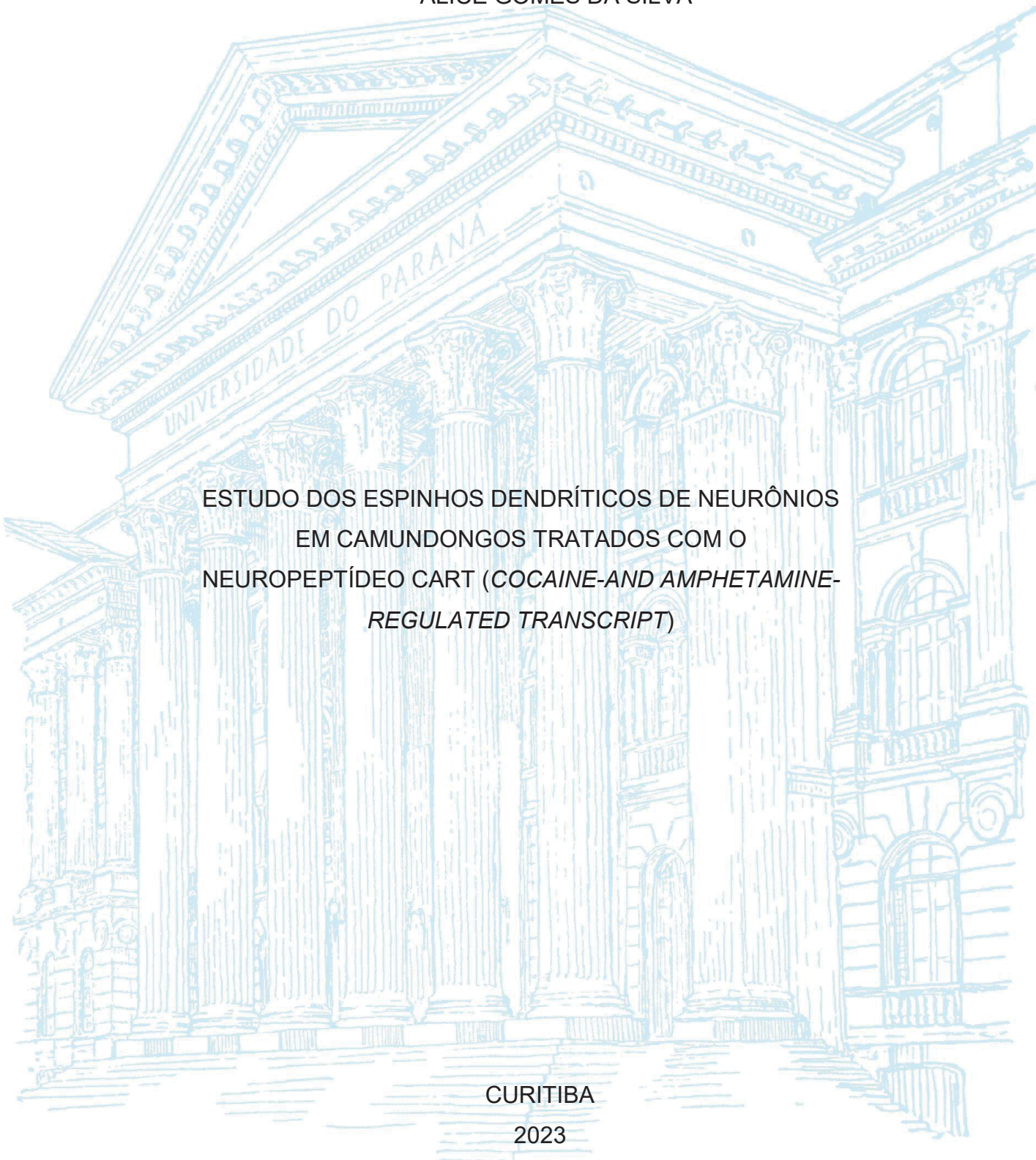


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALICE GOMES DA SILVA



ESTUDO DOS ESPINHOS DENDRÍTICOS DE NEURÔNIOS  
EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM O  
NEUROPEPTÍDEO CART (*COCAINE-AND AMPHETAMINE-  
REGULATED TRANSCRIPT*)

CURITIBA

2023

ALICE GOMES DA SILVA

ESTUDO DOS ESPINHOS DENDRÍTICOS DE  
NEURÔNIOS EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM O  
NEUROPEPTÍDEO CART (*COCAINE-AND AMPHETAMINE-  
REGULATED TRANSCRIPT*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre dos S. Haemmerle

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Silva, Alice Gomes da

Estudos dos espinhos dendríticos de neurônios em camundongos tratados com o neuropeptídeo cart (*cocaine-and amphetamine-regulated transcript*) / Alice Gomes da Silva. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre dos S. Haemmerle.

1. Núcleo accumbens. 2. Núcleo caudado. 3.

Neuroplasticidade. I. Haemmerle, Carlos, 1982. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. III. Título.

Bibliotecária: Camila de Souza Dorneles CRB-9/2056



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR - 40001016007P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ALICE GOMES DA SILVA** intitulada: **Estudo dos espinhos dendríticos de neurônios em camundongos tratados com o neuropeptídeo CART (Cocaine-and-amphetamine regulated transcript)**, sob orientação do Prof. Dr. CARLOS ALEXANDRE DOS SANTOS HAEMMERLE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Outubro de 2023.

Assinatura Eletrônica

10/11/2023 15:44:35.0

CARLOS ALEXANDRE DOS SANTOS HAEMMERLE

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

28/11/2023 15:43:46.0

SILVIA HONDA TAKADA

Avaliador Externo (FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC)

Assinatura Eletrônica

29/11/2023 11:03:30.0

SILVIO MARQUES ZANATA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 327079

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 327079

## **AGRADECIMENTOS**

Esses anos de mestrado não foram fáceis, mas em contrapartida, foi gratificante, emocionante e memorável, pois pude contar com pessoas incríveis que me ajudaram nesta trajetória, onde errei, aprendi e não desisti dos meus objetivos. Hoje só tenho que agradecer pela oportunidade de concluir mais uma etapa de minha vida acadêmica, e com essa experiência estarei seguindo este caminho honrado para me tornar uma pessoa melhor que já fui, e contribuir com a propagação do conhecimento científico em nosso país.

Embora tenha encontrado dificuldades e obstáculos durante o caminho, a esperança e a determinação foram essenciais para superá-los, e neste contexto, que gostaria de agradecer algumas pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta nesta etapa.

Em primeiro lugar, a Deus, que me guiou e iluminou meu caminho em momentos difíceis que enfrentei, como questões de saúde.

A minha mãe Francisca que me incentivou e acreditou em mim, dando forças quando mais precisava, ela que sempre esteve ao meu lado, e com seu amor incondicional me mostrou que poderia ser capaz de fazer qualquer coisa que quisesse.

Ao meu padrasto Roberto, que com sua sabedoria me aconselhou e sempre estava ao dispor em ajudar.

Ao meu irmão Kayky, mesmo em momentos em que ele me provocava, sempre demonstrou o seu respeito e orgulho pela sua irmã mais velha.

Aos meus amigos de trabalho, pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período, pois foram pessoas sensatas e que me incentivaram a persistir no trabalho e nos estudos. Com essas pessoas ao meu lado pude perceber que não estava sozinha.

Agradeço imensamente ao meu orientador professor Dr. Carlos, pelos seus ensinamentos ao longo do mestrado, conselhos, pela ajuda e paciência. É uma pessoa gentil, atenciosa e com uma vasta experiência, na qual tenho muito respeito, não somente como professor, mas como pessoa, que com certeza levarei os seus

conselhos para resto da minha vida. Obrigada pela oportunidade e pela sua compreensão, eu nunca poderia te agradecer o suficiente.

Também agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, como os alunos de graduação Mateus, Yuri, Pedro, Carol e Julia que me auxiliaram durante o estudo, ao Israel do Centro de Tecnologias Avançadas de Fluorescência (CTAF) que estava sempre à disposição a ajudar e contribuir fornecendo ótimas imagens para o trabalho, e ao administrador do PGBIOCEL Lucas pela ajuda e orientação todo esse tempo. Meus sinceros agradecimentos.

Às agências de fomento que indiretamente favoreceram este trabalho, pela aquisição de insumos e equipamentos de laboratório, como a Fundação Araucária, CNPq e FAPESP.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

**Charles Chaplin**

## RESUMO

O CART (*Cocaine-and Amphetamine-Regulated Transcript*) é um peptídeo sintetizado por neurônios situados em diferentes regiões do Sistema Nervoso e colocalizado com outros neurotransmissores e peptídeos, de forma a se envolver em múltiplos processos biológicos incluindo abuso de drogas como cocaína, regulação sensorio-motora, memória, comportamento alimentar, ansiedade e resposta ao estresse. Estudos de nosso grupo de pesquisa sugerem uma nova função na regulação da proliferação de neurônios da região periventricular durante a idade adulta. Para melhor fundamentar este papel, e principalmente se este envolve alterações na morfologia de neurônios pertencentes a essa região, esse trabalho tem por objetivo estudar os espinhos dendríticos dos neurônios nos núcleos accumbens e caudado-putame após a administração do peptídeo CART. Para isso, utilizamos oito camundongos (*Mus musculus*) que receberam a administração contínua por sete dias do peptídeo CART, ou salina estéril, além de um grupo controle negativo. Passado o período pós-cirúrgico, os animais foram anestesiados e eutanasiados para remoção de seus encéfalos, os quais foram impregnados pelo método de Golgi-Cox para visualização da morfologia dendrítica neuronal. Sequencialmente os encéfalos foram seccionados em vibrátomo e os cortes montados em lâminas histológicas. Com auxílio do software *Image-J Fiji*, quantificamos o padrão de comprimento e área nas ramificações dendríticas e classificamos os espinhos encontrados. Verificamos que o grupo que recebeu o peptídeo CART possui uma quantidade maior de espinhos dendríticos em relação ao controle salina e controle negativo, considerando o núcleo accumbens e o núcleo caudado-putame. Além disso, em ambos os núcleos têm ocorrido uma maior incidência de subtipos de espinhos, Espesso. As medidas morfológicas como comprimento e área dos espinhos dendríticos do grupo CART apresentaram médias significativamente menores (\*\*\*)  $p < 0.001$  em comparação ao grupo controle negativo no núcleo accumbens e caudado-putame, enquanto que, nos dendritos mostraram médias significativamente maiores (\*\*\*)  $p < 0.001$ ). Desse modo, as alterações morfológicas encontradas no subtipo Espesso do grupo CART em comparação ao grupo Controle Negativo, sugerem o envolvimento do peptídeo CART em conjunto com os demais neurotransmissores e neuropeptídeos no processo de transmissão sináptica de forma mais rápida e concentrada no eixo dendrítico de neurônios estriatais nas regiões estudadas, indicando sua participação na neuroplasticidade.

Palavras-chave: **núcleo accumbens; núcleo caudado; putame; neuroplasticidade; Golgi-Cox.**

## ABSTRACT

The CART (Cocaine-and Amphetamine-Regulated Transcript) is a peptide synthesized by neurons located in different regions of the nervous system and colocalized with other neurotransmitters and peptides to be involved in multiple biological processes including drug abuse such as cocaine, sensorimotor regulation, memory, eating behavior, anxiety and stress response. Studies by our research group suggest a new role in regulating the proliferation of neurons in the periventricular region during adulthood. To better substantiate this role, and especially whether it involves changes in the morphology of neurons belonging to this region, this work aims to study the dendritic spines of neurons in the accumbens and caudate-putamen nuclei after administration of the CART peptide. To do this, we used eight mice (*Mus musculus*) that received continuous administration of the CART peptide or sterile saline for seven days, as well as a negative control group. After the post-surgical period, the animals were anesthetized and euthanized to remove their brains, which were impregnated using the Golgi-Cox method to visualize neuronal dendritic morphology. The brains were then sectioned using a vibratome and the sections were mounted on histological slides. Using Image-J Fiji software, we quantified the pattern of length and area in the dendritic branches and classified the spines found. We found that the group receiving the CART peptide had a greater number of dendritic spines than the saline control and negative control, considering the nucleus accumbens and the caudate-putamen nucleus. In addition, in both nuclei, there has been a higher incidence of the Thick subtype of spines. Morphological measurements such as length and area of the dendritic spines in the CART group showed significantly lower means (\*\* $p < 0.001$ ) compared to the negative control group in the nucleus accumbens and caudate-putamen, while in the dendrites they showed significantly higher means (\*\* $p < 0.001$ ). Thus, the morphological changes found in the Thick subtype of the CART group compared to the Negative Control group suggest the involvement of the CART peptide together with other neurotransmitters and neuropeptides in the process of synaptic transmission in a faster and more concentrated way in the dendritic axis of striatal neurons in the regions studied, indicating its participation in neuroplasticity.

**Keywords:** nucleus accumbens; caudate nucleus; putamen; neuroplasticity; Golgi-Cox.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- DIAGRAMA EQUEMÁTICO DE FRAGMENTOS DO PEPTÍDEO CART .....	21
FIGURA 2- ESTRIADO DO CAMUNDONGO E HUMANO .....	25
FIGURA 3- TIPOS DE NEURÔNIOS ENCONTRADOS NO CÓRTEX E EM CONEXÃO COM O ESTRIADO .....	27
FIGURA 4- DESENHO REPRESENTATIVO DE DIFERENTES MORFOLOGIAS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS .....	30
FIGURA 5- IMAGENS TRIDIMENSIONAIS RECONSTRUÍDAS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS IMPREGNADOS PELA TÉCNICA DE GOLGI EM NEURÔNIOS DO NÚCLEO MEDIAL DA AMÍGDALA.....	32
FIGURA 6- ILUSTRAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA DO ESPINHO DENDRÍTICO..	34
FIGURA 7- NEURÔNIOS CORTICAIS CORADOS COM GOLGI-COX .....	40
FIGURA 8- BRAIN INFUSION KIT 1 3-5 MM (ALZET) AND MICRO-OSMOTIC PUMP .....	42
FIGURA 9- NEURÔNIOS CORADOS COM GOLGI-COX .....	46
FIGURA 10- TIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS .....	46
FIGURA 11- CORTE DE ENCÉFALO DE CAMUNDONGO .....	47
FIGURA 12- IMAGEM <i>TIF</i> PROCESSADA NO SOFTWARE <i>IMAGE-J FIJI</i> PARA ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DOS DENDRITOS E ESPINHOS DENDRÍTICOS.....	47

FIGURA 13- CORTE DE ENCÉFALO DE CAMUNDONGO .....	48
FIGURA 14- DENDRITO ISOLADO DE NEURÔNIO ESPINHOSO MÉDIO NA REGIÃO DO NÚCLEO ACCUMBENS. ....	48
FIGURA 15- REGIÃO CAUDADO-PUTAME COM FIBRAS DE CORRENTE MIGRATÓRIA.....	59
FIGURA 16- EXEMPLO DE UMA FIBRA DE CORRENTE MIGRATÓRIA ENCONTRADA NA REGIÃO DO CAUDADO-PUTAME .....	59
FIGURA 17- ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS RELAÇÕES ENTRE TAMANHO DA COLUNA E DENSIDADE DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS .....	64

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1– TOTAL POR SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO NÚCLEO ACCUMBENS .....	51
GRÁFICO 2– TOTAL DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO NÚCLEO ACCUMBENS.... .....	51
GRÁFICO 3– TOTAL POR DOS SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO CAUDADO-PUTAME .....	52
GRÁFICO 4– TOTAL DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO CAUDADO-PUTAME ...	52
GRÁFICO 5- QUANTIFICAÇÃO DO COMPRIMENTO ENTRE OS SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO NÚCLEO ACCUMBENS .....	54
GRÁFICO 6- QUANTIFICAÇÃO DO COMPRIMENTO ENTRE OS SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO CAUDADO-PUTAME .....	55
GRÁFICO 7- QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA ENTRE OS SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO NÚCLEO ACCUMBENS .....	57
GRÁFICO 8- QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA ENTRE OS SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO CAUDADO-PUTAME .....	58

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS, CARACTERÍSTICAS E FUNÇÕES.....	30
TABELA 2- COMPRIMENTO DOS DENDRITOS NO NÚCLEO ACCUMBENS E CAUDADO-PUTAME .....	55
TABELA 3- ÁREA DOS DENDRITOS NO NÚCLEO ACCUMBENS E CAUDADO-PUTAME .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

Acb: Núcleo accumbens	DAT: Transportador de Dopamina
AcbC: Região core do Núcleo	ec: cápsula externa
Accumbens	ERK: Quinase Regulada por Sinal
AcbSh: Região shell do Núcleo	Extracelular
Accumbens	GABA: Ácido $\gamma$ -aminobutírico
AMPA: Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4	GDNF: Fator Neurotrófico Derivado da
Isoxazolproprionato	Glia
AMPC: Monofosfato Cíclico de	LV: Ventrículo Lateral
Adenosina	MAPKK: Proteína Quinase Ativada por
AP: Ântero-Posterior	Mitógeno
AtT20: Células tumorais corticotrópicas	ML: Médio-Lateral
hipofisárias	NMDA: N-Metil-D-aspartato
AVC: Acidente Vascular Cerebral	NT-3: Neurotrofina33
BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do	NGF: Fator de Crescimento Nervoso
Cérebro	PFC: Córtex Pré-Frontal
CART: Transcrito regulado por cocaína	POC: Perturbação Obsessiva
e anfetamina	Compulsiva
CPu: Caudado-putame	PVN: Núcleo Paraventricular
CN: Controle Negativo	REL: Retículo endoplasmático
CREB: Proteína de ligação ao	SNC: Sistema Nervoso Central
elemento de resposta AMPc	SVZ: Zona Subventricular
CRF: Fator liberador da corticotrofina	VE: Vesícula endocítica
CTAF: Centro de Tecnologias	VP: Pálido Ventral
Avançadas em Fluorescência	VTA: Área Tegmental Ventral
CTX: Córtex	V-SVZ: Zona Ventricular-
CTNF: Fator Neurotrófico Ciliar	Subventricular
DA: Dopamina	

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 Objetivo Geral .....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
3.1 O peptídeo CART: descoberta, mapeamento e funções .....	19
3.2 Estriado: componentes e funções .....	24
3.2.1 Núcleo accumbens .....	27
3.3 Espinhos dendríticos .....	28
3.4 Peptídeo CART e a Plasticidade neural .....	35
3.5 Golgi-Cox .....	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
4.1 Animais.....	41
4.1.2 Administração do peptídeo CART .....	41
4.1.3 Execução do método de Golgi-Cox.....	43
4.1.4 Captura de imagens e quantificação dos dados morfológicos neuronais .....	44
4.1.5Análise estatística.....	49
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
5.1 Quantificação e morfologia dos subtipos de espinhos dendríticos .....	50
5.2 Quantificação do comprimento dos dendritos e dos subtipos de espinhos dendríticos .....	53
5.3 Quantificação da área dos dendritos e dos subtipos de espinhos dendríticos ...	56
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
6.1 Quantificação e morfologia dos subtipos de espinhos dendríticos .....	60
6.2 Quantificação do comprimento e área dos dendritos e dos subtipos de espinhos dendríticos .....	62
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>65</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O CART (*Cocaine-and Amphetamine-Regulated Transcript*) é um peptídeo produzido por neurônios que se distribuem em diferentes núcleos do Sistema Nervoso Central (SNC) e assim, relacionam-se a múltiplos processos biológicos, como aprendizagem e memória, resposta ao estresse, neuroproteção, controle da alimentação, recompensa, reforço, comportamento e processamento somatossensorial (AHMADIAN-MOGHADAM; SADAT-SHIRAZI; ZARRINDAST, 2018; DOUGLASS; MCKINZIE; COUCEYRO, 1995; ROGGE; JONES; HUBERT; LIN *et al.*, 2008).

O histórico de sua descoberta pode ser considerado com início em 1981, quando um fragmento peptídico de função desconhecida foi isolado a partir de um extrato do hipotálamo de ovinos. Quatorze anos mais tarde, utilizando uma técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), Douglas *et al.* (1995) fizeram um mapeamento dos níveis de mRNA no estriado de ratos após administração aguda de estimulantes psicomotores, como cocaína e anfetamina. Esta sequência de mRNA correspondia parcialmente ao peptídeo de ovino supracitado, e descrito por Spiess *et al.* (1981). Devido ao aumento muito expressivo em uma banda em decorrência da administração da cocaína e anfetamina, Douglas *et al.* (1995) chamaram-na de 'transcrito regulado por cocaína e anfetamina' (CART) e mapearam sua distribuição dentre os núcleos encefálicos. Em 1999, Thim *et al.* extraíram peptídeos CART de tecidos de rato, sequenciaram e mostraram dois peptídeos CART diferentes que estavam presentes, CART 55–102 e CART 62–102 (AHMADIAN-MOGHADAM; SADAT-SHIRAZI; ZARRINDAST, 2018; DOUGLASS; MCKINZIE; COUCEYRO, 1995; SPIESS; VILLARREAL; VALE, 1981; THIM; KRISTENSEN; NIELSEN; WULFF *et al.*, 1999).

Estudos post-mortem em cérebros de vítimas de overdose por cocaína demonstraram uma elevação dos níveis de expressão de peptídeo CART no núcleo accumbens (ALBERTSON; PRUETZ; SCHMIDT; KUHN *et al.*, 2004). Outros estudos sugerem que os peptídeos CART são moduladores das ações de drogas psicoestimulantes: a co-administração do peptídeo CART com dopamina ou cocaína no núcleo accumbens leva a uma atenuação da locomoção em ratos - a qual não ocorre quando CART é administrado isoladamente (JAWORSKI; KOZEL; PHILPOT; KUHAR, 2003).

O núcleo accumbens é um exemplo das regiões densamente inervadas por axônios imunorreativos (ir) ao CART. Trata-se de um componente do estriado, o qual é uma região ampla do cérebro que se distingue em compartimentos dorsal e ventral, cada qual contendo núcleos cerebrais próprios e células neurais com funções distintas, que abrangem desde o controle motor, como também o grau de recompensa de um estímulo viciante e a proliferação de precursores neuronais. No estriado dorsal, encontramos os núcleos caudado e putame, e no estriado ventral, observa-se como principal componente o núcleo accumbens, além do tubérculo olfatório e núcleo piriforme (HALL; GUYTON, 2011; 2021; KANDEL; SCHWARTZ, 2012). De modo geral, o estriado dorsal se localiza lateralmente ao ventrículo lateral, enquanto o estriado ventral está ventralmente ao ventrículo lateral.

Pelo padrão de inervação estabelecido por axônios ir-CART ao longo do ventrículo lateral, sugere-se um papel regulador do nicho neurogênico adulto ali localizado (ZARUGNER, 2020). Isso corrobora com os estudos realizados por Liu et al. (2016) para tratamento pós-AVC com peptídeo CART em camundongos, onde foi observado aumento na reorganização neuronal em volta da região lesionada e recuperação da função neurológica no cérebro após um acidente vascular cerebral (AVC), observando-se aumento da angiogênese e fatores de crescimento (FONT; ARBOIX; KRUPINSKI, 2010; LIU; SHEN; LUO; HOFFER *et al.*, 2016; LUO; SHEN; LIU; YU *et al.*, 2013).

Sabe-se que a resposta a estímulos de drogas de abuso, mas também adaptações neuronais associadas à experiência e aprendizagem e outros fatores que se relacionam funcionalmente ao CART favorecem a plasticidade neural. E este contexto abre a oportunidade de investigar uma possível reorganização neural observada após a administração do neuropeptídeo CART que envolva o brotamento de espinhos dendríticos em neurônios situados em áreas cerebrais de inervação pelo CART, como os núcleos accumbens e caudado-putame. Embora o peptídeo CART seja amplamente estudado, ainda não está completamente elucidada a sua influência na regulação da plasticidade neural, envolvendo estritamente a alteração morfológica neuronal. É nesse campo que o presente estudo pretende contribuir, fornecendo dados de aspectos morfoquantitativos sobre padronização dos espinhos dendríticos estriatais após a administração *in vivo* do peptídeo CART.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Estudar a morfologia dos espinhos dendríticos de neurônios estriatais após a administração *in vivo* do peptídeo CART.

### 2.2 Objetivos específicos

- Quantificar o padrão de comprimento e área dos espinhos dendríticos e dendritos de neurônios dos núcleos accumbens e caudado-putame;
- Classificar e quantificar os tipos morfológicos de espinhos dendríticos encontrados nas regiões estudadas.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O peptídeo CART: descoberta, mapeamento e funções

Após estudos realizados por Douglas et. al na descoberta do mRNA do peptídeo CART, em 1999, Thim et. al extraíram peptídeos CART de tecidos de rato, sequenciaram e mostraram que o pro-CART resultava em pelo menos dois peptídeos CART ativos (DOUGLASS; MCKINZIE; COUCEYRO, 1995; ROGGE; JONES; HUBERT; LIN *et al.*, 2008; THIM; KRISTENSEN; NIELSEN; WULFF *et al.*, 1999). A pós-tradução dos precursores CART resulta na forma longa (102 aminoácidos) ou curta (89 aminoácidos) do pro-CART, apresentando as formas ativas do CART: camundongos e ratos CART (55–102) e CART(62–102), sendo que CART(49–89) e CART(42–89) também são expressas. No entanto, apenas as formas mais curtas são expressas em humanos (AHMADIAN-MOGHADAM; SADAT-SHIRAZI; ZARRINDAST, 2018; ROGGE; JONES; HUBERT; LIN *et al.*, 2008; STEIN; STEINER; DEY, 2006).

O gene CART humano se estende por aproximadamente 2,0 kb (Kilobases) e foi mapeado no cromossomo 5q13-q14. Compreende uma região promotora de aproximadamente 340 nucleotídeos, dois íntrons e três exons (AHMADIAN-MOGHADAM; SADAT-SHIRAZI; ZARRINDAST, 2018). O CART é evolutivamente conservado entre as espécies, pois as sequências de genes humanos e de rato compartilham 91% de identidade de nucleotídeos em suas regiões de codificação, e as sequências da região de codificação nos genes de rato e camundongo são 98% idênticas. É importante ressaltar que a alta similaridade entre as sequências de nucleotídeos de rato e humano leva a 95% de identidade de aminoácidos entre os neuropeptídeos ativos (AHMADIAN-MOGHADAM; SADAT-SHIRAZI; ZARRINDAST, 2018; ROGGE; JONES; HUBERT; LIN *et al.*, 2008). No entanto, a expressão do gene CART é regulada por vários fatores de transcrição e vias de sinalização, incluindo o elemento de ligação à resposta do AMPc (DOMINGUEZ; KUHAR, 2004).

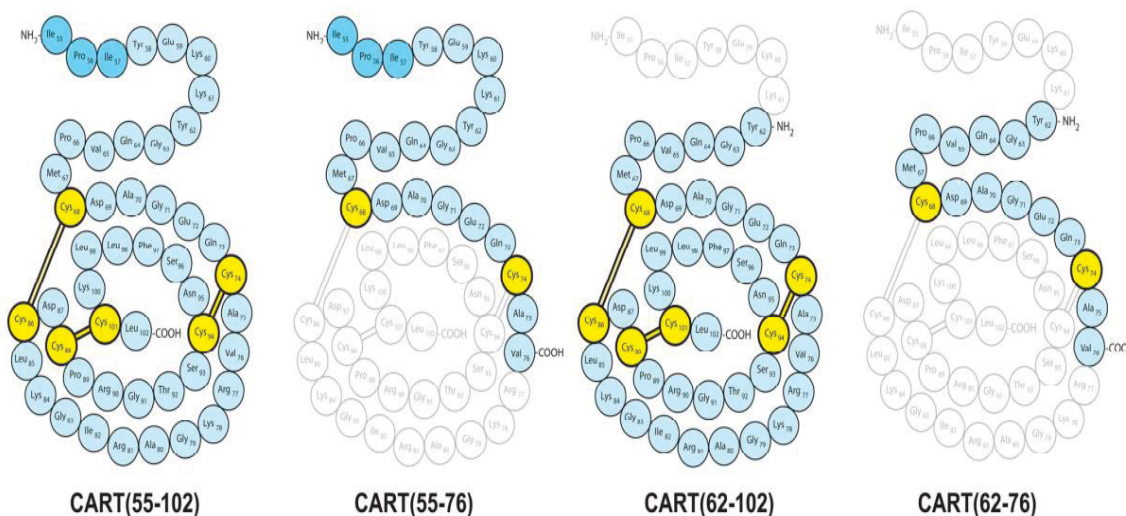
Vários estudos sobre a sinalização celular induzida pelo peptídeo CART demonstraram a ativação de pelo menos três mecanismos de sinalização mediados por receptores acoplados à proteína G: a) como inibidor da proteína G inibitória; b) no aumento da fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta do AMP cíclico (CREB) nos núcleos de neurônios do hormônio liberador de corticotropina

(CRH); e c) no aumento da fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) em células AtT20 e GH3 (MURPHY, 2005; SARKAR; WITTMANN; FEKETE; LECHAN, 2004). Embora o peptídeo CART desempenhe diversas funções e abrangências, seu receptor neural específico ainda não foi completamente elucidado, sendo que essa inespecificidade pode ser explicada devido ao local de ligação de baixa afinidade e altos níveis de ligação não específica, sugerindo desta forma, múltiplos receptores para CART(AHMADIAN-MOGHADAM; SADAT-SHIRAZI; ZARRINDAST, 2018; SINGH; DE ARAUJO; KRIEGER; VERGARA *et al.*, 2021; YERMOLAIEVA; CHEN; COUCEYRO; HOSHI, 2001).

Descobriu-se mais tarde, que o CARTp radiomarcado não ativo aplicado às células AtT20 foi deslocado pelo CART (55-102), e a ligação foi reduzida na presença de um análogo de GTP, confirmando que o receptor CARTp é um GPCR, até o momento (SINGH; DE ARAUJO; KRIEGER; VERGARA *et al.*, 2021).

Apesar das estruturas químicas do CART (55-102) endógenos e peptídeos CART (62-102) foram encontrados em diferentes células de roedores. No entanto, as extensas pesquisas nas últimas duas décadas sobre os receptores CART específicos ainda não foram identificados e clonados. Estudos enfocando a relação estrutura-atividade dos fragmentos CART (Figura 1) revelaram que o peptídeo de comprimento total e as pontes dissulfeto na região globular são necessários para ambas as ligação aos receptores, entre eles de regulação da ingestão de alimentos induzida por CART(KOZSUREK; KIRÁLY; GYIMESI; LUKÁCSI *et al.*, 2023).

FIGURA 1- DIAGRAMA EQUEMÁTICO DE FRAGMENTOS DO PEPTÍDEO CART



FONTE:(KOZSUREK; KIRÁLY; GYIMESI; LUKÁCSI *et al.*, 2023).

O CART é um peptídeo neuroativo bem identificado, sintetizado exclusivamente por neurônios e armazenado em vesículas, sendo encontrado em diferentes regiões do Sistema Nervoso Central, como o córtex frontal, amígdala, bulbo olfatório, hipocampo, mesencéfalo e hipotálamo, local este onde possui o terceiro mais abundante mRNA específico no rato (MURPHY, 2005). O CART também é descrito na hipófise, intestino, pâncreas e suprarenais (DUN; CHIANCA; DUN; YANG *et al.*, 2000; MURPHY, 2005).

Logo após a descoberta dos peptídeos CART, sugeriu-se que eles estavam envolvidos na ingestão de alimentos, em decorrência da distribuição dos peptídeos CART no hipotálamo - de modo especial em regiões que incluíam o núcleo arqueado, o hipotálamo lateral e o núcleo paraventricular (PVN)-, além do núcleo accumbens (Acb) - localizado no prosencéfalo- todos os quais desempenham um papel na regulação da ingestão de alimentos (KOYLU; COUCEYRO; LAMBERT; KUHAR, 1998). Posteriormente encontrou-se que o CART possui expressão e distribuição similares no hipotálamo como o núcleo arqueado do ser humano e em roedores (ELIAS; LEE; KELLY; AHIMA *et al.*, 2001).

CART é anorexígeno (inibe o apetite) e é ativado pela leptina, o que foi corroborado por Kristensen *et al.* (1998) e por Duan *et al.* (2007) que mostraram que a administração periférica de leptina em ratos obesos deficientes de leptina estimula a expressão de mRNA do CART no núcleo arqueado. Não obstante com sua relação

à manutenção hormonal, elevados níveis de corticosterona aumentam níveis sanguíneos de CART, o que sugere que a glândula adrenal pode ser a origem do CART no sangue e que glicocorticoides podem ter o papel na regeneração do ritmo diurno deste peptídeo (DUAN; CHOI; HARTZELL; DELLA-FERA *et al.*, 2007; ELIAS; LEE; KELLY; AHIMA *et al.*, 2001; KRISTENSEN; JUDGE; THIM; RIBEL *et al.*, 1998). Além disso, a expressão de CART também é regulada por dopamina (AWATHALE; CHOUDHARY; SUBHEDAR; KOKARE, 2021; BEAUDRY; ZEKKI; ROUILLARD; LÉVESQUE, 2004).

Os peptídeos CART são amplamente sintetizados no sistema mesolímbico de dopamina (DA), que é crítico no comportamento de recompensa e dependência de drogas no cérebro, incluindo a área tegmental ventral (VTA), o núcleo accumbens (Acb) e pálido ventral (VP) (AWATHALE; CHOUDHARY; SUBHEDAR; KOKARE, 2021; HUBERT; JONES; MOFFETT; ROGGE *et al.*, 2008). A co-localização de peptídeos CART com GABA, substância P e prodinorfina, marcadores do estriado, foi demonstrada em alguns neurônios espinhosos médios do Acb (PHILPOT; SMITH, 2006). Desse modo o CART pode afetar diretamente a atividade dos neurônios dopaminérgicos ou afetá-los indiretamente ao desinibir interneurônios GABAérgicos (JAWORSKI; KOZEL; PHILPOT; KUHAR, 2003).

Observa-se que o aumento na expressão de mRNA CART ocorre em função da exposição do organismo a fatores como estímulos aditivos e de recompensa, psicoestimulantes, comportamento alimentar, ou mesmo durante o desenvolvimento pós-natal. Isso pode ser entendido pelo fato do CART desempenhar um papel na regulação na recaptção de dopamina e desenvolvimento de neurônios dopaminérgicos (AWATHALE; CHOUDHARY; SUBHEDAR; KOKARE, 2021; ROGGE; JONES; HUBERT; LIN *et al.*, 2008). Portanto, existe uma conexão recíproca entre dopamina e CART nas vias cerebrais relacionadas à recompensa e processos motivacionais. Tanto é que os neurônios CART do Acb coexpressam receptores de dopamina e recebem aferências de terminais dopaminérgicos (AWATHALE; CHOUDHARY; SUBHEDAR; KOKARE, 2021; HUBERT; KUHAR, 2006; RODRIGUES; CAVALCANTE; ELIAS, 2011).

Em casos de psicoestimulantes, a cocaína se liga ao transportador de dopamina (DAT, *Dopamine Reuptake Transporter*) bloqueando-o. Com isso, ocorre um aumento súbito e significativo nos níveis de dopamina na fenda sináptica. Pesquisas revelaram que o peptídeo CART pode estar envolvido na dependência e

abuso de psicoestimulantes e que podem ajudar a entender como essas drogas afetam o cérebro e causam dependência (AHMADIAN-MOGHADAM; SADAT-SHIRAZI; ZARRINDAST, 2018). Em um estudo com dez humanos expostos à cocaína, e dez não expostos, foi observado um aumento na expressão do gene do CART no Acb nesses usuários (ALBERTSON; PRUETZ; SCHMIDT; KUHN et al., 2004; ANDERSON; PIERCE, 2005). Portanto, a cocaína atua principalmente em áreas com maior densidade de DAT, onde os axônios dopaminérgicos projetam-se em áreas do sistema límbico, incluindo córtex pré-frontal (PFC), hipocampo, amígdala, estriado e núcleo accumbens (Acb) e a área tegmentar ventral (VTA) (ANDERSON; PIERCE, 2005; AWATHALE; CHOUDHARY; SUBHEDAR; KOKARE, 2021; HEAL; GOSDEN; SMITH, 2014).

Entretanto, outros estudos demonstraram que enquanto a dopamina ou anfetamina aumentaram a atividade locomotora em ratos, o peptídeo CART resultou em uma redução relativa na atividade locomotora, desta forma atenuando os efeitos dos estimulantes (JAWORSKI; KOZEL; PHILPOT; KUHAR, 2003). Outra ação observada pela injeção de peptídeo CART, é que o mesmo inibiu a expressão de sensibilização comportamental que normalmente é induzida pela administração de anfetaminas, e que em estudos de auto-administração de drogas o peptídeo CART reduziu os efeitos recompensadores de cocaína. Portanto, sugere que o peptídeo CART tem uma função homeostática no Acb (JAWORSKI; HANSEN; KUHAR; MARK, 2008; ROGGE; JONES; HUBERT; LIN *et al.*, 2008).

Há suposições que o CART possa ter implicações em distúrbios neurológicos como a ansiedade, depressão, estresse e obesidade, mas ainda não está elucidado se isso decorre da mutação do gene CART-142 ou consequência da falta de peptídeo CART (ROGGE; JONES; HUBERT; LIN *et al.*, 2008). A conexão sugerida da relação do CART e a depressão em humanos deriva de um estudo de uma família italiana com obesidade de início precoce e uma mutação *missense* no gene CART-142. Assim como a obesidade co-segregada com a mutação entre os membros da família, altos níveis de ansiedade e depressão foram observados entre os membros com a mutação (DEL GIUDICE; SANTORO; CIRILLO; D'URSO *et al.*, 2001).

É neste aspecto que pesquisas demonstraram grande potencial do uso de CART como alvo terapêutico para o tratamento de dependência de

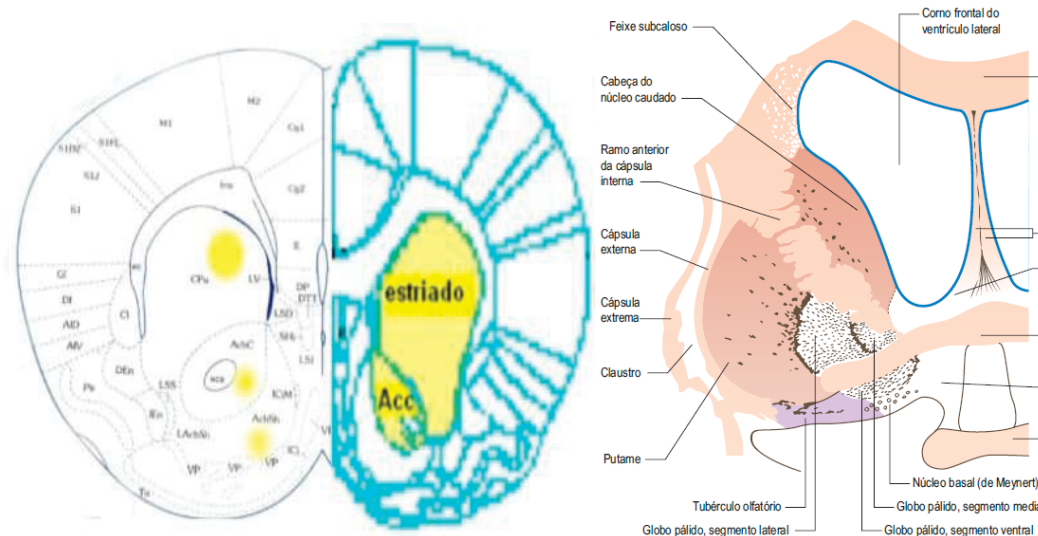
psicoestimulantes, assim como transtornos alimentares, incluindo a obesidade e a anorexia nervosa.

### 3.2 Estriado: componentes e funções

O estriado representa a principal aferência dos núcleos da base do encéfalo e sua função tem sido relacionada ao controle motor somático. Sua estrutura é complexa, diferenciando claramente em três subnúcleos: caudado, putame e globo pálido. Devido à sua evolução filogenética, o estriado tem sido distinguido como o neostriado (estriado dorsal) formado por: caudado, que se situa anteriormente ao tálamo, lateralmente aos ventrículos laterais e medialmente à cápsula interna, tem funções cognitivas; o putame, situado anteriormente ao tálamo, lateralmente aos ventrículos laterais e medialmente à cápsula interna, tendo funções motoras. Enquanto o globo pálido forma o paleostriado, uma estrutura subcortical pareada, situada medialmente ao putâmen, sendo importante na coordenação motora, já o estriado ventral é composto pelo Acb e o tubérculo olfatório (LENT, 2001).

Em humanos, o estriado não é proporcionalmente tão grande quando comparado ao estriado de camundongo (Figura 2). O nome *striatum* de origem latina decorre da sua aparência cheia de estrias quando observado ao microscópio (LENT, 2001). Essas estrias vêm dos axônios mielinizados da porção anterior da cápsula interna que, em humanos, atravessam o estriado de forma a separar o caudado do putame. Em roedores, caudado e putame representam uma estrutura única (MINK, 1999; LENT, 2001).

FIGURA 2- ESTRIADO DO CAMUNDONGO E HUMANO



A esquerda, em amarelo indica a região do estriado e núcleo accumbens de camundongo. À direita, o estriado num encéfalo humano. Ambas as ilustrações representam um corte coronal do encéfalo. **FONTE:** (LENT, 2001; STRANDING, 2008; PAXINOS; FRANKLIN, 2019).

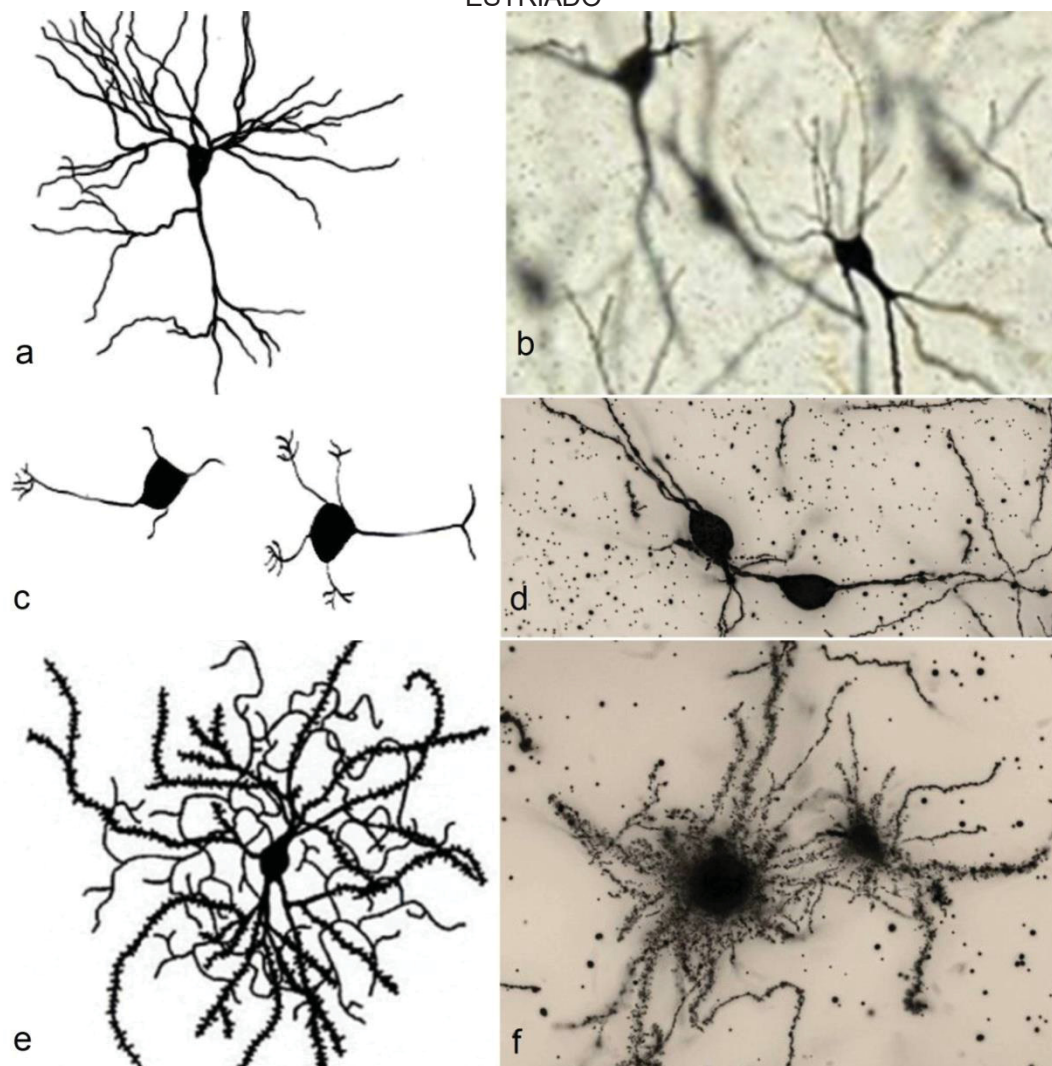
As aferências que chegam aos núcleos da base, vindos de várias áreas do córtex, o fazem primeiramente pelo estriado. O estriado recebe aferências, principalmente glutamatérgicas de neurônios piramidais, de diferentes regiões do córtex cerebral (projeção córtico-estriatal) e do tálamo (núcleos intralaminares). A produção de informações é mais distribuída, destacando-se o papel do globo pálido e da substância negra (LENT, 2001, MATZ; SPOCTER, 2022).

Os neurônios dopaminérgicos (DA) no mesencéfalo ventral projetam-se principalmente para o estriado para controlar o movimento, a cognição e a motivação. Diferentes tipos de receptores de dopamina podem aumentar ou diminuir a função dos núcleos da base. Cinco tipos de receptores de dopamina são conhecidos (D1 e D5, estão ligados a proteínas G estimuladoras), e (D2, D3 e D4, estão ligados a proteínas G inibitórias) (CHUHMA; OH; RAYPORT, 2023; MATHUR; LOVINGER, 2012; MATZ; SPOCTER, 2022).

O núcleo estriado não expressa apenas receptores de dopamina; também possui receptores para glutamato, acetilcolina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, adenosina, histamina, neuropeptídeo Y, somatostatina e óxido nítrico, entre outros (SCHIFFMANN; FISONE; MORESCO; CUNHA *et al.*, 2007). No entanto, o estriado tem uma citoarquitetura notavelmente uniforme, compreendendo cerca de 95% de

seus neurônios do tipo espinhosos médios e 5% de interneurônios (Figura 3). Os neurônios espinhosos médios são GABAérgicos e igualmente divididos em dois tipos: aqueles que expressam receptores D1 (D1Rs) que se projetam diretamente para o mesencéfalo ventral, são ativados por dopamina, e os que expressam D2Rs que se projetam para o mesencéfalo ventral através do pálido, são inibidos por dopamina (CHUHMA; OH; RAYPORT, 2023). Já no Acb há neurônios espinhosos médios que também contêm peptídeo CART e expressam receptores de dopamina D1, D2 e D3, sendo que o mRNA de CART é regulado pelos receptores D3 (JAWORSKI; HANSEN; KUHAR; MARK, 2008, MATZ; SPOCTER, 2022).

FIGURA 3- TIPOS DE NEURÔNIOS ENCONTRADOS NO CÓRTEX E EM CONEXÃO COM O ESTRIADO



À esquerda, imagens ilustrativas (a) neurônio piramidal encontrado no córtex; (c) interneurônio e (e) neurônio espinhoso médio, encontrados no estriado. À direita, fotomicrografias obtidas (b) pelo microscópio óptico 40x; (d) e (f) no microscópio scanner de lâminas 63x pelo autor. **FONTE:**(METZGER; TOLEDO; BRAUN, 2002; NARAYANAN; BAIRY; SRINIVASAMURTHY, 2020).

### 3.2.1 Núcleo accumbens

O Acb é a principal estrutura do estriado ventral situado na base do prosencéfalo (HEIMER, 2003). O Acb desempenha um papel importante na recompensa, prazer, emoções, agressão e medo, tendo um papel relevante na recompensa/vício. É subdividido em core (AcbC) e shell (AcbSh), que recebem aferências de uma variedade de regiões límbicas e pré-frontais, incluindo amígdala e

hipocampo, para formar uma rede que está envolvida na aquisição, aprendizagem e processos de memória (BRAUN, 2011).

Existe uma diferença funcional dessa estrutura, a shell está envolvida com a motivação e sobretudo relacionada com o Sistema Límbico, enquanto o core que tem como função de desencadeamento do movimento e se encontra associado ao Sistema Motor Extrapiramidal (FERNÁNDEZ-ESPEJO, 2000; STURM; LENARTZ; KOULOUSAKIS; TREUER *et al.*, 2003). Além disso, a shell é constituída por células grandes e dispersas, enquanto o core é composto por células pequenas e agregadas (BRAUER; HÄUSSER; HÄRTIG; ARENDT, 2000). E do ponto de vista neuroquímico, a shell é caracterizada por concentrações elevadas de receptores opióides, serotoninérgicos 5HT4 e dopaminérgicos D1 e D3, sendo um alvo preferencial de drogas antipsicóticas, opióides e antidepressivas, com a distribuição mais densa de acetilcolinesterase, enquanto os receptores GABA A são mais representativas no core. Inclusive, a imunorreatividade às fibras CART é mais densa na região Shell (HEIMER; VAN HOESEN, 2006; SCHULLER; KOCH, 2023).

O Acb é atualmente uma das estruturas límbicas mais estudadas no contexto das doenças neuropsiquiátricas, como Alzheimer, depressão, esquizofrenia, perturbação obsessiva compulsiva (POC) e também nos comportamentos de adição principalmente com relação a drogas de abuso (BAYASSI-JAKOWICKA; LIETZAU; CZUBA; PATRONE *et al.*, 2022; HEIMER, 2003; HEIMER; VAN HOESEN, 2006). Em estudos realizados por Nieet al. (2017) mostram que em doença de Alzheimer foi observada atrofia nas quatro sub-regiões no hipocampo bilateral e no núcleo accumbens, desta forma, associando-se ao comprometimento cognitivo dos pacientes (NIE; SUN; WAN; ZHAO *et al.*, 2017)

### **3.3 Espinhos dendríticos**

Os espinhos dendríticos são protruções neuronais que servem como especializações sinápticas encontradas na superfície dos dendritos, descritos pela primeira vez por Santiago de Ramón y Cajal em 1888 ao estudar células de Purkinje cerebelares. São encontrados na maioria dos neurônios encefálicos e recebem principalmente contatos sinápticos excitatórios (BOURNE; HARRIS, 2007; YUSTE,

2013), cuja plasticidade é essencial para o desenvolvimento do cérebro e funções cerebrais superiores (ALVAREZ; SABATINI, 2007; NISHIYAMA, 2019). Os espinhos têm formas, tamanhos e funções variadas observados ao longo do comprimento dendrítico (GARCÍA-LÓPEZ; GARCÍA-MARÍN; FREIRE, 2010; HOLTMAAT; SVOBODA, 2009; PICKEL; SEGAL, 2014), variando entre diferentes núcleos encefálicos (MAJEWSKA; TASHIRO; YUSTE, 2000).

Uma proporção variável de espinhos dendríticos pode ser estável morfológica e funcionalmente, mas outra parte, dependendo de cada núcleo cerebral estudado, pode ser variável e ter seu número, distribuição e forma alterados devido a disparos elétricos e concentrações bioquímicas locais, sendo dependentes da demanda de atividade sináptica sobre si (YUSTE, 2011; 2013). Além disso, a funcionalidade sináptica adequada dentro dos espinhos requer mudanças no número de receptores na sinapse, o que tem implicações nas funções neurais posteriores, como aprendizagem e formação de memória (BELL; LEE; RANGAMANI, 2023). Os espinhos dendríticos são classificados de acordo com sua variabilidade de forma e tamanho (ARELLANO; ESPINOSA; FAIRÉN; YUSTE *et al.*, 2007).

Em estudos realizados pelo grupo de Dall'Oglio, A. (2015) para identificação e classificação dos espinhos dendríticos, obtiveram-se imagens nos cinco tipos de neurônios multipolares encontrados na amígdala humana, usando o método adaptado de Golgi e microscopia de luz, com o corante fluorescente carbocianina Dil e microscopia confocal, e microscopia eletrônica de transmissão. A reconstrução tridimensional mostrou espinhos de diferentes classes ao longo dos dendritos com formas e tamanhos variados, nas quais utilizamos seus exemplos como orientação para classificação dos espinhos dendríticos encontrados no núcleo caudado-putame e núcleo accumbens. Em seu trabalho, foi verificada a forma de cada coluna e em seguida comparou-se os resultados obtidos em microscópio confocal com os dados de Golgi em microscopia de luz para determinar a forma e a classificação da coluna. Os espinhos foram classificados de acordo com as descrições de Fiala & Harris (1999), Arellano *et al.* (2007), Brusco *et al.* (2010), Gonzalez-Burgos *et al.* (2012), González-Ramírez, M. M. *et al.* (2014). Os critérios para atribuir espinhos dendríticos a diferentes classes foram baseados: no comprimento e diâmetro de um colo, número de saliências de uma única haste, diâmetro da cabeça e formato da cabeça (DALL'OGGIO; DUTRA; MOREIRA; RASIA-FILHO, 2015). Os espinhos foram classificados conforme as Figuras 4 e 5 e Tabela 1:

FIGURA 4- DESENHO REPRESENTATIVO DE DIFERENTES MORFOLOGIAS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS



Formas ilustrativas de espinhos dendríticos de neurônios de ratos machos adultos observados pelo emprego da técnica de Golgi à microscopia de luz. **FONTE:** (BRUSCO et al.,2010).

TABELA 1- SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS, CARACTERÍSTICAS E FUNÇÕES

Subtipo de espinho dendrítico	Característica	Comparação de proporção	Função
<b>Fino</b>	Uma única protuberância com um colo longo e estreito terminando em um alargamento bulboso na ponta;	O comprimento do espinho maior que o diâmetro do colo;	São considerados imaturos por serem menos estáveis; reflete um grau mais alto de conectividade sináptica.
<b>grosso/largo/ Espesso</b>	Uma saliência da membrana celular com ou sem pescoço aparente;	O comprimento do espinho é semelhante ou maior do que o seu diâmetro;	São considerados imaturos por serem menos estáveis; sinalização mais rápida que pode resultar na capacidade de sustentar correntes sináptica.
<b>Cogumelo</b>	Um espinho caracteristicamente de cabeça grande;	Com o diâmetro da cabeça maior do que o diâmetro do pescoço;	São considerados maduros por serem mais estáveis;
<b>Ramificado</b>	Um único caule dando origem a duas ou mais cabeças;	O comprimento do espinho é semelhante ou maior do que o seu diâmetro;	São considerados maduros por serem mais estáveis;
<b>com espículas</b>	Protuberâncias menores geralmente estendendo-se da cabeça de um espinho;	O comprimento do espinho maior que o diâmetro do colo;	Raros- considerado como um sinal de formação ou eliminação da dinâmica da coluna;

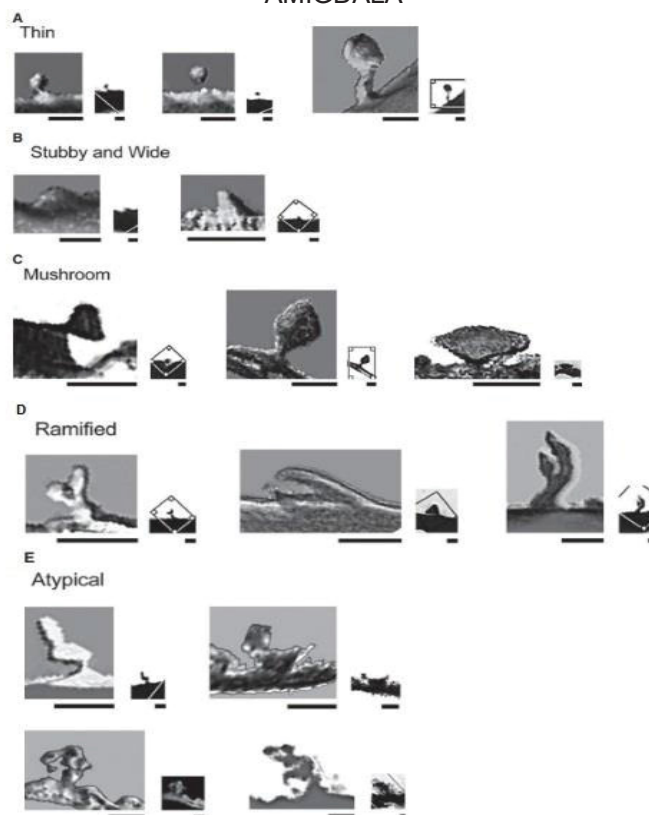
<b>Filopódio</b>	Uma protuberância fina e alongada sem cabeça aparente;	O comprimento do espinho maior que o diâmetro do colo;	Raros- envolvidos na transferência de moléculas grandes.
------------------	--	--	--

**FONTE:** (BRUSCO; DALL'OGGIO; ROCHA; ROSSI *et al.*, 2010; GARCÍA-LÓPEZ; GARCÍA-MARÍN; FREIRE, 2010; DALL'OGGIO; DUTRA; MOREIRA; RASIA-FILHO, 2015).

Os espinhos podem ser estudados quanto a seu número, forma e distribuição nos ramos dendríticos. Quanto à sua densidade, apesar dos mecanismos de surgimento ainda não estarem plenamente esclarecidos, acredita-se que podem ser formados por dois processos diferentes: proveniente de um “*filopodium*” e ou por surgimento a partir de uma sinapse diretamente no tronco dendrítico (SEGAL, 2010).

Diferentes espinhos podem coexistir de forma muito próxima em um mesmo ramo dendrítico, inclusive dividindo o mesmo terminal pré-sináptico para formar sinapses. Essa proximidade, ainda, pode levar ao compartilhamento de um mesmo pescoço por duas ou mais cabeças de espinhos, ocasionando os espinhos denominados ramificados, sendo considerados raros dependendo do tipo neuronal estudado (FIALA; SPACEK; HARRIS, 2002).

FIGURA 5- IMAGENS TRIDIMENSIONAIS RECONSTRUÍDAS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS IMPREGNADOS PELA TÉCNICA DE GOLGI EM NEURÔNIOS DO NÚCLEO MEDIAL DA AMÍGDALA



Classificados como: (A) fino, (B) atarracado/largo, (C) cogumelo, (D) ramificado e (E) atípico, observados por microscopia de luz. Ajustes do Photoshop CS3 (Adobe Systems, Inc.). Barra = 1  $\mu$ m. **FONTE:** (DALL'OGGIO; DUTRA; MOREIRA; RASIA-FILHO, 2015).

O tamanho dos espinhos dendríticos pode ser determinante na sua composição intracelular e vice-versa. Como exemplo, espinhos de maior tamanho contêm maior quantidade de mitocôndrias, polirribossomos maior densidade de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA no terminal pós-sináptico, como é caso dos espinhos com formato de cogumelo (Figura 6). Por outro lado, espinhos finos não apresentam essa mesma composição e podem ter mais receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (ARELLANO; ESPINOSA; FAIRÉN; YUSTE *et al.*, 2007; BELL; LEE; RANGAMANI, 2023; BOURNE; HARRIS, 2007).

A força sináptica é frequentemente correlacionada com a densidade dos receptores ionotrópicos e glutamatérgicos, AMPARs, (receptores do ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico) na densidade pós-sináptica (PSD). Embora se saiba que a densidade do AMPAR muda com base em cascatas de sinalização biológica complexas, o efeito de fatores geométricos, como formato, tamanho e

curvatura da coluna dendrítica, permanece pouco compreendido (BELL; LEE; RANGAMANI, 2023).

A morfologia dos espinhos dendríticos pode se relacionar com suas propriedades funcionais (GARCÍA-LÓPEZ; GARCÍA-MARÍN; FREIRE, 2007), portanto as mudanças ocorrem por uma reorganização do citoesqueleto (Figura 7). Muitos estudos mostram a importância dos filamentos de actina nessa dinâmica (HLUSHCHENKO; KOSKINEN; HOTULAINEN, 2016), incluindo seu papel na proliferação e na expansão da cabeça dos espinhos dendríticos (CHEN; KELLNER; ZAGREBELSKY; GRUNWALD *et al.*, 2015). Deste modo, parâmetros como comprimento do pescoço e espessura da cabeça poderiam explicar a distribuição de receptores na membrana pós-sináptica, a motilidade e estabilidade dos espinhos e a difusão de íons e moléculas entre espinho e ramo dendrítico (YUSTE, 2011). A variação morfológica dos espinhos pode, então, relacionar-se com a atividade sináptica processada por este espinho (ALVAREZ; SABATINI, 2007). Ou seja, a densidade pós-sináptica, que corresponde a aproximadamente 10% do volume da cabeça do espinho, depende da quantidade de impulsos que este espinho recebe, tornando-o mais estável quanto à sua morfologia e funcionamento e, conseqüentemente, com a frequência e intensidade da atividade sináptica da via aferente (BOURNE; HARRIS, 2007; SEGAL, 2010).

Curiosamente, os neurônios humanos têm não apenas densidades de coluna mais altas, mas também espinhos com pescoços caracteristicamente longos, podendo refletir um grau mais alto de conectividade sináptica e plasticidade no cérebro (DALL'OGGIO; DUTRA; MOREIRA; RASIA-FILHO, 2015), corroborando com os achados na região da amígdala medial em ratos, sendo que esses espinhos dendríticos mais finos são geralmente mais plásticos, envolvem receptores de glutamato, sendo nomeados como “espinhos de aprendizagem” (BOURNE; HARRIS, 2007; BRUSCO; DALL'OGGIO; ROCHA; ROSSI *et al.*, 2010).

Estudos anteriores que observaram o aumento da densidade de espinhos dendríticos e da coluna em neurônios espinhosos médio do Acb após o estresse e derrota crônica social em camundongos, encontraram o aumento da densidade do tipo Fino e atarracados “Espesso” em comparação com o grupo controle, sendo que o tipo cogumelo permaneceu inalterado, visto que é um tipo de espinho considerado mais estável, contudo, esses achados indicam a plasticidade estrutural induzida pelo estresse pelo aumento de espinhos dendríticos e arborização dendrítica em algumas

áreas do cérebro como Acb (CHRISTOFFEL; GOLDEN; DUMITRIU; ROBISON *et al.*, 2011; FOX; FIGUEIREDO; MENKEN; LOBO, 2020). Dito isso, espinhos do tipo Fino e Espesso são considerados imaturos por serem menos estáveis em comparação com o tipo de Cogumelo que é mais maduro. Em comparação com espinhos atarracados “Espessos” os espinhos de cogumelo também formam densidades pós-sinápticas maiores conferindo maior resistência (CHEN; SABATINI, 2012).

Os espinhos de Cogumelos também podem padronizar potenciais pós-sinápticos locais em toda a árvore dendrítica, reduzindo a variabilidade dependente da localização das propriedades excitatórias locais (GULLEDGE; CARNEVALE; STUART, 2012). Enquanto que a presença de Filopódio é geralmente considerada como um sinal de formação ou eliminação da dinâmica da coluna (GARCÍA-LÓPEZ; GARCÍA-MARÍN; FREIRE, 2010). Os espinhos classificados como atípicos podem representar formas transitórias em vários estágios de desenvolvimento ou retração (como 'protoespinhos' e 'multiespinhos') (ARELLANO; ESPINOSA; FAIRÉN; YUSTE *et al.*, 2007). As espículas podem estar envolvidas na transferência de moléculas grandes e no acoplamento elétrico entre elementos pré e pós-sinápticos (SPACEK; HARRIS, 2004). As espículas também podem ocorrer durante o crescimento e remodelação das membranas sinápticas, sendo indicativos de atividade sináptica sustentada (TAO-CHENG; DOSEMECI; GALLANT; MILLER *et al.*, 2009).

FIGURA 6- ILUSTRAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA DO ESPINHO DENDRÍTICO



Espinho dendrítico do tipo cogumelo com a cabeça e pescoço que emergem do dendrito adjacente. Legenda: PSD- Densidade pós-sináptica; REL- Retículo endoplasmático liso; VE- Vesícula endocítica. **FONTE:** (HERIN, 2001; MARCUZZO, 2006).

Sabe-se que os espinhos maiores são mais estáveis com relação aos espinhos menores, os quais possuem maior capacidade de plasticidade. Estudos ainda mostram que o tamanho e a morfologia da cabeça do espinho estão relacionados com o número de vesículas pré-sinápticas e com o número de receptores pós-sinápticos, desta forma podendo alterar a força das conexões (GRUTZENDLER; KASTHURI; GAN, 2002; HOLTMAAT; SVOBODA, 2009).

### **3.4 Peptídeo CART e a Plasticidade neural**

A plasticidade neural ou neuroplasticidade refere-se à alta capacidade do Sistema Nervoso de sofrer mudanças e transformações - em nível estrutural, tecidual ou funcional - em respostas a determinados estímulos, com isso tornando-se uma estrutura adaptável. Isto permite que o Sistema Nervoso se organize frente à aprendizagem ou lesão, modificando determinadas conexões sinápticas ou estruturas neuronais envolvidas na formação das sinapses (PIA, 1985; RAINETEAU; SCHWAB, 2001).

No cérebro adulto, a maioria dos progenitores de neurônios perde a capacidade de se dividir e formar novas células, porém, em algumas poucas regiões cerebrais como hipocampo e a zona ventricular-subventricular, a neurogênese se mantém (SNYDER; SOUMIER; BREWER; PICKEL *et al.*, 2011). Entretanto, a capacidade de formar novos prolongamentos, alterando grandemente seu formato, direcionamento, tamanho, arborizações dendríticas, espinhos dendríticos e número de sinapses em resposta às influências ambientais não é perdida, pois o cérebro adulto está sujeito a constantes remodelações por meio da modificação de neurotransmissores, fatores neurotróficos e neuropeptídeos (FONT; ARBOIX; KRUPINSKI, 2010; LAZAROV; MARR, 2013). Neurotransmissores como: dopamina, glutamato, GABA, glicina, acetilcolina e serotonina são fortes e versáteis moduladores no que diz respeito à plasticidade neural, o que implica uma relação direta entre os efeitos das drogas com as alterações adaptativas, não só na via de recompensa, mas também em diversos circuitos através da formação, do fortalecimento e eliminação de sinapses (VOLKOW; FOWLER; WANG; BALER *et al.*, 2009).

A formação de novos brotos e crescimento dos axônios pode ser programada geneticamente por uma classe de proteínas regenerativas, as quais promovem esse

evento e são denominadas fatores tróficos: fator de crescimento do nervo (NGF – *nerve growth factor*), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF – *brain derived neurotrophic factor*) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF – *glial derived neurotrophic factor*). Essas proteínas estão relacionadas com processo de regeneração de fibras nervosas lesadas, no desenvolvimento e funções neurais como plasticidade neuronal (CHAO, 2003). Outros exemplos, como neurotrofina 3 (NT-3 – *neurotrophin-3*), neurotrofinas 4, 5 e 6, fator neurotrófico ciliar (CNTF – *ciliary neurotrophic factor*) entre outros (BRADSHAW; ALTIN; BLABER; CAVANAUGH *et al.*, 1990; CHAO, 2003).

Além disso, a microglia que são células imunitárias mais proeminentes do SNC que tem o papel de regular o desenvolvimento e manutenção das redes neuronais, também pode está relacionada a processos de neuroplasticidade, como por exemplo, em condições patológicas, estas células conectam-se com as sinapses por maior período de tempo do que quando há ausência de injúrias ao tecido cerebral. Essa conexão prolongada com as sinapses pode levar à eliminação das mesmas em somas neuronais próximos, o que ocorreria como uma resposta ao estímulo inflamatório e sugere uma possível participação da microglia no processo inicial de poda sináptica, visando eliminar as conexões sinápticas entre os neurônios (KETTENMANN; KIRCHHOFF; VERKHRATSKY, 2013). Não obstante, estudos têm mostrado o envolvimento da microglia em processos de neuroinflamação na secreção de citocinas pró-inflamatórias TGF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , as quais têm potencial para causar dano aos neurônios e células gliais (WEITZ; TOWN, 2012). Contudo, os processos inflamatórios têm sido encontrados em diversos transtornos neurológicos, tais como isquemia, doença de Parkinson, Alzheimer, esclerose amiotrófica lateral, esclerose múltipla, doença de Huntington e transtornos psiquiátricos (COLANGELO; ALBERGHINA; PAPA, 2014).

A dinâmica neuronal também é regulada quimicamente por neuropeptídeos. Tratam-se de pequenas cadeias de aminoácidos, cujas funções vão desde atuar como neurotransmissor até fator de crescimento, hormônios e segundos mensageiros no sistema imunológico (HÖKFELT; BARTFAI; BLOOM, 2003). Portanto, a neuroplasticidade é fundamentada em princípios de modificação da transmissão sináptica mediada pelos neurotransmissores (BEAR, 2003).

Ao contrário dos neurotransmissores não peptídicos, os neuropeptídeos não são sintetizados e nem sofrem recaptação no terminal pré-sináptico, mas no terminal

axonal coexistem com as vesículas contendo neurotransmissores não peptídicos como o glutamato ou o GABA. Os neuropeptídeos que estão presentes no SNC têm função na modulação da atividade neuronal, com grande parte das suas ações alterando de forma efetiva a concentração destes neurotransmissores através de mecanismos pré e/ou pós-sinápticos (MERIGHI; SALIO; FERRINI; LOSSI, 2011). Neste contexto, o peptídeo CART está relacionado a experiências de aprendizagem, sendo provável que haja um aumento no comprimento dos dendritos e a densidade de espinhos dendríticos nas células ao longo do manto neocortical, no hipocampo e estriado, e que essas alterações possam embasar as mudanças associadas nos padrões de conectividade sináptica (CHANG; GREENOUGH, 1982; KOLB; GORNY; LI; SAMAHA *et al.*, 2003).

Entretanto, o peptídeo CART está co-localizado com outros neurotransmissores e peptídeos (JANZSÓ; VALCZ; THUMA; SZOKE *et al.*, 2010). Em estudos realizados por Jean *et al.* (2012) foi observado que receptores serotoninérgicos 5-HT4 presentes no Acb regularam a expressão de peptídeo CART, enquanto que no teste de *immunoblotting* mostraram que o peptídeo CART está co-localizado com neurônios GABAérgicos na VTA, substância negra e no Acb onde se encontra com neurônios dopaminérgicos (DALLVECHIA-ADAMS; SMITH; KUHAR, 2001; FU; ZHOU; DONG; HUANG *et al.*, 2016). Em pesquisas realizadas com administração de psicoestimulantes como anfetamina e cocaína, foi observado que na região associada à recompensa como AcbSh e AcbC houve aumento da densidade da coluna de espinhos dendríticos e do número de ramificações dendríticas dos neurônios nessa região (KOLB; GORNY; LI; SAMAHA *et al.*, 2003; ROBINSON; GORNY; MITTON; KOLB, 2001).

### 3.5 Golgi-Cox

Uma metodologia utilizada para a melhor visualização e avaliação da morfologia dos neurônios é a coloração de Golgi-Cox, que se trata de uma técnica adaptada não invasiva da técnica original de Golgi (1873). Nesta técnica o neurônio adquire uma coloração negra e um contraste com restante do tecido de cor amarelo-parda, sendo observado: corpo celular, dendritos, espinhos dendríticos e axônios

(DALL'OGGIO; GEHLEN; ACHAVAL; RASIA-FILHO, 2008). Nas últimas décadas essa técnica mostrou-se eficiente na impregnação de neurônios e glia em cérebros de roedores, bem como confiável na estimativa de ramos finos e espinhos dendríticos, em comparação a procedimentos de incorporação de celoidina mais tradicionais, e provou ser útil em estudos de processos fisiológicos normais, como o desenvolvimento do cérebro, plasticidade e em doenças (NARAYANAN; BAIRY; SRINIVASAMURTHY, 2020).

Com a finalidade de reduzir tempo de processamento e aumentar a seletividade neural foram feitas várias modificações do método (KOLB; FORGIE; GIBB; GORNY *et al.*, 1998; ZAQUOT; KAINDL, 2016). A técnica de Golgi-Cox tem a vantagem de apresentar células isoladas e desvantagem pela aleatoriedade do tipo de neurônio a ser visível (DALL'OGGIO; GEHLEN; ACHAVAL; RASIA-FILHO, 2008).

A técnica de Golgi-Cox permite a análise de arborizações e conexões neuronais, sendo ainda considerado uma ferramenta eficiente na neurociência clínica. A impregnação metálica de neurônios é o princípio subjacente à coloração de Golgi, e que depende da duração do processo e o tipo de sais metálicos utilizados, sendo assim os métodos de coloração de Golgi receberam nomes diferentes como: Golgi Rápido e Golgi-Cox. No método de Golgi Rápido, o cromato de prata metálico ( $\text{Ag}_2\text{CrO}_4$ ) é depositado nos neurônios, e no método Golgi-Cox o depósito em neurônios é relatado como mercúrico de sulfeto ( $\text{HgS}$ ). O método Golgi-Cox (Cox 1891) foi descrito como superior ao o método de Golgi Rápido, pelo fato de corar mais neurônios e deu rotineiramente excelentes resultados (NARAYANAN; BAIRY; SRINIVASAMURTHY, 2020).

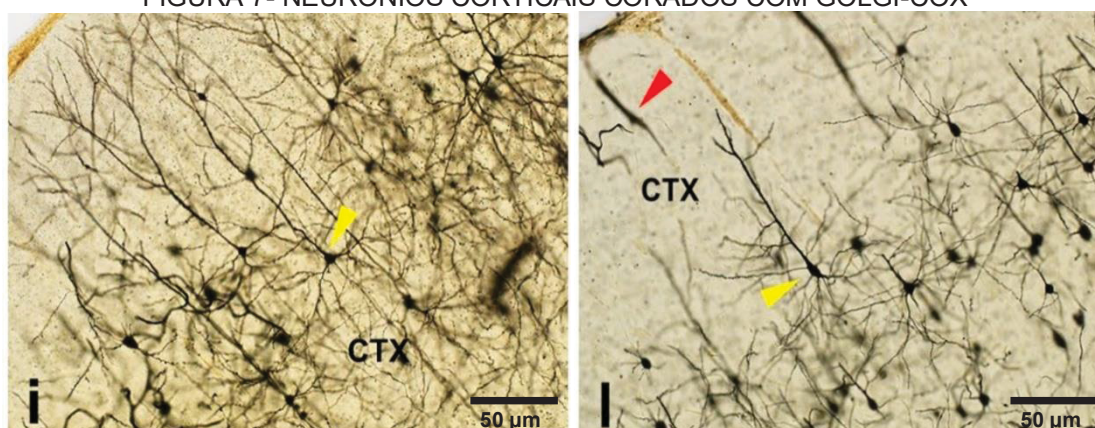
Dentre os diferentes tipos de protocolos de Golgi-Cox aquele escolhido para a execução do presente experimento foi o protocolo adaptado de Narayanan *et al.* (2020), o qual foi desenhado de acordo com estudos que avaliaram fatores que possam influenciar à coloração completa de neurônios e glia em várias regiões do cérebro. Especificamente, (a) o tempo mínimo necessário para a coloração neuronal ideal; (b) a influência da alteração do pH da solução de Golgi-Cox e da solução de carbonato de sódio na coloração; (c) o papel da perfusão ou falta de perfusão antes da impregnação para coloração neuronal ideal; (d) a importância da concentração do fixador (37% de formaldeído vs 4%) de perfusão para a coloração; (e) o papel do volume do tecido cerebral na velocidade de impregnação; e (f) avaliar a adequação

da combinação desses fatores para a coloração neuronal ideal em várias regiões do cérebro (NARAYANAN; BAIRY; SRINIVASAMURTHY, 2020).

Foi concluído pelo estudo de Narayanan et al. (2020) que o tempo de impregnação foi um fator central responsável pela coloração ideal na técnica atual modificada. A coloração neuronal ideal foi alcançada em todo o cérebro após 72-96 h. O pH das soluções de coloração também foi considerado importante para a coloração neuronal ideal em diferentes regiões do cérebro. Sendo assim, os neurônios foram bem corados quando o pH da solução de Golgi-Cox era 6,5 e o pH da solução de carbonato de sódio era 11,2. Foi verificado que a perfusão salina não tenha tido qualquer influência significativa na coloração neuronal ideal ou glial, mas a perfusão de formalina teve um papel significativo na coloração específica da célula. Quando foi usado formaldeído a 37%, apenas as células gliais foram coradas. No entanto, quando o formaldeído a 4% foi usado, tanto os neurônios quanto a glia foram corados se o cérebro estivesse impregnado por pelo menos 72h em solução de Golgi-Cox (NARAYANAN; BAIRY; SRINIVASAMURTHY, 2020).

Observou-se no mesmo estudo que cérebros inteiros exigiram tempos de impregnação mais longos para produzir uma boa coloração em estruturas corticais e subcorticais em comparação com blocos menores. Para coloração predominantemente neuronal, é recomendado o protocolo citado sem perfusão de formaldeído. Para coloração específica de glia, o mesmo protocolo é recomendado, mas com perfusão de formaldeído incluída. Além das conclusões do autor, o protocolo também foi reproduzido no laboratório onde obteve bons resultados, pois com os novos recursos implementado por Narayanan et al. 2020 tem-se economia da quantidade de produtos químicos e reagentes utilizados, simplicidade, velocidade e adequação para coloração de neurônios e glia em comparação com demais protocolos (NARAYANAN; BAIRY; SRINIVASAMURTHY, 2020).

FIGURA 7- NEURÔNIOS CORTICAIS CORADOS COM GOLGI-COX



Fotomicrografia apresentando a eficiência da coloração de Golgi-Cox com impregnação de todo o cérebro por 7 dias (i) na coloração neuronal ideal no córtex (CTX) e impregnação de menor bloco cerebral em 7 dias (l) Nota: pontas de seta amarelas denotam neurônios corticais bem corados e ponta de seta vermelhas denotam vasos sanguíneos manchados. Ampliação 200x. Barra de escala 50 µm. **FONTE:**(NARAYANAN; BAIRY; SRINIVASAMURTHY, 2020).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Os animais são provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. O protocolo de pesquisa foi submetido à apreciação do “Comitê de Ética no Uso de Animais” e aprovado sob o número 1352, de 17/03/2020.

Foram utilizados oito camundongos (*Mus musculus*) machos adultos da linhagem C57BL/6, com massa corporal entre 20 a 30 g, mantidos em caixas plásticas, em grupos com no máximo cinco animais, tratados com água e ração comercial *ad libitum*. A temperatura da sala onde os camundongos estavam dispostos foi controlada e mantida em  $21\pm 1$  °C, sob um ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas às 07:00).

De acordo com a meta pretendida, programamos três fases para a execução desta pesquisa:

Fase 1: Administração do peptídeo CART;

Fase 2: Execução do método de Golgi-Cox;

Fase 3: Captura de imagens e quantificação dos dados morfológicos neuronais.

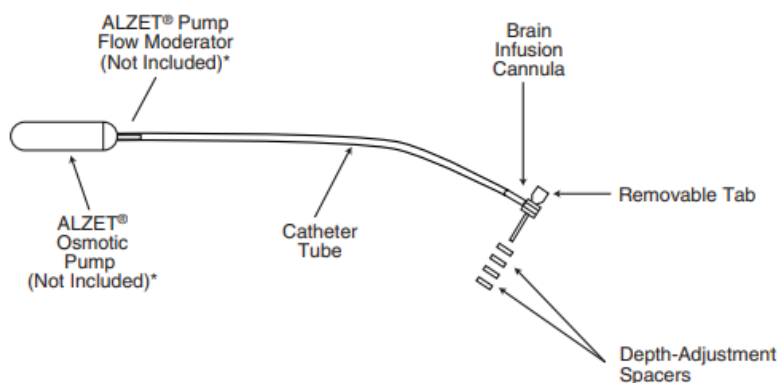
#### 4.1.2 Administração do peptídeo CART

Os animais receberam uma solução anestésica contendo 0,12 mg/g de cetamina e 0,018 mg/g de xilazina, via intraperitoneal (i.p.) em veículo aquoso. Confirmado o efeito anestésico, iniciamos a tricotomia na região dorsal da cabeça e fixação do animal em aparelho estereotático (David Kopf Instruments, EUA). O escalpo foi rebatido para localização do ponto craniométrico bregma, a partir do qual foram definidas as coordenadas ântero-posterior (AP): 0,0 e médio-lateral (ML): 1,1.

Em seguida, realizamos a trepanação do crânio seguindo as coordenadas acima com broca diamantada para assim obtermos uma abertura suficiente para visualização e remoção da dura-máter, a ponto de permitir a passagem da cânula sem a ocorrência de lesão no córtex subjacente. Deste modo, realizamos o implante

da cânula de 1 mm de comprimento, a qual foi acoplada a uma mini-bomba osmótica 1007D (Alzet Company - USA), alojada no dorso do animal e preenchida totalmente com solução contendo o peptídeo CART 55-102 (Phoenix Pharmaceuticals, EUA) em dose de 50 µg/g (Figura 8). A sigla que acompanha a denominação da mini-bomba lhe confere a característica de liberar a solução contida a uma taxa de 0.5µl/hr, durante 7 dias. Como controle, caracterizamos um grupo cujas mini-bombas foram preenchidas apenas de salina estéril. As coordenadas foram adaptadas do atlas estereotático do encéfalo do camundongo de Franklin e Paxinos (2019).

FIGURA 8- BRAIN INFUSION KIT 1 3-5 MM (ALZET) AND MICRO-OSMOTIC PUMP



No sétimo dia pós-cirúrgico, foi realizada a eutanásia dos animais com a administração da mesma solução anestésica em dose letal via intraperitoneal (i.p.) em veículo aquoso. Confirmada a eutanásia, foi feito o deslocamento cervical, separação do escalpo e abertura do crânio. Então os encéfalos foram removidos, blocados e incluídos em solução de Golgi-Cox.

#### 4.1.3 Execução do método de Golgi-Cox

O preparo da solução Golgi-Cox e tratamento dos cortes foram realizados de acordo com o protocolo de Narayanan (2020), que descrevemos abaixo, sendo uma metodologia modificada da técnica original de Golgi (1873).

Para compor a solução Golgi-Cox, dissolvemos inicialmente 2,5g dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O$ ) em 50ml de água destilada morna (5% concentração final) e denominamos de solução A; em seguida, dissolvemos 2,5g de cloreto de mercúrio( $HgCl_2$ ) em 50mL de água destilada quente (5% concentração final), que foi denominada solução B. Então as soluções A e B foram misturadas para obtermos 100mL da solução C. Por fim, dissolvemos 2g de cromato de potássio ( $K_2CrO_4$ ) em 40ml de água destilada fria, o que denominamos de solução D. Ao constatarmos sua completa dissolução, adicionamos 100ml de água destilada fria para obtermos 140ml de solução cromato de potássio 4% (concentração final). Então as soluções C e D foram misturadas e após 3h ao abrigo da luz, observamos a formação de um precipitado amarelo (cromato de mercúrio), filtrado com papel de Whitman.

Deste modo preparamos a solução estoque, com pH ajustado para 6,5, e armazenada em uma garrafa de cor âmbar ao abrigo da luz. Desta solução, utilizamos 100mL com o pH ajustado para 7 por gotejamento de hidróxido de sódio (NaOH) a 5%. Ao adicionar NaOH, um precipitado foi observado, em seguida deixou-se a solução repousar durante a noite para ser novamente filtrado. Cada 10 mL desta solução foi suficiente para que pudéssemos imergir dois blocos que compunham as quatro partes em que cada encéfalo dos animais que foram divididos. As amostras foram armazenadas ao abrigo da luz em temperatura ambiente por sete dias.

Após esse período, os blocos dos encéfalos foram lavados com água destilada para remoção de resquícios de precipitados da coloração e em seguida posicionados em vibrátomo (VT 1000 S, Leica, Alemanha) para seccionamento no plano frontal. Para isso, cada bloco de tecido foi montado individualmente no suporte do vibrátomo usando adesivo de cianoacrilato. A bandeja coletora do equipamento foi então preenchida com água destilada, e ajustado a velocidade da máquina para 8, a frequência para 5 Hz e a espessura da secção para 150  $\mu$ m. Com auxílio de um pincel fino as seções coronais foram coletadas e transferidas para placas de cultura contendo água destilada.

Finalizado o seccionamento, as amostras foram transferidas para cassetes histológicos, que sequencialmente, permaneceram em solução de carbonato de sódio 6% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), pH 11,2, por 15min. O pH da solução 6% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) é um fator importante para qualidade da coloração neuronal, de acordo com análise de Narayanan (2020), onde os cortes tratados com essa solução e em pH 11,2 obteve melhor qualidade na impregnação dos dendritos e espinhos dendríticos.

Os cassetes contendo os cortes foram enxaguados uma vez em água destilada e depois desidratados em soluções ascendentes de álcool (70%, 90% e 100%) por 10min. As secções foram então diafanizadas em xilol por 10min e montadas lâminas histológicas de vidro gelatinizadas, utilizando-se o meio dióptrico DPX (Sigma-Aldrich, USA) e coberto com lamínula de vidro (Figura 9).

#### **4.1.4 Captura de imagens e quantificação dos dados morfológicos neuronais**

A seleção das secções de encéfalos foi realizada por meio do microscópio de luz de campo claro Olympus BX51, enquanto para a captura das imagens utilizamos o scanner de lâminas *Zeiss\MetaSystem*, que conta com o microscópio *AxiolmagerZ2* da Zeiss e o *software* de captura *Metafer* da *MetaSystems*, localizados no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF)-UFPR. As imagens adquiridas foram processadas no *software MetaViewer V2.1* em objetiva de até 63x, e selecionadas as áreas de interesse onde as imagens foram convertidas no formato *tif*. Com auxílio do *software Image-J Fiji* e plugging *Transform J*, quantificamos o padrão de comprimento e área das ramificações dendríticas de neurônios espinhosos médio, interneurônios, bem como a classificação dos espinhos encontrados (Figura 12). O mesmo microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmera fotográfica DP72, foi utilizado para captura de imagens das lâminas do grupo Controle Negativo e demais grupos (Figura 13).

Para localização dos núcleos caudado-putame e núcleo accumbens, seja em lâminas ou em imagens capturadas, utilizou-se como guia o atlas estereotáxico do encéfalo do camundongo de Franklin e Paxinos (2019). Contudo, a visualização da zona subventricular serviu como referência anatômica para localizar os neurônios e analisá-los, quanto aos critérios para seleção de dendritos: (i) ser bem corados e

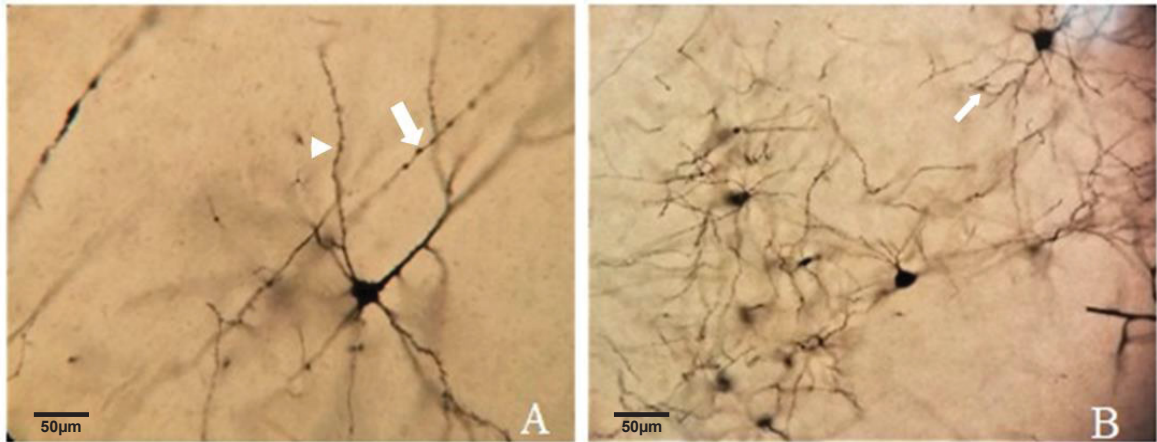
apresentar o mínimo de artefatos; (ii) ser isolados de células vizinhas para evitar dendritos “emaranhados”; (iii) possuírem espinhos dendríticos claramente distinguíveis do fundo e claramente visíveis ao longo do eixo 'z'.

Para a análise morfoquantitativa dos dendritos e respectivos espinhos dendríticos, garantimos que as imagens que foram exportadas pela opção *Extract* do *MetaViewer V2.1* e processadas no *software Image-J Fiji*, tiveram sua barra de escala calibrada de acordo com a objetiva de captura. Neste caso, utilizou-se a objetiva de 63x que permite maior resolução no formato *tif*, com isso, foi calibrada para 9.8 pixel/ $\mu\text{m}$  com RGB color e submetida a contraste automático, seguindo as recomendações do CTAF. Para as imagens fotografadas no microscópio Olympus BX51 e processadas no *software Cell ^ F* em formato *tif*, no *Image-J Fiji* foram submetidos a uma calibração de acordo com a escala adquirida nas fotografias obtidas na objetiva de 40x com Zoom de 2x em campo claro, com a mesma qualidade da objetiva do scanner de lâminas, e sem escala de cinza, seguindo as recomendações do CTAF, foram calibradas em 11.76 pixel/ $\mu\text{m}$ , nas quais os valores de comprimento e área foram reproduzíveis.

Foram estudados oito camundongos agrupados em três grupos: Grupo CART composto por quatro camundongos que receberam peptídeo CART, denominados: CART 1, CART 3, CART 5 e CART 6; o Grupo SALINA, com dois camundongos que receberam solução salina estéril, denominados: SALINA 2 e SALINA 4, e o Grupo Controle Negativo (CN) formado por dois camundongos que não foram expostos a processos cirúrgicos, sendo as primeiras amostras dos testes-piloto, denominados Controle Negativo 1 e Controle Negativo 2. Foram analisadas doze lâminas, sendo quatro cortes de encéfalos para cada grupo. O total de dendritos obtidos por grupo para cada região foi: Acb 110 (cento e dez) e CPu 80 (oitenta) dendritos, valor estipulado de acordo com o limite máximo que foi adquirido no primeiro corte e padronizado para os demais, sendo assim foram analisados num total de 570 dendritos.

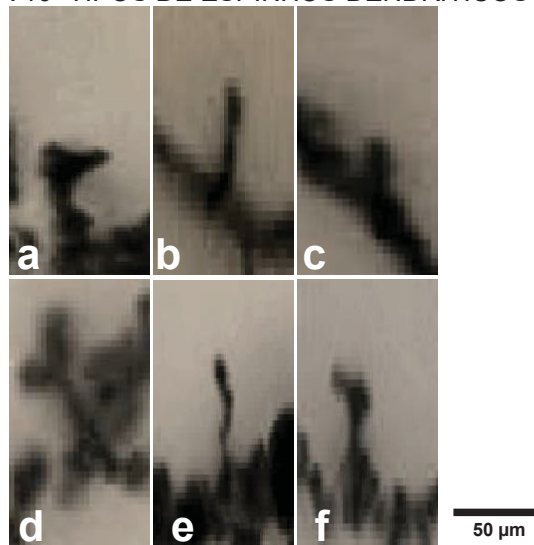
Neste presente estudo, os dados morfoquantitativos analisados para cada dendrito e espinho dendrítico, calculou-se: área ( $\mu\text{m}^2$ ), comprimento ( $\mu\text{m}$ ), bem como classificou-se o tipo de espinho dendrítico encontrado de acordo com os trabalhos de Dall'Oglio et al. (2015) e Guerra et al. (2023) onde foram detectados baseados na presença de protuberâncias em uma única haste e forma aparentes da cabeça, como mostrado na Figura 11 e descritos na Tabela 1.

FIGURA 9- NEURÔNIOS CORADOS COM GOLGI-COX



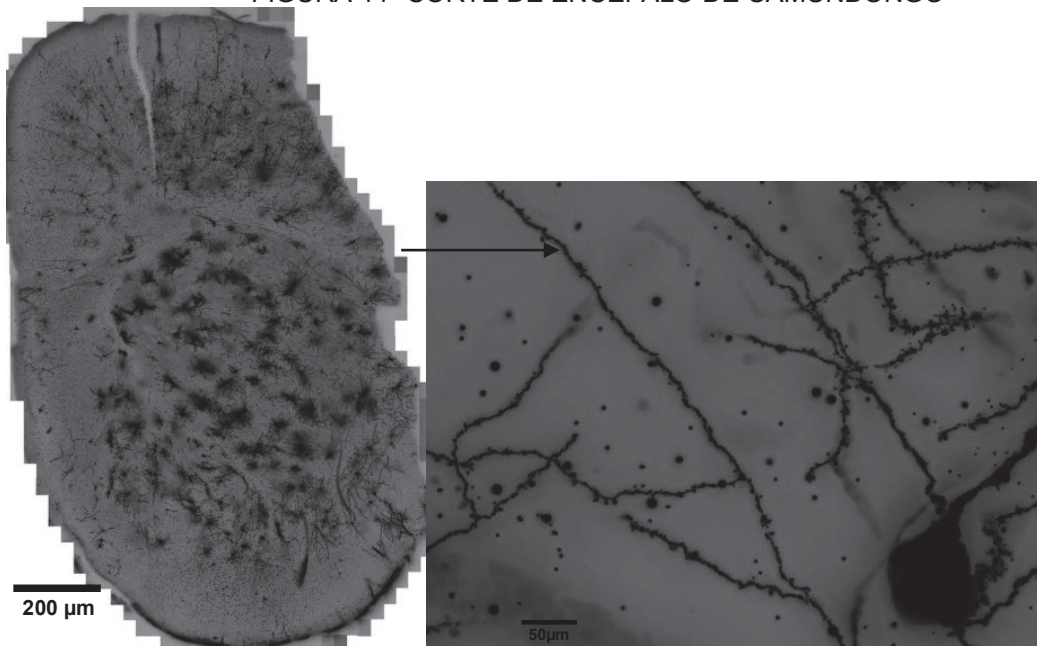
Visualização da estrutura neuronal após método de Golgi-Cox de Narayanan et al. (2020) em camudongos (imagens do autor). Nota-se o correto delineamento do corpo celular, suas projeções dendríticas e axônios varicosos de passagem. A) Irradiação de dendritos do corpo celular, dendrito primário (ponta da seta) e axônio de outro neurônio (seta maior) com protuberâncias varicosas. B) Numerosos e longos dendritos formam uma rede de comunicação esparsa e sob diferentes planos de foco, como exemplo de condições de estudo das ramificações dendríticas secundárias. (seta menor). Barra de escala 50µm.

FIGURA 10- TIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS



Fotomicrografias obtidas no scanner de lâminas captura em objetiva de 63x. (a) Cogumelo; (b) Fino; (c) Espesso; (d) Ramificado; (e) Filopódio; (f) com espícula.

FIGURA 11- CORTE DE ENCÉFALO DE CAMUNDONGO



Fotomicrografias com escala de cinza no formato *tif* obtidas pelo scanner de lâminas Zeiss/Metasyste *software* V2 1. Imagem a esquerda capturada em objetiva de 10x e a imagem a direita captura em 63x para análise dos espinhos dendríticos.

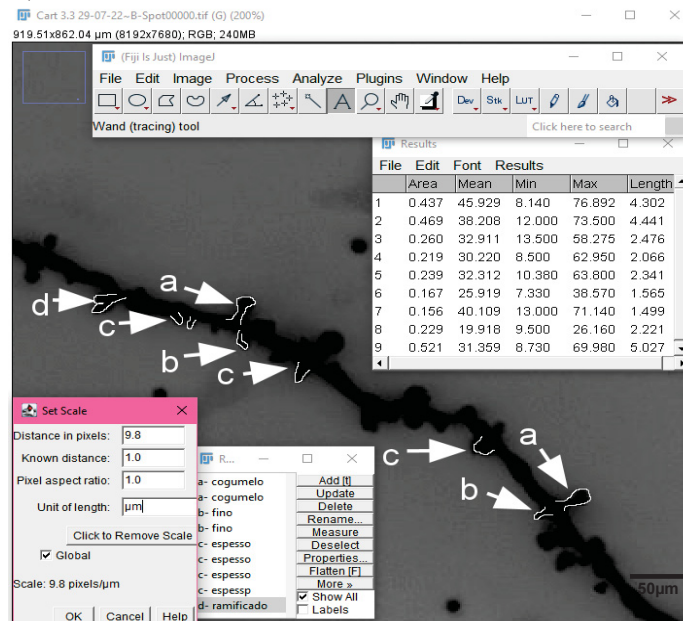
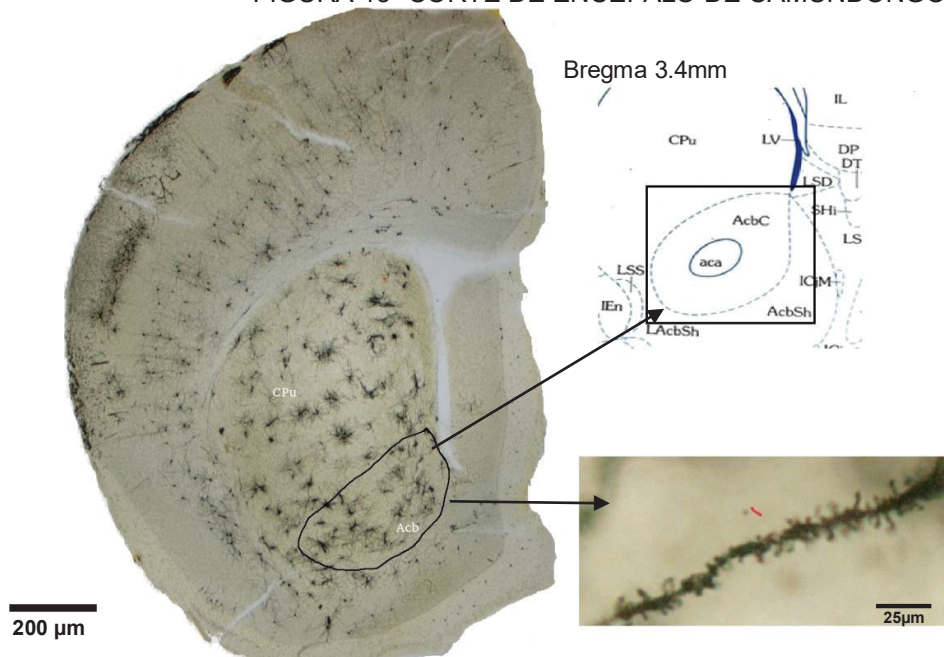
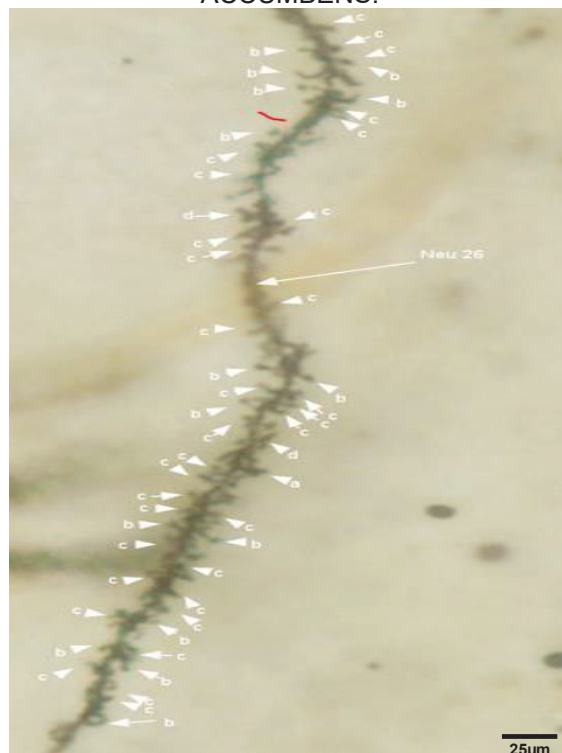
FIGURA 12- IMAGEM *TIF* PROCESSADA NO SOFTWARE *IMAGE-J FIJI* PARA ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DOS DENDRITOS E ESPINHOS DENDRÍTICOS

FIGURA 13- CORTE DE ENCÉFALO DE CAMUNDONGO



Fotomicrografias no formato *tif* obtidas pelo microscópio Olympus BX51 *software* Cell ^ F. Imagem do corte a esquerda capturada em objetiva de 10x e a imagem do dendrito a direita captura em 40x com Zoom de 2x para análise dos espinhos dendríticos.

FIGURA 14- DENDRITO ISOLADO DE NEURÔNIO ESPINHOSO MÉDIO NA REGIÃO DO NÚCLEO ACCUMBENS.



Fotomicrografia no formato *tif* obtida pelo microscópio Olympus BX51 *software* Cell ^ F na objetiva de 40x com Zoom de 2x para análise dos espinhos dendríticos, sem a escala de cinza. Classificação de acordo com a Figura 5 e 11. Barra de escala 25 µm.

#### 4.1.5 Análise estatística

Os dados da quantificação foram analisados no programa GraphPad Prism 8.4.2, utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste Tukey para comparação dos valores de comprimento e área entre os três grupos independentes nas regiões do núcleo accumbens e caudado-putame, sendo definido para significância que \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Os resultados foram descritos em média e desvio padrão.

## 5. RESULTADOS

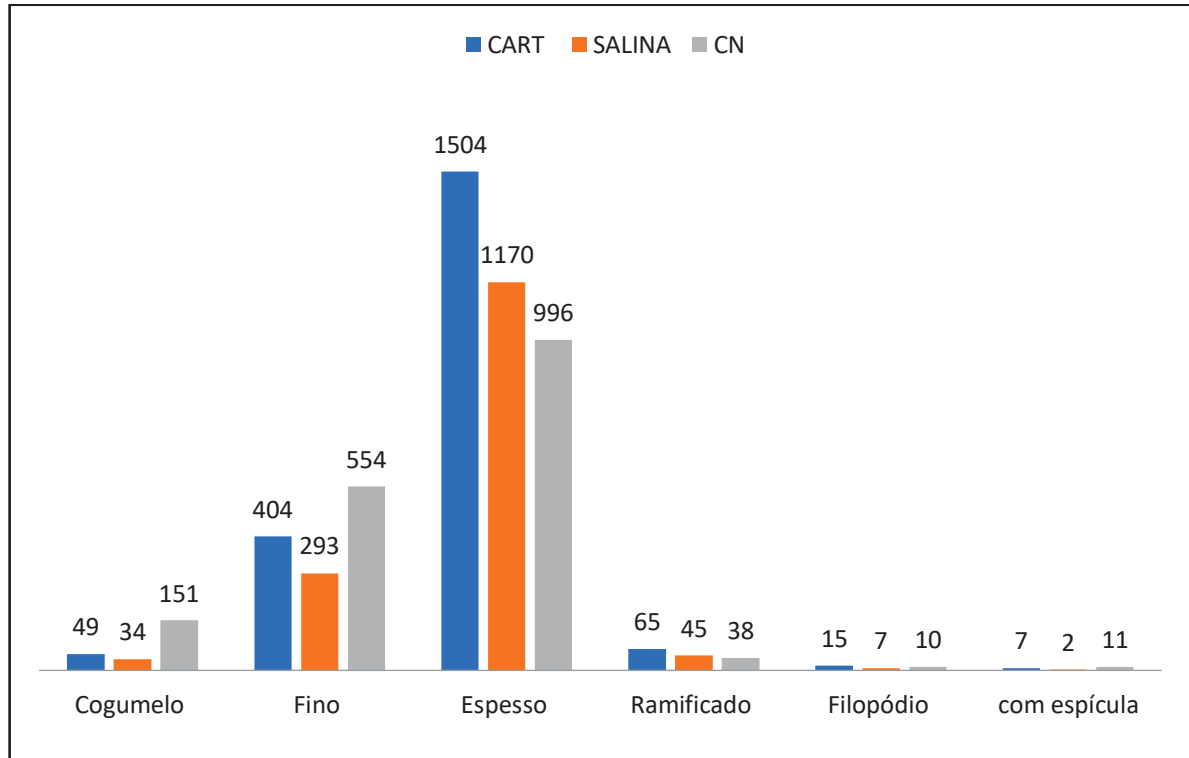
### 5.1 Quantificação e morfologia dos subtipos de espinhos dendríticos

A impregnação do Golgi-Cox resultou em uma coloração escura dos neurônios sob um fundo claro que possibilitou a análise morfológica pretendida, bem como a quantificação dos dendritos e dos espinhos dendríticos de neurônios estriatais. As imagens capturadas e digitalizadas pelo scanner de lâminas do CTAF permitiram uma alta-resolução e precisão na visualização, bem como a classificação dos tipos de espinhos dendríticos encontrados no núcleo accumbens e caudado-putame. Também utilizamos como fonte de imageamento o microscópio Olympus BX51, também do CTAF, sem prejuízo para visualização e classificação dos espinhos.

A classificação dos espinhos ocorreu de acordo com as descrições de Arellano et al. (2007), Brusco et al. (2010) Gonzalez-Burgos et al. (2012), González-Ramírez, M. M. et al. (2014), Dall'Oglio, A. (2015). Tanto a medição de dendritos, espinhos dendríticos e sua classificação foram realizados por meio do *Image-J Fiji*.

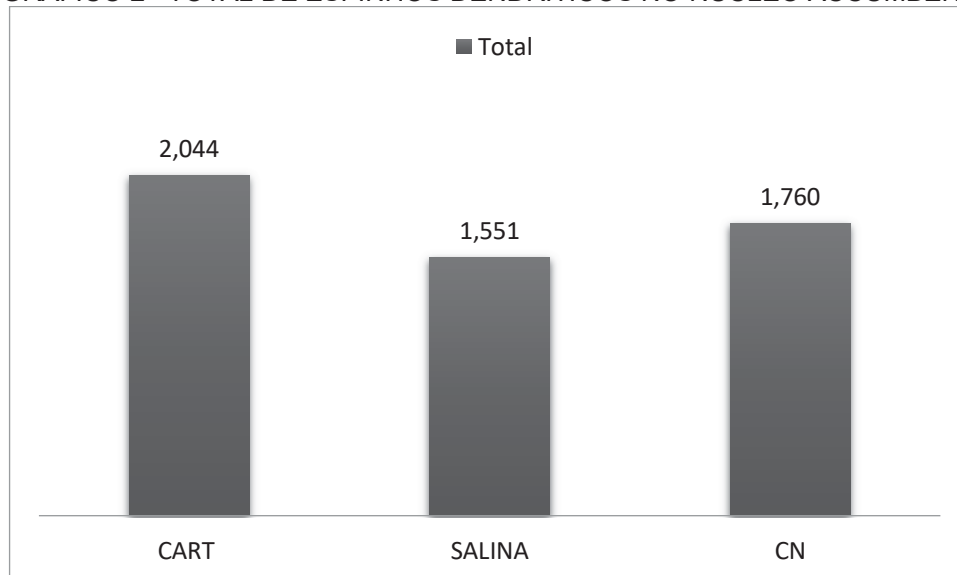
Foi observado que o grupo CART no Acb e no CPu obteve uma quantidade maior no total de espinhos dendríticos com relação aos grupos SALINA e Controle Negativo (Gráficos 2 e 4), além da maior incidência do subtipo de espinho Espesso, comparando todos os grupos e em ambas as regiões estudadas. Os subtipos Filopódio e com espícula tem sido mais raros de serem encontrados. A quantidade de espinhos por subtipo do grupo CART com relação ao grupo controle SALINA e Controle Negativo podem ser comparadas em cada região nos Gráficos 1 e 2.

GRÁFICO 1– TOTAL POR SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO NÚCLEO ACCUMBENS



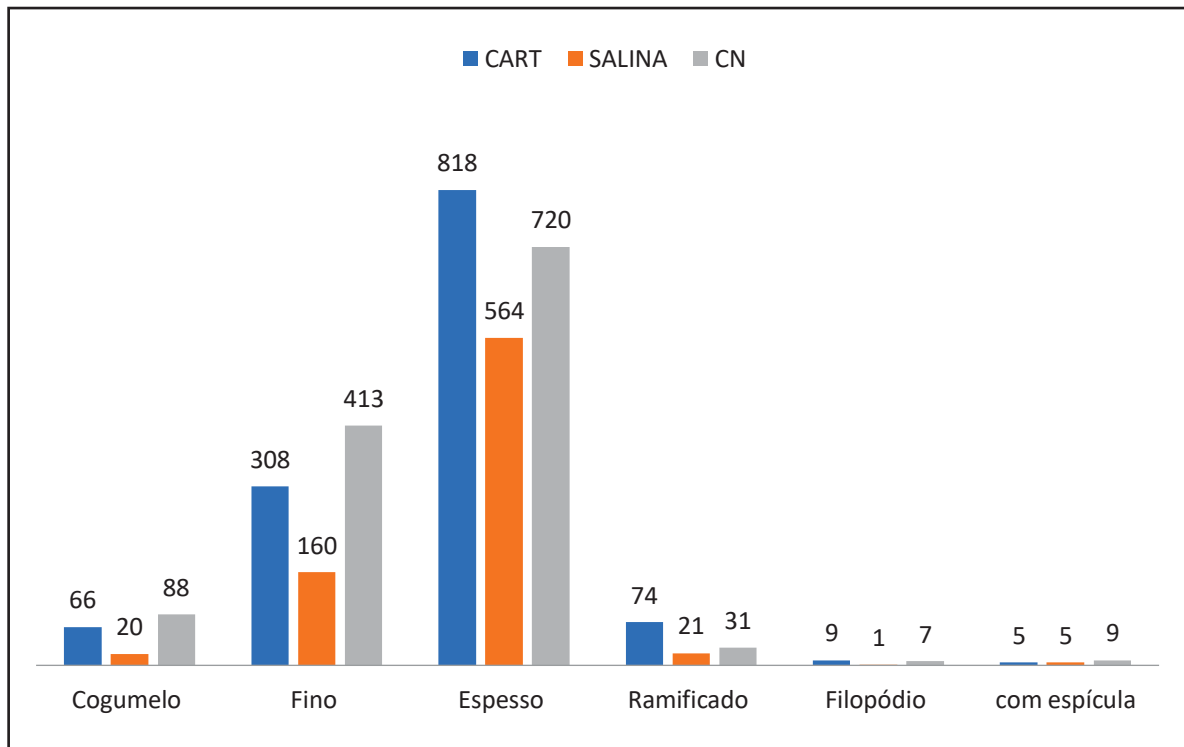
Total por subtipo encontrados em 110 dendritos de cada grupo. O subtipo Espesso apresentou-se em maior quantidade nos grupos estudados.

GRÁFICO 2– TOTAL DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO NÚCLEO ACCUMBENS



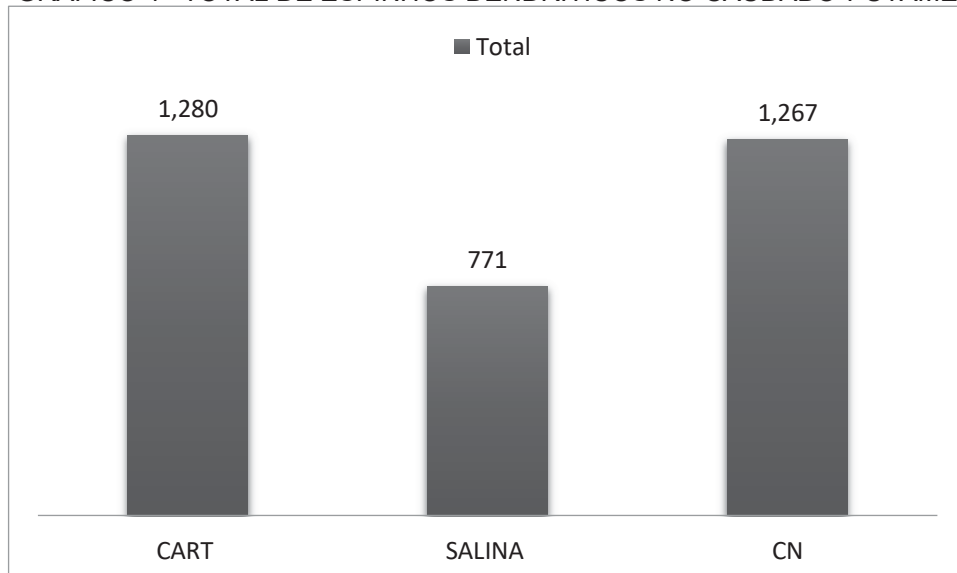
Total de espinhos dendríticos encontrados em 110 dendritos de cada grupo. Grupo CART apresentou-se em maior quantidade de espinhos dendríticos.

GRÁFICO 3– TOTAL POR SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO CAUDADO-PUTAME



Total por subtipo encontrados em 80 dendritos de cada grupo. O subtipo Espesso apresentou-se em maior quantidade nos grupos estudados.

GRÁFICO 4– TOTAL DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO CAUDADO-PUTAME



Total de espinhos dendríticos encontrados em 80 dendritos de cada grupo. Grupo CART apresentou-se em maior quantidade de espinhos dendríticos.

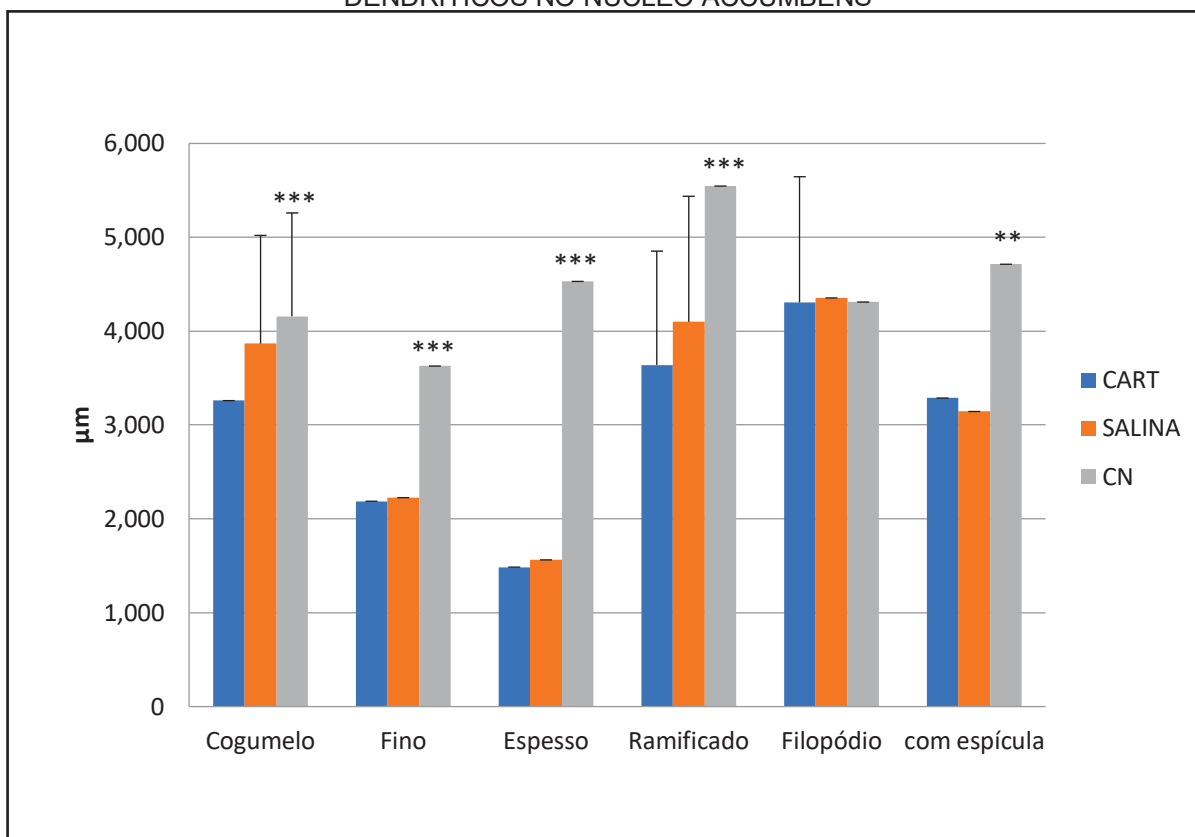
## 5.2 Quantificação do comprimento dos dendritos e dos subtipos de espinhos dendríticos

A quantificação do comprimento ( $\mu\text{m}$ ) dos dendritos bem como seus espinhos dendríticos foi realizada de forma manual por meio de *Image-J Fiji*.

Em nosso trabalho de análise dos dendritos determinamos um padrão de ramificação dendrítica num comprimento de faixa entre 20.000 a 200.000  $\mu\text{m}$ , sendo que a média do comprimento desses dendritos no Acb foi de 78.400  $\mu\text{m}$  e no CPu 67.710  $\mu\text{m}$ , considerando que os tamanhos variados de dendritos, são derivados de diferentes tipos de neurônios encontrados no estriado, como os interneurônios e neurônios espinhosos de tamanho médio. Para quantificação do comprimento dos subtipos de espinhos dendríticos foi realizada adaptação das análises de Dall'Oglio, A. (2015) e Grider, M.H et al. (2006).

As médias de comprimento foram comparadas entre os três grupos analisados usando o teste Tukey para avaliar a diferença significativa. Neste estudo, observou-se que o grupo Controle Negativo possui, no Acb, espinhos dendríticos com os maiores comprimentos, considerando os tipos: Cogumelo ( $4.159 \pm 1.100$ ), Fino ( $3.628 \pm 0,9125$ ), Espesso ( $4.530 \pm 67.20$ ), Ramificado ( $5.546 \pm 1.280$ ) e com espícula ( $4.713 \pm 0.6839$ ), com relação aos grupos CART e SALINA (\*\* $p < 0.001$ )(\*\* $p < 0.005$ ); as diferenças obtidas pelo grupo CART nos subtipos mencionados foram respectivamente de -0.8991; -1.440, -1.404; -1.906, -1.426  $\mu\text{m}$ , enquanto o tipo Filopódio não obteve diferença significativa entre os grupos. Ademais, o Gráfico 5 apresentou maior desvio padrão no comprimento dos subtipos, pois um mesmo subtipo de espinho possui variações em sua morfologia e conseqüentemente tendo medidas morfológicas diferentes.

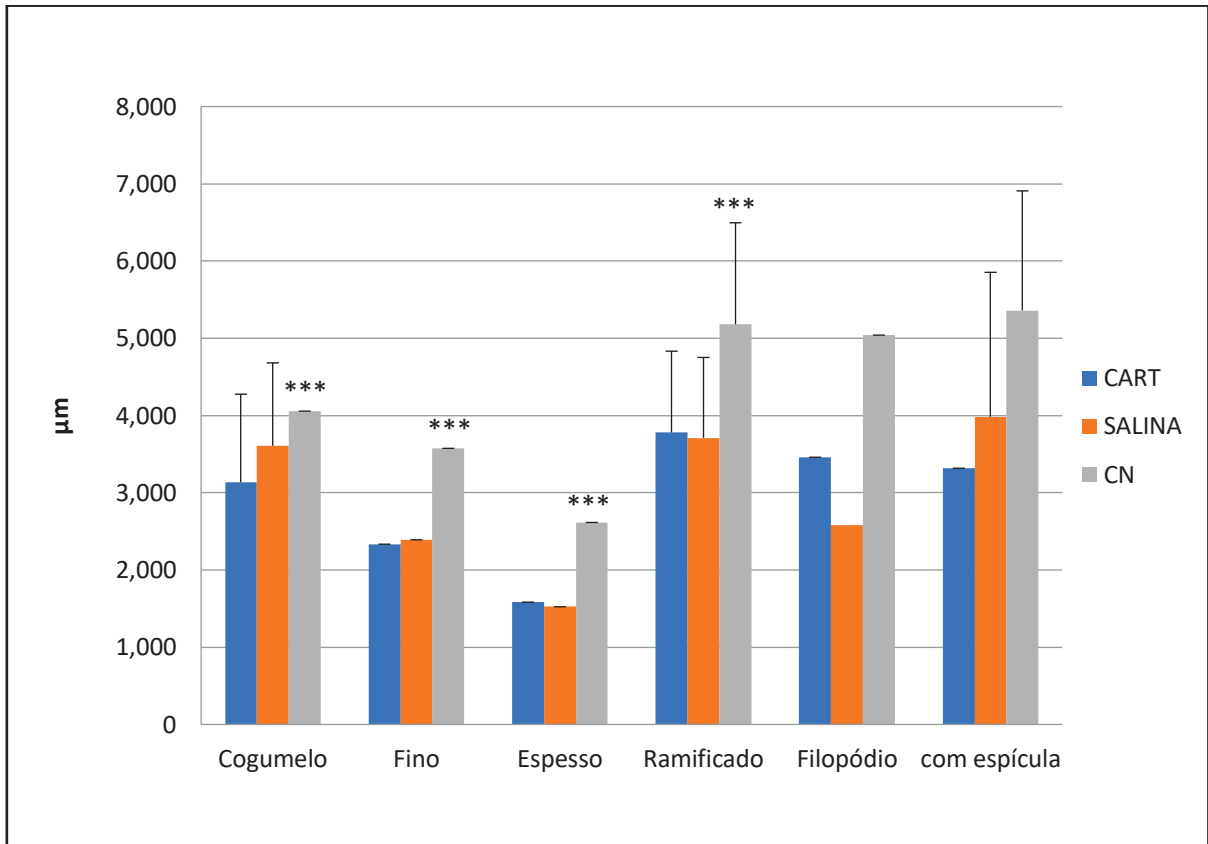
GRÁFICO 5- QUANTIFICAÇÃO DO COMPRIMENTO ENTRE OS SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO NÚCLEO ACCUMBENS



Média e desvio padrão do comprimento dos subtipos de espinhos dendríticos encontrados em 110 dendritos de cada grupo. Sendo definido \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$  para os valores de significância.

Enquanto na região do CPu, o grupo Controle Negativo também apresentou maior comprimento dos subtipos de espinhos dendríticos: Cogumelo ( $4.057 \pm 0.9307$ ), Fino ( $3.575 \pm 0.9178$ ), Espesso ( $2.615 \pm 0.9754$ ), Ramificado ( $5.181 \pm 1.314$ ) com relação aos grupos CART e SALINA (\*\*\*)  $p < 0.001$ ), tais diferenças obtidas pelo grupo CART nos subtipos mencionados foram respectivamente de -0.9195; -1.242, -1.031; -1.400  $\mu\text{m}$ , os subtipos Filopódio e com espícula não obtiveram diferença significativa entre os grupos, para mais, no Gráfico 6 apresentou maior desvio padrão no comprimento dos subtipos.

GRÁFICO 6- QUANTIFICAÇÃO DO COMPRIMENTO ENTRE OS SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO CAUDADO-PUTAME



Média e desvio padrão do comprimento dos subtipos de espinhos dendríticos encontrados em 80 dendritos de cada grupo. Sendo definido \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$  para os valores de significância.

Sobre o comprimento dos dendritos, o grupo CART possui os maiores valores (\*\*\*)  $p < 0.001$  para o Acb e CPu em comparação com o grupo Controle Negativo (Tabela 2).

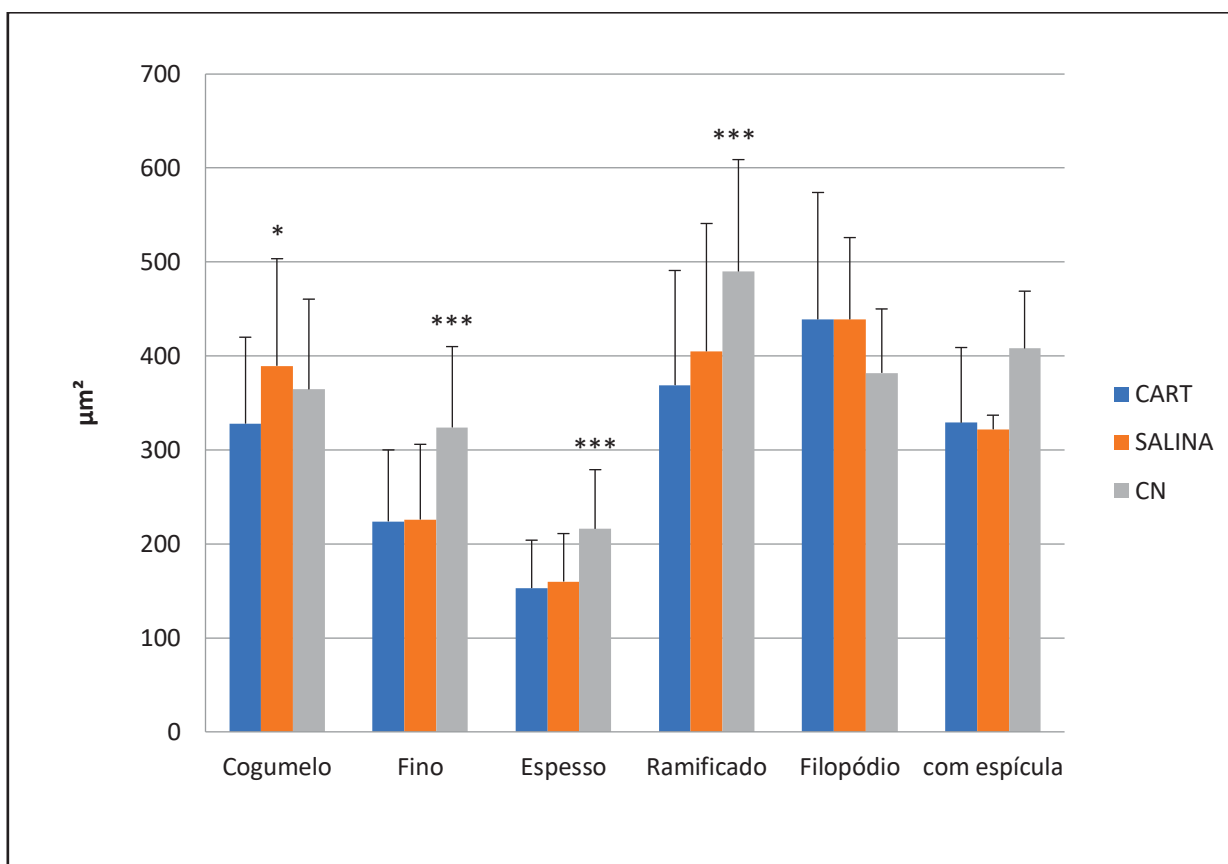
TABELA 2- COMPRIMENTO DOS DENDRITOS NO NÚCLEO ACCUMBENS E CAUDADO-PUTAME

Regiões/ Grupo	CART (M±P) (μm)	CN (M±P) (μm)
Acb	97.54±41.66	46.05±26.70
CPu	78.04±44.47	46.85±26.58

### 5.3 Quantificação da área dos dendritos e dos subtipos de espinhos dendríticos

Nos resultados apresentados foi observado que o grupo Controle Negativo apresentou, no Acb, os seguintes subtipos de espinhos dendríticos com a maior área ( $\mu\text{m}^2$ ): Fino ( $324.1 \pm 86.39$ ), Espesso ( $216.0 \pm 63.18$ ), Ramificado ( $489.9 \pm 119.3$ ), com relação aos grupos CART e SALINA (\*\* $p < 0.001$ ), tais diferenças obtidas pelo grupo CART nos subtipos mencionados foram respectivamente de  $-100.4$ ;  $-109.7$ ;  $-120.6 \mu\text{m}^2$ . Em contrapartida, o grupo SALINA ( $389.5 \pm 114.2$ ) mostrou um aumento significativo da área do subtipo de espinho Cogumelo em comparação com os Grupos Controle Negativo e CART (\*  $p < 0.05$ ), com diferença respectiva de  $-0.2918$  e  $-0.6072 \mu\text{m}^2$ . Entretanto, não houve diferença significativa nos subtipos de espinhos Filopódio e com espícula entre os grupos. No Gráfico 7 é notado que todos os subtipos mostraram maior dispersão nas médias de área.

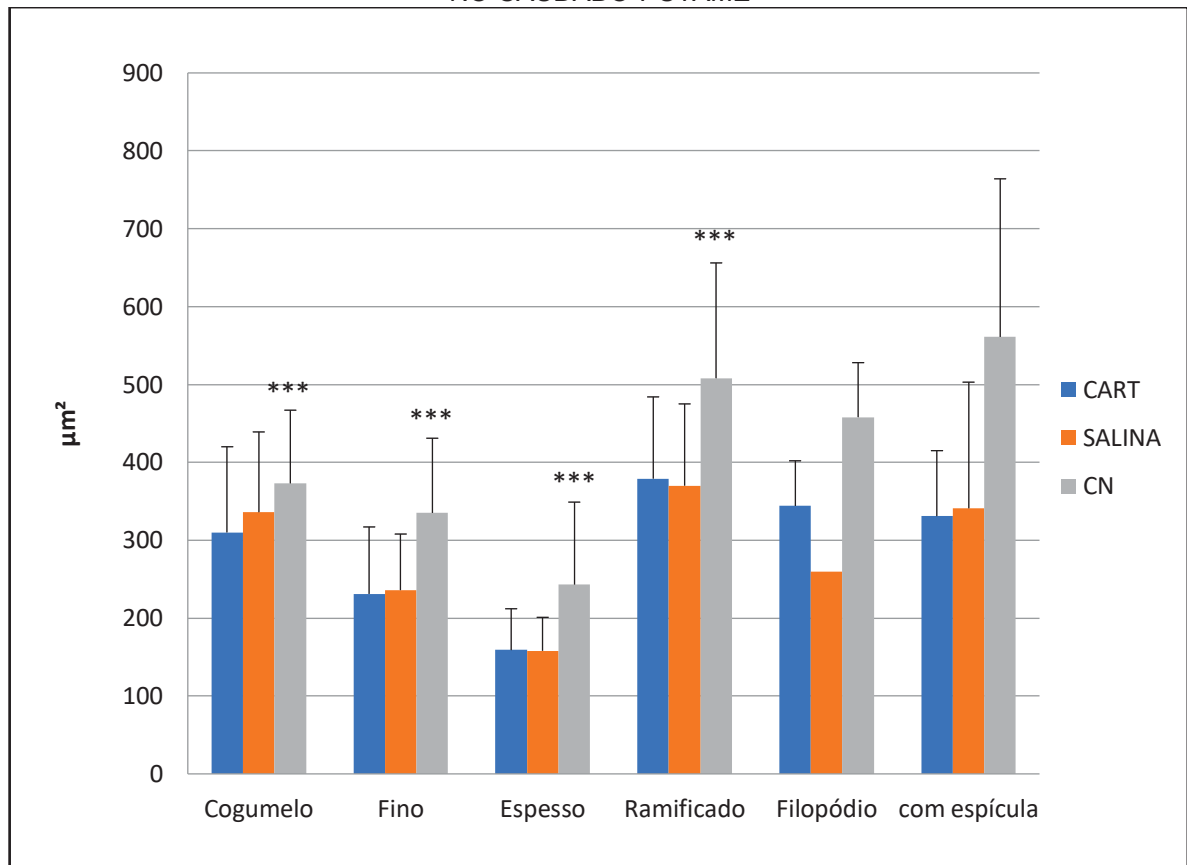
GRÁFICO 7- QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA ENTRE OS SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO NÚCLEO ACCUMBENS



Média e desvio padrão da área dos subtipos de espinhos dendríticos encontrados em 110 dendritos de cada grupo. Sendo definido \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$  para os valores de significância

No CPu, o grupo Controle Negativo também apresentou subtipos de espinhos dendríticos com maior área: Cogumelo ( $373.2 \pm 94.59$ ), Fino ( $335.5 \pm 96.18$ ), Espesso ( $243.2 \pm 106.1$ ) e Ramificado ( $507.9 \pm 147.7$ ) com relação aos grupos CART e SALINA (\*\*\*)  $p < 0.001$ ); tais diferenças obtidas pelo grupo CART nos subtipos foram respectivamente de  $-63,54$ ;  $-104,4$ ;  $-84,56$ ;  $-128,6 \mu\text{m}^2$ . O subtipo Filopódio não obteve diferença significativa, e com espícula não apresentou diferença devido à quantidade inferior ao limite do teste para análise estatística. Assim como na região do Acb, no CPu, conforme mostrado no Gráfico 8, todos os subtipos dos grupos estudados possuem maior dispersão nas médias de área por causa da variação encontrada nos subtipos dos espinhos.

GRÁFICO 8- QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA ENTRE OS SUBTIPOS DE ESPINHOS DENDRÍTICOS NO CAUDADO-PUTAME



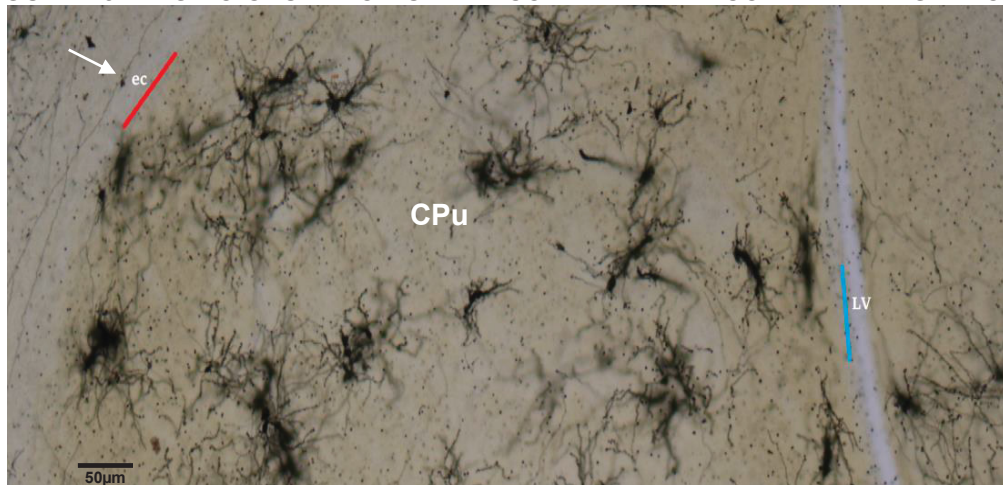
Média e desvio padrão da área dos subtipos de espinhos dendríticos encontrados em 80 dendritos de cada grupo. Sendo definido \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$  para os valores de significância.

Já em relação à área dos dendritos – e não mais dos espinhos dendríticos - o grupo CART (\*\*\*)  $p < 0.001$ ) também possui os maiores valores para as regiões Acb e CPu em comparação com ao grupo Controle Negativo.

TABELA 3- ÁREA DOS DENDRITOS NO NÚCLEO ACCUMBENS E CAUDADO-PUTAME

Regiões/ Grupo	CART (M±P) (μm²)	CN (M±P) (μm²)
Acb	10.260±4.498	4.167±2.421
CPu	8.163±4.962	4.399±2.518

FIGURA 15- REGIÃO CAUDADO-PUTAME COM FIBRAS DE CORRENTE MIGRATÓRIA



Fotomicrografia no formato *tif* obtida pelo microscópio Olympus BX51 *software* Cell ^ F na objetiva de 20x com Zoom de 2x. Sem a escala de cinza. Linha em vermelho representa a região onde se encontra as fibras de corrente migratória, e linha em azul representa a região de saída das fibras, a seta indica uma das fibras encontradas. Legenda: CPu- Caudado-putame, ec- cápsula externa , LV- Ventrículo Lateral. Barra de escala 50 µm.

FIGURA 16- EXEMPLO DE UMA FIBRA DE CORRENTE MIGRATÓRIA ENCONTRADA NA REGIÃO DO CAUDADO-PUTAME



Fotomicrografia no formato *tif* obtida pelo microscópio Olympus BX51 *softwar* eCell ^ F na objetiva de 40x com Zoom de 2x. Sem a escala de cinza. Fibra migratória rostral, nota-se a presença de poucos espinhos dendríticos e apresentando maior incidência do subtipo (c) Espesso. Barra de escala 25 µm

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Quantificação e morfologia dos subtipos de espinhos dendríticos

Neste trabalho foi observado que o grupo de camundongos em que foi administrado peptídeo CART apresentou mais espinhos dendríticos, em relação aos controles, em ambas as regiões estudadas.

De acordo com Segal (2010) supõe-se que o número de espinhos esteja relacionado com o número de sinapses, assim como o tamanho físico é refletido na frequência das correntes pós-sinápticas excitatórias. No entanto, várias observações recentes não estão de acordo com essas generalizações, exigindo uma reavaliação do modelo: a dimensão da coluna dos espinhos e as respostas sinápticas nem sempre estão correlacionadas. Propõe-se que os espinhos sejam formados e moldados pela atividade contínua da rede neural, não necessariamente por um evento de 'aprendizagem', na medida em que, na ausência de tal atividade, novos espinhos não são formados e os existentes desaparecem ou se convertem em filopódios e finos. Na ausência de espinhos, os neurônios ainda podem manter sinapses com fibras aferentes, que agora podem terminar em seu eixo dendrítico (SEGAL, 2010).

No presente estudo, foi observada a ausência ou poucos espinhos dendríticos encontrados em algumas fibras de corrente migratória rostral (Figura 16), que tem saída da SVZ em direção ao bulbo olfatório, nas quais são fibras longas, plásticas e que funcionam como um trilho para migração durante período neurogênico. Mesmo com poucos dendritos, as sinapses dopaminérgicas, GABAérgicas e colinérgicas que regulam esse nicho mantêm-se (HÖGLINGER; RIZK; MURIEL; DUYCKAERTS et al., 2004; LENNINGTON; POPE; GOODHEART; DROZDOWICZ et al., 2011; PALLOTTO; DEPREZ, 2014)

Como o estriado e o núcleo accumbens estão parcialmente inseridos em territórios onde residem precursores neurais específicos para a formação de novos neurônios do bulbo olfatório: a zona ventricular-subventricula (V-SVZ), é comum encontrar essas fibras inervando essas regiões (MERKLE; FUENTEALBA; SANDERS; MAGNO *et al.*, 2014) (Figura 15 e 16).

Em contrapartida, em doenças em que ocorre a perda dos espinhos dendríticos, os neurônios são menos capazes de lidar com as grandes entradas sinápticas sobre seus eixos dendríticos, e essas entradas podem levar à sua eventual morte, pois os espinhos dendríticos protegem os neurônios de aumentos induzidos pela atividade sináptica nas concentrações intracelulares de cálcio (SEGAL, 2010). Assim como ocorre na doença de Alzheimer, os espinhos são rapidamente perdidos, sugerindo descontrole do mecanismos de manutenção, os quais podem estar envolvidos com o declínio cognitivo observado nesses pacientes (POPUGAEVA; BEZPROZVANNY, 2014).

Não obstante, foi observada uma predominância dos subtipos de espinhos, Espesso e Fino, com relação aos demais subtipos nas regiões estudadas. De acordo com Bourne et al. (2010) espinhos dendríticos mais finos são geralmente mais plásticos e considerados “espinhos de aprendizagem”, refletindo um grau mais alto de conectividade sináptica. E os Espessos possuem sinalização mais rápida que pode resultar na capacidade de sustentar correntes sinápticas mais fortes; no entanto, os dois tipos são considerados imaturos e menos estáveis, pois estão relacionados com maior capacidade de plasticidade (CHEN; SABATINI, 2012).

O subtipo de espinho com maior incidência encontrado nos três grupos analisados, principalmente no grupo CART foi o Espesso que, segundo o estudo de Christoffel et al. (2011), alguns fatores como estresse influencia no aumento da densidade do tipo Fino e Espesso, indicando a plasticidade estrutural induzida por esse fator assim como em processos inflamatórios, resultando em aumento de espinhos dendríticos e arborização dendrítica em algumas áreas do cérebro, neste caso, o Acb e CPu.

No presente estudo a administração do peptídeo CART pode ter corroborado em conjunto com outros fatores, como a ação da micróglia, matriz extracelular, neurotransmissores, entre outros neuropeptídios no brotamento de espinhos dendríticos mais plásticos, e nas de alterações morfológicas. Como observado nos estudos de Liu et al. (2016) que demonstrou os efeitos neuroregenerativo do peptídeo CART em camundongos com AVC, envolvido no aumento da proliferação de células neuroprogenitoras, migrações, reinervação e recrutamento de neuropeptídeos.

## **6.2 Quantificação do comprimento e área dos dendritos e dos subtipos de espinhos dendríticos**

A área das estruturas dos neurônios está relacionada com a resistência exercida sobre o impulso trazido de outros neurônios pelos dendritos, assim como o comprimento dos dendritos tem influência direta na transmissão do impulso de entrada, sendo que essas medidas morfológicas podem nos dizer a respeito da plasticidade neuronal (RALL, 2011).

A quantificação do comprimento e da área do grupo Controle Negativo nos subtipos de espinhos dendríticos Fino, Espesso e Ramificado no Acb apresentaram maiores médias com relação ao grupo CART e SALINA, com exceção ao subtipo Cogumelo, onde o grupo SALINA mostrou maior média da área. Isso também foi observado no CPu, mas incluindo o subtipo Cogumelo.

Contudo, os espinhos podem sofrer modificações em sua morfologia e esse processo reflete no rearranjo rápido do citoesqueleto de actina em seu interior, o que pode levar à mudança no tamanho e no número de espinhos (OERTNER; MATUS, 2005; TADA; SHENG, 2006). No entanto, a variação observada entre as médias de comprimento e área entre os grupos estudados também está relacionada com diferentes formas encontradas nos subtipos Cogumelo, Fino, Espesso e Ramificado, pois estão associadas com as variações elétricas e bioquímicas locais, sendo dependentes da demanda de atividade sináptica sobre si (YUSTE, 2011; 2013).

Sabe-se que a imunorreatividade às fibras CART é mais densa na região Shell do Acb em relação ao CPu (HEIMER; VAN HOESEN, 2006), o que corrobora com os achados no presente estudo, na qual a contagem maior de dendritos foi observada no Acb após administração do peptídeo CART.

Embora esperássemos que o peptídeo CART, devido sua ampla funcionalidade no encéfalo e contribuição na plasticidade, pudesse influenciar nas alterações morfológicas dos espinhos dendrítico, e tenhamos observado tais alterações, essas ocorreram principalmente nas medidas morfológicas de espinhos considerados plásticos, como o tipo Espesso. A comparação visual em relação ao tamanho dos subtipos entre os grupos torna-se mais difícil e por este motivo conseguimos uma melhor análise comparativa por meio da média das medidas.

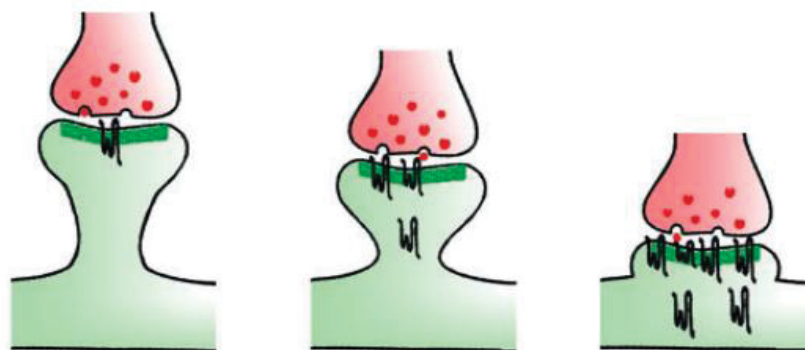
Também existe a suposição de que a morfologia da coluna do espinho pode afetar a carga sináptica (SEGAL, 2010). Acreditava-se que a coluna dos espinhos

dendríticos não era uma barreira para transferência do potencial sináptico para o dendrito de origem. No entanto, evidências sugerem que uma sinapse do eixo produz uma corrente sináptica maior registrada na soma do que uma sinapse da coluna espinho, pois ele é necessário para proteção dos neurônios no controle do influxo de  $Ca^{2+}$  que pode ativar processos apoptóticos levando à morte celular (FISHBEIN; SEGAL, 2007).

Nos experimentos de Pipel & Segal (2004) foram realizadas transfecções de neurônios hipocampais cultivados com Rho GTPase constitutivamente ativa, verificou-se que houve eliminação de espinhos e encolhimento de dendritos, mas as sinapses ainda estavam presentes nos dendritos desses neurônios e produziram sinapses maiores do que os controles, indicando que as sinapses do eixo provavelmente produzem correntes sinápticas maiores do que as sinapses da coluna (SEGAL, 2010). Desta maneira, em outros experimentos indicavam que a coluna do espinho dendrítico pode atuar como uma barreira para a entrega da corrente sináptica da sinapse na cabeça da coluna para o dendrito (ASHBY; MAIER; NISHIMUNE; HENLEY, 2006), o que pode explicar a redução na corrente sináptica com a distância entre a cabeça da coluna do espinho até o eixo, e a observação de que as sinapses nos Filopódios são menos eficazes do que as sinapses da coluna dos Espessos.

Portanto, alguns estudos têm demonstrado que espinhos mais longos possuem uma densidade menor de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA pós-sinápticos, e respondem mantendo uma corrente de entrada menor registrada na soma, enquanto que as maiores e mais rápidas respostas são observadas com sinapses atarracadas “Espessos” ou em eixo, isto é, os espinhos dendríticos possuem formas, composição e distribuição de receptores diferentes mesmo fazendo parte de um mesmo dendrito e tipo de neurônio e que isso está relacionado com plasticidade sináptica (BELL; LEE; RANGAMANI, 2023; KORKOTIAN; SEGAL, 2007)(Figura 18).

FIGURA 17- ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS RELAÇÕES ENTRE TAMANHO DA COLUNA E DENSIDADE DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS



FONTE: (SEGAL, 2010).

Esse processo pode ser comparado com o que ocorreu no experimento com peptídeo CART, por apresentar maior incidência dos subtipos Fino e Espessos com isso gerando respostas mais rápidas ao um estímulo externo, sendo observados nas alterações das medidas morfológicas encontradas nos grupos, portanto, para essa comprovação é necessário realizar um estudo complementar de estimulação dos receptores sejam glutamatérgicos ou dopaminérgicos, como foi realizado com a estimulação de fotólise no estudo citado. Entretanto, o grupo SALINA mostrou um comportamento semelhante ao grupo CART ao verificar a média do comprimento e área dos espinhos, tendo em vista que pode ter relação com efeitos ocasionados pelo estresse e/ou processos inflamatórios, devida a cirurgia que os dois grupos de animais foram submetidos.

Ao passo que, a média do comprimento e da área dos dendritos do grupo CART é significativamente maior em comparação com o grupo Controle Negativo nas regiões estudadas, mas contendo espinhos dendríticos com menores medidas morfológicas, neste caso, as sinapses podem estar mais concentradas no eixo do dendrito com maior corrente sináptica nessas células. Segundo Bell et al. (2023) em neurônios espinhosos médios, as sinapses do eixo têm maior probabilidade de serem prejudiciais ao neurônio central do que nas sinapses da coluna. Desta forma os espinhos mais plásticos como Espesso, podem tanto ter relação com uma transmissão mais rápida do contato sináptico de sua cabeça ao eixo dendrítico como manter sua neuroproteção, pois sua ausência seria prejudicial.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Acreditamos que a técnica de coloração Golgi-Cox cumpriu com seu propósito, permitindo uma análise morfológica dos dendritos e espinhos dendríticos de neurônios estriatais, bem como a quantificação semiautomatizada das medidas morfológicas no *software Image-J Fiji*. Existem algumas limitações da técnica de Golgi-Cox, quanto à espessura do corte, fazendo com que algumas análises dos dendritos fossem isoladas de forma que sua origem fosse desconhecida, e com isso obtendo-se tamanhos de comprimento variados. É inerente à técnica a formação de precipitados nos reagentes que compõem a solução Golgi-Cox mesmo após o processo de filtragem, desta forma, alguns cortes apresentaram nas imagens capturadas com precipitados nos dendritos, sendo um dos motivos de critério de exclusão para análise.

Comparado aos demais trabalhos que utilizaram a técnica Golgi-Cox em microscopia de campo claro, aliado com outras técnicas de revelação e equipamentos, para análise dos espinhos dendríticos, este trabalho utilizou o equipamento scanner de lâminas como uma forma alternativa de utilizar apenas um método preciso para análise morfológica, na qual obtivemos as classificações satisfatórias dos subtipos de espinhos que corresponderam com as classificações obtidas em diferentes métodos de aquisição de imagens e reconstrução 3D. Entretanto, devido à indisponibilidade do equipamento, e para completar o número amostral de dendritos e espinhos dendríticos, foi necessária a utilização do microscópio Olympus BX51 para aquisição das imagens, que também apresentou qualidade e nitidez das estruturas dos neurônios.

Para adquirir medidas morfológicas, utilizou-se um *software* gratuito e de fácil acesso, todavia, considerando que a análise foi realizada em imagens capturadas em diferentes equipamentos, e para obter as medidas de forma precisa, realizaram-se as devidas calibrações de escala. Embora o processo seja semiautomatizado, as medições foram feitas de forma manual, pois devido a variações dos subtipos de espinhos, existe a limitação de padronização de medidas e que são de difícil acesso em outros *softwares* de medição automatizada, o mesmo se aplica aos neurônios espinhosos médios.

As técnicas de medição de dendritos dependem de uma programação manual, como no caso citado, ou de programas comerciais, além disso, a parte mais

crítica para reconstrução digital é: pré-processamento da imagem do microscópio que precisa do alinhamento de várias imagens que depende do microscópio usado, segmentação da soma, segmentação de estruturas ramificadas e são potencialmente caros, portanto, a desvantagem deste tipo de método é o erro de precisão em estruturas complexas, como no caso dos neurônios espinhosos médio.

Por este motivo o presente trabalho abordou uma ferramenta mais simples de domínio público para quantificação, usando o *Image-J Fiji*, com possibilidade de desenvolver seus próprios plugins e macros baseado em Java, e como uma alternativa menos dispendiosa para computadores. Esta técnica foi validada em alguns trabalhos realizados por Grider, M.H. et al. (2006), que se mostrou eficiente com relação à automatização para quantificação de dendritos e axônios.

De acordo com as análises de medidas morfológicas dos subtipos de espinhos, mas principalmente no Espesso, sugere a contribuição do peptídeo CART no aumento da transmissão da corrente elétrica concentrada no eixo dendrítico, sobretudo, as medidas de área e comprimento demonstraram ser menores nesse subtipo comparado ao grupo Controle Negativo, assim como em outros subtipos. Com base nesses dados existe uma possível relação do CART com a neuroplasticidade, visto que o tamanho e o tipo da coluna são determinantes importantes da força sináptica (CHEN; SABATINI, 2012; FOX; FIGUEIREDO; MENKEN; LOBO, 2020).

Como observado nos estudos de Fox, M.E (2020) que espinhos Espessos não possuem uma coluna/pescoço definida e estão mais firmemente acoplados ao seu dendrito parental/de origem. Desta forma, uma mudança no número de espinhos desse subtipo pode exercer uma influência proporcionalmente maior na fisiologia neuronal, porém também foi observado um aumento na quantidade do mesmo subtipo nos grupos SALINA e Controle Negativo, acredita-se que mesmo antes de estímulos endógenos ou exógenos, espinhos tanto do subtipo Fino e Espesso podem estar em maior proporção.

Logicamente, para a comprovação da relação entre peptídeo CART e neuroplasticidade ainda faz-se necessários outros ensaios para corroborar com as observações do presente estudo, e que possam esclarecer um provável papel do neuropeptídeo CART no brotamento e modificações estruturais de espinhos dendríticos em neurônios situados em áreas cerebrais de imunorreatividade ao CART.

Entre essas sugestões, pode-se avaliar a densidade da coluna de espinhos dendríticos, neste caso, os subtipos Espessos, pois ainda não está claro quanto à plasticidade da coluna de espinhos dendríticos e de dendritos nos neurônios espinhosos médios. Portanto, as medidas fornecidas de comprimento e área compreendem a estrutura completa do espinho dendrítico, incluindo cabeça e coluna, sabe-se que por meio dessas medidas verifica-se que existem entradas sinápticas e morfologias neuronais alteradas que também são impulsionadas pela expressão genética modificada, como por exemplo, a remodelação de citoesqueleto, mas que os mecanismos para o aumento da formação de espinhos em neurônios espinhosos médios permanecem desconhecidos. Deste modo, os parâmetros analisados no presente estudo, podem demonstrar a distribuição de receptores na membrana pós-sináptica, motilidade, estabilidade dos espinhos e a difusão de íons e moléculas entre espinho e ramo dendrítico (YUSTE, 2011). Pois, a variação morfológica dos espinhos pode estar relacionada com a atividade sináptica processada por este espinho (ALVAREZ; SABATINI, 2007).

Para avaliar mudanças na morfologia da densidade da coluna, poderia utilizar a técnica de marcação viral como mostrado no trabalho de Fox M.E (2020), para caracterizar a morfologia da coluna dendrítica, especificamente de neurônios dopaminérgicos, neste caso, que expressam receptores do tipo D1 e D3 (receptor relacionado com a regulação do mRNA de CART) após administração do peptídeo CART, visto que esse neuropeptídeo tem ação em diferentes receptores, deste modo poderemos observar se o efeito do peptídeo causará um aumento da densidade da coluna, pois tem correlação com comportamento e plasticidade estrutural, podendo ser visualizado em imunofluorescência com imagem 3D para comparação das densidades de colunas entre os subtipos de espinhos.

Portanto, este estudo tem por finalidade contribuir fornecendo dados de aspectos morfoquantitativos para demonstrar possível envolvimento do peptídeo CART em processos de neuroplasticidade.

## 8. CONCLUSÃO

- O subtipo de espinho dendrítico Espesso foi encontrado em maior incidência nos três grupos analisados, principalmente no grupo que recebeu peptídeo CART, em ambas as regiões estudadas;
- Tanto no Acb quanto no CPu os subtipos de espinhos dendríticos encontrados nos neurônios estriatais do grupo CART e SALINA, apresentaram médias de comprimento e área significativamente menor em relação ao grupo Controle Negativo, podendo essa semelhança entre os grupos está relacionado com os efeitos ocasionados pelo estresse e/ou processos inflamatórios, visto que os animais de ambos grupos passaram por procedimento cirúrgico;
- Medidas de comprimento e área dos dendritos no grupo CART são significativamente maiores em comparação com o grupo Controle Negativo, podendo está relacionado com as variações de tamanho encontrados em diferentes neurônios analisados;
- As alterações morfológicas encontradas no subtipo Espesso do grupo CART em comparação ao grupo Controle Negativo, sugerem o envolvimento do peptídeo CART em conjunto com os demais neurotransmissores e neuropeptídeos no processo de transmissão sináptica de forma mais rápida e concentrada no eixo dendrítico de neurônios estriatais nas regiões estudadas, indicando sua participação na neuroplasticidade.

## REFERÊNCIAS

AHMADIAN-MOGHADAM, H.; SADAT-SHIRAZI, M. S.; ZARRINDAST, M. R. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART): A multifaceted neuropeptide. **Peptides**, 110, p. 56-77, Dec 2018.

ALBERTSON, D. N.; PRUETZ, B.; SCHMIDT, C. J.; KUHN, D. M. *et al.* Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: evidence for dysregulation of myelin. **J Neurochem**, 88, n. 5, p. 1211-1219, Mar 2004.

ALVAREZ, V. A.; SABATINI, B. L. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. **Annu Rev Neurosci**, 30, p. 79-97, 2007.

ANDERSON, S. M.; PIERCE, R. C. Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement. **Pharmacol Ther**, 106, n. 3, p. 389-403, Jun 2005.

ARELLANO, J. I.; ESPINOSA, A.; FAIRÉN, A.; YUSTE, R. *et al.* Non-synaptic dendritic spines in neocortex. **Neuroscience**, 145, n. 2, p. 464-469, Mar 16 2007.

ASHBY, M. C.; MAIER, S. R.; NISHIMUNE, A.; HENLEY, J. M. Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. **J Neurosci**, 26, n. 26, p. 7046-7055, Jun 28 2006.

AWATHALE, S. N.; CHOUDHARY, A. G.; SUBHEDAR, N. K.; KOKARE, D. M. Neuropeptide CART modulates dopamine turnover in the nucleus accumbens: Insights into the anatomy of rewarding circuits. **J Neurochem**, 158, n. 5, p. 1172-1185, 09 2021.

BAYASSI-JAKOWICKA, M.; LIETZAU, G.; CZUBA, E.; PATRONE, C. *et al.* More than Addiction-The Nucleus Accumbens Contribution to Development of Mental Disorders and Neurodegenerative Diseases. **Int J Mol Sci**, 23, n. 5, Feb 27 2022.

BEAR, M. F. Bidirectional synaptic plasticity: from theory to reality. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 358, n. 1432, p. 649-655, Apr 2003.

BEAUDRY, G.; ZEKKI, H.; ROUILLARD, C.; LÉVESQUE, D. Clozapine and dopamine D3 receptor antisense reduce cocaine- and amphetamine-regulated transcript expression in the rat nucleus accumbens shell. **Synapse**, 51, n. 4, p. 233-240, Mar 2004.

BELL, M. K.; LEE, C. T.; RANGAMANI, P. Spatiotemporal modelling reveals geometric dependence of AMPAR dynamics on dendritic spine morphology. **J Physiol**, 601, n. 15, p. 3329-3350, Aug 2023.

BOURNE, J.; HARRIS, K. M. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? **Curr Opin Neurobiol**, 17, n. 3, p. 381-386, Jun 2007.

BRADSHAW, R. A.; ALTIN, J. G.; BLABER, M.; CAVANAUGH, K. P. *et al.* Neurotrophic factors in the CNS: biosynthetic processing and functional responses. **Prog Brain Res**, 86, p. 157-167, 1990.

BRAUER, K.; HÄUSSER, M.; HÄRTIG, W.; ARENDT, T. The core-shell dichotomy of nucleus accumbens in the rhesus monkey as revealed by double-immunofluorescence and morphology of cholinergic interneurons. **Brain Res**, 858, n. 1, p. 151-162, Mar 2000.

BRAUN, K. The prefrontal-limbic system: development, neuroanatomy, function, and implications for socioemotional development. **Clin Perinatol**, 38, n. 4, p. 685-702, Dec 2011.

BRUSCO, J.; DALL'OGGIO, A.; ROCHA, L. B.; ROSSI, M. A. *et al.* Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial amygdala. **Neurosci Lett**, 483, n. 2, p. 152-156, Oct 11 2010.

COLANGELO, A. M.; ALBERGHINA, L.; PAPA, M. Astrogliosis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. **Neurosci Lett**, 565, p. 59-64, Apr 17 2014.

CHANG, F. L.; GREENOUGH, W. T. Lateralized effects of monocular training on dendritic branching in adult split-brain rats. **Brain Res**, 232, n. 2, p. 283-292, Jan 1982.

CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. **Nat Rev Neurosci**, 4, n. 4, p. 299-309, Apr 2003.

CHEN, J. H.; KELLNER, Y.; ZAGREBELSKY, M.; GRUNWALD, M. *et al.* Two-Photon Correlation Spectroscopy in Single Dendritic Spines Reveals Fast Actin Filament Reorganization during Activity-Dependent Growth. **PLoS One**, 10, n. 5, p. e0128241, 2015.

CHEN, Y.; SABATINI, B. L. Signaling in dendritic spines and spine microdomains. **Curr Opin Neurobiol**, 22, n. 3, p. 389-396, Jun 2012.

CHRISTOFFEL, D. J.; GOLDEN, S. A.; DUMITRIU, D.; ROBISON, A. J. *et al.* I $\kappa$ B kinase regulates social defeat stress-induced synaptic and behavioral plasticity. **J Neurosci**, 31, n. 1, p. 314-321, Jan 05 2011.

CHUHMA, N.; OH, S. J.; RAYPORT, S. The dopamine neuron synaptic map in the striatum. **Cell Rep**, 42, n. 3, p. 112204, Mar 28 2023.

DALL'OGGIO, A.; DUTRA, A. C.; MOREIRA, J. E.; RASIA-FILHO, A. A. The human medial amygdala: structure, diversity, and complexity of dendritic spines. **J Anat**, 227, n. 4, p. 440-459, Oct 2015.

DALL'OGGIO, A.; GEHLEN, G.; ACHAVAL, M.; RASIA-FILHO, A. A. Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: further data based on the Golgi method. **Neurosci Lett**, 430, n. 2, p. 151-156, Jan 2008.

DALLVECHIA-ADAMS, S.; SMITH, Y.; KUHAR, M. J. CART peptide-immunoreactive projection from the nucleus accumbens targets substantia nigra pars reticulata neurons in the rat. **J Comp Neurol**, 434, n. 1, p. 29-39, May 2001.

DEL GIUDICE, E. M.; SANTORO, N.; CIRILLO, G.; D'URSO, L. *et al.* Mutational screening of the CART gene in obese children: identifying a mutation (Leu34Phe) associated with reduced resting energy expenditure and cosegregating with obesity phenotype in a large family. **Diabetes**, 50, n. 9, p. 2157-2160, Sep 2001.

DOMINGUEZ, G.; KUHAR, M. J. Transcriptional regulation of the CART promoter in CATH.a cells. **Brain Res Mol Brain Res**, 126, n. 1, p. 22-29, Jul 05 2004.

DOUGLASS, J.; MCKINZIE, A. A.; COUCEYRO, P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. **J Neurosci**, 15, n. 3 Pt 2, p. 2471-2481, Mar 1995.

DUAN, J.; CHOI, Y. H.; HARTZELL, D.; DELLA-FERA, M. A. *et al.* Effects of subcutaneous leptin injections on hypothalamic gene profiles in lean and ob/ob mice. **Obesity (Silver Spring)**, 15, n. 11, p. 2624-2633, Nov 2007.

DUN, S. L.; CHIANCA, D. A.; DUN, N. J.; YANG, J. *et al.* Differential expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactivity in the rat spinal preganglionic nuclei. **Neurosci Lett**, 294, n. 3, p. 143-146, Nov 2000.

ELIAS, C. F.; LEE, C. E.; KELLY, J. F.; AHIMA, R. S. *et al.* Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. **J Comp Neurol**, 432, n. 1, p. 1-19, Mar 2001.

FERNÁNDEZ-ESPEJO, E. [How does the nucleus accumbens function?]. **Rev Neurol**, 30, n. 9, p. 845-849, 2000 May 1-15 2000.

FIALA, J. C.; SPACEK, J.; HARRIS, K. M. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? **Brain Res Brain Res Rev**, 39, n. 1, p. 29-54, Jun 2002.

FISHBEIN, I.; SEGAL, M. Miniature synaptic currents become neurotoxic to chronically silenced neurons. **Cereb Cortex**, 17, n. 6, p. 1292-1306, Jun 2007.

FONT, M. A.; ARBOIX, A.; KRUPINSKI, J. Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke. **Curr Cardiol Rev**, 6, n. 3, p. 238-244, Aug 2010.

FOX, M. E.; FIGUEIREDO, A.; MENKEN, M. S.; LOBO, M. K. Dendritic spine density is increased on nucleus accumbens D2 neurons after chronic social defeat. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 12393, Jul 24 2020.

FU, Q.; ZHOU, X.; DONG, Y.; HUANG, Y. *et al.* Decreased Caffeine-Induced Locomotor Activity via Microinjection of CART Peptide into the Nucleus Accumbens Is Linked to Inhibition of the pCaMKIIa-D3R Interaction. **PLoS One**, 11, n. 7, p. e0159104, 2016.

GARCÍA-LÓPEZ, P.; GARCÍA-MARÍN, V.; FREIRE, M. The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. **Prog Neurobiol**, 83, n. 2, p. 110-130, Oct 2007.

GARCÍA-LÓPEZ, P.; GARCÍA-MARÍN, V.; FREIRE, M. Dendritic spines and development: towards a unifying model of spinogenesis--a present day review of Cajal's histological slides and drawings. **Neural Plast**, 2010, p. 769207, 2010.

GRIDER, M. H.; CHEN, Q.; SHINE, H. D. Semi-automated quantification of axonal densities in labeled CNS tissue. *J Neurosci Methods*, 155, n. 2, p. 172-179, Sep 15 2006.

GRUTZENDLER, J.; KASTHURI, N.; GAN, W. B. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. **Nature**, 420, n. 6917, p. 812-816, 2002 Dec 19-26 2002.

GAUTVIK, K. M.; DE LECEA, L.; GAUTVIK, V. T.; DANIELSON, P. E. *et al.* Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93, n. 16, p. 8733-8738, Aug 06 1996.

GIBB, R.; KOLB, B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. **J Neurosci Methods**, 79, n. 1, p. 1-4, Jan 1998.

GOLGI, C. On the structure of nerve cells. 1898. *J Microsc*, 155, n. Pt 1, p. 3-7, Jul 1989.

GULLEDGE, A. T.; CARNEVALE, N. T.; STUART, G. J. Electrical advantages of dendritic spines. **PLoS One**, 7, n. 4, p. e36007, 2012.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Guyton and Hall textbook of medical physiology**. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2011. 9781416045748.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Guyton & Hall physiology review**. Fourth edition. ed. Amsterdam: Elsevier, 2021. 258 pages : illustrations (colour) p. (Guyton physiology. 9780323639996 (pbk.).

HEAL, D. J.; GOSDEN, J.; SMITH, S. L. Dopamine reuptake transporter (DAT) "inverse agonism"--a novel hypothesis to explain the enigmatic pharmacology of cocaine. **Neuropharmacology**, 87, p. 19-40, Dec 2014.

HEIMER, L. A new anatomical framework for neuropsychiatric disorders and drug abuse. **Am J Psychiatry**, 160, n. 10, p. 1726-1739, Oct 2003.

HEIMER, L.; VAN HOESEN, G. W. The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. **Neurosci Biobehav Rev**, 30, n. 2, p. 126-147, 2006.

HLUSHCHENKO, I.; KOSKINEN, M.; HOTULAINEN, P. Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity. **Cytoskeleton (Hoboken)**, 73, n. 9, p. 435-441, Sep 2016.

HÖGLINGER, G. U.; RIZK, P.; MURIEL, M. P.; DUYCKAERTS, C. et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. **Nat Neurosci**, 7, n. 7, p. 726-735, Jul 2004.

HOLTMAAT, A.; SVOBODA, K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. **Nat Rev Neurosci**, 10, n. 9, p. 647-658, Sep 2009.

HÖKFELT, T.; BARTFAI, T.; BLOOM, F. Neuropeptides: opportunities for drug discovery. **Lancet Neurol**, 2, n. 8, p. 463-472, Aug 2003.

HUBERT, G. W.; JONES, D. C.; MOFFETT, M. C.; ROGGE, G. *et al.* CART peptides as modulators of dopamine and psychostimulants and interactions with the mesolimbic dopaminergic system. **Biochem Pharmacol**, 75, n. 1, p. 57-62, Jan 01 2008.

HUBERT, G. W.; KUHAR, M. J. Colocalization of CART peptide with prodynorphin and dopamine D1 receptors in the rat nucleus accumbens. **Neuropeptides**, 40, n. 6, p. 409-415, Dec 2006.

JANZSÓ, G.; VALCZ, G.; THUMA, A.; SZOKE, B. *et al.* Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide-immunopositive neuronal elements in the lateral septum: rostrocaudal distribution in the male rat. **Brain Res**, 1362, p. 40-47, Nov 2010.

JAWORSKI, J. N.; HANSEN, S. T.; KUHAR, M. J.; MARK, G. P. Injection of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide into the nucleus accumbens reduces cocaine self-administration in rats. **Behav Brain Res**, 191, n. 2, p. 266-271, Aug 2008.

JAWORSKI, J. N.; KOZEL, M. A.; PHILPOT, K. B.; KUHAR, M. J. Intra-accumbal injection of CART (cocaine-amphetamine regulated transcript) peptide reduces cocaine-induced locomotor activity. **J Pharmacol Exp Ther**, 307, n. 3, p. 1038-1044, Dec 2003.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H. **Principles of neural science**. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier. 2012

KETTENMANN, H.; KIRCHHOFF, F.; VERKHRATSKY, A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. **Neuron**, 77, n. 1, p. 10-18, Jan 09 2013.

KIM, J. H.; CREEKMORE, E.; VEZINA, P. Microinjection of CART peptide 55-102 into the nucleus accumbens blocks amphetamine-induced locomotion. **Neuropeptides**, 37, n. 6, p. 369-373, Dec 2003.

KOLB, B.; FORGIE, M.; GIBB, R.; GORNY, G. *et al.* Age, experience and the changing brain. **Neurosci Biobehav Rev**, 22, n. 2, p. 143-159, Mar 1998.

KOLB, B.; GORNY, G.; LI, Y.; SAMAHA, A. N. *et al.* Amphetamine or cocaine limits the ability of later experience to promote structural plasticity in the neocortex and nucleus accumbens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 18, p. 10523-10528, Sep 2003.

KORKOTIAN, E.; SEGAL, M. Morphological constraints on calcium dependent glutamate receptor trafficking into individual dendritic spine. **Cell Calcium**, 42, n. 1, p. 41-57, Jul 2007.

KOYLU, E. O.; COUCEYRO, P. R.; LAMBERT, P. D.; KUHAR, M. J. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. **J Comp Neurol**, 391, n. 1, p. 115-132, Feb 1998.

KOZSUREK, M.; KIRÁLY, K.; GYIMESI, K.; LUKÁCSI, E. *et al.* Unique, Specific CART Receptor-Independent Regulatory Mechanism of CART(55-102) Peptide in Spinal Nociceptive Transmission and Its Relation to Dipeptidyl-Peptidase 4 (DDP4). **Int J Mol Sci**, 24, n. 2, Jan 04 2023.

KRISTENSEN, P.; JUDGE, M. E.; THIM, L.; RIBEL, U. *et al.* Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. **Nature**, 393, n. 6680, p. 72-76, May 1998.

KUHAR, M. J.; JAWORSKI, J. N.; HUBERT, G. W.; PHILPOT, K. B. *et al.* Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides play a role in drug abuse and are potential therapeutic targets. **AAPS J**, 7, n. 1, p. E259-265, Sep 02 2005.

LAU, J.; HERZOG, H. CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. **Front Neurosci**, 8, p. 313, 2014.

LAZAROV, O.; MARR, R. A. Of mice and men: neurogenesis, cognition and Alzheimer's disease. **Front Aging Neurosci**, 5, p. 43, 2013.

LENNINGTON, J. B.; POPE, S.; GOODHEART, A. E.; DROZDOWICZ, L. et al. Midbrain dopamine neurons associated with reward processing innervate the neurogenic subventricular zone. **J Neurosci**, 31, n. 37, p. 13078-13087, Sep 14 2011.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. Rio de Janeiro: **Atheneu**, 2001.

LIU, H. S.; SHEN, H.; LUO, Y.; HOFFER, B. J. et al. Post-treatment with cocaine- and amphetamine-regulated transcript enhances infarct resolution, reinnervation, and angiogenesis in stroke rats - an MRI study. **NMR Biomed**, 29, n. 3, p. 361-370, Mar 2016.

LUO, Y.; SHEN, H.; LIU, H. S.; YU, S. J. et al. CART peptide induces neuroregeneration in stroke rats. **J Cereb Blood Flow Metab**, 33, n. 2, p. 300-310, Feb 2013.

MAJEWSKA, A.; TASHIRO, A.; YUSTE, R. Regulation of spine calcium dynamics by rapid spine motility. **J Neurosci**, 20, n. 22, p. 8262-8268, Nov 15 2000.

MAO, P. Potential Antidepressant Role of Neurotransmitter CART: Implications for Mental Disorders. **Depress Res Treat**, 2011, p. 762139, 2011.

MATHUR, B. N.; LOVINGER, D. M. Endocannabinoid-dopamine interactions in striatal synaptic plasticity. **Front Pharmacol**, 3, p. 66, 2012.

MATZ, O. C.; SPOCTER, M. The Effect of Huntington's Disease on the Basal Nuclei: A Review. **Cureus**, 14, n. 4, p. e24473, Apr 2022.

MARCUZZO, S. Estudo sobre a densidade de espinhos dendríticos de neurônios da amígdala medial pósterio-dorsal de ratos em diferentes condições experimentais. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 35. 2006.

MENG, Q.; KIM, H. C.; OH, S.; LEE, Y. M. *et al.* Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript (CART) Peptide Plays Critical Role in Psychostimulant-Induced Depression. **Biomol Ther (Seoul)**, 26, n. 5, p. 425-431, Sep 01 2018.

MEIJERING, E. Neuron tracing in perspective. **Cytometry A**, 77, n. 7, p. 693-704, Jul 2010.

MERIGHI, A.; SALIO, C.; FERRINI, F.; LOSSI, L. Neuromodulatory function of neuropeptides in the normal CNS. **J Chem Neuroanat**, 42, n. 4, p. 276-287, Dec 2011.

MERKLE, F. T.; FUENTEALBA, L. C.; SANDERS, T. A.; MAGNO, L. *et al.* Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. **Nat Neurosci**, 17, n. 2, p. 207-214, Feb 2014.

METZGER, M.; TOLEDO, C.; BRAUN, K. Serotonergic innervation of the telencephalon in the domestic chick. **Brain Res Bull**, 57, n. 3-4, p. 547-551, 2002 Feb-Mar 1 2002.

MINK, J.W.; ZIGMOND, M.J. *et al.* Basal Ganglia: Fundamental neuroscience. San Diego: **Academic Press**, 1999. p. 951 - 971.

MURPHY, K. G. Dissecting the role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the control of appetite. **Brief Funct Genomic Proteomic**, 4, n. 2, p. 95-111, Jul 2005.

NARAYANAN, S. N.; BAIRY, L. K.; SRINIVASAMURTHY, S. K. Determining factors for optimal neuronal and glial Golgi-Cox staining. **Histochem Cell Biol**, 154, n. 4, p. 431-448, Oct 2020.

NIE, X.; SUN, Y.; WAN, S.; ZHAO, H. *et al.* Subregional Structural Alterations in Hippocampus and Nucleus Accumbens Correlate with the Clinical Impairment in Patients with Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Parallel Combining Volume and Vertex-Based Approach. **Front Neurol**, 8, p. 399, 2017.

NISHIYAMA, J. Plasticity of dendritic spines: Molecular function and dysfunction in neurodevelopmental disorders. **Psychiatry Clin Neurosci**, 73, n. 9, p. 541-550, Sep 2019.

OERTNER, T. G.; MATUS, A. Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. **Cell Calcium**, 37, n. 5, p. 477-482, May 2005.

PALMER, L. M.; STUART, G. J. Membrane potential changes in dendritic spines during action potentials and synaptic input. **J Neurosci**, 29, n. 21, p. 6897-6903, May 27 2009.

PALLOTTO, M.; DEPREZ, F. Regulation of adult neurogenesis by GABAergic transmission: signaling beyond GABAA-receptors. **Front Cell Neurosci**, 8, p. 166, 2014.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates**. Fifth edition. ed. London: Academic Press, an imprint of Elsevier, 2019. 1 volume (unpaged) p., still image. 0128161574 9780128161579.

PHILPOT, K.; SMITH, Y. CART peptide and the mesolimbic dopamine system. **Peptides**, 27, n. 8, p. 1987-1992, Aug 2006.

PIA, H. W. Plasticity of the central nervous system--a neurosurgeon's experience of cerebral compensation and decompensation. **Acta Neurochir (Wien)**, 77, n. 3-4, p. 81-102, 1985.

PICKEL, V.; SEGAL, M. **The synapse : structure and function**. First edition. ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press, 2014. xiv, 513 pages p. (Neuroscience-Net Reference Book Series. 9780124186750.

PILPEL, Y.; SEGAL, M. Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. **Eur J Neurosci**, 19, n. 12, p. 3151-3164, Jun 2004.

POPUGAEVA, E.; BEZPROZVANNY, I. Can the calcium hypothesis explain synaptic loss in Alzheimer's disease? **Neurodegener Dis**, 13, n. 2-3, p. 139-141, 2014.

RAINETEAU, O.; SCHWAB, M. E. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. **Nat Rev Neurosci**, 2, n. 4, p. 263-273, Apr 2001.

RALL. Core conductor theory and cable properties of neurons. **Comprehensive physiology**, 2011.

ROBINSON, T. E.; GORNY, G.; MITTON, E.; KOLB, B. Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. **Synapse**, 39, n. 3, p. 257-266, Mar 2001.

ROBINSON, T. E.; KOLB, B. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. **Eur J Neurosci**, 11, n. 5, p. 1598-1604, May 1999.

RODRIGUES, B. C.; CAVALCANTE, J. C.; ELIAS, C. F. Expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat forebrain during postnatal development. **Neuroscience**, 195, p. 201-214, Nov 2011.

ROGGE, G.; JONES, D.; HUBERT, G. W.; LIN, Y. *et al.* CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. **Nat Rev Neurosci**, 9, n. 10, p. 747-758, Oct 2008.

ROH, M. S.; CUI, F. J.; AHN, Y. M.; KANG, U. G. Up-regulation of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the rat nucleus accumbens after repeated electroconvulsive shock. **Neurosci Res**, 65, n. 2, p. 210-213, Oct 2009.

SARKAR, S.; WITTMANN, G.; FEKETE, C.; LECHAN, R. M. Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript increases phosphorylation of cAMP response element binding protein in corticotropin-releasing hormone-producing neurons but not in prothyrotropin-releasing hormone-producing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Brain Res**, 999, n. 2, p. 181-192, Mar 2004.

SCHIFFMANN, S. N.; FISONE, G.; MORESCO, R.; CUNHA, R. A. *et al.* Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. **Prog Neurobiol**, 83, n. 5, p. 277-292, Dec 2007.

SCHULLER, J.; KOCH, M. Blockade of the orexin 1-receptors and 'cocaine- and amphetamine-regulated transcript' in the nucleus accumbens shell alters impulse control in rats. **Behav Brain Res**, 440, p. 114268, Feb 25 2023.

SEGAL, M. Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. **Eur J Neurosci**, 31, n. 12, p. 2178-2184, Jun 2010.

SINGH, A.; DE ARAUJO, A. M.; KRIEGER, J. P.; VERGARA, M. *et al.* Demystifying functional role of cocaine- and amphetamine-related transcript (CART) peptide in control of energy homeostasis: A twenty-five year expedition. **Peptides**, 140, p. 170534, Jun 2021.

SNYDER, J. S.; SOUMIER, A.; BREWER, M.; PICKEL, J. *et al.* Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. **Nature**, 476, n. 7361, p. 458-461, Aug 2011.

SPACEK, J.; HARRIS, K. M. Trans-endocytosis via spinules in adult rat hippocampus. **J Neurosci**, 24, n. 17, p. 4233-4241, Apr 28 2004.

SPIESS, J.; VILLARREAL, J.; VALE, W. Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus. **Biochemistry**, 20, n. 7, p. 1982-1988, Mar 31 1981.

STEIN, J.; STEINER, D. F.; DEY, A. Processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) precursor proteins by prohormone convertases (PCs) and its implications. **Peptides**, 27, n. 8, p. 1919-1925, Aug 2006.

STURM, V.; LENARTZ, D.; KOULOUSAKIS, A.; TREUER, H. *et al.* The nucleus accumbens: a target for deep brain stimulation in obsessive-compulsive- and anxiety-disorders. **J Chem Neuroanat**, 26, n. 4, p. 293-299, Dec 2003.

SUBHEDAR, N. K.; NAKHATE, K. T.; UPADHYA, M. A.; KOKARE, D. M. CART in the brain of vertebrates: circuits, functions and evolution. **Peptides**, 54, p. 108-130, Apr 2014.

TADA, T.; SHENG, M. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. **Curr Opin Neurobiol**, 16, n. 1, p. 95-101, Feb 2006.

TAO-CHENG, J. H.; DOSEMECI, A.; GALLANT, P. E.; MILLER, S. *et al.* Rapid turnover of spinules at synaptic terminals. **Neuroscience**, 160, n. 1, p. 42-50, Apr 21 2009.

THIM, L.; KRISTENSEN, P.; NIELSEN, P. F.; WULFF, B. S. *et al.* Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96, n. 6, p. 2722-2727, Mar 1999.

TØNNESEN, J.; KATONA, G.; RÓZSA, B.; NÄGERL, U. V. Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. **Nat Neurosci**, 17, n. 5, p. 678-685, May 2014.

VERKHRATSKY, A.; RODRÍGUEZ, J. J.; PARPURA, V. Astroglia in neurological diseases. **Future Neurol**, 8, n. 2, p. 149-158, Mar 01 2013.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WANG, G. J.; BALER, R. *et al.* Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. **Neuropharmacology**, 56 Suppl 1, p. 3-8, 2009.

WEITZ, T. M.; TOWN, T. Microglia in Alzheimer's Disease: It's All About Context. **Int J Alzheimers Dis**, 2012, p. 314185, 2012.

YERMOLAIEVA, O.; CHEN, J.; COUCEYRO, P. R.; HOSHI, T. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide modulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> signaling in hippocampal neurons. **J Neurosci**, 21, n. 19, p. 7474-7480, Oct 2001.

YUSTE, R. Dendritic spines and distributed circuits. **Neuron**, 71, n. 5, p. 772-781, Sep 08 2011.

YUSTE, R. Electrical compartmentalization in dendritic spines. **Annu Rev Neurosci**, 36, p. 429-449, Jul 08 2013.

ZAQOUT, S.; KAINDL, A. M. Golgi-Cox Staining Step by Step. **Front Neuroanat**, 10, p. 38, 2016.

ZARUGNER, R. Z. A distribuição da inervação imunorreativa ao peptídeo cart na zona ventricular-subventricular. **DSPACE 2020**.

ZHANG, X.; LI, L.; QI, L.; FU, Y. *et al.* Distribution pattern of iron deposition in the basal ganglia of different motor subtypes of Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, p. 137249, Apr 13 2023.