. acumbens, parte core	-/+	campo retrorubral	+/>-
n. da estria terminal, div. lat., parte dorsal	-/+	n. coclear ventral, parte anterior	+/>-
n. da estria terminal, div. lat., posterior	-/+	n. coclear ventral, parte posterior	+/>-
n. da estria terminal, div. lat., justacapsular	-/+	núcleo paragigantocelular dorsal	+/>-
n. da estria terminal, div. medial, anterior	-/+	n. paragigantocelular lateral	-/+
n. basal (Meynert)	-/+	n. reticular gigantocelular	+/>+
Formação Hipocampal		n. reticular dorsal	-/+
camada CA4 do hipocampo	+/>-	n. reticular lateral	-/+
camada CA3 do hipocampo	+/>-	n. reticular lateral, parte subtrigeminal	-/+
camada CA2 do hipocampo	+/>-	trato espinal do trigêmeo	-/+
camada CA1 do hipocampo	+/>-	n. cuneiforme externo	+/>-
camada granular do giro denteado	+/>-	n. grácil	+/>-
Diencéfalo		n. do nervo glossofaríngeo	-/+
Tálamo		n. hipoglosso	-/+
n. talâmico central medial	-/+	n. motor dorsal do nervo vago	-/+
n. talâmico ventral lateral	+/>-		
n. mediodorsal medial	-/+	Cerebelo	
n. mediodorsal central	-/+	Córtex	
n. reticular do tálamo	+/>-	camada de Purkinje	+/>-
n. geniculado lateral	+/>-	Núcleos cerebelares	
n. geniculado medial	+/>-	n. cerebelar medial	+/>-
n. habenular medial	-/+	n. cerebelar lateral	+/>-
Subtálamo		n. interpósito	+/>-
núcleo subtalâmico	+/>-	Medula espinal	
Hipotálamo		lâmina I/II	-/+
Zona periventricular		lâmina III	-/+
n. arqueado, lateral	-/+	lâmina IV	-/+
n. arqueado, medial	-/+	lâmina V	-/+
n. paraventricular, magnocelular	-/+	lâmina VI	-/+
n. paraventricular, parvicelular	-/+	lâmina VII	-/+
n. paraventricular, parte posterior	-/+	lâmina VIII	+/>+
Zona medial		lâmina IX	+/>+
área preoptica medial	-/+	lâmina X	-/+
área hipotalâmica anterior	-/+	Hipófise	
n. dorsomedial do hipotálamo	-/+	lobo anterior	-/-
n. ventromedial do hipotálamo	-/+	lobo posterior	-/-
		lobo intermédio	+/>-

Tabela 3. Distribuição de corpos neuronais e fibras nervosas com imunorreatividade relacionada à Ten-4 (Ten-4-LI) no SNC do *Sapajus spp.* Sinal de + presença de corpos neuronais imunorreativos e sinal de + a +++ intensidade de fibras imunorreativas à Ten-4 e sinal – para ausência de marcação.

4.3 Resultados do objetivo 2

*Distribuição da teneurina-3 no SNC de primatas não-humano (*Sapajus spp*) e ratos (*Rattus norvegicus*)*

4.3.1 Teneurina-3 no SNC do *Sapajus spp*

Para o mapeamento neuroanatômico da proteína Ten-3 foi realizada a submissão de séries completas de cortes histológicos do SNC de três animais ao método de imunoperoxidase utilizando o anticorpo comercial da Santa Cruz Biotechnology® na concentração de 1:500. De modo geral, foi observado que a imunorreatividade para Ten-3 mostrou-se ampla com distribuição de fibras e possíveis campos terminais com imunorreatividade relacionada à Ten-3 (teneurina-3-“like immunoreactivity” - Ten-3-LI) ao longo do SNC, e corpos neuronais Ten-3-LI evidentes principalmente em áreas hipotalâmicas. Além disso, devido à ampla distribuição de fibras nervosas Ten-3-LI foi empregada à análise semi-quantitativa sendo estabelecido o padrão de pouca, moderada e intensa densidade destas fibras (Figura 18). A distribuição geral de fibras e corpos neuronais imunorreativos para Ten-3 é apresentada na tabela 4. Um esquema ilustrativo do SNC do *Sapajus spp* exibindo a distribuição de corpos neuronais imunorreativos a Ten-2, Ten-3 e Ten-4 é mostrado na figura 27, permitindo avaliar e comparar as principais áreas imunomarcadas.

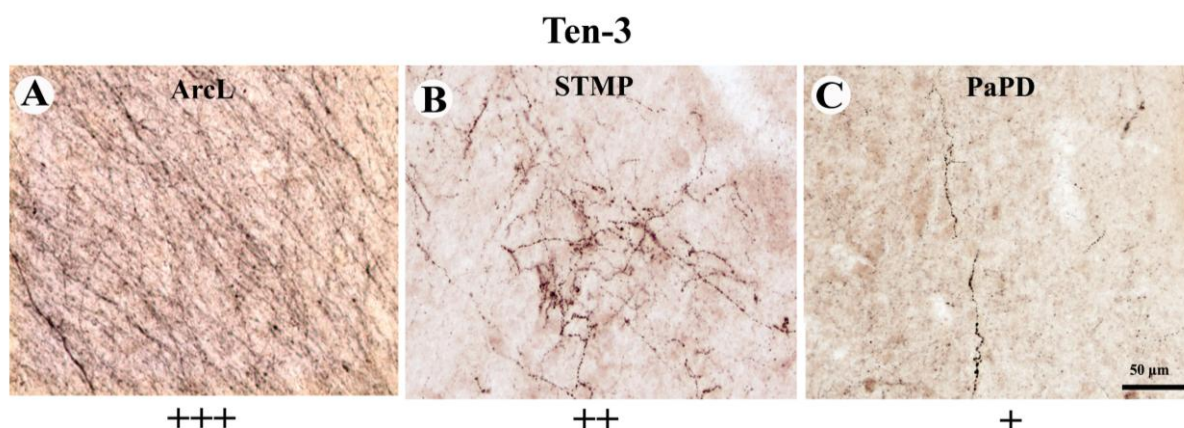


Figura 18. Representação da densidade de fibras nervosas Ten-3-LI. Fotomicrografias em campo claro demonstrando o padrão de três densidades de fibras e campos terminais em diferentes regiões do sistema nervoso central do *Sapajus spp*. A) +++, intensa densidade. B) ++, moderada densidade. C) +, pouca densidade. Abreviaturas: ArcL, núcleo arqueado parte lateral; PaPD, núcleo paraventricular do hipotálamo, parte parvicelular, divisão dorsal; STMP, núcleo da estria terminal, divisão medial, parte posterior.

Telencéfalo. Foi verificada uma ampla distribuição de fibras Ten-3-LI neste território encefálico tanto em áreas corticais quanto subcorticais. A densidade de fibras nervosas Ten-3-LI oscilou entre moderada à intensa, evidenciado nos núcleos do complexo amigdalóide, tais como no núcleo basolateral da amígdala parte ventromedial (BLVM) e no núcleo basomedial da amígdala parte parvicelular (BMPC). Nos núcleos da base, foi observada intensa distribuição de fibras Ten-3-LI, principalmente no globo pálido interno (IGP), globo pálido externo (EGP) e pálido ventral (VP) (Figura 19). Na região septal, intensa densidade de fibras foi observada no núcleo basal (Meynert) (B), enquanto entre moderada a intensa densidade de fibras foi notada na substância inominata (SI) e no núcleo da estria terminal, em particular na divisão medial e parte anterior e posterior (STMA e STMP, respectivamente) (Figura 19). Na formação hipocampal, moderada a intensa densidade de fibras nervosas foram presentes nas camadas polimórficas do giro denteado (PoDG) e CA2-CA4, e poucas fibras na camada granular do giro denteado (GrGD) (Figura 3). Nas camadas CA2-CA4 foram verificados escassos corpos neuronais Ten-3-LI. Nítida presença de corpos neuronais imunorreativos a Ten-3 foi observada na região do córtex cerebral, em particular nas camadas piramidais internas e externas da área 4 do córtex motor [4(F1)] e na área de transição amigdalopiriforme (APir).

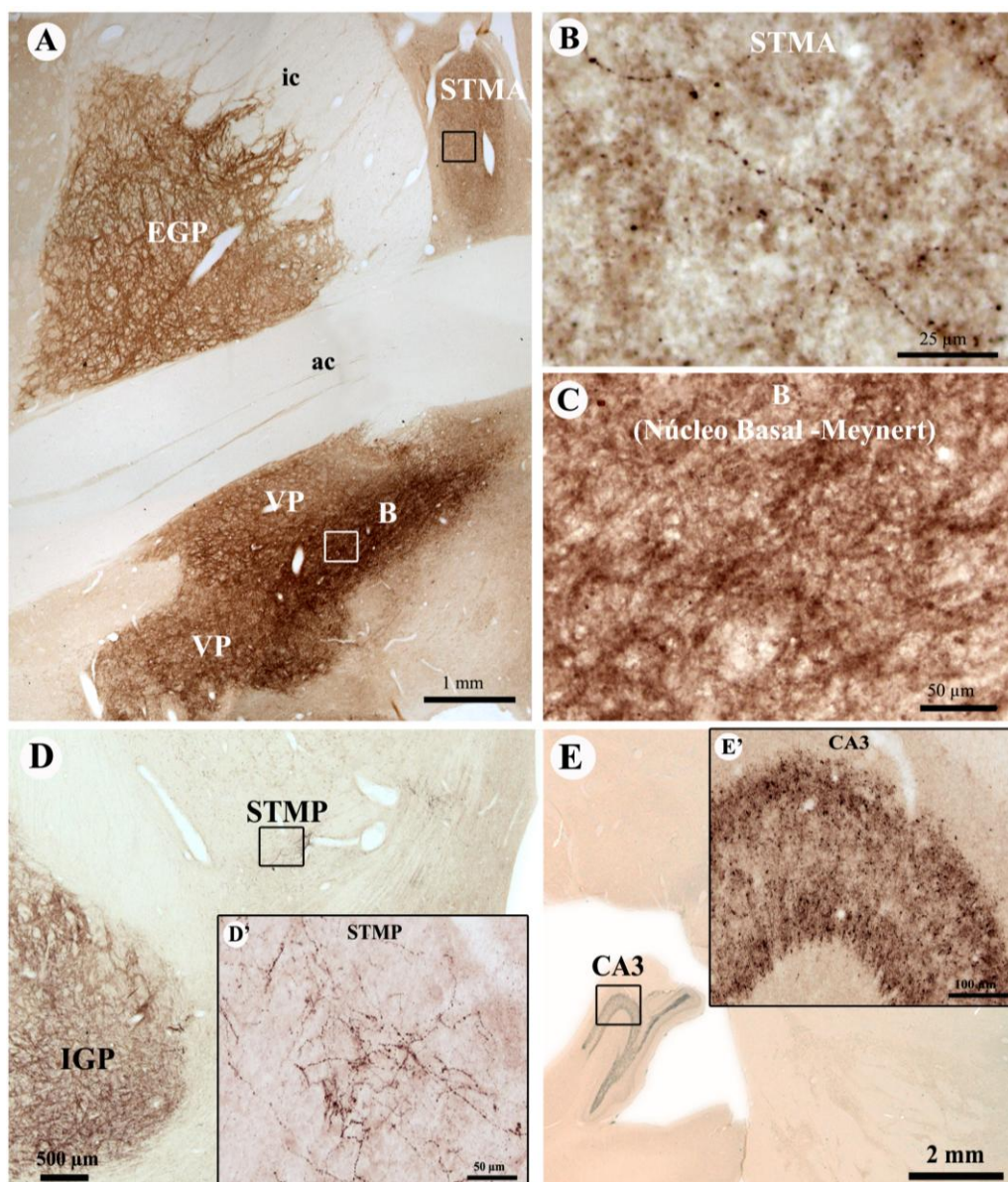


Figura 19. Distribuição de fibras nervosas Ten-3-LI em regiões telencefálicas do primata não-humano *Sapajus spp.* Em (A) fotomicrografia em campo claro evidenciando a densa distribuição de fibras Ten-3-LI no núcleo basal (Meynert), globo pálido externo (EGP), núcleo da estria terminal, divisão medial parte anterior (STMA) e pálido ventral (VP). Em (B) fotomicrografia em campo claro evidenciando moderada densidade de fibras Ten-3-LI no STMA, enquanto que em (C) é notado intensa densidade de fibras no núcleo basal (Meynert). Em (D), é possível notar moderada densidade de fibras Ten-3-LI no núcleo da estria terminal, divisão medial, parte posterior (STMP), mostrado em maior resolução em (D'). Em (E) é observado intensa distribuição de fibras Ten-3-LI na formação hipocampal como destacado na camada CA3. Abreviaturas: ac, comissura anterior; ic, cápsula interna; IGP, globo pálido interno.

Diencéfalo

Tálamo e Subtálamo. A presença de fibras nervosas Ten-3-LI variou entre pouca à moderada densidade como notado no núcleo pré-tectal anterior (APT), núcleo paraventricular do tálamo (PV), núcleo reuniens (Re), núcleo talâmico mediodorsal (MD) e núcleo talâmico anterodorsal (AD). Também foi verificado que poucos territórios talâmicos apresentaram corpos neuronais imunorreativos restritos ao núcleo pulvinar inferior (IPul), reticular do tálamo (Rt) e geniculado lateral (DLG) e medial (MG) que também exibiram pouca densidade de fibras nervosas Ten-3-LI. No subtálamo, somente foi notada pouca densidade de fibras nervosas Ten-3-LI no núcleo subtalâmico (STh).

Hipotálamo. No hipotálamo foram verificadas diferentes densidades de fibras Ten-3-LI. A região periventricular apresentou intensa densidade de fibras nervosas destacando as imunomarcações no núcleo arqueado parte lateral (ArcL) (Figura 18). A zona lateral do hipotálamo mostrou intensa a moderada densidade de fibras nervosas, em particular no núcleo tuberal lateral (LTu) e núcleo magnocelular do hipotálamo lateral (MCLH), respectivamente (Figura 20). É interessante destacar que as fibras nervosas imunorreativas à Ten-3 exibiam um padrão varicoso na região hipotalâmica. Também foi verificado que a região hipotalâmica mostrou um maior número de áreas e núcleos com corpos neuronais imunorreativos. A zona periventricular mostrou corpos neuronais imunorreativos no núcleo paraventricular magnocelular divisão dorsal (PaMD) e parvicelular divisão dorsal (PaPD) (Figura 21), além do núcleo supraquiasmático (SCh) (Figura 22). Na zona medial, perfis de corpos neuronais foram observados no núcleo preoptico anteromedial (AMPO) (Figura 22) e no núcleo mamilar lateral. Na zona lateral do hipotálamo foi evidenciado corpos neuronais Ten-3-LI no núcleo tuberal lateral (Ltu), núcleo magnocelular do hipotálamo lateral (MCLH) e núcleo supra-óptico (SO) (Figura 20 e 22).

É interessante ressaltar que as imunomarcações nos neurônios hipotalâmicos apresentou padrão de imunorreatividade típico de mediadores neuropeptidérgico, uma vez que é verificada densa imunorreatividade no corpo celular, o qual emite longos prolongamentos e axônios varicosos com ramificações. Enquanto as demais áreas do SNC, os neurônios exibiram uma imunorreatividade de menor intensidade e restrita ao corpo celular.

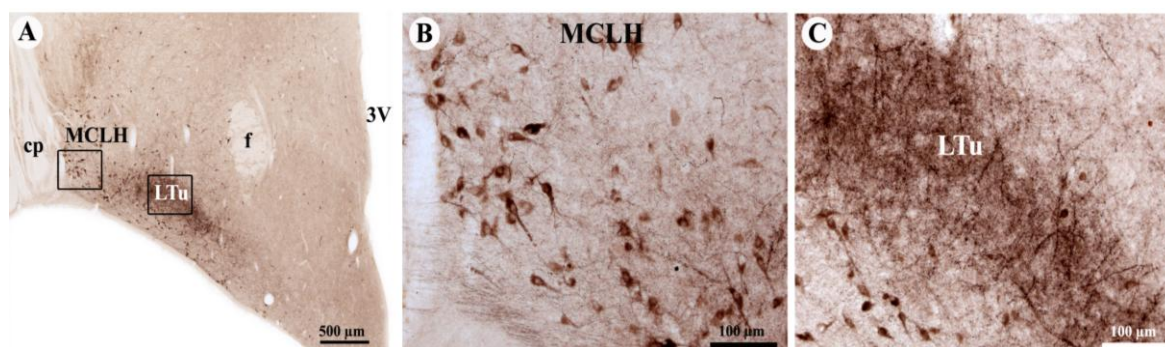


Figura 20. Distribuição de fibras e corpos neuronais Ten-3-LI na zona lateral do hipotálamo do primata não-humano *Sapajus spp.* Em (A) fotomicrografias em campo claro evidenciando a distribuição panorâmica das fibras e corpos neuronais Ten-3-LI. Em (B) nota-se a presença de corpos neuronais e pouca a moderada densidade de fibras Ten-3-LI núcleo magnocelular do hipotálamo lateral (MCLH). Em (C) intensa densidade de fibras Ten-3-LI é visualizada no núcleo tuberal lateral (LTu). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; cp, pedúnculo cerebral; f, fórnice.

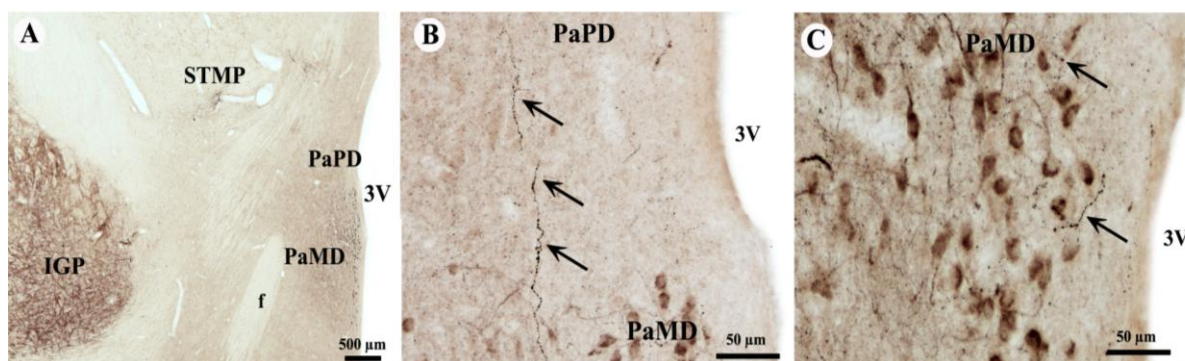


Figura 21. Distribuição de fibras nervosas e corpos neuronais Ten-3-LI na zona periventricular do hipotálamo do primata não-humano *Sapajus spp.* Em (A) fotomicrografia em campo claro mostrando a visão panorâmica da região periventricular do hipotálamo. Em (B) e (C) nota-se a presença de poucas fibras Ten-3-LI no núcleo paraventricular do hipotálamo, parte parvicelular, divisão dorsal (PaPD) e parte magnocelular, divisão dorsal (PaMD), como apontado pelas setas, sendo que nesta região há presença de corpos neuronais Ten-3-LI. Abreviaturas: f, fórnice; IGP, globo pálido interno.

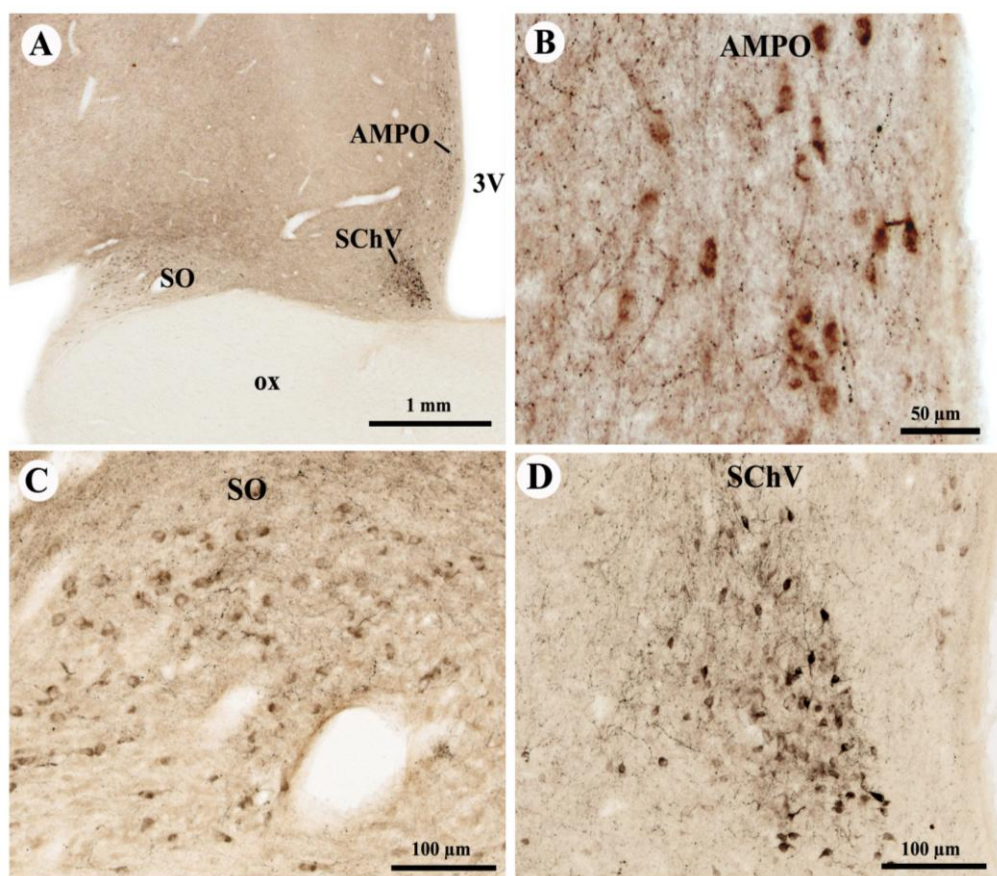


Figura 22. Distribuição de fibras nervosas e corpos neuronais Ten-3-LI em núcleos hipotalâmicos do primata não-humano *Sapajus spp.* Em (A) fotomicrografias em campo claro evidenciando a distribuição panorâmica das fibras e corpos neuronais Ten-3-LI. Em (B) e (C) nota-se a presença de corpos neuronais e pouca distribuição de fibras Ten-3-LI no núcleo preoptico anteromedial (AMPO) e no núcleo supra-óptico (SO). Em (D) nota-se a presença de corpos neuronais e uma moderada distribuição de fibras Ten-3-LI no núcleo supraquiasmático, parte ventral (SChV). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; ox, quiasma óptico.

Tronco encefálico. A distribuição das fibras nervosas Ten-3-LI variou de moderada a intensa, sendo que na região mesencefálica foi observada intensa densidade de fibras na região da substância negra reticular (SNR), moderada na área tegmental ventral (VTA) e pouca a moderada no núcleo parabraquial pigmentado (PBP) (Figura 23). Nas regiões da ponte e bulbo, foram notadas entre moderada a intensa densidade de fibras nervosas Ten-3-LI no núcleo reticular lateral parte subtrigeminal (LRtS5), trato espinal do trigêmeo (sp5) e núcleo motor dorsal do nervo vago (Cel) (Figura 24). A presença de corpos neuronais Ten-3-LI foi evidente no núcleo vestibular espinal (SpVe), núcleo cuneiforme externo (ECu) e núcleo reticular lateral (LRt) (Figura 24).

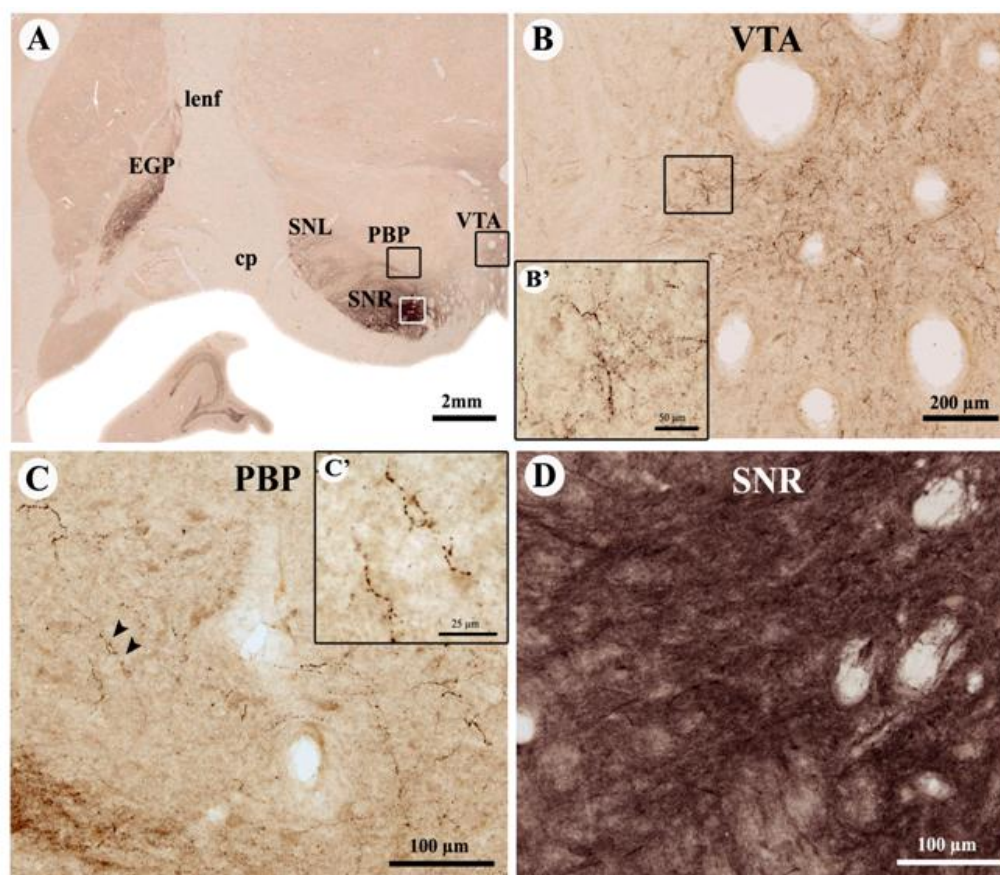


Figura 23. Distribuição de fibras Ten-3-LI no tronco encefálico do primata não-humano *Sapajus spp.* Em (A) fotomicrografia em campo claro mostrando a distribuição panorâmica das imunomarcações para Ten-3. Em (B) nota-se moderada presença de fibras Ten-3-LI na área tegmental ventral (VTA), destacado em maior aumento em (B'). Em (C) é verificada entre moderada a pouca densidade de fibras nervosas Ten-3-LI no núcleo parabraquial pigmentado (PBP), mostrada pelas cabeças de setas e em destaque em (C'). Em (D) é mostrada a substância negra, parte reticular (SNR), com intensa densidade de fibras nervosas imunorreativas. Abreviaturas: cp, pedúnculo cerebral; EGP, globo pálido externo; lenf, fascículo lenticular; SNL, substância negra parte lateral.

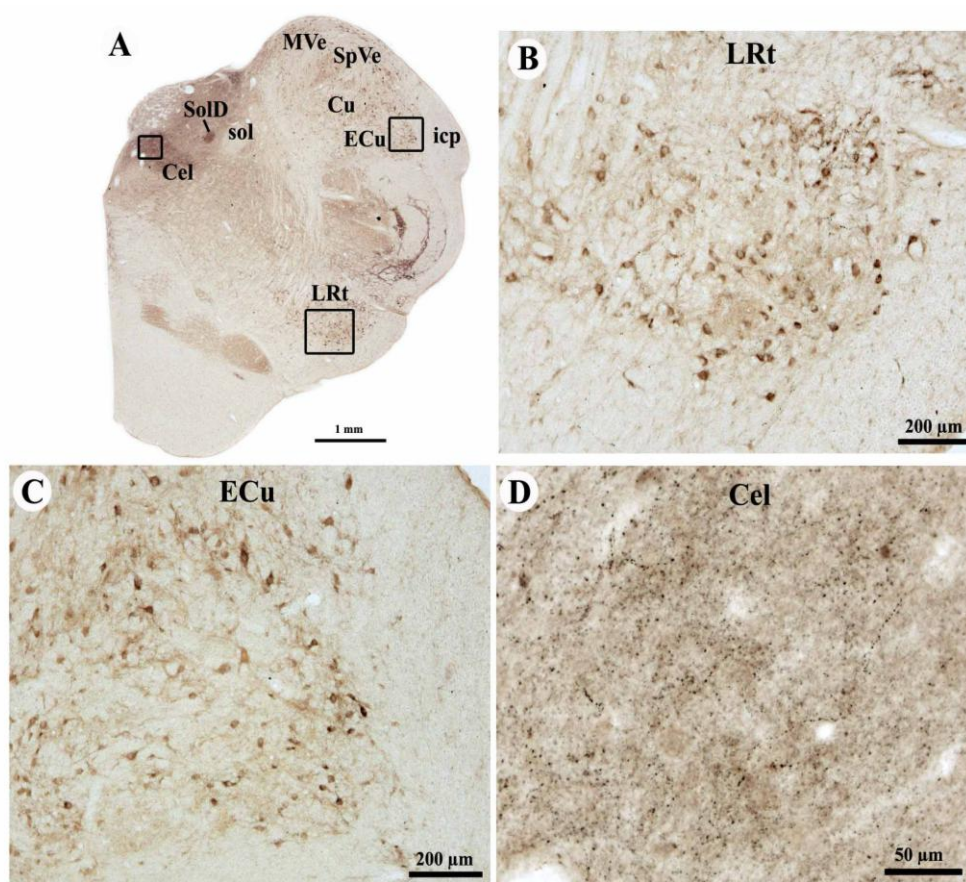


Figura 24. Distribuição de fibras e corpos neuronais Ten-3-LI no tronco encefálico do primata não-humano *Sapajus spp.* Em (A) fotomicrografia em campo claro evidenciando a distribuição panorâmica das fibras e corpos neuronais Ten-3-LI. Em (B) e (C) nota-se a presença de corpos neuronais e de poucas fibras Ten-3-LI no núcleo reticular lateral (LRt) e núcleo cuneiforme externo (ECu), respectivamente. Em (D) nota-se a presença moderada de fibras Ten-3-LI no núcleo motor dorsal do nervo vago (Cel). Abreviaturas: Cu, núcleo cuneiforme; icp, pedúnculo cerebelar inferior; MVe, núcleo vestibular medial; sol, trato solitário; SolD, núcleo solitário subnúcleo dorsal; SpVe, núcle vestibular espinal.

Cerebelo. Não foi observada evidente distribuição de fibras nervosas Ten-3-LI no córtex cerebelar, sendo verificada a presença de poucas fibras no núcleo cerebelar medial (Med) e lateral (Lat). Nestes núcleos e na camada de Purkinje (Pk) foi verificada a presença de corpos neuronais Ten-3-LI (Figura 3).

Medula espinal. As lâminas medulares I, II e X mostraram entre moderada a intensa densidade de fibras nervosas Ten-3-LI. Entretanto, a presença de corpos neuronais imunorreativos foi somente notada nas lâminas VII-X da medula espinal como mostrado na lâmina IX (Figura 25).

Hipófise. Células endócrinas Ten-3-LI foram observadas nos lobos anterior e intermédio (Figura 26).

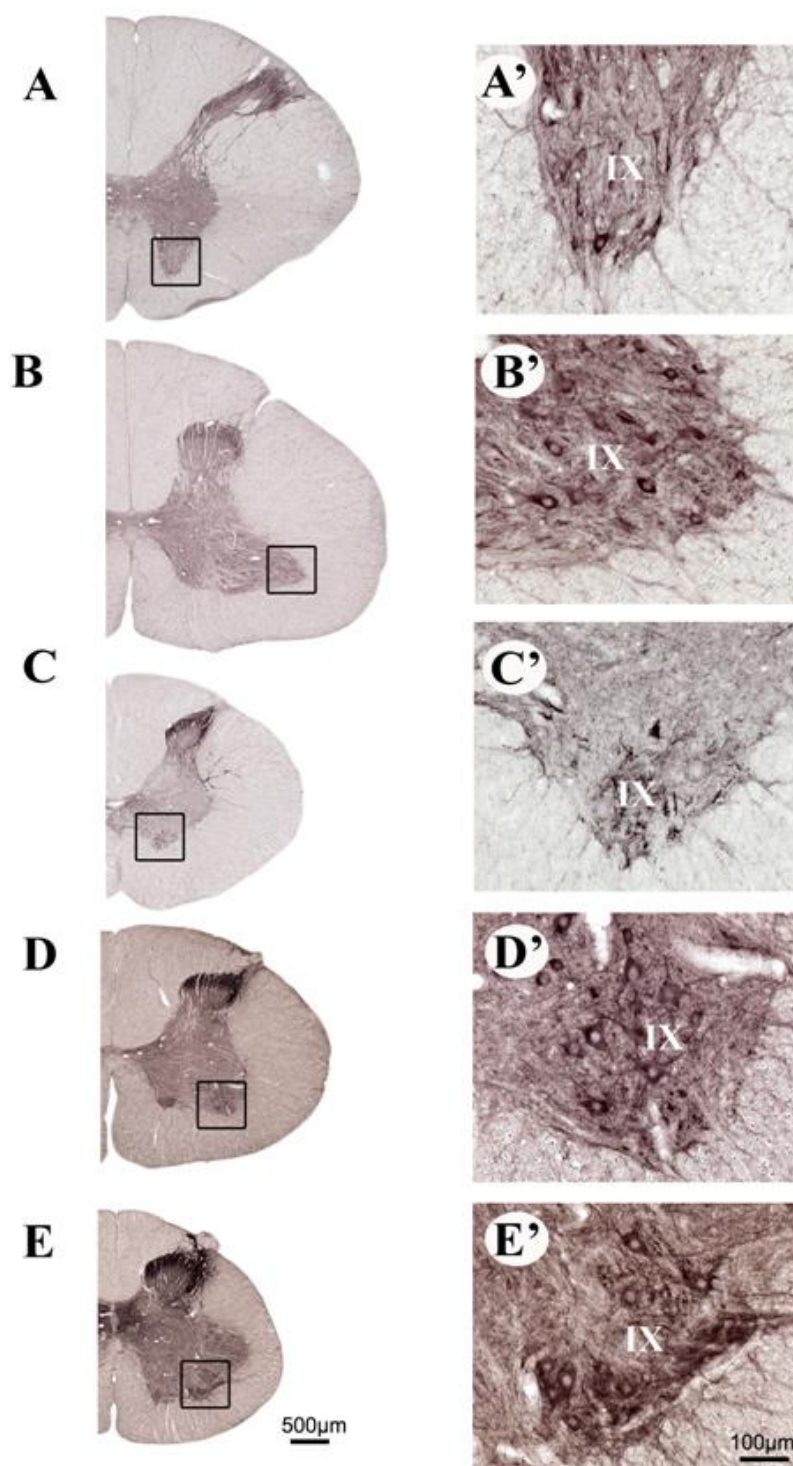


Figura 25. Distribuição de corpos neuronais e fibras Ten-3-LI na medula espinal do *Sapajus spp.* As fotomicrografias em campo claro mostram na coluna à esquerda uma visão panorâmica dos segmentos cervical alto (A), cervical baixo (B), torácica (C), lombar (D) e sacral (E). Na coluna à direita é evidenciado em maior aumento as áreas delimitadas na coluna esquerda que mostram corpos Ten-3-LI na lâmina IX. Organização citoarquitetônica de acordo com REXED (1952).

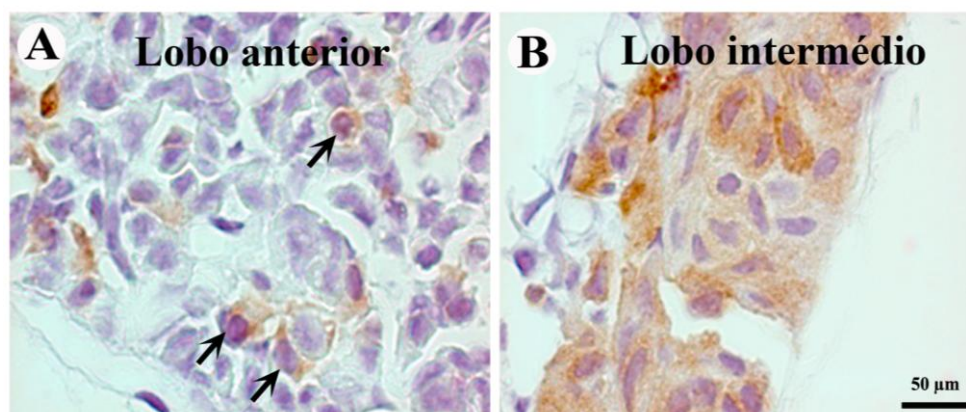


Figura 26. Distribuição de células endócrinas Ten-3 (Ten-3-LI) na hipófise do *Sapajus spp.* As fotomicrografias evidenciam algumas células Ten-3-LI (setas) no lobo anterior da hipófise (A) e em toda extensão do lobo intermédio (B).

Regiões/núcleos	Ten-3 (Corpo/ fibras)	Regiões/núcleos	Ten-3 (Corpo / fibras)
Telencéfalo		n. paraventricular, parvicelular, div. dorsal	+/-
Córtex cerebral		n. supraquiasmático	+/++
área 1 do córtex (somatosensorial)	+/-	zona medial	
área 2 do córtex (somatosensorial)	+/-	área preoptica	-/+
área 4 do córtex (motor primário)	+/-	área preoptica anteromedial	+/+
área 6M (suplemento motor)	-/+	n. mamilar lateral	+/+++
área 6 dorsorostral	-/+	área hipotalâmica anterior	-/+
área 6 ventrorostral	+/-	n. dorsomedial	-/+
área 9, parte medial	+/+	n. ventromedial	-/+
área 9, parte lateral	+/+	núcleo hipotalâmico posterior	+/+
área 14 do córtex, parte medial	+/+	zona lateral	
área 24a	+/+	n. supraoptico	+/+
área 24b	-/+	n. tuberal lateral	+/+++
área 25	-/+	n. tuberomamilar	+/+++
área 32 do córtex	-/+	área hipotalâmica lateral	+/+++
córtex piriforme	+/+++	n. magnocelular do hipotálamo lateral	+/+++
córtex entorrinal	+/+	n. perifornical	-/+
n. olfatório anterior	+/+	Tronco encefálico	
tubérculo olfatório	+/+	Mesencéfalo	
perialocórtex orbital	+/+	substância negra, parte reticular	-/+++
Amígdala		substância negra, parte lateral	+/+++
área amigdalóidea anterior	-/+	área tegmental ventral	+/+++
núcleo medial da amígdala	-/+++	substância periaqueductal lateral	-/+
n. central da amígdala	-/+++	substância periaqueductal ventrolateral	-/+
n. lateral da amígdala	-/+++	substância periaqueductal dorsomedial	-/+
n. basolateral da amígdala, ventromedial parte	+/+++	n. peripeduncular	-/+++
n. basomedial da amígdala, parte parvicelular	+/+++	n. tegmental pedunculopontine	-/+++
área de transição amigdalopiriforme	+/+	n. interpeduncular	-/+++
Núcleos da Base		Ponte e bulbo	
n. caudado	-/+++	n. parabulbar pigmentado	-/+
pálido ventral	-/+++	n. linear rostral da rafe	-/+++
globo pálido externo	-/+++	n. pálido da rafe	-/+
globo pálido interno	-/+++	n. dorsal da rafe, parte dorsal	-/+++
Região Septal		n. dorsal da rafe, interfascicular	-/+++
n. septal lateral	-/+	n. dorsal da rafe, parte ventral	-/+
n. septal medial	-/+	n. vestibular espinal	+/+
n. vertical da banda diagonal	-/+	núcleo prepósito	-/+++
substantia innominata	-/+++	campo retrorubral	-/+++
n. acumbens	-/+	núcleo coclear dorsal	-/+
n. da estria terminal, div. medial, parte anterior	-/+	núcleo paragigantocelular dorsal	-/+++
n. da estria terminal, div. medial, parte posterior	-/+++	núcleo paragigantocelular lateral	-/+++
n. basal (Meynert)	-/+++	núcleo reticular gigantocelular	-/+
n. septohipocampal	-/+	núcleo obscuro da rafe	-/+++
Formação Hipocampal		núcleo reticular lateral, parte subtrigeminal	+/+++
camada CA2 do hipocampo	+/+++	trato espinal do trigêmio	-/+++
camada CA3 do hipocampo	+/+++	n. cuneiforme externo	+/+
camada CA4 do hipocampo	+/+++	n. solitário	-/+++
camada granular do giro denteado	-/+	n. reticular lateral	+/+
camada polimórfica do giro denteado	-/+++	n. motor dorsal do nervo vago	-/+
Diencéfalo		Cerebelo	
Tálamo		Córtex	
n. talâmico limitante	-/++	camada molecular	+/-
n. pretectal anterior	-/++	camada de Purkinje	+/-
n. paraventricular tálamo	-/+	Núcleos cerebelares	
n. reuniens	-/+	n. cerebelar medial	+/+
n. parafascicular do tálamo	-/+	n. cerebelar lateral	+/+
n. lateral dorsal do tálamo, parte superficial	-/+++	Medula espinal	
n. talâmico anterodorsal	-/+	lâmina I/II	-/+++
núcleo talâmico mediodorsal	-/+	lâmina III	-/++
pulvinar inferior	+/+	lâmina IV	-/++
n. reticular do tálamo	+/+	lâmina V	-/+++
n. geniculado lateral	+/-	lâmina VI	-/++
n. geniculado medial	+/-	lâmina VII	+/+++
Subtálamo		lâmina VIII	+/+++
núcleo subtalâmico	-/+	lâmina IX	+/+++
Hipotálamo		lâmina X	+/+++
zona periventricular		Hipófise	
n. arqueado, parte medial	-/+	lobo anterior	+/-
n. arqueado, parte lateral	-/+++	lobo posterior	-/-
n. arqueado, parte dorsal	-/+	lobo intermédio	+/-
n. periventricular hipotálamo	+/+		
n. paraventricular, magnocelular, div. dorsal	+/+		

Tabela 4. Distribuição de corpos neuronais e fibras nervosas com imunorreatividade relacionada à Ten-3 (Ten-3-LI) no SNC do *Sapajus spp.* Sinal de + presença de corpos neuronais imunorreativos, sinal de + a +++ intensidade de fibras imunorreativas a Ten-3 e sinal – para ausência de marcação.

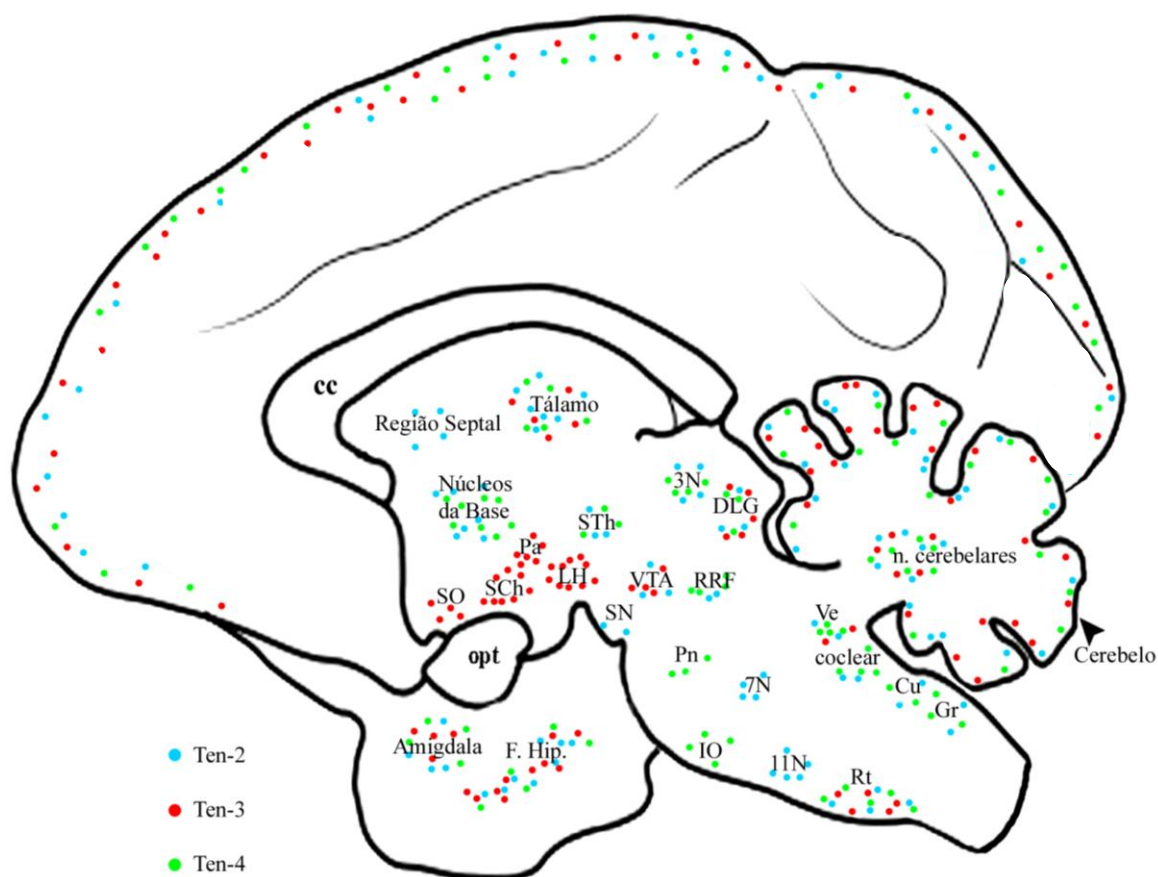


Figura 27. Desenho esquemático mostrando o encéfalo do *Sapajus spp* em corte sagital. Os principais territórios de distribuição dos corpos neuronais imunorreativos para Ten-2, Ten-3 e Ten-4 estão representados pelos pontos azul, vermelho e verde, respectivamente. Abreviações: 11N, núcleo acessório; 3N, núcleo oculomotor; 7N, núcleo facial; cc, corpo caloso; Cu, nucleio cuneiforme; DLG, núcleo geniculado lateral dorsal; F. Hip, formação hipocampal; Gr, núcleo grácil; IO, complexo olivar inferior; LH, hipotálamo lateral; opt, trato óptico; Pa, paraventricular do hipotálamo; Pn, núcleo pontino; RRF, campo retrorubral; Rt, núcleo reticular; SCh, núcleo supraquiasmático; SN, substância negra; SO, núcleo supra-óptico; STh, núcleo subtalâmico; Ve, núcleos vestibulares; VTA, área tegmental ventral.

4.3.2 *Teneurina-3 no SNC de rato (Rattus norvegicus)*

As regiões que exibiram corpos neuronais Ten-3-LI foram em sua maioria correspondentes entre primatas e roedores, sendo que nos primatas foi notada uma distribuição mais extensiva em áreas hipotalâmicas.

Os dados advindos de ratos sem tratamento com colchicina revelaram fibras nervosas Ten-3-LI dispersas no SNC, porém sendo pouco evidente a presença de corpos

neuronal com imunorreatividade relacionada à Ten-3 (Ten-3-LI). Por outro lado, os animais que receberam tratamento de colchicina mostraram uma distribuição de corpos neuronais Ten-3-LI melhor definida. É interessante mencionar que a imunorreatividade em fibras e possíveis terminais neuronais não foi significativamente reduzida em alguns territórios neuronais de ratos tratados com colchicina, como esperado após o uso de tal agente antimitótico. A distribuição detalhada da Ten-3 no SNC de ratos é mostrada na tabela 5 e no esquema apresentado na Figura 35. O padrão semi-quantitativo da distribuição de fibras nervosas Ten-3-LI também seguiu os critérios de pouca, moderada e intensa, como descrito anteriormente.

Telencéfalo. A imunorreatividade neste território foi verificada na formação hipocampal, especificamente na camada CA3 do hipocampo, onde foram observados corpos neuronais e prolongamentos neuronais Ten-3-LI, principalmente nos animais tratados com colchicina (Figura 28). Nos demais territórios, foi evidente a presença de fibras nervosas imunomarcadas com densidade que variaram entre pouca, moderada e intensa. Entre as regiões com intensa imunorreatividade para Ten-3, destacou o núcleo da estria terminal divisão lateral parte ventral (STLV) (Figura 28).

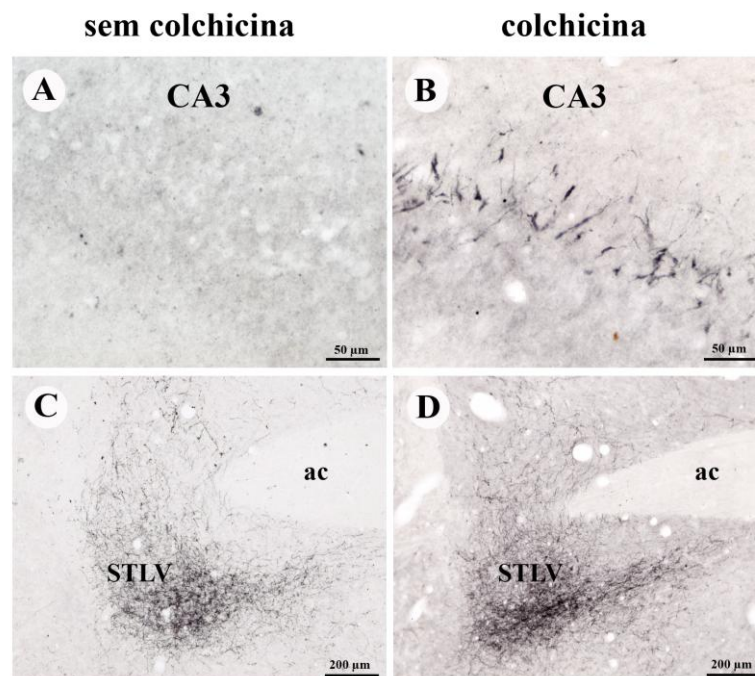


Figura 28. Distribuição de fibras nervosas e corpos neuronais Ten-3-LI no telencéfalo de ratos. As fotomicrografias em campo claro mostram a ausência de corpos neuronais e fibras na camada CA3 do hipocampo de animais sem colchicina (A), enquanto que em animais com colchicina (B) nota-se melhor

evidência de imunomarcção. Em (C) e (D) é verificado a distribuição de fibras no núcleo da estria terminal divisão lateral parte ventral (STLV) em ambos animais. Abreviaturas: ac, comissura anterior.

Diencéfalo. Corpos neuronais e fibras nervosas Ten-3-LI foram observadas no núcleo arqueado (Arc) e no núcleo hipotalâmico dorsomedial parte ventral (DMV) (Figura 29). Esse núcleo assim como os núcleos paraventricular do hipotálamo parte parvicelular medial (PaMP) e o núcleo supra-óptico (SO) mostraram uma consistente melhora no padrão de imunorreatividade dos corpos neuronais, quanto comparado animais ratos normais e tratados com colchicina (Figura 29).

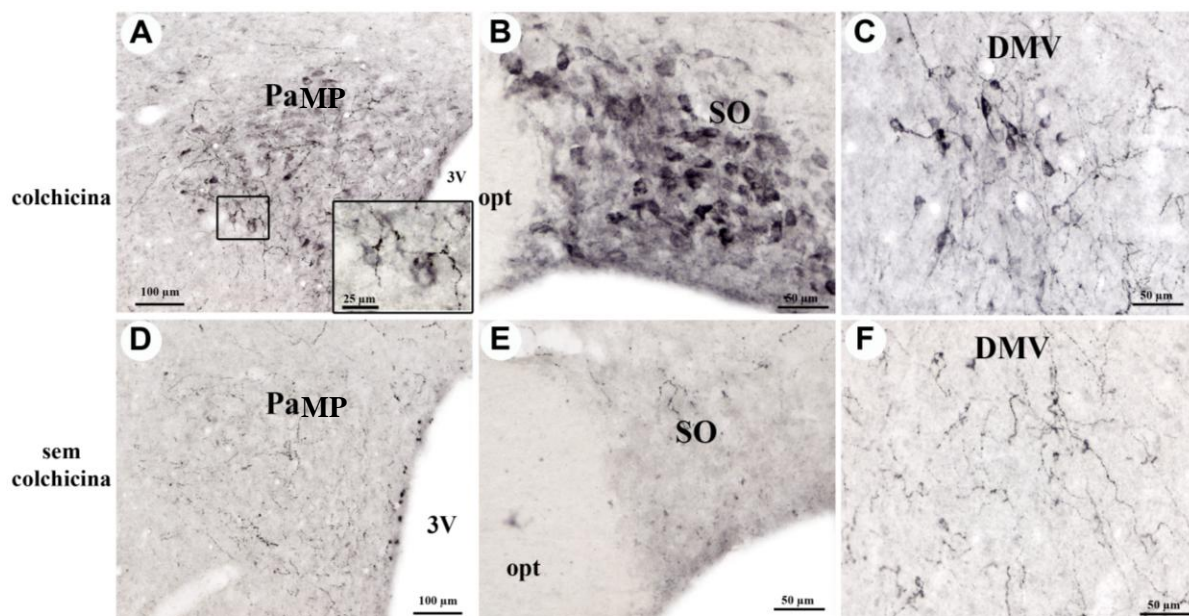


Figura 29. Distribuição de fibras e corpos neuronais Ten-3-LI no diencéfalo de ratos. As fotomicrografias em campo claro mostram o núcleo paraventricular do hipotálamo parte parvicelular medial (PaMP) (A e D) com melhora da imunomarcção nos animais com colchicina. Esta melhora também foi observada nos núcleos supra-óptico (SO) (B e E) e núcleo hipotalâmico dorsomedial parte ventral (DMV) (C e F). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; opt, trato óptico.

Tronco encefálico. Corpos neuronais e intensa distribuição de fibras nervosas Ten-3-LI foram observadas no núcleo mesencefálico trigeminal (Me5) (Figura 30). Corpos neuronais e poucas fibras nervosas imunorreativas foram observadas no núcleo rubro parte magnocelular (RMC), núcleo motor dorsal do nervo vago (10N), área noradrenérgica A1 (A1) e na raiz coclear (CRN) (Figuras 30 e 31) que apresentaram evidente imunomarcção em corpos neuronais nos animais que receberam colchicina.

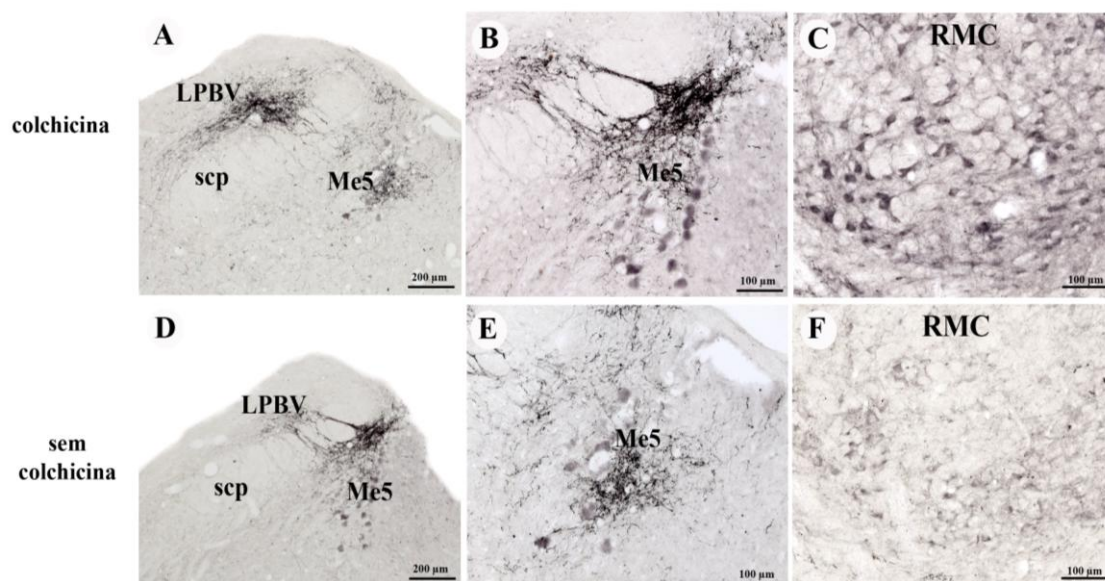


Figura 30. Distribuição de fibras e corpos neuronais Ten-3-LI no tronco encefálico de ratos. As fotomicrografias em campo claro em (A) e (D) demonstram visão panorâmica das regiões imunomarcadas com intensa concentração de fibras Ten-3-LI no núcleo parabraquial lateral parte ventral (LPBV). Em (B) e (E) núcleo mesencefálico trigeminal (Me5) com fibras e corpos neuronais imunorreativos em animais sem e com colchicina. Em (C) e (F) núcleo rubro parte magnocelular (RMC) com melhora da imunomarcção nos animais com colchicina. Abreviaturas: scp, pedúnculo cerebelar superior.

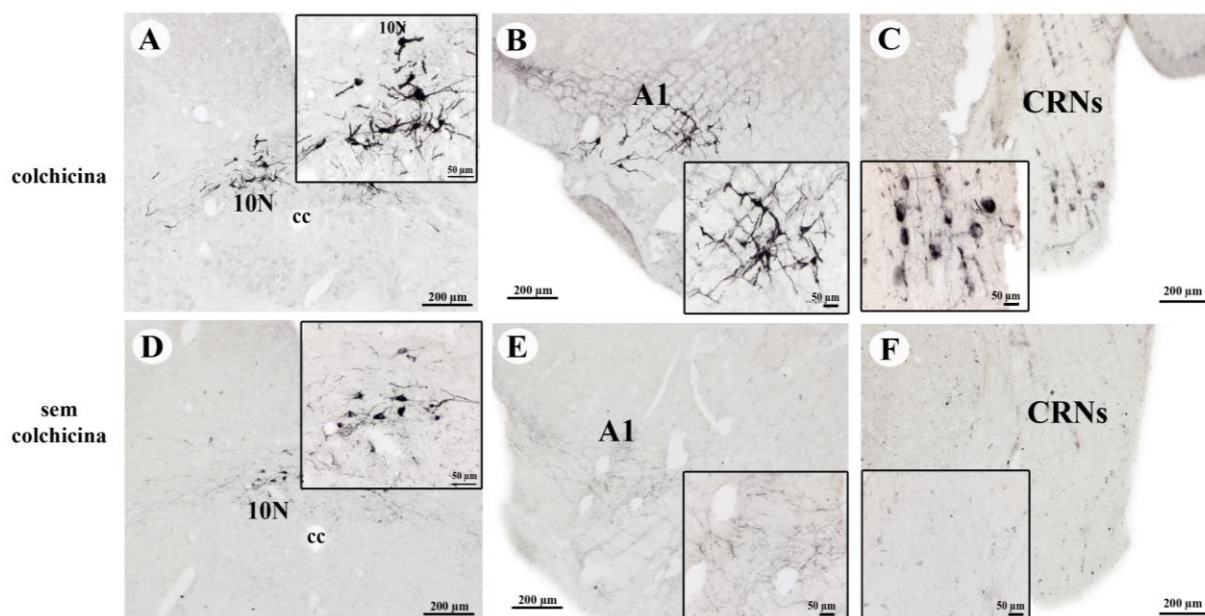


Figura 31. Distribuição de corpos neuronais Ten-3-LI no tronco encefálico de ratos. As fotomicrografias em campo claro (A) e (D) destacam o núcleo motor dorsal do nervo vago (10N) com evidente melhora de imunomarcção em corpos neuronais de animais com colchicina sendo a mesma melhora observada nas células noradrenérgicas A1 (A1) vista em (B) e (E) e nos neurônios da raiz coclear (CRN) vista em (C) e (F). Abreviaturas: cc, canal central.

Cerebelo. Foi notado melhora no padrão de imunorreatividade nos animais que receberam colchicina, como verificado nos corpos neuronais da camada de Purkinje do cerebelo e nos núcleos profundos do cerebelo como o interpósito parte anterior (IntA) (Figura 32).

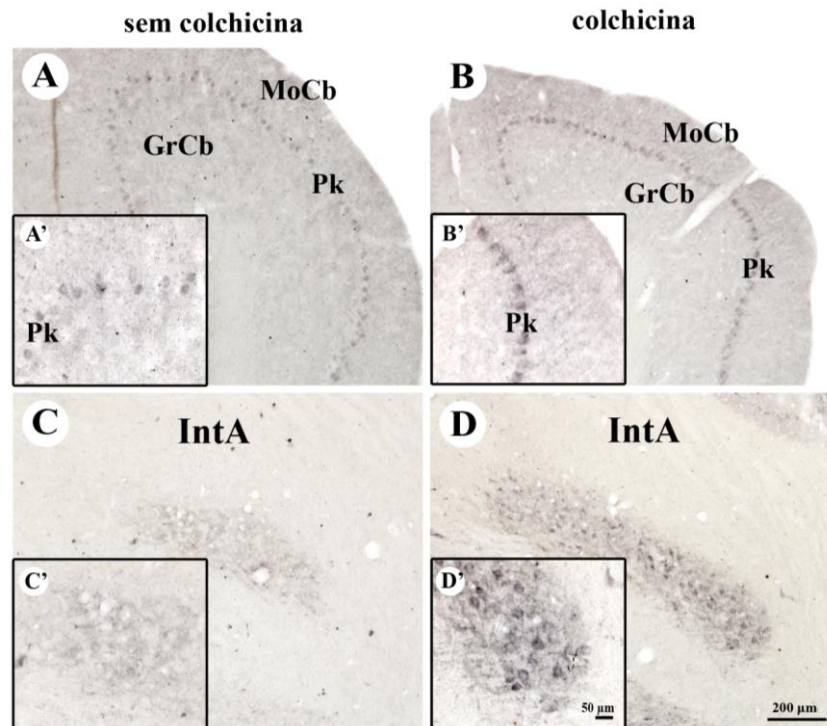


Figura 32. Distribuição de corpos neuronais Ten-3-LI no cerebelo de ratos. As fotomicrografias em campo claro demonstram que ratos com colchicina apresentam melhora na imunomarcagem de corpos neuronais na camada de células de Purkinje do cerebelo (Pk) vista em (A) e (B) e no núcleo interpósito parte anterior (IntA) vista em (C) e (D). Abreviaturas: GrCb, camada granular do cerebelo; MoCb, camada molecular do cerebelo.

Medula espinal. Não foram verificadas diferenças significantes na imunorreatividade observada em ratos normais e com colchicina. De modo geral, corpos neuronais imunorreativos foram observados nas lâminas VII, VIII e IX, enquanto fibras Ten-3-LI foram evidentes na lâmina I de todos os segmentos medulares, como mostrado no segmento cervical alto (Figura 33).

Hipófise. Células endócrinas imunorreativas para Ten-3 foram observadas no lobo anterior da hipófise de ratos (Figura 34).

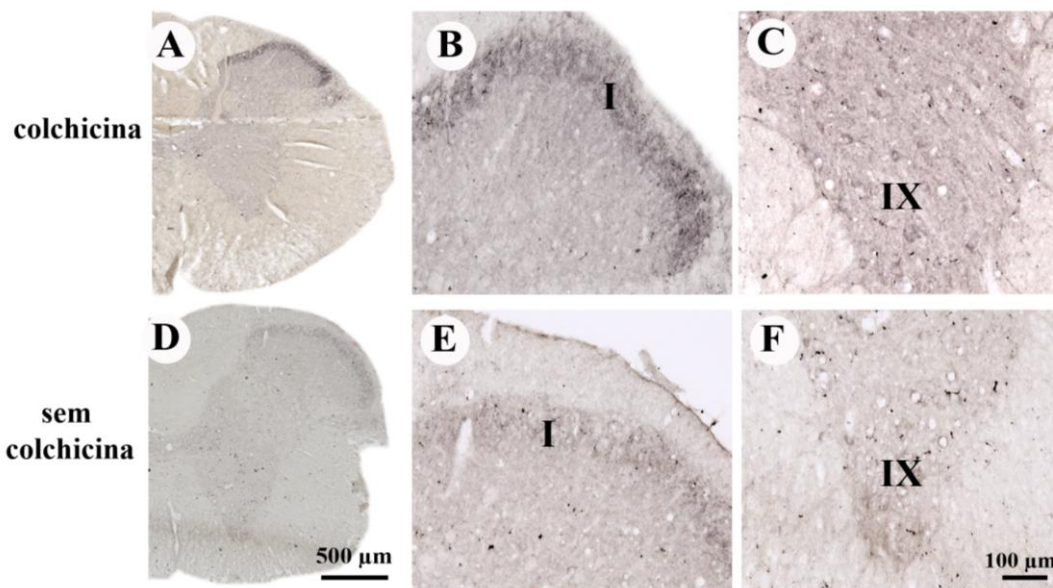


Figura 33. Distribuição de fibras nervosas e corpos neuronais Ten-3-LI na medula espinal de ratos. As fotomicrografias em campo claro em (A) e (D) demonstram a visão panorâmica do segmento cervical alto da medula espinal, sendo que nas imagens em maior aumento observa-se imunomarcacção em fibras presente na lâmina I (B e E) e em corpos neuronais da lâmina IX (C e F).

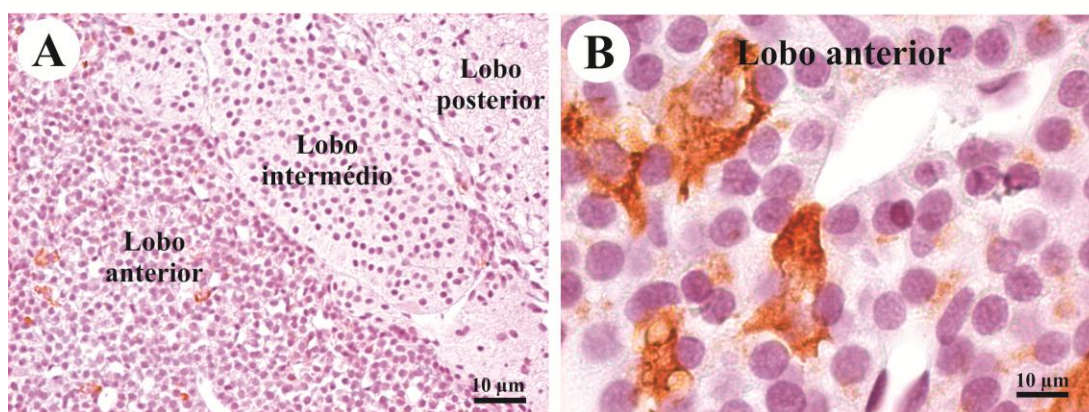


Figura 34. Distribuição de células endócrinas Ten-3 (Ten-3-LI) na hipófise de ratos. A fotomicrografia em campo claro vista em (A) mostra algumas células imunorreativas no lobo anterior da hipófise de animais que não receberam colchicina, sendo estas evidenciadas no maior aumento em (B).

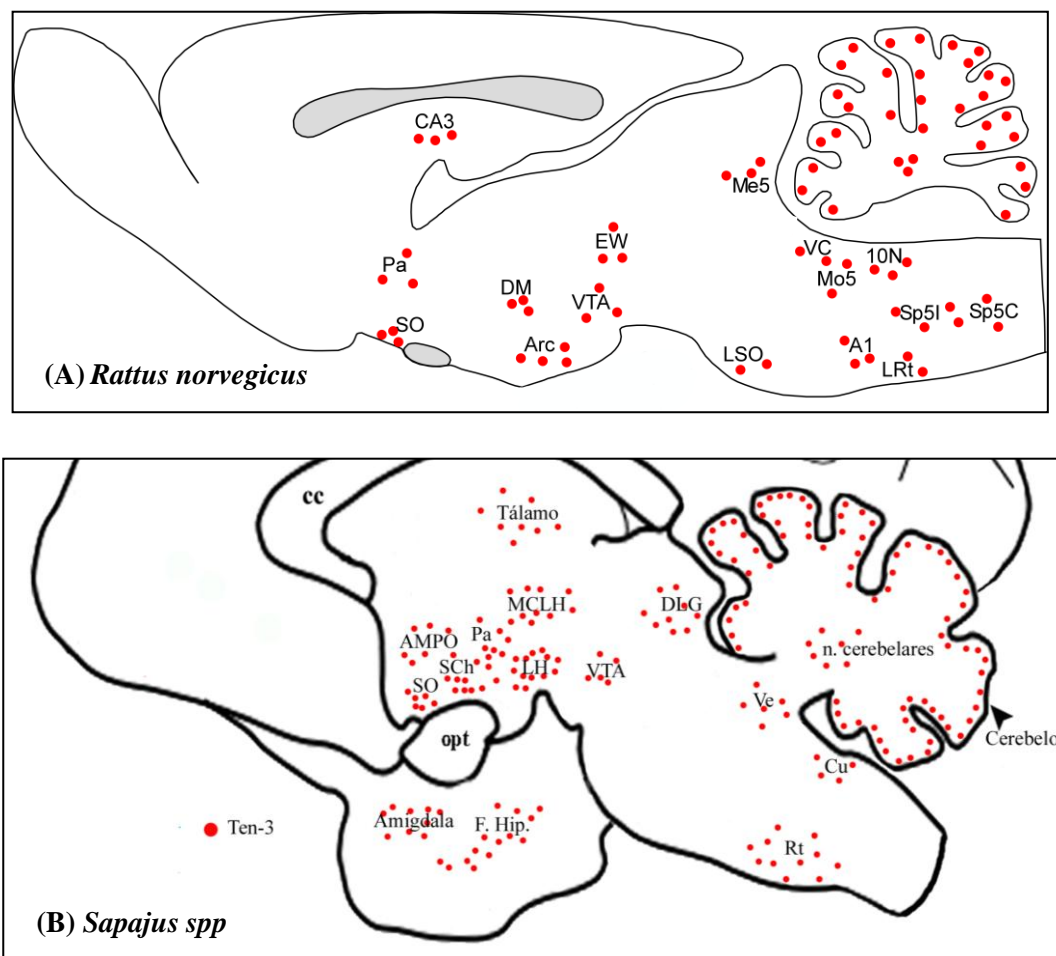


Figura 35. Desenho esquemático do encéfalo de *Rattus norvegicus* (A) e *Sapajus spp* (B) em corte sagital mostrando os territórios que apresentam corpos neuronais imunorreativos para Ten-3. É notada uma preponderância de neurônios em núcleos da região hipotalâmica do *Sapajus spp*, enquanto que em ratos esta distribuição é difusa ao longo do SNC. Abreviaturas: 10N, núcleo motor dorsal do nervo vago; A1, área noradrenérgica A1; AMPO, núcleo preoptico anteromedial; Arc, núcleo arqueado; CA3, camada CA3 do hipocampo; cc, corpo caloso; Cu, núcleo cuneiforme; DLG, geniculado lateral dorsal; DM, núcleo hipotalâmico dorsomedial; EW, núcleo de Edinger-Westphal; F. Hip., formação hipocampal; LH, hipotálamo lateral; LRT, núcleo reticular lateral; LSO, lateral superior da oliva; Me5, núcleo mesencefálico trigeminal; MCLH, hipotálamo lateral magnocelular; Mo5, núcleo motor do trigêmeo; opt, trato óptico; Pa, núcleo paraventricular do hipotálamo; Rt, núcleo reticular; Sch, núcleo supraquiasmático; SO, núcleo supra-óptico; Sp5C, núcleo espinal trigeminal parte caudal; Sp5I, núcleo espinal trigeminal parte interpolares; VC, núcleo coclear ventral; Ve, núcleos vestibulares; VTA, área tegmental ventral.

Regiões/núcleos	Ten-3 (corpo/fibras)	Regiões/núcleos	Ten-3 (corpo/fibras)
Telencéfalo		n. caudal linear da rafe	-/+
Amígdala		n. paranigral	-/+
n. central da amígdala	-/+	subs. cinz. periaquedutal, dorsomedial	-/+
Núcleos da Base		subs. cinz. periaquedutal, dorsolateral	-/+
globo pálido lateral	+/+	subs. cinz. periaquedutal, lateral	-/+
pálido ventral	-/+	subs. cinz. periaquedutal, ventrolateral	-/+
Região Septal		campo retrorubral	-/+
n. horiz. da banda diagonal	-/+	substância negra, compact part	-/+
n. septohipotalâmico	-/+	substância negra lateral	-/+
n. septal lateral	+/+	substância negra reticular	-/+
n. septal medial	-/+	n. ventral do leminisco lateral	-/+
n. septohipocampal	-/+	n. mesencefálico trigeminal	+/+
n. intersticial	-/+	mesencephalic trigeminal tract	+/+
n. da estria terminal, div. medial	-/+	n. rubro, parvicelular	+/+
n. da estria terminal, div. lateral	-/+	n. rubro, magnoelular	+/+
n. acumbens	-/+	Ponte e bulbo	
n. basal (Meynert)	-/+	núcleo dorsal da rafe	-/+
Formação Hipocampal		n. troclear	-/+
camada polimórfica do giro denteado	+/-	n. linear rostral da rafe	-/+
camada CA3 do hipocampo	+/+	n. periolivar medioventral	-/+
Diencéfalo		n. parabraquial pigmentado	-/+
Tálamo		n. parabraquial lateral dorsal	-/+
n. paraventricular tálamo parte posterior	-/+	n. reticulotegmental	+/-
n. talâmico posteromediano	-/+	n. pontino da rafe	+/+
area retroumiens	-/+	medial superior oliva	+/+
n. habenuar medial	-/+	lateral superior da oliva	+/+
n. rombóide do tálamo	-/+	n. motor dorsal do nervo vago	+/+
Subtálamo		n. motor do trigêmeo	+/-
n. parasubtalâmico	-/+	n. vestibular espinal	+/+
zona incerta	-/+	zona peritrigeminal	-/+
Hipotálamo		n. salivatório superior	-/+
zona periventricular		n. coclear ventral, parte anterior	+/+
n. supraquiasmático	-/+	n. coclear ventral, parte posterior	-/+
n. periventricular hipotálamo	-/+	n. raiz coclear	+/+
n. arqueado	+/+	n. reticular pontino, parte caudal	+/+
zona medial		n. reticular gigantocelular	+/+
n. preóptico mediano	-/+	n. reticular lateral	+/+
n. preóptico ventromedial	-/+	n. espinal trigeminal, parte caudal	+/+
n. preóptico medial	-/+	n. espinal trigeminal, parte interpolar	+/+
área preóptica lateral	-/+	n. sens. princ. trigem., parte ventrolateral	+/+
n. paraventricular do hipotálamo parvicel.	+/+	células noradrenérgicas A1	+/+
n. hipotalâmico dorsomedial, parte dorsal	-/+	area subpostrema	-/+
n. hipotalâmico dorsomedial, parte ventral	+/+	n. linear	-/+
n. hipotalâmico posterior	-/+	Cerebelo	
area hipotalâmica dorsal	-/+	Córtex	
area hipotalâmica anterior	-/+	camada de Purkinje	+/-
zona lateral		Núcleos cerebelares	
n. supraóptico	+/+	n. cerebelar lateral	+/-
area hipotalâmica lateral	-/+	n. interpósito, parte anterior	+/-
n. tuberal medial	-/+	Medula espinal	
n. magnoelular do hipotálamo lateral	-/+	lâmina I/II	-/+
região tuberal do hip. lateral	-/+	lâmina VII	+/-
parte perifornical do hip. lateral	-/+	lâmina VIII	+/-
Tronco encefálico		lâmina IX	+/-
Mesencéfalo			
Edinger-Westphal	+/-		
n. tegmental pedunculopontine	-/+		
n. tegmental subpeduncular	-/+		
area tegmental ventral	+/+		

Tabela 5. Distribuição de corpos e fibras nervosas imunorreativas à Ten-3 no SNC de *Rattus norvegicus* tratados com colchicina. Sinal de + presença de corpos neuronais imunorreativos e sinal de + a +++ intensidade de fibras imunorreativas a Ten-3 e sinal de – ausência de marcação.

4.4 Resultados do objetivo 3

Correlação da distribuição das teneurinas e latrofilinas em áreas do SNC de primatas não-humano (*Sapajus spp*)

A fim de verificar a correlação quanto a distribuição das latrofilinas (LPHNs) e as teneurinas (TENS) no SNC do primata, foram empregadas séries de cortes histológicos representativos das principais regiões encefálicas com evidente distribuição das TENS. De modo geral, a imunorreatividade para a latrofilina-2 e 3 (LPHN-2 e LPHN-3) no SNC de macacos foi discreta e restrita a poucos territórios, sendo mais evidente a distribuição da latrofilina-1 (LPHN-1). Além disso, a imunomarcção para a LPHN-1 foi observada nos corpos neuronais e ao redor destes, sendo que esta distribuição esteve presente em territórios semelhantes ao descrito para Ten-3, dados estes confirmados através do método da dupla imunofluorescência indireta.

Telencéfalo. A imunorreatividade para LPHN-1, 2 e 3 foi verificada no citosol dos neurônios das camadas piramidais internas e externas da área 4 do córtex motor primário 4(F1) (Figura 36). Foi verificado que neurônios da área de transição amigdalopiriforme (APir) e amigdalohipocampal (AHiPC) exibiram imunorreatividade para LPHN-1. A imunorreatividade também esteve na região septal, como evidenciado nos núcleos septal lateral dorsal (LSD), intermédio (LSI) e ventral (LSV) (Figura 36). Não foram observadas imunomarcções para as demais latrofilinas nestas regiões. Corpos neuronais imunorreativos para LPHN-1 e 2 também foram observados em alguns territórios pertencentes aos núcleos da base como globo pálido externo e interno e região septal como núcleo basal (Meynert) e núcleo horizontal da banda diagonal (HDB). Na região hipocampal foi observado a presença de LPHN-1 e 2 nas camadas CA1-CA4 bem como na camada granular do giro denteado da formação hipocampal (GrDG) (Figura 36 e 38).

Diencéfalo. No tálamo, discretos corpos neuronais foram observados no núcleo geniculado lateral dorsal (DLG) para LPHN-1, 2 e 3. Os núcleos hipotalâmicos mostraram imunorreatividade para LPHN-1, em particular nos neurônios do núcleo supra-óptico (SO) e paraventricular do hipotálamo parte magnocelular divisão dorsal (PaMD) sendo observado nestes núcleos padrão de imunorreatividade granular tanto no citosol quanto ao redor do corpo neuronal. (Figura 37).

Tronco encefálico. Neurônios imunorreativos para LPHN-1 e LPHN-2 foram observados na substância negra lateral (SNL), enquanto a LPHN-2 também foi constatado na substância negra reticular (SNR). O núcleo oculomotor (3N) e o campo retrorubral (RRF) exibiram imunorreatividade para todas as latrofilinas analisadas.

Cerebelo. Os núcleos profundos e a camada de células de Purkinje exibiram imunorreatividade para as LPHN-1 e 2 (Figura 36 e 38). É destacada também a imunomarcção para LPHN-1 com padrão puntiforme ao redor das células de Purkinje, bem como uma imunomarcção no citosol destes neurônios.

Medula espinal. A presença da LPHN-1 foi notada em corpos neuronais distribuídos em todos os segmentos e lâminas medulares (Figura 37), com exceção do segmento torácico. Este padrão de distribuição na medula espinal foi semelhante para LPHN-2 (Figura 38). Para LPHN-3 somente foi verificada discreta imunorreatividade na lâmina IX de todos os segmentos.

Os resultados de dupla imunomarcção evidenciaram interessantes dados principalmente para LPHN-1 e Ten-3 nas áreas descritas anteriormente, com notável colocalização destas em neurônios das regiões hipotalâmicas como núcleo supra-óptico (SO) e paraventricular do hipotálamo magnocelular dorsal (PaMD) (Figura 39). Também foi verificado que nestas áreas assim como no córtex cerebelar a imunomarcção para LPHN-1 mostrou-se puntiforme ao redor das células de Purkinje que foram duplamente marcados com Ten-3. Neurônios duplamente imunomarcados também foram encontrados em todos os segmentos e lâminas da medula espinal como evidenciado na lâmina IX (Figura 40).

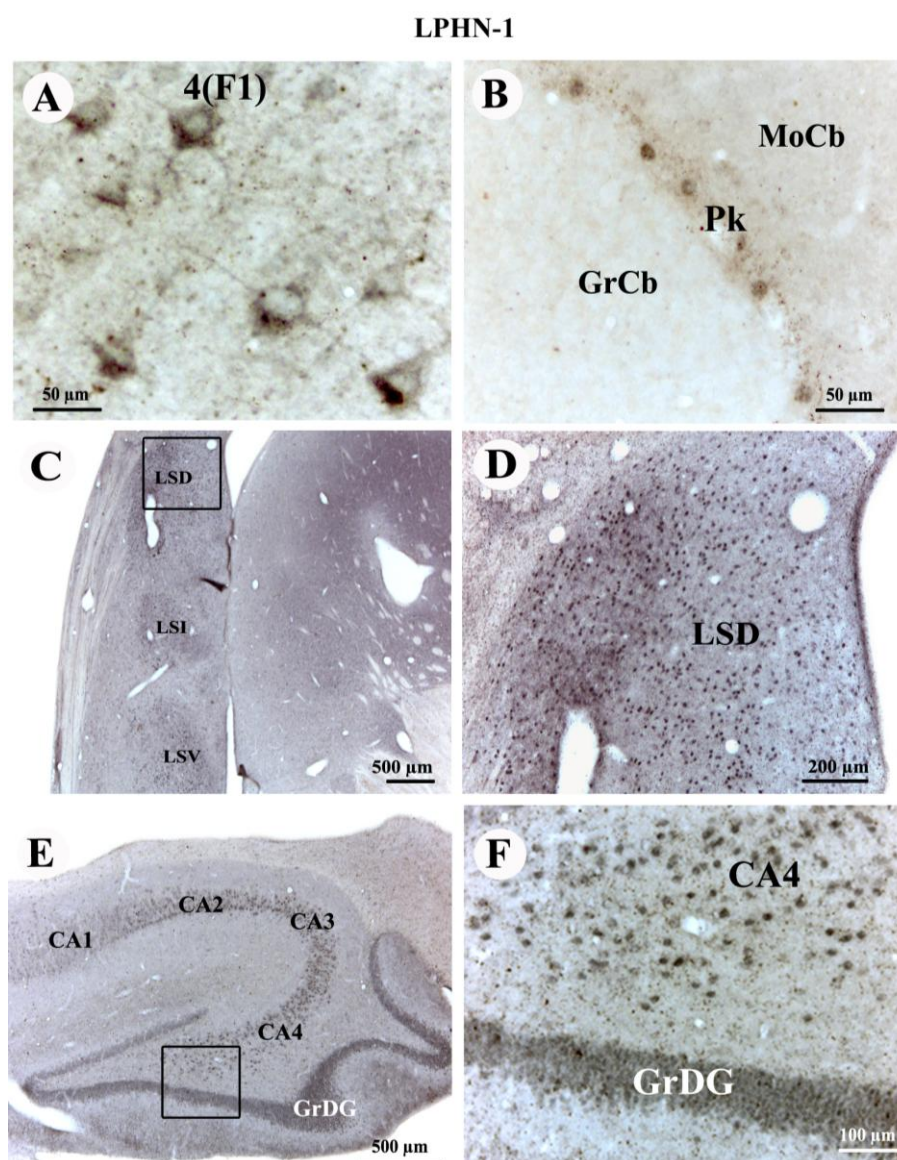


Figura 36. Distribuição da latrofilina-1 (LPHN-1) em territórios telencefálicos do *Sapajus spp.* Em (A) fotomicrografia em campo claro dos neurônios da camada piramidal interna do córtex motor primário 4(F1). Em (B) é mostrado o córtex cerebelar apresentando imunorreatividade para LPHN-1 nas células de Purkinje (Pk). Em (C) são mostradas as áreas imunomarcadas na região septal, sendo destacada a área septal lateral dorsal (LSD) em maior resolução (D). Em (E) imunomarcagem na formação hipocampal sendo evidenciado em (F) a camada CA4 do hipocampo e camada granular do giro denteado (GrDG). Abreviaturas: LSI, área septal lateral intermédia; LSV, área septal lateral ventral.

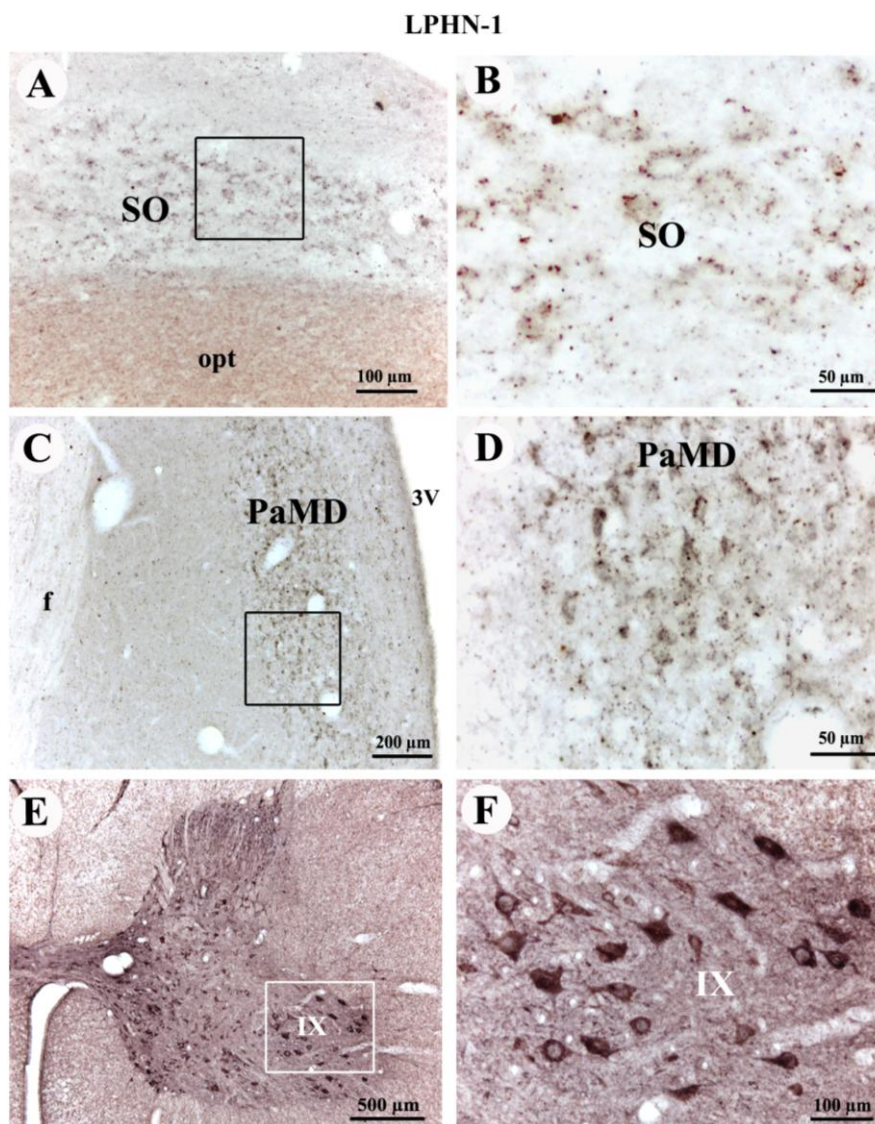


Figura 37. Distribuição da latrofilina-1 (LPHN-1) em territórios diencefálicos e da medula espinal do *Sapajus spp.* Em (A) fotomicrografia em campo claro do núcleo supra-óptico (SO) com corpos neuronais imunorreativos com padrão granular no citosol e na periferia do corpo neuronal, como mostrado em maior aumento em (B). Em (C) e (D) imunorreatividade para a LPHN-1 nos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo parte magnocelular divisão dorsal (PaMD) sendo também observado este padrão granular tanto no citosol quanto ao redor do corpo neuronal. Em (E) visão panorâmica da imunorreatividade distribuída na substância cinzenta do segmento cervical baixo da medula espinal evidenciando neurônios imunomarcados na lâmina IX em (F). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; f, fórnice; opt, trato óptico.

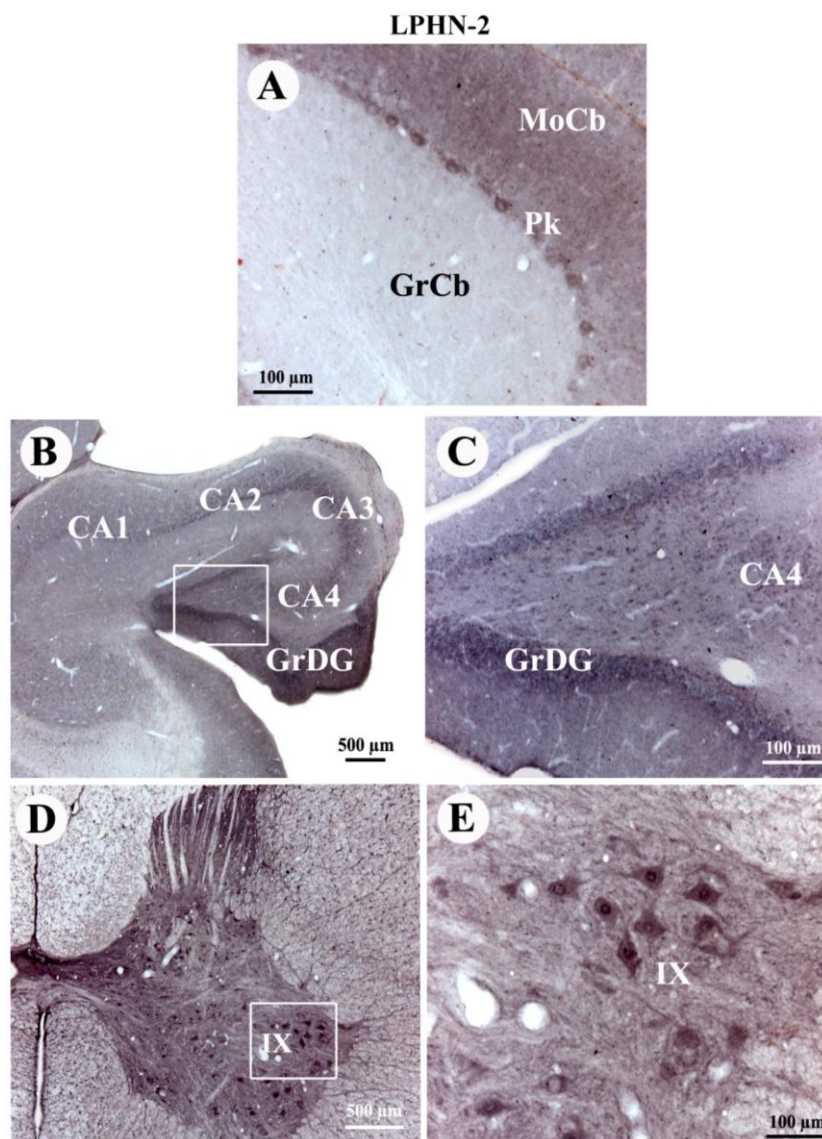


Figura 38. Distribuição da latrofilina-2 (LPHN-2) em territórios telencefálicos e da medula espinal do *Sapajus spp.* As fotomicrografias em campo claro demonstram em (A) a LPHN-2 na camada de Purkinje do cerebelo (Pk). Em (B) visão panorâmica da formação hipocámpal com discreta imunomarcção para LPHN-2 em neurônios como mostrado em maior resolução em (C) na camada granular do giro dentado (GrDG) e camada CA4 do hipocampo. Em (D) visão panorâmica da imunorreatividade distribuída na substância cinzenta do segmento lombar da medula espinal sendo observados neurônios imunorreativos na lâmina IX visto em (E).

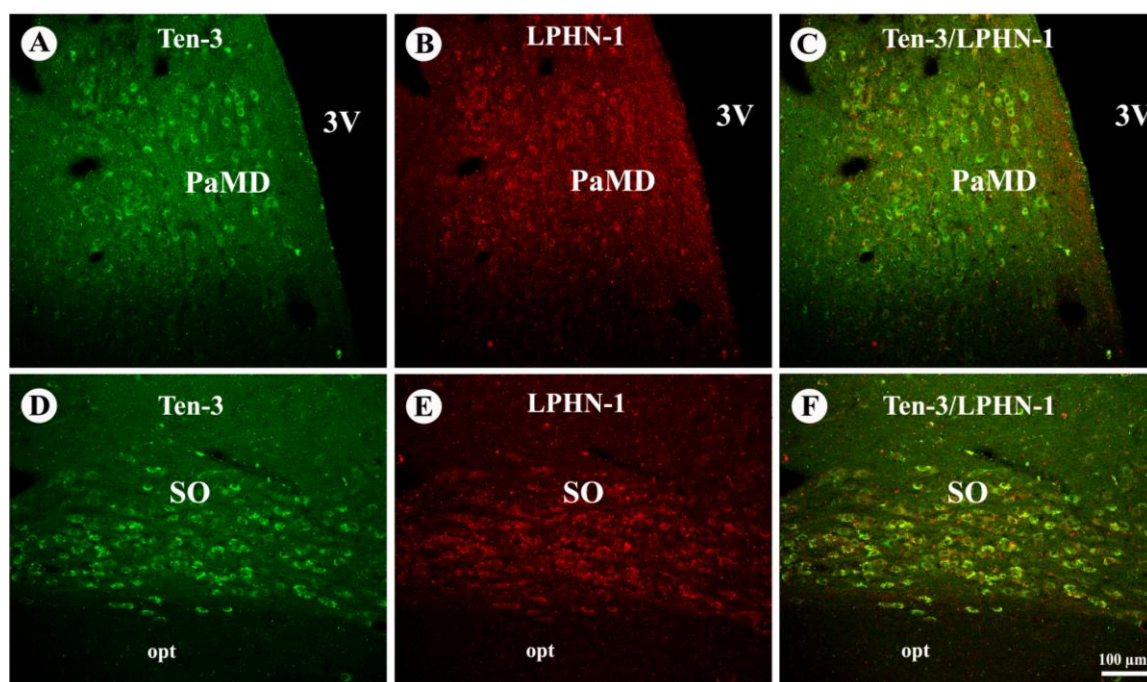


Figura 39. Colocalização da Ten-3 e LPHN-1 em núcleos hipotalâmicos do *Sapajus spp.* Fotomicrografias em microscopia confocal da dupla imunofluorescência indireta com Ten-3, marcado com FITC – fluorescência verde e LPHN-1 marcado com Cy3 – fluorescência vermelha. Em (A) e (D) imunorreatividade para Ten-3 no núcleo paraventricular do hipotálamo parte magnocelular divisão dorsal (PaMD) e supra-óptico (SO). Em (B) e (E) imunorreatividade para LPHN-1 nos mesmos núcleos. Os perfis neuronais colocalizados podem ser observados em amarelo nas figuras (C) e (F). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; opt, trato óptico.

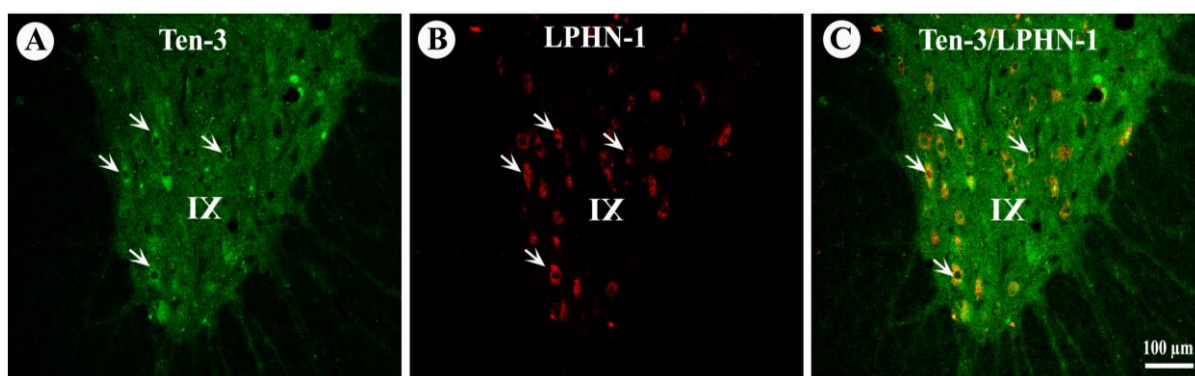


Figura 40. Colocalização da Ten-3 e LPHN-1 na medula espinal do *Sapajus spp.* Fotomicrografias em microscopia confocal da dupla imunofluorescência indireta com Ten-3, marcado com FITC – fluorescência verde e LPHN-1 marcado com Cy3 – fluorescência vermelha. Em (A) imunorreatividade para Ten-3 e em (B) para LPHN-1 na lâmina IX do segmento cervical alto da medula espinal. Em (C) os perfis neuronais colocalizados podem ser observados em amarelo sendo alguns apontados pelas setas.

5. DISCUSSÃO

5.1 Considerações metodológicas

Foi realizado neste estudo o mapeamento neuroanatômico das proteínas Ten-2, Ten-3 e Ten-4 no SNC do primata não-humano e correlação da distribuição entre TENs e latrofilinas (LPHNs) em alguns territórios neuronais, além disso também foi realizado a análise da distribuição da Ten-3 no SNC de ratos e comparação com resultados obtidos para esta mesma proteína no SNC do primata não-humano. Para tanto foi utilizado a técnica de imuno-histoquímica pelo método de imunoperoxidase e imunofluorescência. A técnica de imuno-histoquímica foi introduzida por volta dos anos 70 sendo amplamente empregada na pesquisa biomédica para identificar proteínas e outras macromoléculas em tecidos e células (LEONG et al., 2010; BURRY, 2011). Através do refinamento dos procedimentos envolvidos na técnica de imuno-histoquímica, juntamente com o desenvolvimento de vários tipos de anticorpos, conferindo aos mesmos um aumento da sensibilidade e especificidade, foi possível a utilização desta técnica em tecidos e/ou órgãos fixados em formaldeído e inclusos em parafina que podem ter seus sítios antigênicos mascarados ou modificados (LEONG et al., 2010; HOLMSETH et al., 2012; RAMOS-VARA e MILLER, 2014). O adequado controle das etapas que compõe esta técnica juntamente com o controle do anticorpo secundário e anticorpo primário são segundo BURRY (2011) essenciais para validar os resultados oriundos da imuno-histoquímica. Entretanto, trabalhos têm apontado para erros nos resultados advindos desta técnica devido principalmente ao insuficiente controle dos anticorpos empregados, especificamente o anticorpo primário que é considerado um dos controles mais difíceis (SAPER e SAWCHENKO, 2003; FRITSCHY, 2008; LORINCZ e NUSSER, 2008; BURRY, 2011; HOLMSETH et al., 2012; WARD e REHG, 2014; BAKER, 2015). Além disso, para a escolha de um bom anticorpo comercial é necessário avaliar as especificações técnicas que discrimine a região do epítipo empregado, qual parte da molécula de Ig está sendo utilizada, qual a concentração do anticorpo na alíquota, em qual hospedeiro foi produzido, para quais técnicas é utilizado, para qual tipo de processamento tecidual está mais indicado e se necessita de recuperação antigênica, além das referências de uso prévio (WARD e REHG, 2014; BAKER, 2015).

A fim de validar os resultados de imuno-histoquímica do presente estudo, foram realizados os testes de titulação de todos os anticorpos, teste de adsorção nos anticorpos anti-

Ten-2 e anti-Ten-3 da marca comercial Santa Cruz Biotechnology®, uso de anticorpos anti-TENs de diferentes marcas comerciais que são importantes para confirmação da imunorreatividade oriunda do anticorpo primário empregado e a omissão do anticorpo primário (FRITSCHY, 2008; LORINCZ e NUSSER, 2008; BORDEAUX et al., 2010; BURRY, 2011; HOLMSETH et al., 2012; WARD e REHG, 2014). É interessante ressaltar que o teste de adsorção nos demais anticorpos não foi realizado devido à inexistência de peptídeos comerciais correspondentes com a porção de reconhecimento dos anticorpos. A realização destes testes é importante para confirmar a específica localização do antígeno e minimizar a presença de falso-positivo, sendo, portanto importante para determinar a qualidade do anticorpo empregado (WARD e REHG, 2014). Os testes de titulação e adsorção segundo BURRY (2011) fazem parte da etapa do controle do anticorpo primário utilizado na técnica de imuno-histoquímica. O teste de titulação se baseia na determinação da concentração ideal do anticorpo primário através do uso de soluções com concentrações crescentes do anticorpo primário, isto assegura que o excesso ou a insuficiente quantidade deste gerem resultado falso-negativo ou falso-positivo (HOFFMAN et al., 2008). A determinação da concentração do anticorpo primário permite sugerir se a marcação oriunda do reconhecimento deste anticorpo é sensível e até mesmo específica ou não como proposto por WARD e REHG (2014) e HOLMSETH et al. (2012) sendo em nosso trabalho as concentrações para os anticorpos primários anti-Ten-2, anti-Ten-3 e anti-Ten-4 estiveram na faixa de 1:100 a 1:2000.

O teste de adsorção é uma etapa importante para determinar se o anticorpo primário se liga corretamente no antígeno alvo (BURRY, 2011; HOLMSETH et al., 2012), entretanto não é capaz de garantir que o anticorpo primário é capaz de se ligar exclusivamente na proteína de interesse ou em proteínas com sequências similares (BURRY, 2011; HOLMSETH et al., 2012). Embora seja um teste muito utilizado, este e os demais testes para validação dos anticorpos como teste de titulação, omissão do anticorpo e uso de anticorpos alternativos que reconheçam antígenos distintos de uma mesma molécula não devem ser os únicos determinantes para garantir a validação dos resultados obtidos pela técnica de imuno-histoquímica, necessitando de controles adicionais. Esses controles adicionais podem ser o emprego de outras técnicas, tais como “imunoblots”, hibridização *in situ* e métodos de manipulação da expressão das proteínas de interesse através do silenciamento total ou parcial

do gene (criação de animais “knockout” e “knockdown”) (SAPER e SAWCHENKO, 2003; RHODES e TRIMMER, 2006; FRITSCHY, 2008; BURRY, 2011; IVELL et al., 2014).

Para a realização do teste de adsorção, inicialmente o anticorpo primário é pré-incubado com o seu peptídeo correspondente a fim de obter a saturação de todos seus sítios antigênicos. Em prosseguimento, esta solução é aplicada ao tecido estudado, supondo que após a adsorção do mesmo não haja sítios imunorreativos nas frações com maior concentração do peptídeo (BITTENCOURT e ELIAS, 2007; BURRY, 2011). No presente estudo foi verificado ausência de imunoreatividade para os anticorpos adsorvidos para Ten-2 e Ten-3 da Santa Cruz Biotechnology®, sugerindo que estes anticorpos possam reconhecer somente as porções das proteínas Ten-2 e Ten-3 presente no SNC do primata não-humano. Além disso, quando é analisada a porção antigênica reconhecida por cada anticorpo, pode ser notado que os anticorpos da Santa Cruz Biotechnology® reconhecem pequenos peptídeos da proteína, o que sugere maior possibilidade do anticorpo de se ligar ao antígeno alvo resultando em uma melhor eficiência do teste de adsorção como sugerido por BURRY (2011). Entretanto, para a Ten-2, alguns territórios do córtex cerebral permaneceram imunomarcados sugerindo o reconhecimento de outros antígenos por este anticorpo, ou então, a solução de anticorpo não foi totalmente saturada com o peptídeo haja vista que a concentração do peptídeo estava aquém da relação 1:1 (peptídeo/anticorpo) como verificado nas informações do fabricante.

Outro controle para técnica de imuno-histoquímica é comparar o padrão de imunomarcção produzido por outros anticorpos que reconheçam distintos antígenos de uma mesma molécula alvo e, portanto mostrem resultados coincidentes quando as demais condições experimentais da técnica não são modificadas (FRITSCHY, 2008; LORINCZ e NUSSER, 2008; IVELL et al., 2014). Para isso, foram utilizados e comparados os anticorpos de diferentes marcas comerciais que apresentam diferentes sítio de reconhecimento nas porções das proteínas TENs como apresentado na tabela 1. Disto posto, foi observado que para Ten-2 os anticorpos das marcas Santa Cruz Biotechnonology® e R&D Systems® eram capazes de reconhecer antígenos localizados na porção amino-terminal da Ten-2. Notamos que através do uso de ambos os anticorpos os resultados de distribuição da Ten-2 apresentou territórios de imunoreatividade equivalentes. Entretanto, o anticorpo anti-Ten-2 da marca comercial R&D Systems® é capaz de reconhecer um maior número de aminoácidos da proteína Ten-2 do que os anticorpos da marca Santa Cruz Biotechnonology® e não apresentou peptídeo comercial que pudessem ser utilizados no teste de adsorção. Devido a isso, foi

utilizado o anticorpo anti-Ten-2 da marca Santa Cruz Biotechnology® para realização de todo o mapeamento da Ten-2 uma vez que este anticorpo é capaz de reconhecer uma menor sequência de aminoácidos, sugerindo maior possibilidade de especificidade do anticorpo (BURRY, 2011). Adicionado a isto, houve a possibilidade de realizar o teste de adsorção conferindo uma abordagem adicional para validar a especificidade do anticorpo, além de permitir uma imunorreatividade melhor definida.

Nas imunomarcações para a Ten-3 pode ser verificado que os anticorpos da marca comercial Santa Cruz Biotechnology® e Novus Biologicals® são capazes de reconhecer antígenos localizados na porção carboxi-terminal da Ten-3. Entretanto, a marcação verificada para o anticorpo Novus Biologicals® demonstrou tanto território de distribuição quanto padrão de imunorreatividade distinto da Santa Cruz Biotechnology® que foi evidente nos prologamentos e corpo neuronal, enquanto que anti-Ten-3 da Novus Biologicals® foi evidente nos núcleos dos neurônios. O distinto padrão de marcação entre estes anticorpos pode ser devido à região de reconhecimento do anticorpo da Novus Biologicals® posicionar na parte final da extremidade carboxi-terminal. Este fato pode indicar que o anticorpo reconhece uma possível área de clivagem que resulta em um peptídeo que pode ser internalizado pela célula e transferido a região nuclear, porém não sendo possível afirmar esta possibilidade somente através da técnica de imuno-histoquímica (FRITSCHY, 2008). Além disso, devido à presença desta marcação nuclear por um anticorpo que estaria reconhecendo uma proteína de membrana celular gera a dúvida sobre a especificidade do anticorpo (FRITSCHY, 2008); somado ao fato de que trabalhos anteriores relatam a translocação da porção amino-terminal das TENs para o núcleo e não a porção carboxi-terminal (BAGUTTI et al., 2003; NUNES et al., 2005). Outra possibilidade sugerida para a distinta imunomarkação pode ser devido à possibilidade de alguns antígenos serem mascarados durante a preparação do tecido através do método de fixação por modificar as propriedades dos constituintes teciduais, a conformação tridimensional da proteína e a capacidade de penetração do anticorpo no tecido, resultando na dificuldade do reconhecimento do antígeno por um, mas não por outro anticorpo (FRITSCHY, 2008; LORINCZ e NUSSER, 2008; RAMOS-VARA e MILLER, 2014). Desta forma, com base nos resultados de imunomarkação do anticorpo anti-Ten-3 da Santa Cruz Biotechnology® e somado ao fato da realização do teste de adsorção e que este anticorpo reconhece sítios distantes da porção de clivagem da região carboxi-

terminal, capaz de gerar o respectivo peptídeo TCAP-3, optou-se por realizar a distribuição neuroanatômica com tal anticorpo.

Com relação ao anticorpo anti-Ten-4, foi verificado que os anticorpos da marca comercial Santa Cruz Biotechnology® são capazes de reconhecer antígenos localizados na porção carboxi-terminal enquanto que os da R&D Systems® reconhecem a porção amino-terminal. Além disso, foi verificada uma fraca imunorreatividade para anti-Ten-4 da R&D Systems® porém nos mesmos locais na qual foi constatado marcação para o anticorpo anti-Ten-4 da Santa Cruz Biotechnology®. A fraca marcação constatada para anti-Ten-4 da R&D Systems® pode ser devido à possibilidade do processo de fixação tecidual resultar no mascaramento dos antígenos teciduais que podem ser reconhecidos por este anticorpo (FRITSCHY, 2008; LORINCZ e NUSSER, 2008; RAMOS-VARA e MILLER, 2014). Desta forma, optou-se pelo uso do anticorpo da marca comercial anti-Ten-4 da Santa Cruz Biotechnology® para o mapeamento neuroanatômica desta proteína, ressaltando que embora seu sítio de reconhecimento esteja presente na extremidade carboxi-terminal o mesmo encontra-se distante da porção de clivagem capaz de gerar o peptídeo TCAP-4.

Além destes testes foi realizada a omissão do anticorpo primário para validação dos anticorpos empregado neste estudo. O teste de omissão do anticorpo primário visa determinar se o anticorpo secundário empregado é específico para reconhecer o anticorpo primário e não antígenos teciduais que poderiam gerar resultado falso-positivo (BORDEAUX et al., 2010). No presente estudo, a omissão do anticorpo primário não evidenciou imunomarcação tecidual sugerindo a especificidade do anticorpo secundário empregado em reconhecer somente antígenos do anticorpo primário.

Ressaltamos que para facilitar a análise dos resultados dos testes de controle da técnica de imuno-histoquímica foram avaliadas as regiões do SNC da formação hipocampal e cerebelo, uma vez que essas regiões são consideradas na literatura como os principais sítios de distribuição das TENs tanto em aves quanto em roedores (OOHASHI et al., 1999; OTAKI e FIRESTEIN, 1999; ZHOU et al., 2003; KENZELMANN et al., 2008). Portanto, representam territórios adequados para verificar a especificidade e eficiência da interação do anticorpo primário.

5.2 Distribuição das teneurina-2 e teneurina-4 no SNC de primatas não-humano (Sapajus spp)

Uma parte considerável dos estudos das TENs no SNC de peixes, aves e roedores, enfocam sua distribuição durante a neurogênese, quando suas expressões são mais acentuadas (MIEDA et al., 1999; MINET et al., 1999; OOHASHI et al., 1999; RUBIN et al., 1999; BENZUR et al., 2000; RUBIN et al., 2002; LI et al., 2006; KENZELMANN et al., 2008). Entretanto, com relação à distribuição neuroanatômica das TENs esta não foi completamente detalhada em mamíferos durante a fase adulta, em particular em primatas.

A distribuição da teneurina-2 (Ten-2) foi inicialmente descrita no SNC de embriões de aves principalmente no sistema visual talamofugal formada pela retina, núcleo talâmico dorsal, núcleo geniculado lateral ventral, tecto óptico do mesencéfalo e córtex visual, cujo circuito neuronal está relacionado à detecção dos movimentos. Neste mesmo trabalho foi verificada a presença da teneurina-1 (Ten-1) nas vias do sistema visual tectofugal formada pela retina, tecto óptico do mesencéfalo e núcleo rotundo do tálamo responsável pela discriminação da cor e do brilho (RUBIN et al., 1999; KENZELMANN et al., 2008). Este padrão de distribuição demonstra que em embriões de aves Ten-1 e Ten-2 encontram-se predominante na via visual, porém em populações neuronais distintas (RUBIN et al., 1999; KENZELMANN et al., 2008; YOUNG et al., 2013) (MINET et al., 1999; RUBIN et al., 1999; RUBIN et al., 2002; KENZELMANN et al., 2008). No trabalho de ZHOU et al. (2003) foi constatado que a Ten-2 esteve presente nas camadas CA1 e CA2 do hipocampo, giro denteado, além das camadas molecular e granular do cerebelo de camundongos. Em nossos resultados verificamos a distribuição da Ten-2 nas camadas hipocampais incluindo CA1-CA4, camada polimórfica e granular do giro dentado correspondendo com os resultados da literatura. No entanto, a distribuição desta proteína no cerebelo, como verificada em nossos resultados na camada de células de Purkinje, não havia sido mencionada anteriormente. A literatura ainda relata a distribuição da Ten-2 no tálamo, área septal e núcleos do mesencéfalo de ratos e camundongos (OTAKI e FIRESTEIN, 1999; LI et al., 2006; YOUNG et al., 2013). No *Sapajus spp* não houve significativa imunorreatividade em núcleos talâmicos e região septal, com exceção do núcleo geniculado lateral no qual observamos neurônios imunorreativos correspondendo com os resultados apresentado por YOUNG et al. (2013) em camundongos. No entanto, a distribuição da Ten-2 no *Sapajus spp* foi mais evidente no tronco encefálico como mostrado em neurônios imunorreativos do núcleo oculomotor, núcleo motor do trigêmeo, núcleo rubro, núcleos cocleares, núcleo facial e acessório. Uma característica interessante encontrada em nossos resultados é que em alguns territórios do SNC como córtex

motor e somatosensorial foi notado padrão de marcação associada à membrana celular, similar aos achados de OTAKI e FIRESTEIN (1999) e de YOUNG et al. (2013) no córtex de camundongos adultos. Entretanto, também foi verificado em nossos resultados que a imunomarcação para a Ten-2 estava dispersa e homogênea no citosol. Tal característica pode advir da possibilidade do anticorpo em reconhecer além da proteína Ten-2 outros peptídeos ou proteínas oriundos da transcrição alternativa (“splice variants”) do gene da Ten-2, ou mesmo ser decorrentes de clivagem pós-traducionais que resulta em proteínas intermediárias. Esta hipótese foi levantada com base em estudos que verificaram que os genes das TENS podem codificar “splice variants” (OOHASHI et al., 1999; SILVA et al., 2011; WOELFLE et al., 2015) sendo sugestivo o reconhecimento dos mesmos e da própria proteína Ten-2 quando do uso de anticorpos comerciais. Desta forma, foi adotado em nosso trabalho o termo imunorreatividade relacionada às TENS na descrição dos resultados de imuno-histoquímica, uma vez que esta hipótese tem sido reforçada com bases em resultados prévios de “western blotting” realizado em nosso laboratório que revelou que os anticorpos comerciais anti-TENS reconhecem bandas com peso molecular igual e menor do que o das TENS.

Com relação ao papel funcional da Ten-2 a literatura descreve que em mamíferos a mesma está relacionada ao processo de regeneração neuronal, uma vez que houve aumento dos níveis de uma proteína similar a Ten-2 denominada de neurestina nos neurônios sensoriais do bulbo olfatório de ratos adultos após lesão da cavidade nasal com sulfato de zinco (OTAKI e FIRESTEIN, 1999). Além disso, estudos desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram a presença de Ten-2 principalmente em astrócitos após indução de lesão mecânica no córtex cerebral de ratos adultos, principalmente após 48 horas da referida injúria. Estes resultados sugerem que a Ten-2 possa estar envolvida no processo de reparo tecidual do SNC, dos quais os astrócitos são fundamentais, porém maiores estudos ainda são necessários para verificar se essa expressão é facilitatória ou inibitória neste processo neuroinflamatório. Em nossos resultados verificamos que em condições de normalidade a distribuição da Ten-2 esteve presente nos territórios hipocâmpais, cerebelares e principalmente no tronco encefálico. O hipocampo e cerebelo foram os primeiros territórios neuronais mencionados nos trabalhos de distribuição das TENS (OOHASHI et al., 1999; ZHOU et al., 2003) sendo que estes locais também foram encontrados em nossos resultados confirmando a conservação desta família de proteínas no SNC. Funcionalmente o hipocampo está envolvido com a consolidação da memória enquanto que o cerebelo participa do controle do equilíbrio e

planejamento motor, sendo que ambos os territórios apresentam conexões com o sistema límbico que está relacionado com o controle do comportamento emocional (ROOSTAEI et al., 2014; MCDONALD e MOTT, 2016). A participação das TENs e dos seus peptídeos TCAPs na plasticidade dos neurônios piramidais do hipocampo foi verificada através da regulação de proteínas do citoesqueleto, sendo esta regulação capaz de alterar a morfologia dendrítica e as redes neuronais (AL CHAWAF et al., 2007; TAN et al., 2012). A distribuição da Ten-2 nestes e em outros territórios neuronais do *Sapajus spp* sugerem a versatilidade na qual as TENs podem estar envolvidas, podendo contribuir direta ou indiretamente em diversas funções através da manutenção da integridade neuronal e de suas conexões que são essenciais para a funcionabilidade dos núcleos e dos circuitos neuronais como já sugerido anteriormente (RUBIN et al., 2002; KINEL-TAHAN et al., 2007; LEAMEY et al., 2008; YOUNG e LEAMEY, 2009; MOSCA, 2015).

A distribuição da Ten-4 tem sido pouco relatada, sendo notado que a distribuição do seu RNAm foi mencionada durante os diferentes estágios de desenvolvimento embrionário de camundongos em territórios do telencéfalo, diencéfalo e mesencéfalo (ZHOU et al., 2003). No mesmo estudo foi avaliado a distribuição do RNAm da Ten-4 em animais adultos, onde foram encontrados resultados no córtex cerebral, camada CA1, CA2 e CA3 do hipocampo, além da camada molecular e células de Purkinje do cerebelo (ZHOU et al., 2003). Em nossos resultados verificamos neurônios imunorreativos para a Ten-4 no córtex cerebral, especificamente em áreas corticais motoras e somatosensorial, camada CA1-CA4 e camada granular do giro denteado da formação hipocampal e nas células de Purkinje do cerebelo, correspondendo com estudos prévios. Além disso, a proteína Ten-4 no SNC do *Sapajus spp* apresentou distribuição de corpos neuronais imunorreativos principalmente em núcleos do tronco encefálico e medula espinal como podemos destacar para o núcleo de Edinger-Westphal, núcleo oculomotor, núcleos vestibulares, núcleos cocleares e lâmina VIII e IX da medula espinal. Entretanto, foi verificado que fibras imunorreativas estiveram amplamente distribuídas pelo SNC com destaque para as regiões dos núcleos da base, região septal e do tronco encefálico como bem evidenciado no trato solitário e trato espinal do trigêmeo. Desta forma, verificamos que alguns dos dados de distribuição neuroanatômica da Ten-2 e Ten-4 no SNC de primata não-humano são resultados ainda não mencionados na literatura e sugerem a preservação e expansão desta família de proteínas.

Com relação às funções da Ten-4 no SNC tem sido proposta sua participação na neurogênese uma vez que embriões de camundongos mutantes para esta proteína apresentam defeitos no padrão de formação, sobrevivência e proliferação celular durante a formação do tubo neural e organogênese (LOSSIE et al., 2005). Também foi verificado que camundongos mutantes com fenótipo de tremor e hipomielinização apresentaram ausência da expressão da Ten-4, revelando sua importância para a diferenciação dos oligodendrócitos e na formação de axônios mielinizados de pequeno diâmetro na medula espinal (SUZUKI et al., 2012). Recentemente, foi constatado o envolvimento da Ten-4 na regeneração do músculo estriado esquelético de ratos, sendo que células satélites deste músculo expressam Ten-4 e sua inativação facilita a regeneração muscular contribuindo para o crescimento e formação das fibras da musculatura esquelética (ISHII et al., 2015). Estes dados reforçam a possível participação da Ten-4 nas funções motoras e colaboram com nossos resultados de distribuição em neurônios de áreas motoras como córtex cerebral, núcleos da base, tronco encefálico e corno ventral da medula espinal. Além disso, a evidente imunorreatividade para Ten-4 em fibras presente nas lâminas superficiais da medula espinal e em tratos do tronco encefálico como trato solitário e trato espinal do trigêmeo sugere seu envolvimento nas vias de informação sensorial. A presença da Ten-4 nas fibras do trato espinal do trigêmeo pode ser oriunda de neurônios pseudo-unipolares dos gânglios facial, glossofaríngeo, vago e trigeminal enquanto que fibras presente nas lâminas I e II da medula espinal podem ser oriundas dos gânglios espinais, estando estas vias relacionadas com informações sensoriais gerais (WAITE e ASHWELL, 2004). Esta suposição é reforçada com bases no estudo de BEN-ZUR et al. (2000) que mencionou a distribuição do RNAm para Ten-4 em gânglios espinais e trigeminais de embriões de camundongos. Desta forma, as fibras encontradas no trato solitário também podem ser oriundas de gânglios, como o facial, glossofaríngeo e vago, estando relacionado com informações sensoriais especiais no caso à gustação (PRITCHARD e NORGRÉN, 2004). Portanto, como sugerido para a Ten-2 é possível que a Ten-4 atue direta ou indiretamente nestas funções através da manutenção de circuitos neuronais (RUBIN et al., 2002; KINEL-TAHAN et al., 2007; LEAMEY et al., 2008; YOUNG e LEAMEY, 2009; MOSCA, 2015).

5.3 Distribuição da teneurina-3 no SNC de primatas não-humano (*Sapajus spp*) e ratos (*Rattus norvegicus*)

A presença da proteína Ten-3 no SNC do *Sapajus spp* apresentou, de modo geral, correspondência de localização com os dados apresentados na literatura em relação ao SNC camundongos e cangurus (ZHOU et al., 2003; LI et al., 2006; ANTINUCCI et al., 2013; CARR et al., 2014). A distribuição do RNAm da Ten-3 em embriões de camundongos concentra-se na região telencefálica e diencefálica durante os estágios iniciais de desenvolvimento, sendo posteriormente verificada a distribuição em regiões do tronco encefálico e da medula espinal em estágios mais tardios (ZHOU et al., 2003). Em camundongos adultos foi relatada sua presença no córtex cerebral, tálamo, camadas CA1 e CA2 do hipocampo e camadas granular, molecular e de células de Purkinje do cerebelo que representam os principais sítios de distribuição tanto do RNAm quanto da proteína da Ten-3 (ZHOU et al., 2003). A camada CA1 do hipocampo do *Sapajus spp* não apresentou fibras ou corpos neuronais imunorreativos à Ten-3 como descrito em estudo prévio (ZHOU et al., 2003); entretanto, foi verificada a discreta presença de neurônios e moderada a intensa concentração de fibras na CA2 e CA4 do hipocampo e camada granular e polimórfica do giro denteado da formação hipocampal do primata não-humano. A distribuição da Ten-3 no cerebelo do *Sapajus spp* estava localizada na camada de Purkinje e camada molecular, colaborando com os resultados mencionados em camundongos, porém não sendo verificada a distribuição na camada granular do cerebelo. Em cangurus e camundongos adultos também foi verificada a distribuição da Ten-3 em regiões neuronais envolvidas com o processamento da informação visual pela via retino-talâmica (LEAMEY et al., 2007; ANTINUCCI et al., 2013; CARR et al., 2014) colaborando com nossos resultados de distribuição na qual foi observada a presença da Ten-3 no núcleo geniculado lateral dorsal, que faz parte desta via visual. Além disso, verificamos que a Ten-3 no SNC do *Sapajus spp* esteve presente em vários territórios neuronais, porém a maior concentração de corpos neuronais e fibras varicosas imunorreativas estiveram distribuídas em núcleos hipotalâmicos como núcleo paraventricular do hipotálamo, principalmente a porção magnocelular, núcleo supra-óptico, área pré-óptica, área hipotalâmica lateral, núcleo tuberomamilar e núcleo supraquiasmático. Vale ser ressaltado que o núcleo supraquiasmático faz parte da via visual retino-hipotalâmica associada com a regulação do ritmo circadiano (SAPER, 2004), entretanto, não verificamos a descrição das TENs nesta via visual e nestes territórios hipotalâmicos, embora a presença da

Ten-3 no hipotálamo seja mencionada em camundongos durante a fase embrionária porém sem detalhes quanto a localização neuroanatômica (LI et al., 2006). Fibras nervosas imunorreativas para a Ten-3 no *Sapajus* com características de varicosidades também estiveram distribuídas por todo o neuroeixo principalmente nas regiões da amígdala, núcleos da base, alguns territórios da região septal, camada CA2 a CA4 da formação hipocampal e tronco encefálico.

É interessante destacar que a ampla distribuição da Ten-3 nos núcleos hipotalâmicos e a vasta distribuição de fibras nervosas com aspecto varicoso em todo o neuroeixo do *Sapajus spp*, sugere a possibilidade de que o anticorpo anti-Ten-3 empregado neste estudo possa apresentar afinidade por proteínas relacionadas à Ten-3, possivelmente provindas da tradução de parte do gene que codifica a proteína Ten-3 (“splice variants”) ou a possibilidade de tal anticorpo em reconhecer peptídeos oriundos da clivagem de tal proteína, embora o sítio de reconhecimento do anticorpo esteja longe do sítio de clivagem dos TCAPs, de acordo com a descrição do fabricante. Como mencionado anteriormente a geração de “splice variants” para os membros das TENS tem sido relatada (OOHASHI et al., 1999; SILVA et al., 2011; WOELFLE et al., 2015) e a possibilidade do reconhecimento de proteínas intermediárias oriundas da clivagem pós-traducionais por anticorpos comerciais tem sido reforçada por nossos resultados de “western blotting”, que evidenciou bandas com peso molecular que coincidem com as proteínas advindas da clivagem proteolítica (dados não mostrados). Desta forma, como descrito anteriormente os resultados advindos deste estudo referem-se a tanto as TENS quanto a proteínas que estão relacionadas as TENS sendo por isso adotado o termo imunorreatividade relacionada às TENS na descrição dos resultados de imuno-histoquímica.

Os interessantes resultados de distribuição da proteína Ten-3 no SNC do *Sapajus spp* direcionaram a complementação deste estudo através de uma análise comparativa com ratos. Para isto, foram utilizados cortes histológicos dos SNC de ratos normais e pré-tratados com colchicina. A colchicina é um agente antimitótico que interrompe os microtúbulos por se ligar a tubulina e impedir a polimerização ocasionando a interrupção do transporte axoplasmático (BITTENCOURT e ELIAS, 2007). Devido a estas características seu uso mostra-se eficaz para detectar neuropeptídeos no soma dos neurônios, uma vez que estes são produzidos no corpo celular e rapidamente transportados para o axônio, dificultando a visualização dos mesmos no corpo neuronal quando não se administra esta droga. Desta

forma, o emprego da colchicina facilitou a visualização dos corpos neuronais imunorreativos à Ten-3, permitindo uma análise comparativa mais fidedigna entre o SNC de ratos e primatas não-humanos.

No SNC de ratos foi verificado que a distribuição da Ten-3 não foi tão ampla quanto a observada em primatas não-humano. Algumas regiões hipotalâmicas foram similares aquelas encontradas no *Sapajus* como núcleo supra-óptico e núcleo paraventricular do hipotálamo, sendo este melhor evidenciado em ratos na porção parvicelular. Outro território que apresentou correspondência de distribuição da Ten-3, em ambas as espécies, foi o lobo anterior da hipófise, lâminas I e IX da medula espinal e região cerebelar, na qual foi constatada imunorreatividade na camada de células de Purkinje e núcleos profundos do cerebelo. Também foram notados neurônios imunorreativos, principalmente no tronco encefálico, como núcleo motor dorsal do nervo vago e células noradrenérgicas A1, dados estes não verificados no primata *Sapajus*. Fibras nervosas varicosas no SNC do rato estiveram concentradas na região septal, similarmente aos dados advindos *do Sapajus spp.* O diencéfalo e o tronco encefálico de ratos também exibiram intensa presença de fibras varicosas, sugerindo padrão de imunorreatividade neuropeptidérgica em possíveis campos terminais. É interessante destacar que os ratos tratados com colchicina ainda exibiam imunorreatividade em fibras e possíveis terminais neuronais em algumas regiões. Isto pode ser devido à intensa quantidade de proteína Ten-3 presente em alguns territórios neuronais, não sendo este agente antimitótico capaz de restringir tal proteína ao soma neuronal, ou mesmo, indicando que a Ten-3 apresenta baixa capacidade de depleção nos terminais nervosos.

De modo geral a distribuição da Ten-3 no SNC mostra-se conservada, porém com alguns territórios distintos entre o *Sapajus* e ratos. Estes dados comparativos indicam que a Ten-3 represente um sistema neuropeptidérgico que provavelmente sofreu uma significativa expansão dos roedores para os primatas. Além disso, a distribuição da Ten-3 em neurônios e fibras varicosas, principalmente no hipotálamo (paraventricular e supra-óptico), e em células da hipófise anterior, sugere que a mesma possa estar envolvida em outras funções ainda não mencionadas na literatura como neuroendócrinas. Esta função é bem descrita para os núcleos paraventricular magnocelular e supra-óptico, que liberam neuropeptídeos como vasopressina e oxitocina diretamente na hipófise posterior, e núcleo paraventricular parvicelular que secreta neuropeptídeos no sistema porta-hipofisário que controla a função de células endócrinas da hipófise anterior (SAPER, 2004).

Apesar de nossos resultados se concentrarem em territórios hipotalâmicos, temos notado que a literatura enfatiza a distribuição e o papel funcional da Ten-3 no sistema visual de peixes, cangurus e camundongos sendo nesses também mencionado a função de controle motor (LEAMEY et al., 2007; ANTINUCCI et al., 2013; MERLIN et al., 2013; YOUNG et al., 2013; CARR et al., 2014). Em peixes, a Ten-3 mostra-se importante para o desenvolvimento estrutural e funcional de células da retina como as células ganglionares e de neurônios tectais pós-sinápticos, enquanto que em animais submetidos ao silenciamento parcial do gene (animais “knockdown”), a orientação sináptica do sistema visual mostrou-se defeituosa, pois resultou em defeitos na morfologia dos axônios e dendritos das células ganglionares (ANTINUCCI et al., 2013). Além disso, camundongos adultos submetidos ao silenciamento do gene para Ten-3 (animais “knockout”) exibiram prejuízos na via visual induzidos por falhas no alinhamento das projeções ipsilateral da retina para o núcleo geniculado lateral (LEAMEY et al., 2007). Outro estudo relata a participação da Ten-3 na formação de circuito neuronal associado com as projeções talamoestriatal advindas do núcleo parafascicular do tálamo (PF) (TRAN et al., 2014). Este circuito estriatal em animais cujo gene para Ten-3 foi silenciado apresentaram distribuição topográfica alterada das projeções do PF, quando comparado com animais controle, além de exibirem atrasos no desenvolvimento das habilidades motoras (TRAN et al., 2014). Os estudos envolvendo as TENs estão sendo ampliados consideravelmente nos últimos anos a fim de elucidar seus mecanismos de ação, sendo verificado importante papel das interações homofílicas e heterofílicas para o desenvolvimento de conexões neuronais e manutenções das conexões sinápticas (MOSCA, 2015; WOELFLE et al., 2015). As interações heterofílicas entre latrofilinas (LPHNs) e TENs têm sido verificadas em estudos de cultura de células, cromatografia e biologia molecular (SILVA et al., 2011; BOUCARD et al., 2014; O'SULLIVAN et al., 2014) sendo que estas interações também podem ser estabelecidas entre TENs e proteínas pertencentes às famílias das integrinas e distroglicanas (Figura 41) (BOUCARD et al., 2014; MOSCA, 2015; WOELFLE et al., 2015; WOELFLE et al., 2016).

5.4 Correlação da distribuição das teneurinas e latrofilinas em áreas do SNC de primatas não-humano (*Sapajus spp*)

As latrofilinas (LPHNs) são uma família de receptores de membrana ligados à proteína G e principalmente distribuídas no SNC (SILVA e USHKARYOV, 2010).

Inicialmente foram descritas a partir de estudos que buscavam os possíveis receptores para a α -latrotoxina, que é uma toxicina presente no veneno da aranha viúva-negra. Esta toxicina é capaz de aumentar o fluxo de Ca^{2+} na membrana dos neurônios e com isso ativar a liberação de neurotransmissores e neuromoduladores de células neurais e neuroendócrinas (DAVLETOV et al., 1996; SUGITA et al., 1998; MATSUSHITA et al., 1999).

As LPHNs são compostas por três membros sendo estes denominados de latrofilina-1 (LPHN-1), latrofilina-2 (LPHN-2) e latrofilina-3 (LPHN-3). Os três membros possuem estrutura complexa com grande sequência intra e extracelular e com vários domínios presente na porção carboxi-terminal conservado entre as espécies, sugerindo com bases em suas características estruturais que os mesmos possuam funções similares (SUGITA et al., 1998; MATSUSHITA et al., 1999). É verificado que as LPHNs possam participar das funções sinápticas, porém não sendo receptores com funções sinápticas específicas, sendo sugerida a esta família a função de adesão celular e transdução de sinal (WOELFLE et al., 2016). Estudos de “northern blotting” evidenciaram a distribuição dos membros das LPHNs em diversos tecidos de ratos sendo verificada expressão predominante da LPHN-1 no SNC, enquanto que LPHN-2 além de distribuição no SNC foi evidente no tecido pulmonar e hepático e a expressão da LPHN-3 foi fracamente presente no SNC (MATSUSHITA et al., 1999). Estudos posteriores utilizando metodologia semelhante, juntamente com técnica de imuno-histoquímica e hibridização *in situ* descreveram a distribuição da proteína e do RNAm para LPHN-3 no SNC de humanos, sendo esta encontrado principalmente na amígdala, núcleo caudado, hipocampo, córtex cerebral e cerebelar (ARCOS-BURGOS et al., 2010). Desta forma fica claro que esta família de receptores está envolvida com a atividade e manutenção dos tecidos neuronais e não neuronais.

As LPHNs estão relacionadas com a liberação pré-sináptica de neurotransmissores, além da participação na estabilidade neuronal a partir da interação com as TENs (SILVA et al., 2011) (Figura 41). Esta interação foi descrita entre LPHN-1 com parte de um transcrito da teneurina-2 (“splice variant”) denominado de Lasso (SILVA et al., 2011), sendo notado que LPHN-1 está localizada na membrana pré-sináptica e Lasso está localizada na membrana pós-sináptica auxiliando na estabilização sináptica (SILVA et al., 2011; WOELFLE et al., 2015) (Figura 41). Além disso, foi verificado que esta interação é capaz de controlar os níveis de Ca^{+2} pré-sináptico e assim, possivelmente, controlar a sinalização intracelular nas junções sinápticas (SILVA et al., 2011).

Por meio de técnica imuno-histoquímica para as LPHNs verificamos que os resultados obtidos no SNC do *Sapajus spp* corresponderam aos achados da literatura que descrevem evidente imunomarcção no SNC para LPHN-1 e discreta para LPHN-2 e LPHN-3 (ARCOS-BURGOS et al., 2010; BECKMANN et al., 2013; O'SULLIVAN et al., 2014). Foi verificado em nossos resultados que a imunorreatividade para as LPHNs esteve em territórios mencionados na literatura como córtex cerebral, hipocampo e córtex cerebelar (BOUCARD et al., 2014; WOELFLE et al., 2016). O padrão de imunorreatividade verificada principalmente para a LPHN-1, através da microscopia de luz e confocal, demonstra que esta proteína esteve localizada no citosol e na periferia do corpo neuronal sugestivo de campo terminal, correspondendo com o observado na literatura (SILVA et al., 2011). Não foi verificada evidente imunorreatividade para LPHN-3 no SNC do *Sapajus spp*, apesar de a literatura demonstrar que a mesma se encontra no citosol de áreas como córtex cerebral, hipocampo, núcleos da base, bulbo e medula espinal de humanos (ARCOS-BURGOS et al., 2010; MEZA-AGUILAR e BOUCARD, 2014). Em nossos resultados de colocalização foi verificado que os territórios analisados apresentaram dupla imunomarcção para as LPHNs e TENs sendo bem evidente entre Ten-3 e LPHN-1. Observamos que estes dois elementos estiveram no citosol e membrana celular do mesmo neurônio e de neurônios adjacentes como mencionado na literatura que melhor evidenciou tal característica por meio da microscopia eletrônica (SILVA et al., 2011; WOELFLE et al., 2015).

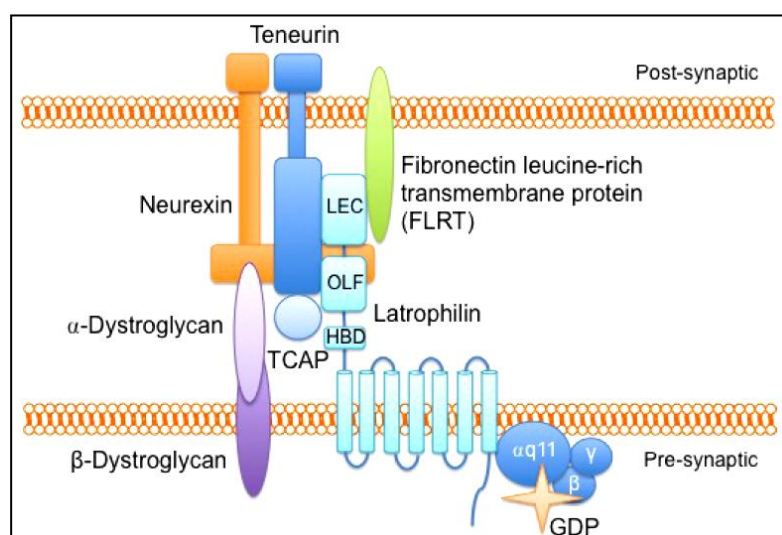


Figura 41. Esquema da localização e da interação entre TENs e LPHNs na membrana neuronal. É verificado a existência de proteínas de estabilização como ditroglicanas, neurexinas e proteína de transmembrana fibronectina rica em leucina (FLRT) que estão interligadas entre as TENs e LPHNs. Ilustração extraída e adaptada de WOELFLE et al. (2016). Abreviaturas: GDP, guanosina difosfato; HBD, domínio ligante de hormônio (

“hormone-binding domain”); LEC, domínios de lectina; OLF, domínios de olfactomedina; TCAP, peptídeo associado ao terminal carboxila das teneurinas.

Com relação à interação entre TENs e LPHNs, estudos preliminares desenvolvidos pelo nosso laboratório evidenciaram o aumento da imunoreatividade para Ten-2 e LPHN-1, 2 e 3 em astrócitos reativos após indução experimental de lesão mecânica, reforçando o papel das interações heterofílicas da TENs no SNC. Outros estudos verificaram que a LPHN-1 interage com a Ten-4 e pode regular de modo direta ou indiretamente a formação das sinapses e/ou sua manutenção (BOUCARD et al., 2014). A interação entre LPHN-3 com a Ten-1 também foi relatada, porém não sendo verificado o papel desta interação no desenvolvimento das sinapses (O’SULLIVAN et al., 2014). Alguns indícios também apontam a participação dos membros da TENs em em distúrbios psiquiátricos associado com prejuízos sinápticos como autismo, distúrbio bipolar e esquizofrenia (DUBOVSKY et al., 1994; VIK e YATHAM, 1998; BUERVENICH et al., 2001; TUCKER e CHIQUET-EHRISMANN, 2006; ALDAHMESH et al., 2012; BASTÍAS-CANDIA et al., 2015; MOSCA, 2015; SCHOLER et al., 2015). Isto pode ser devido a mudanças no processamento de recompensa na amígdala (HEINRICH et al., 2013) ou devido a malformações da rede neuronal resultando em prejuízos na sinalização sináptica ou no desenvolvimento glial (SUZUKI et al., 2012; SUZUKI et al., 2014). Estes indícios apontam e reforçam a participação e interação das LPHNs e TENs no controle de desordens de humor através da regulação sináptica (WOELFLE et al., 2016), como também em desordens de aprendizagem e déficit de atenção (ARCOS-BURGOS et al., 2010; MEZA-AGUILAR e BOUCARD, 2014).

Desta forma, nossos resultados colaboram para a possível interação entre os membros das TENs e LPHNs contribuindo com o possível papel funcional dos mesmos, entretanto, outros estudos ainda se fazem necessários para comprovação desta função.

6 CONCLUSÕES

Através do presente estudo podemos concluir que:

1) A distribuição das TENs foi verificada em vários territórios do SNC do *Sapajus spp* como córtex motor primário, cerebelo e hipocampo envolvidos com o controle motor e memória;

2) O mapeamento neuroanatômica da Ten-3 no SNC do primata *Sapajus spp* foi evidente em áreas envolvidas com o controle neuroendócrino como verificado em áreas hipotalâmicas, sendo estes resultados correspondentes ao encontrado em ratos;

3) A imunorreatividade para a Ten-2 e Ten-4 estiveram, principalmente, em regiões do tronco encefálico, sugerindo participação das mesmas no controle das funções motoras e sensoriais;

4) Os ligantes endógenos das TENs, denominados de latrofilinas (LPHNs), demonstraram correspondência de distribuição com as TENs principalmente entre LPHN-1 e Ten-3.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL CHAWAF, A.;ST AMANT, K.;BELSHAM, D.;LOVEJOY, D. A. Regulation of neurite growth in immortalized mouse hypothalamic neurons and rat hippocampal primary cultures by teneurin c-terminal-associated peptide-1. **Neuroscience**, v. 144, p. 1241-54, 2007.
- ALDAHMESH, M. A.;MOHAMMED, J. Y.;AL-HAZZAA, S.;ALKURAYA, F. S. Homozygous null mutation in *od3* causes microphthalmia in humans. **Genet Med**, v. 14, p. 900-4, 2012.
- ALFARO, J. W.; SILVA, J. D., JR.; RYLANDS, A. B. How different are robust and gracile capuchin monkeys? An argument for the use of *sapajus* and *cebus*. **Am J Primatol**, v. 74, p. 273-86, 2012.
- ALKELAI, A.;OLENDER, T.;HAFFNER-KRAUSZ, R.;TSOORY, M. M.;BOYKO, V.;TATARSKYY, P.;GROSS-ISSEROFF, R.;MILGROM, R.;SHUSHAN, S.;BLAU, I.;COHN, E.;BEERI, R.;EPHRAT, L. L.;PRAS, E.;LANCET, D. A role for *tenm1* mutations in congenital general anosmia. **Clin Genet**, v. p. 2016.
- ANTINUCCI, P.;NIKOLAOU, N.;MEYER, M. P.;HINDGES, R. Teneurin-3 specifies morphological and functional connectivity of retinal ganglion cells in the vertebrate visual system. **Cell Rep**, v. 5, p. 582-92, 2013.
- ARCOS-BURGOS, M.;JAIN, M.;ACOSTA, M. T.;SHIVELY, S.;STANESCU, H.;WALLIS, D.;DOMENE, S.;VELEZ, J. I.;KARKERA, J. D.;BALOG, J.;BERG, K.;KLETA, R.;GAHL, W. A.;ROESSLER, E.;LONG, R.;LIE, J.;PINEDA, D.;LONDONO, A. C.;PALACIO, J. D.;ARBELAEZ, A.;LOPERA, F.;ELIA, J.;HAKONARSON, H.;JOHANSSON, S.;KNAPPSKOG, P. M.;HAAVIK, J.;RIBASES, M.;CORMAND, B.;BAYES, M.;CASAS, M.;RAMOS-QUIROGA, J. A.;HERVAS, A.;MAHER, B. S.;FARAONE, S. V.;SEITZ, C.;FREITAG, C. M.;PALMASON, H.;MEYER, J.;ROMANOS, M.;WALITZA, S.;HEMMINGER, U.;WARNKE, A.;ROMANOS, J.;RENNER, T.;JACOB, C.;LESCH, K. P.;SWANSON, J.;VORTMEYER, A.;BAILEY-WILSON, J. E.;CASTELLANOS, F. X.;MUENKE, M. A common variant of the latrophilin 3 gene, *lphn3*, confers susceptibility to *adhd* and predicts effectiveness of stimulant medication. **Mol Psychiatry**, v. 15, p. 1053-66, 2010.
- BAGUTTI, C.;FORRO, G.;FERRALLI, J.;RUBIN, B.;CHIQUET-EHRISMANN, R. The intracellular domain of teneurin-2 has a nuclear function and represses *zic-1*-mediated transcription. **J Cell Sci**, v. 116, p. 2957-66, 2003.
- BAKER, M. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. **Nature**, v. 521, p. 274-6, 2015.
- BASTÍAS-CANDIA, S.;BRAIDY N.;ZOLEZZI J. M.;C., I. N. Teneurins and alzheimer's disease: A suggestive role for a unique family of proteins. **Medical Hypotheses**, v. p. 2015.
- BAUMGARTNER, S.; CHIQUET-EHRISMANN, R. *Ten a*, a drosophila gene related to *tenascin*, shows selective transcript localization. **Mechanisms of development**, v. 40, p. 165-176, 1993.
- BAUMGARTNER, S.;MARTIN D.;HAGIOS C.;R, C.-E. *Ten m*, a drosophila gene related to *tenascin*, is a new pair-rule gene. **The EMBO Journal**, v. 13, p. 3728-3740, 1994.
- BECKMANN, J.;SCHUBERT, R.;CHIQUET-EHRISMANN, R.;MULLER, D. J. Deciphering teneurin domains that facilitate cellular recognition, cell-cell adhesion, and neurite outgrowth using atomic force microscopy-based single-cell force spectroscopy. **Nano Lett**, v. 13, p. 2937-46, 2013.
- BEN-ZUR, T.;FEIGE, E.;MOTRO, B.;WIDES, R. The mammalian *od3* gene family: Homologs of a drosophila pair-rule gene with expression implying distinct yet overlapping developmental roles. **Dev Biol**, v. 217, p. 107-20, 2000.
- BITTENCOURT, J.; ELIAS, C. **Métodos em neurociência**. São Paulo: Roca. 2007
- BORDEAUX, J.;WELSH, A.;AGARWAL, S.;KILLIAM, E.;BAQUERO, M.;HANNA, J.;ANAGNOSTOU, V.;RIMM, D. Antibody validation. **Biotechniques**, v. 48, p. 197-209, 2010.

- BOUCARD, A. A.; MAXEINER, S.; SUDHOF, T. C. Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: Regulation by alternative splicing. **J Biol Chem**, v. 289, p. 387-402, 2014.
- BUERVENICH, S.; XIANG, F.; SYDOW, O.; JONSSON, E. G.; SEDVALL, G. C.; ANVRET, M.; OLSON, L. Identification of four novel polymorphisms in the calcitonin/alpha-cgrp (calca) gene and an investigation of their possible associations with parkinson disease, schizophrenia, and manic depression. **Hum Mutat**, v. 17, p. 435-6, 2001.
- BURRY, R. W. Controls for immunocytochemistry: An update. **J Histochem Cytochem**, v. 59, p. 6-12, 2011.
- CARR, O. P.; GLENDINING, K. A.; LEAMEY, C. A.; MAROTTE, L. R. Retinal overexpression of ten-m3 alters ipsilateral retinogeniculate projections in the wallaby (*macropus eugenii*). **Neurosci Lett**, v. 566, p. 167-71, 2014.
- CHAND, D. S. **The molecular characterization and role of teneurin c-terminal associated peptide (tcap)-1 in the regulation of neuronal cytoskeletal dynamics and male reproduction**. Cell and Systems Biology, University of Toronto, 2013.
- CHEN, Y.; XU, M.; DE ALMEIDA, R.; LOVEJOY, D. A. Teneurin c-terminal associated peptides (tcap): Modulators of corticotropin-releasing factor (crf) physiology and behavior. **Front Neurosci**, v. 7, p. 166, 2013.
- CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascins. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, p. 986-90, 2004.
- DAVLETOV, B. A.; SHAMOTIENKO, O. G.; LELIANOVA, V. G.; GRISHIN, E. V.; USHKARYOV, Y. A. Isolation and biochemical characterization of a ca²⁺-independent alpha-latrotoxin-binding protein. **J Biol Chem**, v. 271, p. 23239-45, 1996.
- DRABIKOWSKI, K.; TRZEBIATOWSKA, A.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Ten-1, an essential gene for germ cell development, epidermal morphogenesis, gonad migration, and neuronal pathfinding in *caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 282, p. 27-38, 2005.
- DUBOVSKY, S. L.; THOMAS, M.; HIJAZI, A.; MURPHY, J. Intracellular calcium signalling in peripheral cells of patients with bipolar affective disorder. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 243, p. 229-34, 1994.
- FENG, K.; ZHOU, X. H.; OOHASHI, T.; MORGELIN, M.; LUSTIG, A.; HIRAKAWA, S.; NINOMIYA, Y.; ENGEL, J.; RAUCH, U.; FASSLER, R. All four members of the ten-m/odz family of transmembrane proteins form dimers. **J Biol Chem**, v. 277, p. 26128-35, 2002.
- FRITSCHY, J. M. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. **Eur J Neurosci**, v. 28, p. 2365-70, 2008.
- GUSTAVSON, K. H.; ANNEREN, G.; MALMGREN, H.; DAHL, N.; LJUNGGREN, C. G.; BACKMAN, H. New x-linked syndrome with severe mental retardation, severely impaired vision, severe hearing defect, epileptic seizures, spasticity, restricted joint mobility, and early death. **Am J Med Genet**, v. 45, p. 654-8, 1993.
- HEINRICH, A.; LOURDUSAMY, A.; TZSCHOPPE, J.; VOLLSTADT-KLEIN, S.; BUHLER, M.; STEINER, S.; BACH, C.; POUSTKA, L.; BANASCHEWSKI, T.; BARKER, G.; BUCHEL, C.; CONROD, P.; GARAVAN, H.; GALLINAT, J.; HEINZ, A.; ITERMANN, B.; LOTH, E.; MANN, K.; MARTINOT, J. L.; PAUS, T.; PAUSOVA, Z.; SMOLKA, M.; STROHLE, A.; STRUVE, M.; WITT, S.; FLOR, H.; SCHUMANN, G.; RIETSCHEL, M.; NEES, F.; CONSORTIUM, I. The risk variant in *odz4* for bipolar disorder impacts on amygdala activation during reward processing. **Bipolar Disord**, v. 15, p. 440-5, 2013.
- HILL, W. C. O. **Primates: Comparative anatomy and taxonomy**. UK: Edinburgh at the University Press, v.5. 1960 (Iv cebidae - part a)
- HOFFMAN, G. E.; LE, W. W.; SITA, L. V. The importance of titrating antibodies for immunocytochemical methods. **Curr Protoc Neurosci**, v. Chapter 2, p. Unit 2 12, 2008.
- HOLMSETH, S.; ZHOU, Y.; FOLLIN-ARBELET, V. V.; LEHRE, K. P.; BERGLES, D. E.; DANBOLT, N. C. Specificity controls for immunocytochemistry: The antigen preadsorption test can lead to inaccurate assessment of antibody specificity. **J Histochem Cytochem**, v. 60, p. 174-87, 2012.

- HONG, W.; MOSCA, T. J.; LUO, L. Teneurins instruct synaptic partner matching in an olfactory map. **Nature**, v. 484, p. 201-7, 2012.
- ISHII, K.;SUZUKI, N.;MABUCHI, Y.;ITO, N.;KIKURA, N.;FUKADA, S. I.;OKANO, H.;TAKEDA, S.;AKAZAWA, C. Muscle satellite cell protein teneurin-4 regulates differentiation during muscle regeneration. **Stem Cells**, v. p. 2015.
- IVELL, R.; TEERDS, K.; HOFFMAN, G. E. Proper application of antibodies for immunohistochemical detection: Antibody crimes and how to prevent them. **Endocrinology**, v. 155, p. 676-87, 2014.
- IZAR, P.;VERDERANE, M. P.;PETERNELLI-DOS-SANTOS, L.;MENDONCA-FURTADO, O.;PRESOTTO, A.;TOKUDA, M.;VISALBERGHI, E.;FRAGASZY, D. Flexible and conservative features of social systems in tufted capuchin monkeys: Comparing the socioecology of *sapajus libidinosus* and *sapajus nigritus*. **Am J Primatol**, v. 74, p. 315-31, 2012.
- KENZELMANN, D.;CHIQUET-EHRISMANN, R.;LEACHMAN, N. T.;TUCKER, R. P. Teneurin-1 is expressed in interconnected regions of the developing brain and is processed in vivo. **BMC Dev Biol**, v. 8, p. 30, 2008.
- KINEL-TAHAN, Y.;WEISS, H.;DGANGY, O.;LEVINE, A.;WIDES, R. Drosophila odz gene is required for multiple cell types in the compound retina. **Dev Dyn**, v. 236, p. 2541-2554, 2007.
- LEAMEY, C. A.;GLENDINING, K. A.;KREIMAN, G.;KANG, N. D.;WANG, K. H.;FÄSSLER, R.;SAWATARI, A.;TONEGAWA, S.;SUR, M. Differential gene expression between sensory neocortical areas: Potential roles for ten_m3 and bc16 in patterning visual and somatosensory pathways. **Cereb cortex**, v. 18, p. 2008.
- LEAMEY, C. A.;MERLIN, S.;LATTOUF, P.;SAWATARI, A.;ZHOU, X.;DEMEL, N.;GLENDINING, K. A.;OOHASHI, T.;SUR, M.;R, F. Ten_m3 regulates eye-specific patterning in the mammalian visual pathway and is required for binocular vision. **PLoS Biol**, v. 5, p. 241, 2007.
- LEAMEY, C. A.; SAWATARI, A. The teneurins: New players in the generation of visual topography. **Semin Cell Dev Biol**, v. 35, p. 173-9, 2014.
- LEONG, T. Y.; COOPER, K.; LEONG, A. S. Immunohistology--past, present, and future. **Adv Anat Pathol**, v. 17, p. 404-18, 2010.
- LEVINE, A.;BASHAN-AHREND, A.;BUDAI-HADRIAN, O.;GARTENBERG, D.;MENASHEROW, S.;WIDES, R. Odd oz: A novel drosophila pair rule gene. **Cell**, v. 77, p. 587-98, 1994.
- LI, H.; BISHOP, K. M.; O'LEARY, D. D. Potential target genes of *emx2* include *odz/ten-m* and other gene families with implications for cortical patterning. **Mol Cell Neurosci**, v. 33, p. 136-49, 2006.
- LORINCZ, A.; NUSSER, Z. Specificity of immunoreactions: The importance of testing specificity in each method. **J Neurosci**, v. 28, p. 9083-6, 2008.
- LOSSIE, A. C.;NAKAMURA, H.;THOMAS, S. E.;JUSTICE, M. J. Mutation of *17rn3* shows that *odz4* is required for mouse gastrulation. **Genetics**, v. 169, p. 285-99, 2005.
- LOVEJOY, D. A. Structural evolution of urotensin-i: Reflections of life before corticotropin releasing factor. **Gen Comp Endocrinol**, v. 164, p. 15-9, 2009.
- LOVEJOY, D. A.; AL CHAWAF, A.; CADINOUCHE, M. Z. Teneurin c-terminal associated peptides: An enigmatic family of neuropeptides with structural similarity to the corticotropin-releasing factor and calcitonin families of peptides. **Gen Comp Endocrinol**, v. 148, p. 299-305, 2006.
- LOVEJOY, D. A.; ROTZINGER, S.; BARSYTE-LOVEJOY, D. Evolution of complementary peptide systems: Teneurin c-terminal-associated peptides and corticotropin-releasing factor superfamilies. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1163, p. 215-20, 2009.
- MALMGREN, H.;SUNDEVALL, M.;DAHL, N.;GUSTAVSON, K. H.;ANNEREN, G.;WADELIUS, C.;STEEN-BONDESON, M. L.;PETTERSSON, U. Linkage mapping of a severe x-linked mental retardation syndrome. **Am J Hum Genet**, v. 52, p. 1046-52, 1993.

- MATSUSHITA, H.; LELIANOVA, V. G.; USHKARYOV, Y. A. The latrophilin family: Multiply spliced g protein-coupled receptors with differential tissue distribution. **FEBS Lett**, v. 443, p. 348-52, 1999.
- MCDONALD, A. J.; MOTT, D. D. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. **J Neurosci Res**, v. p. 2016.
- MERLIN, S.;HORNG, S.;MAROTTE, L. R.;SUR, M.;SAWATARI, A.;LEAMEY, C. A. Deletion of ten-m3 induces the formation of eye dominance domains in mouse visual cortex. **Cereb Cortex**, v. 23, p. 763-74, 2013.
- MEZA-AGUILAR, D. G.; BOUCARD, A. A. Latrophilins updated. **Biomol Concepts**, v. 5, p. 457-78, 2014.
- MIEDA, M.;KIKUCHI, Y.;HIRATE, Y.;AOKI, M.;OKAMOTO, H. Compartmentalized expression of zebrafish ten-m3 and ten-m4, homologues of the drosophila ten(m)/odd oz gene, in the central nervous system. **Mech Dev**, v. 87, p. 223-7, 1999.
- MINET, A. D.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Phylogenetic analysis of teneurin genes and comparison to the rearrangement hot spot elements of e. Coli. **Gene**, v. 257, p. 87-97, 2000.
- MINET, A. D.;RUBIN, B. P.;TUCKER, R. P.;BAUMGARTNER, S.;CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurin-1, a vertebrate homologue of the drosophila pair-rule gene ten-m, is a neuronal protein with a novel type of heparin-binding domain. **J Cell Sci**, v. 112 (Pt 12), p. 2019-32, 1999.
- MOSCA, T. J. On the teneurin track: A new synaptic organization molecule emerges. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 204, 2015.
- MOSCA, T. J.;HONG, W.;DANI, V. S.;FAVALORO, V.;LUO, L. Trans-synaptic teneurin signalling in neuromuscular synapse organization and target choice. **Nature**, v. 484, p. 237-41, 2012.
- NAGLE, C. A., DENARI, J H. **The reproductive biology of capuchin monkey (cebus spp)**: International Zoo Yearbook, v.22. 1982
- NUNES, S. M.;FERRALLI, J.;CHOI, K.;BROWN-LUEDI, M.;MINET, A. D.;CHIQUET-EHRISMANN, R. The intracellular domain of teneurin-1 interacts with mbd1 and cap/ponsin resulting in subcellular codistribution and translocation to the nuclear matrix. **Exp Cell Res**, v. 305, p. 122-32, 2005.
- O'SULLIVAN, M. L.;MARTINI, F.;VON DAAKE, S.;COMOLETTI, D.;GHOSH, A. Lphn3, a presynaptic adhesion-gpcr implicated in adhd, regulates the strength of neocortical layer 2/3 synaptic input to layer 5. **Neural Dev**, v. 9, p. 7, 2014.
- OOHASHI, T.;ZHOU, X. H.;FENG, K.;RICHTER, B.;MORGELIN, M.;PEREZ, M. T.;SU, W. D.;CHIQUET-EHRISMANN, R.;RAUCH, U.;FASSLER, R. Mouse ten-m/odz is a new family of dimeric type ii transmembrane proteins expressed in many tissues. **J Cell Biol**, v. 145, p. 563-77, 1999.
- OTAKI, J. M.; FIRESTEIN, S. Neurestin: Putative transmembrane molecule implicated in neuronal development. **Dev Biol**, v. 212, p. 165-81, 1999.
- PAXINOS, G.;HUANG, X.;PETRIDES, M.;TOGA, A. **The rhesus monkey brain in stereotaxic coordinates**. 2009
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2007
- PRITCHARD, T.; NORNGREN, R. Gustatory system. In: PAXINOS, G.; MAI, J. (Ed.). **The human nervous system**: Elsevier, 2004. Gustatory system, p.1171-1196
- QIAN, X.;BARSYTE-LOVEJOY, D.;WANG, L.;CHEWPOY, B.;GAUTAM, N.;AL CHAWAF, A.;LOVEJOY, D. A. Cloning and characterization of teneurin c-terminus associated peptide (tcap)-3 from the hypothalamus of an adult rainbow trout (oncorhynchus mykiss). **Gen Comp Endocrinol**, v. 137, p. 205-16, 2004.
- RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A. When tissue antigens and antibodies get along: Revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. **Vet Pathol**, v. 51, p. 42-87, 2014.
- REXED, B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. **J Comp Neurol**, v. 96, p. 414-95, 1952.

- RHODES, K. J.; TRIMMER, J. S. Antibodies as valuable neuroscience research tools versus reagents of mass distraction. **J Neurosci**, v. 26, p. 8017-20, 2006.
- ROOSTAEI, T.; NAZERI, A.; SAHRAIAN, M. A.; MINAGAR, A. The human cerebellum: A review of physiologic neuroanatomy. **Neurol Clin**, v. 32, p. 859-69, 2014.
- ROSENE, D. L.; ROY, N. J.; DAVIS, B. J. A cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact. **J Histochem Cytochem**, v. 34, p. 1301-15, 1986.
- RUBIN, B. P.; TUCKER, R. P.; BROWN-LUEDI, M.; MARTIN, D.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurin 2 is expressed by the neurons of the thalamofugal visual system in situ and promotes homophilic cell-cell adhesion in vitro. **Development**, v. 20, p. 2002.
- RUBIN, B. P.; TUCKER, R. P.; MARTIN, D.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurins: A novel family of neuronal cell surface proteins in vertebrates, homologous to the drosophila pair-rule gene product ten-m. **Dev Biol**, v. 216, p. 195-209, 1999.
- SAPER, C. Hypothalamus. In: PAXINOS, G.; MAI, J. (Ed.). **The human nervous system**: Elsevier, 2004. Hypothalamus, p.513-550
- SAPER, C. B.; SAWCHENKO, P. E. Magic peptides, magic antibodies: Guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. **J Comp Neurol**, v. 465, p. 161-3, 2003.
- SCHOLER, J.; FERRALLI, J.; THIRY, S.; CHIQUET-EHRISMANN, R. The intracellular domain of teneurin-1 induces the activity of microphthalmia-associated transcription factor (mitf) by binding to transcriptional repressor hint1. **J Biol Chem**, v. 290, p. 8154-65, 2015.
- SILVA, J. P.; LELIANOVA, V. G.; ERMOLYUK, Y. S.; VYSOKOV, N.; HITCHEN, P. G.; BERNINGHAUSEN, O.; RAHMAN, M. A.; ZANGRANDI, A.; FIDALGO, S.; TONEVITSKY, A. G.; DELL, A.; VOLYNSKI, K. E.; USHKARYOV, Y. A. Latrophilin 1 and its endogenous ligand lasso/teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signaling capabilities. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, p. 12113-8, 2011.
- SILVA, J. P.; USHKARYOV, Y. A. The latrophilins, "split-personality" receptors. **Adv Exp Med Biol**, v. 706, p. 59-75, 2010.
- SKLAR, P.; RIPKE, S.; LJ, S. Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near odz4. **Nat Genet**, v. 43, p. 977-83, 2011.
- ST JOHN JL, R. D., LUEBKE JI Morphology and electrophysiology of dentate granule cells in the rhesus monkey: Comparison with the rat. **The Journal of Comparative neurology**, v. 387, p. 136-147, 1997.
- SUGITA, S.; ICHTCHENKO, K.; KHVOTCHEV, M.; SUDHOF, T. C. Alpha-latrotoxin receptor cirl/latrophilin 1 (cl1) defines an unusual family of ubiquitous g-protein-linked receptors. G-protein coupling not required for triggering exocytosis. **J Biol Chem**, v. 273, p. 32715-24, 1998.
- SUZUKI, N.; FUKUSHI, M.; KOSAKI, K.; DOYLE, A. D.; DE VEGA, S.; YOSHIZAKI, K.; AKAZAWA, C.; ARIKAWA-HIRASAWA, E.; YAMADA, Y. Teneurin-4 is a novel regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination of small-diameter axons in the CNS. **J Neurosci**, v. 32, p. 11586-99, 2012.
- SUZUKI, N.; NUMAKAWA, T.; CHOU, J.; DE VEGA, S.; MIZUNIWA, C.; SEKIMOTO, K.; ADACHI, N.; KUNUGI, H.; ARIKAWA-HIRASAWA, E.; YAMADA, Y.; AKAZAWA, C. Teneurin-4 promotes cellular protrusion formation and neurite outgrowth through focal adhesion kinase signaling. **FASEB J**, v. 28, p. 1386-97, 2014.
- TAN, L. A.; CHAND, D.; DE ALMEIDA, R.; XU, M.; DE LANNOY, L.; LOVEJOY, D. A. Modulation of neuroplastic changes and corticotropin-releasing factor-associated behavior by a phylogenetically ancient and conserved peptide family. **Gen Comp Endocrinol**, v. 176, p. 309-13, 2012.
- TRAN, H.; SAWATARI, A.; LEAMEY, C. A. The glycoprotein ten-m3 mediates topography and patterning of thalamostriatal projections from the parafascicular nucleus in mice. **Eur J Neurosci**, v. p. 2014.

- TUCKER, R. P.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurins: A conserved family of transmembrane proteins involved in intercellular signaling during development. **Dev Biol**, v. 290, p. 237-45, 2006.
- TUCKER, R. P.;KENZELMANN, D.;TRZEBIATOWSKA, A.;CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurins: Transmembrane proteins with fundamental roles in development. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, p. 292-7, 2007.
- VASCONCELOS, L. A.;DONALDSON, C.;SITA, L. V.;CASATTI, C. A.;LOTFI, C. F.;WANG, L.;CADINOUCHE, M. Z.;FRIGO, L.;ELIAS, C. F.;LOVEJOY, D. A.;BITTENCOURT, J. C. Urocortin in the central nervous system of a primate (cebus apella): Sequencing, immunohistochemical, and hybridization histochemical characterization. **J Comp Neurol**, v. 463, p. 157-75, 2003.
- VIK, A.; YATHAM, L. N. Calcitonin and bipolar disorder: A hypothesis revisited. **J Psychiatry Neurosci**, v. 23, p. 109-17, 1998.
- WAITE, P. M. E.; ASHWELL, K. W. S. Trigeminal sensory system. In: PAXINOS, G.; MAI, J. (Ed.). **The human nervous system**, 2004. Trigeminal sensory system, p.1093-1124
- WARD, J. M.; REHG, J. E. Rodent immunohistochemistry: Pitfalls and troubleshooting. **Vet Pathol**, v. 51, p. 88-101, 2014.
- WHEELER, B. C.;TIDDI, B.;KALBITZER, U.;VISALBERGHI, E.;HEISTERMANN, M. Methodological considerations in the analysis of fecal glucocorticoid metabolites in tufted capuchins (cebus apella). **Int J Primatol**, v. 34, p. 879-898, 2013.
- WOELFLE, R.;D'AQUILA, A. L.;PAVLOVIC, T.;HUSIC, M.;LOVEJOY, D. A. Ancient interaction between the teneurin c-terminal associated peptides (tcap) and latrophilin ligand-receptor coupling: A role in behavior. **Front Neurosci**, v. 9, p. 146, 2015.
- WOELFLE, R.; D'AQUILA, A. L.; LOVEJOY, D. A. Teneurins, tcap, and latrophilins: Roles in the etiology of mood disorders. **Translational Neuroscience**, v. 7, p. 17-23, 2016.
- YOUNG, T. R.;BOURKE, M.;ZHOU, X.;OOHASHI, T.;SAWATARI, A.;FASSLER, R.;LEAMEY, C. A. Ten-m2 is required for the generation of binocular visual circuits. **J Neurosci**, v. 33, p. 12490-509, 2013.
- YOUNG, T. R.; LEAMEY, C. A. Teneurins: Important regulators of neural circuitry. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, p. 990-3, 2009.
- ZHOU, X. H.;BRANDAU, O.;FENG, K.;OOHASHI, T.;NINOMIYA, Y.;RAUCH, U.;FASSLER, R. The murine ten-m/odz genes show distinct but overlapping expression patterns during development and in adult brain. **Gene Expr Patterns**, v. 3, p. 397-405, 2003.
- ZIEGLER, A.;CORVALAN, A.;ROA, I.;BRANES, J. A.;WOLLSCHIED, B. Teneurin protein family: An emerging role in human tumorigenesis and drug resistance. **Cancer Lett**, v. 326, p. 1-7, 2012.

Anexos

ANEXO 1



Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto *"Expressão das teneurinas (TENS) e dos peptídeos associados ao terminal carboxila das teneurinas (TCAPs) nos tecidos e órgãos de primatas não-humanos (Cebus apella)"* sob responsabilidade do Pesquisador **CLÁUDIO APARECIDO CASATTI** e colaboração de Kelly Regina Torres está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **02257-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research *"Expression of teneurins and teneurins C-terminal associated peptides (TCAPs) in tissue and organs of non-human primate (Cebus apella)"*, process number **02257-2012**, under responsibility of **CLÁUDIO APARECIDO CASATTI** and with collaboration of Kelly Regina Torres agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edison Ervolino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

ANEXO 2



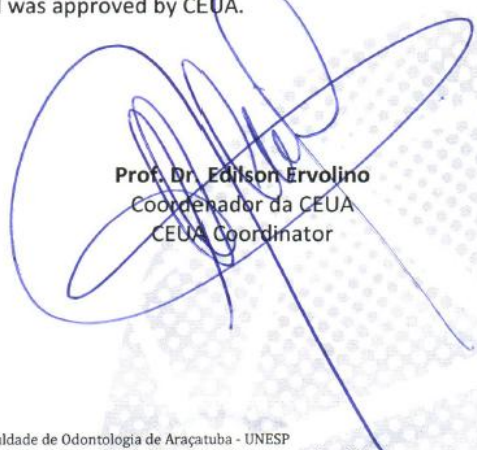
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto *“Identificação das teneurinas em tecidos e órgãos de roedores”* sob responsabilidade do Pesquisador **CLÁUDIO APARECIDO CASATTI** e colaboração de Kelly Regina Torres está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **02401-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research *“Identification of teneurins in tissue and organs of rodents”*, process number **02401-2012**, under responsibility of **CLÁUDIO APARECIDO CASATTI** and with collaboration of Kelly Regina Torres agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP
Rua José Bonifácio, 1193 - CEP-16015-050 - Araçatuba - SP
Tel. (18) 3636-3234