**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS**

BRUNO LOPES DOS SANTOS

**Efeitos do envelhecimento sobre o sistema nitrérgico dos
núcleos da base em humanos**

**Ribeirão Preto – SP
2014**

BRUNO LOPES DOS SANTOS

**Efeitos do envelhecimento sobre o sistema nitrérgico dos
núcleos da base em humanos**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Neurociências e Ciências do Comportamento da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Neurologia Clínica

Área de Concentração: Neurologia / Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Vitor Tumas

**Ribeirão Preto – SP
2014**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

dos Santos, Bruno Lopes

Efeitos do envelhecimento sobre o sistema nitrérgico dos núcleos da base em humanos.

Ribeirão Preto, 2014.

125 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia / Neurociências.

Orientador: Tumas, Vitor.

1. Óxido nítrico, 2. Envelhecimento, 3. Núcleos da base, 4. Neuroanatomia, 5. Neurofisiologia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruno Lopes dos Santos

Efeitos do envelhecimento sobre o sistema nitrgico dos núcleos da base em humanos.

Dissertação apresentada ao Departamento de
Neurociências e Ciências do Comportamento da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Neurologia Clínica

Área de Concentração: Neurologia / Neurociências

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Vitor Tumas
Instituição: FMRP-USP
Assinatura: _____

Prof. Dr. Elaine Aparecida Del Bel
Instituição: FMRP-USP
Assinatura: _____

Prof. Dr. Francisco Eduardo Costa Cardoso
Instituição: UFMG
Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

בס"ד

Ao Altíssimo, Senhor do Universo, por ter me concedido
sabedoria, inteligência e conhecimento, para que
eu pudesse estudar os Mistérios de Sua Criação.

Dedico esta obra a minha mãe, meu pai, minha irmã
e minha tia, por toda saudade que eu lhes causei ao sair
da terra natal, no afã de me tornar um homem melhor.

Nosso sofrimento não foi em vão.

AGRADECIMENTOS

De modo póstumo, agradeço aos indivíduos que cederam parte de seus corpos materiais, para que outras pessoas possam se beneficiar destes novos conhecimentos no futuro. Agradeço também às famílias envolvidas neste processo.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Vitor Tumas, que tem ajudado enormemente desde 2007 a minha carreira de especialista em Distúrbios de Movimento, e por ter acreditado na minha competência para executar um projeto tão alienígena à prática diária de um médico neurologista.

Agradeço profundamente à Profa. Dra. Elaine Del Bel, por ter aceitado minha presença quase constante em seu laboratório, de modo irrestrito, por um longo e agradabilíssimo período. Além de tudo, agradeço por ter me criticado quando eu errei, e por ter me incentivado quando necessitei. Estes dois anos de convívio no laboratório forjaram um espírito científico mais robusto em mim, do qual serei eternamente grato.

Agradeço aos grandes amigos de Laboratório de Neurofisiologia da FORP-RP: Danielle Tavares, Fernando Padovan, Ana Carolina Issy, Célia Aparecida da Silva, João Francisco Pedrazzi, Mariza Bortolanza, Nádia Rúbia, Vitor Castania, e a todos que contribuíram de alguma forma para esta realização.

Agradeço ao Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, por ter permitido a realização deste estudo em suas dependências, assim como aos técnicos de necropsia, aos médicos residentes e professores em geral. Agradeço em particular ao Prof. Luciano Neder por bons conselhos, e de modo especial ao Prof. José

Eymard Homem Pittella, meu grande mestre nas artes microscópicas, por ter renovado minha paixão pela Neuropatologia e por me inspirar a buscar a excelência.

Agradeço ao Laboratório de Neuropatologia Experimental por ter permitido meu acesso para uso do sistema de microscopia e captação de imagens, em especial ao amigo Antônio Renato Meirelles, por toda assistência prestada.

Agradeço aos meus pais, Walcirene e Claudio, que abdicaram de partes importantes de suas vidas e de seus desejos pessoais para me proporcionar uma criação ideal. Os frutos de meu sucesso sempre serão de vocês também! Agradeço à tia Varlene e à minha irmã Brena pelo amor incondicional e apoio constante. Com relação à minha mãe, a primeira professora que tive e aquela de quem herdei o desejo de ensinar, espero que esta obra lhe seja agradável e digna de seu orgulho.

Agradeço, do fundo do coração, à minha noiva, companheira de todas as horas, melhor amiga, alma gêmea e musa inspiradora, Edienny Viana, por toda a paciência que teve comigo durante as infinitas horas de contagem de células, fins de semana processando cérebros, reações histológicas que rompiam as madrugadas e digitação de incontáveis páginas para a confecção deste manuscrito. Prometo que incluo seu nome no *paper*!

De modo geral, agradeço a todos aqueles que participaram de minha vida durante este ciclo de 6 anos morando em Ribeirão Preto, em especial aos irmãos de arte neurológica André Clériston dos Santos, Luis Henrique Castro-Afonso, Saul Schnitman, Maria Gabriela Ghilardi e Pedro Cougo-Pinto. Vocês tornaram uma missão potencialmente árdua em uma das melhores épocas da minha vida.

Obviamente, há pessoas que me esqueci de agradecer nominalmente, e a elas peço perdão. A verdade é que, neste trabalho, eu dependi muito da ajuda de várias

pessoas em áreas diferentes, e se houvesse algum problema em uma destas partes, todo o projeto estaria fadado ao fracasso. Apenas um milagre explica o sucesso.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	17
1.1 – OS NÚCLEOS DA BASE EM HUMANOS: ASPECTOS ANATÔMICOS E FUNCIONAIS....	17
1.1.1 – PRINCÍPIOS GERAIS DOS NÚCLEOS DA BASE.....	17
1.1.2 – NÚCLEO DE ENTRADA: O ESTRIADO.....	18
1.1.3 – NÚCLEOS INTRÍNSECOS.....	21
1.1.3.1 – COMPLEXO PALIDAL: GLOBO PÁLIDO EXTERNO.....	21
1.1.3.2 – NÚCLEO SUBTALÂMICO.....	23
1.1.3.3 – SUBSTÂNCIA NEGRA <i>PARS COMPACTA</i>	25
1.1.4 – NÚCLEOS DE SAÍDA: GLOBO PÁLIDO INTERNO E SUBSTÂNCIA NEGRA <i>PARS RETICULATA</i>	25
1.1.5 – NÚCLEO ACESSÓRIO: O NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO.....	26
1.1.6 – EVOLUÇÃO DA ORGANIZAÇÃO FUNCIONAL DOS NÚCLEOS DA BASE E SEUS MODELOS CANÔNICOS.....	28
1.1.7 – AS PRINCIPAIS VIAS DE COMUNICAÇÃO DOS NÚCLEOS DA BASE: VIA DIRETA, INDIRETA E HIPERDIRETA.....	30
1.2 – A BIOLOGIA DO ÓXIDO NÍTRICO.....	33
1.2.1 - SÍNTESE E AÇÃO MOLECULAR DO ÓXIDO NÍTRICO.....	33
1.2.2 - LOCALIZAÇÃO DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS NO SNC.....	36
1.2.3 - O PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NO CONTROLE MOTOR.....	37
1.2.4 - O ÓXIDO NÍTRICO E NEURODEGENERAÇÃO.....	39
1.3. PROCESSAMENTO DO TECIDO NERVOSO HUMANO PÓS-MORTE E MÉTODOS DE DETECÇÃO HISTOLÓGICA DO ÓXIDO NÍTRICO.....	41
1.3.1 – ABORDAGEM SISTEMÁTICA PARA USO PÓS-MORTE DO ENCÉFALO HUMANO.....	41
1.3.1.1 – CONDIÇÕES PRÉ-MORTE DO ENCÉFALO.....	41
1.3.1.2 – CONDIÇÕES PÓS-MORTE DO ENCÉFALO.....	43
1.3.1.3 – MANEJO DO ENCÉFALO HUMANO APÓS NECRÓPSIA.....	43
1.3.1.4 – FIXAÇÃO DO ENCÉFALO.....	44
1.3.1.5 – CRIOPROTEÇÃO E CONGELAMENTO.....	46
1.3.2 – MÉTODOS DE DETECÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO TECIDO NERVOSO: HISTOQUÍMICA PARA NADPH-DIAFORASE E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA nNOS.....	47
1.3.2.1 – HISTOQUÍMICA PARA NADPH-DIAFORASE APLICADA AO ESTUDO DO ENCÉFALO HUMANO.....	47
1.3.2.1.1 – PRINCÍPIOS DA REAÇÃO NADPH-DIAFORASE.....	47
1.3.2.1.2 – MEIO DE INCUBAÇÃO E SUBSTRATOS.....	49
1.3.2.1.3 – CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO.....	50

1.3.2.1.4 – LIMITAÇÕES E VANTAGENS DO MÉTODO.....	51
1.3.2.2 – IMUNOHISTOQUÍMICA PARA nNOS.....	52
1.4 - NEURÔNIOS NITRÉRGICOS NOS NÚCLEOS DA BASE EM HUMANOS.....	54
1.4.1 – ESTUDOS EM ENCÉFALOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS.....	54
1.4.2 – ESTUDOS EM DOENÇAS NEUROLÓGICAS E PSIQUIÁTRICAS.....	55
1.5 - NEURÔNIOS NITRÉRGICOS E O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO.....	58
1.5.1 – ASPECTOS GERAIS DO ENVELHECIMENTO NO ENCÉFALO.....	58
1.5.2 – O ENVELHECIMENTO NOS NÚCLEOS DA BASE.....	59
1.5.3 – EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE O SISTEMA NITRÉRGICO DOS NÚCLEOS DA BASE.....	61
2 – OBJETIVOS.....	63
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	63
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
3.1 - AQUISIÇÃO DOS ENCÉFALOS HUMANOS.....	64
3.2 - MODO DE COLETA DOS ENCÉFALOS.....	64
3.3 – FIXAÇÃO, CRIOPROTEÇÃO E ARMAZENAMENTO.....	66
3.4 – PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DO ENCÉFALO.....	66
3.5 – REAÇÕES HISTOLÓGICAS.....	68
3.5.1 – HISTOQUÍMICA PARA NADPH-DIAFORASE.....	68
3.5.2 – IMUNOHISTOQUÍMICA PARA nNOS, NeuN e TH.....	68
3.5.3 – COLORAÇÕES ADICIONAIS.....	69
3.6 – ANÁLISE QUANTITATIVA HISTOLÓGICA.....	69
3.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
4 – RESULTADOS.....	76
4.1 – CASUÍSTICA.....	76
4.2 - ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES PRÉ E PÓS-MORTE DO ENCÉFALO SOBRE A QUALIDADE DAS MARCAÇÕES HISTOLÓGICAS.....	78
4.3 - ANÁLISE QUALITATIVA DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS NOS NÚCLEOS DA BASE...79	79
4.3.1 – ESTRIADO.....	79
4.3.2 – GLOBO PÁLIDO.....	81
4.3.3 – NÚCLEO SUBTALÂMICO.....	82
4.3.4 – SUBSTÂNCIA NEGRA.....	84
4.3.5 – NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO.....	84
4.4 - ANÁLISE QUANTITATIVA DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS NOS NÚCLEOS DA BASE.....	86
4.4.1 – CONTAGEM DA DENSIDADE NEURONAL.....	86
4.4.1.1 – ESTRIADO.....	86

4.4.1.1.1 – ANÁLISE DA DENSIDADE NEURONAL NITRÉRGICA ENTRE NÍVEIS, SUBDIVISÕES TOPOGRÁFICAS E FUNCIONAIS E SUBSETORES DO ESTRIADO.....	86
4.4.1.1.2 – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA IDADE SOBRE A DENSIDADE NEURONAL NITRÉRGICA DO ESTRIADO.....	87
4.4.1.1.3 – COMPARAÇÃO ENTRE A DENSIDADE NEURONAL NITRÉRGICA E A DENSIDADE NEURONAL TOTAL.....	88
4.4.1.2 – NÚCLEO SUBTALÂMICO.....	89
4.4.1.2.1 – ANÁLISE DA DENSIDADE NEURONAL NITRÉRGICA ENTRE NÍVEIS E SUBDIVISÕES FUNCIONAIS DO NÚCLEO SUBTALÂMICO.....	89
4.4.1.2.2 – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA IDADE SOBRE A DENSIDADE NEURONAL NITRÉRGICA DO NÚCLEO SUBTALÂMICO.....	90
4.4.2 – ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	91
4.4.2.1 – ESTRIADO.....	91
4.4.2.1.1 – DIÂMETRO MÁXIMO DO SOMA.....	91
4.4.2.1.2 – ÁREA DO SOMA.....	91
4.4.2.1.3 – COMPRIMENTO DENDRÍTICO MÁXIMO.....	91
4.4.2.1.4 – NÚMERO DE DENDRITOS PRIMÁRIOS.....	92
4.4.2.1.5 – MORFOLOGIA DO NEURÔNIO.....	93
4.4.2.2 – NÚCLEO SUBTALÂMICO.....	93
4.4.2.2.1 – DIÂMETRO MÁXIMO DO SOMA.....	93
4.4.2.2.2 – ÁREA DO SOMA.....	93
4.4.2.2.3 – NÚMERO DE DENDRITOS PRIMÁRIOS.....	94
4.4.2.2.4 – MORFOLOGIA DO NEURÔNIO.....	94
4.4.2.3 – NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO.....	95
4.4.2.3.1 – DIÂMETRO MÁXIMO DO SOMA.....	95
4.4.2.3.2 – ÁREA DO SOMA.....	95
4.4.2.3.3 – COMPRIMENTO DENDRÍTICO MÁXIMO.....	95
4.4.2.3.4 – NÚMERO DE DENDRITOS PRIMÁRIOS.....	96
4.4.2.3.5 – MORFOLOGIA DO NEURÔNIO.....	97
5 – DISCUSSÃO.....	98
5.1 – CASUÍSTICA.....	98
5.2 - ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES PRÉ E PÓS-MORTE DO ENCÉFALO SOBRE A QUALIDADE DAS MARCAÇÕES HISTOLÓGICAS.....	98
5.3 - ANÁLISE DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO ESTRIADO – DENSIDADE NEURONAL.....	99
5.4 - ANÁLISE DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO ESTRIADO – MORFOMETRIA.....	103
5.5 - ANÁLISE DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO NÚCLEO SUBTALÂMICO – DENSIDADE NEURONAL.....	104
5.6 - ANÁLISE DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO NÚCLEO SUBTALÂMICO – MORFOMETRIA.....	106
5.7 - ANÁLISE DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO – MORFOMETRIA.....	107

5.8 - ANÁLISE QUALITATIVA DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO GLOBO PÁLIDO E DA SUBSTÂNCIA NEGRA.....	109
6 – CONCLUSÃO.....	111
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

RESUMO

dos Santos, BL. Efeitos do envelhecimento sobre o sistema nitrérgico dos núcleos da base em humanos. 2014. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa descrita recentemente, com implicações sobre uma vasta quantidade de processos fisiológicos, incluindo transmissão de sinais no sistema nervoso central (SNC). A sinalização nervosa mediada pelo NO ocorre por meios extrassinápticos, na chamada “neurotransmissão por volume”. Há evidências de que o NO seja um importante fator de modulação no controle da motricidade. A presença de neurônios que produzem NO já foi descrita em várias espécies, e estruturas ligadas ao controle do movimento como os núcleos da base (NNBB) contêm células nitrérgicas em quantidades variadas. Não se conhece os efeitos do processo de envelhecimento sobre a estrutura e função destes neurônios produtores de NO. O objetivo geral deste estudo foi investigar se o envelhecimento provoca alterações nos neurônios nitrérgicos presentes nos NNBB do encéfalo humano. Além disso, busca agregar mais conhecimento a aspectos morfológicos e de distribuição das células que compõem o sistema nitrérgico nos NNBB em humanos. As amostras de estriado (caudado e putâmen), globos pálidos (GP), núcleo subtalâmico (NST), substância negra (SN) e núcleo pedunculopontino (NPP) de 20 indivíduos sem doenças neurológicas e psiquiátricas foram submetidas à avaliação histológica em secções, coradas por técnicas que localizam neurônios que expressam NO, como a histoquímica para NADPH-diaforase (NADPHd) e à imunohistoquímica para sintase do NO neuronal (nNOS), e parâmetros de densidade neuronal e morfometria foram comparados entre indivíduos adultos jovens e idosos. Análises de densidade neuronal e morfometria entre subdivisões topográficas e funcionais também foram realizadas. Foi visto que o envelhecimento não provoca modificações na densidade neuronal e morfometria nitrérgica nos NNBB em humanos. Adicionalmente, o trabalho mostrou que: (I) as regiões mais posteriores do estriado se destacaram por apresentarem uma elevada densidade neuronal, associada a neurônios menores, em comparação com as regiões mais anteriores; (II) as porções do estriado ligadas ao córtex límbico apresentam maiores densidades neuronais; (III) o NST é uma região em que cerca de 90% de seus neurônios expressam NO, e suas características morfológicas sugerem que estas células coexpresssem glutamato; (IV) o NPP é extensamente povoado por neurônios nitrérgicos, principalmente no nível do colículo inferior; (V) a presença de células NO-positivas é preponderante nas lâminas medulares de ambos GP, porém notamos maior concentração de células nitrérgicas no GPi; (VI) não foi detectada presença de neurônios que contêm NO na SN. Nossos resultados mostram que há uma presença maciça de

neurônios que expressam NO em núcleos-chaves envolvidos com processamento motor corticobasal, como o NST, o estriado e o NPP, sugerindo que a neurotransmissão nitrérgica seja peça fundamental da fisiologia dos NNBB, portanto, com considerável potencial terapêutico nas doenças que afetam estas estruturas.

Palavras-chaves: Óxido nítrico, envelhecimento, núcleos da base, estriado, núcleo subtalâmico.

ABSTRACT

dos Santos, BL. Effects of aging over nitrgic system in human basal nuclei. 2014. Efeitos do envelhecimento sobre o sistema nitrérgico dos núcleos da base em humanos. 2014. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The nitric oxide (NO) is a gaseous molecule recently described, with a role on several physiologic processes, including signal transmission in central nervous system (CNS). The NO-mediated brain signaling occurs by extrasynaptic mode, called “volume transmission”. There are evidences supporting the NO as a major neurotransmitter involved on motor control modulation. The presence of NO neurons was described in many species, and movement-related structures, as the basal nuclei (BN), also contains variable densities of nitrgic cells. It is unknown the effect of aging over the structure and function of these NO neurons. The objective of the study is to investigate if the aging causes abnormalities on human BN nitrgic neurons. Furthermore, we aimed to explore distribution and morphologic features of these cells in BN. The samples of striatum (caudate and putamen), globus pallidum (GP), subthalamic nucleus (STN), substantia nigra (SN) and pedunculo pontine nucleus (PPN) of 20 human brains from subjects without neurologic or psychiatric diseases were processed for histologic analysis, stained by 2 techniques which localizes NO neurons: histochemistry for NADPH-diaphorase (NADPHd) and immunohistochemistry for neuronal NO synthase (nNOS); the neuronal density and morphometric parameters were compared between young adults and aged subjects. The neuronal density and morphometric analysis between striatal and subthalamic topographic / functional subdivisions were also performed. Our data showed that aging does not change the neuronal density or morphometric parameters of nitrgic neurons in human BN. Additionally, other results were found: (I) the most posterior regions of striatum have a higher neuronal density and smaller neurons than the most anterior regions of this nucleus; (II) the limbic cortex-associated areas of striatum have higher neuronal density than others functional subdivisions; (III) the STN is a region in which about 90% of its neurons expresses NO, and its morphologic features suggest these neurons coexpress glutamate; (IV) the PPN has a massive nitrgic neuronal density, mostly in the inferior colliculus level; (V) in GP, there is a marked presence of NO neurons in *laminae medullaris*, and the internal GP has more NO-positive cells than the external GP; (VI) nitrgic neurons were not detected in SN. Our results showed a remarkable presence of neurons expressing NO in nuclei essential for motor corticobasal processing (striatum, STN, PPN), suggesting that the nitrgic neurotransmission has a fundamental role in BN physiology, therefore, with great therapeutic potential in diseases involving these structures.

Keywords: Nitric oxide, aging, basal nuclei, striatum, subthalamic nucleus.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – OS NÚCLEOS DA BASE EM HUMANOS: ASPECTOS ANATÔMICOS E FUNCIONAIS

1.1.1 – PRINCÍPIOS GERAIS DOS NÚCLEOS DA BASE

Desde Kinnier Wilson, em seus comentários sobre “as bases escuras do encéfalo”, o conjunto de estruturas subcorticais do prosencéfalo denominado de núcleos da base (NNBB) foi associado inicialmente apenas com a modulação dos movimentos corporais (GOLDMAN-RAKIC; SELEMON, 1990), em modelos hipotéticos que variaram bastante ao longo das décadas, até o modelo vigente atual, onde atua como integrador de várias funções motoras, comportamentais e cognitivas. Classicamente, constituem-se de 3 tipos de núcleos: (1) o núcleo de entrada, que corresponde ao estriado; (2) os núcleos intrínsecos, como o globo pálido porção externa (GPe), o núcleo subtalâmico (NST) e a substância negra *pars compacta* (SNpc); e (3) os núcleos de saída, que são a porção interna do globo pálido (GPi) e substância negra *pars reticulata* (SNpr) (LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012). Mesmo não fazendo parte dos NNBB clássicos, o núcleo tegmentar pedunculopontino (NPP) é considerada importante região acessória desta circuitaria.

Quanto às suas características gerais, impressiona a diversidade e concentração de neurotransmissores nos NNBB, em relação ao resto do encéfalo, principalmente no estriado (GRAYBIEL, 1990; HOLT; GRAYBIEL; SAPER, 1998). Neurotransmissores clássicos, como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e o glutamato, coexistem com outros neuropeptídeos e influenciam em conjunto tanto os circuitos principais de projeção quanto os circuitos locais comandados por interneurônios (GRAYBIEL, 1990). A presença destes diversos neurotransmissores, com características bioquímicas distintas, faz com que os circuitos possam ter influências excitatórias ou inibitórias sobre seus alvos. O exemplo mais importante de modulação de um neuropeptídeo sobre as alças principais dos NNBB é o da via dopaminérgica nigroestriatal, originária da SNpc: a partir deste sistema acessório de modulação, regulados pela via direta e indireta (maiores explicações na subseção 1.1.7 deste texto), acredita-se que sinais indesejados ou conflitantes sejam inibidos para uma regulação mais exata das funções dos NNBB, principalmente do movimento voluntário. Além disso, é sabido que cada núcleo apresenta padrões elétricos próprios, alternando entre padrões fásicos e tônicos de descargas neuronais de acordo com os sinais recebidos de outros núcleos (CHEVALIER; DENIAU, 1990; KAWAGUCHI, 1997; HABER, 2004; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012). Esta combinação de modulação bioquímica e elétrica eleva consideravelmente a complexidade de processamento dos NNBB.

Abordaremos inicialmente cada núcleo em particular, para depois analisarmos as circuitarias específicas.

1.1.2 – NÚCLEO DE ENTRADA: O ESTRIADO

O estriado é uma complexa estrutura localizada no diencefalo, e em mamíferos superiores, é separada em 3 partes distintas: o caudado, o putâmen e o núcleo acumbens. O caudado, em sua porção mais anterior, é mais largo e recebe o nome de *cabeça do estriado* (HABER, 2004; BERNÁCER; PRENSA; GIMÉNEZ-AMAYA, 2005). A porção posterior ao nível do corpo mamilar é chamada de *corpo do estriado*, onde a estrutura se torna mais afilada, e faz um giro, acompanhando o sistema ventricular, nas porções chamadas de *giro e cauda do caudado* (Figura 1). O putâmen, em humanos, é a maior região dos NNBB, com formato elíptico, medindo cerca de 6 a 7 cm de comprimento, 2 a 3 cm de largura e 3 a 4 cm de altura. Em humanos, caudado e putâmen são separados na maior parte de seus trajetos pela cápsula interna, exceto nas regiões mais rostrais do estriado (HABER, 2004). O núcleo acumbens está localizado na porção mais ventromedial e anterior do estriado, sem limites precisos em relação ao putâmen (HABER, 2004).

Figura 1: Representação esquemática das subdivisões topográficas do caudado (cabeça pré-comissural, cabeça pós-comissural, corpo, giro e cauda) e do putâmen (putâmen pré-comissural e pós-comissural). Ncaud: núcleo caudado; Put: putâmen (adaptado de BERNÁCER, PRENSA e GIMENEZ-AMAYA, 2005).

As projeções corticais que chegam ao estriado são alocadas em territórios distintos entre si, formando os territórios funcionais do estriado (KEMP; POWELL, 1970; PARENT; HAZRATI, 1995A). A

região do estriado que recebe fibras dos córtices associativos é composta por vastas áreas do putâmen rostral à comissura anterior e grande parte da cabeça, corpo e cauda do caudado, com exceção de um pequeno setor dorsolateral próximo à cápsula interna. O território estriatal associado ao córtex sensorimotor é constituído pelo setor dorsolateral da porção pós-comissural do putâmen e pela margem dorsolateral da cabeça do núcleo caudado. O território estriatal ligado ao córtex límbico engloba o núcleo acumbens, a porção profunda do tubérculo olfatório e as porções mais ventrais do caudado e putâmen (PARENT; HAZRATI, 1995a; BERNÁCER; PRENSA; GIMÉNEZ-AMAYA, 2005).

Para facilitar o entendimento, dividem-se os neurônios do estriado em 2 categorias: os neurônios médios espinhosos (NME) e os interneurônios, a partir de características morfológicas e funcionais. Os NME também são conhecidos como de projeção (ou principais), e é o tipo celular mais comum do estriado (aproximadamente 70% das células do estriado em primatas) (HABER, 2004). São neurônios de tamanho médio (14 a 20 μm), com 4 a 7 dendritos, caracteristicamente coberta por espinhos, além de possuírem um axônio robusto, que dá origem a uma densa rede sináptica (HABER, 2004; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012). Estes longos axônios terão a função de projetar os sinais gerados no estriado para o globo pálido e SN, já que os NME são as principais eferências do estriado (GOLDMAN-RAKIC; SELEMON, 1990; HABER, 2004; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012). Além disso, sabe-se que estes neurônios contêm primariamente GABA e outros neuropeptídeos, e que suas projeções estriatofugais são classificadas em 2 alças paralelas distintas por seus alvos e pela presença de receptores dopaminérgicos da família D1 ou D2: a via direta e indireta, as quais serão comentadas com detalhes posteriormente (GOLDMAN-RAKIC; SELEMON, 1990; HABER, 2004; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012).

Os interneurônios estriatais são desprovidos de espinhas dendríticas e também contêm GABA, sendo divididos de acordo com suas diferentes morfologias, propriedades elétricas e bioquímicas (KAWAGUCHI et al., 1995; KAWAGUCHI, 1997) (Figura 2). Há 3 tipos mais comuns de interneurônios no estriado: (1) interneurônios colinérgicos gigantes, com hiperpolarização de longa duração, (2) interneurônios contendo parvalbumina, com descargas neuronais rápidas, e (3) interneurônios contendo óxido nítrico (NO) e somatostatina (KAWAGUCHI et al., 1995; KAWAGUCHI, 1997). Em particular, este último grupo de interneurônios apresenta diâmetro entre 12 a 25 μm , com uma árvore dendrítica menos robusta e representa de 1 a 2% de todos os neurônios do estriado. Eletrofisiologicamente, estes interneurônios são caracterizados por gerarem grandes e persistentes despolarizações em *plateau*, e por uma alta taxa de descargas neuronais de baixo limiar (*low threshold spikes*).

Figura 2: Diferentes classes de interneurônios estriatais. Há um grupo de interneurônios colinérgicos e outro de interneurônios GABAérgicos, sendo que estes últimos se subdividem em 3 subtipos: portadores de parvalbumina, calretinina e óxido nítrico. ACh: acetilcolina; CB: calbindina; CR: calretinina; GABA: ácido gama-aminobutírico; NO: óxido nítrico; NPY: neuropeptídeo Y; PV: parvalbumina; SS: somatostatina (retirado de KAWAGUCHI et al., 1995).

Mesmo aparentando ser uma estrutura morfológicamente homogênea, sabe-se que existem 2 compartimentos imunohistoquimicamente separados no estriado: a matriz e o estriassomo. Os estriassomos são como “ilhas” celulares imersas em uma matriz também celular, onde os dendritos de NME pertencentes a estriassomos não adentram o território da matriz e vice-versa (PARENT; HAZRATI, 1995a; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012). Os interneurônios estão presentes em ambos os compartimentos, e se acredita que os interneurônios que contêm NO também teriam função de integração entre matriz e estriassomos (PARENT; HAZRATI, 1995a). Também há uma organização espacial, baseada nas aferências, envolvendo os citados compartimentos: áreas corticais motoras e sensoriais, tálamo e neurônios dopaminérgicos da SNpc inervam principalmente a matriz estriatal; áreas corticais límbicas, a amígdala basolateral e as partes ventrais da SNpc inervam preferencialmente os estriassomos (LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012).

1.1.3 – NÚCLEOS INTRÍNSECOS:

1.1.3.1 – COMPLEXO PALIDAL: GLOBO PÁLIDO EXTERNO

O globo pálido (GP), também chamado complexo palidal, é uma estrutura que, medialmente contígua ao estriado, forma uma área com formato de lente, chamada também de núcleo lentiforme. O GP apresenta uma palidez marcante à coloração de Nissl, em contraste com a viva marcação do estriado, o que dá origem ao seu nome (HABER, 2004). Em primatas, o GP se divide em duas estruturas: o GPe, mais lateral, e o GPi, mais medial. Os limites entre estas duas subáreas é feito pela lâmina medular medial, e o GPe é separado do putâmen pela lâmina medular lateral. Em humanos, os limites entre GPe e GPi não são bem definidos (HABER, 2004).

A citologia do GP é mais homogênea que a do estriado, porém a sua quantidade de neurônios é bem menor (PARENT, 1990). Todos os neurônios do GP também são GABAérgicos, e apresentam imunomarcação para a proteína parvalbumina (LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012). Há um predomínio de neurônios grandes (20 a 60 µm de diâmetro), com dendritos longos, calibrosos, pouco numerosos, arranjados em padrão radial discoide, dispostos perpendicularmente às fibras estriatopalidais, de modo que cada célula palidal intercepte várias fibras estriatais funcionalmente relacionadas, como um canal específico, conforme proposto pelos modelos de Alexander et al. e Percheron et al. (ALEXANDER; DELONG; STRICK, 1986; PARENT, 1990; PERCHERON; FILION, 1991; HABER, 2004) (Figura 3). Acredita-se que esta disposição especializada dendrítica discoide seja mais comum no GPe que no GPi (FRANCOIS et al., 1984 apud HABER, 2004)¹. Os neurônios do GP são tonicamente ativos, gerando uma inibição tônica sobre seus alvos quando em repouso. Esta inibição tônica é reduzida com atividades comportamentais voluntárias (HABER, 2004).

---

¹ FRANCOIS, C. et al. A Golgi analysis of the primate globus pallidus. I. Inconstant processes of large neurons, other neuronal types, and afferent axons. *J Comp Neurol*, v. 227, p. 182-199, 1984b.

Figura 3: Esquema representando a arborização das vias estriatopálidas e subtalamopálidas em primatas. Nos globos pálidos, há uma disposição dendrítica em faixa paralela às lâminas medulares, facilitando o contato dos neurônios pálidas com fibras extrapálidas. GABA-ENK: neurônio estriatal da via indireta; GABA-SP: neurônio estriatal da via direta; GLU: fibras glutamatérgicas; PU: putâmen; STN: núcleo subtalâmico (retirado de PARENT, 1990).

Mesmo sendo estruturas semelhantes morfológica e bioquimicamente, o GPe se difere bastante do GPi em termos funcionais. Comentaremos sobre o GPi com mais detalhes a seguir (*vide* 1.1.4 – NÚCLEOS DE SAÍDA: GLOBO PÁLIDO INTERNO E SUBSTÂNCIA NEGRA *PARS RETICULATA*). Conforme já dito antes, o GPe é classificado como um núcleo intrínseco dos NNBB, com uma função modulatória principalmente relacionada ao NST, mas também com o GPi, SNpr e tálamo. Atualmente, acredita-se que o GPe seja uma estrutura modulatória, através de inibição tônica, de todos os núcleos de saída do sistema corticobasotálamico (PARENT; HAZRATI, 1995a). O estriado é a principal região a enviar fibras para o GPe, e estas eferências estriatopálidas apresentam imunorreatividade para encefalina (HABER, 2004) e para receptores de adenosina tipo 2A (LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012). As fibras estriatopálidas encefalina-positivas que seguem para o GPe representam o primeiro trajeto da via indireta dos NNBB, e neste circuito específico, o GPe serviria como uma estação relé entre estriado e NST (LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012) (Figura 4).

Figura 4: Esquema do modelo canônico clássico dos núcleos da base. GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; SNc: substância negra *pars compacta*; STN: núcleo subtalâmico (adaptado de LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012).

1.1.3.2 – NÚCLEO SUBTALÂMICO

O NST é um núcleo compacto, bem-definido e oval, com forma de lente biconvexa, limitado dorsalmente pela zona incerta e ventralmente pelo pedúnculo cerebral, medial à porção peduncular da cápsula interna no seu nível rostral e se estendendo caudalmente até fazer contato com a parte mais rostral da SN (PARENT; HAZRATI, 1995b; HABER, 2004) (Figura 5). Seu principal elemento celular são neurônios de projeção glutamatérgicos, com 25 a 50 μm de diâmetro, apresentando longos axônios e uma árvore dendrítica extensa, assemelhando-se morfológicamente aos neurônios presentes no complexo palidal e na SN (PARENT; HAZRATI, 1995b; HABER, 2004). Estima-se que, em primatas, os neurônios subtalâmicos ocupem apenas de um quinto a um nono do volume total do núcleo, enquanto que em roedores a densidade neuronal é muito maior (PARENT; HAZRATI, 1995b; HABER, 2004). Assim como os neurônios palidais, as células do NST são tonicamente ativas, porém disparam em uma frequência mais baixa que as do GP (cerca de 24 Hz) (HABER, 2004).

Figura 5: Fotomicrografia da porção média do NST. Objetiva 10x, coloração de Nissl. No detalhe, uma proposta de subdivisão funcional feita por Parent e Hazrati (1995b). AS: porção associativa do NST; LI: porção límbica do NST; SM: porção sensorimotora do NST.

As conexões envolvendo o NST podem ser intrínsecas ou extrínsecas aos NNBB. As fibras oriundas do GPe são as projeções intrínsecas mais importantes que o NST recebe, envolvidas na via indireta (HABER, 2004). A sua principal conexão extrínseca é com o córtex frontal, e estas projeções diretas corticosubtalâmicas foram descritas na década de 1970 (HARTMANN-VON MONAKOW; AKERT; KÜNZLE, 1978 apud NAMBU; TOKUNO; TAKADA, 2002)². Contudo, apenas recentemente o grupo de Nambu e colaboradores descreveu e comprovou uma via funcional alternativa nos NNBB, a via hiperdireta (NAMBU; TOKUNO; TAKADA, 2002). Segundo estes autores, o NST também atuaria como um núcleo de entrada de sinais corticais, assim como o estriado, e por ser mais rápida e curta que as outras duas vias, a via hiperdireta teria uma função anterior às vias direta e indireta (ver a seguir “Microcircuitaria”) (NAMBU; TOKUNO; TAKADA, 2002).

² HARTMANN-VON MONAKOW, K., AKERT, K., KÜNZLE, H. Projections of the precentral motor cortex and other cortical areas of the frontal lobe to the subthalamic in the monkey. **Exp Brain Res**, v. 33, p. 395-403, 1978.

1.1.3.3 – SUBSTÂNCIA NEGRA *PARS COMPACTA*

A substância negra (SN) é uma estrutura achatada oval, situada na base do mesencéfalo, dorsal ao pedúnculo cerebral. A partir de critérios citoarquitetônicos e neuroquímicos, a SN é dividida em 2 grupos celulares: a *pars compacta* (SNpc) e a *pars reticulata* (SNpr) (HABER, 2004).

A SNpc é caracterizada macroscopicamente pela coloração escura oriunda da neuromelanina, uma substância oriunda do metabolismo das catecolaminas, porém sua principal marca são os neurônios contendo DA, já que faz parte do sistema dopaminérgico mesencefálico, que engloba também a área tegmentar ventral e o campo retrorrubral (HABER, 2004). Estes neurônios são grandes (média de 33 µm de diâmetro), com dendritos longos e pobres em espinhas dendríticas (HABER, 2004). Fisiologicamente, sabe-se que as descargas neuronais desta estrutura não respondem aos movimentos corporais ativos ou passivos, mas influenciados por sinais associados à recompensa (DELONG; CRUTCHER; GEORGOPOULOS, 1983 apud NAMBU, 2011)³.

O principal alvo das fibras dopaminérgicas nigrais é o estriado, na projeção conhecida como via nigroestriatal. A via nigroestriatal apresenta uma fraca organização topográfica: os neurônios da SNpc ventrais se projetam para o caudado dorsal, e os neurônios nigrais dorsais para as partes mais ventrais do estriado (SZABO, 1979 apud HABER, 2004⁴; NAMBU, 2011). Esta projeção é de fundamental importância na organização funcional dos NNBB, já que faz a modulação das vias paralelas direta e indireta. Além desta eferência, a SNpc também envia fibras à amígdala e a várias regiões neocorticais (HABER, 2004). Em contrapartida, a SNpc recebe projeções do próprio estriado, do GPe e do NPP (HABER, 2004).

1.1.4 – NÚCLEOS DE SAÍDA: GLOBO PÁLIDO INTERNO E SUBSTÂNCIA NEGRA *PARS RETICULATA*

Deve-se entender o GPi e SNpr como uma única estrutura funcional, para melhor compreensão de suas funções na circuitaria dos NNBB. Mesmo sendo de origens embriológicas distintas, as semelhanças morfofuncionais e neuroquímicas entre estas duas regiões são marcantes, e se postula que a SNpr possa ser considerada uma extensão caudomedial do GPi (HABER, 2004). Os dois núcleos são predominantemente GABAérgicos, apresentam intensa marcação para substância P e alta concentração de ferro, e suas projeções são similares (HABER, 2004; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO,

³ DELONG, M.R., CRUTCHER, M.D., GEORGOPOULOS, A.P. Relations between movement and single cell discharge in the substantia nigra of the behaving monkey. **J Neurosci**, v. 3, p. 1599-1606, 1983.

⁴ SZABO, J. Striatal and nigrostriatal connections. Anatomical studies. **Appl Neurophysiol**, v. 42, p. 9-12, 1979.

2012). Ambos mostram atividade elétrica tônica inibitória de alta frequência (aproximadamente 60 a 80 Hz) (HABER, 2004). O papel destas regiões é crucial na organização funcional dos NNBB, pois recebem os sinais já integrados no estriado e nos núcleos intrínsecos, e são a via final comum das vias paralelas direta, indireta e hiperdireta.

Como estruturas finais da circuitaria dos NNBB, o GPi/SNpr recebem projeções principalmente do estriado e NST, e de modo menos proeminente do GPe, tronco encefálico e tálamo. O principal alvo do GPi/SNpr são os núcleos talâmicos relacionados com a via corticobasotálamica: o GPi se projeta para a divisão parvicelular do núcleo ventral anterior e para parte oral do núcleo ventrolateral, enquanto a SNpr se projeta para a divisão magnocelular do núcleo ventral anterior e parte medial do núcleos ventrolateral (NAMBU, 2011; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012); além destas vias principais, sabe-se que GPi/SNpr também se conectam com alguns núcleos talâmicos intralaminares, em especial com o complexo centromediano-parafascicular (PARENT; HAZRATI, 1995a; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012). Os outros alvos do GPi/SNpr são o NPP e o colículo superior (projeção exclusiva do SNpr) (PARENT; HAZRATI, 1995a).

1.1.5 – NÚCLEO ACESSÓRIO: O NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO

O NPP é um grupamento neuronal de formato colunar, situado na porção dorsolateral do tegmento pontomesencefálico, e a área com maior densidade neuronal está no nível do núcleo troclear, logo acima da junção entre ponte e mesencéfalo (LEE; RINNE; MARSDEN, 2000). Como outros núcleos da formação reticular, seus limites não são nítidos, porém se considera que faça limite rostral com o campo retrorubral, caudal com os núcleos parabraqiais pontinos, medial com o pedúnculo cerebelar superior, lateroventral com o lemnisco medial e dorsal com o núcleo cuneiforme (LEE; RINNE; MARSDEN, 2000). Como grande parte dos núcleos do tronco encefálico, tem uma quantidade enorme de conexões com várias regiões do SNC, porém se caracteriza por ter numerosas aferências e eferências com os NNBB, por isso sendo considerado funcionalmente um núcleo da base acessório (LEE; RINNE; MARSDEN, 2000; ERRO; GIMÉNEZ-AMAYA, 1999). Funcionalmente, está relacionado com várias funções diversas, como centro de controle da locomoção e regulação do ciclo sono-vigília (LEE; RINNE; MARSDEN, 2000; ERRO; GIMÉNEZ-AMAYA, 1999; ALAM; SCHWABE; KRAUSS, 2011).

O NPP é um núcleo de aspecto heterogêneo, e uma das maneiras de dividi-lo é a descrita por Olszewski e Baxter (1954), baseada na densidade de células colinérgicas: a NPP *pars compacta*, onde há neurônios grandes densamente agrupados, e a NPP *pars dissipata*, com neurônios médios e pequenos espalhados entre o pedúnculo cerebelar superior e o trato tegmentar central, com limites

imprecisos (OLSZEWSKI; BAXTER, 1954; LEE; RINNE; MARSDEN, 2000) (Figura 6). O NPP *pars compacta* é menor e se localiza na parte dorsolateral da metade caudal do NPP, enquanto que o NPP *pars dissipata* constitui principalmente a parte rostral do núcleo (LEE; RINNE; MARSDEN, 2000; MARTINEZ-GONZALEZ; BOLAM; MENA-SEGOVIA, 2011). Há autores que preferem dividir o NPP apenas em região rostral e caudal (equivalente à *pars dissipata* e *pars compacta*, respectivamente) (MARTINEZ-GONZALEZ; BOLAM; MENA-SEGOVIA, 2011).

Figura 6: Esquema das relações entre o NPP com outras estruturas, no nível da decussação dos pedúnculos cerebelares superiores e do colículo inferior (A) e no nível do núcleo do nervo troclear (B). O NPP está representado na área mais escura do esquema. CA: aqueduto cerebral; CN: núcleo cuneiforme; CTT: trato tegmentar central; Dec SCP: decussação dos pedúnculos cerebelares superiores; LC: *locus coeruleus*; LL: lemnisco lateral; ML: lemnisco medial; MLF: fascículo longitudinal medial; NRD: núcleo da rafe dorsal; PAG: substância cinzenta periaquedutal; PN: núcleos pontinos; PPNc: núcleo pedunculopontino *pars compacta*; PPNd: núcleo pedunculopontino *pars dissipata*; SNe: substância negra *pars compacta*; RST: trato rubroespinal; STT: trato espinotalâmico; IV: núcleo troclear; V: núcleo mesencefálico do nervo trigêmeo (retirado de FOURNIER-GOSSELIN et al., 2013).

No aspecto neuroquímico, o NPP é composto por neurônios colinérgicos e não-colinérgicos. Sabe-se que os neurônios colinérgicos do NPP representam uma minoria dentro o total de neurônios do núcleo, porém estes são grandes (maiores que 20 μm), coexpressam NO, e são mais concentrados na *pars compacta* / região caudal do núcleo (LEE; RINNE; MARSDEN, 2000; ERRO; GIMÉNEZ-AMAYA, 1999; MARTINEZ-GONZALEZ; BOLAM; MENA-SEGOVIA, 2011). Os neurônios não-colinérgicos, mais presentes na região rostral da NPP *pars dissipata*, são principalmente GABAérgicos (e em menor escala glutamatérgicos) e se concentram mais na *pars dissipata* / região rostral do núcleo (LEE; RINNE; MARSDEN, 2000; ERRO; GIMÉNEZ-AMAYA, 1999; MARTINEZ-GONZALEZ; BOLAM; MENA-SEGOVIA, 2011). Esta distinção morfológica e neuroquímica entre as regiões rostral e caudal do NPP também se torna funcional, pois estas áreas dão origem a projeções distintas (MARTINEZ-

GONZALEZ; BOLAM; MENA-SEGOVIA, 2011). No aspecto eletrofisiológico, o NPP contém neurônios com padrões de descarga fásicos e tônicos (INGLIS; WINN, 1995).

O NPP tem conexões aferentes e eferentes com todos os NNBB, sendo provavelmente um importante relé no controle motor corticobasal. O GPi e o SNpr fornecem a principal aferência GABAérgica para o NPP, predominantemente para os neurônios não-colinérgicos (MENA-SEGOVIA; BOLAM; MAGILL, 2004 apud BENARROCH, 2013)⁵, e as projeções eferentes pedunculobasais tem como principais alvos a SNpc e o GPi (oriundas da NPP *pars dissipata* não-colinérgica) e o NST (oriunda da NPP *pars compacta* colinérgica) (MARTINEZ-GONZALEZ; BOLAM; MENA-SEGOVIA, 2011).

1.1.6 – EVOLUÇÃO DA ORGANIZAÇÃO FUNCIONAL DOS NÚCLEOS DA BASE E SEUS MODELOS CANÔNICOS

Até meados da década de 1970, acreditava-se que as informações geradas por todo neocórtex eram integradas nos NNBB, como uma espécie de “funil” de circuitos em série com as mais variadas origens neocorticais, encaminhadas a alguns núcleos talâmicos, sendo finalmente enviadas de volta ao córtex motor, onde seria feita a modulação fina de início e controle dos movimentos (GOLDMAN-RAKIC; SELEMON, 1990; ALEXANDER; DELONG; STRICK, 1986). Contudo, nas duas décadas seguintes, vários estudos mostraram que este modelo era insuficiente para explicar os novos achados morfológicos e fisiológicos: usando técnicas de marcação retrógrada e autorradiografia, trabalhos mostraram que as aferências do córtex frontal associados ao movimento inviam preferencialmente o putâmen, e as dos córtices associativos estavam ligadas ao caudado, formando vias corticobasais segregadas (KÜNZLE, 1975). Em 1981, DeLong e Georgopoulos propuseram a existência de dois circuitos distintos nos NNBB: (1) uma via motora, iniciada das aferências do que ficou conhecido como “córtex sensorimotor”, passando principalmente pelo putâmen, influenciaria algumas áreas corticais pré-motoras específicas, e (2) uma via associativa (ou “complexa”), formada por aferências das mais diversas áreas neocorticais associativas, integradas pelo caudado, e finalmente retornando para regiões específicas do córtex pré-frontal. Este novo modelo mantinha a lógica dos NNBB como integradores em “funil” de sinais oriundos de várias regiões neocorticais, porém com duas particularidades: (1) estes dados integrados seriam devolvidos não apenas ao córtex motor, mas a todo córtex pré-frontal, e (2) a função dos NNBB não estaria restrita apenas aos programas motores, sendo

---

⁵ MENA-SEGOVIA, J.; BOLAM, J.P.; MAGILL, P.J. Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? **Trends Neurosci**, v. 27, p. 585-588, 2004.

expandida a de múltiplas funções superiores (DELONG; GEORGOPOULOS, 1981 apud ALEXANDER; DELONG; STRICK, 1986)⁶.

Quanto à segregação destes circuitos, a via motora mostrou a existência de uma organização espacial dos sinais: um grupo de neurônios corticais envia sinais para um grupo específico de neurônios no estriado, e este por sua vez transmite os sinais para outro grupo específico de neurônios no GP, que após enviará os dados integrados ao tálamo e ao córtex. Além desta segregação neurônio-específica, há indícios de uma organização somatotópica de transmissão nos vários núcleos (ou seja, existiria uma área específica para a mão no córtex motor, no estriado, GP, NST e SN) (GOLDMAN-RAKIC; SELEMON, 1990; NAMBU, 2011).

Alexander, DeLong e Strick (1986), a partir desta lógica, propuseram um modelo de NNBB baseado em 5 vias em paralelo, como “unidade modulares”, segregadas entre si e com funções distintas, a se saber: via motora, via oculomotora, via pré-frontal dorsolateral, via orbitofrontal lateral e via cingulada anterior. Esta era a nova proposta de compreensão dos NNBB, como um sistema de múltiplas alças com funções específicas e segregadas entre si, onde determinadas áreas corticais enviam sinais para o estriado, GP e tálamo, e este último retransmite os dados a uma região específica do córtex frontal, fechando assim o circuito. Contudo, este modelo não foi um consenso. Em 1991, Percheron e Filion (1991) questionaram a validade do “paralelismo” dos circuitos nos NNBB, onde mostraram que, ao invés de uma segregação entre as vias corticobasais, havia uma convergência destes sinais nos núcleos de saída (GPi e SNpr), sendo este sinal integrado enviado ao tálamo e ao próprio córtex (Figura 7).

Figura 7: Modelos de processamento de sinais nos núcleos da base. **A:** Modelo em paralelo (ALEXANDER; DELONG; STRICK, 1986). **B:** Modelo em convergência (PERCHERON; FILION, 1991). **C:** Modelo intermediário entre o processamento em paralelo e em convergência (PARENT; HAZRATI, 1995a) (retirado de NAMBU, 2011).

⁶ DELONG, M.R.; GEORGOPOULOS, A.P. Motor functions of the basal ganglia. In: BROOKHART, J.M.; MOUNTCASTLE, V.B.; BROOKS, V.B. **The Nervous System, Vol. 2 - Motor Control**. Bethesda: Am Physiol Soc, 1981.

Nos anos seguintes, mais evidências mostraram que estes 2 modelos, o do paralelismo e o da convergência, eram insuficientes para explicar a grande complexidade da circuitaria nos NNBB. Parent e Hazrati (1995a) propuseram um modelo que congrega ideias de ambas as hipóteses, mostrando que existem 3 níveis funcionais distintos e paralelos de circuitaria corticobasal (sensorimotora, associativa e límbica) e que há importante integração e convergência destes sinais, tanto no estriado quanto nos núcleos de saída (PARENT; HAZRATI, 1995a; NAMBU, 2011). O atual modelo canônico usado para explicar as circuitarias dos NNBB é baseado nos modelos anteriores, mas com maior ênfase da modulação de alças locais menores sobre as vias principais, tornando a rede neural mais complexa (LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012).

1.1.7 – AS PRINCIPAIS VIAS DE COMUNICAÇÃO DOS NÚCLEOS DA BASE: VIA DIRETA, INDIRETA E HIPERDIRETA

Entre o córtex cerebral e o tálamo, os NNBB exercem sua função de integradores, distribuidores, facilitadores de sinais adequados e inibidores de sinais inadequados para diversos comportamentos complexos, sobretudo a motricidade. Esta função de “filtro” de sinais, realizada inicialmente pelo estriado, levou pesquisadores a se questionarem: o que faz determinado sinal motor ser mantido ou ser suprimido? Em 1986, Penney e Young propuseram um modelo de 2 sistemas de projeção paralelos, ambos oriundos do estriado e modulados pela via nigroestriatal: uma das projeções se iniciaria no estriado, modulada excitatoriamente pela dopamina (DA) nigroestriatal, seguindo pelo GPi/SNpr e após para o tálamo, reforçando um comportamento motor adequado, no que ficou conhecido como “via direta”; a outra projeção também teria início no estriado, porém modulada inibitoriamente pela DA, com fibras seguindo pelo GPe, NST, GPi/SNpr e então chegando ao tálamo, contudo, agiria suprimindo comportamentos motores inadequados, em uma alça prolongada que ficou conhecida como “via indireta” (PENNEY; YOUNG, 1986; ALBIN; YOUNG; PENNEY, 1989). Este modelo ganhou rápida aceitação na comunidade científica por explicar os sintomas hipocinéticos ocorridos na doença de Parkinson (DP) e os hipercinéticos na doença de Huntington (DH) e foi incorporado aos modelos canônicos existentes.

Tanto a via direta quanto a indireta se iniciam em NME estriatais. Foi visto que estes neurônios de projeção da via direta (denominados de estriatonigrais, por convenção da literatura (BERTRAN-GONZALEZ et al., 2010) expressavam, além de GABA, substância P e dinorfina, com grandes concentrações desta molécula no GPi. Os NME da via indireta (chamados de estriatopalidais) expressavam encefalina em conjunto com o GABA, peptídeo presente de modo marcante no GPe

(CHESSELET; GRAYBIEL, 1983 apud BERTRAN-GONZALEZ et al., 2010; PENNEY; YOUNG, 1986; ALBIN; YOUNG; PENNEY, 1989; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012) (Figura 8).

Figura 8: Modelo canônico dos núcleos da base, mostrando as três vias de projeção de sinais: via direta, indireta e hiperdireta. As setas abertas e fechadas indicam projeções excitatórias e inibitórias, respectivamente. Cx: córtex cerebral; DA: dopamina; glu: glutamate; SNc: substância negra *pars compacta*; SNr: substância negra *pars reticulata*; STN: núcleo subtalâmico; Str: estriado; Th: tálamo (adaptado de NAMBU, 2011).

Outro ponto fundamental na compreensão destas vias foi a demonstração de que estes neurônios apresentam diferenças quanto à presença de receptores de DA: os neurônios da via direta contêm preferencialmente receptores D1, e os da via indireta receptores D2 (BECKSTEAD, 1988 apud LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012)⁷. Além destas diferenças já citadas, sabe-se atualmente que estas duas variedades de NME também apresentam características eletrofisiológicas, de sinalização intracelular e de sinapses corticoestriatais que permitem transformar estes dois tipos de fibras estriatofugais em sistema paralelos funcionalmente opostos, e se estima que apenas 6% dos NME coexpressem receptores D1 e D2 (BERTRAN-GONZALEZ et al., 2010). Recentemente, Kravitz et al. (2010), usando um modelo experimental de optogenética em roedores, demonstrou que a estimulação

⁷ BECKSTEAD, R.M. Association of dopamine D1 and D2 receptors with specific cellular elements in the basal ganglia of the cat: the uneven topography of dopamine receptors in the striatum is determined by intrinsic striatal cells, not nigrostriatal axons. **Neuroscience**, v. 27, p. 851-863, 1988.

seletiva de NME que expressam receptores D1 facilita a movimentação do animal, enquanto que a estimulação dos NME que expressam receptores D2 provocam cessação do movimento.

A partir de dados que confirmavam que o NST recebia fibras corticais diretamente, sem envolvimento do estriado, foi ganhando força a hipótese de que o NST, assim como o estriado, também tinha funções de um núcleo de entrada de sinais neocorticais (NAMBU et al., 2000). Nambu e colaboradores propuseram a existência de uma terceira projeção funcional, chamada de hiperdireta, com fibras corticosubtalâmicas, que se conectariam ao GPi/SNpr e ao tálamo (NAMBU et al., 2000; NAMBU; TOKUNO; TAKADA, 2002) (Figura 8). Segundo os autores, esta via seria mais rápida que as outras duas: em um movimento voluntário, a via hiperdireta seria a primeira a ser ativada, provocando uma forte inibição tônica sobre várias áreas do tálamo e córtex, o que suprimiria tanto sinais motores selecionados quanto os sinais não selecionados, intrusos. Em um segundo momento, este mesmo movimento voluntário ativaria a via direta, desinibindo as regiões-alvo e liberando os sinais selecionados para o córtex. Por último, a via indireta seria ativada e todos os sinais seriam novamente inibidos, provocando o término do movimento voluntário (NAMBU; TOKUNO; TAKADA, 2002). Sendo assim, a via hiperdireta seria um circuito com função de aperfeiçoar a filtragem de sinais “úteis” dos “inúteis” para um determinado comportamento. Em artigo recente, o mesmo grupo conseguiu provocar alterações nos disparos do GPi através de inibição seletiva da via hiperdireta, evidenciando mais sua existência (INOUE et al., 2012).

Em resumo, a organização funcional dos NNBB segue os seguintes princípios:

- 1) As informações corticais que foram recebidas pelos núcleos de entrada são transferidas aos núcleos de saída através de 3 vias paralelas e funcionalmente distintas (direta, indireta e hiperdireta);
- 2) Baseiam-se em 2 modalidades hipotéticas de processamento: o processamento em paralelo (ALEXANDER; CRUTCHER, 1990) ou o processamento com convergência de informações (PERCHERON; FILION, 1991). Atualmente, acredita-se que ambos os processos ocorram simultaneamente (PARENT; HAZRATI, 1995a; NAMBU, 2011; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012);
- 3) São mediados por diversos neurotransmissores, alguns principais e outros secundários, através de transmissão sináptica, conferindo propriedades excitatórias ou inibitórias às projeções;
- 3) Cada núcleo apresenta um padrão característico de descargas neuronais, variando em atividade fásica ou tônica, e em diferentes frequências;

1.2 – A BIOLOGIA DO ÓXIDO NÍTRICO

O NO é um gás com funções biológicas descobertas recentemente, identificado no início como o “fator de relaxamento derivado do endotélio” dos vasos sanguíneos, em resposta a agentes vasodilatadores como acetilcolina, histamina e bradicinina (VINCENT, 1995). Após a observação de que células nervosas cerebelares em cultura produziam NO após a exposição a aminoácidos excitatórios, a atuação desta molécula no sistema nervoso central (SNC) foi estudada com interesse progressivo (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988). Em seguida, surgiram evidências de que o NO atuaria na sinalização intraneuronal, com a demonstração de que a inibição de sua síntese bloqueia a produção de guanosina-monofosfato cíclico (GMPc) induzida pela ativação dos receptores glutamatérgicos (GARTHWAITE et al., 1989). Mesmo sendo um agente de múltiplas funções, cada vez mais o papel de neurotransmissor do NO é consolidado, e seu potencial papel terapêutico em várias doenças neurológicas e psiquiátricas o transforma em assunto de grande interesse na literatura médica.

1.2.1 - SÍNTESE E AÇÃO MOLECULAR DO ÓXIDO NÍTRICO

O NO é sintetizado por uma família de enzimas denominadas sintases do NO (NOS) (VINCENT, 1995). A atividade das NOS é controlada em múltiplos níveis, com uma complexa regulação na transcrição, podendo ainda sofrer alterações moleculares do tipo fosforilação ou outras, que alteram a sua atividade enzimática e sua distribuição subcelular (VINCENT, 1995). Existem 3 diferentes isoformas de NOS: a NOS endotelial (eNOS), a NOS neuronal (nNOS) e a NOS induzível dos macrófagos (iNOS). No contexto do SNC, a nNOS é a principal isoforma atuante, e sua purificação mostrou se tratar de uma proteína formada por um único polipeptídeo com 160kD (BREDT; SNYDER, 1992).

A NOS catalisa a oxidação da L-arginina para formar NO e L-citrulina (BREDT; SNYDER, 1992). A atividade da NOS é cálcio e calmodulina-dependente, necessitando da presença de NADPH como doador de elétrons, FAD e FMN. No cérebro, o influxo de cálcio intracelular através de canais ligados ao receptor de glutamato ou de canais ativados por voltagem, estimula a calmodulina, que se liga fortemente à NOS e a ativa (BENARROCH, 2011).

Após sua síntese na célula-doadora, o NO se difunde para o meio extracelular, facilitada pela predominante localização da NOS na membrana plasmática, e exerce sua função de regulação da sinalização nas células-alvo. No sistema nervoso, o NO atua como um mensageiro intracelular difusível sobre as células-alvo, e esta interação sobre a sinalização neuronal ocorre de 2 modos principais:

através de regulação da ativação da guanilil-ciclase solúvel (sGC) e de modificações pós-traducionais em diversas proteínas (BENARROCH, 2011).

Compostos contendo NO são potentes ativadores da sGC, molécula que catalisa a conversão de guanosina-trifosfato (GTP) em GMPc (VINCENT, 1995; BENARROCH, 2011). Este segundo-mensageiro ativa a proteína-quinase G, a qual controla vários eventos moleculares, como regulação de outras proteínas-quinases, fosfodiesterases, canais iônicos e de fatores de transcrição como o CREB (BENARROCH, 2011). Estes processos de sinalização intracelular modulam tanto a atividade sináptica quanto as outras funções do NO (LIN et al., 2010; WEST; TSENG, 2011; BENARROCH, 2011) (Figura 9).

Figura 9: Esquema da neurotransmissão mediada pelo NO. A célula doadora gera a molécula de NO a partir da proteína nNOS, que é ativada pelo influxo de cálcio associado a receptores glutamatérgicos NMDA. O NO se difunde e ativa a sGC à distância, levando a produção de GMPc nas células alvo. A GMPc ativa a proteína-quinase G (PKG) e canais ligados a nucleotídeos cíclicos (CNG), desencadeando uma via de sinalização que irá mediar a plasticidade sináptica e vasodilatação na célula alvo. Em níveis elevados, o NO poderá provocar estresse oxidativo e nitrosativo (S-nitrosilação e nitração da tirosina), ambos com efeitos neurotóxicos sobre a célula doadora. CaM: calmodulina; nNOS: sintase do NO neuronal; $\text{O}_2^{\bullet}$: radical superóxido; ONOO: peroxinitrito; PSD-95: proteína pós-sináptica com densidade de 95 kD; R-SH: radicais tiol; RSNO: produtos da S-nitrosilação (adaptado de BENARROCH, 2011).

Modificações pós-traducionais, com alteração da função de diversas proteínas importantes no SNC, também interferem na sinalização intracelular nervosa. As principais modificações pós-traducionais provocadas pelo NO no SNC são a S-nitrosilação e de nitração da tirosina. A propriedade de radical livre do NO promove a transformação de grupamentos tiol (-SH) em S-nitrosotiol (SNO), modificando a estrutura e função de proteínas envolvidas com canais iônicos, fatores de transcrição, assim como na sobrevivência celular e vias de morte celular (NAKAMURA; LIPTON, 2011). O NO também pode reagir com o radical superóxido, gerando peroxinitrito (ONOO^-), molécula que provoca a nitração do aminoácido tirosina contida em diversos polipeptídeos. A nitração da tirosina pode inibir a fosforilação e na interação entre proteínas, interferindo em importantes processos celulares.

Pelo fato do NO ser um gás em seu estado natural e não poder ser contido em vesículas, sua ação no sistema nervoso precisa ser regulada por sua síntese. A esta nova modalidade de neurotransmissão chamamos extrassináptica ou por volume (KISS; VIZI, 2001; DEL BEL et al., 2011). Além disso, por causa dessa característica peculiar, o NO não apenas atua sobre as sinapses, mas se difunde através das membranas celulares e se liga a inúmeras proteínas nas células-alvo, influenciando a sua atividade (Figura 10).

Figura 10: Efeitos da difusão por volume do NO sobre fibras monoaminérgicas. O NO sintetizado pela célula doadora se difunde como uma esfera ("nuvem", representada pela área circular em azul claro no esquema), e atinge as varicosidades

monoaminérgicas próximas. Através da redução da recaptação e estímulo da liberação destas moléculas, o sinal extrassináptico do NO provoca o aumento da concentração extracelular de monoaminas, como a dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT), na área de influência da “nuvem” nitrérgica. L-Arg: L-arginina; nNOS: sintase do NO neuronal; PSD-95: proteína pós-sináptica com densidade de 95 kD; T: transportador de monoamina (adaptado de KISS; VIZI, 2001).

1.2.2 - LOCALIZAÇÃO DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS NO SNC

Os neurônios capazes de sintetizar NO estão localizados em algumas regiões específicas do SNC, e também coexpressam vários outros neurotransmissores, como neuropeptídeo Y, somatostatina, galanina, acetilcolina, GABA e glutamato (VINCENT et al., 1983; KOWALL et al, 1987; ELLISON; KOWALL; MARTIN, 1987; PASQUALOTTO; VINCENT, 1991; NISBET et al., 1994). O achado de que a NOS é capaz de catalisar seletivamente a reação NADPH-diaforase (NADPHd) em tecidos fixos em aldeído facilitou a identificação dos neurônios nitrérgicos no SNC, e métodos histoquímicos e imunohistoquímicos são atualmente usados para estudo destas células (VINCENT; HOPE, 1992; VINCENT, 1994). Há uma correspondência estrita entre os neurônios que expressam atividade NADPHd com aqueles que expressam o RNA mensageiro (RNAm) da NOS e que apresentam imunorreatividade à NOS (DAWSON et al., 1991). Camundongos transgênicos com o gene nNOS inativado não apresentam marcação NADPHd no tecido cerebral (HUANG et al., 1993).

Tanto em estudos com humanos e animais não-humanos, os neurônios nitrérgicos estão distribuídos especialmente por algumas regiões do córtex cerebral, no hipocampo, no cerebelo, nos NNBB e no tronco cerebral (BREDT; HWANG; SNYDER, 1990; VINCENT; KIMURA, 1992; MEYER et al., 1992; EGBERONGBE et al, 1994; RODRIGO et al., 1994). No córtex cerebral humano, a nNOS é encontrada entre neurônios corticais das camadas II-V e na substância branca subcortical (SPRINGALL et al., 1992; MEYER et al., 1992; DEFELIPE, 1993; VINCENT, 1995). No hipocampo, as células NOS positivas são interneurônios no giro denteado e células piramidais do subículo (VINCENT, 1995).

No diencéfalo, a NOS também está presente em várias populações de neurônios hipotalâmicos, especialmente na área pré-óptica medial, ventromedial, lateral e perífornix (SANGRUCHI; KOWALL, 1991). As células NO-positivas são raras no tálamo, mas estão presentes na substância inominada (ELLISON; KOWALL; MARTIN, 1987; VINCENT; KIMURA, 1992; EGBERONGBE et al., 1994).

Kowall e Mueller (1988) estudaram a distribuição de neurônios nitrérgicos no tronco encefálico humano e notaram que estas células se organizavam em regiões definidas no bulbo, ponte e mesencéfalo. No bulbo, há 3 regiões ricas em células NO-positivas: a região lateral, dorsal ao

complexo olivar inferior, e regiões ventromedial e dorsomedial, localizadas ventralmente ao 4º ventrículo. Na ponte rostral, há 2 regiões ricas em NO: a região adjacente ao *locus coeruleus* (paracerúlea) e outra área entre o lemnisco lateral e o pedúnculo cerebelar superior (parabraquial lateral). O mesencéfalo caudal mostra uma região contígua à região parabraquial lateral, chamada de região cuneiforme, e outra adjacente à SN, a região paranigral.

No cerebelo, especialmente as células granulares e as células em cesta apresentam nítida marcação positiva para a reação da NADPHd (VINCENT, 1995).

1.2.3 - O PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NO CONTROLE MOTOR

A atuação do NO na fisiologia dos NNBB ainda é pouco estudada, porém existem informações suficientes na literatura sugerindo que tenha papel ativo no controle motor, principalmente na modulação da transmissão dopaminérgica nigroestriatal (DEL BEL et al, 2005).

As observações iniciais de que a inibição da NOS provoca redução da atividade motora em murinos, com posturas anormais associadas (catalepsia), evidenciaram o NO como um agente modulador do sistema dopaminérgico dos NNBB (MARRAS et al., 1995; KRZASCIK; KOSTOWSKI, 1997; DEL BEL; DA SILVA; GUIMARÃES, 1998; DEL BEL et al., 2004). A catalepsia apresenta semelhanças com alguns sintomas de parkinsonismo (rigidez, bradicinesia) em humanos (KRZASCIK; KOSTOWSKI, 1997), e medicações antiparkinsonianas, como a apomorfina, são capazes de prevenir e reverter a catalepsia induzida pela inibição da NOS (DEL BEL et al, 2005). Corroborando com estes achados, foi visto que os inibidores da NOS também reduzem a hiperlocomção induzida pela fenciclidina ou por agonistas dopaminérgicos (ABEKAWA; OHMORI; KOYAMA. 1994; NODA et al., 1995; SANDI; VENERO; GUAZA, 1995; STARR; STARR, 1995; DZOLJIC; DE VRIES; DZOLJIC, 1997; DEL BEL et al., 2002), e bloqueiam o comportamento rotatório induzido pela anfetamina no modelo de ratos com lesão unilateral pela 6-OHDA (BARTH WAL; SRIVASTAVA; DIKSHIT, 2001).

A interação entre NO e DA foi fortalecida pela demonstração de que o NO aumenta as concentrações de DA no estriado, facilitando a sua liberação ou reduzindo a sua recaptação (GUEVARA-GUZMAN; EMSON; KENDRICK, 1994; BLACK; MATTHEWS; HUMPHREY, 1994; STEWART et al., 1996; IRAVANI; MILLAR; KRUK, 1998; WEST; GALLOWAY, 1998; WEST; GALLOWAY; GRACE, 2002), embora alguns estudos tenham registrado resultados contraditórios. Estas crescentes evidências sugerem que o NO module a transmissão de sinais nos NNBB (FERRARO et al., 2004; WEST; GRACE, 2000), e que pelo menos parte da ação motora do NO se faça através de efeitos diretos e indiretos sobre o sistema dopaminérgico (DEL BEL et al, 2005). Entretanto, a ação do

NO pode ser muito mais ampla, atuando na regulação e mediação de múltiplos aspectos da neurotransmissão estriatal ou de outros núcleos (WEST; GRACE, 2000; FERRARO et al., 2004; KISS; VIZI, 2001). Existem observações sugerindo que circuitos nitrérgicos estriatais regulem a resposta das vias direta, indireta e hiperdireta de projeção corticobasal (WEST; GALLOWAY; GRACE, 2002; SAKA et al., 2002) e interfiram na atividade do NST (SARDO et al., 2006; SHEN; JOHNSON, 2010).

Em resumo, as evidências atuais indicam que provavelmente a síntese do NO nos NNBB potencializa a ação da DA no estriado e, ao mesmo tempo, modula o funcionamento das alças cortico-baso-talamo-corticais agindo em outros núcleos do sistema (Figura 11).

Figura 11: A via de sinalização nitrérgica no estriado. Neste esquema, a célula doadora de NO é o interneurônio nitrérgico estriatal, e através de sua difusão (área de difusão representada em azul claro), o NO alcança sua célula-alvo (o NME), ativa o sGC e desencadeia várias vias de sinalização, incluindo a fosforilação de substratos das proteínas quinases, como a fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc de massa molecular 32 kD (DARPP-32), responsáveis por modulação dos sinais que convergem no NME (adaptado de DEL BEL et al, 2011).

O fenômeno motor das discinesias, que são movimentos involuntários coreodistônicos induzidos pela levodopa, é uma das consequências do tratamento crônico com esta droga na DP, e está possivelmente associado ao desenvolvimento de mecanismos plásticos anormais nos NNBB. Sabe-se que o tratamento crônico intermitente com a levodopa induz ativação dos interneurônios

estriatais positivos para NOS associada ao aparecimento das discinesias (PAVON et al., 2006), e há aumento na síntese estriatal de NO após o tratamento com levodopa (ITOKAWA et al., 2006).

Trabalhos mostraram que a inibição da síntese do NO é capaz de reduzir aguda e persistentemente as discinesias induzidas pela levodopa em ratos com lesão unilateral da via nigroestriatal tratados cronicamente com esta droga (PADOVAN-NETO et al., 2009). Os mecanismos desse efeito são ainda desconhecidos. Supõe-se que esta ação do NO se relacione com o desenvolvimento de mecanismos plásticos nos NNBB, principalmente no estriado, que desenvolvem respostas persistentes anormais durante a progressão da DP. E se considerando o relevante papel do processo de depleção dopaminérgica da DP na gênese destes mecanismos compensatórios, e que estas respostas adaptativas atrasam o aparecimento de sintomas motores e podem induzir outros sintomas na fase avançada da doença, deve-se incluir o sistema nitrérgico como um dos componentes efetores destas progressivas adaptações plásticas que ocorrem nos NNBB.

Contudo, os modelos canônicos até hoje sugeridos para organização dos NNBB não levam em conta a influência de um neurotransmissor gasoso difusível como o NO sobre os vários núcleos desta circuitaria. Por todas as evidências atuais expostas pela literatura, não se pode ignorar o papel modulador do NO sobre a via nigroestriatal e sobre outros possíveis alvos. Logo, é necessário que um novo modelo de organização funcional dos NNBB seja proposto, contemplando uma realidade que vá além da clássica transmissão sináptica de glutamato, GABA e DA, e utilizando os novos conceitos de transmissão por volume introduzidos pela existência do NO.

1.2.4 - O ÓXIDO NÍTRICO E NEURODEGENERAÇÃO

Pela vasta gama de ações, o NO é considerado uma “molécula Janus”, pleiotrópica, com efeitos neuroprotetores e neurotóxicos ocorrendo de modo simultâneo. Esta capacidade ambivalente é regulada por suas concentrações nos tecidos, como em uma balança, e está relacionada com vários processos pró- e antidegenerativos de doenças do SNC (CALABRESE et al., 2007; CALABRESE et al., 2009).

Em concentrações baixas e transitórias, o NO apresenta uma série de efeitos neuroprotetores e antiapoptóticos, mediados principalmente pela sinalização via GMPc e ativação da proteína CREB ou proteína quinase B (CALABRESE et al., 2007; CALABRESE et al., 2009). Estas vias inibem a apoptose em células nervosas, como as granulares do cerebelo (CIANI et al., 2002). Além disso, os processos de S-nitrosilação e nitração da tirosina podem inibir a função de importantes proteínas envolvidas com mecanismos de excitotoxicidade e apoptose, como subunidades do receptor glutamatérgico NMDA, a

caspase 3 e porções do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (CALABRESE et al., 2007; CALABRESE et al., 2009; PIANTADOSI, 2012; NAKAMURA; LIPTON, 2011).

Quando o NO está presente em concentrações altas e persistentes, suas ações tendem a ter efeitos neurotóxicos. Mecanismos como processos inflamatórios, excitotoxicidade induzida por glutamato e outros são responsáveis pelo aumento indevido na geração de NO (NAKAMURA; LIPTON, 2011; ZHANG et al., 2010). O excesso do radical livre NO gera espécies reativas de nitrogênio e promove o estresse nitrosativo, que associado ao estresse oxidativo, contribui de forma importante para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (CALABRESE et al., 2009; NAKAMURA; LIPTON, 2011). Por ação da S-nitrosilação e nitração da tirosina, várias proteínas envolvidas no processo degenerativo da doença de Alzheimer (DA) e DP sofrem alteração de função e causam morte celular, como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (KNOTT; BOSSY-WETZEL, 2009), a Hsp90, a Drp1 e a alfa-sinucleína (NAKAMURA; LIPTON, 2011).

1.3. PROCESSAMENTO DO TECIDO NERVOSO HUMANO PÓS-MORTE E MÉTODOS DE DETECÇÃO HISTOLÓGICA DO ÓXIDO NÍTRICO

O estudo neuropatológico se baseia na preservação em longo prazo de estruturas do sistema nervoso após o óbito dos indivíduos, através de substâncias de conservação, para avaliação visual macroscópica e microscópica da histologia normal ou histopatologia do sistema. Para fins de detecção de neurônios que contêm NO, é necessário que uma série de procedimentos seja realizada para uma clara marcação de quais células contêm esta molécula, otimizando-se ao máximo a relação entre sinal e ruído. Detalharemos aspectos importantes do preparo específico do encéfalo humano para o estudo de neurônios nitrérgicos, e após comentaremos sobre as técnicas de detecção mais usadas.

1.3.1 – ABORDAGEM SISTEMÁTICA PARA USO PÓS-MORTE DO ENCÉFALO HUMANO

1.3.1.1 – CONDIÇÕES PRÉ-MORTE DO ENCÉFALO

Os estudos anatomopatológicos em encéfalos humanos devem considerar as inúmeras condições intrínsecas a este tipo de tecido, desde a natureza do tecido, sua captação e certos fatores clínicos. Estas variáveis nem sempre são levadas em conta como fatores de confusão, atrapalhando assim a robustez dos dados colhidos e dos resultados obtidos nos trabalhos. Tais variáveis podem influenciar a integridade bioquímica e molecular do material, anterior e/ou posteriormente ao óbito do indivíduo.

Os fatores do período anterior ao óbito podem ser controlados no momento da seleção dos indivíduos para o estudo. Dentre eles, citamos:

a) Idade: Sabe-se que a expressão de determinadas proteínas e outras macromoléculas no sistema nervoso pode variar ao longo da vida de um indivíduo, principalmente no contexto de doenças neurológicas. Com relação aos ácidos nucleicos, é possível que o envelhecimento possa reduzir a estabilidade do DNA e do RNAm no encéfalo humano, provavelmente por aumento da ação de enzimas como as ribonucleases (HYND et al., 2003). Castensson et al. (2000) mostraram que idade, sexo e tempo pós-morte não influenciam a expressão do RNAm da NOS. Quanto às proteínas, os dados sobre sua estabilidade no decorrer da vida são conflitantes, havendo tanto aumento, redução e manutenção dos níveis de proteínas diferentes no SNC (HYND et al., 2003). Quanto à NOS, há uma série de trabalhos mostrando os efeitos do envelhecimento sobre a expressão de NOS no encéfalo, de modo direto ou indireto (SELDEN et al., 1994; YAMADA et al., 1996; CHA et al., 1998; BLUM-DEGEN et al., 1999; CHA et al., 2000; DEL MORAL et al., 2004), também com resultados discordantes.

b) Sexo: Cada vez mais a influência do gênero na expressão de proteínas no encéfalo vem sendo estudada, e é nítido que algumas delas têm concentrações e níveis de atividade que variam de acordo com o sexo do indivíduo (HYND et al., 2003). Há poucas informações sobre diferenças de expressão de nNOS quanto ao sexo. Aconselha-se que os grupos estudados sejam pareados quanto ao sexo, ou que se eleja apenas um gênero para coleta, para evitar estas possíveis variações.

c) Quadro Clínico: Para uma boa seleção de encéfalos humanos para estudos pós-morte, é fundamental a obtenção de dados sobre as doenças prévias do indivíduo (principalmente as neurológicas e psiquiátricas, como epilepsia, acidentes vasculares cerebrais, doenças neurodegenerativas, alcoolismo, transtornos psicóticos e afetivos), assim como condições clínicas específicas da fase terminal da vida do indivíduo (febre e infecções com choque séptico, crises convulsivas, coma – ver mais em “Estado Agônico”). Alguns trabalhos com encéfalos de indivíduos com doenças neurológicas e psiquiátricas e sua relação com o sistema nitrérgico já foram publicados, como em DH (FERRANTE; KOWALL; BEAL, 1985; FERRANTE et al., 1987; MORTON; NICHOLSON; FAULL, 1993; NORRIS et al., 1996), DP (HIRSCH et al., 1987; MUFSON; BRANDABUR, 1994; BÖCKELMANN et al., 1994; HUNOT et al., 1996; EVE et al., 1998), de DA (SELDEN et al., 1994; MUFSON; BRANDABUR, 1994; TAO et al., 1999) e esquizofrenia (LAUER et al., 2005; FRITZEN et al., 2007). Além disso, há evidências experimentais em ratos de que a ingestão crônica de álcool pode alterar a marcação da NADPHd no encéfalo (ZIMA; DRUGA; STIPEK, 1998).

d) Medicamentos: O uso crônico de determinadas medicações pode afetar moléculas presentes no encéfalo pós-morte: como exemplo, o uso crônico de analgésicos opiáceos pode alterar o padrão sináptico dos neurônios (HARDY et al., 1983 apud HYND et al., 2003)⁸ e provocar variações neuroquímicas diversas em material de necropsia, e várias outras drogas neuroativas modificam a expressão e atividade de proteínas do SNC (HYND et al., 2003). Além disso, algumas medicações de uso clínico podem ter efeitos sobre a produção de NO sistêmico, como os nitratos e o nitroprusiato de sódio. Portanto, ao realizar a seleção dos indivíduos e posterior análise dos resultados, deve-se sempre levar em conta a possível influência de uso crônico de certas medicações sobre a produção de NO.

e) Estado Agônico: Define-se estado agônico como a condição clínica do paciente antes da morte, e inclui distúrbios como febre, desidratação, distúrbios metabólicos e acidobásicos, hipoglicemia, hipotensão, hipóxia e coma (HARRISON; PEARSON, 1990). Sabe-se que esta variável tem forte influência sobre parâmetros neuroquímicos posteriormente estudados em tecidos pós-morte, já que grande parte dos pacientes usados nestes trabalhos tem uma morte prolongada, associada a

---

⁸ HARDY, J.A.; DODD, P.R. Metabolic and functional studies on post-mortem human brain. **Neurochem Internat**, v. 5, p. 253-266, 1983.

infecções, ventilação mecânica, uso de drogas vasoativas e coma (HYND et al., 2003). O estado agônico também pode alterar o pH encefálico, geralmente por hipóxia e/ou acidose láctica, levando a possíveis modificações na estabilidade de certas proteínas (HARRISON; PEARSON, 1990). Tanto Yates et al. (1990 apud HYND et al., 2003) quanto Monoranu et al. (2009) mostraram que o pH encefálico tende a ser menor em indivíduos com morte prolongada.

Não se sabe se a presença de hipertermia, que provoca a produção de proteínas de fase aguda, e da hipoglicemia, que induz o metabolismo anaeróbico e redução do pH sistêmico, provocam outras alterações no tecido nervoso pós-morte (HARRISON; PEARSON, 1990; HYND et al., 2003). O coma também pode trazer profundas alterações neuroquímicas, e sua duração maior que 24 horas está relacionada à redução da expressão de determinadas proteínas no encéfalo (JOHNSTON et al., 1997; HYND et al., 2003). Em geral, as proteínas e seus epítomos parecem ser resistentes às variações induzidas pelo estado agônico, com algumas exceções, como a enzima glutamato descarboxilase (HYND et al., 2003).

Tomita et al. (2004) compararam a influência das variáveis do estado agônico (coma, febre, desidratação etc.) e das variáveis pós-morte (intervalo pós-morte, tempo de refrigeração) sobre a qualidade do RNAm para estudos de biologia molecular em encéfalos humanos, e mostraram que o período agônico é mais relevante que o pós-morte para esta finalidade, através de um escore de 10 fatores agônicos. Recentemente, Sherwood et al. (2011) desenvolveram uma nova escala, baseada no trabalho de Tomita et al., que pontua o estado pós-morte de maneira mais específica.

1.3.1.2 – CONDIÇÕES PÓS-MORTE DO ENCÉFALO

A partir do estado agônico do indivíduo, há 3 períodos fundamentais antes da dissecação do encéfalo: (1) o intervalo entre o início da fase terminal até o óbito, (2) o intervalo entre o óbito e a refrigeração do corpo e (3) o intervalo entre a refrigeração do corpo e a retirada do encéfalo com seu devido congelamento e fixação (HYND et al., 2003). O dito intervalo pós-morte (tempo entre óbito e fixação do encéfalo) é um dos fatores pós-morte mais relevantes a ser controlado na seleção de indivíduos.

1.3.1.3 – MANEJO DO ENCÉFALO HUMANO APÓS NECRÓPSIA

Discutiremos nas próximas seções as etapas de preparação do tecido encefálico humano para os procedimentos histológicos específicos. Comentaremos cada passo da técnica e faremos uma revisão crítica da metodologia usada em 21 artigos publicados que avaliaram o sistema nitrérgico nos

NNBB em humanos (FERRANTE; KOWALL; BEAL, 1985; FERRANTE et al., 1987; HIRSCH et al., 1987; NAKAMURA et al., 1988; KOWALL et al., 1987; KOWALL; MUELLER, 1988; SAJIN; SESTAN; DMITROVIC, 1992; GEULA; SCHATZ; MESULAM, 1993; MORTON; NICHOLSON; FAULL, 1993; SELDEN et al., 1994; MUFSON; BRANDABUR, 1994; BÖCKELMANN et al., 1994; NORRIS et al., 1996; HUNOT et al., 1996; DOWNEN et al., 1999; TAO et al., 1999; JOHANNES et al., 2003; LEONTOVICH; MUKHINA; FEDOROV, 2004; BERNÁCER; PRENSA; GIMÉNEZ-AMAYA, 2005; LAUER et al., 2005; FRITZEN et al., 2007).

Após a necropsia e retirada do encéfalo do crânio, é aconselhada imediata refrigeração do órgão, objetivando-se temperaturas entre 4 a 8°C. As regiões encefálicas de interesse devem ser rapidamente dissecadas e depois colocadas em fixador. No processamento de tecidos pós-morte, sabe-se que a temperatura é um fator crucial para degradação de ácidos nucléicos e proteínas (como a NOS), e a maioria das proteínas, em temperatura ambiente, sofre alterações em suas estruturas e atividades enzimáticas (HYND et al., 2003; HILBIG et al., 2004; FERRER et al., 2007; FERRER et al., 2008). Não há informações exatas sobre a estabilidade da NOS em encéfalos humanos pós-morte, porém trabalho feito em camundongos mostrou a estabilidade de enzima associada à NADPHd por até 24 horas (KOWALL et al., 1985), e mais recentemente Hilbig et al. (2004) mostraram, também em camundongos, que a atividade NADPHd no tecido nervoso refrigerado a 4°C reduz bruscamente após 12 horas de período pós-morte; se conservado à temperatura ambiente (22°C), reduz após 8 horas pós-morte.

Em nossa revisão, vimos que apenas 22% dos trabalhos utilizaram encéfalos com período pós-morte menor que 12 horas (tempo pós-morte entre 12 a 24 horas – 44%; tempo maior que 24 horas – 30%). Considerando a degradação da proteína NOS já ocorrendo em períodos maiores que 12 horas após o óbito, é provável que cerca de 75% destes trabalhos tenham seus resultados comprometidos pelo longo tempo pós-morte.

1.3.1.4 – FIXAÇÃO DO ENCÉFALO

Após a dissecação, as partes do encéfalo são imersas em um aldeído com propriedades de conservação do tecido, sendo geralmente usado o formaldeído ou paraformaldeído (PFA), este último uma forma polimerizada, que se transforma em formaldeído mais purificado quando diluído em água. Um efeito associado da fixação em HQ é impedir a difusão das enzimas para locais diferentes de seu sítio *in vivo* (ROSENE; MESULAM, 1978). O formaldeído se transforma em metileno glicol em solução aquosa, adquirindo assim alto poder de penetração nos tecidos (aproximadamente 1 mm por hora) e, no interior do material, o equilíbrio químico favorece a transformação do metileno glicol em formaldeído,

que fixará a peça (EVERS; UYLINGS; SUURMEIJER, 1998). Acredita-se que o formaldeído reage com grupamentos tiol e amina de proteínas e com outras macromoléculas, formando treliças que ajudam a manter a estrutura secundária proteica (FOX et al., 1985; MASON; O'LEARY, 1991; EVERS; UYLINGS; SUURMEIJER, 1998).

Vários fatores influenciam a fixação dos tecidos em aldeídos, como pH, concentração do fixador e temperatura (EVERS; UYLINGS; SUURMEIJER, 1998). Quanto à temperatura, sabe-se que a velocidade de fixação aumenta diretamente proporcional à temperatura do meio, e se estima que a fixação ocorra em 24 horas na temperatura ambiente (25°C) e em 17 horas a 37°C (FOX et al., 1985). Além disso, a reação em temperaturas mais altas reduz o encolhimento do tecido (FOX et al., 1985). O encolhimento do tecido na fixação com formaldeído não é tão significativo, porém se torna nítido nas fases finais do processamento dos cortes, podendo gerar artefatos morfométricos (FOX et al., 1985).

Com relação à HQ para NADPHd, o fixador tem o papel adicional de inativar grande parte das outras enzimas com atividade diaforase não associadas à NOS, enquanto que a atividade NADPHd associada à NOS resiste aos aldeídos até em altas concentrações (BLOTTNER; GROZDANOVIC; GOSSRAU, 1995), às custas de redução da intensidade do formazan citoplasmático, porém sem alterar o padrão de marcação das células (NAKOS; GOSSRAU, 1994; SPESSERT; LAYES, 1994). Contudo, em certos tecidos sem nNOS (células gliais, células epiteliais do plexo coroide, células glandulares), as várias enzimas diaforase podem reter sua atividade mesmo em condições extremas de fixação (NAKOS; GOSSRAU, 1994; NORRIS et al., 1996). Logo, a fixação dos tecidos encefálicos é fundamental para a especificidade da reação NADPHd associada à NOS. Quanto à influência do tempo de fixação sobre os tecidos, Rosene et al. (1978) mostraram que um tempo de fixação mais longo pode reduzir a marcação de células no sistema nervoso, podendo haver ausência de atividade enzimática da NADPHd em encéfalo humano após fixação em formalina 10% por 4 a 5 dias (FERRANTE et al., 1987), e estudo mais recente notou que regimes de fixação mais longos podem reduzir as contagens de neurônios fracamente marcados com a NADPHd, sem influenciar os grupos neuronais de intensa marcação (GONZALEZ-HERNANDEZ; PEREZ DE LA CRUZ; MANTOLAN-SARMIENTO, 1996).

Nos estudos revisados por nós, o PFA 4% foi utilizado em 75% dos trabalhos, geralmente na temperatura de 4°C (mesmo com evidências de que a fixação ocorra idealmente em temperatura ambiente, a temperatura de 4°C ajuda a conservação da NOS). O tempo de fixação variou bastante: a maioria (58%) utilizou o período de 24 a 48 horas (o tempo mínimo necessário para fixação) e em 26% dos trabalhos, os encéfalos foram fixados por um período de 3 a 10 dias. Acreditamos que períodos de fixação maiores que 48 horas prejudiquem a marcação da reação NADPHd. Apenas um trabalho (NAKAMURA et al., 1988) utilizou a perfusão dos cadáveres com uma solução de PFA 4% e

glutaraldeído via artérias carótidas e vertebrais, sugerindo este método como ideal para melhorar a morfologia final dos cortes.

1.3.1.5 – CRIOPROTEÇÃO E CONGELAMENTO

Após a fixação, o material deve ser preparado para o congelamento, com finalidade de preservação da estrutura das proteínas de interesse por longos períodos. Para evitar artefatos de congelamento, que podem atrapalhar a análise morfológica das secções (ROSENE; ROY; DAVIS, 1986), é fundamental o controle sobre a taxa de congelamento do material: caso a taxa seja baixa, há formação de cristais de gelo extracelular, que deforma a estrutura celular; se o congelamento for rápido, há formação intracelular de cristais e possível ruptura mecânica da membrana celular (SHIRAKASHI; TANASAWA, 1998). Um método para utilizar uma velocidade de congelamento ideal é o pré-congelamento com substâncias crioprotetoras, como a sacarose, glicerol e dimetilsulfóxido, que evitam estresse osmótico e ruptura das células (ROSENE; ROY; DAVIS, 1986; HYND et al., 2003).

A sacarose é um crioprotetor iso-osmótico, não tóxico e barato, que proporciona um congelamento lento e homogêneo antes do congelamento rápido, reduzindo assim o risco de artefato de congelamento (HYND et al., 2003). Usa-se a sacarose geralmente diluída em tampões, com concentrações diversas e por períodos variáveis, em temperatura de refrigeração (4°C). Utiliza-se o critério de afundamento do tecido no recipiente para confirmar a saturação do material com o soluto. Sugere-se o aumento gradual da concentração da sacarose para reduzir o impacto de uma mudança brusca na osmolaridade do meio (SHIRAKASHI; TANASAWA, 1998). A crioproteção com sacarose por tempo prolongado pode trazer a desvantagem de contaminação por microrganismos.

Nossa revisão mostrou que a crioproteção foi feita em 63% dos trabalhos, todos com sacarose, sendo metade deles com concentração crescente e a outra metade com uma concentração fixa de sacarose. As concentrações utilizadas variaram de 10 a 40%.

Após a fase de crioproteção, o material está adequado para o congelamento, que consiste na redução da temperatura da peça a níveis de -70 a -80°C, em que há extrema redução de desnaturação de proteínas e da formação de cristais de gelo, para poder ser armazenada até sua utilização (FEDER; SIDMAN, 1958). É fundamental que neste processo, e mesmo no descongelamento, não haja ruptura dos compartimentos celulares, evitando assim o deslocamento de macromoléculas (PRENTØ, 1997).

Existem vários métodos de congelamento baseados no uso de agentes congelantes simples (nitrogênio líquido e gelo seco) ou no método de congelamento por substituição. Este último é feito por um solvente orgânico que otimiza a transferência de calor do tecido para o gelo seco e dissolve os

cristais de gelo formados no interior do tecido pelo congelamento, formando uma rígida matriz que impede o deslocamento das subestruturas do tecido (FEDER; SIDMAN, 1958).

O método do congelamento por substituição tem as vantagens de reduzir a ruptura de membranas celulares e de acelerar a redução de temperatura do tecido (BRATTHAUER, 2010; ROSENE; ROY; DAVIS, 1986), e a substância mais utilizada para congelamento por substituição é o isopentano. Rosene et al. (1986) avaliaram 2 métodos de congelamento (com isopentano e com gelo seco pulverizado), e mostraram a superioridade do isopentano a -75°C , que congela a peça quase 2 vezes mais rápido que o gelo seco e gera menos artefatos de congelamento. Quando comparado com o nitrogênio líquido, o contato do tecido com o isopentano provoca uma menor produção de bolhas, já que seu ponto de ebulição é maior que o do nitrogênio, otimizando assim a redução de temperatura no material (ROSENE; ROY; DAVIS, 1986). Além disso, o isopentano é uma substância barata e de armazenamento e manipulação fáceis.

Vimos que 77% dos trabalhos revisados por não descreveram a etapa de congelamento dos tecidos. Dentre os 5 trabalhos que descreveram este processo, 2 utilizaram o método do gelo seco, 2 relataram uso de isopentano e 1 estudo fez congelamento com nitrogênio líquido. Sendo uma etapa crítica do processamento, é preocupante que possa não ter sido feita em vários trabalhos com encéfalos humanos.

1.3.2 – MÉTODOS DE DETECÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO TECIDO NERVOSO: HISTOQUÍMICA PARA NADPH-DIAFORASE E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA nNOS

Existem várias formas de se detectar a NOS no tecido nervoso, sendo as mais comuns a histoquímica (HQ) para NADPHd, imunohistoquímica (IHQ) para nNOS, técnica de HQ com hibridização *in situ* (HHIS) e detecção da nNOS por técnica de Western Blotting (BEESLEY, 1995). Contudo, analisando os estudos morfológicos em humanos que avaliaram neurônios nitrérgicos, percebe-se que os métodos mais utilizados são a HQ para NADPHd e a IHQ para nNOS.

1.3.2.1 – HISTOQUÍMICA PARA NADPH-DIAFORASE APLICADA AO ESTUDO DO ENCÉFALO HUMANO

1.3.2.1.1 – PRINCÍPIOS DA REAÇÃO NADPH-DIAFORASE

A reação enzimática diaforase corresponde à atividade de redução (redutase, desidrogenase) de algumas enzimas, que retiram elétrons de uma determinada substância e os transferem para uma

outra molécula aceptora de elétrons. A NOS apresenta em sua estrutura um domínio catalítico redutase C-terminal, e um outro domínio catalítico oxidase N-terminal. O domínio redutase da NOS tem a propriedade de transferir elétrons da molécula nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para as flavinas FAD e FMN, e destas para 3 possíveis destinos: (1) para uma molécula de oxigênio, que será usada na síntese do NO e da L-citrulina, (2) para aceptores de elétrons naturais (citocromo c, citocromo P450) e (3) para aceptores de elétrons artificiais, como os sais de tetrazólio. Quando os sais de tetrazólio recebem elétrons, são reduzidos a cristais de formazan, precipitados com coloração azulada em microscopia óptica, que podem ser visualizados em cortes montados em lâminas, com uma imagem semelhante à coloração de Golgi (BLOTTNER; GROZDANOVIC; GOSSRAU, 1995).

Na década de 1950 e 1960, vários grupos estavam estudando as enzimas envolvidas no processo de produção energética aeróbica em determinados tecidos, incluindo o encéfalo, para avaliar suas particularidades histoquímicas. Thomas e Pearse, em trabalhos nos encéfalos de várias espécies, idealizaram a reação HQ com várias enzimas de atividade desidrogenase. Nas reações com a enzima NADPHd, também conhecida como nucleotídeo-trifosfopiridina reduzida (TPNH, reduced triphosphopyridine nucleotide), foram vistos neurônios com forte presença de formazan em seus citoplasmas e prolongamentos, distribuídos de forma isolada, e foram chamados de “células solitárias ativas” (THOMAS; PEARSE, 1964). Foi visto também pelos mesmos autores que estes neurônios eram mais resistentes a condições adversas, como necrose e contato com algumas substâncias tóxicas. Eles sugeriram que estes neurônios, além de ter a dita enzima NADPHd em altos níveis, também deviam produzir alguma substância particular que lhe conferia suas propriedades particulares, mas não puderam dizer o que seria (THOMAS; PEARSE, 1964).

Após estes trabalhos, vários grupos confirmaram os achados das células solitárias ativas em encéfalos não-fixados (ABE et al., 1963⁹; SHIMIZU; ABE, 1966¹⁰ apud SCHERER-SINGLER et al., 1983). Quase 2 décadas depois, Scherer-Singler et al. (1983) retestaram todos os aspectos metodológicos usados por autores anteriores, e chegaram a um modelo de reação HQ otimizado, cujas bases são utilizadas até hoje. Posteriormente, Hope e Vincent (1989) reanalisaram vários detalhes da reação e aperfeiçoaram o modelo.

Contudo, ainda não se sabia qual a substância produzida por estes neurônios, mas evidências indicavam que estas células se colocavam com peptídeos como somatostatina e neuropeptídeo Y (VINCENT; JOHANSSON; HOKFELT, 1983) e acetilcolina (VINCENT; JOHANSSON; HOKFELT, 1983; HOPE; VINCENT, 1989). De modo independente e quase simultâneo, Hope et al. (1991) e Dawson et

⁹ ABE, T. et al. Histochemical study of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the brain of normal adult rat. **Med J Osaka Univ**, v. 14, p. 67-98, 1963.

¹⁰ SHIMIZU, N.; ABE, T. Histochemical studies of the brain with reference to glucose metabolism. **Progr Brain Res**, v. 21A, p. 197-216, 1966.

al. (1991) resolveram o enigma: através de experimentos bem desenhados, chegaram a conclusão de que a recentemente descoberta proteína NOS (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988; BREDT; HWANG; SNYDER, 1990) é responsável pela atividade diaforase no encéfalo e em determinados tecidos periféricos, e que a colocalização entre as 2 técnicas é total. Desde então, a reação NADPHd tem sido uma das mais populares formas de estudar estes neurônios, e também uma das formas mais seguras de HQ (BLOTTNER; GROZDANOVIC; GOSSRAU, 1995).

1.3.2.1.2 – MEIO DE INCUBAÇÃO E SUBSTRATOS

A atividade NADPHd da NOS catalisa a seguinte reação:

Desde os primeiros experimentos feitos por Thomas e Pearse no início da década de 1960, os compostos usados no processo histoenzimático variaram bastante. Estes autores idealizaram o meio de incubação utilizando uma solução que incluía MTT (um sal de tetrazólio) e cobalto diluídos em tampão Tris e água destilada, além do substrato NADPH (THOMAS; PEARSE, 1964). Scherer-Singler et al. (1983) reutilizaram a técnica, mas com adaptações pertinentes após uma série de testes: comparando os sais de tetrazólio, mostraram que o nitroblue tetrazólio (NBT) teve a melhor marcação celular; definiram o Tris como a melhor solução tampão para a reação, em pH de 8,0-8,2; e consideraram que o uso de NADP associado ao malato teve melhor qualidade quando comparado ao substrato NADPH. Deste modo, eles definiram o uso de malato de sódio, NADP e NBT em tampão Tris como meio de incubação ideal. Ferrante et al. (1987) adicionaram ao meio de incubação o detergente não-iônico Triton X-100 e melhoraram a intensidade de marcação das células, provavelmente por catalisar a formação não-enzimática de formazan (BLOTTNER; GROZDANOVIC; GOSSRAU, 1995). Na comparação entre análogos do NBT e da NADPH na reação, Hope et al. (1989) notaram que não havia muitas diferenças de marcação entre os vários sais de tetrazólio e que o isômero β -NADPH teve os melhores resultados. Spessert e Claassen (1997) avaliaram modificações no protocolo e concluíram que uso do β -NADPH a 1mM, NBT a 0,8mM e Triton X-100 acima de 2,5% aumentam a especificidade da reação NADPHd associada à NOS.

Nos trabalhos posteriores, a utilização de NADP e malato foi progressivamente substituída pelo substrato NADPH, e a composição do meio de incubação da reação tem modificado muito pouco desde então. Em nossa revisão, a solução tampão mais utilizada foi o Tris (66,6%) em relação ao tampão fosfato e o Triton foi adicionado em 78% dos trabalhos. Além do malato, foram utilizados de modo

esporádico o $MgCl_2$ e DMSO, por supostamente catalisar a formação do formazan (SIMS et al., 1974; GONZALEZ-HERNANDEZ et al., 1996). As concentrações do NBT variaram bastante, de 0,164 a 4 mg/ml (concentração mais usada foi de 0,8 mM ou 0,654 mg/ml), e foram usadas concentrações de NADPH de 0,2 a 2 mg/ml (concentrações mais usadas foram de 0,745 mg/ml e 2 mg/ml). Possivelmente, a grande variação dos reagentes-chave nos vários estudos analisados dificulte a comparação de seus resultados.

1.3.2.1.3 – CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

Assim como a composição do meio de incubação da reação, as suas condições também variam bastante. Quanto ao pH do meio de incubação, Scherer-Singler et al (1983) definiram o pH ideal entre 8,0 a 8,2 em tampão Tris, enquanto que Hope et al. (1989) observaram estabilidade na reação se ocorrer na faixa de pH 6 a 10, e que o pH mais próximo de 6 reduz a marcação de vasos sanguíneos, sem alterar o padrão neuronal. Além disso, Spessert e Claassen (1997) notaram que, se pH do meio de incubação ficar entre 5 a 7, há um predomínio da atividade diaforase associada ao NOS, enquanto que um pH próximo de 10-11 aumenta a reação NADPHd não associada à NOS. Logo, tampões ácidos no meio de incubação otimizam a especificidade da técnica.

A temperatura também influencia o resultado da reação, e foi visto que se o corte for pré-aquecido a até 52-55°C, não há alterações na marcação celular (HOPE; VINCENT, 1989; SPESSERT; CLAASSEN, 1997) e que a temperatura de incubação de 42°C otimiza a reação diaforase (SPESSERT; CLAASSN, 1997). O tempo de incubação necessário para início da marcação é de 15 a 30 minutos, ocorrendo inicialmente no citosol e posteriormente nos processos celulares e no neurópilo, e com 40 a 60 minutos há saturação no citoplasma das células (SCHERER-SINGLER et al., 1983; HOPE; VINCENT, 1989; SPESSERT; CLAASSEN, 1997), com queda gradual da relação sinal-ruído. Além disso, foi visto que quanto maior o tempo de fixação do tecido, é necessário um maior tempo de incubação dos cortes (GONZALEZ-HERNANDEZ et al., 1996). A HQ costuma ser feita em ambiente escuro, pela fotossensibilidade do NBT e da NADPH, úmido e sob agitação constante, em regime *free-floating*.

Os estudos analisados foram feitos com tempos de incubação muito diversos: apenas 15% deles utilizaram um tempo menor que 60 minutos, sendo a maioria com tempos entre 60 a 120 minutos, e 26% fizeram a reação diaforase em mais de 4 horas, inclusive um deles executado em 4 dias (HUNOT et al., 1996). A temperatura da reação usada na maioria foi de 37-38°C, porém com trabalhos feitos em temperatura ambiente (3 trabalhos) e até a 4°C (1 trabalho). Quase todos foram feitos em

regime *free-floating* e não houve descrição suficiente a respeito de luminosidade, umidade e agitação constante.

1.3.2.1.4 – LIMITAÇÕES E VANTAGENS DO MÉTODO

Mesmo sendo uma técnica amplamente utilizada, a HQ NADPHd tem algumas possíveis limitações, e a mais polêmica seria a falta de especificidade de marcação das células. Para entendermos melhor esta questão, devemos recordar detalhes sobre as enzimas com atividade diaforase.

A “Enzyme Commission” enumera pelo menos 6 enzimas NADPH diaforase (ou desidrogenase) em mamíferos, as quais também reduzem NBT a formazan, que são: NADPH desidrogenase (flavina, EC 1.6.99.1), NAD(P)H desidrogenase (quinona, EC 1.6.99.2), NADPH desidrogenase (quinona, EC 1.6.99.6), NADPH-ferrihemoproteína redutase (EC 1.6.2.4, sendo este um complexo enzimático também conhecido como NADPH citocromo P450 redutase ou CPR, e NADPH citocromo c_2 redutase), NADPH-citocromo- c_2 redutase (EC 1.6.2.5) e NAD(P)⁺ transhidrogenase (EC 1.6.1.1) (BLOTTNER; GROZDANOVIC; GOSSRAU, 1995).

Após a descoberta da NOS como proteína relacionada com a reação NADPHd em neurônios, alguns trabalhos mostraram que nem todos neurônios marcados pela NADPHd produziam NOS (DAWSON et al., 1991; BLOTTNER; GROZDANOVIC; GOSSRAU, 1995). Matsumoto et al. (1993), através de ensaios enzimáticos que avaliaram de modo isolado a atividade da NOS e da NADPHd, mostraram que a maior parte da atividade da NOS é citosólica, enquanto a da NADPHd é nas organelas (fração particulada), não se sobrepondo. Além disso, na presença do fixador PFA, a atividade NADPHd da fração particulada foi totalmente abolida com PFA a 4%, enquanto que na porção citosólica (onde se tem mais atividade da NOS) ela se manteve em 40-60%. Os autores concluíram que a atividade NADPHd relacionada à nNOS é em uma fração mínima de toda atividade diaforase de um neurônio, e que o uso de fixadores como o PFA é essencial para aumentar a especificidade da HQ para a proteína NOS. Os mesmos achados foram confirmados por Tracey et al (1993). A enzima que apresenta maiores chances de apresentar atividade diaforase não associada à NOS no encéfalo é a CPR, que inclusive apresenta cerca de 50% de homologia de sua estrutura com a NOS, sugerindo que as duas tenham funções análogas (BREDT; SNYDER, 1992; MATSUMOTO et al., 1993; BLOTTNER; GROZDANOVIC; GOSSRAU, 1995; NORRIS et al., 1996); contudo, a CPR é descrita como sensível à fixação (MATSUMOTO et al., 1993). Logo, a insensibilidade da atividade NADPHd associada à NOS aos fixadores confere a especificidade desejada à técnica.

Outro problema é que a reação não diferencia entre as 3 isoenzimas da NOS (BEESLEY, 1995), porém o aspecto morfológico da célula ajuda a identificar apenas os neurônios marcados. Além disso, a necessidade do uso de tecido fresco é um limitante desta reação. Em encéfalos humanos, por todas as dificuldades inerentes de sua obtenção, isto acrescenta variáveis e obstáculos importantes à reação. A fotossensibilidade dos substratos NADPH e NBT também é uma dificuldade técnica da reação.

Como vantagens, a deposição de formazan confere às células marcadas uma boa nitidez e contraste com o fundo, possibilitando uma análise morfométrica de maior qualidade, principalmente para contagem de dendritos e medida de seus prolongamentos. Além disso, o sinal da marcação celular é bastante duradouro. Trata-se de uma técnica de rápida realização (realizada em algumas horas), sem necessidade de processos de recuperação antigênica que possam agredir o tecido, todos os substratos estão disponíveis comercialmente e seus protocolos são de simples execução.

1.3.2.2 – IMUNOHISTOQUÍMICA PARA nNOS

A IHQ é uma técnica histológica baseada no uso de peptídeos sintéticos ou proteínas purificadas (anticorpos) para detectar a presença de determinadas proteínas, com o maior grau possível de sensibilidade e especificidade. A possibilidade de conciliar a interação antígeno-anticorpo com a habilidade de visualizar esta imunoreatividade em tecidos por microscopia tem sido de fundamental importância na medicina atual (BEESLEY, 1995; NORRIS et al., 1996).

Existem várias técnicas de IHQ atualmente, e uma das mais utilizadas é o método indireto de avidina e biotina. Este processo se baseia nas ligações entre o antígeno a ser estudado e um anticorpo que se liga diretamente a ele (anticorpo primário), e entre o anticorpo primário e outro anticorpo dirigido contra as imunoglobulinas da espécie animal onde foi produzido o anticorpo primário (anticorpo secundário). Este anticorpo secundário está marcado com uma substância chamada biotina, a qual se ligará com outra proteína chamada avidina, formando o complexo avidina-biotina. O complexo avidina-biotina contém moléculas de peroxidase, que tem como função oxidar uma substância cromógena na presença de H_2O_2 , revelando assim o sinal adequado para detecção de determinado antígeno *in situ*.

A impregnação em parafina e as substâncias fixadoras do tecido alteram a qualidade do resultado final da IHQ. Os fixadores aldeídos formam pontes de metileno para preservação das moléculas e provoca alteração nas estruturas terciárias e quaternárias de proteínas, causando barreiras estéricas que limitam a acessibilidade do anticorpo ao seu antígeno-alvo, principalmente quando se trata de anticorpos monoclonais com um único epítipo. Além disso, é sabido que o tempo de fixação também influencia a ocorrência deste evento. Para evitar o problema de anticorpos não-

reativos e IHQ falso-negativas, foram criados métodos de recuperação antigênica, sendo os mais efetivos os baseados em lavagens abundantes em água ou tampão Tris e o aquecimento do tecido (por exemplo, em banho-maria termostatzado) em tampões com pH entre 6 a 8 (EVERS; UYLINGS; SUURMEIJER, 1998).

Bredt et al. (1990) foram os primeiros a obter um anticorpo para NOS e a utilizá-lo para análise imunohistoquímica em roedores, porém se tratava de um anticorpo policlonal que detectava tanto nNOS quanto iNOS (POLLOCK et al., 1995). Egberongbe et al. (1994) fizeram o primeiro estudo imunohistoquímico de localização de neurônios nitrérgicos no encéfalo usando um anticorpo primário policlonal feito em coelho contra nNOS. As gerações seguintes de anticorpos policlonais se tornaram mais específicas para a forma neuronal da NOS, possibilitando uma análise mais específica de neurônios nitrérgicos no SNC.

Conforme comentado acima (ver 1.3.2.1.4 – LIMITAÇÕES E VANTAGENS DO MÉTODO), mesmo que a imunorreatividade da IHQ para nNOS tenha uma alta correlação com a marcação da HQ para NADPHd no SNC após fixação em aldeído, há uma real especificidade antigênica na IHQ para a enzima nNOS que a reação NADPHd não fornece. Foi visto que, em condições não-ideais de fixação em aldeído, alguns neurônios (3 a 5% do total analisado) são marcados apenas na IHQ nNOS, e não na NADPHd (GONZALEZ-HERNANDEZ et al., 1996), sugerindo que a atividade NADPHd possa ser positiva apenas em neurônios que estejam ativamente sintetizando NO, enquanto que a detecção por IHQ revele todas as células que contêm NOS (RODRIGO et al., 1994). O tempo de execução da técnica IHQ é um fator de desvantagem (segundo nossos protocolos, a reação NADPHd pode ser executada em algumas horas, enquanto que a IHQ demora quase 2 dias). Mesmo sendo técnicas diferentes, com seus pontos fortes e fracos, ambas podem ser usadas em situações específicas para a detecção de neurônios nitrérgicos.

1.4 - NEURÔNIOS NITRÉRGICOS NOS NÚCLEOS DA BASE EM HUMANOS

O desenvolvimento de novas técnicas, como as descritas no capítulo anterior, para marcar a proteína nNOS e neurônios que contêm NO possibilitou o estudo destes tipos celulares no encéfalo humano de indivíduos normais e doentes. Considerando-se a importância das estruturas subcorticais do encéfalo em doenças degenerativas como a DP, DH, DA e paralisia supranuclear progressiva, é fundamental que se conheça com detalhes a localização e morfologia do sistema nitrérgico nos NNBB de pessoas normais e com doenças neurológicas e psiquiátricas.

1.4.1 – ESTUDOS EM ENCÉFALOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS

Kowall et al. (1987) publicaram uma avaliação extensa e completa dos neurônios nitrérgicos no estriado dorsal e ventral humano, usando HQ para NADPHd e IHQ para neuropeptídeo Y e somatostatina. Foi visto que a distribuição destes neurônios é predominante na matriz estriatal em relação aos estriassomos, e que as células NO-positivas coexpressam somatostatina e neuropeptídeo Y, fato já descrito em ratos. Este padrão de compartimentalização matriz-estriassomo surge posteriormente no desenvolvimento nervoso pós-natal, já que em fetos e crianças os neurônios nitrérgicos estão mais presentes em estruturas semelhantes aos estriassomos, chamadas de pré-estriassomos (SAJIN; SESTAN; DMITROVIC, 1992).

Egberongbe et al. (1994), a partir de estudo com IHQ para nNOS, construíram o primeiro mapa geral da distribuição de neurônios nitrérgicos no encéfalo humano, e foi visto que as células NO-positivas estão presentes em regiões dos NNBB como estriado dorsal e NPP, mas não no GP, SN e NST. Este trabalho, além de ter sido realizado com apenas 4 encéfalos, tem vários problemas de método que podem ter prejudicado seus resultados.

Nisbet et al. (1994) analisaram os neurônios nitrérgicos nos NNBB através de HHIS em indivíduos normais. Sua presença foi vista no estriado, GP, claustró, córtex insular adjacente e, de modo inédito, no NST. Não houve presença na SN e nos núcleos talâmicos. No putâmen e caudado, a atividade nitrérgica foi detectada em neurônios espalhados de médio tamanho, compreendendo de 1 a 2% do total da região, em correspondência com os interneurônios NO-positivos. Até este estudo, a presença de NO no NST só havia sido detectada em gatos (MIZUKAWA et al., 1989).

Usando IHQ para nNOS, Ohyu e Takashima (1998) estudaram encéfalos de fetos humanos e crianças para determinar a ontogênese dos neurônios nitrérgicos, e foi visto que o pico de densidade neuronal NO-positiva no putâmen e caudado está entre 22 e 36 semanas de idade gestacional, e que o NPP tem boa atividade nitrérgica desde a 17ª semana gestacional.

Em estudo semelhante, Blum-Degen et al. (1999) fizeram a pesquisa da proteína nNOS através de medidas enzimáticas e Western Blotting em 28 regiões do encéfalo humano. Foi mostrado que o estriado, o GP e o NST têm importante atividade nitrérgica, em contraste com o trabalho baseado em IHQ de Egberongbe et al. (1994).

Johannes et al. (2003) analisaram estes interneurônios nitrérgicos localizados no putâmen humano com HQ para NADPHd e 12 tipos distintos de neurônios foram descritos, classificados de acordo com as dimensões de seu *soma* e disposição da árvore dendrítica. Trabalho semelhante (LEONTOVICH; MUKHINA; FEDOROV, 2004) também analisou a diversidade morfológica destes interneurônios no estriado dorsal e na amígdala.

Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya (2005) publicaram trabalho avaliando a distribuição topográfica dos neurônios nitrérgicos no estriado dorsal utilizando HQ para NADPHd, e foi demonstrado que as áreas com maior densidade celular foram o giro, corpo e cauda do caudado (as regiões mais caudais do caudado) em relação ao putâmen, e estes neurônios se concentraram principalmente na matriz e nas bordas dos estriassomos.

1.4.2 – ESTUDOS EM DOENÇAS NEUROLÓGICAS E PSIQUIÁTRICAS

Em estudo pioneiro com encéfalos humanos, Ferrante, Kowall e Beal (1985) avaliaram a população neuronal no caudado de pacientes com DH e controles, através de HQ para NADPHd, e notaram que os neurônios não-espinhosos estriatais NO-positivos estavam mais preservados na DH que os neurônios sem atividade nitrérgica (NME). Estes neurônios foram mais bem caracterizados morfolologicamente em trabalho posterior (FERRANTE et al., 1987).

Hirsch et al. (1987) estudaram a perda neuronal do NPP na DP e na paralisia supranuclear progressiva, utilizando HQ para NADPHd e acetilcolinesterase, e foi visto uma diminuição dos neurônios nitrérgicos e colinérgicos nas duas doenças, o que evidenciou a existência de processos neurodegenerativos ocorrendo também em células não-dopaminérgicas.

Morton, Nicholson e Faull (1993) testaram um protocolo diferente de HQ para NADPHd, retirando a fixação com PFA, com intuito de melhorar o padrão de coloração. De acordo com este processo, compararam a população neuronal NO-positiva no estriado e GP entre encéfalos normais e pacientes com DH, e foi visto que: (1) as duas regiões apresentaram neurônios nitrérgicos, sendo no estriado distribuídos homogeneamente por suas regiões, e no GP, mais concentrados no GPe, e (2) o neurópilo estriatal marcado pela NADPHd está dramaticamente reduzido na DH em comparação com indivíduos normais, contudo a população neuronal nitrérgica está preservada.

Em estudo que comparou a população neuronal no estriado de humanos com e sem DA, Selden et al. (1994) utilizaram várias técnicas para marcação celular, incluindo as nitrérgicas (HQ para NADPHd), e foi visto que não há diferenças no número de neurônios NO-positivos entre indivíduos com e sem DA. Associado, mostrou-se que a densidade de neurônios nitrérgicos no caudado é 2 a 3 vezes maior que no putâmen. Este achado foi posteriormente replicado por Tao et al. (1999).

Dois trabalhos do mesmo ano (1994) avaliaram a população nitrérgica no estriado de indivíduos com doenças neurodegenerativas, através da HQ para NADPHd, com resultados divergentes: Mufson e Brandabur (1994) quantificaram os neurônios nitrérgicos no estriado de pessoas normais, com DA e com DP, mostrando que a densidade celular é a mesma nas três condições, enquanto que Böckelmann et al. (1994) relataram uma redução de neurônios NO-positivos de quase 4 vezes no putâmen de indivíduos com DP.

Seguindo a linha de investigação da relativa preservação de neurônios nitrérgicos estriatais na DH, Norris et al. (1996) estudaram as células NO-positivas através de HQ para NADPHd, IHQ para nNOS e HHIS para mRNA da nNOS em humanos. Estes neurônios mantiveram sua densidade neuronal mesmo com a degeneração da DH, conforme visto em vários trabalhos, porém a expressão do mRNA da enzima NOS se mostrou reduzida nos encéfalos com doença, principalmente nas porções dorsais do caudado e putâmen.

Eve et al. (1998) fizeram estudo usando HHIS para detectar a expressão de mRNA da nNOS nos NNBB de doentes com DP. Foi visto que há um aumento na expressão de nNOS no NST e na lâmina medular medial do GP, e uma discreta redução no putâmen, e se acredita que estes achados sejam respostas compensatórias do organismo ao processo de depleção dopaminérgica nigroestriatal.

Lauer et al. (2005) compararam a presença e a morfologia de neurônios nitrérgicos no putâmen de pacientes esquizofrênicos e normais, através de HQ para NADPHd e IHQ para nNOS, com achados de alterações de tamanho e no padrão de dendritos nos esquizofrênicos, assim como redução na contagem destes neurônios.

Avaliando encéfalos de pessoas com diagnóstico de depressão maior, transtorno bipolar, esquizofrenia e controles com coloração para NADPHd, Fritzen et al (2006) notaram redução significativa do número de neurônios NO-positivos no putâmen de pessoas com esquizofrenia em relação aos controles.

Em conjunto, estes trabalhos mostram que, com exceção ao estriado dorsal, a quantidade de estudos envolvendo GP, NST e NPP são insuficientes para uma conclusão mais objetiva sobre a presença de neurônios nitrérgicos nestas áreas, às vezes com dados conflitantes. Consideramos que grande parte dos resultados discordantes entre os trabalhos se deve à diversidade de metodologias

usadas, sem uma padronização de análise destas células. Percebe-se também o consenso de que regiões importantes associadas aos NNBB, como SN e tálamo, não apresentam células NO-positivas.

1.5 - NEURÔNIOS NITRÉRGICOS E O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO

1.5.1 – ASPECTOS GERAIS DO ENVELHECIMENTO NO ENCÉFALO

O encéfalo sofre várias mudanças macroscópicas e microscópicas ao longo do tempo, no chamado envelhecimento normal. Estas modificações devem ser distintas de processos patológicos do SNC, como demências e outras doenças neurodegenerativas, portanto é essencial que se conheça com detalhes quais são estes processos e como ocorrem.

Dentre as primeiras alterações notadas em encéfalos de pessoas idosas em relação às mais jovens, a redução no peso e volume encefálico foi bastante estudada. A perda de volume e peso do encéfalo se inicia a partir da terceira década de vida, tornando-se mais acentuada a partir dos 50 anos, quando há uma diminuição de 7 a 8% de seu peso por ano, e 2 a 3% de seu volume a cada década (SCHOCHET, 1998), e se acentua mais ainda após os 70 anos (SHANKAR, 2010). Esta perda de volume ocorre de modo difuso e uniforme na substância branca, mas se mostra heterogênea na substância cinzenta, onde é mais acentuada no estriado, córtex frontal e parietal (MRAK; GRIFFIN; GRAHAM, 1997).

Em 1955, Brody avaliou o córtex de um reduzido número de encéfalos humanos com técnicas bidimensionais, e mostrou que há um declínio de 10 a 60% da densidade neuronal cortical entre a infância e a velhice (BRODY, 1955 apud SHANKAR, 2010)¹¹. Após outros trabalhos que corroboraram seus achados, a perda neuronal foi estabelecida como a causa da redução de volume e peso do encéfalo no envelhecimento, e isto se tornou um paradigma da época.

Na década de 1980, a introdução de análises morfológicas baseadas nos princípios da estereologia pode gerar estimativas de densidade neuronal mais fidedignas e com menos vieses, por considerar a natureza tridimensional das estruturas cerebrais (SHANKAR, 2010; BURKE; BARNES, 2006). Estes novos estudos mostraram uma desconcertante preservação na densidade de neurônios através do decorrer do envelhecimento na maioria das regiões encefálicas examinadas em humanos, primatas não-humanos e roedores, e com isso, morte neuronal significativa já não significaria envelhecimento normal, mas sim processo degenerativo patológico (SHANKAR, 2010; BURKE; BARNES, 2006). Uma exceção a esta observação é a área 8A do córtex prefrontal dorsolateral de primatas não-humanos (SMITH et al., 2004).

O envelhecimento tem considerável influência sobre parâmetros mais sutis e complexos do tecido nervoso, como dados morfométricos do corpo neuronal, da árvore dendrítica e das espinhas

---

¹¹ BRODY, H. Organization of the cerebral cortex III: A study of aging in the human cerebral cortex. **J Comp Neurol**, v. 102, p. 511-516, 1955.

dendríticas. O sistema de dendritos e espinhas dendríticas corresponde a 90% da área de superfície de um neurônio, e cerca de 80% do consumo de glicose celular é direcionado às bombas de sódio e potássio nas membranas celulares; como o envelhecimento está associado a uma redução global dos gastos metabólicos do sistema nervoso, é de se esperar que a idade se relacione com alterações degenerativas em dendritos e espinhas (JACOBS; DRISCOLL; SCHALL, 1997). Alterações como redução no número de dendritos, assim como seu encolhimento, irregularidades na árvore dendrítica, diminuição no volume, distribuição, número das espinhas dendríticas são descritas em vários estudos com encéfalo de animais e humanos idosos (DICKSTEIN et al., 2007), porém não são consensuais. Há evidências de que há aumento da ramificação da árvore dendrítica e seu comprimento no hipocampo humano (BUELL; COLEMAN, 1979 apud SHANKAR, 2010)¹², e que não há redução progressiva da extensão dos dendritos com a idade em hipocampo de roedores (FLOOD, 1993 apud BURKE; BARNES, 2006; PYAPALI; TURNER, 1996 apud BURKE; BARNES, 2006).

Além destas alterações, acredita-se que o envelhecimento natural possa ter efeitos negativos sobre neurotransmissores (DICKSTEIN et al., 2007), modificações nas propriedades eletrofisiológicas de grupamentos neuronais, com diferenças nos padrões de descarga neuronal (BURKE; BARNES, 2006; DICKSTEIN et al., 2007), redução na função e número de sinapses envolvidas em processos de plasticidade e alterações na sinalização neuronal e expressão de genes (BURKE; BARNES, 2006). Estas evidências mostram que as mudanças durante o envelhecimento normal são mais sutis e seletivas do que se acreditava antes, justificando parcialmente o declínio funcional característico desta etapa da vida.

1.5.2 – O ENVELHECIMENTO NOS NÚCLEOS DA BASE

Os efeitos do envelhecimento normal sobre os NNBB são pouco conhecidos, variando bastante quanto à área estudada. Vários estudos evidenciaram a redução de volume do estriado com a idade, seja por análise pós-morte ou por métodos de imagem (RAZ; TORRES; ACKER, 1995), com redução linear do número de neurônios do putâmen com a idade (BUGIANI et al., 1979 apud HUBBLE, 1998)¹³. Através de técnicas estereológicas, Schmitt, Eggers e Haug (1995) refutaram este conceito clássico, mostrando que a densidade neuronal putaminal aumenta com o progredir da idade, com redução na área destes neurônios. Sendo assim, a redução de volume do estriado não pode ser atribuída apenas a perda neuronal, mas talvez por seu encolhimento. Outra modificação descrita com a idade é a redução

¹² BUELL, S.J.; COLEMAN, P.D. Dendritic growth in the aged human brain and failure of growth in senile dementia. **Science**, v. 206, p. 854-856, 1979.

¹³ BUGIANI, O. et al. Nerve cell loss with aging in the putamen. **Eur Neurol**, v. 17, p. 286-291, 1978.

progressiva na expressão estriatal de receptores D1, D2 e da proteína transportadora de DA (HUBBLE, 1998; MENG et al., 1999).

Desde McGeer, McGeer e Suzuki (1977), sabe-se que a SN humana sofre modificações com o envelhecimento: estes autores descreveram uma redução no número de neurônios nigrais diretamente proporcional à idade, sendo de 48% em pessoas de 60 anos (MCGEER; MCGEER; SUZUKI, 1977 apud CABELLO et al., 2002)¹⁴. Vários estudos subsequentes confirmaram o achado (MANN; YATES; MARCYNIUK, 1984 apud CABELLO et al., 2002¹⁵; FEARNLEY; LEES, 1991), e através de trabalhos feitos com estereologia, também foi notado o aumento linear do volume do neurônio da SN ao longo dos anos, sugerindo algum mecanismos compensatório da perda neuronal progressiva (CABELLO et al., 2002; RUDOW et al., 2008).

Há pouco dados sobre as mudanças provocadas pelo envelhecimento sobre o GP, mas há evidências de que haja uma tendência à redução de seu volume com a idade (RAZ; TORRES; ACKER, 1995), e não houve modificações no núcleo entopeduncular (análogo ao GPi em primatas) de camundongos mais velhos (STURROCK, 1991).

O NST humano tem mostrado mudanças de localização com o envelhecimento, principalmente uma tendência ao deslocamento lateral da estrutura em pessoas mais idosas (DEN DUNNEN; STAAL, 2005; KEUKEN et al., 2013). Em camundongos, não foi visto perda neuronal progressiva no NST com o decorrer da idade, porém foi descrito um possível aumento do volume do núcleo em animais mais velhos (STURROCK, 1991).

Quanto ao NPP, há evidências em roedores de que haja uma manutenção do número de neurônios com o envelhecimento (LOLOVA; LOLOV; ITZEV, 1997; BASKERVILLE et al., 2006), porém há uma série de modificações morfológicas neuronais com a idade, como redução da área, diâmetro e intensidade da marcação celular para NADPHd, e uma discreta regressão da árvore dendrítica destes neurônios (LOLOVA; LOLOV; ITZEV, 1996; LOLOVA; LOLOV; ITZEV, 1997). Em humanos, as alterações provocadas com a idade no número total de neurônios do NPP obedecem uma função quadrática em forma de “U”: há uma progressiva redução na quantidade de neurônios a partir dos 30 anos, que se estabiliza por volta da nona década de vida, e nos indivíduos centenários a quantidade de células volta a aumentar (RANSMAYR et al., 2000).

---

¹⁴ MCGEER, P.L.; MCGEER, E.G.; SUZUKI, J.S. Aging and the extrapyramidal function. **Arch Neurol**, v. 34, p. 33-35, 1977.

¹⁵ MANN, D.M.; YATES, P.O.; MARCYNIUK, B. Monoaminergic neurotransmitter systems in presenile Alzheimer's disease and in senile dementia of Alzheimer type. **Clin Neuropathol**, v. 3, p. 199-205, 1984.

1.5.3 – EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE O SISTEMA NITRÉRGICO DOS NÚCLEOS DA BASE

Não se sabe ainda exatamente de que forma a idade pode influenciar o sistema nitrérgico encefálico, porém como o NO está envolvido em doenças neurodegenerativas (no papel de mediador tóxico ou protetor, conforme discutido acima) e tem importantes funções de sinalização neuronal como neurotransmissor, é essencial que conheça melhor a natureza destas consequências específicas do envelhecimento.

Em trabalho já descrito acima, Selden et al. (1994) também avaliaram, de modo indireto, as repercussões do envelhecimento sobre a área total, área do *soma* e densidade neuronal estriatal dos neurônios nitrérgicos, e não viram diferenças significativas. Contudo, o número de encéfalos normais total foi apenas 8, sendo três destes de indivíduos idosos.

Yamada et al. (1996) avaliaram as mudanças com a idade na contagem de neurônios NO-positivos através de HQ para NADPHd no córtex e estriado de ratos. Foi visto que a quantidade de todos tipos neuronais no córtex e no estriado se mantinha estável em ratos jovens e velhos, porém as células nitrérgicas apresentavam significativas reduções na contagem de 68% no estriado de animais mais idosos em relação aos jovens, respectivamente. A atividade enzimática da NOS não mostrou diferença entre os grupos etários.

Kuo, Hengemihle e Ingram (1997) realizaram a análise de neurônios nitrérgicos do estriado e hipocampo de ratos jovens e idosos, usando como parâmetros a densidade neuronal, a densidade óptica da marcação do neurópilo e a área do *soma*. Foi detectada uma redução quase linear da densidade de neurônios NADPHd-positivos no estriado com a idade, havendo um declínio total de cerca de 30% entre 6 meses e 26 meses de vida, além de uma redução da intensidade do neurópilo e na área do corpo neuronal no grupo mais velho.

Em artigos já comentados acima, foram vistos neurônios nitrérgicos no NPP de ratos através da NADPHd, e detectadas várias alterações morfológicas associadas ao envelhecimento, como encolhimento das células, redução na intensidade de marcação, redução da discreta árvore dendrítica, porém sem modificações na contagem total de neurônios NADPHd-positivos (LOLOVA; LOLOV; ITZEV, 1996; LOLOVA; LOLOV; ITZEV, 1997).

Em trabalho também já citado anteriormente, Blum-Degen et al. (1999) avaliaram se a idade teria algum efeito sobre a quantidade da proteína nNOS em várias regiões do encéfalo, medidas por Western Blotting, e não foi visto efeito do envelhecimento sobre esta variável.

Em 2000, Cha et al. investigaram os efeitos do envelhecimento no SNC sobre os NNBB em ratos. Foram estudados 2 NNBB clássicos (estriado dorsal e NST) e 3 áreas também associadas à

fisiopatologia da DA, como a substância inominada, núcleo acumbens e tubérculo olfatório. O número de neurônios NO-positivos foi significativamente menor no estriado dorsal e na substância inominada, enquanto houve um aumento significativo na contagem celular no NST (CHA et al., 2000). Estes resultados reforçam os achados de Eve et al. (1998) na hipótese de que o NO esteja associado a processos compensatórios à depleção dopaminérgica nigroestriatal.

Também usando ratos, Necchi et al. (2002) avaliaram os efeitos do envelhecimento sobre o sistema nitrérgico cerebral com várias abordagens (histologia com NADPHd e IHQ para nNOS, quantificação da proteína nNOS por Western Blotting e ensaio bioquímico de atividade enzimática da nNOS), com foco no estriado, neocórtex, córtex olfatório e hipocampo. Os resultados mostraram que a presença e atividade do sistema gerador de NO no estriado de ratos adultos jovens foi maior do que em animais idosos, tanto pela densidade destes neurônios quanto pela atividade cálcio-dependente da nNOS.

Del Moral et al. (2004) avaliaram especificamente os efeitos da idade sobre o estriado de roedores, através de HQ para NADPHd e IHQ para nNOS, e também foi vista uma redução na população nitrérgica neste núcleo, tanto pela técnica da NADPHd quanto nos neurônios imunorreativos para nNOS. Esta redução de densidade celular se correlacionou com o aumento da área ocupada por fibras de substância branca no estriado, a qual foi maior nos animais mais velhos.

Em resumo, os estudos em animais mostram que os neurônios nitrérgicos localizados nos NNBB, e em particular no estriado, sofrem consequências do processo de envelhecimento, seja por perda neuronal ou por alterações morfológicas nestas células. Tais modificações podem provocar instabilidades na transmissão de sinais da complexa circuitaria dos NNBB, com possíveis implicações funcionais e interações com as doenças neurodegenerativas que envolvem estas estruturas. Em humanos, as informações sobre os efeitos do envelhecimento sobre este peculiar sistema de neurotransmissão baseado na molécula gasosa NO são bastante escassas, sendo importante sua compreensão plena.

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi investigar se o envelhecimento provoca alterações nos neurônios nitrérgicos presentes nos NNBB do encéfalo humano. Além disso, agregar mais conhecimento sobre os aspectos morfológicos e de distribuição das células que compõem o sistema nitrérgico em regiões de fundamental importância para a regulação de diversas funções do SNC humano.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Avaliar a influência do envelhecimento sobre a densidade neuronal e sobre parâmetros morfométricos dos neurônios nitrérgicos nos NNBB, em indivíduos sem doenças neurológicas e psiquiátricas;

2) Avaliar aspectos morfológicos e de distribuição de neurônios nitrérgicos nos NNBB de indivíduos sem doenças neurológicas e psiquiátricas;

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - AQUISIÇÃO DOS ENCÉFALOS HUMANOS

Foram avaliados encéfalos oriundos de indivíduos falecidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, do período de outubro de 2011 a abril de 2012, e submetidos ao exame de necropsia por indicação médica e autorização familiar prévia. Os encéfalos foram divididos em 2 grupos, conforme faixa etária (Grupo I – Idade menor que 60 anos e Grupo II – Idade maior ou igual a 60 anos). Os seguintes critérios de seleção foram usados:

- Critérios de Inclusão

- a) Indivíduos falecidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com indicação médica de exame necroscópico e com autorização familiar prévia do procedimento;
- b) Idade maior que 20 anos;

- Critérios de Exclusão

- a) História de doença neurológica ou psiquiátrica prévia;
- b) Diagnóstico de morte encefálica;
- c) Diagnóstico de síndrome de imunodeficiência adquirida humana (SIDA);
- d) Tempo Morte-Necropsia > 24 horas;

3.2 – MODO DE COLETA DOS ENCÉFALOS

Após a retirada do encéfalo da caixa craniana, o órgão foi lavado várias vezes para retirada do excesso de sangue. Em ambiente com temperatura mais baixa, foi realizada a dissecação do encéfalo em prancha conforme sequência abaixo:

- a) Retirada do cerebelo por secção dos pedúnculos cerebelares;
- b) Separação entre tronco encefálico e cérebro no nível do colículo superior e do polo inferior dos corpos mamilares;
- c) Hemissecação do cérebro no eixo sagital, no nível da linha média;
- d) Secção coronal do hemisfério cerebral no nível do polo mais rostral do joelho do corpo caloso (sob visão sagital);

- e) Secção coronal do hemisfério cerebral no nível do polo mais caudal do pulvinar do tálamo (sob visão sagital);
- f) Secção axial do hemisfério cerebral no nível do giro do cíngulo;
- g) Secção paramediana no nível do giro da ínsula, isolando-se a região de interesse 1 (RDI 1), que engloba o estriado, o GP e o NST (Figura 12);
- h) Isolamento da região do tronco encefálico, separada do cérebro, formada por mesencéfalo e ponte, denominada de RDI 2. Esta área contém SN e NPP (Figura 12);

Figura 12: Regiões de interesse (RDI) captadas nos encéfalos estudados. A RDI 1 inclui o estriado, o GP e o NST, enquanto que a RDI 2 contém a SN e o NPP (adaptado de MAI; ASSHEUER; PAXINOS, 2004).

Em cada indivíduo, um hemisfério foi utilizado para coleta de material para a avaliação histológica (incluindo as reações histoquímicas, imunohistoquímicas e colorações de rotina, como hematoxilina/eosina e Nissl) do estudo, e o outro hemisfério foi usado para coleta de porções de cada um dos NNBB estudados (estriado, GP, NST, SN e NPP) para posteriores análises. Este material para estudos posteriores foi colocado em tubos criogênicos, identificado, congelado em nitrogênio líquido logo após a dissecação, e armazenado em freezer a -80°C . A análise deste material não foi realizada durante a realização deste trabalho.

Uma ficha de coleta de informações foi preenchida para cada um dos indivíduos selecionados. Foram registrados dados sobre antecedentes pessoais mórbidos e familiares, uso de medicações crônicas e substâncias de abuso, *causa mortis*, achados no exame necroscópico geral e macroscópico

do encéfalo, intervalos de tempo entre as etapas de processamento do encéfalo, e foi realizada a aplicação de uma escala numérica de avaliação do estado de conservação do encéfalo pós-morte, específica para o exame neuropatológico (*Index of Agonal State – IAS*), descrita por Sherwood et al. (2012).

3.3 – FIXAÇÃO, CRIOPROTEÇÃO E ARMAZENAMENTO

Após o isolamento das RDI 1 e 2 destinadas ao estudo histológico, este material ficou imerso em PFA a 4% (diluído em tampão fosfato 0,1 M) e posto em geladeira por 1 hora. Em seguida, a RDI 1 foi seccionada no sentido coronal, em fatias de 0,5 cm de espessura, e novamente imersa na solução de PFA 4% para retirada do excesso de sangue por mais 1 hora. Este procedimento se mostrou eficaz na melhora da penetração do fixador no tecido fresco e para tornar a consistência de cérebro adequada para uma dissecação mais seletiva. Em última etapa, as secções da RDI 1 foram dissecadas para amostragem apenas das regiões do estriado, GP e NST, e este material armazenado em tubos Falcon com PFA 4% para fixação do tecido por 48 horas. A RDI 2 também foi armazenada em tubo Falcon com PFA 4%.

Após 2 dias, este material (RDI 1 e 2) foi imerso em solução de sacarose 30% para crioproteção até sedimentação do tecido no fundo do tubo, método usado como parâmetro de penetração adequada da sacarose no material. A partir do momento em que a penetração da sacarose no tecido se tornou satisfatória, o material foi congelado em solução de isopentano e gelo seco, sendo em seguida armazenado em freezer a -80°C até secção em criostato.

3.4 – PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DO ENCÉFALO

As amostras de RDI 1 e RDI 2 foram seccionadas em criostato com cortes de 30 µm de espessura, sendo os cortes de RDI 1 orientados no plano coronal e de RDI 2 no plano axial. Para a RDI 1, os cortes coletados para estudo histológico correspondem às coordenadas de um atlas microscópico de encéfalo humano (MAI; ASSHEUER; PAXINOS, 2004), onde o ponto zero de referência corresponde ao nível do corpo mamilar, e valores negativos estão anteriores ao ponto e valores positivos estão posteriores ao ponto:

- Estriado (10 níveis coletados): o nível 1 do estudo corresponde ao corte localizado em -20,0 mm do atlas; nível 2: -15,0 mm; nível 3: -10,0 mm; nível 4: -5,8 mm; nível 5: -2,0 mm; nível 6: +2,0 mm; nível 7: +9,3 mm; nível 8: +14,6 mm; nível 9: +19,9 mm; nível 10: + 25,2 mm;

- GP (3 níveis coletados): o nível 1 do estudo corresponde ao corte localizado em +2,0 mm; nível 2: +9,3 mm; nível 3: +14,6 mm;

- NST (3 níveis coletados): o nível 1 do estudo corresponde ao corte localizado em +13,3 mm; nível 2: +16,0 mm; nível 3: 18,6 mm;

Os cortes coletados da RDI 2 foram baseados no artigo de Nakamura et al. (1988), onde a região pontomesencefálica do tronco encefálico humano foi dividida em 4 níveis com suposta atividade nitrérgica (Figura 13). Nós coletamos uma secção no nível da SN e outras 3 secções englobando o NPP (corte rostral, no nível da decussação dos pedúnculos cerebelares superiores; corte médio, no nível do colículo inferior; corte caudal, no nível do *locus coeruleus*).

Figura 13: Níveis coletados para análise da região pontomesencefálica do tronco encefálico (RDI 2). Em A, secção no nível da SN; em B, C e D, secções englobando o NPP no nível da decussação dos pedúnculos cerebelares superiores (B), do colículo inferior (C), e do *locus coeruleus* (D) (retirado de NAKAMURA et al, 1988).

Em cada nível estudado (tanto da RDI 1 quanto da RDI 2), foram coletadas 5 secções, as quais foram armazenadas em tubos com solução anticongelante a -20°C, até a realização das reações histológicas.

3.5 – REAÇÕES HISTOLÓGICAS

3.5.1 – HISTOQUÍMICA PARA NADPH-DIAFORASE

Para a realização da reação NADPHd, foi utilizado protocolo adaptado de Vincent e Kimura (1992), e como controle positivo da qualidade das reações, uma secção de estriado de camundongo foi incubada simultaneamente com as secções de encéfalo humano.

Os cortes foram submetidos a 3 lavagens de 5 minutos em tampão fosfato (TF) e após incubados em solução contendo TF 0,1M (pH 8,0), com Triton X-100 0,3%, β -NADPH 1mg/ml (Sigma®) e Nitroblue Tetrazolium (NBT) 0,1mg/ml (Sigma®). A incubação foi feita em banho-maria a 37°C, com ambiente escuro, por 3 horas. Após, os cortes foram novamente lavados em TF e depois montados em lâminas cobertas por gelatina e deixados ao ar livre durante uma noite. Por último, as lâminas foram desidratadas por passagem em níveis crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol, e após cobertas com lamínula e solução de montagem (Entellan®, MERK, Darmstadt, Alemanha).

3.5.2 – IMUNOHISTOQUÍMICA PARA nNOS, NeuN e TH

Foram realizadas reações imunohistoquímicas para detecção de 3 proteínas: a nNOS, a NeuN (Neuronal Nucleus), um marcador histológico específico de neurônios, e a proteína tirosina hidroxilase (TH), marcadora de projeções dopaminérgicas. A proteína nNOS foi avaliada em cortes de NST, pois a marcação dos neurônios nitrérgicos foi sensivelmente melhor na IHQ para nNOS do que pela técnica da reação NADPHd. A proteína NeuN foi pesquisada em alguns cortes de estriado para marcação de todos os tipos neuronais, visando comparação com a presença específica da população nitrérgica. A TH foi estudada para avaliação das projeções dopaminérgicas oriundas principalmente da SN em direção ao estriado e ao NST. Como controle positivo da qualidade das reações, uma secção de estriado de camundongo foi incubada simultaneamente com as secções de encéfalo humano.

As IHQ foram realizadas por técnica *free-floating*, conforme o protocolo seguinte: inicialmente, foi realizada recuperação antigênica com aquecimento das secções em solução de tampão citrato de sódio a 50°C por 30 minutos (com arrefecimento posterior das secções durante pelo menos 20 minutos até temperatura ambiente), seguida por bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio por 30 minutos, e bloqueio antigênico dos sítios de ligação inespecíficos com albumina do soro bovino 2% (BSA –NGS, Jackson Immuno Research, E.U.A.) e soro normal 5% (para nNOS – soro normal de coelho; para NeuN – soro normal de cavalo; para TH – soro normal de cabra; todos produzidos pela Vector Laboratories®) por 60 minutos. Após, foi realizada incubação dos cortes em anticorpo primário

durante 18 a 48 horas sob temperatura de $\pm 21^{\circ}\text{C}$ em constante agitação, nestas titulações: anticorpo anti-nNOS feito em carneiro 1:15.000 (sheep anti-nNOS, K205, doado pelo Prof. Dr. Piers C. Emson, Babraham Institute, Cambridge, Reino Unido; 18hs), anticorpo anti-NeuN feito em camundongo 1:200.000 (mouse anti-NeuN monoclonal, Chemicon, E.U.A.), anticorpo anti-TH feito em coelho 1:8.000 (rabbit anti-TH, Pel Freez, E.U.A.; 18hs). Posteriormente, os cortes foram lavados e após incubados em anticorpos secundários por 90 minutos nestas titulações: para nNOS - anticorpo anti-carneiro feito em coelho 1:400; para NeuN – anticorpo anti-camundongo feito em cavalo 1:400; para TH – anticorpo anti-coelho feito em cabra (todos os anticorpos secundários foram produzidos pela Vector Laboratories®), e após novamente lavados. Em seguida, os cortes foram incubados durante 2 horas em complexo avidina-peroxidase biotinilada (solução A e B, Kit AVC, Vectastain, Vector Laboratories®), onde a avidina se liga às moléculas de biotina do anticorpo secundário. Esta solução foi preparada 30 minutos antes para permitir a formação do complexo. A revelação da atividade da enzima peroxidase foi feita pela adição do cromógeno tetrahidroclorato de 3,3-diamino-benzidina 10 mg (DAB, Sigma®) contendo 3 μl de peróxido de hidrogênio 30V (diluídos em 20 ml de TF 0,1M, pH 7,4) durante aproximadamente 10 minutos. Finalmente, as secções foram montadas em lâminas, desidratadas por passagem em níveis crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol, e após cobertas com lamínula e solução de montagem (Entellan®, MERK, Darmstadt, Alemanha).

Algumas secções foram submetidas à marcação combinada de neurônios nitrérgicos e fibras dopaminérgicas no NST, sendo feita inicialmente a HQ para NADPHd e, em seguida, a IHQ para TH.

3.5.3 – COLORAÇÕES ADICIONAIS

Para exclusão de processos patológicos, os cortes também foram montados em lâmina e corados com hematoxilina e eosina. As secções de NST foram também coradas pela técnica de Nissl para detecção de neurônios e comparação entre as densidades neuronais total e nitrérgica.

3.6 – ANÁLISE QUANTITATIVA HISTOLÓGICA

As imagens foram captadas por um microscópio Axiophot II, marca Zeiss (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), acoplado a uma câmera Axiocam MRc de 3.0 megapixel, a uma platina motorizada Zeiss e a um microcomputador com o programa AxioVison LE versão 4.8.1.0 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Oberkochen, Alemanha), gentilmente cedidos pelo Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Inicialmente, a imagem total da secção foi dividida em quadrantes (de quatro a nove divisões, dependendo do tamanho da

secção) através de marcação de pontos sobre a lâmina que continha a amostra de tecido. Em seguida, utilizando-se o módulo “MosaiX” do programa AxioVision LE, cada quadrante foi captado em alta resolução através de montagem automática em mosaico de quadros, adquiridos com aumento de 10x1,6x0.5. Desta forma, ao final do processo, cada quadrante era digitalizado em alta resolução. Para reagrupamento dos mosaicos, os quadrantes foram processados no programa Photoshop CS5 64-bit for Windows (Adobe Systems, San Jose, EUA) e remontados, de forma a gerar uma imagem integral da secção em alta resolução. As imagens foram armazenadas em arquivos no formato TIFF.

Dois tipos de análises foram realizadas nos NNBB estudados: contagem da densidade neuronal e análise morfométrica.

A contagem dos neurônios foi realizada manualmente, com o auxílio do software ImageJ 64-bit (National Institute of Health). Para evitar vieses de contagem, os arquivos foram identificados randomicamente, sem indicação se o corte pertenceria a um indivíduo adulto jovem ou idoso (análise cega). As lâminas foram analisadas com a técnica de varredura da lâmina por campos de 1 mm², onde os campos escolhidos para contagem eram selecionados alternadamente no estriado e sequencialmente no NST. O mesmo investigador realizou todas as contagens, para todos os núcleos avaliados. Os elementos celulares foram considerados adequados para a contagem quando apresentaram citoplasma bem marcado, com ramificações dendríticas típicas de células nervosas, dimensões e marcação compatíveis com neurônios (Figura 14). A análise das regiões citadas foi guiada por atlas de encéfalo humano (OLSZEWSKI; BAXTER, 1954; MAI; ASSHEUER; PAXINOS, 2004).

Figura 14: Fotomicrografia de neurônios nitrérgicos do estriado. Objetiva 10x, coloração pela NADPHd.

Para análise morfométrica, foram escolhidos cinco parâmetros morfométricos para serem quantificados em uma pequena amostra de neurônios do núcleo: área do *soma* (em μm^2), diâmetro máximo do *soma* (em μm), número de dendritos primários, comprimento dendrítico máximo (em μm) e a morfologia do neurônio. Foram utilizados os seguintes critérios para escolha do neurônio para análise morfométrica: (1) neurônios com citoplasma nitidamente marcado; (2) processos dendríticos que pudessem ser seguidos de sua porção mais proximal até a mais distal; (3) sem interrupções nos processos dendríticos ao longo de sua extensão; e (4) sem obstruções dos processos dendríticos por astrócitos, vasos sanguíneos, ou por processos de dendritos vizinhos (ROITMAN et al., 2002).

a) Análise do Estriado: No estriado, foram avaliadas as células marcadas pela reação NADPHd e pela IHQ para NeuN. Para os neurônios detectados pela reação NADPHd, foram realizadas a contagem de densidade neuronal nitrérgica (DNN) e a análise morfométrica.

Para melhor avaliação da contagem de densidade neuronal do estriado, foram utilizadas diferentes divisões do núcleo para sua análise: entre diferentes níveis de secção (Figura 15), entre subdivisões topográficas (baseada em Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya, 2005) (Figura 1), entre subdivisões funcionais (baseada em Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya, 2007) (Figura 16) e entre subsetores (baseada em Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya, 2005) (Figura 17).

Figura 15: Esquema representando os 10 níveis analisados no estriado (caudado e putâmen), da região mais rostral (nível 1) para a mais caudal (nível 10). AC: comissura anterior (adaptado de BERNÁCER, PRENSA e GIMENEZ-AMAYA, 2005).

Figura 16: Representação esquemática das subdivisões funcionais do estriado (sensorimotor, associativo e límbico), divididos de acordo com as conexões que cada área do estriado estabelece com diferentes regiões do córtex cerebral (adaptado de BERNÁCER, PRENSA e GIMENEZ-AMAYA, 2007).

Figura 17: Representação esquemática dos subsetores do caudado e putâmen em porções dorsomedial (DM), dorsolateral (DL), ventromedial (VM) e ventrolateral (VL). Nos níveis mais rostrais do núcleo (A), também consideramos o núcleo acumbens (NAc) como um subsetor específico, assim como o putâmen posteroventral nos níveis mais caudais (B) do estriado (não mostrado neste esquema) (adaptado de BERNÁCER, PRENSA e GIMENEZ-AMAYA, 2007).

Para a análise morfométrica, uma amostra de 4 neurônios em cada um dos 10 níveis foi escolhida, de modo aleatório (sendo 2 de caudado e 2 de putâmen), totalizando de 24 a 40 neurônios por indivíduo. Quanto à morfologia dos interneurônios estriatais marcados pela NADPHd, por ser muito variada, optamos por classificar nossos achados entre os três principais tipos morfológicos: os neurônios médios triangulares, médios ovais e médios redondos (JOHANNES, 2003).

Para os resultados da IHQ para NeuN feita no nível 1 do estriado, foi avaliada apenas a densidade neuronal total (DNT), e pela grande quantidade de neurônios envolvidos, foi optado nestas secções de modo excepcional por uma contagem semiautomatizada, através do método de segmentação, realizada pelo software ImageJ 64-bit (National Institute of Health).

b) Análise do GP e da SN: No GP e SN, a avaliação foi apenas qualitativa, pela baixa presença de células nitrérgicas nestas regiões.

c) Análise do NST: O NST foi estudado a partir da IHQ para nNOS, e realizada contagem de densidade neuronal e avaliação de algumas variáveis morfométricas (área do *soma*, diâmetro máximo do *soma*, número de dendritos primários e morfologia do neurônio).

Para melhor avaliação da contagem de densidade neuronal do NST, foram utilizadas diferentes divisões do núcleo para sua análise: entre diferentes níveis (anterior, médio e posterior) (Figura 18) e entre subdivisões funcionais (baseado em Parent e Hazrati, 1995b) (Figura 19).

Figura 18: Níveis de NST coletados para avaliação: nível 1 (anterior), próximo ao corpo mamilar; nível 2 (médio), próximo à SNpc; e nível 3 (posterior), próximo do núcleo rubro (adaptado de MAI; ASSHEUER; PAXINOS, 2004 e MARANI et al., 2008).

Figura 19: Esquema de subdivisões funcionais do NST. AS: porção associativa; LI: porção límbica; SM: porção sensorimotora (adaptado de PARENT e HAZRATI, 1995b).

A contagem total de neurônios do NST foi realizada a partir de secções coradas pela reação de Nissl. A presença de projeções dopaminérgicas no NST também foi avaliada pela IHQ para TH.

d) Análise do NPP: As células nitrérgicas do NPP foram avaliadas pelos resultados da reação NADPHd, e os neurônios deste núcleo foram analisados apenas em aspectos morfométricos (área do soma, diâmetro máximo do soma, número de dendritos primários, comprimento dendrítico máximo e morfologia do neurônio).

A análise da densidade neuronal do NPP não pode ser comparada entre os indivíduos pelas diferenças de marcação apresentadas pelos cortes coletados na região pontomesencefálica, e pela dificuldade em se estabelecer pontos de referência exatos para o seccionamento do tronco encefálico no criostato, proporcionando melhor base para a comparação da densidade neuronal do NPP, no mesmo nível, entre encéfalos diferentes.

3.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis quantitativas contínuas foram descritas com medidas de tendência central (média) e dispersão (erro padrão da média). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição de variáveis quantitativas. As variáveis categóricas foram estudadas em termos de distribuição de frequências.

As diferenças entre 2 grupos foram testadas com o teste t de Student (de amostras independentes) para variáveis de distribuição normal, e com o teste de Mann-Whitney para variáveis de distribuição não-normal.

As diferenças entre 3 grupos ou mais foram testadas com teste de análise de variância (ANOVA) de uma via para variáveis de distribuição normal (utilizado teste de comparações múltiplas de Bonferroni), e com o teste de Kruskal-Wallis para variáveis de distribuição não-normal (utilizado teste de comparações múltiplas de Dunn).

As correlações foram descritas com os coeficientes de Pearson para variáveis de distribuição normal, e de Spearman para variáveis de distribuição não-normal. As análises de regressão univariada e multivariada foram realizadas para avaliar se a DNN foi influenciada por variáveis potencialmente confundidoras (idade, intervalo entre óbito e fixação, intervalo entre fixação e crioproteção, índice de estado agônico, história de choque séptico antes do óbito, hemisfério e sexo).

Diferenças na distribuição de variáveis categóricas entre os grupos foram averiguadas com o teste do qui-quadrado ou com o teste exato de Fisher.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade da hipótese de nulidade (P) fosse menor que 0,05. Os resultados estão descritos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e valores de P.

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS versão 16.0.

4 - RESULTADOS

4.1 - CASUÍSTICA

Foram coletados 21 encéfalos para posterior análise, e um dos encéfalos foi excluído das análises por fraca marcação dos neurônios, tanto na HQ para NADPHd quanto para IHQ para nNOS (indivíduo com óbito por insuficiência respiratória por metástase pulmonares de adenocarcinoma de ovário, em cuidados paliativos, com intervalo entre óbito e fixação de 6 horas e 25 minutos). A análise final foi realizada com 20 encéfalos. As idades dos indivíduos variaram entre 31 a 86 anos (Figura 20).

Figura 20: Distribuição das idades dos indivíduos nos grupos adultos jovens e idosos.

A tabela 1 mostra a comparação de determinadas variáveis entre os grupos de adultos jovens e idosos (Tabela 1). Dentre as doenças de caráter crônico-degenerativo pré-existent nos indivíduos, as mais frequentes foram hipertensão arterial sistêmica (9 casos), cirrose hepática (4 casos) e neoplasias (3 casos). Das 20 pessoas, 8 tinham antecedente de etilismo crônico, e as medicações crônicas mais utilizadas foram os diuréticos (5 pessoas, todos com furosemida) e os antihipertensivos orais. Durante o período agônico imediatamente anterior à morte, 7 indivíduos necessitaram do uso de drogas vasoativas (noradrenalina, dopamina, dobutamina).

Variáveis	Adultos Jovens (n = 10), em Média ± DP ou %	Idosos (n = 10), em Média ± DP ou %	Valor de p
Idade no Óbito (anos)	42,8 ± 8,2	73,1 ± 10	< 0,001
Sexo Masculino	70	60	1,00
Hemisfério Direito	60	40	0,65
IMC (kg/m ²)	24,4 ± 5,2	24 ± 9,4	0,52
Peso do Encéfalo (g)	1277 ± 117,6	1203 ± 131	0,97
História de Etilismo	60	20	0,16
História de Doença Crônico-Degenerativa	70	70	1,00
Uso de Droga Vasoativa Pré-Morte	50	20	0,34
Choque Séptico Pré-Morte	20	30	1,00
Escala de Intervalo Agônico	4,9 ± 1,1	3,8 ± 1,1	0,05
Intervalo Óbito-Fixação (min)	485,5 ± 238,1	640,8 ± 330,3	0,24
Intervalo Fixação-Sacarose (h)	50 ± 2,4	53,4 ± 6,8	0,17
Intervalo Sacarose-Congelamento (dias)	108,5 ± 41	104,3 ± 30,5	0,79
Intervalo Congelamento-Secção em Criostato (dias)	83,5 ± 64,5	100,7 ± 78	0,43

Tabela 1: Tabela de dados demográficos, clínicos e pós-morte dos indivíduos dos grupos adultos jovens e idosos.

As causas de morte variaram bastante, porém o motivo mais frequente na casuística foi o choque hipovolêmico secundário à hemorragia digestiva alta (5 casos), todos ocorridos em indivíduos do grupo adulto jovem, sendo a etiologia predominante a síndrome de hipertensão portal causada por cirrose hepática. Outras causas de morte comuns foram o choque hipovolêmico por outras causas de sangramento (3 casos) e o infarto agudo do miocárdio (3 casos). Cinco indivíduos evoluíram ao óbito por infecções e choque séptico (Tabela 2).

Caso	Sexo	Idade	Intervalo Óbito-Fixação (horas)	Causa Mortis
1	F	31	8,5	Arritmia Cardíaca
2	M	36	5	Tamponamento Cardíaco
3	M	36	3,5	Pneumonia
4	M	37	11,5	Meningite Bacteriana
5	M	38	16	Choque Hipovolêmico por Hemorragia Digestiva Alta
6	F	46	6	Choque Hipovolêmico por Hemorragia Digestiva Alta
7	M	48	10	Choque Hipovolêmico por Hemorragia Digestiva Alta
8	F	48	4	Choque Hipovolêmico por Hemorragia Digestiva Alta
9	M	53	5,5	Choque Hipovolêmico por Hemorragia Digestiva Alta
10	M	55	10	Choque Tóxico por Salmonelose
11	M	61	10	Edema Agudo Pulmão
12	M	61	5,5	Choque Séptico por Peritonite Pós-Operatória
13	M	62	21,5	Infarto Agudo do Miocárdio
14	F	66	14	Choque Hipovolêmico por Ruptura de Aneurisma de Aorta Torácica
15	M	73	5,5	Choque Hipovolêmico por Hemorragia de Abscesso Abdominal
16	M	74	7	Infarto Agudo do Miocárdio
17	F	81	7,5	Choque Séptico por Infecção do Trato Urinário
18	F	83	12	Choque Hipovolêmico por Múltiplas Hemorragias
19	M	84	6	Choque Hipovolêmico por Ruptura de Aneurisma de Aorta Abdominal
20	F	86	17	Infarto Agudo do Miocárdio

Tabela 2: Tabela de dados isolados de sexo, idade, intervalo óbito-fixação e causa de morte para cada indivíduo da casuística.

Na comparação entre os grupos de adultos jovens e idosos, houve diferença apenas quanto à gravidade do estado agônico antes da morte, avaliado pela escala IAS, com o grupo adulto jovem

apresentando piores estados agônicos (U de Mann-Whitney = 24,5; $p = 0,05$), o que pode influenciar negativamente a qualidade do tecido nervoso para análise (Tabela 1).

4.2 - ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES PRÉ E PÓS-MORTE DO ENCÉFALO SOBRE A QUALIDADE DAS MARCAÇÕES HISTOLÓGICAS

Conforme já exposto na introdução, as condições pré e pós-morte são de grande relevância para a qualidade dos resultados de estudos neuropatológicos. Neste estudo, foram consideradas as seguintes variáveis pré-morte: idade, sexo, gênero, antecedentes mórbidos, estado agônico e uso crônico de medicações. As variáveis pós-morte avaliadas foram: intervalo entre óbito e fixação do encéfalo, intervalo entre fixação e crioproteção com sacarose 30%, intervalo entre crioproteção e congelamento com isopentano, intervalo entre congelamento e secção em criostato.

Para avaliação da qualidade da marcação histológica, nós utilizamos 3 parâmetros numéricos: (1) a DNN (em células/mm²) do nível 1 do caudado, (2) a DNT (em células/mm²) de neurônios marcados pelo NeuN do nível 1 do caudado e (3) intensidade de azul das secções marcadas pela NADPHd no nível 1 do caudado, através de um escore de 0 a 4, baseado em critérios visuais subjetivos.

Para análise da influência destes parâmetros pré e pós-morte sobre a qualidade da marcação, nós realizamos correlações isoladas para mostrar as variáveis independentes com maior relação com os parâmetros de qualidade de marcação (DNN, DNT e intensidade de azul), e as seguintes variáveis numéricas pré e pós-morte foram selecionadas: idade, escala IAS, intervalo entre óbito e fixação do encéfalo, intervalo entre fixação e crioproteção com sacarose 30%. As seguintes variáveis categóricas também foram analisadas: sexo, hemisfério e história de choque séptico.

Não houve efeito das variáveis independentes numéricas sobre os parâmetros de qualidade de marcação (método *backwise*; modelo com todos os preditores e DNN: $p = 0,309$; modelo com todos os preditores e DNT: $p = 0,62$; modelo com todos os preditores e intensidade de azul: $p = 0,964$). Também não houve efeito das variáveis categóricas sobre os parâmetros de marcação.

4.3 - ANÁLISE QUALITATIVA DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS NOS NÚCLEOS DA BASE

4.3.1 – ESTRIADO

O método histoquímico da NADPHd apresentou uma marcação escura das secções e com bom contraste entre as células e o fundo da imagem, que revelou numerosos neurônios, com dimensões semelhantes e extensas árvores dendríticas, ao longo do estriado (Figura 21). Foram vistas várias pequenas áreas sem neurônios, tanto no caudado quanto no putâmen, e também regiões onde estas células se agrupavam, de modo menos frequente. O neurópilo apresentou um padrão variado de marcação nas secções. Muitas fibras NADPHd-positivas foram identificadas, com fácil identificação entre seus limites. Os dendritos destes neurônios não continham espinhas dendríticas, conforme previsto.

Algumas células isoladas, com morfologia compatível com neurônios e marcadas pela NADPHd, também foram identificadas na substância branca adjacente ao estriado. Estas células apresentaram longa árvore dendrítica e morfologia variável do *soma*.

Houve considerável heterogeneidade entre os padrões de intensidade de azul das secções, tanto entre diferentes indivíduos quanto entre secções de diferentes níveis provenientes do mesmo indivíduo, cuja reação tenha ocorrido simultaneamente nas mesmas condições. Esta heterogeneidade não influenciou a contagem dos neurônios nitrérgicos. Conforme mostrado na seção 4.2, não houve importante correlação generalizada entre a DNN e as condições pré e pós-morte dos indivíduos.

O método imunohistoquímico de marcação da proteína NeuN (imunorreatividade neuronal específica) realizado no nível 1 do estriado evidenciou uma alta densidade neuronal em todas as porções do estriado, com bom contraste entre as células e o fundo da imagem (Figura 21B).

Figura 21: Fotomicrografias de neurônios nitrérgicos do estriado. **A:** Neurônios nitrérgicos do caudado no nível 1 (maior aumento), correspondente à área delimitada pelo retângulo vermelho, coloração pela NADPHd. **B:** Neurônios do caudado

(continuação da página anterior) no nível 1 (maior aumento), correspondente à área delimitada pelo retângulo vermelho, imunohistoquímica para NeuN. Notar a diferença entre a densidade neuronal total em B (NeuN) e a densidade neuronal nitrérgica em A (NADPHd; 2% do total de neurônios). **C**: Neurônios nitrérgicos do putâmen no nível 5 no maior aumento, correspondente à área delimitada pelo retângulo vermelho, evidenciando fibras de substância branca próximas aos neurônios marcados, coloração pela NADPHd. **D**: Neurônios nitrérgicos do putâmen posteroventral no nível 8 no maior aumento, correspondente à área delimitada pelo retângulo vermelho, coloração pela NADPHd. O putâmen posteroventral apresentou alta densidade de neurônios nitrérgicos em relação às outras regiões, inclusive com uma marcação em azul mais intenso, conforme mostrado na área delimitada em vermelho. **E**: Neurônios nitrérgicos do caudado em maior detalhe, mostrando um neurônio bipolar oval com um longo dendrito de comprimento máximo estimado em 400 μm , coloração pela NADPHd. Objetiva 10x.

4.3.2 – GLOBO PÁLIDO

O método histoquímico da NADPHd mostrou a presença de neurônios e fibras marcadas, tanto no GPe e GPi quanto nas lâminas medulares lateral e medial. Contudo, por problemas técnicos na marcação dos elementos celulares neuronais, apenas em metade dos encéfalos estudados foi possível esta análise qualitativa (Figura 22).

A região medial dos GP, compreendendo a lâmina medular medial e o GPi, parece ser a região mais densa em neurônios e fibras nitrérgicas desta área, porém as lâminas medulares (tanto lateral quanto medial) aparentam conter mais elementos NADPHd-positivos que os GP propriamente ditos. Em nossa amostragem, o GP foi dividido em uma porção anterior (nível 1), uma porção média (nível 2) e uma porção posterior (nível 3), e a porção média foi a área com maior presença de células e fibras nitrérgicas.

Estes neurônios nitrérgicos apresentaram variável morfologia, porém principalmente triangular, com cerca de 3 a 4 dendritos primários e diâmetro máximo médio do *soma* variando entre 25 a 40 μm . No tocante às fibras marcadas pela NADPHd, o GPe mostrou um neurópilo moderadamente marcado, às custas uma aparente grande quantidade de fibras mal definidas à visualização, em contraste com o GPi, que tem um neurópilo menos marcado, porém com fibras de melhor visualização. Houve grande heterogeneidade no padrão de marcação desta região, inviabilizando sua análise quantitativa.

Figura 22: Fotomicrografias de neurônios nitrérgicos dos globos pálidos. **A:** Globos pálidos, com áreas em destaque (B, C e D), menor aumento. **B:** Globo pálido externo, rico em fibras mal-definidas à marcação, porém escasso em neurônios nitrérgicos, maior aumento. **C:** Lâmina medular medial, rico em fibras e neurônios marcados, maior aumento. **D:** Globo pálido interno, com neurônios bem marcados e poucas fibras, maior aumento. Objetiva 10x, coloração pela NADPHd.

4.3.3 – NÚCLEO SUBTALÂMICO

O método imunohistoquímico de marcação da proteína nNOS nos revelou um núcleo densamente povoado por células nNOS-positivas, de modo homogêneo entre as regiões mais dorsais, ventrais, mediais e laterais no NST (Figura 23). A presença de fibras nNOS-positivas foi bem frequente, principalmente nas porções ventrolaterais do núcleo. A região mais lateral do núcleo, principalmente na sua porção média (nível 2), continha uma aparente maior densidade de fibras nitrérgicas além dos limites do NST, na direção do GPi. O neurópilo foi marcado pela IHQ de modo moderado a intenso na maioria das secções.

Figura 23: Fotomicrografias de neurônios nitrérgicos do núcleo subtalâmico. **A:** Núcleo subtalâmico médio, menor aumento. **B:** Imagem em destaque na figura A, mostrando numerosos neurônios nitrérgicos na porção central do núcleo subtalâmico, maior aumento. **C:** Neurônios nitrérgicos em detalhe, maior aumento. Objetiva 10x, imunohistoquímica para nNOS.

Também houve considerável heterogeneidade entre os padrões de imunorreatividade das secções, tanto entre diferentes indivíduos quanto entre secções de diferentes níveis provenientes do mesmo indivíduo, cuja reação tenha ocorrido simultaneamente nas mesmas condições.

Através de dupla marcação com NADPHd e IHQ para TH, foram visualizadas fibras dopaminérgicas no interior do NST próximas às fibras nitrérgicas, assim como isoladas células TH-reativas, que não coexpressam nNOS (Figura 24).

Figura 24: Fotomicrografias do núcleo subtalâmico, mostrando a distribuição de neurônios/fibras reativas para NADPHd (azul) e TH (marrom) em uma secção duplamente marcada. **A:** Neurônios e fibras nitrérgicas, entremeadas por fibras dopaminérgicas (setas), na porção ventromedial do núcleo (área em detalhe na figura destacada no canto superior esquerdo). **B:** Neurônio dopaminérgico (seta) rodeado por neurônios e fibras nitrérgicas (área em detalhe na figura destacada no canto superior esquerdo). Objetiva 10x. Dupla marcação (coloração pela NADPHd + imunohistoquímica para TH).

4.3.4 – SUBSTÂNCIA NEGRA

Não foi detectada marcação de células ou fibras pela técnica da NADPHd na SN em qualquer um dos indivíduos estudados. Apenas a região do núcleo paranigral, medial à SN, contém neurônios e fibras nitrérgicas.

4.3.5 – NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO

O NPP mostrou intensa presença de neurônios e fibras NADPHd-positivas, principalmente na região do NPP *pars compacta*, nos três níveis visualizados (rostral, medial e caudal). As secções no nível do colículo inferior apresentaram visualmente uma maior densidade de neurônios nitrérgicos (Figura 25).

Além do NPP, outros núcleos foram marcados pela técnica histoquímica nesta região, como a substância cinzenta periaquedutal e o núcleo reticular pontino oral.

Figura 25: Fotomicrografias de neurônios nitrérgicos do núcleo pedunculopontino. **A:** Núcleo pedunculopontino rostral, menor aumento. **B:** Núcleo pedunculopontino médio, menor aumento. **C:** Núcleo pedunculopontino caudal, menor aumento. **D:** Imagem em destaque da figura B, no maior aumento. Objetiva 10x, coloração pela NADPHd.

4.4 - ANÁLISE QUANTITATIVA DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS NOS NÚCLEOS DA BASE

4.4.1 – CONTAGEM DA DENSIDADE NEURONAL

4.4.1.1 – ESTRIADO

4.4.1.1.1 – ANÁLISE DA DENSIDADE NEURONAL NITRÉRGICA ENTRE NÍVEIS, SUBDIVISÕES TOPOGRÁFICAS E FUNCIONAIS E SUBSETORES DO ESTRIADO

Neste estudo, o estriado foi subdividido em vários aspectos para melhora da caracterização de possíveis efeitos do envelhecimento sobre a contagem da densidade neuronal, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Entre os diferentes níveis de secções do caudado, foi notada uma maior DNN nas porções mais posteriores em relação às mais anteriores ($F_{9,176} = 13,44$, $p < 0,0001$) (Figura 26A). Entre os diferentes níveis de secções do putâmen, também foi vista uma maior DNN nas porções mais posteriores em relação às mais anteriores ($F_{8,157} = 15$, $p < 0,0001$) (Figura 26B).

Entre as diferentes subdivisões topográficas, também foi visto que as porções mais posteriores do caudado (cabeça do caudado pós-comissural e corpo do caudado) apresentavam maiores DNN que a cabeça do caudado pré-comissural ($F_{2,58} = 20,27$, $p < 0,0001$), e que as porções mais posteriores do putâmen (putâmen pós-comissural e putâmen ventral) eram mais populosas em neurônios nitrérgicos do que o putâmen pré-comissural ($F_{3,74} = 23,36$, $p < 0,0001$) (Figura 26C).

Entre as diferentes subdivisões funcionais, o chamado “estriado límbico” foi a porção com maior DNN ($F_{2,57} = 7,63$, $p = 0,00012$) (Figura 26D).

Entre os subsectores do caudado, foi notada diferença significativa apenas nos subsectores dorsolateral e ventrolateral do corpo do caudado, os quais apresentavam maiores DNN ($F_{3,76} = 5,93$, $p = 0,001$) (Figura 26E). No putâmen, o subsector dorsomedial do putâmen pós-comissural apresentou menor DNN que a dos outros subsectores ($F_{3,76} = 14,21$, $p < 0,0001$) (Figura 26F). Tanto no corpo do caudado quanto no putâmen pós-comissural, o subsector lateral foi a região mais densa em neurônios nitrérgicos (corpo do caudado: $t_{38} = 3,136$, $p = 0,003$; putâmen pós-comissural: $t_{38} = 3,894$, $p = 0,0004$), e o subsector ventral do putâmen pós-comissural mostrou maior DNN que o sector dorsal ($t_{38} = 2,946$, $p = 0,005$).

Figura 26: Gráficos de DNN (células/mm²) do estriado. **A:** Distribuição da DNN por níveis no caudado; **B:** Distribuição da DNN por níveis no putâmen; **C:** Distribuição da DNN por subdivisão topográfica do estriado; **D:** Distribuição da DNN por subdivisão funcional do estriado; **E:** Distribuição da DNN por subsectores no corpo do caudado; **F:** Distribuição da DNN por subsectores no putâmen pós-comissural. * $p < 0,05$. Caud Pré-Com: caudado pré-comissural; Caud Pós-Com: caudado pós-comissural; Corpo Caud: corpo do caudado; DL: dorsolateral; DM: dorsomedial; Est: estriado; Put Pré-Com: putâmen pré-comissural; Put Pós-Com: putâmen pós-comissural; Put Vent: putâmen ventral; VL: ventrolateral; VM: ventromedial.

4.4.1.1.2 – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA IDADE SOBRE A DENSIDADE NEURONAL NITRÉRGICA DO ESTRIADO

Em geral, a média total de DNN entre todos os níveis de secções de caudado e putâmen não se correlacionou com a idade (Figura 27). Dentre as subdivisões topográficas, não houve correlação entre a DNN e idade. Não houve também correlação entre idade e a DNN das subdivisões funcionais.

Figura 27: Gráficos de correlações entre DNN (células/mm²) e idade no estriado. **A:** Correlação entre média total de DNN em todos os níveis do caudado e idade; **B:** Correlação entre média total de DNN em todos os níveis do putâmen e idade.

4.4.1.1.3 – COMPARAÇÃO ENTRE A DENSIDADE NEURONAL NITRÉRGICA E A DENSIDADE NEURONAL TOTAL

Para comparação entre a DNN e a DNT no estriado, o nível 1 foi submetido tanto à HQ para NADPHd (avaliação da DNN) quanto à IHQ para NeuN (avaliação da DNT). Houve uma correlação entre as duas densidades neuronais ($r = 0,45$, $p = 0,04$) (Figura 28). Assim como visto para DNN, não houve correlação entre idade e DNT. Em média, os neurônios nitrérgicos representaram 1,98% de todos os neurônios do estriado.

Figura 28: Gráfico de correlação entre a DNN e DNT (células/mm²) do nível 1 do caudado.

4.4.1.2 – NÚCLEO SUBTALÂMICO

4.4.1.2.1 – ANÁLISE DA DENSIDADE NEURONAL NITRÉRGICA ENTRE NÍVEIS E SUBDIVISÕES FUNCIONAIS DO NÚCLEO SUBTALÂMICO

Conforme executado no estriado, o NST também foi dividido para análise das densidades neuronais. Na comparação entre os níveis do núcleo, não houve diferença de DNN entre as porções anterior, média e posterior do NST (Figura 29A). Comparando as diferentes subdivisões funcionais de cada nível (anterior, médio e posterior), houve diferença apenas no NST médio: a DNN da porção “límbica” do núcleo foi significativamente maior que nas porções associativa e sensorimotora do NST ($F_{2,44} = 4,22$, $p = 0,02$) (Figura 29B,C e D).

Figura 29: Gráficos de DNN (células/mm²) do NST. **A:** Distribuição da DNN nos níveis anterior, médio e posterior do NST; **B:** Distribuição da DNN por subdivisão funcional do NST anterior; **C:** Distribuição da DNN por subdivisão funcional do NST médio; **D:** Distribuição da DNN por subdivisão funcional do NST posterior. * $p < 0,05$.

4.4.1.2.2 – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA IDADE SOBRE A DENSIDADE NEURONAL NITRÉRGICA DO NÚCLEO SUBTALÂMICO

Em geral, não houve correlação entre idade e a DNN do NST, tanto entre níveis quanto nas subdivisões funcionais (Figura 30). Em média, os neurônios nitrérgicos representaram 89,5% de todos os neurônios do NST.

Figura 30: Gráficos de correlações entre DNN (células/mm²) e idade no NST. **A:** Correlação entre DNN e idade no NST anterior; **B:** Correlação entre DNN e idade no NST médio; **C:** Correlação entre DNN e idade no NST posterior.

4.4.2 – ANÁLISE MORFOMÉTRICA

4.4.2.1 – ESTRIADO

4.4.2.1.1 – DIÂMETRO MÁXIMO DO SOMA

Na comparação entre os níveis de caudado e putâmen, os neurônios nitrérgicos da região mais posterior (nível 10) apresentaram menores diâmetros máximos do que níveis médios (estatística Kruskal-Wallis = 30,08, $p = 0,0004$) (Figura 31A). Não houve diferença de diâmetro máximo do soma entre os indivíduos adultos jovens e idosos (Figura 31B).

4.4.2.1.2 – ÁREA DO SOMA

Na comparação entre os níveis de caudado e putâmen, os neurônios nitrérgicos da região mais posterior (nível 10) apresentaram menores áreas do que os níveis mais anteriores e médios (estatística Kruskal-Wallis = 44,67, $p < 0,0001$) (Figura 31C). Apenas o caudado pós-comissural mostrou uma tendência à diferença entre idosos e adultos jovens, com maiores áreas neuronais nitrérgicas nos adultos jovens ($t_{18} = 1,929$, $p = 0,0696$) (Figura 31D).

4.4.2.1.3 – COMPRIMENTO DENDRÍTICO MÁXIMO

Na comparação entre os níveis de caudado e putâmen, os neurônios nitrérgicos da região mais posterior (nível 10) apresentaram menores comprimentos dendríticos máximos do que os níveis mais anteriores e médios (estatística Kruskal-Wallis = 32,21, $p = 0,0002$) (Figura 31E). Apenas o caudado pós-comissural mostrou uma tendência à diferença entre idosos e adultos jovens, com maiores áreas neuronais nitrérgicas nos adultos jovens ($t_{18} = 1,997$, $p = 0,0611$) (Figura 31F).

Figura 31: Análise morfométrica dos neurônios nitrérgicos do estriado. **A:** Médias de diâmetros do *soma* neuronal nitrérgico estriatal (caudado e putâmen) por níveis. **B:** Comparação entre as médias de diâmetros do *soma* neuronal nitrérgico estriatal (caudado e putâmen) de indivíduos adultos jovens e idosos. **C:** Médias de áreas do *soma* neuronal nitrérgico estriatal (caudado e putâmen) por níveis. **D:** Comparação entre as médias de áreas do *soma* neuronal nitrérgico estriatal (caudado e putâmen) de indivíduos adultos jovens e idosos. **E:** Médias de comprimento dendrítico máximo dos neurônios nitrérgicos estriatais (caudado e putâmen) por níveis. **F:** Comparação entre as médias de comprimento dendrítico máximo dos neurônios nitrérgicos estriatais (caudado e putâmen) de indivíduos adultos jovens e idosos. * $p < 0,05$ e $^t = p$ entre 0,1 e 0,05. Caud Pré-Com: caudado pré-comissural; Caud Pós-Com: caudado pós-comissural; Corpo Caud: corpo do caudado; Put Pré-Com: putâmen pré-comissural; Put Pós-Com: putâmen pós-comissural.

4.4.2.1.4 – NÚMERO DE DENDRITOS PRIMÁRIOS

Na comparação entre os níveis de caudado e putâmen, não houve diferença na mediana de número de dendritos primários. Também não houve diferenças na mediana de número de dendritos primários entre indivíduos adultos jovens e idosos.

4.4.2.1.5 – MORFOLOGIA DO NEURÔNIO

Quanto aos tipos morfológicos dos neurônios, 43% dos neurônios visualizados no estriado foram ovais, 40,9% foram triangulares e 16,1% redondos. A porcentagem de neurônios ovais é maior nos níveis mais posteriores do estriado ($\chi^2 = 28,92$, $p = 0,04$), e não há diferenças na frequência de morfologia de neurônios entre adultos jovens e idosos.

4.4.2.2 – NÚCLEO SUBTALÂMICO

4.4.2.2.1 – DIÂMETRO MÁXIMO DO SOMA

Na comparação entre os níveis do NST, os neurônios nitrérgicos do nível anterior apresentaram maiores diâmetros máximos do que os outros ($F_{2,39} = 9,68$, $p = 0,0004$) (Figura 32A). Não houve diferença de diâmetro máximo do *soma* entre os indivíduos adultos jovens e idosos (Figura 32B).

4.4.2.2.2 – ÁREA DO SOMA

Na comparação entre os níveis do NST, os neurônios nitrérgicos do nível anterior apresentaram maiores áreas do que os localizados no nível posterior ($F_{2,39} = 5,07$, $p = 0,01$) (Figura 32C). Não houve diferença de área do *soma* entre os indivíduos adultos jovens e idosos (Figura 32D).

Figura 32: Análise morfométrica dos neurônios nitrérgicos do NST. **A:** Médias de diâmetros do *soma* neuronal nitrérgico subtalâmico por níveis. **B:** Comparação entre as médias de diâmetros do *soma* neuronal subtalâmico de indivíduos adultos jovens e idosos. **C:** Médias de áreas do *soma* neuronal nitrérgico subtalâmico por níveis. **D:** Comparação entre as médias de áreas do *soma* neuronal nitrérgico subtalâmico de indivíduos adultos jovens e idosos. * $p < 0,05$. NST: núcleo subtalâmico.

4.4.2.2.3 – NÚMERO DE DENDRITOS PRIMÁRIOS

Na comparação entre os níveis do NST, não houve diferença na mediana de número de dendritos primários. Também não houve diferenças na mediana de número de dendritos primários entre indivíduos adultos jovens e idosos.

4.4.2.2.4 – MORFOLOGIA DO NEURÔNIO

Quanto aos tipos morfológicos dos neurônios, 57,1% dos neurônios visualizados no NST foram ovais, 28,8% foram triangulares e 13,9% redondos. Não há diferenças na frequência de morfologia de neurônios entre adultos jovens e idosos.

4.4.2.3 – NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO

4.4.2.3.1 – DIÂMETRO MÁXIMO DO SOMA

Na comparação entre os níveis do NPP, não houve diferença no diâmetro médio do *soma* dos neurônios nitrérgicos (Figura 33A), e também não houve diferenças no diâmetro médio entre indivíduos adultos jovens e idosos.

4.4.2.3.2 – ÁREA DO SOMA

Na comparação entre os níveis do NPP, os neurônios nitrérgicos do nível rostral apresentaram maiores áreas do que os do nível caudal (estatística Kruskal-Wallis = 9,56, $p = 0,008$) (Figura 33B). Não houve diferença de área do *soma* entre os indivíduos adultos jovens e idosos.

4.4.2.3.3 – COMPRIMENTO DENDRÍTICO MÁXIMO

Na comparação entre os níveis do NPP, não houve diferença no comprimento dendrítico máximo dos neurônios nitrérgicos (Figura 33C), e também não houve diferenças no comprimento dendrítico máximo entre indivíduos adultos jovens e idosos.

Figura 33: Análise morfométrica dos neurônios nitrérgicos do NPP. **A:** Médias de diâmetros do *soma* neuronal nitrérgico do NPP por níveis. **B:** Médias de áreas do *soma* neuronal nitrérgico do NPP por níveis. **C:** Médias de comprimento dendrítico máximo dos neurônios nitrérgicos do NPP por níveis. * $p < 0,05$. NPP: núcleo pedunculo pontino.

4.4.2.3.4 – NÚMERO DE DENDRITOS PRIMÁRIOS

Na comparação entre os níveis do NPP, não houve diferença na mediana de número de dendritos primários dos neurônios nitrérgicos, e também não houve diferenças na mediana de número de dendritos primários entre indivíduos adultos jovens e idosos.

4.4.2.3.5 – MORFOLOGIA DO NEURÔNIO

Quanto aos tipos morfológicos dos neurônios, 55,5% dos neurônios visualizados no NPP foram ovais, 32,4% foram triangulares e 12% redondos. Não há diferenças na frequência de morfologia de neurônios entre adultos jovens e idosos.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - CASUÍSTICA

Em relação aos trabalhos anteriores que analisaram a população nitrérgica nos NNBB em humanos, nossa casuística de 20 encéfalos foi satisfatória, e apenas Downen et al. (1999), com 23 indivíduos, e Fritzen et al. (2006), com 60 indivíduos, apresentaram maiores amostras. Não houve importantes diferenças de comorbidades e causas de morte entre nossa casuística e as anteriores.

A diferença vista na escala de gravidade de estado agônico entre indivíduos adultos jovens e idosos pode ser explicada pela presença de morte por choque hipovolêmico por hemorragia digestiva alta em 50% da amostra dos adultos jovens, havendo maior demanda por cuidados intensivos por horas ou dias antes do óbito, contribuindo para um pior estado agônico.

O intervalo médio entre óbito e fixação de 9,3 horas obtido por nós é bem inferior a media relatada nos outros trabalhos (apenas 22% dos trabalhos revisados tiveram um intervalo óbito-fixação menor que 12 horas). Este é um parâmetro frequentemente ignorado por outros grupos, e há várias evidências de que um maior intervalo entre óbito e necropsia pode alterar o sinal de células marcadas pela NADPHd (KOWALL et al., 1985; HILBIG et al., 2004).

Os outros parâmetros temporais pós-morte (intervalos entre fixação e crioproteção, entre crioproteção e congelamento e entre congelamento e secção) apresentaram médias adequadas e compatíveis com uma boa qualidade de material para análise histológica.

5.2 - ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES PRÉ E PÓS-MORTE DO ENCÉFALO SOBRE A QUALIDADE DAS MARCAÇÕES HISTOLÓGICAS

As análises de regressão não mostraram relações entre as condições pré e pós-morte e os parâmetros de qualidade de marcação histológica. Estas evidências impossibilitam a influência consistente de fatores potencialmente artefatuosos sobre a qualidade de marcação realizada nos cortes deste estudo. A revisão da literatura nos mostrou que esta mesma análise não foi descrita em nenhum dos trabalhos revisados. Acreditamos que o aumento da qualidade das secções proporcionado pelo controle rigoroso das condições pré e pós-morte em nosso trabalho tenha sido um ponto forte em relação aos estudos já publicados sobre o tema.

5.3 - ANÁLISE DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO ESTRIADO – DENSIDADE NEURONAL

Em geral, os dados sobre DNN (em células/mm²) que obtivemos foram próximos dos valores de outros estudos que usaram a mesma relação (BÖCKELMANN et al., 1994; NORRIS et al., 1996; TAO et al., 1999; WU; PARENT, 2000; FRITZEN et al., 2007). Nossos resultados mostraram dados relevantes a respeito da DNN no estriado humano: (1) não há diferenças na DNN entre indivíduos adultos jovens e idosos, (2) há um gradiente anteroposterior de DNN no caudado e putâmen, (3) o estriado límbico apresenta maior DNN que as outras subdivisões funcionais, e (4) os subsetores laterais do estriado caudal apresentam maiores DNN.

(I) Achado 1 - Não há diferenças na DNN entre indivíduos adultos jovens e idosos:

Em ratos, todos os estudos morfológicos indicaram uma redução da densidade de neurônios NADPHd no estriado de animais idosos (YAMADA et al., 1996; KUO; HENGEMIHLE; INGRAM, 1997; CHA et al., 2000; NECCHI et al., 2002; DEL MORAL et al., 2004). Os estudos em humanos que analisaram parâmetros de presença nitrérgica no estriado não confirmaram um efeito de redução com o envelhecimento visto em animais (SELDEN et al., 1994; BLUM-DEGEN et al., 1999), em conformidade com nossos achados.

É sabido que os neurônios nitrérgicos apresentam uma suposta resistência à neurodegeneração ocorrida na DH, apresentando densidades neuronais maiores que as vistas em indivíduos controle, pela redução da área estriatal total (FERRANTE; KOWALL; BEAL, 1985; FERRANTE et al., 1987; MORTON; NICHOLSON; FAULL, 1993). Acreditamos que estes neurônios também possam ter uma menor vulnerabilidade ao processo de envelhecimento, mantendo sua presença sem importantes variações ao longo dos anos, de acordo com a ideia vigente de que o envelhecimento não provoca morte neuronal progressiva (SHANKAR, 2010; BURKE; BARNES, 2006).

(II) Achado 2 – Há um gradiente anteroposterior de DNN no caudado e putâmen:

Em 2000, Wu e Parent estudaram os interneurônios nitrérgicos do estriado de ratos, macacos e humanos, e a análise dos neurônios nitrérgicos mostrou que não havia diferenças na DNN entre as porções anteriores, médias e posteriores de caudado e putâmen.

Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya (2005), a partir de extensa análise dos neurônios nitrérgicos no estriado, mostraram que o giro do caudado apresentava uma alta DNN em comparação às outras subdivisões topográficas, sugerindo uma possível tendência de que as regiões mais posteriores do caudado fossem mais ricas em células NO-positivas por algum motivo funcional

desconhecido. Este estudo não mostrou outras diferenças estatisticamente significativas das médias de DNN capazes de definir um gradiente de densidade destes interneurônios no eixo anteroposterior.

A discordância de nossos achados com estes 2 trabalhos citados pode ser explicada por alguns motivos: (1) os estudos utilizaram um número de indivíduos inferior ao nosso (Wu e Parent, 2000: 3 indivíduos; Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya (2005): 9 indivíduos), reduzindo o poder dos testes estatísticos utilizados para avaliar as diferenças das médias de DNN; (2) os valores das médias de DNN das subdivisões topográficas descritos por Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya (2005) apresentam grandes erros padrão da média, o que também compromete os resultados dos testes estatísticos; (3) Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya (2005) dividiram o estriado apenas em grandes subdivisões topográficas, enquanto nossa abordagem fez a divisão em níveis de secção e nas mesmas subdivisões topográficas, mostrando maiores DNN nas regiões mais posteriores tanto na divisão por níveis de secção quanto nas subdivisões topográficas de caudado e putâmen (Figura 26A, B e C); (4) Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya (2005) utilizaram um método estereológico para avaliar as densidades neuronais, diferente de nossa contagem manual de secções específicas, podendo incompatibilizar a comparação dos resultados dos 2 trabalhos. Nossa análise não abordou as regiões de giro e cauda do caudado, como foi feito por Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya (2005), porém acreditamos que isto não influencie nossos achados.

O motivo de haver um gradiente anteroposterior de interneurônios que produzem NO no estriado é desconhecido. Sabe-se que o circuito corticoestriatal apresenta uma somatotopia em relação aos diferentes córtices cerebrais e as determinadas regiões associadas de caudado e putâmen (KEMP; POWELL, 1970). As regiões mais posteriores do caudado (corpo, giro e cauda) recebem fibras oriundas de regiões corticais pós-rolândicas, como o lóbulo parietal inferior (área 7 de Brodmann), giro pré-occipital (área 18 e 19 de Brodmann) e a área temporal inferior caudal (área 20 de Brodmann) (YETERIAN; VAN HOESEN, 1978), e o putâmen caudal recebe preferencialmente sinais da área relativa aos membros inferiores do córtex motor (KÜNZLE, 1975). Sabe-se também que o estriado posterior apresenta características citoarquiteturais próprias, com gradientes de marcação para outros neurotransmissores (BERNÁCER; PRENSA; GIMENEZ-AMAYA, 2008)

Há alguns processos degenerativos envolvendo o estriado que também seguem um gradiente anteroposterior: Kish, Shannak e Hornykiewicz (1988) mostraram que a progressão da DP está associada a uma depleção dopaminérgica máxima nas porções mais caudais do putâmen, e outros autores observaram este fenômeno ocorrendo apenas na fase inicial da doença (LEE et al., 2004; KORDOWER et al., 2013); na DH, os primeiros estágios neuropatológicos da doença são caracterizados pela morte neuronal nas porções mais caudais do caudado (cauda e corpo) e do putâmen (principalmente a porção dorsal) (VONSATTEL, 2008). Há evidências de que os

interneurônios nitrérgicos sejam poupados da morte neuronal ocorrida na DH por motivos também desconhecidos, e se supõe o NO possa ter uma ação excitotóxica sobre a morte dos outros tipos neuronais (FERRANTE; KOWALL; BEAL, 1985; NORRIS et al., 1996). Do ponto de vista fisiopatológico, estes dados nos fazem hipotetizar que a maior DNN nas regiões mais posteriores de caudado e putâmen possa estar associada a uma suposta vulnerabilidade regional de outros neurônios do estriado posterior, evidenciada pelo padrão de depleção dopaminérgica na DP e de morte neuronal da DH, conforme parcialmente sugerido por Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya (2005).

(III) Achado 3 – O estriado límbico apresenta maior DNN que as outras subdivisões funcionais:

Nenhum dos trabalhos anteriores envolvendo estudo dos neurônios nitrérgicos havia dividido o estriado em subdivisões funcionais baseadas nas suas conexões com áreas corticais diversas. Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya (2007) criaram um método de subdivisão funcional do estriado dorsal (excluindo-se o núcleo acumbens) em 3 porções: uma região conectada ao córtex sensorimotor (incluindo todo putâmen pós-comissural, exceto sua porção posteroventral), uma conectada ao córtex associativo (setor dorsomedial da cabeça, corpo e giro do caudado) e outra ao córtex límbico (putâmen posteroventral). Este esquema de organização, aplicado em nossa amostra, mostrou que a região correspondente ao “estriado límbico” apresentou uma DNN estatisticamente maior que a das outras subdivisões funcionais.

O estriado ventral é uma área classicamente relacionada a processos motivacionais, e pode ser dividido em núcleo acumbens e estriado ventral caudal (putâmen posteroventral e área amigdaloestrial lateral) (FUDGE; HABER, 2002; HABER, 2004). A amígdala e algumas regiões corticais específicas ligadas à emoção, recompensa e motivação enviam sinais para o estriado ventral, os quais são modulados pela circuitaria estriatal (FUDGE; HABER, 2002). Esta porção é análoga à área denominada de “estriado límbico” na subdivisão feita por Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya (2007). Nossos achados revelam que o estriado ventral caudal, em particular o putâmen posteroventral, apresenta uma maior população nitrérgica, inclusive com maior intensidade de marcação de fibras, neurônios e neurópilo pela técnica da NADPHd (Figura 22D). Paralelamente, mostramos que o estriado ventral caudal apresentou DNN maior que a do núcleo acumbens ($t_{37} = 5,56$; $p < 0,0001$). Mesmo sem análise estatística, o trabalho de 2005 feito por Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya já sugeria uma maior DNN no aspecto posteroventral do putâmen pós-comissural.

Em animais, foi visto que o camundongo *knockout* para o gene da nNOS apresentava uma série de alterações de comportamento, incluindo agressividade excessiva e hiperssexualidade (Nelson et al., 1995), e não desenvolviam as alterações comportamentais induzidas pela fenciclidina, um modelo farmacológico de psicose (Bird et al., 2001). Além disso, o nitroprussiato de sódio, um agente

doador de NO, bloqueou o comportamento complexo similar à psicose induzido pela fenciclidina (Bujas-Bobonovic et al., 2000). Em camundongos, Issy et al. (2013) mostraram que o nitroprussiato de sódio inibe os efeitos pró-psicóticos induzidos pela anfetamina, utilizando-se o método da inibição pré-pulso como preditor de atividade psicótica.

Em humanos, Lauer et al. (2005) observaram uma redução global da DNN no putâmen em 2 encéfalos de indivíduos com esquizofrenia, em comparação com controles, sem mostrar um gradiente entre as regiões mais anteriores e posteriores, e Fritzen et al. (2007) confirmaram a redução da DNN putaminal de pacientes com esquizofrenia e outros transtornos psiquiátricos com psicose (como transtorno afetivo bipolar e depressão maior) em relação a controles sadios. Uma meta-análise feita por Maia-de-Oliveira et al. (2012) mostrou não haver redução nos níveis séricos de nitrito entre esquizofrênicos e controle.

Hallak et al. (2013) testaram os efeitos do nitroprussiato de sódio sobre agudização de sintomas psicóticos em esquizofrênicos através de infusão endovenosa por 4 horas, e foi vista importante melhora dos sintomas em uma escala de sintomas psiquiátricos após 3 horas de início de infusão, e este efeito se manteve por 4 semanas, principalmente nos sintomas de alteração do conteúdo do pensamento.

Em resumo, a influência do NO sobre comportamentos ligados à emoção, recompensa e motivação, assim como sobre transtornos psiquiátricos crônicos como a esquizofrenia, parece ser muito relevante, e nossos resultados respaldam ainda mais esta associação, ao evidenciarmos uma grande população de interneurônios produtores de NO no estriado ventral caudal, uma estrutura-chave no processamento comportamental.

Um fato que chamou nossa atenção foi a baixa densidade nitrérgica na subdivisão correspondente ao “estriado sensorimotor”, já que há várias evidências dos efeitos do NO sobre o controle motor, conforme discutido na seção 1.2.3 da Introdução, as quais nos faziam pressupor que esta seria a subdivisão funcional com maior DNN. Para delimitar a subdivisão “estriado sensorimotor”, nós utilizamos as DNN dos níveis de putâmen posteriores à comissura anterior (nível 5 ao 10), excluindo-se as contagens do putâmen posteroventral, conforme orientação do trabalho de Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya (2007). Ao utilizar apenas as densidades dos níveis mais posteriores do putâmen (nível 8, 9 e 10), vimos um aumento da DNN no estriado sensorimotor, e tanto estriado límbico quanto sensorimotor apresentaram densidades estatisticamente maiores que a do estriado associativo ($F_{2,57} = 6,52$; $p = 0,002$).

(IV) Achado 4 – Os subsetores laterais do estriado caudal apresentam maiores DNN:

Bernácer, Prensa e Gimenez-Amaya (2005) dividiram o estriado em subsetores (dorsomedial, dorsolateral, ventromedial e ventrolateral) para melhor analisar a distribuição dos neurônios nitrérgicos ao longo dos eixos dorsoventral e mediolateral, e foi visto que o giro do caudado apresentava mais neurônios no setor ventral, o putâmen pré-comissural tinha maiores DNN na porção dorsolateral, e o putâmen pós-comissural mais povoado nos setores ventral e lateral, sugerindo que as porções mais posteriores do estriado apresentavam maior densidade em suas porções laterais.

No tocante ao caudado, nós não analisamos o giro do caudado, e nem este citado trabalho analisou os diferentes subsetores no corpo do caudado, para que pudéssemos comparar a heterogeneidade de DNN ao longo dos eixos mediolateral e dorsoventral. Em relação ao putâmen, os resultados destes autores estão em concordância com nossos achados, que evidenciaram também as porções laterais do putâmen pré- e pós-comissural como uma região de alta densidade nitrérgica. Assim como no gradiente anteroposterior, não há um motivo conhecido para esta diferente densidade nitrérgica no eixo mediolateral, mas deve ser lembrado que a porção lateral do putâmen posterior é a primeira a sofrer o processo de depleção dopaminérgica na DP (KORDOWER et al., 2013).

5.4 - ANÁLISE DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO ESTRIADO – MORFOMETRIA

Os valores morfométricos mensurados apresentaram concordâncias com a literatura já existente. Quanto ao diâmetro máximo do *soma*, os trabalhos anteriores verificaram valores que variaram de 15 a 31 μm (FERRANTE et al., 1987; KOWALL et al., 1987; BERNÁCER; PRENSA; GIMENEZ-AMAYA, 2005), a área do soma entre 111,1 a 265 μm^2 (MUFSON; BRANDABUR, 1994; SELDEN et al., 1994) e um comprimento dendrítico máximo com grandes variações entre 100 até 600 μm (FERRANTE et al., 1987; KOWALL et al., 1987; JOHANNES et al., 2003; BERNÁCER; PRENSA; GIMENEZ-AMAYA, 2005).

Há uma grande variabilidade de tipos de interneurônios NADPHd-positivos, classificados de acordo com suas características citológicas, com autores descrevendo de 8 (LEONTOVICH; MUKHINA; FEDOROV, 2004) a 12 variedades morfológicas distintas (JOHANNES et al., 2003), sem qualquer padronização nos parâmetros de categorização. Nossa classificação entre tipos triangulares, ovais e redondos, os mais frequentes no trabalho de Johannes et al. (2003), não mostrou importante diferença dos valores morfométricos entre as diferentes morfologias neuronais.

O presente trabalho mostrou dados interessantes sobre os aspectos morfométricos dos interneurônios estriatais que expressam NO, ainda não descritos nos trabalhos anteriores. O diâmetro máximo, a área do *soma* e o comprimento dendrítico máximo dos neurônios nitrérgicos localizados nas

porções mais posteriores do caudado e putâmen se mostraram significativamente menores que os daquelas células existentes na porção mais anterior do estriado. No eixo anteroposterior, vimos que a morfologia triangular foi mais frequente nas porções mais anteriores, e a morfologia oval nas porções posteriores. Estes achados parecem se associar com as diferenças também detectadas na DNN do estriado caudal: aparentemente, as porções mais posteriores do caudado e putâmen apresentam uma população nitrérgica mais densa, e estes interneurônios são menores que os existentes nas regiões mais anteriores do estriado.

5.5 - ANÁLISE DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO NÚCLEO SUBTALÂMICO – DENSIDADE NEURONAL

O NST humano possui o maior volume e densidade de neurônios dentre as espécies já estudadas (MARANI et al., 2008). É constituído por duas classes de neurônios, um de maiores dimensões (principal, magnocelular) e outro menor (parvocelular): os neurônios principais têm diâmetro médio de 24,6 μm , cerca de 4 dendritos, e são o tipo celular mais encontrado neste núcleo, enquanto os neurônios parvocelulares têm diâmetro médio de 12,2 μm , com 2 a 3 dendritos e representando cerca de 7% dos neurônios totais (LÉVESQUE; PARENT, 2005; MARANI et al., 2008). Considera-se classicamente que os neurônios principais sejam de projeção e expressem glutamato (SMITH; PARENT, 1988), e os neurônios menores sejam interneurônios GABAérgicos (LÉVESQUE; PARENT, 2005).

Em geral, há uma verdadeira escassez de informações a respeito da presença de NO no NST, principalmente em humanos. Através da técnica da NADPHd, Mizukawa et al. (1989) detectaram neurônios de tamanho médio e moderadamente marcados no NST em gatos, e Vincent e Kimura (1992) descreveram neurônios fracamente marcados pela NADPHd no NST de ratos, circundados por uma rica rede de fibras. Nisbet et al. (1994) foram os primeiros a mostrar a presença do RNAm de nNOS no NST de humanos através de HHIS, descrevendo o núcleo como uma região com muitos neurônios que contém NO (mais de 95% dos neurônios visualizados continham RNAm de nNOS), porém o nível de expressão por célula foi inferior ao visto no estriado. Este achado foi reproduzido posteriormente por Eve et al. (1998). De Vente et al. (1998) estudaram a presença de nNOS e de seu receptor citoplasmático, o sGC, em várias regiões do encéfalo de ratos, e foi vista uma grande quantidade de neurônios NO-positivos em próxima relação espacial com neurônios expressando sGC, sem colocação destas marcações neste núcleo, sugerindo uma possível associação fisiológica entre estes dois tipos de neurônios. Uma análise de distribuição e de atividade enzimática em várias regiões do encéfalo humano mostrou que o NST apresenta uma forte atividade enzimática da nNOS,

mas a concentração desta proteína no núcleo é considerada mediana, em comparação com o estriado (BLUM-DEGEN et al., 1999).

Nossos resultados revelaram dados inéditos sobre a quantidade de neurônios nitrérgicos no NST em humanos: densidade neuronal, distribuição dos neurônios no eixo anteroposterior e distribuição dos neurônios nas diferentes subdivisões funcionais. O envelhecimento não alterou a DNN neste núcleo, em discordância com estudo feito em roedores (CHA et al., 2000). Como não encontramos outros estudos que tenham analisado morfológicamente estas células no NST em humanos, não foi possível a comparação de nossos resultados com outras fontes.

Em nossa amostra, foi observado que a marcação destes neurônios pela técnica NADPHd foi de intensidade fraca a moderada, conforme relatado por Vincent e Kimura (1992), porém a marcação resultante da IHQ para nNOS foi forte e com boa relação sinal-ruído. Por isso, optamos por fazer a análise da DNN e da morfometria nas lâminas estudadas com IHQ para nNOS. Acreditamos que esta dissociação de qualidade de sinal entre a NADPHd e IHQ para nNOS possa ser explicada por uma menor concentração da nNOS no NST, conforme descrita por Nisbet et al. (1994) e Blum-Degen et al., (1999).

Outro achado interessante foi a presença de esparsas fibras e células dopaminérgicas no NST humano. Mitkovski et al. (2012) mostraram as amplas relações entre as estruturas celulares nitrérgicas e dopaminérgicas em algumas estruturas encefálicas de ratos, e o NST apresentou intensa presença de neurônios nitrérgicos, porém poucas células e fibras dopaminérgicas na intimidade do NST, sem colocalização. Nossos achados reproduziram parcialmente estes resultados em humanos.

Do ponto de vista fisiológico, Sardo et al. (2006) mostraram que a infusão de um inibidor da nNOS diretamente sobre o NST de ratos provocava a redução do número de disparos dos neurônios deste núcleo, enquanto que doadores de NO e uma molécula análoga do GMPc causaram aumento na frequência de disparos, sugerindo um efeito exercido pela neurotransmissão nitrérgica sobre as células do NST que contém sGC. O mesmo grupo mostrou que a neurotransmissão do NO modula a transmissão GABAérgica no NST (SARDO et al., 2009). No contexto das doenças neurodegenerativas, Eve et al. (1998) mostraram uma hiperexpressão de NO no NST de pacientes com DP, enquanto que trabalho recente com modelo animal de parkinsonismo e discinesia induzida por levodopa não mostrou alteração do número total de neurônios nitrérgicos no NST destes animais (CZARNECKA et al., 2013).

De acordo com nossos achados, e em concordância com uma robusta literatura, o NST é um núcleo onde cerca de 90% de suas células produz NO, na coexistência com neurônios que contêm os receptores naturais nitrérgicos (sGC), mostrando fortes evidências de que há uma sinalização local (intranuclear) mediada pelo NO, a qual modula o padrão de descargas de populações específicas de neurônios, conforme descrito por Sardo et al. (2006). Sendo um ponto crucial da circuitaria da via

indireta e hiperdireta dos NNBB, podemos inferir que o NO é uma molécula de alta relevância na compreensão da fisiologia das tarefas neurais executadas pelo NST e pelos NNBB, de modo geral.

Atualmente, o NST é um dos alvos preferenciais do tratamento cirúrgico por estimulação cerebral profunda (*deep brain stimulation* – DBS) da DP (FASANO; DANIELE; ALBANESE, 2012; OKUN, 2012; WEAVER et al., 2012; SCHUEPBACH et al., 2013; DEUSCHL; AGID, 2013). Os efeitos do DBS sobre o sistema nervoso central são bastante discutidos, mas se acredita que a estimulação elétrica sobre determinados NNBB cause inibição do corpo neuronal, excitação de fibras próximas ao estimulador, modificação da expressão de neurotransmissores locais (como glutamato, GABA e dopamina), liberação de cálcio extracelular pelos astrócitos, aumento no fluxo sanguíneo cerebral local e possível estímulo da proliferação de células precursoras neurais (FASANO; DANIELE; ALBANESE, 2012; OKUN, 2012). Quanto à ação específica do DBS no NST, sabe-se que há uma hiperatividade elétrica do NST em indivíduos com DP (RODRIGUEZ-OROZ et al., 2001), e é pouco esclarecido de que modo a estimulação elétrica reduz os sintomas de bradicinesia, rigidez e discinesia, mas se supõe que a estimulação de fibras próximas ao NST (como a zona incerta, campos de Forel, *ansa lenticularis* e o *fasciculus lenticularis*) seja responsável por parte importante destes efeitos clínicos (FASANO; DANIELE; ALBANESE, 2012). Até o momento, não se conhece os efeitos que o DBS possa ter sobre a liberação de NO no NST. Conforme confirmado por nossos resultados, sendo um núcleo densamente povoado por neurônios que contêm NO em humanos, nós sugerimos que uma parcela dos efeitos benéficos do DBS sobre a sintomatologia da DP possa ser mediada pela interferência da estimulação elétrica profunda sobre a neurotransmissão nitrérgica do NST.

5.6 - ANÁLISE DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO NÚCLEO SUBTALÂMICO – MORFOMETRIA

Nossos resultados mostraram, de forma inédita, informações sobre os parâmetros morfométricos dos neurônios nitrérgicos do NST. Não há trabalhos similares, tanto em animais quanto em humanos, para a comparação dos resultados. Foi visto que o envelhecimento não provocou alterações na morfologia neuronal nitrérgica do NST, e que os neurônios nitrérgicos existentes nas regiões mais posteriores deste núcleo são menores que os localizados na porção mais anterior.

Conforme visto acima, morfologicamente se divide os neurônios subtalâmicos, por características morfológicas, em magnocelulares e parvocelulares (MARANI et al., 2008). De acordo com os dados morfométricos que obtivemos, os neurônios nitrérgicos do NST apresentam diâmetro máximo médio entre 30 a 34 μm , área média do *soma* entre 350 a 420 μm^2 , cerca de 3 dendritos primários e formato oval predominante. Estes valores são próximos dos descritos classicamente por

Winkler em 1928 (apud MARANI et al., 2008) e por Lévesque e Parent (2005) para os neurônios principais magnocelulares. Isto mostra que os neurônios nitrérgicos do NST, cerca de 90% do total neuronal do núcleo, correspondem aos neurônios principais de projeção, e diferente do que tem sido discutido na literatura a partir do trabalho de Smith e Parent (1988), estas células não são apenas glutamatérgicas; ao que se indica, estes neurônios subtalâmicos, de grande relevância, coexpressam glutamato e NO.

5.7 - ANÁLISE DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO – MORFOMETRIA

Ainda visto como uma região puramente colinérgica, o NPP de indivíduos com síndromes parkinsonianas foi avaliado por Hirsch et al. (1987), e a recém-descoberta técnica da NADPHd foi utilizada para detecção dos neurônios deste núcleo, de modo casual. Os autores descobriram uma área com formato de foice fortemente marcada pela NADPHd, a qual eles associaram à região NPPc descrita por Olszewski e Baxter (1954). Nesta área com formato de foice, a densidade neuronal foi menor nos indivíduos com doenças degenerativas como DP e PSP. A forte presença destas células no NPP foi confirmada por Kowall e Mueller (1988) (NADPHd), Nakamura et al. (1988) (NADPHd), Geula, Schatz e Mesulam (1993) (NADPHd) e por Egberongbe et al. (1994) (IHQ para nNOS). Em todos estes trabalhos, exceto o último, os neurônios com atividade colinérgica também apresentaram reação à NADPHd, definindo que os neurônios colinérgicos coexpressam NO em quase sua totalidade. Ohyu e Takashima (1998) detectaram a presença de neurônios nitrérgicos no NPP a partir da 13ª semana gestacional em humanos.

Nossos resultados confirmam estes achados, mostrando uma forte presença destes neurônios em uma área com formato de foice, principalmente no nível do colículo inferior, conforme descrito pelos trabalhos citados acima. Todos os estudos prévios também mostraram a presença de neurônios nitrérgicos em núcleos adjacentes ao NPP, como o núcleo reticular pontino oral, núcleo parabraquial lateral, núcleo tegmentar dorsolateral, núcleo central pontino, núcleo cuneiforme e núcleo peripeduncular, além de células NADPHd-positivas espalhadas pela região periaquedutal cinzenta (HIRSCH et al., 1987; KOWALL; MUELLER, 1988; NAKAMURA et al., 1988; EGBERONGBE et al., 1994).

Em relação aos parâmetros morfométricos, há poucas informações sobre a morfologia destas células na literatura. De acordo com nosso trabalho, os neurônios nitrérgicos do NPP apresentam diâmetro médio de 43 a 50 μm , área média do *soma* de 650 a 880 μm^2 , mediana de 3 dendritos primários, comprimento dendrítico máximo de 140 a 175 μm e considerável diversidade de tipos

morfológicos. Nos trabalhos que marcaram neurônios nitrérgicos pela NADPHd, o diâmetro médio variou entre 30 a 80 μm , com morfologia variada (multipolar, triangular, fusiforme) e cerca de 2 a 4 dendritos primários (HIRSCH et al., 1987; KOWALL; MUELLER, 1988; NAKAMURA et al., 1988;), em conformidade com nossos achados. Rinne et al. (2008) mostraram que os neurônios colinérgicos do NPP de humanos apresentam áreas médias de 2223 μm^2 , quase o triplo das dimensões vistas em nosso trabalho, diferença provavelmente explicada pelas diferenças metodológicas.

Assim como no NST, a literatura ignora as implicações funcionais da maciça presença de neurônios que expressam NO na região caudal do NPP (*pars compacta*). O NPP tem sido considerado a área humana análoga ao centro locomotor mesencefálico, uma área funcional do tronco encefálico na qual é possível se evocar eletricamente padrões coordenados de locomoção em modelos com ratos e gatos descerebrados (INGLIS; WINN, 1995; ERRO; GIMÉNEZ-AMAYA, 1999; LEE; RINNE; MARSDEN, 2000; BENARROCH, 2013), porém de difícil localização anatômica. As evidências mostram que: (1) infartos no NPP podem cursar com instabilidade da marcha de humanos, (2) há uma redução progressiva dos neurônios colinérgicos do NPP de pessoas com DP, uma doença que cursa com distúrbios importantes da marcha, não-responsivos à terapia de reposição dopaminérgica, e (3) lesões por radiofrequência no NPP de primatas não humanos causam acinesia e instabilidade de marcha, os quais não melhoram com agonistas dopaminérgicos (ALAM; SCHWABE; KRAUSS, 2011). A porção mais caudal do NPP (*pars compacta*), região densamente povoada por neurônios colinérgicos e nitrérgicos, está associada às projeções eferentes para o NST e alguns núcleos do tronco encefálico e da medula espinhal e funcionalmente muito envolvida com controle de sistemas motores, incluindo a marcha (MARTINEZ-GONZALEZ; BOLAM; MENA-SEGOVIA, 2011). Todos estes argumentos suportam a hipótese de que o NPP seja realmente uma importante área de controle da marcha em humanos, e que os neurônios colinérgicos/nitrérgicos da *pars compacta* sejam os mais implicados neste processo.

A partir destas evidências, associada à falta de eficácia do tratamento medicamentoso e do DBS no NST sobre sintomas axiais, como instabilidade da marcha e postura, o NPP se tornou um possível alvo terapêutico para a estimulação elétrica profunda. Há fracas evidências, oriundas de pequenas séries de caso, de que há um efeito positivo do DBS bilateral no NPP sobre alterações na marcha e quedas (LUKINS; TISCH; JONKER, 2013), e inclusive uma possível ação sinérgica na estimulação combinada de baixa frequência em NPP e NST sobre o subescore axial de sintomas motores da DP (KHAN et al., 2012). Em analogia com o que foi argumentado para o NST, acreditamos que parte dos efeitos clínicos causados pela estimulação elétrica sobre o NPP possa ser mediada pela liberação e difusão do NO para núcleos próximos.

5.8 - ANÁLISE QUALITATIVA DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO GLOBO PÁLIDO E DA SUBSTÂNCIA NEGRA

Morton, Nicholson e Faull (1993) estudaram a marcação pela NADPHd do neurópilo em NNBB de indivíduos controles e com DH, e foi visto um neurópilo bem marcado nos GP (porém menos que o estriado), e o GPe mostrou uma intensidade de azul maior que a do GPi, principalmente em sua porção mais marginal. Foram vistos alguns neurônios de aparência multipolar e de tamanho médio a grande nos dois segmentos do GP. Em outro trabalho, através de HHIS, foi vista a presença de alguns neurônios nitrérgicos no GPi e na lâmina medular medial, porém não no GPe (NISBET et al., 1994), resultados confirmados posteriormente por Eve et al. (1998).

Nossos resultados replicaram os achados destes três estudos anteriores, mostrando que a lâmina medular medial e o GPi são as regiões com maior densidade de neurônios nitrérgicos, porém o neurópilo do GPe é mais fortemente marcado que o do GPi. Em particular, chamou-nos a atenção a grande presença de células e fibras NADPHd-positivas nas porções mais marginais dos GP e nas lâminas medulares.

Os estudos citoarquiteturais, conforme já citado acima, mostram que a maioria das células do GP estão dispostas em bandas e formam um arranjo radial discoide perpendicular às fibras oriundas do estriado e do NST, explicando a maior presença de neurônios nitrérgicos também nestas áreas (Figura 3). Um estudo em primatas não-humanos mostrou que a lâmina medular medial é particularmente rica em fibras dopaminérgicas (LAVOIE; SMITH; PARENT, 1989 apud EVE et al., 1998)¹⁶.

É muito provável que estes neurônios marcados pela NADPHd sejam uma subpopulação de células GABAérgicas que coexpressa NO (NISBET et al., 1994), e com isso podemos inferir funcionalmente que a presença nitrérgica neste ponto específicos da circuitaria dos NNBB, associada a outros neurotransmissores como GABA e dopamina, também tenha uma função modulatória sobre os sinais processados.

Quanto à SN, alguns estudos de localização não mostraram a presença de neurônios nitrérgicos neste núcleo (KOWALL; MUELLER, 1988; EGBERONGBE et al., 1994; NISBET et al., 1994; OHYU; TAKASHIMA, 1998), enquanto que Blum-Degen et al. (1999) detectaram a níveis medianos da proteína nNOS na SN, em uma concentração inferior à do estriado e GP, porém maior que a do NST. Contudo, Hunot et al. (1996) mostraram histologicamente a existência de células NADPHd- e nNOS-positivas na SN tanto de indivíduos normais quanto com DP, inclusive alguns

---

¹⁶ LAVOIE, B.; SMITH, A.; PARENT, A. Dopaminergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. **J Comp Neurol**, v. 289, p. 36-52, 1989.

destes neurônios contendo neuromelanina (provavelmente dopaminérgicos), sendo os resultados negativos de outros estudos com humanos justificados por diferenças metodológicas. Em ratos, há algumas evidências de que realmente haja neurônios nitrérgicos na área tegmentar ventral e na SNpc (VINCENT; KIMURA, 1992; RODRIGO et al., 1994; CAVALCANTI-KWIATKOSKI et al., 2010).

Nossas análises não detectaram neurônios nitrérgicos na SN humana. Acreditamos que as diferenças de resultado ocorram pela diferença do método de amostragem de mesencéfalo que cada trabalho utilizou. Estas dúvidas seriam parcialmente resolvidas se a presença destes neurônios pudesse ser detectada por método estereológico, que permitiria uma busca extensa por estas células. Kowall e Mueller (1988) descrevem um agrupamento de células sem neuromelanina NADPHd-positivas medial à SNpc, em um núcleo chamado de paranigral, também visualizado em nosso estudo. É possível que o trabalho de Hunot et al. (1996) tenha detectado esta população de neurônios.

6. CONCLUSÕES

(I) Não há diferenças significativas entre as densidades neuronais e parâmetros morfométricos nitrérgicos dos NNBB entre adultos jovens e idosos.

(II) A região mais posterior do estriado apresenta maior densidade e menores dimensões neuronais nitrérgicas.

(III) O estriado límbico (putâmen posteroventral) apresenta maior densidade neuronal que os outros subsetores funcionais.

(IV) O NST é uma estrutura em que cerca de 90% dos neurônios expressam NO, e a morfologia destas células sugere que sejam neurônios que coexpressam glutamato.

(V) Há importante presença nitrérgica no NPP.

(VI) Os globos pálidos apresentam mais neurônios nitrérgicos nas lâminas medulares, e não há presença nitrérgica na SN.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEKAWA, T.; OHMORI, T.; KOYAMA, T. Effect of NO synthase inhibition on behavioral changes induced by a single administration of methamphetamine. **Brain Research**, v. 666, n. 1, p. 147-150, 1994.

ALAM, M.; SCHWABE, K.; KRAUSS, J. K. The pedunclopontine nucleus area: Critical evaluation of interspecies differences relevant for its use as a target for deep brain stimulation. **Brain**, v. 134, n. 1, p. 11-23, 2011.

ALBIN, R. L.; YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends Neurosci**, v. 12, n. 10, p. 366-75, 1989.

ALEXANDER, G. E.; DELONG, M. R.; STRICK, P. L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. **Annu Rev Neurosci**, v. 9, p. 357-81, 1986.

ALEXANDER, G. E.; CRUTCHER, M. D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. **Trends Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 266-71, 1990.

BARTHWAL, M. K.; SRIVASTAVA, N.; DIKSHIT, M. Role of nitric oxide in a progressive neurodegeneration model of Parkinson's disease in the rat. **Redox Report**, v. 6, n. 5, p. 297-302, 2001.

BASKERVILLE, K. A. et al. Aging causes partial loss of basal forebrain but no loss of pontine reticular cholinergic neurons. **Neuroreport**, v. 17, n. 17, p. 1819-23, 2006.

BEAL, M. F. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. **Annals of Neurology**, v. 44, n. 3, p. S110-S114, 1998. Supplement 1.

BEESELEY, J. E. Histochemical methods for detecting nitric oxide synthase. **Histochem J**, v. 27, n. 10, p. 757-69, 1995.

BENARROCH, E. E. Nitric oxide: A pleiotropic signal in the nervous system. **Neurology**, v. 77, n. 16, p. 1568-76, 2011.

BENARROCH, E.E. Pedunclopontine nucleus: functional organization and clinical implications. **Neurology**, v. 80, n. 12, p. 1148-55, 2013.

BERNÁCER, J.; PRENSA, L.; GIMENEZ-AMAYA, J. M. Morphological features, distribution and compartmental organization of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced-diaphorase interneurons in the human striatum. **Journal of Comparative Neurology**, v. 489, n. 3, p. 311-327, 2005.

_____. Cholinergic interneurons are differentially distributed in the human striatum. **PLoS One**, v. 2, n. 11, p. e1174, 2007.

_____. Chemical architecture of the posterior striatum in the human brain. **J Neural Transm**, v. 115, n. 1, p. 67-75, 2008.

BERTRAN-GONZALEZ, J. et al. What is the Degree of Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections? **Front Neuroanat**, v. 4, 2010.

BIRD, D. C. et al. Lack of phencyclidine-induced effects in mice with reduced neuronal nitric oxide synthase. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 155, n. 3, p. 299-309, 2001.

BLACK, M. D.; MATTHEWS, E. K.; HUMPHREY, P. P. A. The effects of a photosensitive nitric oxide donor on basal and electrically-stimulated dopamine efflux from the rat striatum in vitro. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1357-1365, 1994.

BLOTTNER, D.; GROZDANOVIC, Z.; GOSSRAU, R. Histochemistry of nitric oxide synthase in the nervous system. **Histochem J**, v. 27, n. 10, p. 785-811, 1995.

BLUM-DEGEN, D. et al. Characterization and regional distribution of nitric oxide synthase in the human brain during normal ageing. **Brain Research**, v. 834, n. 1-2, p. 128-135, 1999.

BOCKELMANN, R. et al. NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase containing neurons in normal and Parkinson's disease putamen. **J Neural Transm Park Dis Dement Sect**, v. 7, n. 2, p. 115-21, 1994.

BRATTHAUER, G. L. Preparation of frozen sections for analysis. **Methods Mol Biol**, v. 588, p. 67-73, 2010.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 768-770, 1990.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, v. 8, n. 1, p. 3-11, 1992.

BUJAS-BOBANOVIC, M. et al. Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor. **Br J Pharmacol**, v. 130, n. 5, p. 1005-12, 2000.

BURKE, S. N.; BARNES, C. A. Neural plasticity in the ageing brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 30-40, 2006.

CABELLO, C. R. et al. Ageing of substantia nigra in humans: cell loss may be compensated by hypertrophy. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 28, n. 4, p. 283-91, 2002.

CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 10, p. 766-75, 2007.

_____. Nitric oxide in cell survival: A Janus molecule. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, n. 11, p. 2717-2739, 2009.

CASTENSSON, A. et al. High-resolution quantification of specific mRNA levels in human brain autopsies and biopsies. **Genome Res**, v. 10, n. 8, p. 1219-29, 2000.

CAVALCANTI-KWIATKOSKI, R. et al. Altered expression of neuronal nitric oxide synthase in weaver mutant mice. **Brain Res**, v. 1326, p. 40-50, 2010.

CHA, C. I. et al. Age-related changes of VIP, NPY and somatostatin-immunoreactive neurons in the

cerebral cortex of aged rats. **Brain Research**, v. 753, n. 2, p. 235-244, 1997.

_____. Immunocytochemical study on the distribution of NOS-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of aged rats. **NeuroReport**, v. 9, n. 10, p. 2171-2174, 1998.

_____. Region-specific changes of NOS-IR cells in the basal ganglia of the aged rat. **Brain Research**, v. 854, n. 1-2, p. 239-244, 2000.

CHEVALIER, G.; DENIAU, J. M. Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. **Trends Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 277-80, 1990.

CIANI, E. et al. Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide. **J Neurochem**, v. 82, n. 5, p. 1282-9, 2002.

CZARNECKA, A. et al. Alterations in the expression of nNOS in the substantia nigra and subthalamic nucleus of 6-OHDA-lesioned rats: The effects of chronic treatment with L-DOPA and the nitric oxide donor, molsidomine. 2013. **Brain Research**, v. 1541, p. 92-105, 2013.

DAWSON, T. M. et al. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH-diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 17, p. 7797-7801, 1991.

DE VENTE, J. et al. Nitric-oxide-induced cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat brain. **Experimental Brain Research**, v. 137, n. 1, p. 480-491, 2001.

DEFELIPE, J. A study of NADPH diaphorase-positive axonal plexuses in the human temporal cortex. **Brain Research**, v. 615, n. 2, p. 342-346, 1993.

DEL BEL, E. A.; DA SILVA, C. A.; GUIMARÃES, F. S. Catalepsy induced by nitric oxide synthase inhibitors. **General Pharmacology**, v. 30, n. 2, p. 245-248, 1998.

DEL BEL, E. et al. Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice. **Psychopharmacology**, v. 161, n. 1, p. 32-37, 2002.

_____. Catalepsy induced by intra-striatal administration of nitric oxide synthase inhibitors in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 485, n. 1-3, p. 175-181, 2004.

_____. Role of nitric oxide on motor behavior. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 25, n. 2, p. 371-392, 2005.

_____. Role of nitric oxide in motor control: Implications for Parkinson's disease pathophysiology and treatment. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 5, p. 471-488, 2011.

DEL MORAL, M. L. et al. Immunohistochemistry of neuronal nitric oxide synthase and protein nitration in the striatum of the aged rat. **Microscopy Research and Technique**, v. 64, n. 4, p. 304-311, 2004.

DEN DUNNEN, W. F.; STAAL, M. J. Anatomical alterations of the subthalamic nucleus in relation to age: a postmortem study. **Mov Disord**, v. 20, n. 7, p. 893-8, 2005.

DEUSCHL, G.; AGID, Y. Subthalamic neurostimulation for Parkinson's disease with early fluctuations: balancing the risks and benefits. **Lancet Neurol**, v. 12, n. 10, p. 1025-34, 2013.

DICKSTEIN, D. L. et al. Changes in the structural complexity of the aged brain. **Aging Cell**, v. 6, n. 3, p. 275-284, 2007.

DOWNEN, M. et al. Neuronal nitric oxide synthase expression in developing and adult human CNS. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 58, n. 1, p. 12-21, 1999.

DOYLE, C. A.; SLATER, P. Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus. **Neuroscience**, v. 76, n. 2, p. 387-395, 1997.

DZOLJIC, E.; DE VRIES, R.; DZOLJIC, M. R. New and potent inhibitors of nitric oxide synthase reduce motor activity in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 87, n. 2, p. 209-212, 1997.

EGBERONGBE, Y. I. et al. The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. **Neuroscience**, v. 59, n. 3, p. 561-578, 1994.

ELLISON, D. W.; KOWALL, N. W.; MARTIN, J. B. Subset of neurons characterized by the presence of NADPH-diaphorase in human substantia innominata. **Journal of Comparative Neurology**, v. 260, n. 2, p. 233-245, 1987.

ERRO, E.; GIMENEZ-AMAYA, J. M. Pedunculo-pontine tegmental nucleus. Anatomy, functional considerations and physiopathological implications. **Anales del Sistema Sanitario del Navarra**, v. 22, n. 2, p. 189-201, 1999.

EVE, D. J. et al. Basal ganglia neuronal nitric oxide synthase mRNA expression in Parkinson's disease. **Molecular Brain Research**, v. 63, n. 1, p. 62-71, 1998.

EVERS, P.; UYLINGS, H. B.; SUURMEIJER, A. J. Antigen retrieval in formaldehyde-fixed human brain tissue. **Methods**, v. 15, n. 2, p. 133-40, 1998.

FASANO, A.; DANIELE, A.; ALBANESE, A. Treatment of motor and non-motor features of Parkinson's disease with deep brain stimulation. **Lancet Neurol**, v. 11, n. 5, p. 429-42, 2012.

FEARNLEY, J. M.; LEES, A. J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. **Brain**, v. 114, n. 5, p. 2283-301, 1991.

FEDER, N.; SIDMAN, R. L. Methods and principles of fixation by freeze-substitution. **J Biophys Biochem Cytol**, v. 4, n. 5, p. 593-600, 1958.

FERRANTE, R. J.; KOWALL, N. W.; BEAL, M. F. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. **Science**, v. 230, n. 4725, p. 561-563, 1985.

FERRANTE, R. J. et al. Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 46, n. 1, p. 12-27, 1987.

FERRARO, G. et al. CCK-8S systemic administration blocks the 7-nitroindazole-induced effects of the EEG of striatum and globus pallidus: A FFT analysis in the rat. **In Vivo**, v. 18, n. 3, p. 317-324, 2004.

FERRER, I. et al. Brain protein preservation largely depends on the postmortem storage temperature: implications for study of proteins in human neurologic diseases and management of brain banks: a BrainNet Europe Study. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 66, n. 1, p. 35-46, 2007.

_____. Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. **Cell Tissue Bank**, v. 9, n. 3, p. 181-94, 2008.

FLOOD, D. G. Critical issues in the analysis of dendritic extent in aging humans, primates, and rodents. **Neurobiol Aging**, v. 14, n. 6, p. 649-54, 1993

FOX, C. H. et al. Formaldehyde fixation. **J Histochem Cytochem**, v. 33, n. 8, p. 845-53, 1985.

FOURNIER-GOSSELIN, M. P. et al. Regional anatomy of the pedunculo pontine nucleus: relevance for deep brain stimulation. **Mov Disord**, v. 28, n. 10, p. 1330-36, 2013.

FRITZEN, S. et al. NO synthase-positive striatal interneurons are decreased in schizophrenia. **European Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 9, p. 595-599, 2007.

FUDGE, J. L.; HABER, S. N. Defining the caudal ventral striatum in primates: cellular and histochemical features. **J Neurosci**, v. 22, n. 23, p. 10078-82, 2002.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v. 336, n. 6197, p. 385-388, 1988.

GARTHWAITE, J. et al. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **European Journal of Pharmacology - Molecular Pharmacology Section**, v. 172, n. 4-5, p. 413-416, 1989.

GEULA, C.; SCHATZ, C. R.; MESULAM, M. M. Differential localization of NADPH-diaphorase and calbindin-D(28k) within the cholinergic neurons of the basal forebrain, striatum and brainstem in the rat, monkey, baboon and human. **Neuroscience**, v. 54, n. 2, p. 461-476, 1993.

GOLDMAN-RAKIC, P. S.; SELEMON, L. D. New frontiers in basal ganglia research. Introduction. **Trends Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 241-4, 1990.

GONZALEZ-HERNANDEZ, T.; DE LA CRUZ, M. A. P.; MANTOLAN-SARMIENTO, B. Histochemical and immunohistochemical detection of neurons that produce nitric oxide: Effect of different fixative parameters and immunoreactivity against non-neuronal NOS antisera. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 12, p. 1399-1413, 1996.

GRAYBIEL, A. M. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. **Trends Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 244-54, 1990.

GUEVARA-GUZMAN, R.; EMSON, P. C.; KENDRICK, K. M. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. **Journal of Neurochemistry**, v. 62, n. 2, p. 807-810, 1994.

HABER, S. N.; GDOWSKI, M. J. The Basal Ganglia. In: PAXINOS, G. e MAI, J., K. (Ed.). **The Human Nervous System**. 2Ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2004. cap. 21,

HALLAK, J. E. et al. Rapid improvement of acute schizophrenia symptoms after intravenous sodium nitroprusside: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 7, p. 668-76, 2013.

HARRISON, P. J.; PEARSON, R. C. In situ hybridization histochemistry and the study of gene expression in the human brain. **Prog Neurobiol**, v. 34, n. 4, p. 271-312, 1990.

HILBIG, H. et al. Influence of post-mortem delay and storage temperature on the immunohistochemical detection of antigens in the CNS of mice. **Exp Toxicol Pathol**, v. 56, n. 3, p. 159-71, 2004.

HIRSCH, E. C. et al. Neuronal loss in the pedunculo pontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 16, p. 5976-5980, 1987.

_____. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 991, p. 214-228, 2003.

HOLT, D. J.; GRAYBIEL, A. M.; SAPER, C. B. Neurochemical architecture of the human striatum. **Journal of Comparative Neurology**, v. 384, n. 1, p. 1-25, 1997.

HOPE, B. T.; VINCENT, S. R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. **J Histochem Cytochem**, v. 37, n. 5, p. 653-61, 1989.

HOPE, B. T. et al. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 7, p. 2811-2814, 1991.

HUANG, P. L. et al. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. **Cell**, v. 75, n. 7, p. 1273-1286, 1993.

HUBBLE, J. P. Aging and the basal ganglia. **Neurol Clin**, v. 16, n. 3, p. 649-57, 1998.

HUNOT, S. et al. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 72, n. 2, p. 355-63, 1996.

HYND, M. R. et al. Biochemical and molecular studies using human autopsy brain tissue. **J Neurochem**, v. 85, n. 3, p. 543-62, 2003.

INGLIS, W. L.; WINN, P. The pedunculo pontine tegmental nucleus: Where the striatum meets the reticular formation. **Progress in Neurobiology**, v. 47, n. 1, p. 1-29, 1995.

INOUE, K. et al. Immunotoxin-mediated tract targeting in the primate brain: selective elimination of the cortico-subthalamic "hyperdirect" pathway. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39149, 2012.

IRAVANI, M. M.; MILLAR, J.; KRUK, Z. L. Differential release of dopamine by nitric oxide in subregions of rat caudate putamen slices. **Journal of Neurochemistry**, v. 71, n. 5, p. 1969-1977, 1998.

ISSY, A. et al. Critical role of nitric oxide in the modulation of prepulse inhibition in Swiss mice. **Psychopharmacology (Berl)**, 2013. In press. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00213-013-3277-4>>. Acesso em: 21 Nov. 2013.

ITOKAWA, K. et al. Effect of L-DOPA on nitric oxide production in striatum of freely mobile mice.

Neuroscience Letters, v. 402, n. 1-2, p. 142-144, 2006.

JACOBS, B.; DRISCOLL, L.; SCHALL, M. Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: a quantitative Golgi study. **J Comp Neurol**, v. 386, n. 4, p. 661-80, 1997.

JOHANNES, S. et al. NADPH-diaphorase staining reveals new types of interneurons in human putamen. **Brain Research**, v. 980, n. 1, p. 92-99, 2003.

JOHNSTON, N. L. et al. Multivariate analysis of RNA levels from postmortem human brains as measured by three different methods of RT-PCR. Stanley Neuropathology Consortium. **J Neurosci Methods**, v. 77, n. 1, p. 83-92, 1997.

MAI, K.; ASSHEUER, J.; PAXINOS, G. **Atlas of the Human Brain**. 2nd Edition. London: Elsevier Academic Press, 2004.

KAWAGUCHI, Y. Neostriatal cell subtypes and their functional roles. **Neurosci Res**, v. 27, n. 1, p. 1-8, 1997

KAWAGUCHI, Y. et al. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. **Trends Neurosci**, v. 18, n. 12, p. 527-35, 1995.

KEMP, J. M.; POWELL, T. P. The cortico-striate projection in the monkey. **Brain**, v. 93, n. 3, p. 525-46, 1970.

KEUKEN, M. C. et al. Ultra-high 7T MRI of structural age-related changes of the subthalamic nucleus. **J Neurosci**, v. 33, n. 11, p. 4896-900, 2013.

KHAN, S. et al. Combined pedunculopontine-subthalamic stimulation in Parkinson disease. **Neurology**, v. 78, n. 14, p. 1090-5, 2012.

KISH, S. J.; SHANNAK, K.; HORNYKIEWICZ, O. Uneven patterns of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. **N Eng J Med**, v. 313, n. 14, p. 876-80, 1988.

KISS, J. P.; VIZI, E. S. Nitric oxide: A novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. **Trends in Neurosciences**, v. 24, n. 4, p. 211-215, 2001.

KNOTT, A. B.; BOSSY-WETZEL, E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 3, p. 541-54, 2009.

KORDOWER, J. H. et al. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. **Brain**, v. 136, p. 8, p. 2419-31, 2013.

KOWALL, N. W. et al. Topography of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase staining neurons in rat striatum. **Neurosci Lett**, v. 59, n. 1, p. 61-6, 1985.

KOWALL, N. W.; FERRANTE, R. J.; BEAL, M. F. Neuropeptide Y, somatostatin, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the human striatum: A combined immunocytochemical and enzyme histochemical study. **Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 817-828, 1987.

KOWALL, N. W.; MUELLER, M. P. Morphology and distribution of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) diaphorase reactive neurons in human brainstem. **Neuroscience**, v. 26, n. 2, p. 645-54, 1988.

KRAVITZ, A. V. et al. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. **Nature**, v. 466, n. 7306, p. 622-6, 2010.

KRZASCIK, P.; KOSTOWSKI, W. Nitric oxide donors antagonize N-nitro-L-arginine and haloperidol catalepsy: Potential implication for the treatment of parkinsonism? **Polish Journal of Pharmacology**, v. 49, n. 4, p. 263-266, 1997.

KÜNZLE, H. Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in Macaca fascicularis. **Brain Research**, v. 88, n. 2, p. 195-209, 1975.

KUO, H.; HENGEMIHLE, J.; INGRAM, D. K. Nitric oxide synthase in rat brain: Age comparisons quantitated with NADPH-diaphorase histochemistry. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 52, n. 3, p. B146-B151, 1997.

LANCIEGO, J. L.; LUQUIN, N.; OBESO, J. A. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 12, p. a009621, 2012.

LAUER, M. et al. Morphological abnormalities in nitric-oxide-synthase-positive striatal interneurons of schizophrenic patients. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 3, p. 111-117, 2005.

LEE, C. S. et al. Lack of regional selectivity during the progression of Parkinson disease: implications for pathogenesis. **Arch Neurol**, v. 61, n. 12, p. 1920-5, 2004.

LEE, M. S.; RINNE, J. O.; MARSDEN, C. D. The pedunculo pontine nucleus: its role in the genesis of movement disorders. **Yonsei Med J**, v. 41, n. 2, p. 167-84, 2000.

LEONTOVICH, T. A.; MUKHINA, Y. K.; FEDOROV, A. A. Neurons of the basal ganglia of the human brain (striatum and basolateral amygdala) expressing the enzyme NADPH-d. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 34, n. 3, p. 277-286, 2004.

LÉVESQUE, J. C.; PARENT, A. GABAergic interneurons in human subthalamic nucleus. **Mov Disord**, v. 20, n. 5, p. 574-84, 2005.

LIN, D. T. S. et al. Nitric oxide signaling via cGMP-stimulated phosphodiesterase in striatal neurons. **Synapse**, v. 64, n. 6, p. 460-6, 2010.

LUKINS, T.; TISCH, S.; JONKER, B. The latest evidence on target selection in deep brain stimulation for Parkinson's disease. **J Clin Neurosci.**, 2013. In press. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0967586813003482>>. Acesso em: 21 Nov. 2013.

MAIA-DE-OLIVEIRA, J. P. et al. Nitric oxide plasma/serum levels in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 34, p. S149-55, 2012. Supplement 2.

MARANI, E. et al. **The Subthalamic Nucleus Part I: Development, Cytology, Topography and Connections** Berlin: Springer-Verlag, 2008.

MARRAS, R. A. et al. L-NOARG, an inhibitor of nitric oxide synthase, induces catalepsy in mice. **NeuroReport**, v. 7, n. 1, p. 158-160, 1995.

MARTINEZ-GONZALEZ, C.; BOLAM, J. P.; MENA-SEGOVIA, J. Topographical organization of the pedunculopontine nucleus. **Front Neuroanat**, v. 5, p. 22, 2011.

MASON, J. T.; O'LEARY, T. J. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. **J Histochem Cytochem**, v. 39, n. 2, p. 225-9, 1991.

MATSUMOTO, T. et al. A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. **Neurosci Lett**, v. 155, n. 1, p. 61-4, 1993.

MENG, S. Z. et al. Developmental and age-related changes of dopamine transporter, and dopamine D1 and D2 receptors in human basal ganglia. **Brain Res**, v. 843, n. 1-2, p. 136-44, 1999.

MEYER, G. et al. Morphology of neurons in the white matter of the adult human neocortex. **Experimental Brain Research**, v. 88, n. 1, p. 204-212, 1992.

MITKOVSKI, M. et al. Investigations into potential extrasynaptic communication between the dopaminergic and nitrergic systems. **Front Physiol**, v. 3, n. 372, 2012.

MIZUKAWA, K. Distribution of reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate diaphorase-positive cells and fibers in the cat central nervous system. **Journal of Comparative Neurology**, v. 279, n. 2, p. 281-311, 1989.

MONORANU, C. M. et al. pH measurement as quality control on human post mortem brain tissue: a study of the BrainNet Europe consortium. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 35, n. 3, p. 329-37, 2009.

MORTON, A. J.; NICHOLSON, L. F. B.; FAULL, R. L. M. Compartmental loss of NADPH diaphorase in the neuropil of the human striatum in Huntington's disease. **Neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 159-168, 1993.

MRAK, R. E.; GRIFFIN, S. T.; GRAHAM, D. I. Aging-associated changes in human brain. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 56, n. 12, p. 1269-75, 1997.

MUFSON, E. J.; BRANDABUR, M. M. Sparing of NADPH diaphorase striatal neurons in Parkinson's and Alzheimer's diseases. **NeuroReport**, v. 5, n. 6, p. 705-708, 1994.

NAKAMURA, S. et al. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase histochemistry in the pontomesencephalic region of the human brainstem. **Brain Res**, v. 455, n. 1, p. 144-7, 1988.

NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. Redox modulation by S-nitrosylation contributes to protein misfolding, mitochondrial dynamics, and neuronal synaptic damage in neurodegenerative diseases. **Cell Death Differ**, v. 18, n. 9, p. 1478-86, 2011.

NAKOS, G.; GOSSRAU, R. When NADPH diaphorase (NADPHd) works in the presence of

formaldehyde, the enzyme appears to visualize selectively cells with constitutive nitric oxide synthase (NOS). **Acta Histochem**, v. 96, n. 3, p. 335-43, 1994.

NAMBU, A. Somatotopic organization of the primate Basal Ganglia. **Front Neuroanat**, v. 5, p. 26, 2011.

NAMBU, A.; TOKUNO, H.; TAKADA, M. Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. **Neurosci Res**, v. 43, n. 2, p. 111-7, 2002.

NAMBU, A. et al. Excitatory cortical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. **J Neurophysiol**, v. 84, n. 1, p. 289-300, 2000.

NECCHI, D. et al. Regional alterations of the NO/NOS system in the aging brain: a biochemical, histochemical and immunochemical study in the rat. **Brain Res**, v. 933, n. 1, p. 31-41, 2002.

NELSON, R. J. et al. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. **Nature**, v. 378, n. 6555, p. 383-6, 1995.

NISBET, A. P. et al. Nitric oxide synthase mRNA expression in human subthalamic nucleus, striatum and globus pallidus: Implications for basal ganglia function. **Molecular Brain Research**, v. 22, n. 1-4, p. 329-332, 1994.

NODA, Y. et al. Involvement of nitric oxide in phencyclidine-induced hyperlocomotion in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 286, n. 3, p. 291-297, 1995.

NORRIS, P. J. et al. Decreased neuronal nitric oxide synthase messenger RNA and somatostatin messenger RNA in the striatum of Huntington's disease. **Neuroscience**, v. 72, n. 4, p. 1037-1047, 1996.

OHYU, J.; TAKASHIMA, S. Developmental characteristics of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) immunoreactive neurons in fetal to adolescent human brains. **Developmental Brain Research**, v. 110, n. 2, p. 193-202, 1998.

OKUN, M. Deep-brain stimulation for Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v. 367, n. 16, p. 1529-38, 2012.

OLSZEWSKI, J.; BAXTER, D. **Cytoarchitecture of the Human Brain Stem**. 1st Edition. Basel: Karger, 1954.

PADOVAN-NETO, F. E. et al. Nitric oxide synthase inhibitor improves de novo and long-term L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 5, 2011.

_____. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 159, n. 3, p. 927-935, 2009.

PARENT, A. Extrinsic connections of the basal ganglia. **Trends Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 254-8, 1990.

PARENT, A.; HAZRATI, L. N. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. **Brain Research Reviews**, v. 20, n. 1, p. 91-127, 1995a.

_____. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external

pallidum in basal ganglia circuitry. **Brain Research Reviews**, v. 20, n. 1, p. 128-154, 1995b.

PASQUALOTTO, B. A.; VINCENT, S. R. Galanin and NADPH-diaphorase coexistence in cholinergic neurons of the rat basal forebrain. **Brain Research**, v. 551, n. 1-2, p. 78-86, 1991.

PAVÓN, N. et al. ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 1, p. 64-74, 2006.

PENNEY, J. B., JR.; YOUNG, A. B. Striatal inhomogeneities and basal ganglia function. **Mov Disord**, v. 1, n. 1, p. 3-15, 1986.

PERCHERON, G.; FILION, M. Parallel processing in the basal ganglia: up to a point. **Trends Neurosci.** v.14, n. 2, p.55-9, 1991.

PIANTADOSI, C. A. Regulation of mitochondrial processes by protein S-nitrosylation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1820, n. 6, p. 712-21, 2012.

POLLOCK, J. S. et al. Nitric oxide synthase isozymes antibodies. **Histochem J**, v. 27, n. 10, p. 738-44, 1995.

PRENTØ , P. The effects of freezing, storage, and thawing on cell compartment integrity and ultrastructure. **Histochem Cell Biol**, v. 108, n. 6, p. 543-7, 1997.

RANSMAYR, G. et al. Age-related changes of neuronal counts in the human pedunculo pontine nucleus. **Neurosci Lett**, v. 288, n. 3, p. 195-8, 2000.

RAZ, N.; TORRES, I. J.; ACKER, J. D. Age, gender, and hemispheric differences in human striatum: a quantitative review and new data from in vivo MRI morphometry. **Neurobiol Learn Mem**, v. 63, n. 2, p. 133-42, 1995.

RINNE, J. O. et al. Loss of cholinergic neurons in the pedunculo pontine nucleus in Parkinson's disease is related to disability of the patients. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 14, n. 7, p. 553-557, 2008.

RODRIGO, J. et al. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 345, n. 1312, p. 175-221, 1994.

RODRIGUEZ-OROZ, M. et al. The subthalamic nucleus in Parkinson's disease: somatotopic organization and physiological characteristics. **Brain**, v. 124, n. 9, p. 1777-90, 2001.

ROITMAN, M. F. et al. Induction of a salt appetite alters dendritic morphology in nucleus accumbens and sensitizes rats to amphetamine. **J Neurosci**, v. 22, n. 11, p. 225, 2002.

ROSENE, D. L.; MESULAM, M. M. Fixation variables in horseradish peroxidase neurohistochemistry. I. The effect of fixation time and perfusion procedures upon enzyme activity. **J Histochem Cytochem**, v. 26, n. 1, p. 28-39, 1978.

ROSENE, D. L.; ROY, N. J.; DAVIS, B. J. A cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact. **J Histochem Cytochem**, v. 34, n. 10, p. 1301-15, 1986.

RUDOW, G. et al. Morphometry of the human substantia nigra in ageing and Parkinson's disease. **Acta Neuropathol**, v. 115, n. 4, p. 461-70, 2008.

SAJIN, B.; SESTAN, N.; DMITROVIC, B. Compartmentalization of NADPH-diaphorase staining in the developing human striatum. **Neuroscience Letters**, v. 140, n. 1, p. 117-120, 1992.

SAKA, E. et al. Local circuit neurons in the striatum regulate neural and behavioral responses to dopaminergic stimulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 13, p. 9004-9009, 2002.

SANDI, C.; VENERO, C.; GUAZA, C. Decreased spontaneous motor activity and startle response in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 277, n. 1, p. 89-97, 1995.

SANGRUCHI, T.; KOWALL, N. W. NADPH diaphorase histochemistry of the human hypothalamus. **Neuroscience**, v. 40, n. 3, p. 713-724, 1991.

SARDO, P. et al. Effects of nitric oxide-active drugs on the discharge of subthalamic neurons: microiontophoretic evidence in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 24, n. 7, p. 1995-2002, 2006.

_____. Intensity of GABA-evoked responses is modified by nitric oxide-active compounds in the subthalamic nucleus of the rat: a microiontophoretic study. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 10, p. 2340-50, 2009.

SCHERER-SINGLER, U. et al. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **J Neurosci Methods**, v. 9, n. 3, p. 229-34, 1983.

SCHMITT, O.; EGGERS, R.; HAUG, H. Quantitative investigations into the histostructural nature of the human putamen. I. Staining, cell classification and morphometry. **Ann Anat**, v. 177, n. 3, p. 243-50, 1995.

SCHOCHET JR, S. S. Neuropathology of aging. **Neurol Clin**, v. 16, n. 3, p. 569-80, 1998.

SCHUEPBACH, W. et al. Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications. **N Engl J Med**, v. 368, n. 7, p. 610-22, 2013.

SELDEN, N. et al. Human striatum: Chemoarchitecture of the caudate nucleus putamen and ventral striatum in health and Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 60, n. 3, p. 621-636, 1994.

SHANKAR, S. K. Biology of aging brain. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 595-604, 2010.

SHEN, K. Z.; JOHNSON, S. W. Ca^{2+} influx through NMDA-gated channels activates ATP-sensitive K^{+} currents through a nitric oxide-cGMP pathway in subthalamic neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 1882-1893, 2010.

SHERWOOD, K. et al. A new index of agonal state for neurological disease. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 37, n. 6, p. 672-5, 2011.

SHIRAKASHI, R.; TANASAWA, I. Method of designing pre-freezing protocol in cryopreservation of biological materials. **Ann N Y Acad Sci**, v. 858, p. 175-82, 1998.

SIMS, K. L. et al. Cytochemical localization of brain nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized)-dependent dehydrogenases. Qualitative and quantitative distributions. **J Histochem Cytochem**, v. 22, n. 1, p. 7-19, 1974.

SMITH, D. E. et al. Memory impairment in aged primates is associated with focal death of cortical neurons and atrophy of subcortical neurons. **J Neurosci**, v. 24, n. 18, p. 4373-81, 2004.

SMITH, Y.; PARENT, A. Neurons of the subthalamic nucleus in primates display glutamate but not GABA immunoreactivity. **Brain Res**, v. 453, n. 1-2, p. 353-6, 1988.

SPESSERT, R.; CLAASSEN, M. Histochemical differentiation between nitric oxide synthase-related and -unrelated diaphorase activity in the rat olfactory bulb. **Histochemical Journal**, v. 30, n. 1, p. 41-50, 1998.

SPESSERT, R.; LAYES, E. Fixation conditions affect the intensity but not the pattern of NADPH-diaphorase staining as a marker for neuronal nitric oxide synthase in rat olfactory bulb. **J Histochem Cytochem**, v. 42, n. 10, p. 1309-15, 1994.

SPRINGALL, D. R. et al. Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. **Histochemistry**, v. 98, n. 4, p. 259-266, 1992.

STARR, M. S.; STARR, B. S. Do NMDA receptor-mediated changes in motor behaviour involve nitric oxide? **European Journal of Pharmacology**, v. 272, n. 2-3, p. 211-217, 1995.

STEWART, T. L. et al. Evidence that nitric oxide causes calcium-independent release of [3H]dopamine from rat striatum in vitro. **Journal of Neurochemistry**, v. 66, n. 1, p. 131-137, 1996.

STURROCK, R. R. Stability of neuron number in the subthalamic and entopeduncular nuclei of the ageing mouse brain. **J Anat**, v. 179, p. 67-73, 1991.

TAO, Z. et al. NADPH-diaphorase-containing neurons in cortex, subcortical white matter and neostriatum are selectively spared in Alzheimer's disease. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 10, n. 6, p. 460-8, 1999.

THOMAS, E.; PEARSE, A. G. The solitary active cells. Histochemical demonstration of damage-resistant nerve cells with a TPN-diaphorase reaction. **Acta Neuropathol**, v. 3, p. 238-49, 1964.

TOMITA, H. et al. Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. **Biol Psychiatry**, v. 55, n. 4, p. 346-52, 2004.

TRACEY, W. R. et al. Nitric oxide synthases in neuronal cells, macrophages and endothelium are NADPH diaphorases, but represent only a fraction of total cellular NADPH diaphorase activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 195, n. 2, p. 1035-40, 1993.

VINCENT, S. R. **Nitric Oxide in the Nervous System**. London: Academic Press, 1995.

VINCENT, S. R. Nitric oxide: A radical neurotransmitter in the central nervous system. **Progress in**

Neurobiology, v. 42, n. 1, p. 129-160, 1994.

_____. Nitric oxide neurons and neurotransmission. **Progress in Neurobiology**, v. 90, n. 2, p. 246-255, 2010.

VINCENT, S. R.; HOPE, B. T. Neurons that say NO. **Trends in Neurosciences**, v. 15, n. 3, p. 108-113, 1992.

VINCENT, S. R.; JOHANSSON, O.; HOKFELT, T. NADPH-diaphorase: A selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. **Journal of Comparative Neurology**, v. 217, n. 3, p. 252-263, 1983.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, n. 4, p. 755-784, 1992.

VONSATTEL, J. P. Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. **Acta Neuropathol**, v. 115, n. 1, p. 55-69, 2008.

WEAVER, F. et al. Randomized trial of deep brain stimulation for Parkinson disease: thirty-six-month outcomes. **Neurology**, v. 79, n. 1, p. 55-65, 2012.

WEST, A. R.; GALLOWAY, M. P. Nitric oxide and potassium chloride-facilitated striatal dopamine efflux in vivo: Role of calcium-dependent release mechanisms. **Neurochemistry International**, v. 33, n. 6, p. 493-501, 1998.

WEST, A. R.; GALLOWAY, M. P.; GRACE, A. A. Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: Effector pathways and signaling mechanisms. **Synapse**, v. 44, n. 4, p. 227-245, 2002.

WEST, A. R.; GRACE, A. A. Striatal nitric oxide signaling regulates the neuronal activity of midbrain dopamine neurons in vivo. **Journal of Neurophysiology**, v. 83, n. 4, p. 1796-1808, 2000.

WEST, A. R.; TSENG, K. Y. Nitric Oxide-Soluble Guanylyl Cyclase-Cyclic GMP Signaling in the Striatum: New Targets for the Treatment of Parkinson's Disease? **Front Syst Neurosci**, v. 5, p. 55, 2011.

WU, Y.; PARENT, A. Striatal interneurons expressing calretinin, parvalbumin or NADPH-diaphorase: A comparative study in the rat, monkey and human. **Brain Research**, v. 863, n. 1-2, p. 182-191, 2000.

YAMADA, K. et al. Reduction in the number of NADPH-diaphorase-positive cells in the cerebral cortex and striatum in aged rats. **Neuroscience Research**, v. 24, n. 4, p. 393-402, 1996.

YETERIAN, E. H.; VAN HOESEN, G. W. Cortico-striate projections in the rhesus monkey: the organization of certain cortico-caudate connections. **Brain Research**, v. 139, n. 1, p. 43-63, 1978.

ZIMA, T.; DRUGA, R.; ŠTÍPEK, S. The influence of chronic moderate ethanol administration on NADPH-diaphorase (nitric oxide synthase) activity in rat brain. **Alcohol and Alcoholism**, v. 33, n. 4, p. 341-346, 1998.