

Stefani Alves Magalhães

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE C-FOS NO
CORTÉX CEREBRAL DE RATOS E SAGUIS APÓS
ESTIMULAÇÃO COM PENTILENOTETRAZOL**

Dissertação apresentada a Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

**São Paulo
2018**

Stefani Alves Magalhães

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE C-FOS NO
CORTÉX CEREBRAL DE RATOS E SAGUIS APÓS
ESTIMULAÇÃO COM PENTILENOTETRAZOL**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Eugênio Araújo de Moraes Mello

São Paulo

2018

Magalhães, Stefani Alves

Avaliação comparativa da expressão de c-Fos no cortex cerebral de ratos e saguis após estimulação com pentilenotetrazol / Stefani Alves Magalhães. – São Paulo, 2018.

xiv, 67f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Comparative assessment of the c-Fos expression in the cerebral cortex after pentylenetetrazol seizures in rats and marmosets.

1. c-Fos. 2. Primatas. 3. Ativação Neuronal. 4. Estereologia

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA**

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. José Carlos Fernandes Galduróz

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Psicobiologia:

Profa. Dra. Débora Cristina Hipólide

Stefani Alves Magalhães

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE C-FOS NO
CORTÉX CEREBRAL DE RATOS E SAGUIS APÓS
ESTIMULAÇÃO COM PENTILENOTETRAZOL**

Presidente da banca:

Prof. Dr. Luiz Eugênio Araújo de Moraes Mello

Banca examinadora:

Profa. Dra. Andréa da Silva Torrão

Prof. Dr. Cláudio Marcos Teixeira de Queiroz

Prof. Dr. Gabriel Maisonnave Arisi

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe e meu marido, que estiveram sempre presentes em todos os momentos - fáceis e difíceis - incondicionalmente, no qual seu apoio, amor e dedicação me impulsionaram a chegar até aqui.

Agradecimentos

Agradeço imensamente ao professor Luiz Eugênio pela confiança depositada ao me dar a oportunidade e privilégio de ser sua orientanda, por todo apoio e paciência dedicados às adversidades que surgiram no decorrer desta dissertação e por toda atenção e cuidado ao me orientar na construção deste trabalho. Seus ensinamentos me permitiram evoluir, como pessoa e pesquisadora.

À professora Marli Gerenutti, por acreditar antes de mim mesma no meu potencial, pelo apoio além dos limites acadêmicos e por ter despertado em mim a paixão pela pesquisa científica.

À Vanessa Barros que me recebeu de braços abertos nessa jornada que é o mestrado, me inserindo e orientando de todas as maneiras possíveis e, acima de tudo, confiando a mim o resultado de seu trabalho árduo, muito obrigada.

Ao professor Gabriel Arisi, por toda paciência e disponibilidade ao passar seus ensinamentos em estereologia e prestar consultoria técnica durante todo o decorrer do trabalho, seus treinamentos me proporcionaram agilidade e independência pra realização deste projeto.

Aos colegas de laboratório Clivandir, Maira e Débora pelo apoio, pelos ensinamentos das técnicas, pelas conversas, idéias e pela amizade.

À Liana, Laura, Eri e Aline, que sempre acreditaram no meu potencial e me apoiaram nesse caminho, mesmo algumas estando longe na distância, todas estiveram sempre perto, me apoiando sempre que precisei.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 2015/00520-0), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP) e a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pelo apoio financeiro.

*"Sei bem, meu caro Watson, que você compartilha meu
amor por tudo que é bizarro e alheio as convenções
e a enfadonha rotina da vida cotidiana"*

Arthur Conan Doyle

*"Em algum lugar, alguma coisa incrível está
esperando para ser descoberta"*

Carl Sagan

Sumário

Lista de figuras	x
Lista de siglas	xii
Resumo	xiii
Abstract.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 PTZ, inibição tônica e o modelo de crise convulsiva	4
2.2 c-Fos como marcadora de ativação neuronal	5
2.3 Estudos comparativos entre roedores e primatas	9
3. MÉTODOS.....	12
3.1 Animais.....	12
3.2 Grupos.....	12
3.3 Hiperestimulação encefálica	13
3.4 Estruturas encefálicas analisadas	14
3.5 Análise Imunohistoquímica	15
3.6 Análise Estereológica.....	16
3.7 Análise Estatística	17
4. RESULTADOS	18
4.1 O padrão de expressão de c-Fos em ratos	18
4.2 O padrão de expressão de c-Fos em saguis	30
5. DISCUSSÃO	42
5.1 Imunoreatividade para c-Fos como marcadora de inibição tônica.....	42
5.2 Pico da expressão de c-Fos	44
5.3 Duração da expressão de c-Fos.....	45
5.4 Padrão de expressão de c-Fos: comparação entre ratos e saguis	46

5.5 Padrão de expressão de c-Fos: comparação entre áreas encefálicas	.47
5.6 Limitações do presente estudo.....	51
6. CONCLUSÃO.....	53
7. REFERÊNCIAS.....	54
Anexos	

Lista de figuras

Figura 1. Mecanismo e regiões reguladoras da expressão da proteína c-Fos	7
Figura 2. Tamanho do encéfalo não é um indicador confiável do número de neurônios entre espécies	11
Figura 3. Fotomicrografia da amígdala de saguis	16
Figura 4. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex motor de ratos	19
Figura 5. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex cingulado de ratos	20
Figura 6. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex entorrinal de ratos	21
Figura 7. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex perirrinal de ratos	22
Figura 8. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex somatossensorial de ratos	23
Figura 9. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex auditivo de ratos	24
Figura 10. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex visual de ratos	25
Figura 11. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex piriforme de ratos	26
Figura 12. O Padrão de Expressão de c-Fos em Ratos	28
Figura 13. Representação do padrão de expressão da proteína c-Fos nos córtices somatossensorial, visual, auditivo, motor, piriforme, cingulado, entorrinal e perirrinal do encéfalo de ratos	29
Figura 14. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex motor de saguis	31
Figura 15. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex cingulado de saguis	32

Figura 16. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex entorrinal de saguis	33
Figura 17. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex perirrinal de saguis	34
Figura 18. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex somatossensorial de saguis	35
Figura 19. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex auditivo de saguis	36
Figura 20. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex visual de saguis	37
Figura 21. Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex piriforme de saguis	38
Figura 22. O Padrão de Expressão de c-Fos em Saguis.....	40
Figura 23. Representação do padrão de expressão da proteína c-Fos nos córtices somatossensorial, visual, auditivo, motor, piriforme, cingulado entorrinal e perirrinal do encéfalo de saguis	41
Figura 24. Padrão de expressão do RNAm de <i>OCC1</i> em mamíferos	50

Lista de siglas

cAMP	AMP cíclico
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELK1	Fator do complexo ternário
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FT	Fator de transcrição
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA-A	Receptor especializado de GABA subclasse A
IEGs	Genes de expressão imediata
ITF	Fator transcricional induzido
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
nbM	Núcleo basal de Meynert
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NMDARs	Receptores N-Metil-D-Aspartato
OCC1	Gene occipital1
PBS	Tampão fosfato-salino
PTZ	Pentilenotetrazol
RBP	Gene da proteína de ligação ao retinol
RNA_m	RNA mensageiro
RSK	Quinase ribossomal S6
SNC	Sistema nervoso central
SPARC	<i>Secreted protein acidic and rich in cystein gene</i>
SPP1	Fosfoproteína secretada 1
SRF	Fator de resposta ao soro
VSCCs	Canais de cálcio voltagem dependentes

Resumo

Introdução: Evidências anteriores de nosso laboratório sugerem, após análise comparativa entre roedores e primatas, uma possível base para que os primatas apresentem maior capacidade de integração entre diferentes estruturas do sistema nervoso central, o que poderia contribuir para explicar as diferentes capacidades apresentadas por esses animais em relação às demais ordens. **Objetivos:** Em busca de evidências mais sólidas que pudessem corroborar aqueles achados, o presente trabalho realizou análise comparativa do padrão de expressão da proteína c-Fos em estruturas encefálicas neocorticais de ratos e saguis, empregando uma técnica quantitativa mais robusta e avaliando um número maior de estruturas. **Métodos:** Foram utilizados 27 ratos (Wistar) e 21 saguis (*Callithrix jacchus*) eutanasiados em diferentes tempos após crise convulsiva induzida pelo antagonista GABAérgico pentilenotetrazol (PTZ), e distribuídos então entre os grupos controle (animais sem crise); grupo PTZ 0,5h; 1, 2, 3, 6, 9 e 12h pós-PTZ. O material biológico foi processado através de técnica de imunohistoquímica para c-Fos e a contagem histológica das células expressando a proteína foi realizada pela técnica de estereologia, através do programa Stereoinvestigator®. **Resultados:** Os sagüis apresentaram expressão mais intensa e duradoura da proteína c-Fos, chegando a ser 5x mais intensa e perdurando até 3h a mais do que a expressão nos ratos. Ainda, a expressão nos ratos apresentou padrões semelhantes de expressão de acordo com a função das estruturas (funções associativas, corticais e motoras), que não foi observada para sagüis. **Conclusão:** Os resultados presentes neste estudo podem indicar que o encéfalo dos saguis, se comparado ao dos ratos, além de apresentar mecanismos mais complexos de ativação neuronal, apresenta também estruturas com maior nível de especialização, evidenciadas pelas diferenças funcionais que foram medidas pela expressão de c-Fos. Ainda que esperadas, estas diferenças funcionais não haviam até o momento sido caracterizadas, e podem contribuir para o entendimento das diferentes capacidades de processamento neuronal destas ordens de mamíferos.

Palavras-chave: c-Fos, primatas, ativação neuronal, estereologia

Abstract

Introduction: Previous evidence from our laboratory indicate a potential mechanism that might support the fact that primates exhibit greater cognitive integration capacity as a result of the activation of different structures of the central nervous system, as compared to rodents. The current study might contribute to explain the different neural processing capacities presented by these animals as compared to other mammal orders. **Aims:** To search for stronger evidence that could confirm our previous findings here we analyzed the patterns of c-Fos expression in neocortical structures of rats and marmosets using a more robust quantitative technique and evaluating a larger number of brain areas. Twenty-seven rats (*Wistar*) and 21 marmosets (*Callithrix jacchus*) were euthanized at different times after seizures induced by the GABAergic antagonist pentylentetrazol (PTZ), and then distributed among the control groups (animals without seizures); PTZ group 0.5h; 1, 2, 3, 6, 9 and 12h after PTZ induction. The biological material was processed for the immunohistochemical detection of c-Fos and the cell count was performed by means of the stereology technique with a StereInvestigator® program. **Results:** Marmosets had a c-Fos expression that was notably stronger (5x) and longer (up to 3 hours) than rats. Yet, the expression in rats presented similar patterns of expression according to the function of the structures (associative, cortical and motor functions), which was not observed for marmosets. **Conclusions:** Our results provide evidence that the marmoset brain has a greater neuronal activation after intense stimulation by means of PTZ and a more complex pattern of brain activation, which are indicative of a brain structure with a higher degree of specialization than that seen for rats. Although expected, these functional differences had never been characterized before, and may contribute for the understanding of the different neuronal processing capacities of these mammals orders.

Keywords: c-Fos, primates, neuronal activation, stereology

1 INTRODUÇÃO

O encéfalo é o órgão diretamente responsável pela organização do comportamento. Diferentes áreas no sistema nervoso desempenham diferentes funções e o desempenho nestas funções varia enormemente nas diferentes espécies animais, mesmo quando não dependentes de aspectos motores ou sensoriais específicos de cada espécie animal. Nesta linha diz-se, por exemplo, que os elefantes nunca esquecem. Mesmo que essa frase em si possa ser desprovida de base científica, haveriam mecanismos que ocorrem a nível bioquímico no encéfalo, que permitiriam o desenvolvimento das diferentes habilidades apresentadas entre espécies?

Na busca da resposta a questionamentos deste gênero – de quais processos neurais podem estar envolvidos nestes aspectos de evolução e diversidade - a comunidade científica utiliza estudos de análise comparativa entre espécies com o intuito de evidenciar diferenças anatômicas, histológicas, de atividade encefálica ou no padrão de comportamento que possam contribuir para este entendimento.

Considerando que os roedores representam a mais numerosa ordem de mamíferos, e a ordem dos primatas é onde se insere a espécie humana, o estudo comparativo do padrão de expressão de genes e proteínas após exposição destas ordens a um mesmo estímulo, é uma abordagem altamente promissora para a compreensão dos mecanismos que podem estar envolvidos em um aspecto crítico para a evolução: o desenvolvimento e especialização cortical, já que a expressão de determinados genes ou proteínas pode promover mudanças plásticas e adaptativas específicas das células nervosas. A hipótese que impulsiona estes estudos é a de que, para os primatas apresentarem uma evolução cortical tão diferenciada em relação aos roedores, deve haver mudanças de expressão gênica nos ancestrais comuns que fizeram, portanto, os roedores e os primatas evoluírem para suas respectivas linhagens (Matsunaga et al., 2015).

Entretanto, apesar de bastante promissora, evidências de comparação da expressão gênica ou protéica entre roedores e primatas não tem sido um objeto central de análise na literatura neurocientífica. Todavia, um estudo recente de nosso laboratório (Barros et al., 2015) realizou análise comparativa da expressão protéica de um gene de expressão imediata (c-fos) entre essas ordens, que demonstrou para os primatas expressão mais intensa e duradoura do que para os roedores, o que

poderia indicar, de acordo com os autores, uma maior capacidade de integração entre diferentes estruturas do sistema nervoso central dos primatas, e em termos de comportamento esses achados poderiam contribuir para explicar as diferentes capacidades dos primatas em relação às demais ordens. Em virtude disso, o presente trabalho busca evidências que também possam contribuir de maneira significativa, através da análise comparativa da expressão da proteína c-Fos entre ratos e sagüis, em praticamente todo o neocórtex destas duas espécies.

O gene c-fos, assim como sua proteína específica c-Fos, são amplamente descritos na literatura científica como marcadores de atividade neuronal universal (Kaczmarek, 2002), podendo sua expressão ser induzida por diversos estímulos (nocicepção, exposição à luz após privação, estresse, injeção intraperitoneal de agentes químicos como pentilenotetrazol e metrazol, entre outros) em inúmeras estruturas encefálicas, sendo as mais relatadas as subregiões hipocâmpais (giro denteado, CA1 e CA3), amígdala, corpo estriado, córtex piriforme e córtex visual (Dragunow e Robertson, 1987, 1988; Hunt et al., 1987; Morgan et al., 1987; Harris, 1996; Prado e Del Bel, 1998; Chaudhuri et al., 2000). Ainda há um grande interesse no estudo da expressão de c-Fos em estruturas encefálicas após tarefas cognitivas, de memória e condicionamento, como condicionamento aversivo (Kaczmarek e Nikolajew, 1990; Savonenko, 1999), esquiva inibitória (Zhang et al., 2000), condicionamento apetitivo (Heurteaux et al., 1993; Carretta et al., 1999), tarefas de memória e reconhecimento espacial (Vann et al., 2000), e de reconhecimento visual (Zhu et al., 1995).

A expressão de c-Fos pode ser, portanto, induzida pelo agente químico pentilenotetrazol (PTZ), e este sendo um antagonista GABAérgico (antagonista dos receptores de GABA – ácido gama-aminobutírico) minimiza a atividade das aferências inibitórias no sistema nervoso causando ativação exacerbada, inespecífica e generalizada de células nervosas. Essa condição é caracterizada clinicamente por uma crise convulsiva. Pode-se afirmar, portanto, que durante uma crise convulsiva há intensa expressão do gene c-fos, assim como de sua proteína específica, como resultado do influxo exacerbado de sódio e cálcio no neurônio, que promove ativação das quinases, mediadoras da expressão (Kovács, 1998; Cruz et al., 2013).

Considerando que tanto primatas como roedores expressam c-Fos após crise convulsiva (Dragunow e Robertson, 1987; Morgan et al., 1987; Salle, 1988; Simler et

al., 1994; Mello et al., 1996; Malhi et al., 2014), este estudo se propôs a comparar de maneira quantitativa (por meio de técnica de estereologia, usando o programa Stereoinvestigator®) o padrão de expressão da proteína c-Fos após estimulação com pentilenotetrazol (PTZ) em ratos e saguis, em regiões neocorticais de funções associativas, sensoriais e motoras, na busca de dados que possam contribuir para explicar as diferentes habilidades apresentadas dentre essas ordens de mamíferos.

1.1 Objetivos

- Mapear o padrão de expressão da proteína c-Fos em ratos e saguis após hiperestimulação encefálica induzida por meio do agente químico pentilenotetrazol;
- Comparar as diferenças e semelhanças no padrão de expressão da proteína c-Fos entre estas espécies.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PTZ, inibição tônica e o modelo de crise convulsiva

A homeostase do sistema nervoso depende de um equilíbrio entre circuitos excitatórios e inibitórios. Tanto a estimulação de sistemas excitatórios ativa o sistema nervoso e gera a expressão de c-Fos, como também o bloqueio de sistemas inibitórios (portanto desinibição) gera a expressão de c-Fos. Em suma, a excitação direta ou remoção/supressão da inibição são equivalentes em termos de ativação do sistema nervoso (Cronin et al., 2004; Jonas e Buzsáki, 2007; Lee e Maguire, 2014).

As transmissões sinápticas inibitórias estão envolvidas, portanto, na regulação da excitabilidade neuronal, sendo que, no sistema nervoso central de mamíferos, estas sinapses inibitórias são mediadas por dois neurotransmissores: a glicina e o ácido gama-aminobutírico (GABA). A glicina é o neurotransmissor inibitório predominante na medula espinhal, enquanto que no encéfalo, principalmente no hipocampo e neocórtex, o GABA é mais abundante (Cronin et al., 2004; Jonas e Buzsáki, 2007). As sinapses inibitórias GABAérgicas (mediadas pelo neurotransmissor GABA) estão mais frequentemente associadas aos receptores ionotrópicos GABA-A que, quando ativados, promovem a abertura de canais de cloreto e influxo deste íon no interior dos neurônios, que desencadeia uma hiperpolarização neuronal, estado em que é pouco provável que o neurônio gere um potencial de ação, sendo portanto inibitório (Pirker et al., 2000; Huang et al., 2001).

Portanto, os sistemas que estão ativamente inibidos pela sinalização GABAérgica associada a receptores ionotrópicos GABA-A, onde esta inibição é o estado basal, estão sob inibição tônica (Jonas e Buzsáki, 2007; Lee e Maguire, 2014). O pentilenotetrazol - estímulo utilizado neste estudo – é um antagonista GABAérgico, que age nos canais de cloreto diminuindo o influxo deste íon no neurônio (Cl⁻), o que impede ou minimiza a influência das sinalizações inibitórias, resultando portanto na desinibição do sistema e causando um aumento massivo na excitabilidade central, tendo como consequência uma expressão potente e generalizada de c-Fos (Huang et al., 2001; Cronin et al., 2004).

Esse aumento massivo na excitabilidade central, consequência da ativação neuronal exacerbada provocada pelo PTZ, é manifestado clinicamente pela crise

convulsiva (Huang et al., 2001). Após administração intraperitoneal ou subcutânea de PTZ, primatas e roedores apresentam crises convulsivas tônico-clônicas com duração média de 1 a 3 min (Barros et al., 2014). A latência entre a administração intraperitoneal de PTZ e o início das crises foi registrada para diferentes espécies, sendo em camundongos, na dose de 50 mg/kg, 14 a 24 minutos (Brito et al., 2006), em ratos, dose 50 mg/kg, 2 a 3 minutos e em sagüis, também na dose 50mg/kg, 10 a 18 minutos (Barros et al., 2014). Com o intuito de categorização de intensidade da crise convulsiva, Racine propôs, em 1972, uma escala com os sintomas que caracterizam os estágios da crise, sendo estes: estágio I - automatismos faciais; estágio II - movimentos faciais e clonia de cabeça; estágio III - clonia dos membros anteriores; estágio IV - elevação do tronco sobre as patas traseiras (rearing) e elevação da cauda (straub); estágio V - clonia generalizada com perda postural.

Na literatura, são inúmeros os estudos que empregam o PTZ como método para indução de crise convulsiva (Dragunow e Robertson, 1988; Holmes et al., 1999; Huang et al., 2002; Zhao e Holmes, 2006; Syndler et al., 2009; Malhi et al., 2014; Barros et al., 2015), talvez pelas várias características que permitem sua alta reprodutibilidade: os efeitos convulsivantes já foram caracterizados para várias espécies, como camundongos, ratos, gatos e primatas; pode ser administrado por via subcutânea, intravenosa e intraperitoneal; as crises são usualmente induzidas por uma única aplicação, sendo as crises confiáveis, de fácil constatação visual e com baixo índice de mortalidade (Zhao e Holmes, 2006). Estas características do PTZ, somadas as suas propriedades farmacológicas no sistema nervoso central, fazem com que este seja um método largamente empregado na pesquisa científica. De fato, o trabalho fundamental descrevendo o emprego do gene c-fos e sua proteína específica c-Fos como marcadores de atividade neuronal, empregou um análogo do PTZ, o metrazol, como meio de indução de excitação do sistema nervoso (Morgan et al., 1987).

2.2 c-Fos como marcadora de ativação neuronal

Genes que apresentam ativação imediata e transiente após estimulação celular e cuja expressão não pode ser impedida por inibidores da síntese de proteínas, constituem a classe dos IEGs, os genes de expressão imediata (Sheng e

Greenberg, 1990). A descoberta dos IEGs e suas respectivas proteínas, em 1985, trouxe ao estudo funcional do sistema nervoso central uma nova perspectiva, pois a análise da ativação destes genes permitem o mapeamento da atividade neuronal após um estímulo específico e, através da imunohistoquímica convencional, analisar os efeitos pela marcação da proteína expressa, considerando os aspectos qualitativos e quantitativos (Lima, 2008).

Acredita-se que estes IEGs codificam fatores de transcrição (FT), responsáveis por regular a expressão de diversos outros genes, conhecidos como genes-alvo. A expressão destes genes-alvo pode promover mudanças plásticas e adaptativas específicas, alterando o fenótipo da célula em questão (Sheng e Greenberg, 1990). Assim sendo, os FT estão relacionados a desempenhar papel importante em diversas funções do sistema nervoso, dentre elas, apoptose (Smeyne et al., 1993); memória (Bourtchuladze et al., 1994); regeneração axonal (Schaden et al., 1994) e sincronização dos ritmos biológicos (Wollnick et al., 1995).

Envolvidos nestas funções estão vários IEGs, sendo que um dos mais estudados é o *c-fos*. O gene *c-fos* codifica a proteína nuclear *c-Fos*, que é um fator transcripcional induzido (ITF) (Curran e Morgan, 1987). Essa proteína tende a formar heterodímeros ou homodímeros e se liga a uma região promotora do DNA conhecida como sítio AP-1 (Angel et al, 1988; Ryzeck e Bravo, 1991). A ligação com elementos do DNA e a interação do mesmo com o RNAm nos permite dizer que *c-Fos* ativa a expressão de genes tardios. Além disso, a *c-Fos* sendo um fator transcripcional, atua em conjunto com outros fatores transcripcionais constitutivos como CREB ($Ca^{+}/AMPc$) e fator de resposta ao soro (SRF), que são ativados por fosforilação (Herrera e Robertson, 1996; Zimmermann e Herdegen, 1994). Estas características permitem explicar por que *c-fos* é tão importante, pois pode estar envolvida na regulação da expressão de um grande número de outros genes (Kaczmarek, 2002).

Estudos descrevem que a expressão de *c-Fos* é mediada por quinases, sendo as *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) e *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dependentes da fosforilação do fator do complexo ternário (ELK1) a fator de resposta ao soro (SRF), ou ainda da fosforilação via quinase ribossomal S6 (RSK), do AMP cíclico (cAMP) ao *responsive element-binding protein* (CREB), resultando em promotores de *c-Fos* (Cruz et al., 2013; **figura 1**). A ativação neuronal destas quinases (ERK/MAPK) requer o influxo de altos níveis de cálcio para o meio

intracelular, de maneira consistente (não esporádica), através dos receptores glutamatérgicos NMDA (NMDARs, receptores N-Metil-D-Aspartato) ou pelos canais de cálcio voltagem dependentes (VSCCs) (Hardingham et al., 2001; Deisseroth et al., 2003; Thomas e Huganir, 2004; Cohen e Greenberg, 2008). Tanto os *inputs* glutamatérgicos excitatórios, quanto os *inputs* GABAérgicos inibitórios são capazes de induzir forte ativação neuronal (Cohen e Greenberg, 2008).

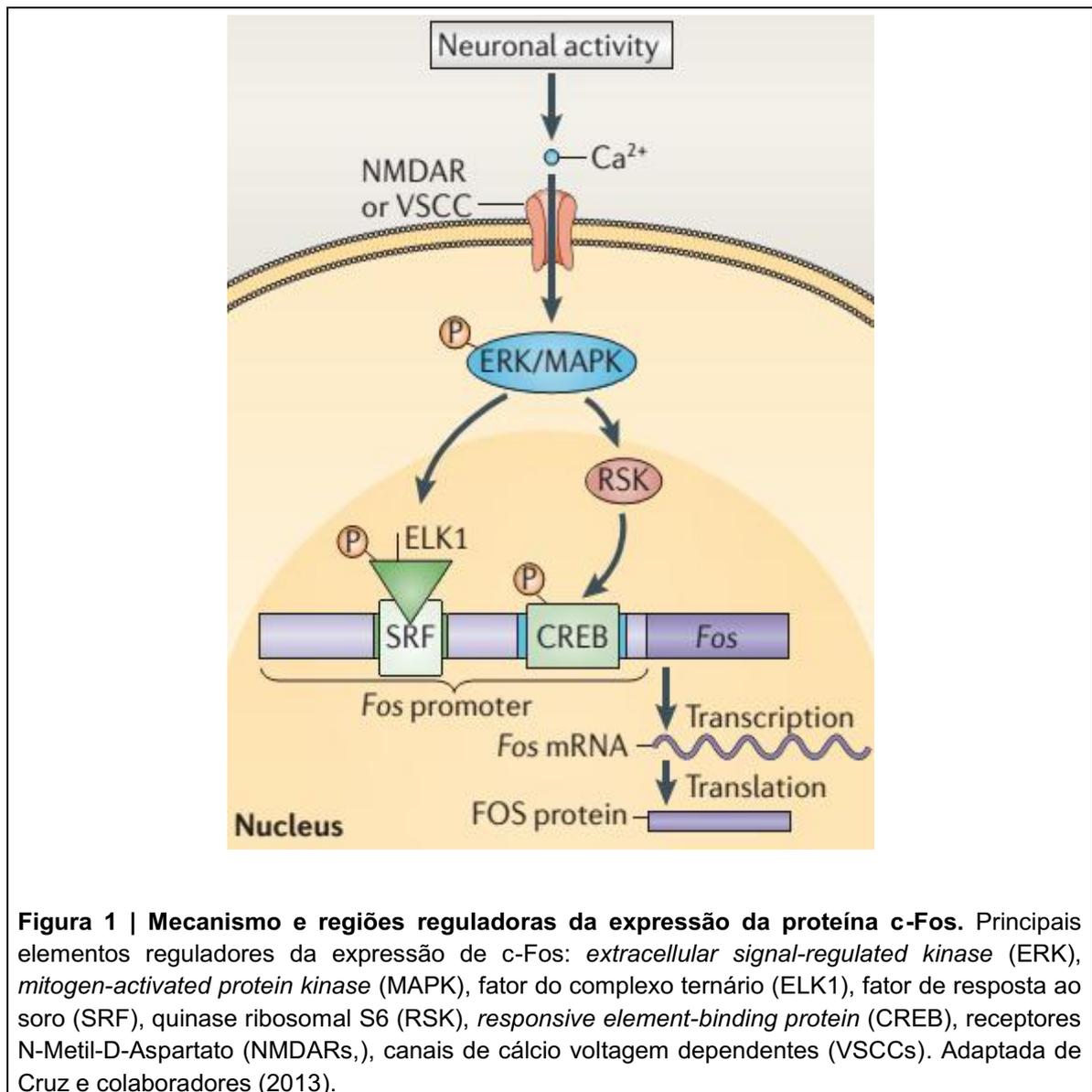


Figura 1 | Mecanismo e regiões reguladoras da expressão da proteína c-Fos. Principais elementos reguladores da expressão de c-Fos: *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), fator do complexo ternário (ELK1), fator de resposta ao soro (SRF), quinase ribossomal S6 (RSK), *responsive element-binding protein* (CREB), receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDARs,), canais de cálcio voltagem dependentes (VSCCs). Adaptada de Cruz e colaboradores (2013).

Existem hipóteses de que a expressão de c-Fos é decorrente de uma soma ou integração da atividade neuronal dependente do influxo de cálcio para o meio intracelular, de segundos a minutos, e que somente atividade forte e consistente,

nesse meio tempo, seria capaz de aumentar os níveis de cálcio a um patamar suficiente para indução da expressão de c-Fos (Cruz et al., 2013).

Os níveis da proteína c-Fos e RNAm de c-fos são muito baixos em condições basais. De maneira bastante simplificada ao mecanismo já descrito, a expressão neuronal aumentada resulta da estimulação de receptores de membrana, com posterior aumento de segundos mensageiros e ativação das quinases. O padrão temporal desta ativação é bastante uniforme. Um aumento no RNAm é observado dentro de poucos minutos após a chegada do sinal a membrana celular, então a proteína é acumulada, e isto ocorre aproximadamente entre 30 e 90 min. Ambos aumentos - de RNAm e proteína - são transitórios (Kaczmarek, 2002).

Devido às condições em que a proteína c-Fos é expressa, esta é amplamente utilizada na pesquisa científica como marcadora de atividade neuronal universal (Kaczmarek, 2002), portanto são inúmeros os estudos que descrevem a expressão desta proteína em diversas regiões do sistema nervoso central de roedores, quando da exposição do animal a diversos tipos de estímulos, como exemplos: expressão no giro denteado, córtex piriforme e cingulado, assim como no hipocampo e sistema límbico, 90 minutos após o estímulo com metrazol, um análogo do PTZ (Morgan et al., 1987); expressão nas subregiões hipocâmpais (giro denteado, CA1 e CA3), amígdala, corpo estriado e córtex piriforme, pela indução de crise convulsiva com PTZ (Dragunow e Robertson, 1987, 1988); na formação hipocâmpal e glândula pineal, pelo estresse (Del Bel et al, 1993; Tietze et al, 1994), no córtex visual, pela exposição a luz após privação (Chaudhuri et. al., 2000); no hipotálamo, córtex piriforme e núcleos da rafe, pelo estímulo nociceptivo (Hunt et al., 1987; Harris, 1996; Prado e Del Bel, 1998). Entretanto, em comparação aos estudos que utilizaram roedores, são poucos os estudos descritos na literatura que utilizam a indução da expressão de c-Fos em primatas. Dentre estes estão os de Asin e colaboradores (1996) e Svenningsson e colaboradores (2000) que demonstraram expressão de c-Fos aumentada na porção medial do núcleo caudado, tálamo, região supramamilar, núcleo acumbens e borda ventricular do estriado, após administração de anfetamina em duas espécies de primatas, os saguis e macaco cynomolgos; e o estudo de Kazi e colaboradores (2003), que observa aumento da expressão de c-Fos nos núcleos habenuares laterais de primatas após enucleação.

Ademais destes trabalhos, há um grande interesse no estudo da expressão de c-Fos em estruturas encefálicas após tarefas cognitivas, de memória e

condicionamento, que constataram: expressão aumentada de c-Fos em subdivisões da amígdala de ratos (cortical, medial, lateral e basolateral), após tarefa de esquiva (Savonenko, 1999); expressão aumentada do RNAm de c-fos e da proteína c-Fos no córtex perirrinal e hipocampo de ratos e camundongos quando expostos a um novo ambiente ou situações novas, assim como experimentos de fuga e esquiva ativa (Zhu et al, 1997; Anokhin et al., 2002); aumento da expressão de c-Fos no núcleo basal de Meynert (nbM) e em hipocampo de ratos, após treinamento de esquiva no escuro (Cammarota et al., 2000; Zhang et al., 2000); aumento nos níveis de c-Fos em todas as subregiões hipocámpais (giro dentado, CA3, CA1, subículos dorsal, ventral e caudal) após tarefas de memória e reconhecimento espacial (Vann et al., 2000). Estes e outros estudos sugerem fortemente que a expressão de c-fos/Fos pode desempenhar um papel fundamental na aprendizagem (Kaczmareck, 2002) principalmente quando o animal é exposto a situações novas.

2.3 Estudos comparativos entre roedores e primatas

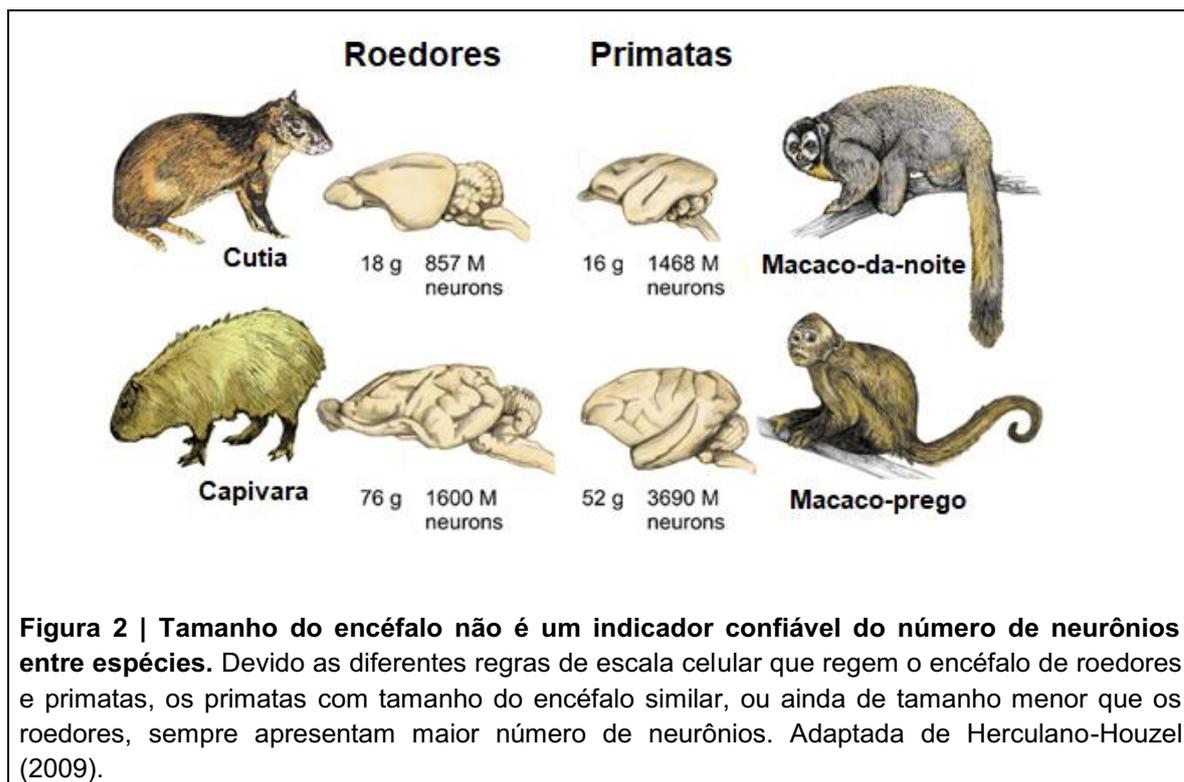
O estudo das diferenças no padrão de expressão de genes e proteínas é uma abordagem altamente promissora para a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e diferenciação entre espécies (Kozian e Kirschbaum, 1999). Uma das vertentes destes estudos consiste em utilizar estas comparações do padrão de expressão como ferramenta para diferenciar o sistema nervoso de uma espécie em relação à outra, a fim de buscar características que pudessem contribuir no entendimento de evolução e diversidade (Takahata et al., 2006; Watakabe et al., 2007; Yamamori, 2011; Matsunaga et al., 2013, 2015).

O que impulsiona estes estudos é o questionamento de que, para os primatas apresentarem uma evolução cortical tão diferenciada em relação aos roedores, deve haver mudanças genéticas nos ancestrais comuns que fizeram, portanto, os roedores e os primatas evoluírem para suas respectivas linhagens (Matsunaga et al., 2015). Estas mudanças na expressão gênica, que levaram roedores e primatas a evoluírem para sua própria espécie, podem ser decorrentes de mecanismos genéticos inatos, mecanismos de regulação da expressão gênica e/ou mecanismos epigenéticos, todos envolvidos em um aspecto crítico da evolução: o

desenvolvimento e especialização cortical (Takahata et al., 2006; Watakabe et al., 2007; Garfield e Wray, 2010; Yamamori, 2011; Matsunaga et al., 2013, 2015).

São descritas na literatura evidências de que os mecanismos genéticos inatos controlam aspectos importantes do desenvolvimento cortical, como a neurogênese, orientação axônica, formação de sinapses e maturação neuronal, pela regulação da expressão de fatores de transcrição, da secreção de moléculas ou de proteínas transmembrana (Rakic, 2009; Greig et al., 2013). A regulação da expressão gênica também é descrita como um importante mecanismo no processo evolutivo, já que diferenças mínimas no tempo de ativação ou no nível de atividade de apenas um único gene podem promover mudanças nas interações regulatórias, resultando em alterações nos processos de desenvolvimento e, portanto na forma e função dos organismos (Wray, 2007; Garfield e Wray, 2010; Prescott et al., 2015). Por fim, os mecanismos epigenéticos também agem de forma significativa no desenvolvimento encefálico: fatores ambientais, como ambientes enriquecidos, foram relacionados a indução de neurogênese no hipocampo de ratos adultos (Deng et al., 2010); assim como ratos jovens criados em ambientes enriquecidos apresentaram maior volume encefálico (Jenks et al., 2013); e para humanos e macacos o tamanho de áreas corticais específicas aumentaram, mesmo quando adultos, após aprendizagem de tarefas cognitivas complexas (Draganski et al., 2004; Boyke et al., 2008; Driemeyer et al., 2008; Quallo et al., 2009).

Ainda é importante ressaltar que descritos na literatura, existem diversos estudos de análise comparativa entre espécies que, com uma abordagem a nível anatômico e histológico, têm avançado na contribuição do entendimento das diferentes capacidades apresentadas por primatas e roedores. Um estudo que tem avançado de maneira significativa, é o de Herculano-Houzel e colaboradores (2006, 2007), que demonstra que o tamanho do encéfalo não é um indicador confiável do número de neurônios, já que nestes estudos, os autores observam que a relação entre o tamanho do encéfalo e o número de neurônios – portanto, densidade neuronal – em roedores é sempre menor do que a observada para as espécies de primatas que apresentam encéfalos de tamanho similar ou mesmo menores (**figura 2**).



Neste contexto, muitos achados importantes obtidos de estudos comparativos entre roedores e primatas demonstram que o córtex dos primatas, além de mais desenvolvido, também apresenta maior complexidade nos níveis histológicos, funcionais e de conectividade neural, o que faz este tipo de estudo ser altamente importante para o avanço do entendimento das diferentes características de cognição e comportamento apresentadas entres estas espécies (Herculano-Houzel et al., 2007; Collins et al., 2010; Fietz et al., 2010; Kaas, 2012; Visel et al., 2013).

3 MÉTODOS

Para realização deste trabalho, foi utilizado material biológico proveniente da pesquisa da pós-graduanda Vanessa Novaes de Barros (2014), do programa de pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de São Paulo, cedidos pela mesma de acordo com as implicações éticas e não sendo necessário o uso ou sacrifício de novos animais além daqueles que já haviam sido processados. O material biológico obtido estava acondicionado em solução anti-freezing em ultra congelador a -80°C . No presente trabalho foram realizadas as etapas de seleção das fatias a serem analisadas, o processamento imunohistoquímico pela técnica convencional avidina-biotina imunoperoxidase, a montagem das lâminas e posterior contagem das células através de análise estereológica pelo programa Stereoinvestigator®.

3.1 Animais

Foram utilizados 21 saguis (*Callithrix jacchus*) machos, que pesavam entre 250 e 400g, idade de 1 a 2 anos, provenientes do Departamento de Áreas Verdes (DEPAVE) e de outras entidades oficialmente registradas no IBAMA e 27 ratos (*Rattus norvegicus* da cepa Wistar) também machos, que pesavam entre 250 a 400g, idade de 8 a 9 semanas, provenientes do CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina). Os saguis foram alimentados em dois períodos diários; no primeiro período com frutas diversas (banana, maçã, e duas frutas da época) e no segundo período com ração e suplemento de ovo, atum ou queijo. Os ratos foram alimentados em dois períodos com ração (Nuvilab®). Todos os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), em ciclo claro-escuro de 12h, com início do ciclo às 7h, tendo livre acesso à água.

Os protocolos utilizados para obtenção do material biológico foram aprovados pelo Comitê de Uso Ético e Cuidado dos Animais da UNIFESP (CEP nº 0175/12 ver anexo A) e pelo Ministério do Meio Ambiente (ver anexo B), que são decorrentes da tese de Barros (2014). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Uso Ético e Cuidado dos Animais da UNIFESP (CEP nº 5474060115 ver anexo C).

3.2 Grupos

Os animais foram divididos em grupos de acordo com o tempo após a administração de PTZ. Foram realizados experimentos piloto baseando-se em dados da literatura que demonstram que os picos de expressão da proteína c-Fos no encéfalo de ratos e camundongos geralmente ocorrem 1h após a administração do PTZ (Bisler et al., 2002; Chaudhuri et al., 2000; Morgan et al., 1987). A partir destes estudos piloto, buscou-se construir grupos com tempos que demonstrassem o início da expressão da proteína, o pico de expressão e o decaimento aos níveis basais, sendo este o fator determinante para as espécies apresentarem grupos com tempos diferentes. Portanto, para a determinação do padrão de expressão de c-Fos em ambas as espécies, os grupos foram construídos conforme **tabela 1**:

Tabela 1 | Grupos Experimentais

Ratos	Saguís	Grupos	Descrição
X	X	Controle	Correspondem aos animais anestesiados e eutanasiados sem administração de qualquer veículo/droga, exceto anestésicos;
X	**	Salina	Correspondem aos animais que receberam solução salina e após uma hora foram eutanasiados;
X	X	PTZ 0,5h	Animais que receberam PTZ e 30 minutos após a crise convulsiva foram eutanasiados;
X	X	PTZ 1h	Animais que receberam PTZ e 1h após a crise convulsiva foram eutanasiados;
X		PTZ 2h	Animais que receberam PTZ e 2h após a crise convulsiva foram eutanasiados;
X	X	PTZ 3h	Animais que receberam PTZ e 3h após a crise convulsiva foram eutanasiados;
X	X	PTZ 6h	Animais que receberam PTZ e 6h após a crise convulsiva foram eutanasiados;
	X	PTZ 9h	Animais que receberam PTZ e 9h após a crise convulsiva foram eutanasiados;
	X	PTZ 12h	Animais que receberam PTZ e 12h após a crise convulsiva foram eutanasiados;

***Em respeito às normas do comitê de ética em pesquisa com animais e visando utilizar o menor número possível de amostras, o grupo salina em saguís não foi utilizado, pois em estudos piloto não apresentou diferenças estatisticamente significativas do grupo controle.*

3.3 Hiperestimulação Encefálica

Os animais foram submetidos às injeções intraperitoneais de PTZ (50mg/kg) ou de solução salina e eutanasiados de acordo com os intervalos de tempo do grupo ao qual pertenciam, sendo que a contabilização destes intervalos teve início no momento que foi registrada a hiperestimulação, através da crise convulsiva. Para tanto, foi considerado como crise convulsiva somente os animais que atingiram o estágio V da escala de Racine (1972), estágio este caracterizado pela clonia generalizada de membros com a perda postural, podendo esta crise ser acompanhada dos sintomas clínicos apresentados nos demais estágios da escala. Para extração do tecido encefálico, os animais foram anestesiados com cetamina (60mg/kg) e xilazina (15mg/kg) via intraperitoneal e posteriormente foram decapitados. Neste estudo foram utilizados somente os hemisférios esquerdos do cérebro dos animais, que após extração por craniotomia, foram colocados em tubos de 30ml contendo solução paraformaldeído 4% em PBS (tampão fosfato 0,01M, pH 7,2, a 4°C) durante 5 dias, e então foram posteriormente desidratados por 2 dias ou mais em solução sacarose 30% em PBS para posterior análise imunohistoquímica para c-Fos.

3.4 Análise Imunohistoquímica

Após fixação e desidratação, os hemisférios esquerdos foram seccionados no criostato, em cortes coronais de 30µm de espessura e acondicionados em solução anticongelante (*anti-freezing*) até o dia do processamento para imunohistoquímica segundo protocolo de Syndler e colaboradores (2009). Os cortes foram lavados 2x 15min em PBS e incubados em 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 15min e novamente lavados em PBS. Subsequentemente os cortes foram banhados com solução de 0,3% de Triton x-100 por 30min e incubados com anticorpo primário c-Fos (*rabbit polyclonal ab-5, Calbiochem*) na concentração de 1:5000 (para ratos) e 1:4000 (para saguis) em agitador, por 24h. Foram novamente lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário biotilado na diluição de 1:200 (anti-coelho feito em cabra, Vector), diluídos em 0,3% de Triton x-100 por 2h, em agitador, na temperatura ambiente. Posteriormente os cortes foram tratados com solução do kit

ABC (complexo avidina-biotina, Vector, 1:100) por 90 min e o produto da reação foi intensificado com diaminobenzidina. Os cortes foram montados em lâminas gelatinadas, desidratados em álcool 70%, 96%, 100% e xilol, e as lâminas foram fechadas com entelan.

3.5 Estruturas Encefálicas Analisadas

Os cortes foram montados em lâminas para avaliação histológica de um amplo conjunto de áreas encefálicas, sendo estas o tálamo (dividido em seus subnúcleos mediodorsal, laterodorsal, ventrolateral, geniculado medial e lateral), o corpo estriado (igualmente segmentado em suas sub-divisões - núcleo caudado e putâmen), globo pálido e substância negra, assim como a amígdala em seus subnúcleos (cortical, lateral, central, medial basolateral) e os córtices entorrinal, perirrinal, piriforme, visual, auditivo, somatossensorial, motor e córtex cingulado.

Estas estruturas foram escolhidas de acordo com suas funções, sendo o objetivo contemplar estruturas com funções motoras, sensoriais e associativas. Porém, em análise inicial qualitativa, pode-se verificar que as estruturas com localização mais medial nos cortes, apresentavam pouca ou nenhuma marcação de expressão de c-Fos, independente do grupo ao qual pertencesse, ou ainda, apresentavam discrepâncias de coloração, por vezes um animal tendo uma forte marcação da expressão e outro animal do mesmo grupo não apresentando marcação. Estas discrepâncias foram registradas para todos os núcleos da amígdala analisados (cortical, lateral, central, medial, basolateral), assim como os núcleos talâmicos (mediodorsal, laterodorsal, ventrolateral e núcleos geniculados medial e lateral) e ainda para o corpo estriado, globo pálido e substância negra. Estas observações da análise qualitativa (**figura 3**) demonstraram que estas estruturas se tornaram inviáveis para a análise estereológica, pois poderiam gerar resultados não confiáveis e portanto, estas estruturas não foram contabilizadas, tornando este um trabalho de análise de estruturas do córtex cerebral.

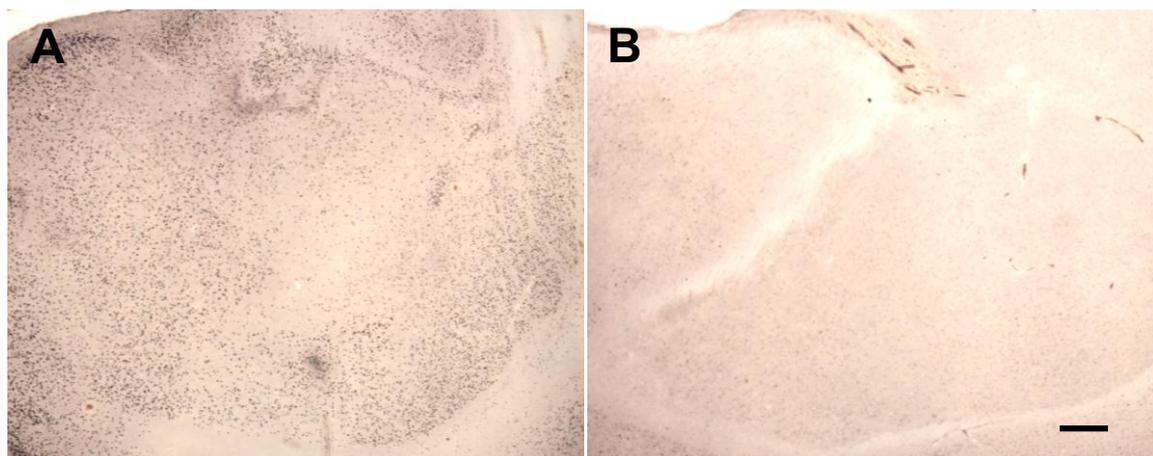


Figura 3 | Fotomicrografia da amígdala de saguis. A imagem demonstra a grande variação que ocorreu na marcação da expressão da proteína c-Fos. Pode-se observar que, para duas estruturas pertencentes ao mesmo grupo (PTZ 1h), a amígdala representada em **A** teve marcação intensa, já a apresentada em **B** não teve marcação alguma. Essa discrepância se apresentou em todos os núcleos da amígdala, assim como nos núcleos talâmicos, corpo estriado, globo pálido e substância negra, inviabilizando assim o uso destas estruturas. Escala de barra 100µm.

3.6 Análise Estereológica

A contagem histológica das células expressando a proteína c-Fos nas regiões encefálicas de interesse foi realizada com auxílio do programa StereoInvestigator® 9.02 32bits (2009 MBF Bioscience - Microbrightfield), integrado a um microscópio óptico Nikon, de alta resolução, com placa motorizada para os eixos “x”, “y” e “z”. Os limites das estruturas a serem analisadas foram identificados e delimitados de acordo com o atlas *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos e Watson, 2013) para os ratos e o *Stereotaxic and Chemoarchitectural Atlas of the Common Marmoset* (Hardman e Ashwell, 2012) para os saguis. As delimitações foram realizadas a partir da imagem de uma objetiva de baixo aumento (2x para ratos e 1x para saguis). Uma vez delimitada a área de interesse, a mesma foi dividida em quadrantes (matriz de contagem), sendo que em cada um deles foi posicionada uma caixa de contagem. As dimensões da caixa de contagem foram determinadas de acordo com o número de células que esta abrangia, sendo de 40 x 40µm para abranger uma média de 5 a 8 células. As dimensões da matriz de contagem foram determinadas de acordo com o tamanho de cada estrutura em particular (**tabela 2**). Foram contabilizadas três secções por estrutura, sendo o intervalo entre as secções de 30 a 90µm, intervalo registrado no programa para cada estrutura.

Tabela 2 | Matrizes de contagem

Estruturas		Tamanho da matriz de contagem (eixo x versus eixo y)
Ratos	Córtex motor	730 x 350µm
	Córtex somatossensorial	250 x 250µm
	Córtices auditivo, visual e cingulado	200 x 200µm
	Córtices entorrinal e perirrinal	160 x 160µm
	Córtex piriforme	180 x 120µm
Saguís	Córtex motor	660 x 240µm
	Córtex somatossensorial	350 x 720µm
	Córtices entorrinal, perirrinal, auditivo, visual e cingulado	380 x 380µm
	Córtex piriforme	340 x 310µm

A imunomarcção para c-Fos foi utilizada como um indicador das células ativadas. Esta imunorreatividade seletiva para o núcleo celular, associada a características morfológicas, foram os critérios adotados na contagem, sendo contabilizados, para o número total de células c-Fos positivas, somente os núcleos celulares que apresentaram bordas bem delimitadas, com intenso preenchimento de cor escura, de tamanho e formato relevantes. A contagem foi realizada em uma objetiva de grande aumento (40x). O coeficiente de erro (CE), valor estatístico padrão amplamente usado na estereologia, que representa a acurácia da estimativa feita pelo procedimento estereológico, foi calculado neste trabalho, pelo coeficiente de erro de Gundersen $m=1$ (Gundersen et al., 1999), com os valores obtidos variando de 0,1 a 0,2.

3.7 Análise Estatística

A análise dos dados foi feita com o software IBM® SPSS® Statistics versão 21.0.0. Comparações entre os dados foram feitas por ANOVA seguido pelo teste Fisher. O nível de significância estatística estabelecido foi $P<0,05$ e $P<0,001$.

4 RESULTADOS

A hiperestimulação com PTZ seguida da imunohistoquímica para c-Fos revelou um padrão de marcação muito intenso para o córtex dos ratos e dos saguis, com os núcleos celulares bem marcados e delineados em preto. As células ativadas estavam distribuídas por toda a extensão do córtex cerebral, em maior abundância nas camadas mais externas do córtex, sendo que em algumas estruturas corticais, como o córtex piriforme de ratos, estas células apresentaram-se em *clusters*. As estruturas subcorticais, como os núcleos da base e os núcleos amigdalares e talâmicos, que também eram objetivos desta avaliação, não apresentaram, em análise qualitativa, padrão de coloração consistente em animais do mesmo grupo, tornando-se portanto inviáveis para esta avaliação.

4.1 O Padrão de Expressão de c-Fos em Ratos

Em avaliação qualitativa, toda a extensão cortical dos animais analisados apresentou expressão intensa da proteína c-Fos, com diferenças observáveis logo no primeiro tempo de análise, 0,5h após o estímulo. A expressão basal (grupo controle) caracteriza-se por um padrão de marcação com células isoladas, distribuídas ao longo de toda a extensão cortical. No tempo de 0,5h após o estímulo, observa-se nitidamente expressão (mais intensa) em todas as estruturas, com maior densidade de células marcadas nas camadas corticais mais externas. Para os córtices entorrinal, perirrinal, somatossensorial, auditivo e visual (**figuras 6 a 10**), mesmo com a maior densidade de células marcadas nas camadas mais externas, todas as camadas corticais apresentaram marcação bem delineada já no primeiro tempo após estímulo. A expressão intensa e bem delineada pode ser observada qualitativamente, para todas as estruturas, até o tempo de 3h pós-PTZ (ver **figuras 4 a 11**).

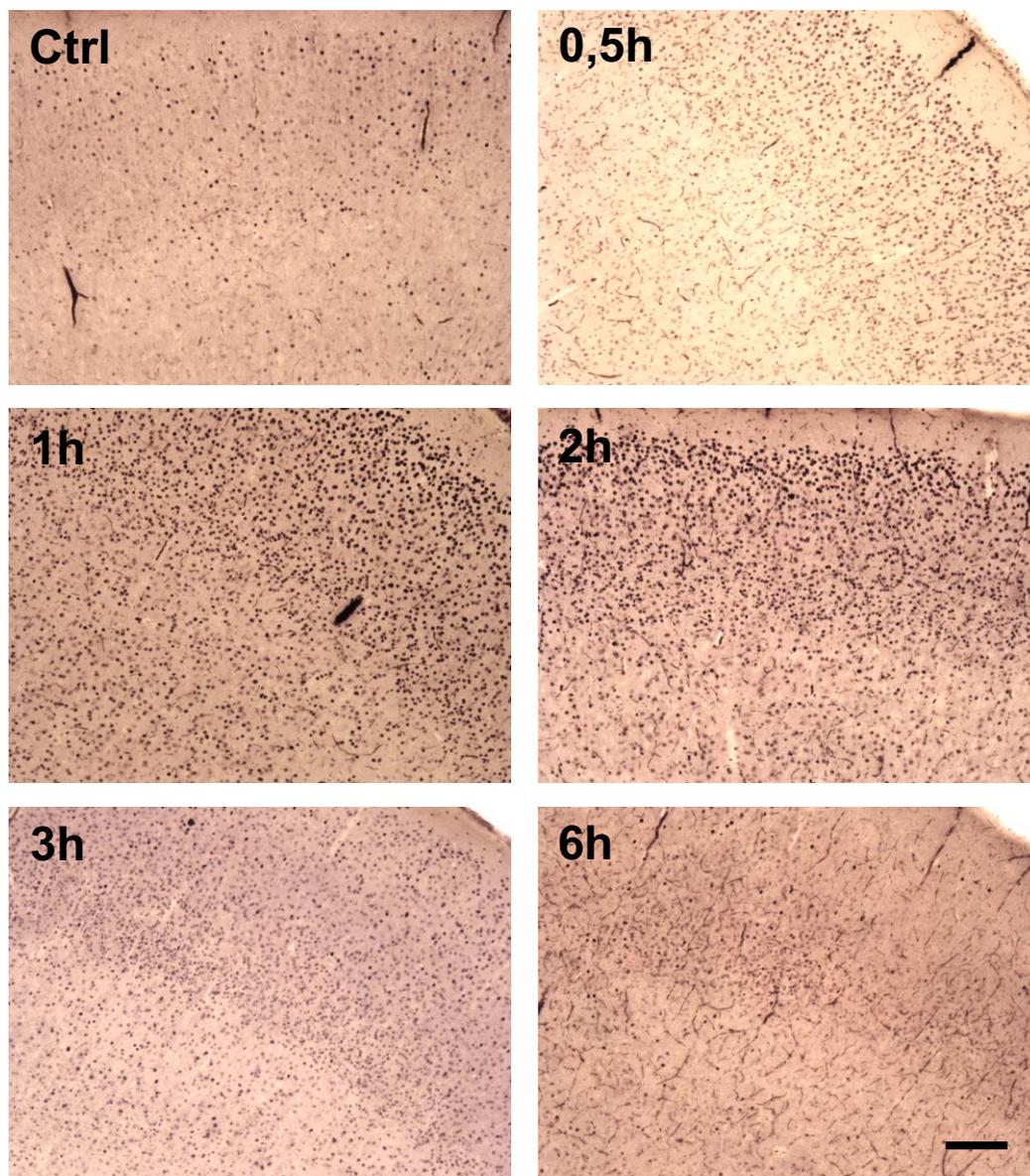


Figura 4 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex motor de ratos. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 2h, PTZ 3h e PTZ 6h. Escala de barra 100 μ m.

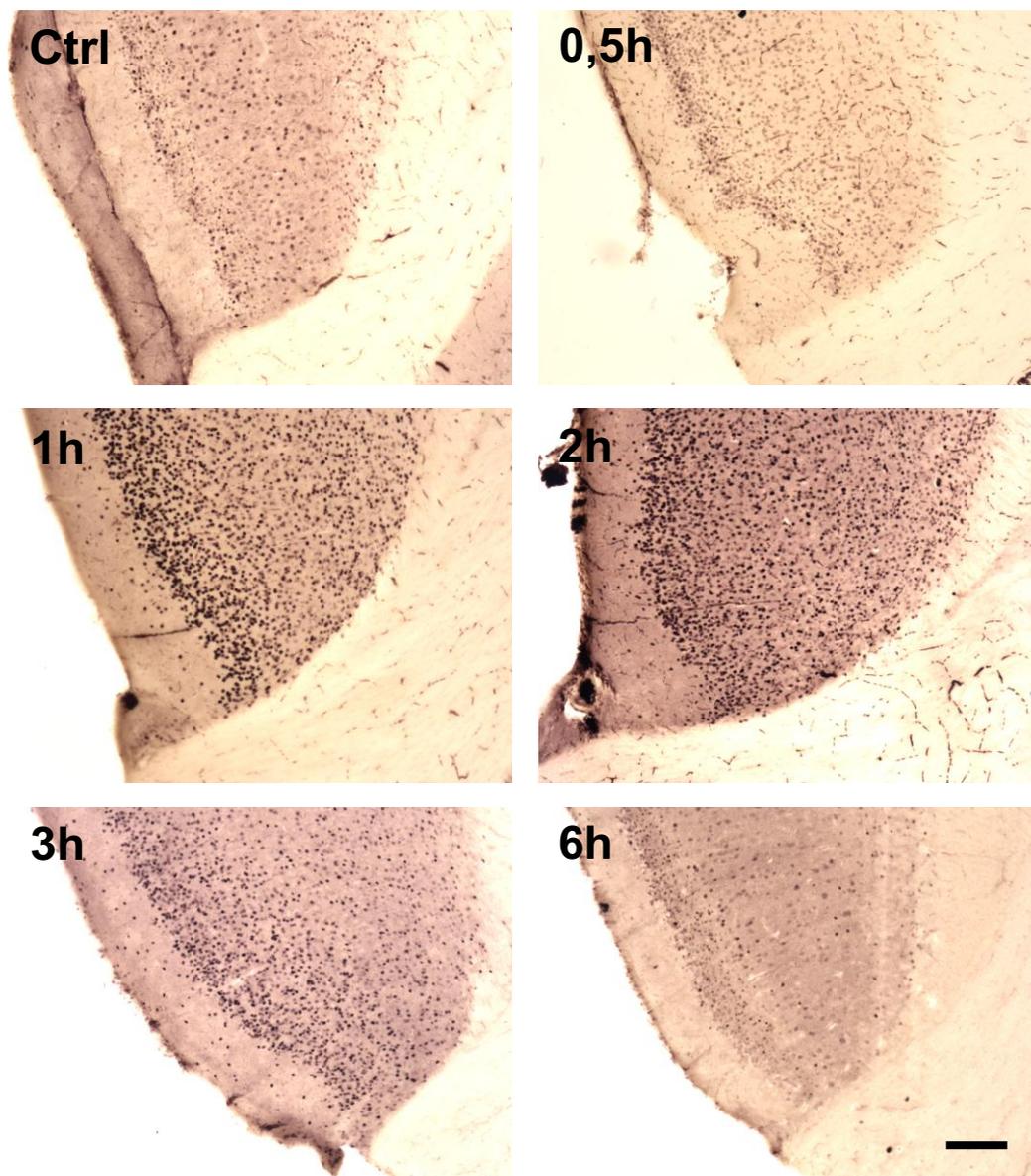


Figura 5 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex cingulado de ratos. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 2h, PTZ 3h e PTZ 6h. Escala de barra 100 μ m.

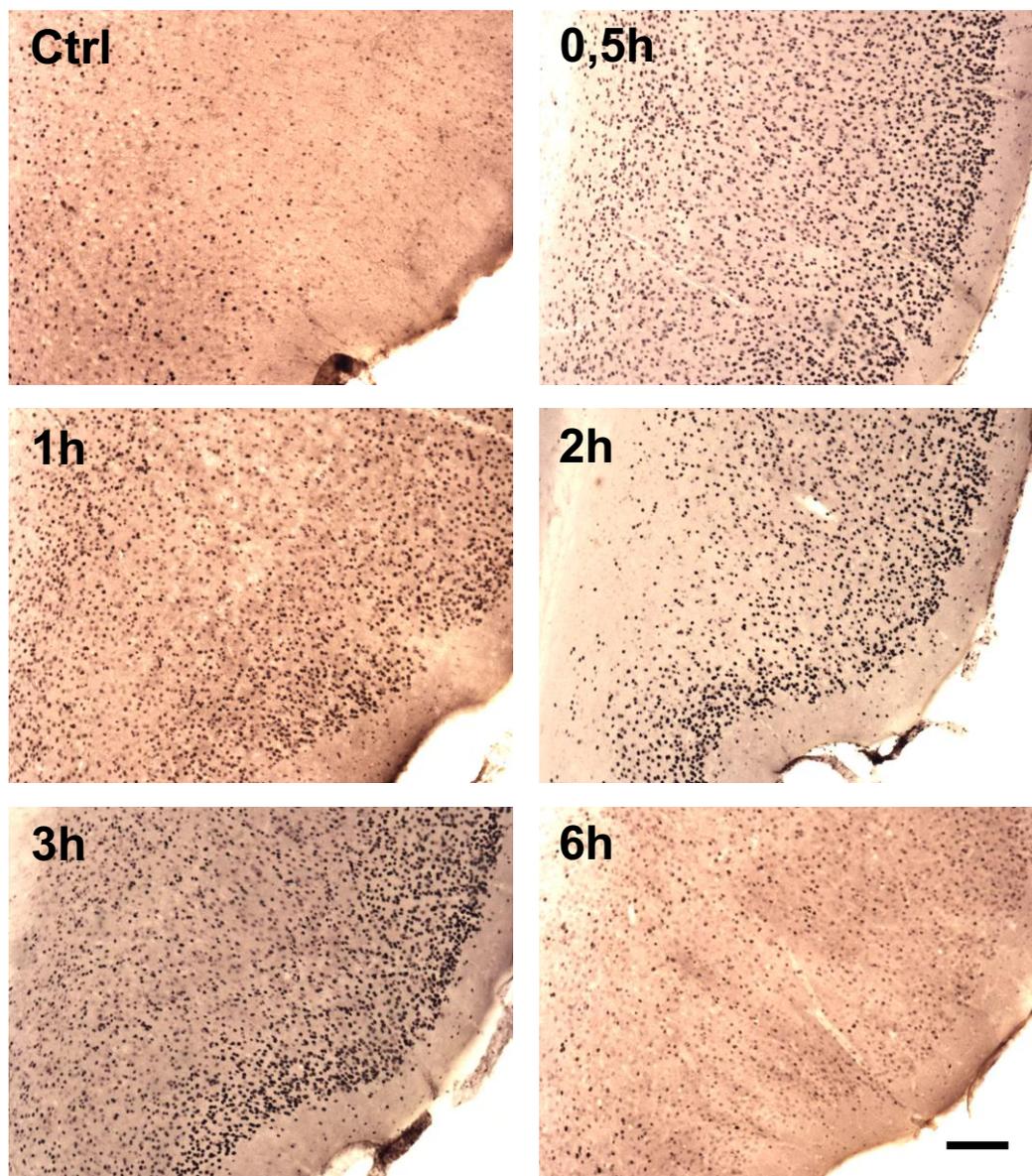


Figura 6 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex entorrinal de ratos. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 2h, PTZ 3h e PTZ 6h. Escala de barra 100 μ m.

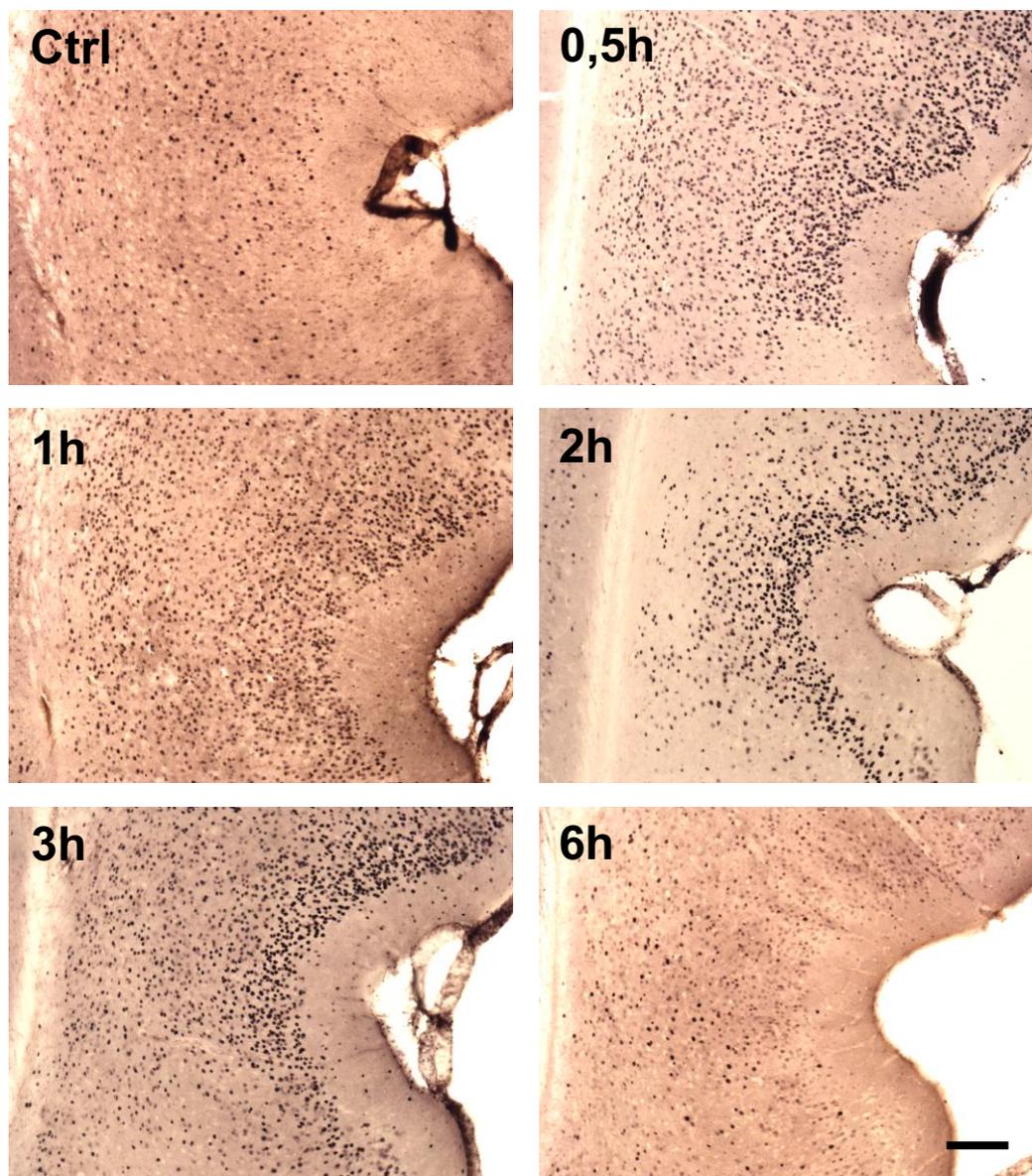


Figura 7 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex perirrinal de ratos. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 2h, PTZ 3h e PTZ 6h. Escala de barra 100 μ m.

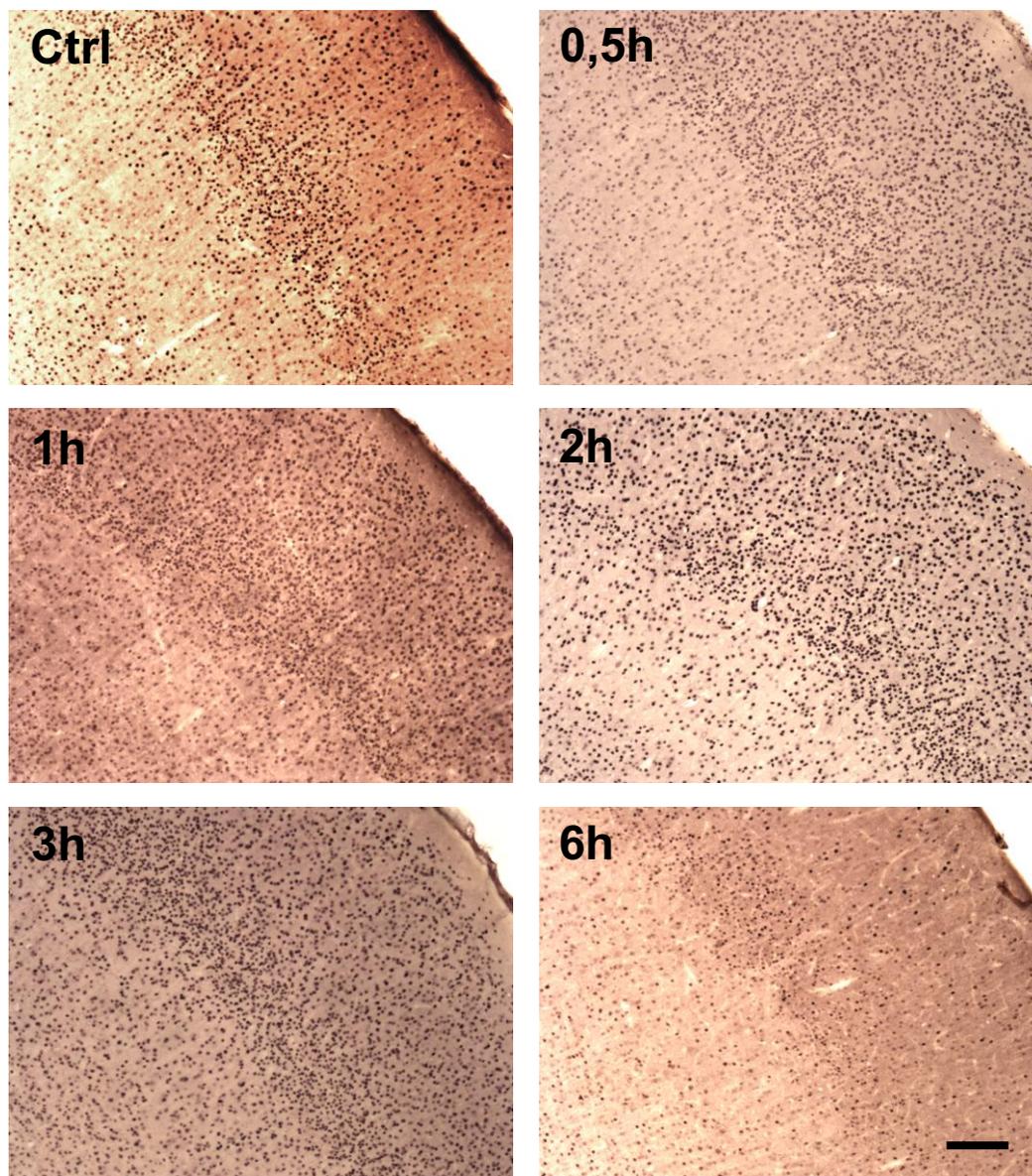


Figura 8 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex somatossensorial de ratos. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 2h, PTZ 3h e PTZ 6h. Escala de barra 100 μ m.

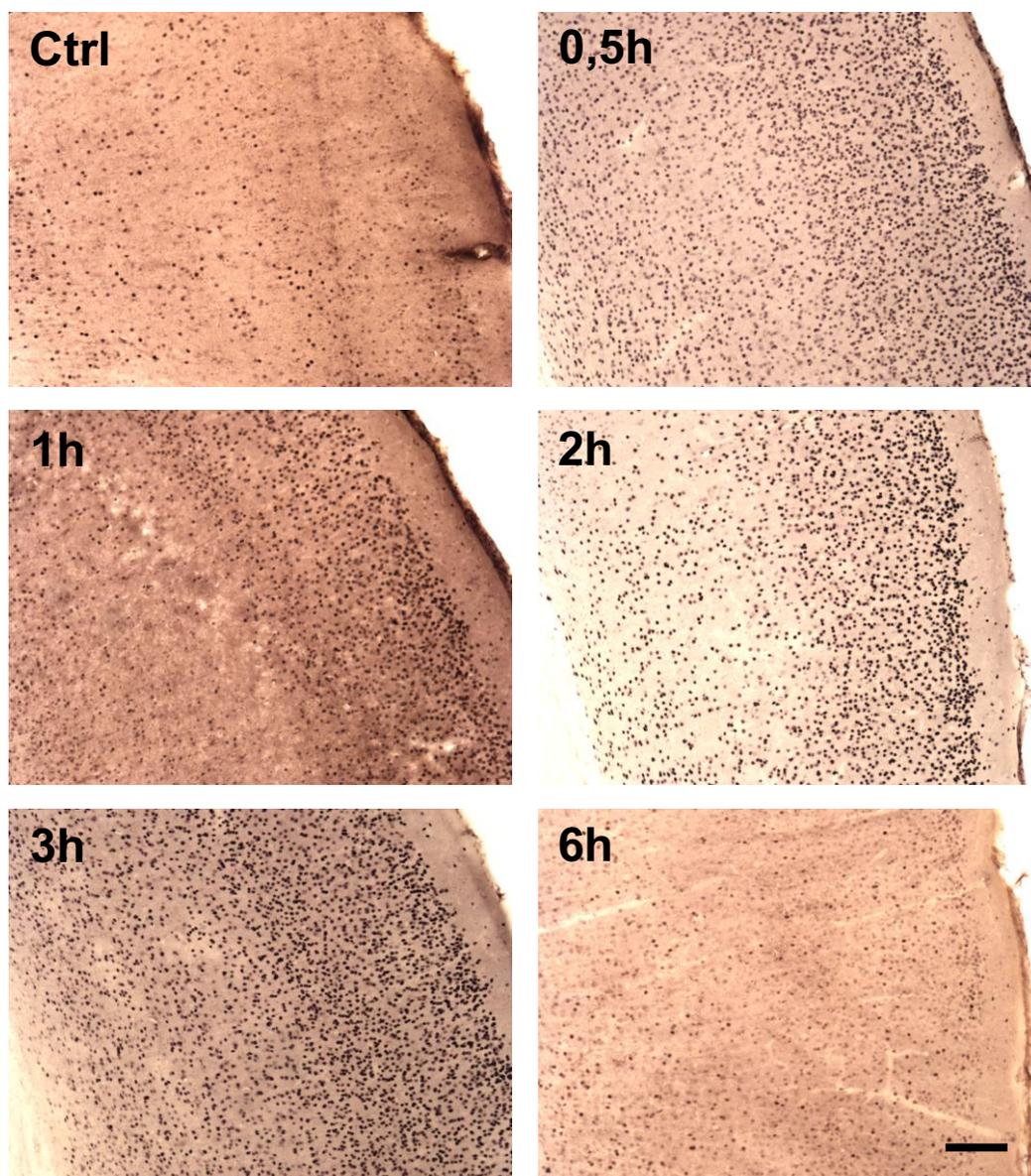


Figura 9 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex auditivo de ratos. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 2h, PTZ 3h e PTZ 6h. Escala de barra 100 μ m.

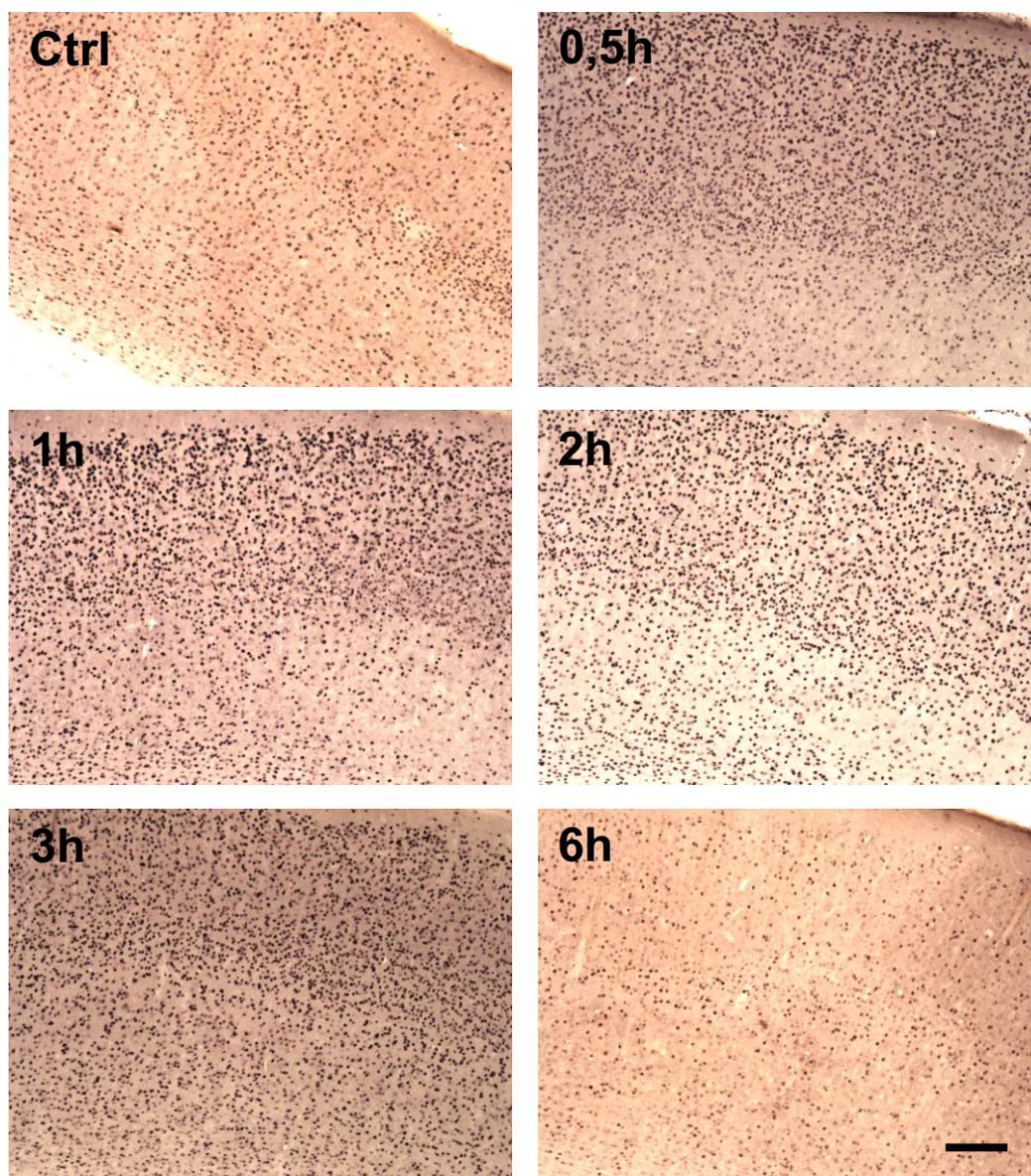


Figura 10 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex visual de ratos. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 2h, PTZ 3h e PTZ 6h. Escala de barra 100 μ m.

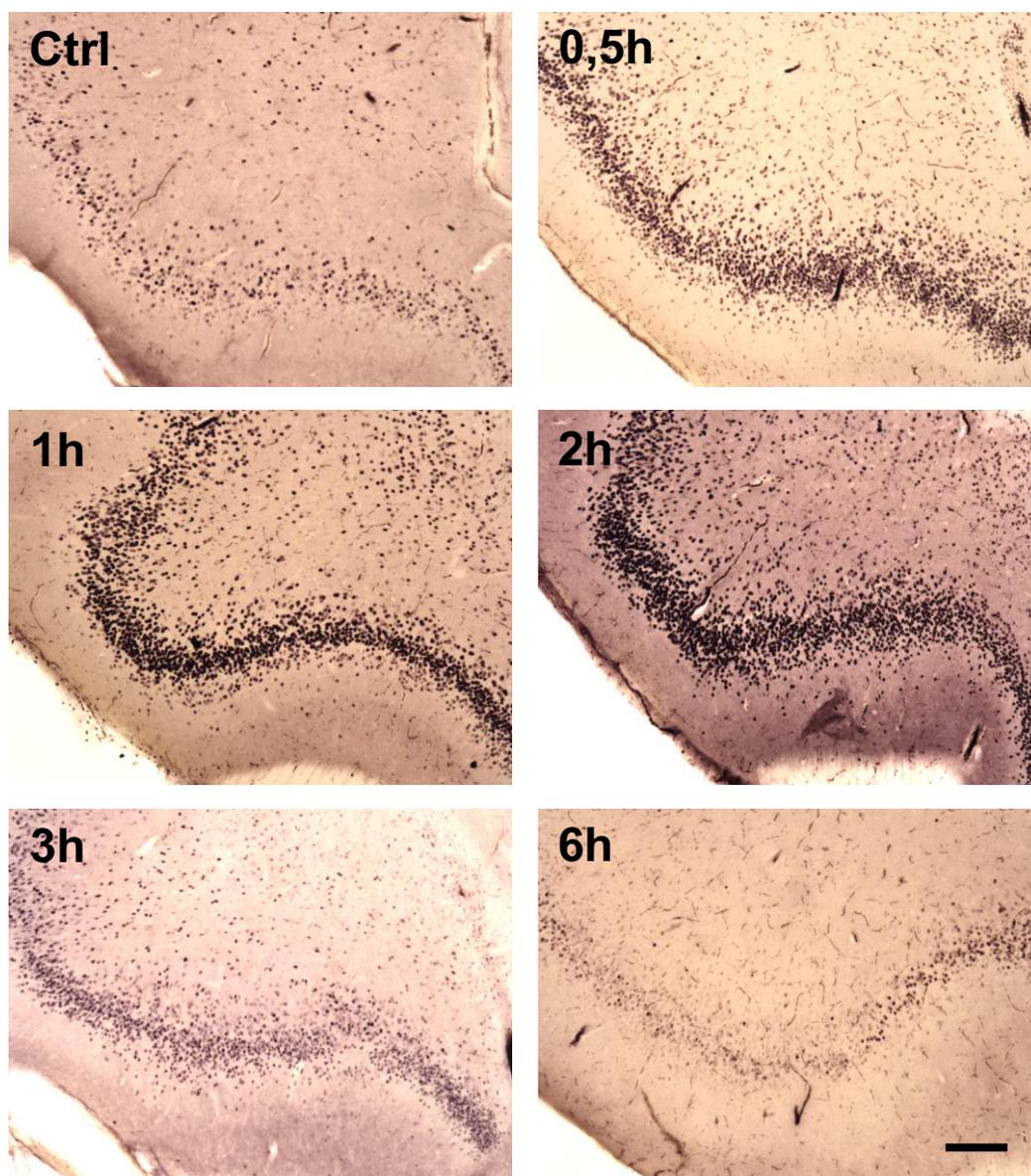
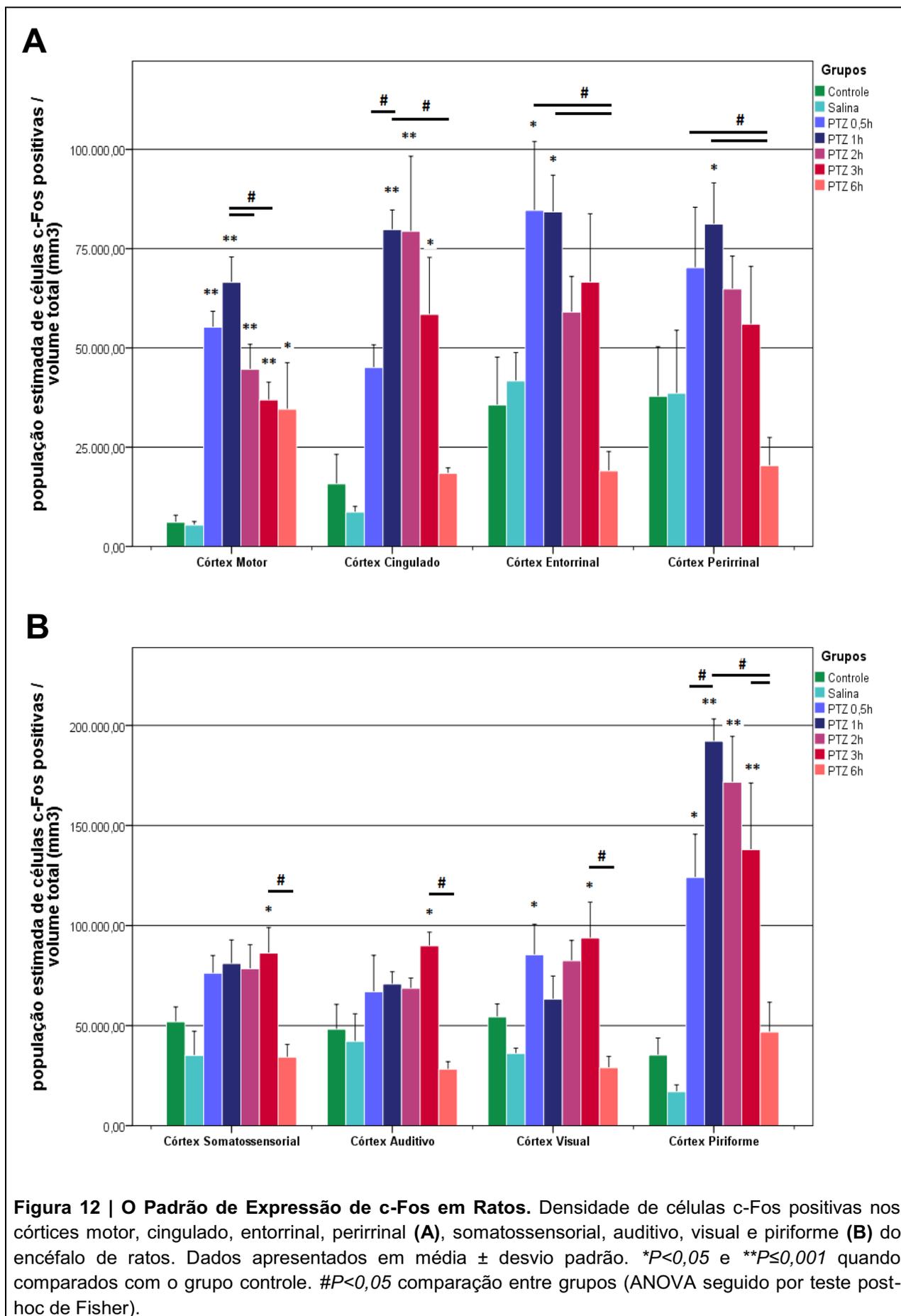


Figura 11 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex piriforme de ratos. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 2h, PTZ 3h e PTZ 6h. Escala de barra 100 μ m.

Estes resultados se apresentaram de acordo com o previamente descrito em literatura para o encéfalo de ratos, e se confirmaram neste trabalho através da análise estereológica quantitativa representada na **figura 12**. A análise estereológica demonstrou que a expressão da proteína c-Fos apresentou-se em padrões, com tempos os de início, pico e o decaimento a níveis basais similares para alguns grupos de estruturas. Os picos de expressão de c-Fos apresentaram-se nos tempos de 0,5 e 1h para os córtices cingulado, entorrinal, perirrinal, piriforme e motor, mantendo-se até as 2h no córtex cingulado, tempo este em que se inicia, para estas estruturas, o decaimento aos níveis basais (**figura 12**). Para os córtices somatossensorial, visual e auditivo, o pico da expressão apresentou-se mais tardiamente, no tempo de 3h após o estímulo (**figura 12**). O retorno aos níveis basais ocorreu por completo no tempo de 6h para todas as regiões corticais analisadas, exceto córtex motor. No córtex motor a expressão se manteve em níveis estatisticamente significantes em relação ao grupo controle até o último tempo avaliado, 6h após o estímulo (**figura 12**). Observa-se também que para os córtices cingulado e entorrinal, o pico de expressão manteve-se em um patamar por um determinado período de tempo, sendo de 1 a 2h para o córtex cingulado e de 0,5 a 1h para o córtex entorrinal (**figura 12**). O decaimento após o pico da expressão pode ser observado pelas diferenças entre grupos, onde todos os picos de expressão da proteína apresentam diferença significativa em relação ao grupo 6h, sendo no córtex motor esta diferença já observada no grupo de 3h após o estímulo.



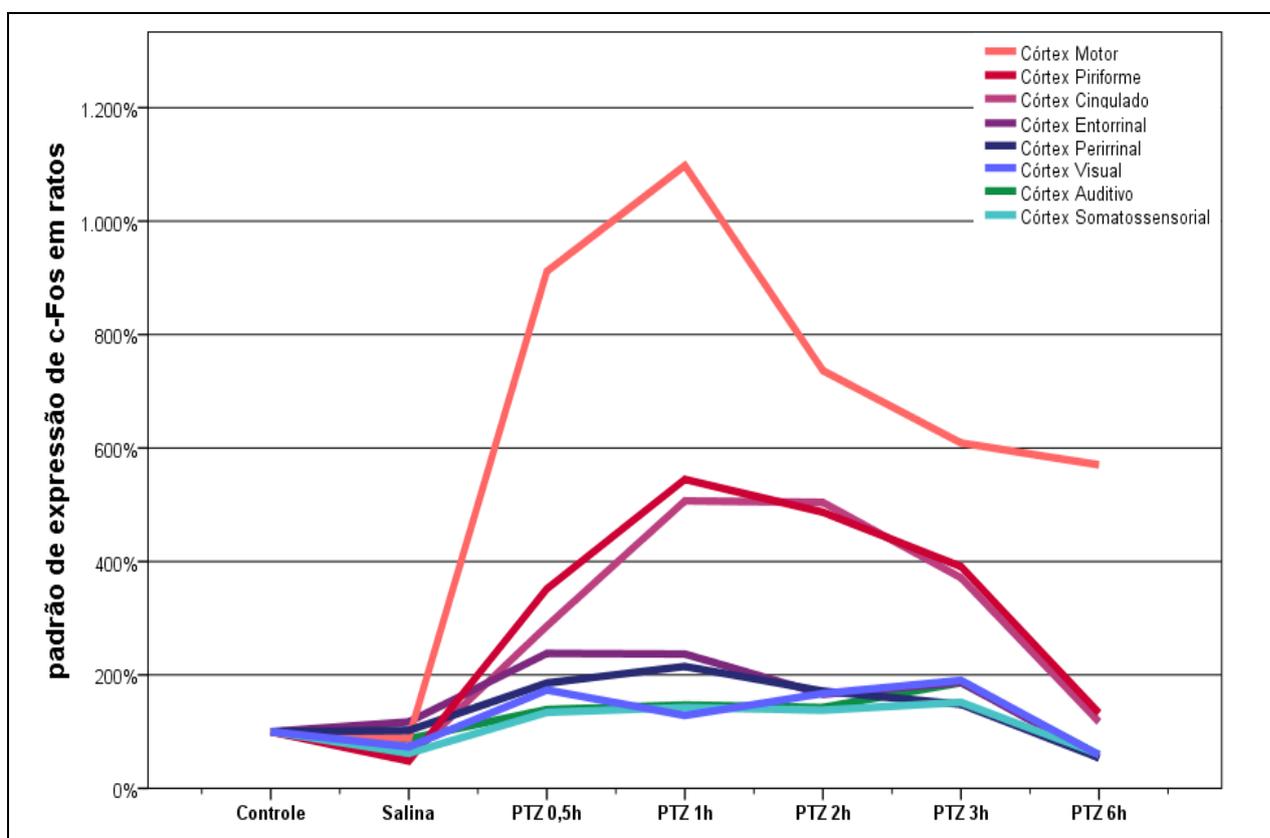


Figura 13 | Representação do padrão de expressão da proteína c-Fos nos córtices somatossensorial, visual, auditivo, motor, piriforme, cingulado, entorrinal e perirrinal do encéfalo de ratos. O gráfico demonstra um padrão de expressão região-dependente, evidenciado pelos picos da expressão em diferentes tempos. Nota-se, entretanto, que todas as regiões demonstram início da expressão com 0,5h e decaimento aos níveis basais com 6h após o estímulo.

Na **figura 13** fica em maior evidência o padrão que se formou para alguns grupos de estruturas, percebe-se que a expressão da proteína nos ratos apresenta maior semelhança entre algumas áreas específicas (estes padrões parecem se formar de acordo com a função: como evidenciado, por exemplo, o padrão muito semelhante para os córtices auditivo, visual e somatossensorial em ratos). Nos saguis, esse agrupamento das estruturas por padrões na expressão é menos evidenciado, como será observado na sequência (**figura 23**).

4.2 O Padrão de Expressão de c-Fos em Saguis

Conforme observado em análise qualitativa para os ratos, o padrão se repetiu para os sagüis: toda a extensão cortical dos animais analisados apresentou forte expressão da proteína c-Fos, com diferenças observáveis logo no primeiro tempo de 0,5h após o estímulo. Nos sagüis, notou-se que qualitativamente há pouca ou nenhuma expressão basal (grupo controle). No tempo de 0,5h pós-PTZ, nota-se expressão mais intensa somente nas camadas corticais mais externas para os córtices motor, cingulado, somatossensorial, auditivo, visual e piriforme (**ver figuras 14 e 15 e 18 a 21**). Os demais (entorrinal e perirrinal, **figuras 16 e 17**), apresentaram aumento na intensidade da expressão, distribuído de maneira homogênea pelas camadas corticais. O aumento mais expressivo observado qualitativamente ocorreu do tempo de 0,5h para 1h pós-PTZ, para todas as estruturas analisadas (**ver figuras 14 a 21**).

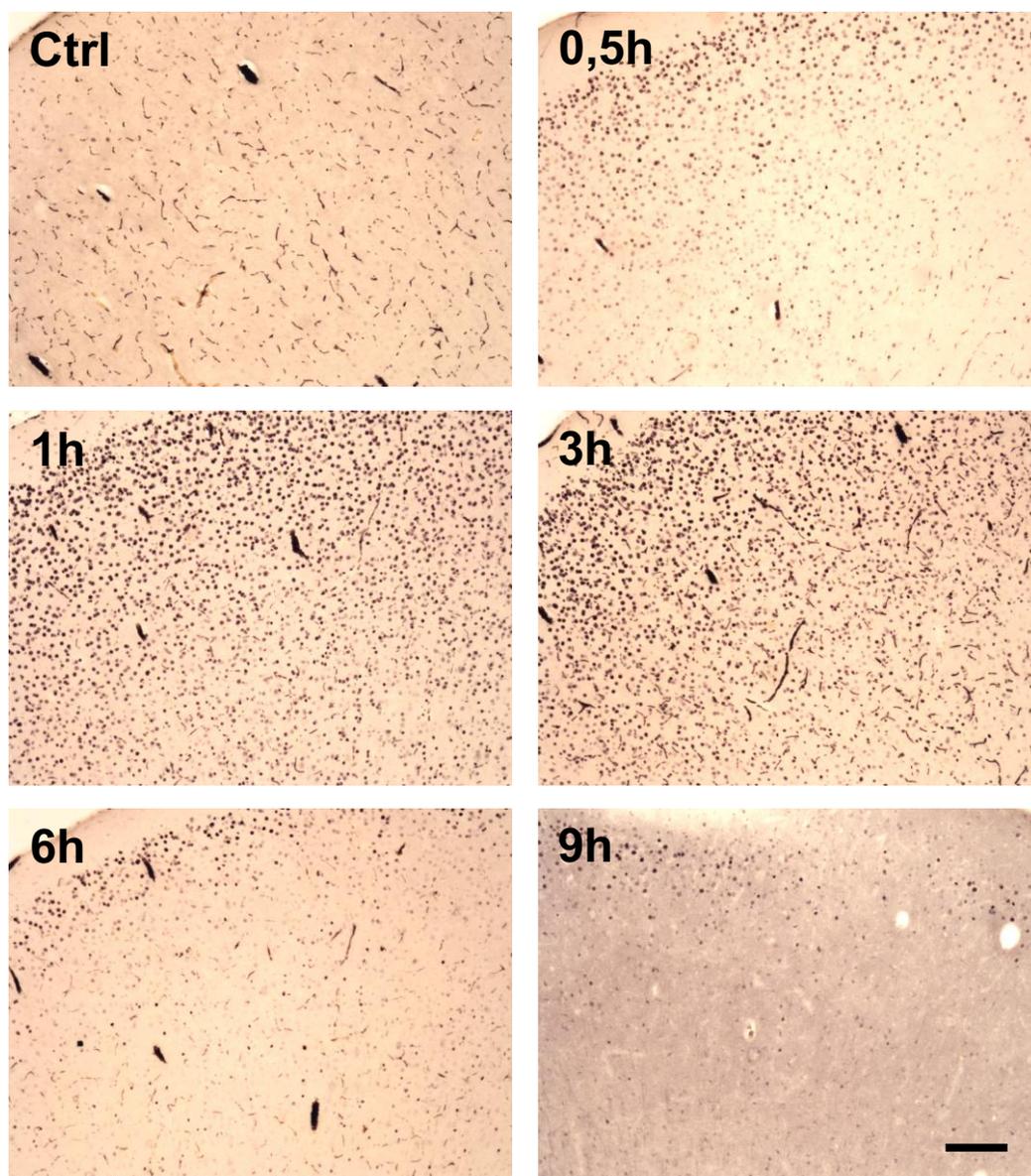


Figura 14 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex motor de saguis. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 3h, PTZ 6h e PTZ 9h. Escala de barra 100 μ m.

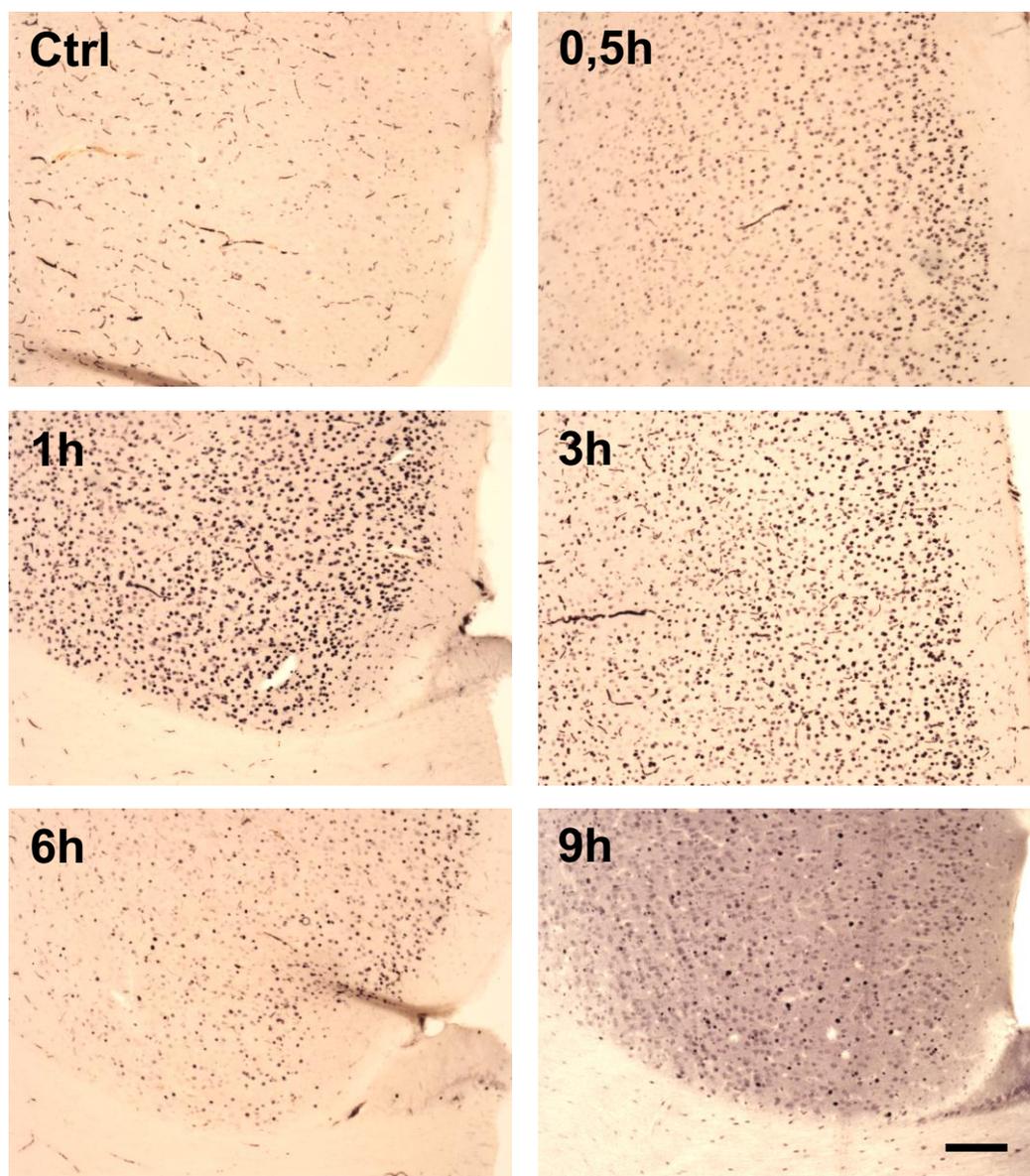


Figura 15 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex cingulado de saguis. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 3h, PTZ 6h e PTZ 9h. Escala de barra 100 μ m.

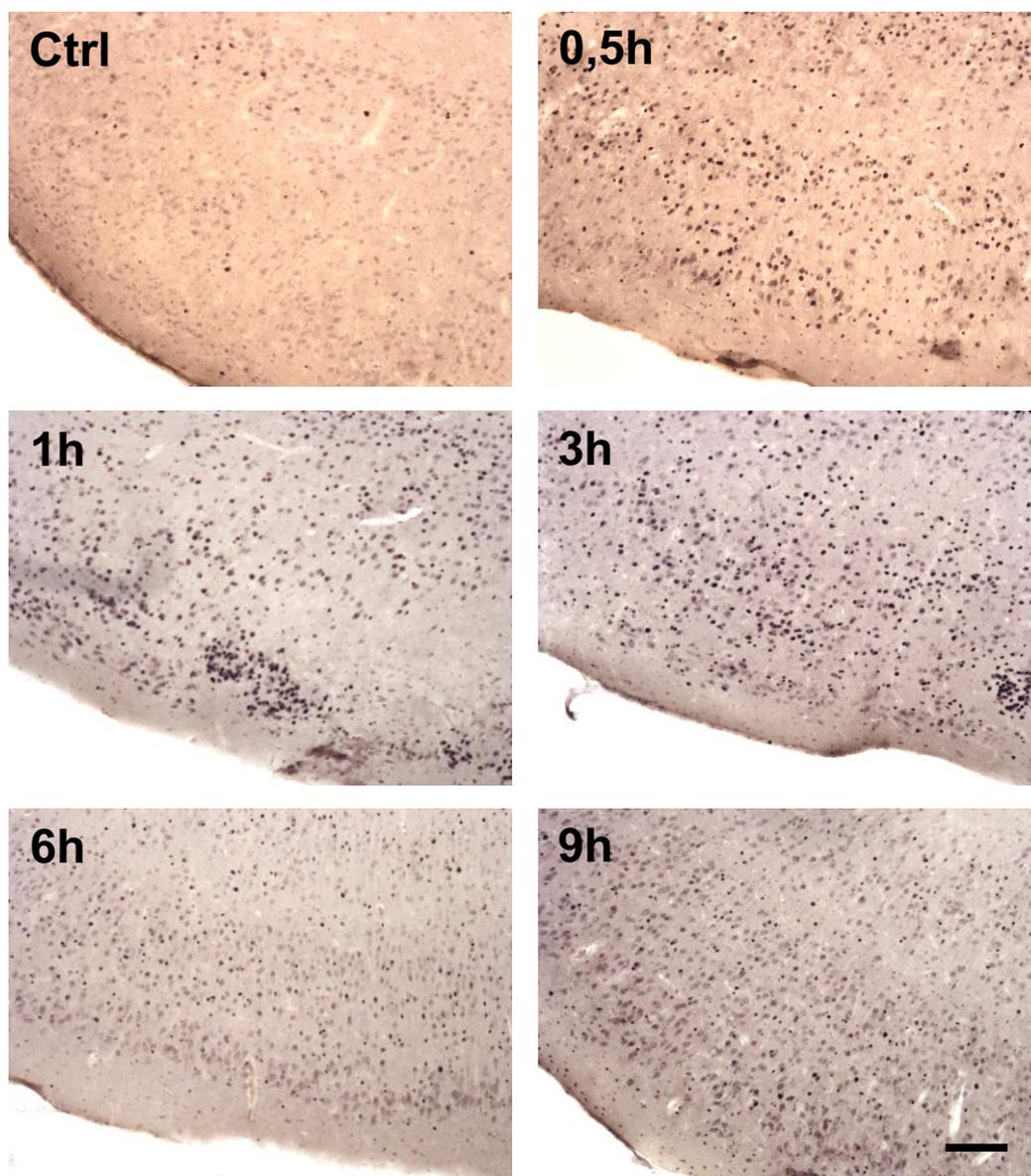


Figura 16 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex entorrinal de saguis. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 3h, PTZ 6h e PTZ 9h. Escala de barra 100 μ m.

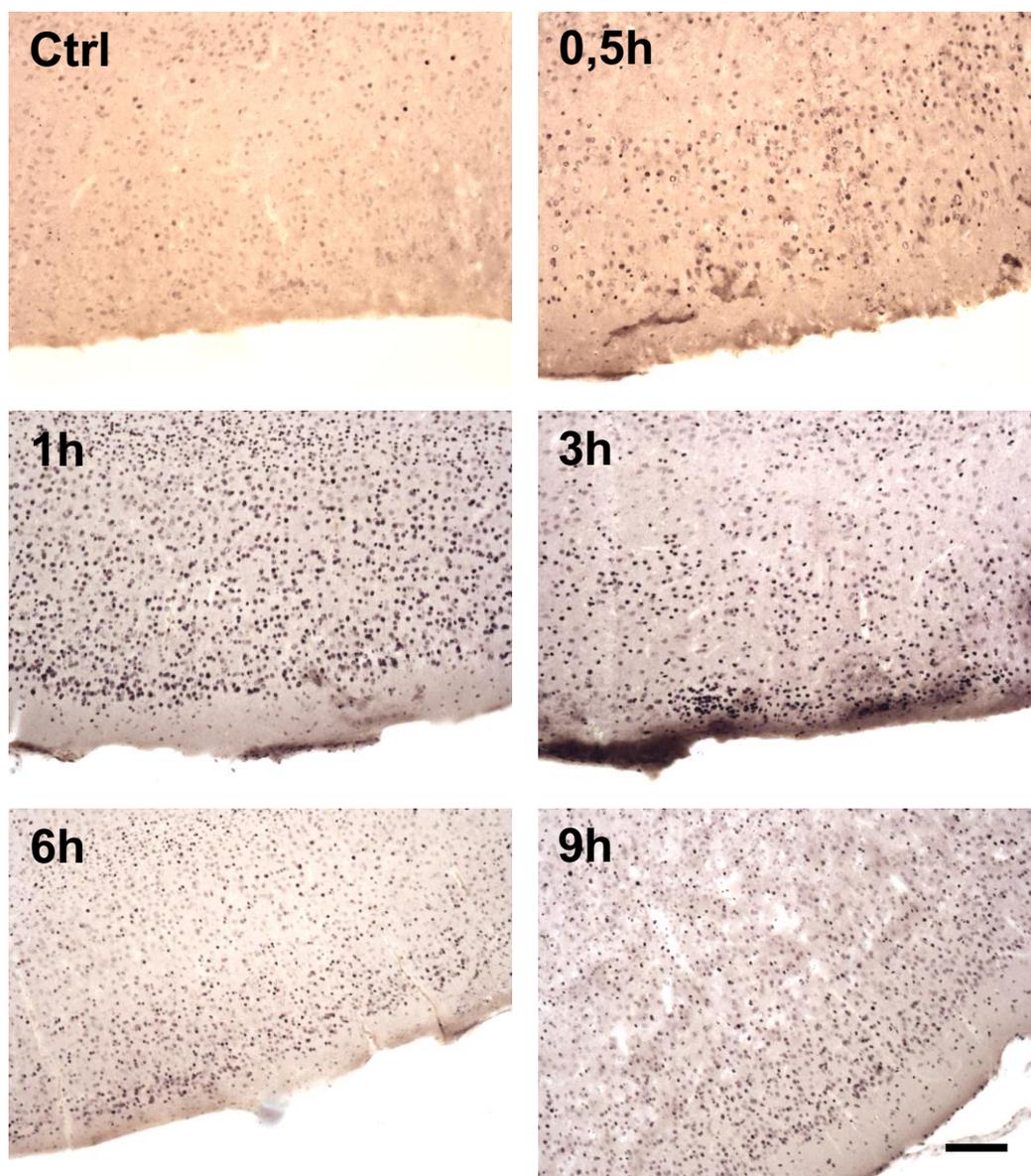


Figura 17 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex perirrinal de saguis. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 3h, PTZ 6h e PTZ 9h. Escala de barra 100 μ m.

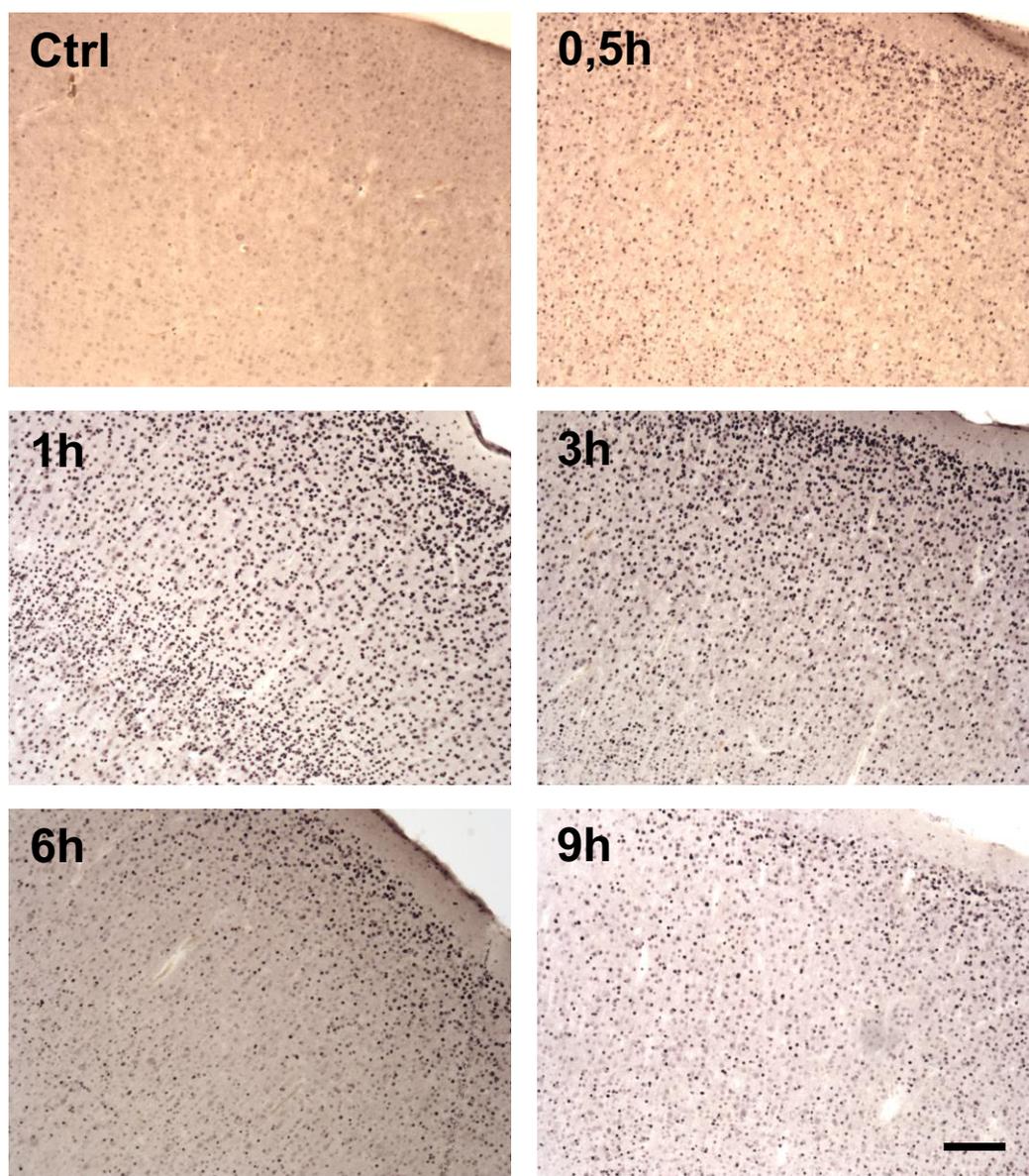


Figura 18 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex somatossensorial de saguis. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 3h, PTZ 6h e PTZ 9h. Escala de barra 100µm.

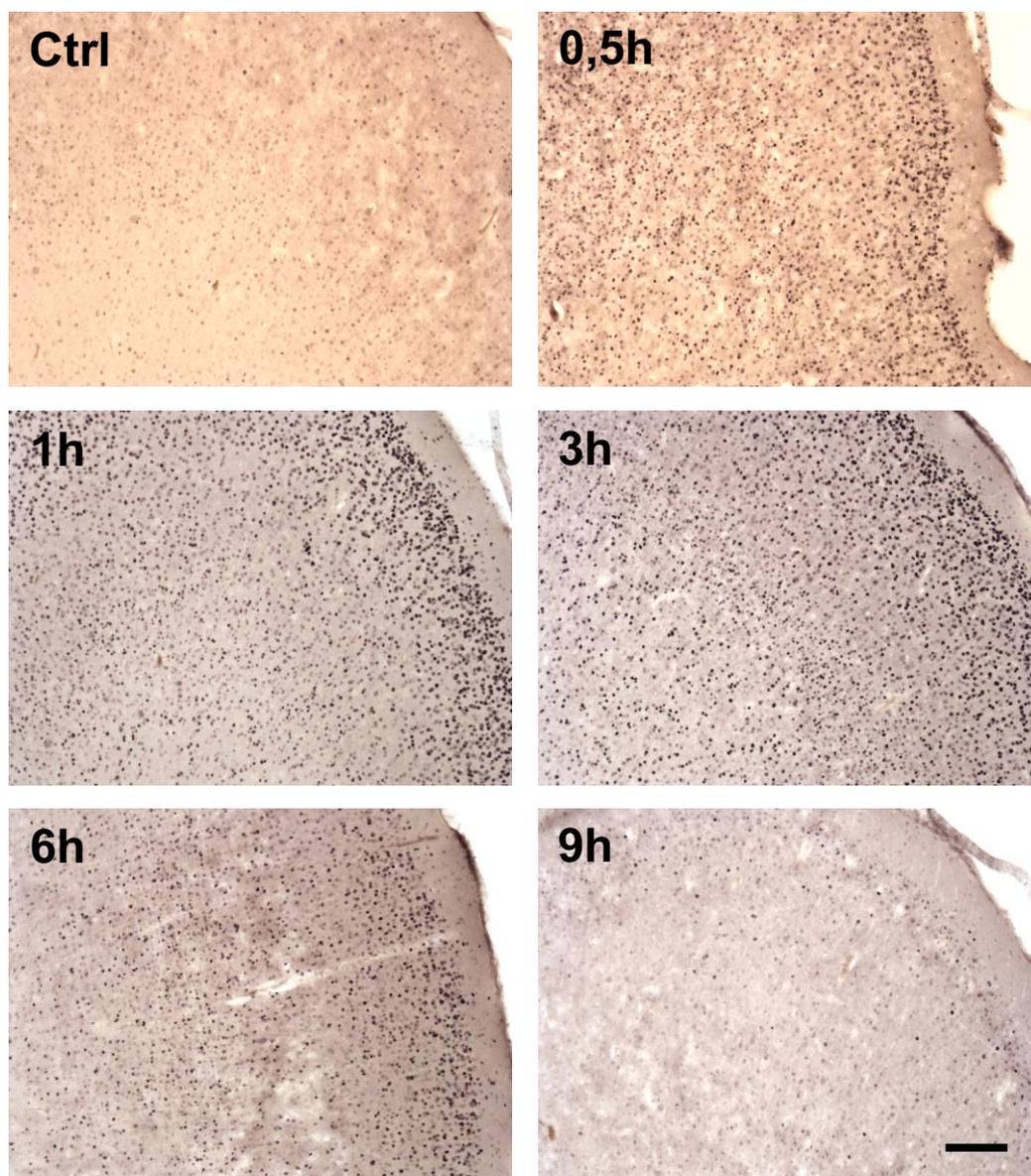


Figura 19 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex auditivo de saguis. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 3h, PTZ 6h e PTZ 9h. Escala de barra 100 μ m.

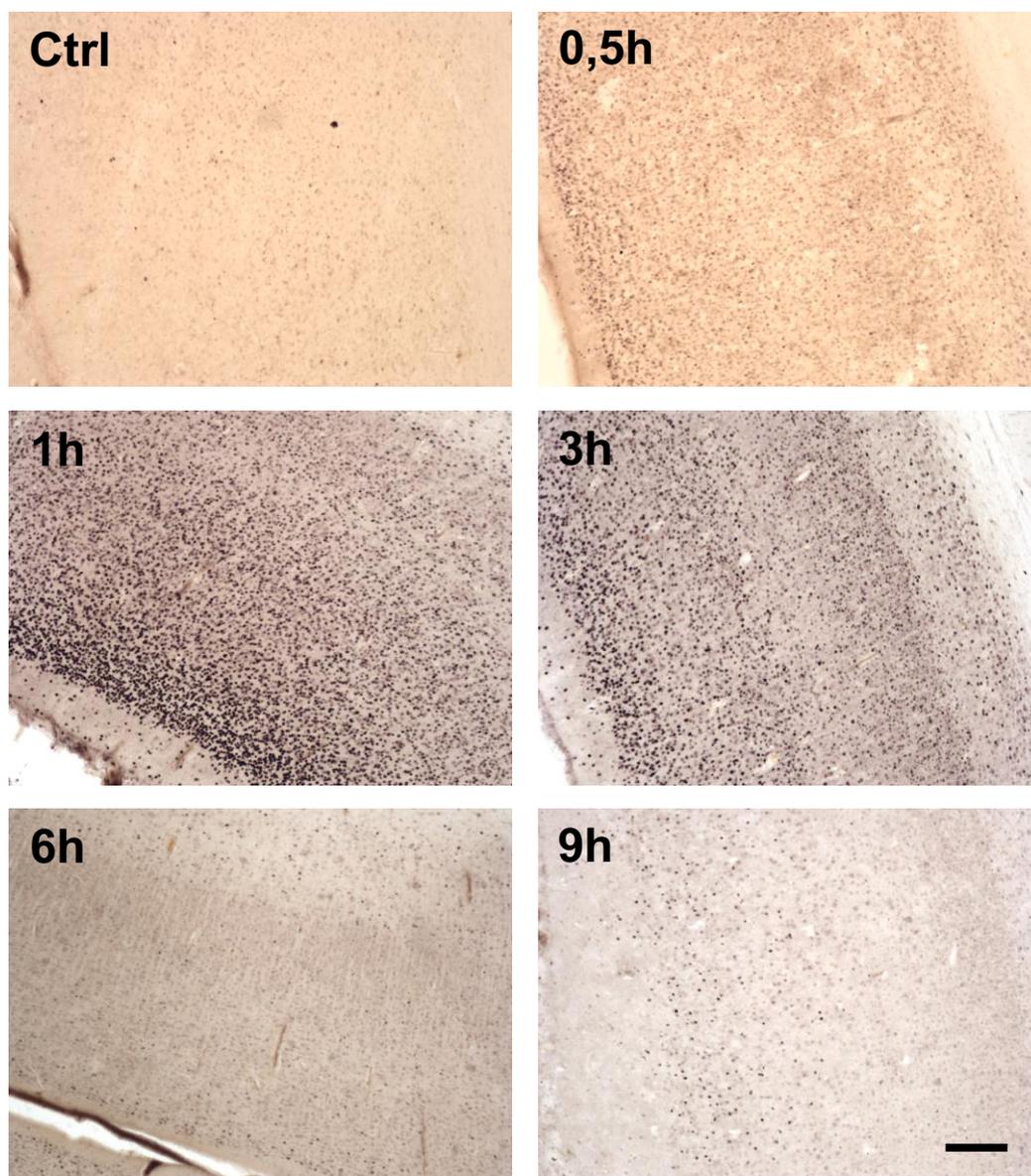


Figura 20 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex visual de saguis. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 3h, PTZ 6h e PTZ 9h. Escala de barra 100µm.

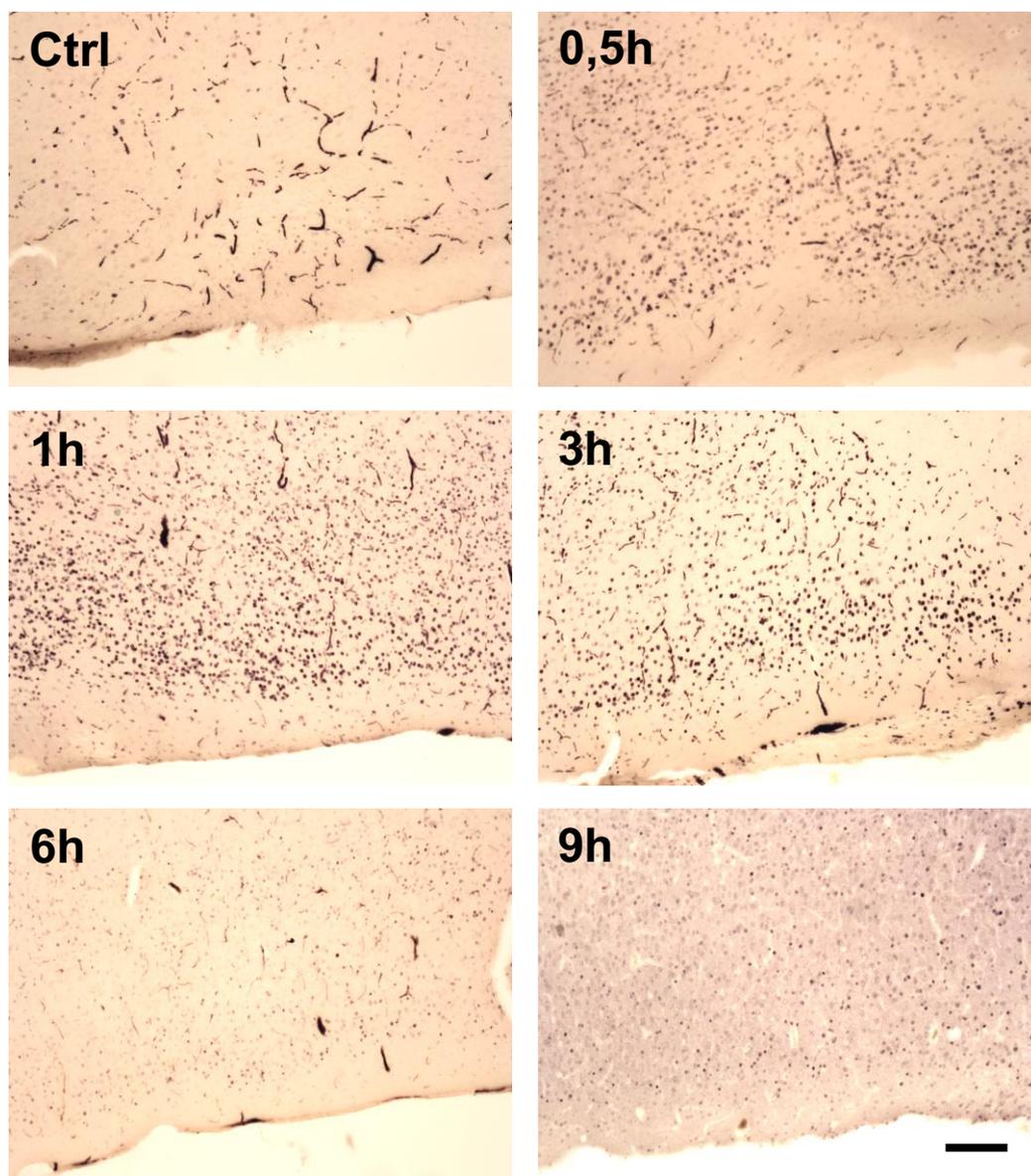
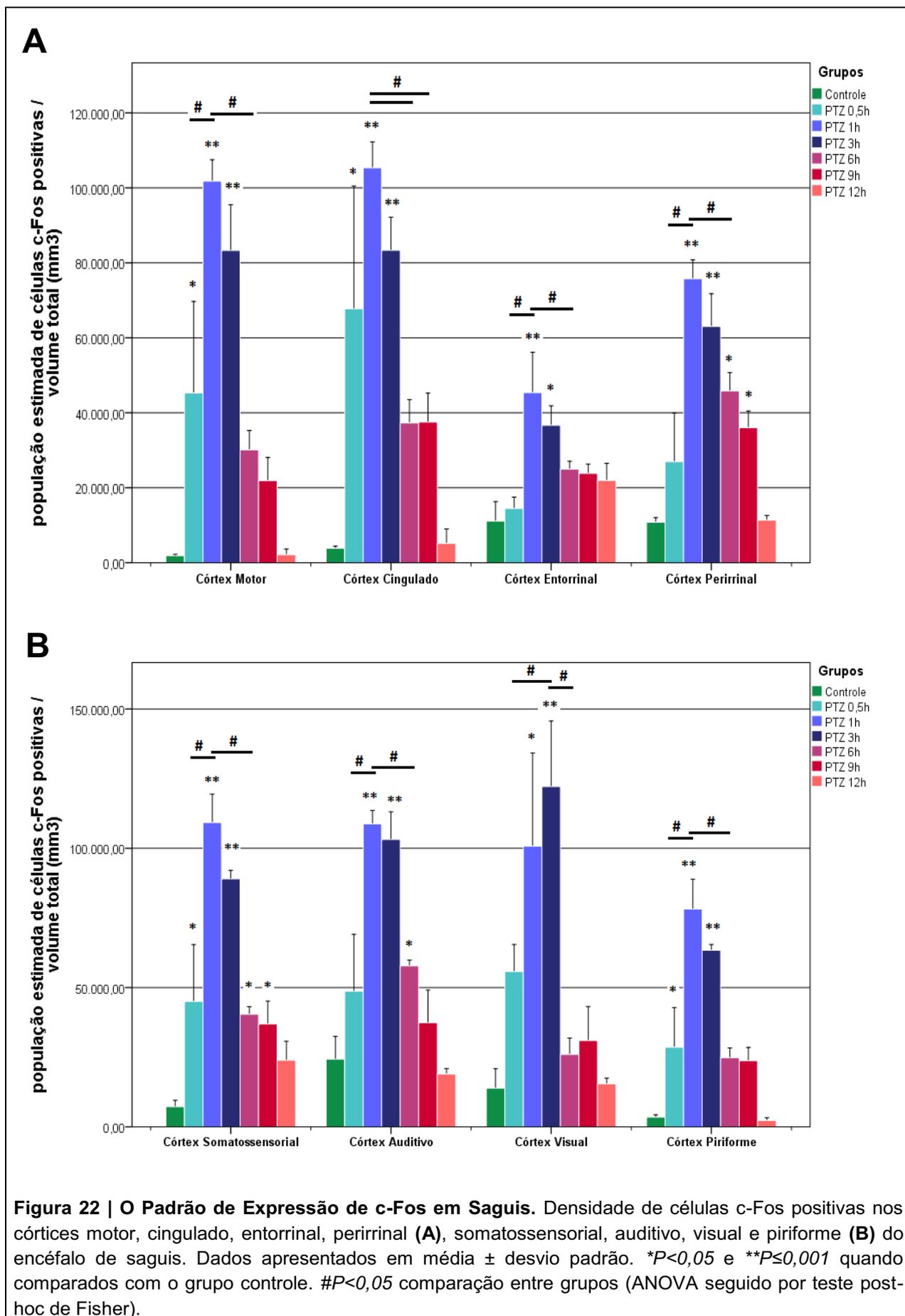
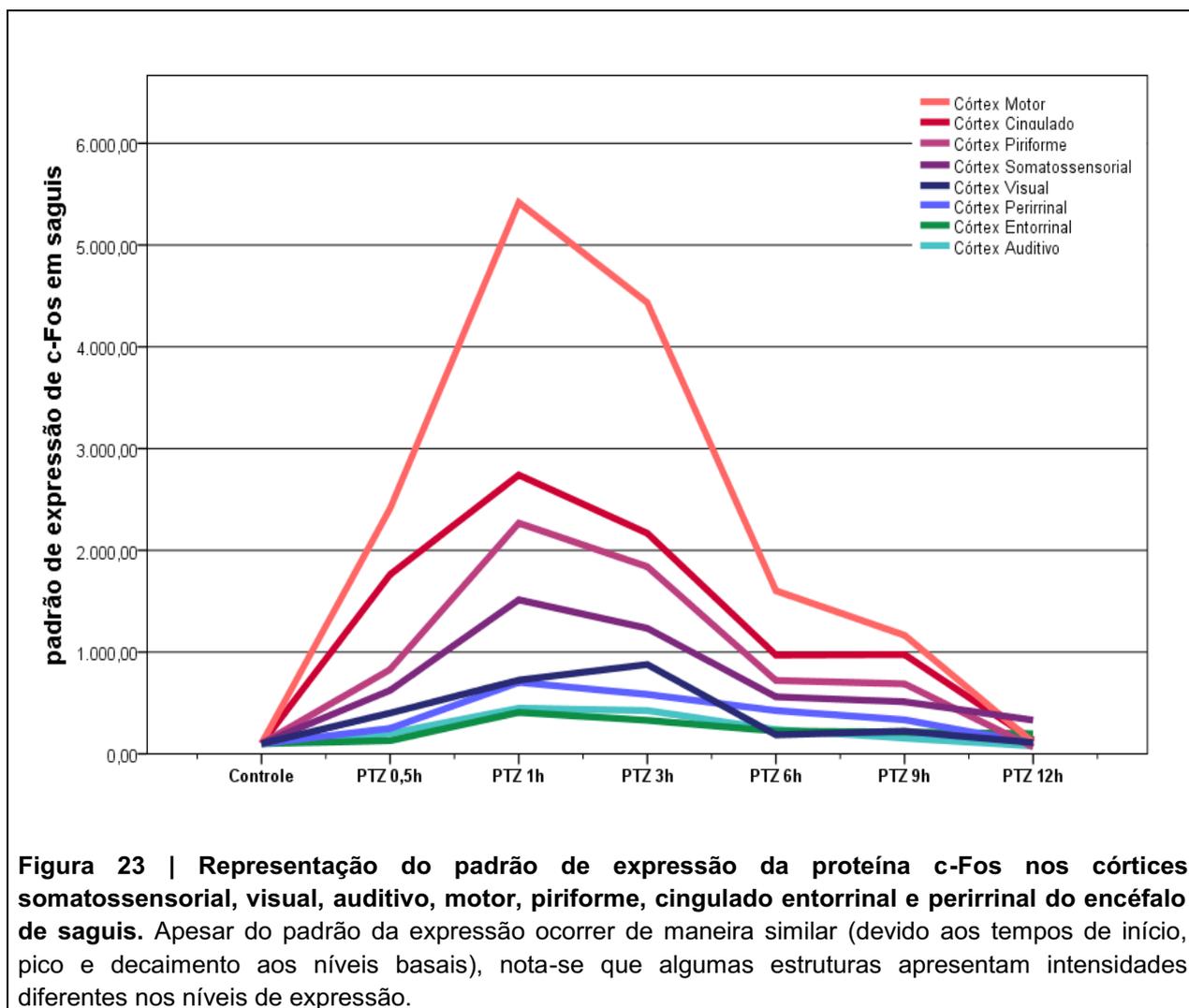


Figura 21 | Fotomicrografia do padrão de expressão da proteína c-Fos no córtex piriforme de saguis. Estão representados os grupos controle, PTZ 0,5h, PTZ 1h, PTZ 3h, PTZ 6h e PTZ 9h. Escala de barra 100μm.

Na análise estereológica quantitativa, estas observações qualitativas se confirmam: a análise demonstrou que os córtices cingulado, motor, piriforme e somatossensorial apresentaram diferença significativa já no primeiro tempo pós-estímulo com PTZ, de 0,5h (**figura 22**). Os picos de expressão da proteína apresentaram-se com 1h pós-estímulo para todas as áreas analisadas, exceto para o córtex visual, onde o pico de expressão foi com 3h após o estímulo com PTZ (**figura 22**). Todos os córtices analisados apresentaram expressão significativa da proteína até as 3h após o estímulo, com decaimento as 6h para os córtices cingulado, entorrinal, piriforme, visual e motor (**figura 22**). Entretanto, para o córtex auditivo a expressão significativa se estendeu até as 6h pós-estímulo e para os córtices perirrinal e somatossensorial, se entendeu até as 9h pós-estímulo com PTZ. No tempo de 12h após o estímulo, todas as regiões corticais analisadas haviam retornado por completo aos níveis basais.

Ao contrário do observado em ratos, nos sagüis não houve padrões de expressão por grupos de estrutura, de maneira geral estas apresentaram padrão semelhante na expressão da proteína, com os tempos de início, pico e retorno a níveis basais em intervalos similares, porém com características específicas para algumas estruturas. Neste caso, vale ressaltar, por exemplo, a expressão significativa prolongada (até 9h pós-estímulo) que se apresentou para os córtices somatossensorial e perirrinal, destacando-se, portanto, das outras estruturas corticais dos sagüis e de todas as estruturas corticais observadas para os ratos (**figuras 13 e 22**). Também se apresentou como uma particularidade o pico da expressão da proteína no córtex visual, que ocorreu mais tardiamente, somente com 3h após o estímulo com PTZ (**figura 22**), diferindo assim de todos os picos de expressão apresentados por sagüis.





Quando comparados os resultados dos saguis em relação aos roedores, fica em evidência que nos saguis não é possível observar agrupamento das estruturas por padrões na expressão. O que ficou bastante claro na **figura 23** foi a diferença de intensidade nos picos de expressão da proteína, como por exemplo na estrutura com pico mais intenso – o córtex motor – que chegou a um aumento de 10 vezes (1000%) para os ratos. Nos saguis esse aumento foi de 50 vezes (5000%).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que, de maneira geral, nas estruturas corticais analisadas, um estímulo causado por PTZ provoca aumento na expressão da proteína c-Fos, que se inicia com 30 min e chega a seus níveis máximos em 1 a 3h. Dependendo da espécie, a expressão pode perdurar de maneira significativa até 9h após a ocorrência do estímulo. A expressão da proteína c-Fos, como indicativo de ativação neuronal, já é um método bastante conhecido na literatura, com diversos estudos que indicam variações no padrão da expressão, de acordo com o tipo de estímulo que é utilizado, como desidratação (da Silveira et al., 2007), condicionamento aversivo (Kaczmarek e Nikolajew, 1990; Savonenko, 1999), exploração tátil (Bisler et al., 2002), lesão encefálica (Schreiber et al., 1993) e esquia inibitória (Zhang et al., 2000). O que o presente estudo traz de inovador é a avaliação quantitativa da expressão em múltiplas estruturas corticais, em decorrência do mesmo estímulo, e a comparação entre diferentes espécies – ratos (caracterizando a mais numerosa ordem de mamíferos, os roedores) - e saguis (caracterizando primatas, a ordem de mamíferos onde se insere a espécie humana). O método escolhido para esta avaliação, um estímulo não-fisiológico (indução da hiperestimulação encefálica com pentilenotetrazol) foi o mais adequado ao objetivo central: comparar os padrões de expressão entre duas espécies diferentes, no maior número possível de áreas encefálicas que pudessem expressar a proteína. Por isso a escolha de um estímulo não-fisiológico, pois o PTZ, como antagonista GABAérgico, minimiza a atividade das aferências inibitórias no sistema nervoso causando ativação exacerbada, inespecífica e generalizada dos neurônios (Huang et al., 2001).

5.1 Imunoreatividade para c-Fos como marcadora de inibição tônica

A inibição tônica é um mecanismo de regulação da excitabilidade neuronal através de sinapses inibitórias GABAérgicas, que são mediadas pelos receptores especializados GABA-A. Estes receptores, na maioria de suas subunidades, têm expressão largamente distribuída por todo o córtex cerebral (Lee e Maguire, 2014). O bloqueio destes receptores por antagonistas GABAérgicos (PTZ no presente caso) provoca um aumento massivo na excitabilidade neuronal, resultando em uma

expressão potente e generalizada de c-Fos. Portanto, a expressão de c-Fos na presença de antagonistas dos receptores GABA pode ser usada como um marcador da distribuição das células que estão sujeitas a inibição tônica, que é mediada pelo sistema transmissor GABAérgico (Cronin et al., 2004).

Experimentos anteriores descreveram a presença de inibição tônica mediada por receptores GABA-A em neurônios piramidais e em interneurônios neocorticais, assim como a expressão da subunidade delta destes receptores foi identificada no córtex de ratos (Salin e Prince, 1996; Pirker et al., 2000). De fato, tem sido descrito que em várias regiões encefálicas os interneurônios expressam receptores GABA-A e são regulados por inibição tônica GABAérgica (Lee e Maguire, 2014). Estudos recentes demonstram que a inibição tônica GABAérgica nos interneurônios atua de maneira crítica na formação de oscilações gama, sugerindo um papel importante desse mecanismo inibitório na atividade da rede neuronal (Bartos et al., 2007; Mann e Mody, 2010). Estão bem documentados na literatura os diversos processos encefálicos e estados cognitivos a que estão associadas estas sincronizações rítmicas da atividade neuronal - as oscilações gama (30 - 90 Hz) - como, por exemplo, o armazenamento e recuperação da memória (Lisman e Idiart, 1995; Lisman, 1999), coordenação da atividade de redes hipocampais (Montgomery e Buzsáki, 2007), comportamento exploratório (Bragin et al. 1995), codificação sensorial (Singer, 1993), coordenação sensorio-motora (Engel et al., 2001) e até mesmo consciência (Llinas et al., 1998; Sauve, 1999). É importante ressaltar que, a conectividade entre interneurônios e neurônios principais, assim como a atividade neuronal regular e sincronizada, são fundamentais para a formação destas oscilações (Bartos et al., 2007; Lee e Maguire, 2014). Ainda nesta linha, se considerada a vasta rede de comunicação neuronal, onde interneurônios comunicam-se entre si e também com o extenso número de neurônios principais, a complexidade computacional aumenta significativamente (Lee e Maguire, 2014).

Considerando os dados observados no presente trabalho, que demonstram maior densidade de células ativadas (expressando c-Fos) para saguis em relação aos roedores, pode-se sugerir que estas sejam neurônios e interneurônios sujeitos a inibição tônica GABAérgica – pois expressaram c-Fos na presença de antagonista destes receptores. Considerando ainda que esse mecanismo inibitório de regulação está relacionado a geração de oscilações gama (atuante em diversos processos cognitivos), podemos sugerir que os dados encontrados neste estudo – de maior

densidade de células ativadas e por mais tempo em sagüis – possam significar que haja maior complexidade computacional para esta espécie e constituir assim um mecanismo, a nível bioquímico, que contribua no entendimento da capacidade cognitiva diferenciada apresentada pelos primatas em relação as demais ordens de mamíferos. Evidentemente, há que se considerar que a maior densidade neuronal já reportada nos trabalhos de Herculano-Houzel (2006, 2007) anteriormente citados, pode ter como contrapartida a maior densidade de ativação de c-Fos. Isso, no entanto, ainda não justificaria a maior duração da expressão de c-Fos. A dissecção dos diferentes fatores contribuintes e o entendimento da contribuição individual de cada um deles na gênese de consciência e outras funções avançadas dependem de experimentos especificamente planejados para este fim e certamente se beneficiarão de modelagem computacional das redes neuronais.

5.2 Pico da expressão de c-Fos

Tanto para ratos como para saguis o pico de expressão de c-Fos deu-se com uma hora após a estimulação com PTZ. Este padrão similar de expressão provavelmente revela que os sistemas bioquímicos de controle da expressão dessa proteína (na verdade uma cadeia de sinalização) obedecem a cinéticas e padrões similares de regulação. De fato, em diferentes espécies animais a estimulação de neurônios promove um pico de expressão da proteína c-Fos cerca de 60 minutos após a estimulação (Barros et al., 2015; Bisler et al., 2002).

Por outro lado, os níveis basais de expressão de c-Fos em saguis foram consistentemente mais baixos que aqueles observados em ratos. Esta característica poderia evidentemente ser meramente decorrência de uma diferente afinidade do anticorpo ao antígeno nestas duas diferentes espécies animais. Ainda nesta linha, alguns autores ponderam que toda a análise quantitativa com base em marcação por imunohistoquímica tem de ser considerada muito mais como sugestiva do que conclusiva. Por outro lado, quando utilizada no formato em que foi no presente estudo, como uma análise comparativa a quantificação, sobretudo usando princípios da estereologia é certamente uma técnica apropriada (Taylor et al., 2010). Ainda, é importante notar que se por um lado os níveis basais de c-Fos em saguis foram sempre menores que aqueles de ratos, os picos de expressão em saguis foram de forma geral muito maiores. De fato, em saguis apenas em 2 áreas (córtices auditivo

e entorrinal) o pico representou um pequeno aumento de cerca de 200% sobre os níveis basais, ao passo que para os ratos além dos córtices auditivo e entorrinal, outras 3 áreas (portanto 5 no total) tiveram aumentos de 200% no pico de expressão. Em paralelo, o pico de expressão em saguis, considerando todas as áreas analisadas, chegou a alcançar 50 vezes (5000%!) no cortex motor, em contraste com um aumento máximo de apenas 10 vezes (1000%) no cortex motor de ratos. Em resumo, a análise da expressão relativa entre ratos e saguis e ao longo do tempo permite sugerir que ao invés de uma menor afinidade relativa do anticorpo, temos talvez um sistema de controle (de expressão de c-Fos) com diferentes níveis de regulação. Assim, propomos de forma especulativa que os níveis basais de c-Fos são mantidos mais baixos em saguis por um sistema de controle mais fortemente regulado. Evidências de regulação diferencial da expressão de proteínas em diferentes espécies animais podem ser encontradas em diversos trabalhos (Garfield e Wray, 2010; Morel e Massoulié, 2000; Schwanhausser et al., 2011). Esse maior controle da expressão de c-Fos por outro lado estaria associado a uma maior intensidade relativa da resposta a estímulos ambientais (PTZ no presente caso). Sendo o c-Fos um marcador de novidade, a adaptação a essa novidade seria favorecida em saguis comparativamente a ratos. Assim, teríamos em um nível bioquímico um mecanismo que poderia ter contribuído para o maior sucesso evolutivo dos primatas comparativamente aos roedores. Ainda que altamente especulativa, essa hipótese pode ser investigada.

5.3 Duração da expressão de c-Fos

Conforme já indicado em trabalhos anteriores de nosso grupo (Barros et al., 2015), a expressão de c-Fos foi consistentemente mais prolongada em saguis que em ratos. De fato, em ratos, observamos que, seis horas após o estímulo temos somente um córtex ativado (córtex motor), enquanto que em saguis, no mesmo tempo, ainda estavam ativados três córtices (córtex auditivo, perirrinal e somatossensorial) sendo que os dois últimos ainda permaneceram ativos até as 9h pós estímulo com PTZ. Se a comparação é feita por estrutura, poderemos encontrar córtices em saguis que retornaram aos níveis basais em 3, 6 e até 10h depois do retorno dos ratos (ver respectivamente córtex auditivo, somatossensorial e perirrinal). Barros e colaboradores (2015), que obtiveram achados consistentes com

o presente estudo postularam que um maior número de áreas encefálicas ativadas por tempo mais prolongado em primatas pode talvez indicar uma maior capacidade de integração de informações no sistema nervoso central, pois se acredita que quanto maior o número de áreas envolvidas ou quanto maior o tempo de associação entre as informações codificadas por estas áreas, os animais possam apresentar respostas mais complexas e refinadas. Com a expansão das áreas estudadas, o presente estudo demonstra que esta é uma hipótese promissora e que merece ser mais largamente investigada, visto que com a ampliação do número de áreas estudadas houve aumento, para os primatas, do número de áreas que estavam ativadas e o tempo de ativação destas e, portanto, de acordo com a hipótese postulada, seriam mais áreas que estariam envolvidas na associação e integração de informações no sistema nervoso central, resultando no comportamento mais complexo apresentado pelos primatas em relação aos roedores.

5.4 Padrão de expressão de c-Fos: comparação entre ratos e saguis

A análise comparativa das figuras 14 e 23 revela interessantes padrões. Na figura 13, em ratos, vemos que em 5 das 8 áreas encefálicas avaliadas, o momento de expressão máxima após a estimulação, a duração máxima da expressão aumentada, o retorno aos níveis basais, bem como a intensidade máxima alcançada em cada um desses tempos experimentais foi semelhante (córtices auditivo, entorrinal, perirrinal, somatossensorial e visual). Em contrapartida, em saguis verificamos que o grau de superposição de curvas foi muito menor (somente 2 áreas dentre as 8 analisadas apresentaram padrões semelhantes entre si; córtices entorrinal e auditivo). Reiteramos assim, a sugestão já feita anteriormente (Barros, 2014; Barros et al., 2015) de que o padrão de expressão de c-Fos em ratos é mais estereotipado, com a maioria das áreas encefálicas analisadas apresentando um padrão semelhante de expressão. Em contrapartida, esse padrão em saguis apresenta mais diversidade tanto em termos do momento de expressão máxima após a estimulação, como da duração da expressão, como da intensidade máxima de expressão. Aqui, mais uma vez de forma especulativa, propomos que em primatas as áreas encefálicas teriam uma maior especialização com diferentes padrões de respostas a estimulação, em comparação a um padrão mais estereotipado dessas respostas em roedores. Evidências de comparação entre

roedores e primatas não tem sido um objeto central de análise na literatura neurocientífica. Mesmo assim, cabe notar que Frotscher e colaboradores (1991) demonstram que apesar de uma grande identidade em diversos parâmetros as células musgosas de primatas são mais complexas que as de roedores. Mesmo considerando de forma restrita apenas os primatas, há solidas evidências da abundância de um tipo neuronal específico, o neurônio fusiforme do giro do cíngulo, que é abundante em pongídeos (orangotango) e homínídeos e praticamente inexistente mesmo em outros primatas ou em outras famílias de mamíferos (Hof et al., 2000). Ainda nesta linha, conforme sugerido por Elston (2003) o próprio córtex cerebral de diferentes primatas tem importantes variações de complexidade das células piramidais. Este autor conclui que é improvável que se possa estabelecer alguma correlação absoluta entre essa variação da estrutura morfológica e a capacidade cognitiva, indicando que não necessariamente uma morfologia mais complexa resultará em mais inteligência (Elston, 2003). De fato, nossas especulações nessa discussão, resultam apenas no lançamento de hipóteses a serem exploradas. Por outro lado, nossos achados são de natureza funcional (e não apenas morfológica) e portanto se adequam mais ao lançamento de hipóteses.

5.5 Padrão de expressão de c-Fos: comparação entre áreas encefálicas

Para as áreas corticais que foram avaliadas neste trabalho, houve constatações interessantes: em relação aos roedores, por exemplo, pode-se observar que as estruturas avaliadas apresentaram um determinado padrão de expressão de acordo com as funções que estas exercem, sendo que as estruturas de função associativa (córtices cingulado, entorrinal e perirrinal) se comportam e apresentam patamares e picos de expressão em densidades celulares semelhantes entre si, assim como as regiões sensoriais (córtices somatossensorial, auditivo, visual) que apresentam entre si um padrão semelhante na expressão da proteína, com exceção ao córtex piriforme.

Enquanto que nos roedores é possível identificar estes padrões, que de certa forma estão mais estereotipados de acordo com a função, nos saguis estes padrões não são tão bem estabelecidos. A hipótese é de que em saguis a diferenciação entre cada área seja mais definida, como se cada estrutura apresentasse uma especialização maior onde fosse mais difícil agrupar em grandes categorias.

Inúmeros achados demonstram que o córtex cerebral dos primatas tem maior complexidade de áreas, tanto anatomicamente, como histologicamente, em conectividade neural e nos níveis funcionais (Herculano-Houzel et al., 2007; Collins et al., 2010; Fietz et al., 2010; Kaas, 2012; Visel et al., 2013).

Um destes estudos comparativos, por exemplo, levanta a possibilidade de que o encéfalo dos primatas possa ser distinto em composição celular ao dos roedores, já que, para encéfalos de similares tamanhos entre as espécies estudadas, houve diferença na proporção entre o número total de neurônios e o tamanho total da superfície cortical, sendo o número de neurônios/área maior para os primatas (Herculano-Houzel et al., 2007). Collins e colaboradores (2010) sugerem que a distribuição neuronal no córtex dos primatas não é uniforme, pois encontraram grande variação em densidade neuronal de estrutura para estrutura cortical, e estas ainda apresentaram variações de densidade neuronal internamente, e ainda ocorreu variação de acordo com a espécie. Embora a maior densidade neuronal tenha sido observada para o córtex visual primário (provavelmente pelo fato do sistema visual nestas espécies ter características especializadas, necessite não somente de uma grande área visual primaria, mas também de alta densidade neuronal), os córtices visual secundário, auditivo e somatossensorial também tiveram altos valores de densidade neuronal, enquanto que áreas associativas apresentaram densidade celular mais baixa (Collins et al., 2010, Kaas et al. 2012).

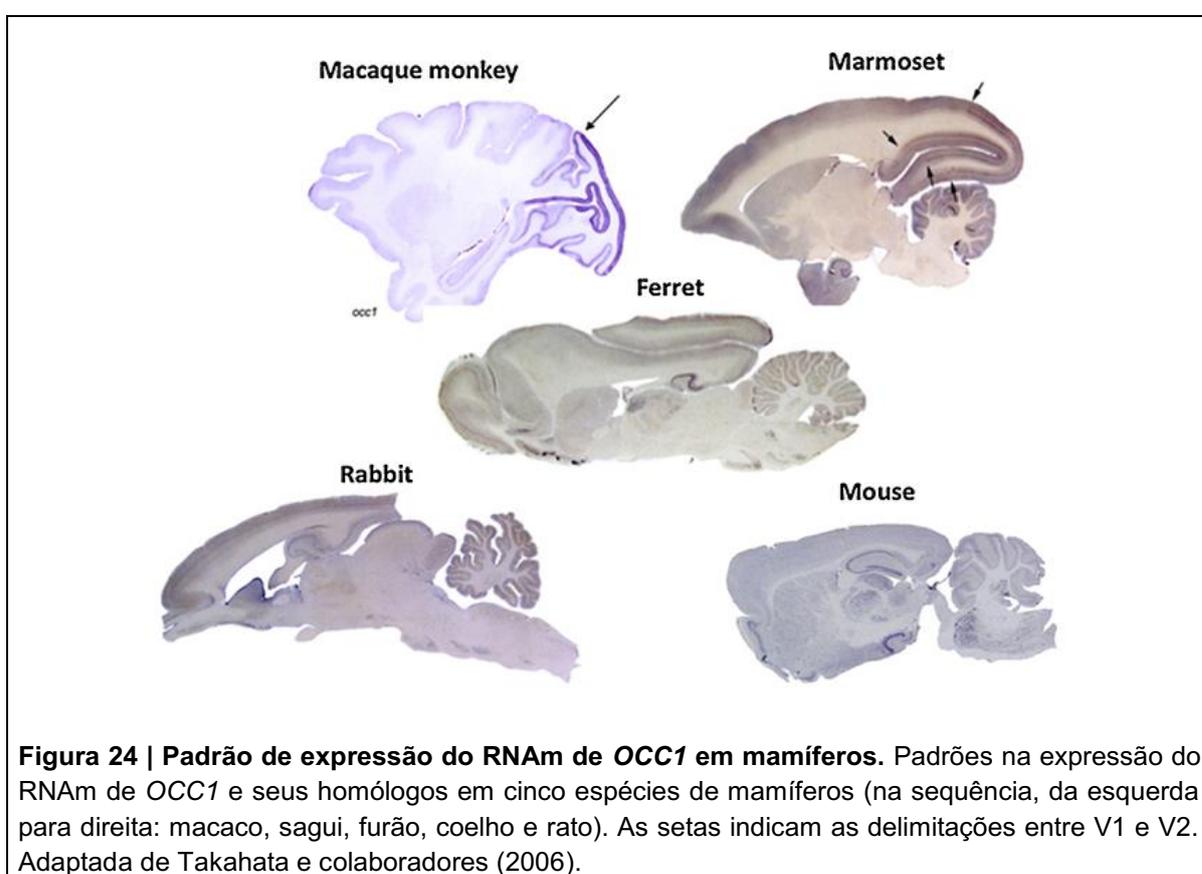
Quando comparamos as expressões corticais para os saguis no presente estudo, observamos que a área que teve maior densidade de células expressando a proteína c-Fos foi o córtex visual, seguido pelos outros córtices sensoriais, dados que demonstram coerência com o descrito na literatura. Posto que altas densidades neuronais impliquem em diminuição no tamanho médio dos neurônios (Herculano-Houzel et al., 2006) estas áreas corticais podem ter uma arquitetura celular diferenciada baseada em neurônios menores. As áreas com altas concentrações de neurônios menores são úteis em estruturas que necessitam segregar várias entradas durante o processamento de informações para melhor análise dos detalhes, enquanto que as estruturas que possuem baixa densidade celular com neurônios maiores são mais úteis em somar as entradas de informação para uma análise mais global (Collins et al., 2010, Kaas et al. 2012).

Além das diferenças de substrato anatômico descritas na literatura para as estruturas corticais, há estudos sobre a evolução e especialização do neocortex de

mamíferos que, como este, buscam avançar em nível molecular (Yamamori, 2011; Matsunaga et al., 2015). Alguns achados destes estudos podem indicar quais mecanismos que estariam relacionados à especialização das estruturas neocorticais, como o estudo de Yamamori (2011), por exemplo, que caracteriza três classes de genes em primatas que apresentam padrão de expressão neocortical área-seletivo, sendo estes os preferencialmente expressos em áreas sensoriais (principalmente no córtex visual primário), os expressos em áreas associativas e os expressos em áreas motoras. Um dos genes que apresentam padrão de expressão seletivo para áreas sensoriais, o *occipital1 (OCC1)*, apresenta expressão altamente preferencial para o córtex visual primário, e expressão moderada para as outras áreas sensoriais primárias (Tochitani et al., 2001). Esse padrão de expressão seletivo, apesar de ter sido estudado também em roedores, foi observado somente em primatas (Takahata et al., 2006; **figura 24**). Nos primatas, este gene é expresso em neurônios excitatórios, assim como é expresso em abundância em camadas neuronais que recebem *inputs* do tálamo. Nos roedores, mesmo nas áreas que recebem fortes *inputs* talamocorticais (p. ex. *barrel field*), a expressão neocortical área-seletiva não foi observada (Wong-Riley e Welt, 1980; Levitt et al., 1995). O padrão de expressão área-seletivo preferencial ao córtex visual primário também foi observado para os genes *Testican 1* e *2*, que codificam glicoproteínas que fazem parte da matriz extracelular, e para os receptores de serotonina *5HT1-B* e *5HT2-A*, sugerindo, devido aos altos níveis de expressão destes dois subtipos de receptores, que este sistema funcione especificamente na visão (Watakabe et al., 2009; Yamamori, 2011).

A segunda classe de genes são os que apresentaram padrão de expressão neocortical seletivo para áreas associativas, dentre estes o *RBP* (gene da proteína de ligação ao retinol) e o *SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine gene)*. Ambos, *RBP* e *SPARC* têm expressão abundante nas áreas associativas sensoriais e frontais. Apesar do significado funcional do *RBP* não estar bem elucidado, sabe-se que este é um precursor para a formação do ácido retinóico, que atua na morfogênese e diferenciação de inúmeros tecidos, incluindo os do sistema nervoso central, como por exemplo, na segmentação do rombencéfalo (Gavalas, 2002; Wagner et al., 2002; Galter et al., 2003). A *SPARC*, proteína associada à matriz, que pode causar alterações no formato da célula e afetar a síntese da matriz extracelular, parece ter papéis funcionais importantes, na modulação de certos

mecanismos de reparo do sistema nervoso central, na superfície de células gliais, e em neurônios excitatórios e inibitórios nas áreas associativas pré-frontais e sensoriais do córtex de primatas (Au et al., 2007; Yamamori, 2011). Frente às características descritas para estes genes com padrão de expressão preferencial nas áreas associativas, Yamamori (2011) levanta a hipótese de que estes podem estar relacionados à promoção de mudanças morfológicas nos neurônios onde são expressos e transportados, como a ramificação dendrítica e axonal, a formação de giros e possivelmente a plasticidade sináptica.



A terceira classe de genes é composta pelos que apresentaram padrão de expressão neocortical seletivo para as áreas motoras. Em um estudo realizado por Sato (2007), observou-se que, para os 476 genes estudados que apresentaram padrão de expressão diferencial entre as áreas analisadas (área pré-motora, córtex motor primário e córtex pré-frontal de primatas), mais da metade destes genes apresentaram expressão abundante no córtex motor primário. Destes, o gene fosfoproteína secretada1 (*SPP1*) foi um dos que apresentou maiores valores de expressão. Com base nestes dados, Higo e colaboradores (2010) caracterizaram a

expressão deste gene no encéfalo de macacos rhesus, saguis e ratos. Demonstrou-se para os macacos rhesus que a expressão do RNAm da *SPP1* foi específica em neurônios piramidais da camada V do córtex sensório-motor, sendo abundante no córtex motor primário, seguido pela área 5 de Brodmann e a área motora suplementar, e ainda em regiões do tálamo, tronco encefálico e medula espinhal. Embora tenha sido observada no tronco encefálico e na medula espinhal dos ratos e saguis, não houve expressão da *SPP1* para estas espécies no córtex cerebral. A expressão seletiva da *SPP1* nos neurônios corticoespinhais do macaco rhesus sugere que esta pode ter um papel importante na especialização dos sistemas corticoespinhais de algumas espécies de primatas, sistemas estes que estão relacionados ao controle motor fino (Higo et. al., 2010; Yamamori, 2011).

Estas constatações nos guiam ao objetivo central deste trabalho: buscar estabelecer diferenças funcionais e bioquímicas que poderiam contribuir para delinear os mecanismos relacionados à evolução e especialização do encéfalo dos primatas. Os trabalhos acima encontram grande consistência com o nosso próprio trabalho, já que aqui também encontramos padrões específicos para áreas sensoriais, motoras e associativas no que diz respeito à expressão de c-Fos nestas espécies. Dado o fato de que a expressão da proteína c-Fos é um indicador de atividade neuronal, os resultados presentes neste estudo fornecem evidências de que o encéfalo dos saguis, se comparado ao dos ratos, além de apresentar mecanismos mais complexos na ativação neuronal, apresenta também diferenças morfológicas e bioquímicas em estruturas com maior nível de especialização, que podem contribuir no entendimento do grande poder computacional e de habilidades cognitivas apresentada por estas espécies em relação às demais ordens.

O presente trabalho evidencia assim diferenças funcionais (medidas pela expressão de c-Fos) entre ratos e saguis, que possivelmente são decorrência das diferenças no substrato anatômico já descritas anteriormente (Herculano-Houzel et al., 2007; Collins et al., 2010; Kaas, 2012; Visel et al., 2013).

5.6 Limitações do presente estudo

Verificou-se no momento da avaliação qualitativa que as estruturas com localização mais internas aos cortes apresentavam pouca ou nenhuma marcação de c-Fos, independente do grupo ao qual pertencesse, ou ainda, apresentavam

discrepâncias de coloração, por vezes um animal tendo uma forte marcação da expressão e outro animal do mesmo grupo não apresentando marcação.

Estas observações da análise qualitativa demonstraram que somente as estruturas corticais estavam aptas para avaliação estereológica, pois as demais áreas não corticais poderiam gerar resultados não confiáveis e, portanto, estas estruturas não foram contabilizadas, tornando este um trabalho de análise somente das estruturas corticais. De acordo com as normas éticas no uso de animais e visando a utilização do menor número possível destes, a maior parte do material biológico utilizado neste trabalho foi proveniente de um estudo realizado em nossos laboratórios (Barros et al., 2015), onde os animais, após passarem pelo mesmo procedimento da hiperestimulação com o PTZ, eram eutanasiados e os encéfalos imediatamente coletados, sendo o hemisfério esquerdo destinado ao processamento imunohistoquímico e o hemisfério direito destinado a biologia molecular. Portanto o animal não poderia passar pelo procedimento de perfusão, pois inutilizaria o tecido encefálico para a biologia molecular. O fato de que somente as áreas corticais tiveram marcação efetiva, enquanto as áreas internas apresentaram marcações duvidosas permitiu postular a hipótese de que o principal causador nesta variação da marcação da proteína poderia ser a não realização da fixação do tecido, através do procedimento de perfusão, já que a fixação dos tecidos na perfusão ocorre via fluxo sanguíneo, permitindo que o fixador se espalhe efetivamente por todo o tecido preservando perfeitamente sua morfologia. Ao não realizar a etapa de fixação do tecido, perdeu-se a garantia de prevenção de autólise e deslocamento dos constituintes celulares, da estabilização das estruturas moleculares do tecido, além da proteção do material celular dos efeitos deletérios dos procedimentos histológicos e de coloração (Ramos-Vara, 2005; Borges-Ferro, 2014).

6 CONCLUSÃO

Os resultados presentes neste estudo podem indicar que o encéfalo dos saguis, se comparado ao dos ratos, além de apresentar mecanismos mais complexos de ativação neuronal, apresenta também estruturas com maior nível de especialização, evidenciadas pelas diferenças funcionais que foram medidas pela expressão de c-Fos. Ainda que esperadas, estas diferenças funcionais não haviam até o momento sido caracterizadas.

Ainda, os dados aqui obtidos contribuem no estabelecimento de bases funcionais em um nível molecular básico – genes de expressão imediata - entre roedores e primatas. Especulamos que os achados deste trabalho possam de alguma forma colaborar para o entendimento das diferentes capacidades de processamento neuronal dentre estas ordens de mamíferos.

7 REFERENCIAS

Angel P, Allegretto EA, Okino ST, Hattori K, Boyle WJ, Hunter T, Karin M. Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature*. 1988 Mar 10;332(6160):166-71.

Anokhin KV1, Riabinin AE, Sudakov KV. The expression of the c-fos gene in the brain of mice in the dynamic acquisition of defensive behavioral habits. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*. 2000 Jan-Feb;50(1):88-94.

Asin KE, Wirtshafter D, Nikkel A. Amphetamine induces Fos-like immunoreactivity in the striatum of primates. *Brain Res*. 1996 May 6;719(1-2):138-42.

Au E, Richter MW, Vincent AJ, Tetzlaff W, Aebersold R, Sage EH, Roskams AJ. SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J Neurosci*. 2007 4;27(27):7208-21.

Barros VN, Mundim M, Galindo LT, Bittencourt S, Porcionatto M, Mello LE. The pattern of c-Fos expression and its refractory period in the brain of rats and monkeys. *Front. Cell. Neurosci*. 2015 9:72

Barros, VN. O mapeamento do padrão de expressão de c-Fos e definição de seu período refratário no cérebro de ratos e macacos (*Callithrix jacchus*) após estimulação com pentilenotetrazol (PTZ) [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo: 2014

Bartos M, Vida I, Jonas P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007 8:45–56

Bisler S, Schleicher A, Gass P, Stehe J, Zilles K, Staiger J. Expression of c-Fos, ICER, Krox-24 and JunB in the whisker-to-barrel pathway of rats: time course of induction upon whisker stimulation by tactile exploration of an enriched environment. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2002 23:187–198

Borges-Ferro A. Imunohistoquímica. Lisboa, Portugal: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL) 2016. 143p.

Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*. 1994 Oct 7;79(1):59-68.

Boyke J, Driemeyer J, Gaser C, Büchel C, May A. Training-induced brain structure changes in the elderly. *J Neurosci*. 2008 28:7031–7035.

Bragin A, Jandó G, Nádasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G. Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci*. 1995 Jan;15(1 Pt 1):47-60.

Brito VB, Folmer V, Puntel GO, Fachinetto R, Soares JC, Zeni G, Nogueira CW, Rocha JB. Diphenyl diselenide and 2,3-dimercaptopropanol increase the PTZ-induced chemical seizure and mortality in mice. *Brain Res Bull*. 2006 Feb 15;68(6):414-8.

Cammarota M, Bevilaqua LR, Ardenghi P, Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I, Medina JH. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000 76:36–46

Carretta D, Herve-Minvielle A, Bajo VM, Villa AE, Rouiller EM. Preferential induction of fos-like immunoreactivity in granule cells of the cochlear nucleus by acoustic stimulation in behaving rats. *Neurosci Lett*. 1999 259:123–126.

Chaudhuri A, Zangenehpour S, Rahbar-Dehgan F, Ye F. Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiologiae Experimentales* 2000 60:403–410

Cohen S, Greenberg ME. Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2008 24, 183–209

Collins CE, Airey DC, Young NA, Leitch DB, Kaas JH. Neurondensities vary across and within cortical areas in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 107:15927–15932.

Cronin JN, Bradbury EJ, Lidierth M. Laminar distribution of GABAA- and glycine-receptor mediated tonic inhibition in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord: effects of picrotoxin and strychnine on expression of Fos-like immunoreactivity. *Pain*. 2004 Nov;112(1-2):156-63.

Cruz FC, Koya E, Guez-Barber DH, Bossert JM, Lupica CR, Shaham Y, Hope BT. New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Nov;14(11):743-54.

Curran T, Morgan JI. Memories of Fos. *BioEssays* 1987 7:255-258

Da Silveira L, Junta C, Monesi N, Oliveira-Pelegrin G, Passos G, Rocha M. Time Course of c-fos, vasopressin and oxytocin mRNA Expression in the Hypothalamus Following Long-Term Dehydration. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2007 27:575-584

Del-Bel EA, Titze-de-Almeida R, Shida H, Garcia-Cairasco N, Corrêa FM, Guimarães FS. Induction of the c-fos proto-oncogene in the rat pineal gland during stress. *Braz J Med Biol Res.* 1993 Sep;26(9):975-81.

Deisseroth K, Mermelstein PG, Xia H, Tsien RW. Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2003 13, 354–365

Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci.* 2010 11:339–350.

Draganski B, Gaser C, Busch V, Schuierer G, Bogdahn U, May A. Changes in grey matter induced by training Newly honed juggling skills show up as a transient feature on a brain-imaging scan. *Nature* 2004 427:311–312.

Dragunow M, Robertson HA. Brain injury induces c-fos protein(s) in nerve and glial-like cells in adult mammalian brain. *Brain Res.* 1988 Jul 12;455(2):295-9.

Dragunow, M.; Robertson, HA. Generalized seizures induce c-fos protein(s) in mammalian neurons. *Neuroscience Letters* 1987 82:157-161

Driemeyer J, Boyke J, Gaser C, Bu C, May A. Changes in Gray matter induced by learning—revisited. *PLoS One* 2008 3:1–5.

Elston GN. Cortex, Cognition and the Cell: New Insights into the Pyramidal Neuron and Prefrontal Function. *Cerebral Cortex* 2003 13:1124–1138

Engel AK, Fries P, Singer W. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Oct;2(10):704-16.

Fietz SA, Kelava I, Vogt J, Wilsch-Bräuninger M, Stenzel D, Fish JL, Corbeil D, Riehn A, Distler W, Nitsch R, Huttner WB. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat Neurosci.* 2010 13(6):690-9.

Frotscher M, Seress L, Schwerdtfeger WK, Buhl E. The mossy cells of the fascia dentata: a comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates. *J Comp Neurol.* 1991 1;312(1):145-63.

Galter D, Carmine A, Buervenich S, Duester G, Olson I. Distribution of Class I, III and IV alcohol dehydrogenase mRNAs in the adult rat, mouse and human brain. *Eur. J. Biochem.* 2003 270:1316–1326.

Garfield DA, Wray GA. The Evolution of Gene Regulatory Interactions. *BioScience* 2010 60: 15–23

Gavalas A. Arranging the hindbrain. *Trends Neurosci.* 2002 25:61–64.

Greig LC, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H, Macklis JD. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci*. 2013 14:755–769.

Gundersen HJ, Jensen EB, Kiêu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. *J Microsc*. 1999 Mar;193(Pt 3):199-211.

Hardingham GE, Arnold FJ, Bading H. Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nature Neurosci*. 2001 4:261–267

Hardman CD, Ashwell KWS. *Stereotaxic And Chemoarchitectural Atlas of the Common Marmoset (Callithrix jacchus)*. Boca Raton: CRC Press; 2012. 515 p.

Harris JA. Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: Their role in the animals defensive system. *J Physiol* 1996 90:15-25

Herculano-Houzel S, Mota B, Lent R. Cellular scaling rules for rodent brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 8;103(32):12138-43

Herculano-Houzel S, Collins CE, Wong P, Kaas JH. Cellular scaling rules for primate brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 104:3562-67.

Herrera D, Robertson H. Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology* 1996 50:83-107

Heurteaux C, Messier C, Destrade C, Lazdunski M. Memory processing and apamin induce immediate early gene expression in mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1993 18:17–22.

Higo N, Sato A, Yamamoto T, Nishimura Y, Oishi T, Murata Y, Onoe H, Yoshino-Saito K, Tsuboi F, Takahashi M, Isa T, Kojima T. SPP1 is selectively expressed in corticospinal neurons of the macaque sensorimotor cortex. *J. Comp. Neurol*. 2010 518:2633–2644

Hof PR, Glezer II, Nimchinsky EA, Erwin JM. Neurochemical and cellular specializations in the mammalian neocortex reflect phylogenetic relationships: evidence from primates, cetaceans, and artiodactyls. *Brain Behav Evol*. 2000 55(6):300-10.

Holmes GL, Sarkisian M, Ben-Ari Y, Chevassus-Au-Louis N. Mossy fiber sprouting after recurrent seizures during early development in rats. *J Comp Neurol*. 1999 404: 537–553.

Huang LT, Yang SN, Liou CW, Hung PL, Lai MC, Wang CL, Wang TJ. Pentylene-tetrazol-induced recurrent seizures in rat pups: time course on spatial learning and long-term effects. *Epilepsia* 2002. 43: 567–573.

Huang R, Bell-Horner LC, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH. Pentylentetrazole-Induced Inhibition of Recombinant Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors: Mechanism and Site of Action. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001 298:986-95.

Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987 328:632-634

Jenks KR, Lucas MM, Duffy BA, Robbins AA, Gimi B, Barry JM, Scott RC Enrichment and training improve cognition in rats with cortical malformations. *PLoS One* 2013 8:e84492.

Jonas P, Buzsaki G. Neural inhibition. *Scholarpedia*. 2007 2(9):3286.

Kaas JH. The evolution of neocortex in primates. *Prog Brain Res* 2012 195:91-102.

Kaczmarek L, Nikolajew E. C-fos protooncogene expression and neuronal plasticity. *Acta Neurobiol Exp* 1990 50:173–179.

Kaczmarek L. c-Fos in learning: beyond the mapping of neuronal activity. In: Kaczmarek L, Robertson HA. *Handbook of Chemical Neuroanatomy: Immediate Early Genes and Inducible Transcription Factors in Mapping of the Central Nervous System Function and Dysfunction*. Elsevier Science 2002 19:189-215.

Kazi J, Mori S, Kuchiiwa S, Nakagawa S. Prolonged Expression of c-Fos Protein in the Lateral Habenular Nucleus of the Japanese Monkey (*Macaca fuscata*) after Eye Enucleation. *Neurosignals* 2004 13:130–133

Kóvacs JK. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International* 1998 22:176-186

Kozian DH, Kirschbaum BJ. Comparative gene-expression analysis. *Trends Biotechnol.* 1999 Feb;17(2):73-8.

Lee V, Maguire J. The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type. *Front Neural Circuits*. 2014 Feb 3;8:3.

Levitt JB, Yoshioka T, Lund JS. Connections between the pulvinar complex and cytochrome oxidase-defined compartments in visual area V2 of macaque monkey. *Exp. Brain Res.* 1995 104:419–430

Lima, RRM. Caracterização do núcleo pré-geniculado do sagui (*Callithrix jacchus*): Projeções retinianas, neuroquímica e atividade celular (expressão de FOS) [dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte: 2008.

Lisman J, Buzsáki G. A neural coding scheme formed by the combined function of gamma and theta oscillations. *Schizophr. Bull.* 2008 34, 974–980.

Lisman JE, Idiart MA. Storage of 7 ± 2 short-term memories in oscillatory subcycles. *Science* 1995 267, 1512–1515.

Llinas R, Ribary U, Contreras D, Pedroarena C. The neuronal basis for consciousness. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1998 353, 1841–1849.

Mann EO, Mody I. Control of hippocampal gamma oscillation frequency by tonic inhibition and excitation of interneurons. *Nat Neurosci.* 2010 Feb; 13(2): 205–212.

Matsunaga E, Nambu S, Oka M, Iriki A. Comparative analysis of developmentally regulated expressions of *Gadd45a*, *Gadd45b*, and *Gadd45g* in the mouse and marmoset cerebral cortex. *Neuroscience* 284 (2015) 566–580

Malhi S, Jawed H, Hanif F, Ashraf N, Zubair F, Siddique B, Begum S, Kabir N, Simjee S. Modulation of c-Fos and BDNF Protein Expression in Pentylentetrazole-Kindled Mice following the Treatment with Novel Antiepileptic Compound HHL-6. *BioMed Research International* 2014:1-9

Mello, LEAM, Khoman CM, Tan AM, Cavalheiro EA, Finch DM. Lack of Fos-like immunoreactivity after spontaneous seizures or reinduction of status epilepticus by pilocarpine in rats. *Neuroscience Letters* 1996 208: 133-137

Montgomery SM, Buzsáki G. Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 Sep 4;104(36):14495-500.

Morgan J, Cohen D, Hempsted J, Curran T. Mapping Patterns of c-fos Expression in the Central Nervous System After Seizure. *Science* 1987 237: 192-197

Morel N, Massoulié J. Comparative Expression of Homologous Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 2000 275:7304 –7312

Paxinos G, Watson C. Paxinos and Watson *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinate.*, 7th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2014. 472 p.

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience.* 2000 101(4):815-50.

Prado PTC, Del Bel EA. c-fos, um gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção. *Medicina Ribeirão Preto* 1998 31:424-433

Prescott SL, Srinivasan R, Marchetto MC, Grishina I, Narvaiza I, Selleri L, Gage FH, Swigut T, Wysocka J. Enhancer divergence and cis-regulatory evolution in the human and chimp neural crest. *Cell*. 2015 Sep 24;163(1):68-83

Quallo MM, Price CJ, Ueno K, Asamizuya T, Cheng K, Lemon RN, Iriki A. Gray and white matter changes associated with tool use learning in macaque monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 106:18379–18384.

Racine RJ. Electroencephalogram. *Clinical Neurophysiology* 1972 32:281-294

Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005 42:405–426.

Rakic P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci* 2009 10:724–735.

Ryzeck P, Bravo R. c-jun, Jun B and JunD differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effects of Fos proteins. *Oncogene* 1991 6: 533-542

Salin PA, Prince DA. Spontaneous GABAA receptor-mediated inhibitory currents in adult rat somatosensory cortex. *J. Neurophysiol.* 1996 75, 1573–1588.

Salle GLG. Long-lasting and sequential increase of c-fos oncoprotein expression in kainic acid-induced status epilepticus. *Neuroscience Letter* 1988 88:127-130

Sato A, Nishimura Y, Oishi T, Higo N, Murata Y, Onoe H, Saito K, Tsuboi F, Takahashi M, Isa T, Kojima T. Differentially expressed genes among motor and prefrontal areas of macaque neocortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007 362:665–669

Sauve K. Gamma-band synchronous oscillations: Recent evidence regarding their functional significance. *Consciousness and Cognition* 1999 8:213-224.

Savonenko A, Filipkowski RK, Werka T, Zielinski K, Kaczmarek L. Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. *Neuroscience* 1999 94:723–733.

Schaden H, Stuermer CA, Bahr M. GAP-43 immunoreactivity and axon regeneration in retinal ganglion cells of the rat. *J Neurobiol.* 1994 25:1570–1578.

Schreiber SS, Najm I, Tocco G, Baudry M. Co-expression of HSP72 and c-Fos in rat brain following kainic acid treatment. *Neuroreport* 5, 1993 269--272.

Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2011 19; 473(7347):337-42

Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. 1990 Apr;4(4):477-85.

Simler S, Hirsch E, Danober L, Motte J, Virgnes M, Marescaux C. c-fos expression after single and kindled audiogenic seizures in Wistar rats. *Neuroscience Letters* 1994 175:58- 52

Singer W. Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. *Annu Rev Physiol*. 1993 55:349–374

Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ, Miao GG, Schilling K, Robertson LM, Curran T, Morgan JI. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature*. 1993 May 13;363(6425):166-9.

Svenningsson P, Gunne L, Andren PE. (L)-DOPA produces strong induction of c-fos messenger RNA in dopamine -denervated cortical and striatal areas of the common marmoset. *Neuroscience* 2000 99:457-468

Syndler J, Maciejak P, Turszinska D, Sobolewska A, Taracha E, Skorzewska A, Lehner M, Bidzinski A, Hamed A, Wislowska-stanek A, Krzascik P, Plasnik A. Mapping of c-Fos expression in the rat brain during the evolution of pentylenetetrazol-kindled seizures. *Epilepsy & Behavior* 2009 16:216–224.

Takahata T, Komatsu Y, Watakabe A, Hashikawa T, Tochitani S, Yamamori T. Activity-dependent expression of *OCC1* in excitatory neurons is a characteristic feature of the primate visual cortex. *Cereb. Cortex* 2006 16: 929–940.

Taylor CR, Shi SR, Barr NJ. Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls, and Standardization. In: Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2010. p 1-36

Thomas GM, Huganir RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature Rev. Neurosci*. 5, 173–183 2004

Titze-de-Almeida R, de Oliveira CL, Shida HW, Guimarães FS, Del Bel EA. Midazolam and the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid (AP-7) attenuate stress-induced expression of c-fos mRNA in the dentate gyrus. *Cell Mol Neurobiol*. 1994 Aug;14(4):373-80.

Tochitani S, Liang F, Watakabe A, Hashikawa T, Yamamori T. The *OCC1* gene is preferentially expressed in the primary visual cortex in an activitydependent manner: a pattern of gene expression related to the cytoarchitectonic area in adult neocortex. *Eur. J. Neurosci*. 2001 13:297–307

Vann SD, Brown MW, Erichsen JT, Aggleton JP (2000): Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *JNeurosci* 20:2711–2718.

Visel A, Taher L, Girgis H, May D, Golonzhka O, Hoch RV, McKinsey GL, Pattabiraman K, Silberberg SN, Blow MJ, Hansen DV, Nord AS, Akiyama JA, Holt A, Hosseini R, Phouanavong S, Plajzer-Frick I, Shoukry M, Afzal V, Kaplan T, Kriegstein AR, Rubin EM, Ovcharenko I, Pennacchio LA, Rubenstein JL. A high-resolution enhancer atlas of the developing telencephalon. *Cell* 2013 152:895–908.

Wagner E, Luo T, Dräger UC. Retinoic acid synthesis in the postnatal mouse brain marks distinct developmental stages and functional systems. *Cereb Cortex*. 2002 12(12):1244-53.

Watakabe A, Komatsu Y, Sadakane O, Shimegi S, Takahata T, Higo N, Tochitani S, Hashikawa T, Naito T, Osaki H, Sakamoto H, Okamoto M, Ishikawa A, Hara S, Akasaki T, Sato H, Yamamori T. Enriched expression of serotonin 1B and 2A receptor genes in macaque visual cortex and their bidirectional modulatory effects on neuronal responses. *Cereb Cortex*. 2009 19(8):1915-28.

Wollnick F, Brysch W, Uhlmann E, Gillardon F, Bravo R, Zimmerman M, Schlingensiepen KH, Herdegen T. Block of c-fos and jun-b expression by antisense oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock. *Eur J Neurosci* 1995 7: 388-393

Wong-Riley MT, Welt C. Histochemical changes in cytochrome oxidase of cortical barrels after vibrissal removal in neonatal and adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980 77:2333–2337

Wray GA. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nature Reviews Genetics* 2007 8:206–216.

Yamamori T. Selective gene expression in regions of primate neocortex: implications for cortical specialization. *Progress in Neurobiology* 2011 94:201–222.

Zhang Y, Ji Y, Mei J. Behavioral training-induced c-Fos expression in the rat nucleus basalis of Meynert during aging. *Brain Res* 2000 879:156–162.

Zhao Q, Holmes GI. Repetitive Seizures in the Immature Brain. In: *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier Academic Press 2006 27:341–350

Zhu XO, Brown MW, McCabe BJ, Aggleton JP. Effects of the novelty or familiarity of visual stimuli on the expression of the immediate early gene c-fos in rat brain. *Neuroscience* 1995 69:821–829.

Zhu XO, McCabe BJ, Aggleton JP, Brown MW. Differential activation of the rat hippocampus and perirhinal cortex by novel visual stimuli and a novel environment. *Neurosci Lett* 1997 229:141–143.

Zimmerman M, Hedergren T. Control of gene transcription by Jun and Fos protein in the nervous system. *APS journal* 1994 3:33-48

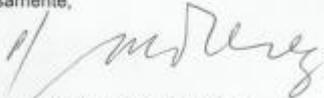
Anexos

Anexo A. Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (decorrente do trabalho de Barros, 2014).

Página 1.

 <p>UNIFESP UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO</p>	<p>Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina</p>	<p>Comitê de Ética em Pesquisa Hospital São Paulo</p>
<p>São Paulo, 6 de junho de 2012 CEP Nº: 0175/12</p>		
<p>Ilmo(a) Sr(a) Pesquisador(a): VANESSA NOVAES BARROS Disciplina/Departamento: neurologia/neurociência Pesquisadores associados: Simone Bittencourt, Luiz Eugênio Araujo de Moraes Mello (orientador)</p>		
<p>Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo</p>		
<p>TÍTULO DO ESTUDO: O Mapeamento da expressão de c-fos e definição de seu período refratário no cérebro de saguis (<i>Callithrix jacchus</i>) após estimulação com pentilenotetrazol (PTZ) :</p>		
<p>CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo agudo</p>		
<p>RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica</p>		
<p>OBJETIVO DO ESTUDO: - Investigar o padrão de expressão de c-fos no cérebro de ratos e macacos - Comparar o padrão de expressão de c-fos no cérebro de macacos com cérebro de ratos - Delimitar o período refratário da expressão de c-fos em macacos e ratos</p>		
<p>RESUMO: Estudo com 49 ratos Wistar, e 49 saguis <i>Callithrix jacchus</i>, de ambos os gêneros. Anestesia: quetamina. Analgesia: xilazina. Eutanásia: decapitação. Os animais serão divididos em 7 grupos conforme o tempo após a administração de PTZ: • Grupo 1: ratos e macacos que serão sacrificados com 30 minutos à partir da crise com PTZ • Grupo 2: ratos e macacos que serão sacrificados com 1 hora à partir da crise com PTZ • Grupo 3: ratos e macacos que serão sacrificados com 3 horas à partir da crise com PTZ • Grupo 4: ratos e macacos que serão sacrificados com 6 horas à partir da crise com PTZ • Grupo 5: ratos e macacos que serão sacrificados com 12 horas à partir da crise com PTZ • Grupo 6: ratos e macacos que serão sacrificados com 24 horas à partir da crise com PTZ • Grupo 7: ratos e macacos que serão sacrificados com 48 horas à partir da crise com PTZ • Grupo 8: grupo controle. Ratos e macacos sacrificados 30min, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h após administração de salina. Serão divididos 6 macacos e 6 ratos para cada um dos grupos, totalizando uma amostra de 49 ratos e 49 macacos. Em um segundo bloco de experimentos, faremos uma análise do período refratário, ou seja, o período no qual a administração da segunda dose de PTZ não causa alta expressão do gene. O intervalo entre a primeira dose e a segunda dose serão definidos conforme resultado do primeiro experimento, serão elencados intervalos aonde os níveis de c-fos começam a decrescer e no ponto em que os níveis de c-fos encontram-se em valores basais. Afim de evitar expressão de c-fos inespecífica, os animais serão submetidos durante 20 dias a injeções diárias de solução salina afim de provocar uma dessensibilização/habituação dos animais. No 24º dia, (após 3 dias sem manipulações) os animais receberão PTZ (40mg/kg) ou salina intraperitonealmente e serão sacrificados nos intervalos do grupo a que pertencem. A contabilização dos intervalos terá início no momento que o animal iniciar a crise. Imediatamente após o aprofundamento do estado de anestesia dos animais terá início o processo de remoção do cérebro visando separar um hemisfério cerebral para uso em Western Blot e um hemisfério cerebral para uso no processamento imunohistoquímico.</p>		
<p>FUNDAMENTOS E RACIONAL: Quando um neurônio é ativado de forma intensa desencadeia-se síntese de proteínas específicas que demandam ativação de genes de expressão imediata, dentre eles o mais conhecido é o c-fos. Este gene está relacionado à ativação neuronal e é expresso em situações onde o animal é exposto a situações novas. Inúmeros trabalhos com camundongos e ratos evidenciaram expressão de c-fos em diversas regiões do sistema nervoso central como, giro denteado, CA1, CA2, CA3, tálamo, córtex piriforme, giro do cíngulo, amígdala, córtex visual, bulbo olfatório, nervos cranianos, cerebelo, striatum dentre outras estruturas encefálicas quando o animal é exposto a uma ampla gama de estímulos (estresse hídrico, medo, odores, injeção intraparenquimatosa de substâncias diversas, etc).</p>		
<p>MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo</p>		
<p>TCLE: Não se aplica</p>		
<p>DETALHAMENTO FINANCEIRO: CNPq - R\$ 48318,80</p>		
<p>CRONOGRAMA DO ESTUDO: 24 meses</p>		
<p>PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 1/6/2013 e 27/5/2014</p>		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.</p>		
<p>1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.</p>		
<p>2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.</p>		
<p>3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.</p>		
<p>Página 1 de 2</p>	<p>Rua Botucatu, 572 - 1º andar - CEP 04023-062 - São Paulo/Brasil</p>	<p>CEP N 0175/12</p>

Página 2.

 <p>UNIFESP UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO 1934</p>	<p>Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina</p>	<p>Comitê de Ética em Pesquisa Hospital São Paulo</p>
<p>Atenciosamente,</p>		
		
<p>Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo</p>		
<p>Página 2 de 2</p>	<p>Rua Botucatu, 572 - 1o andar - CEP 04023-062 - São Paulo/Brasil</p>	<p>CEP N 0175/12</p>

Anexo B. Autorização para Atividades com Finalidades Científicas do Ministério do Meio Ambiente (decorrente do trabalho de Barros, 2014).

Página 1.

		Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO			
Autorização para atividades com finalidade científica					
Número: 35709-1		Data da Emissão: 14/08/2012 10:03			
Dados do titular					
Nome: Vanessa Barros Novaes		CPF: 001.965.322-05			
Título do Projeto: O MAPEAMENTO DO PADRÃO DA EXPRESSÃO DE C-FOS E DEFINIÇÃO DO SEU PERÍODO REFRAATÓRIO NO CÉREBRO DE SAGUIS (<i>Calitrix jacchus</i>) APÓS ESTIMULAÇÃO COM PENTILENOTETRAZOL (PTZ)					
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP		CNPJ: 60.453.032/0001-74			
Cronograma de atividades					
#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)		
1	pesquisas	05/2012	06/2014		
Observações e ressalvas					
Equipe					
#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Luiz Eugênio Araújo Moraes Meilo	Orientador	938.054.628-91	4417777 SSP-SP	Brasileira
Locais onde as atividades de campo serão executadas					
#	Município	UF	Descrição do local	Tipo	
1	SÃO PAULO	SP	Laboratório de neurofisiologia da UNIFESP	Fora de UC Federal	
Atividades X Táxons					
#	Atividade	Táxons			
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Calitrix jacchus</i>			
Página 1/3					

Página 2.

		Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO
Autorização para atividades com finalidade científica		
Número: 35709-1		Data da Emissão: 14/08/2012 10:03
Dados do titular		
Nome: Vanessa Barros Novaes		CPF: 001.965.322-05
Título do Projeto: O MAPEAMENTO DO PADRÃO DA EXPRESSÃO DE C-FOS E DEFINIÇÃO DO SEU PERÍODO REFRACTÁRIO NO CÉREBRO DE SAGUIS (<i>Callithrix jacchus</i>) APÓS ESTIMULAÇÃO COM PENTILENOTETRAZOL (PTZ)		
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP		CNPJ: 60.453.032/0001-74
2	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	<i>Callithrix jacchus</i>
Material e métodos		
1	Amostras biológicas (Primates)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão
Destino do material biológico coletado		
#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP	criadouro científico
<p>Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).</p>		
Código de autenticação: 67993181		Página 2/3
		

Anexo C. Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



, 08 de junho de 2015
CEUA N 5474060115

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Stefani Alves Magalhães
Depto/Disc: Departamento De Psicobiologia
Prof. Dr. Luiz Eugênio Araújo Moraes Mello (orientador)

Título do projeto: "Avaliação comparativa da expressão de c-fos em ratos e saguis após estimulação com pentilenotetrazol".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

A proposta do presente estudo surgiu a partir de um importante trabalho realizado por Novaes (2014) que, ademais de mapear o padrão de expressão de Fos em três regiões cerebrais - córtex motor, córtex piriforme e giro cingulado - buscou comparar as diferenças de expressão entre espécies, por meio da utilização de saguis e ratos. Os achados encontrados no trabalho de Novaes (2014), somados ao interesse em se detalhar o padrão de expressão em um conjunto mais amplo de áreas do sistema nervoso - dada a importância do que eles representam - são os pilares para a realização deste novo estudo.

ANIMAIS

Será utilizado material biológico já coletado em projeto anterior (CEP 0175/12)

VIGÊNCIA DO ESTUDO

Início previsto para: Abr/2015 com término previsto para: Mar/2017

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 11/05/2015, **ANALISOU e APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo