



CRISTIANE MENEGHELLI

**DISTRIBUIÇÃO DE NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS À TRIPTOFANO HIDROXILASE NO
TRONCO ENCEFÁLICO E DIENCÉFALO DE POMBOS (*Columba livia*) E SUA CO-
LOCALIZAÇÃO COM SEROTONINA.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FLORIANÓPOLIS (SC)

10/02/2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
LABORATÓRIO DE NEUROFISIOLOGIA COMPARADA**

**DISTRIBUIÇÃO DE NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS À TRIPTOFANO HIDROXILASE NO
TRONCO ENCEFÁLICO E DIENCÉFALO DE POMBOS (*Columba livia*) E SUA CO-
LOCALIZAÇÃO COM SEROTONINA.**

CRISTIANE MENEGHELLI

ORIENTADOR: Dr. JOSÉ MARINO NETO

CO-ORIENTADORA: Dra. CILENE LINO-DE-OLIVEIRA

Dissertação apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre.

FLORIANÓPOLIS (SC)

10/02/2009

AGRADECIMENTOS

- ✓ Aos Professores orientadores: José Marino Neto e Cilene Lino-de-Oliveira.

- ✓ Aos Professores Doutores Jackson Cioni Bittencourt e Mariana Graciela Terenzi pelas considerações feitas ao trabalho.

- ✓ Aos técnicos: Ana Cláudia Januário e Péricles Arruda Mitozo.

- ✓ Ao secretário da Pós-Graduação em Neurociências Nivaldo Manoel Vicente.

- ✓ Às estudantes de iniciação científica: Nelisa Helena Rocha e Vanessa Mengatto.

- ✓ Aos colegas do laboratório: Alexandre Ademar Hoeller, Tiago Souza Santos e Carlos Crispim Jr.

- ✓ Aos funcionários do Instituto de Engenharia Biomédica – IEB/UFSC.

- ✓ Aos Drs. Cláudia Pinto Figueiredo e Mario Steindel pelo auxílio com a microscopia de fluorescência.

- ✓ À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	03
Figura 2.....	16
Figura 3.....	18
Figura 4.....	20
Figura 5.....	21
Figura 6.....	22
Figura 7.....	23
Figura 8.....	24
Figura 9.....	25
Figura 10.....	27
Figura 11.....	28
Figura 12.....	29
Figura 13.....	30
Figura 14.....	32
Figura 15.....	33
Figura 16.....	34
Figura 17.....	35
Figura 18.....	36
Figura 19.....	37
Figura 20.....	39
Figura 21.....	41
Figura 22.....	42
Figura 23.....	43
Figura 24.....	44

ABREVIATURAS

3V: terceiro ventrículo	PTn: núcleo pré-tectal
4V: quarto ventrículo	PVN: núcleo paraventricular magnocelular
A8: grupo celular dopaminérgico	PVO: órgão paraventricular
AnI: núcleo annularis	Rel: recesso infundibular
AP: área postrema	RL: núcleo reticular lateral
DMA: núcleo dorsomedial anterior talâmico	Rmd: núcleo bulbar da rafe, pars dorsal
DMN: núcleo dorsomedial hipotalâmico	Rmv: núcleo bulbar da rafe, pars ventral
flm: fascículo longitudinal medial	Rpd: núcleo pontino da rafe, pars dorsal
ICV: intracerebroventricular	RPO: núcleo reticularis pontis oralis
INF: núcleo infundibular	Rpv: núcleo pontino da rafe, pars ventral
LC: núcleo linearis caudalis	SC: subceruleus
IDp: subnúcleo lateralis dorsalis, pars posterior	SCd: núcleo subceruleus dorsal
LoC: locus coeruleus	SCI: estrato celular interno
MPv: núcleo mesencefálico profundo, pars ventral	TC: taenia choroidea
mSp: subnúcleo medialis superficialis, pars posterior	TPc: núcleo tegmental pedúnculo pontino
nBOR: núcleo da raiz óptica basal	VT: núcleo tegmental ventrolateral
NTS: núcleo do trato solitário	VTA: área tegmental ventral
PMM: núcleo pré-mamilar	Zp-flm: zona peri-fascículo longitudinal medial

A distribuição de pericários e processos neuronais contendo triptofano hidroxilase (TPH) no tronco encefálico e diencefalo do pombo (*Columba livia*) foram investigados usando métodos imuno-histoquímicos de marcação cromogênica simples e de dupla marcação fluorescente para TPH e 5-HT. Pericários imunorreativos à TPH foram vistos estendendo-se do bulbo caudal até níveis hipotalâmicos mediais, localizados em regiões previamente descritas como contendo pericários imunorreativos à 5-HT. Os agrupamentos celulares imunorreativos à TPH do tronco encefálico (linha média da rafe e grupos celulares dorsolaterais e ventrolaterais) e neurônios circumventriculares contactando o fluido cérebro-espinhal na taenia choroidea (no tronco encefálico caudal), núcleo infundibular e órgão paraventricular (no hipotálamo) foram mostrados co-expressar imunorreatividade para 5-HT. Entretanto, agrupamentos celulares expressando imunorreatividade à TPH, fortemente marcados, foram observados no núcleo pré-mamilar, no estrato celular interno, no núcleo paraventricular magnocelular e na borda medial do núcleo dorsomedial anterior talâmico. Experimentos de dupla-marcação indicam que estes agrupamentos celulares hipotalâmicos não são imunorreativos à 5-HT. Em especial, as células do núcleo pré-mamilar, as quais correspondem a neurônios contendo dopamina e melatonina previamente encontradas no hipotálamo aviário, parecem ser comparáveis aos corpos celulares catecolaminérgicos e imunorreativos à TPH hipotalâmicos A11-A13 de mamíferos, sugerindo que eles possam ser atributos conservados no hipotálamo dos amniotas.

Palavras-chave: Ave, serotonina, triptofano hidroxilase, núcleos da rafe, hipotálamo.

ABSTRACT

The distribution of tryptophan hydroxylase (TPH)-containing perikarya and processes in the brainstem and diencephalon of the pigeon (*Columba livia*) was investigated using single-labeling chromogenic and double-labeling fluorescence immunohistochemical methods for TPH and 5-HT. TPH-immunoreactive perikarya were seen extending from the caudal medulla to mid-hypothalamic levels, located in brainstem regions previously described as containing 5-HT-immunoreactive somata. Brainstem TPH-immunoreactive cell clusters (the midline raphe, and the dorsolateral and ventrolateral cell groups) and the circumventricular cerebrospinal fluid-contacting neurons in the taenia choroidea (in the caudal brainstem), recessus infundibuli and paraventricular organ (in the hypothalamus) were shown to co-express 5-HT immunoreactivity. However, heavily labeled TPH-immunoreactive cell clusters were observed in the nucleus premamillaris, in the stratum cellulare internum, in the nucleus paraventricularis magnocellularis and in the medial border of the nucleus dorsomedialis anterior thalami. Double-labeling experiments indicated that all of these hypothalamic TPH-immunoreactive cells were not immunoreactive to 5-HT. These cells correspond to dopamine- and melatonin-containing neurons previously found in the avian hypothalamus, and appear to be comparable to the mammalian TPH-immunoreactive hypothalamic A11-A13 catecholaminergic somata, suggesting that they may be a conserved attribute in the amniote hypothalamus.

Keywords: Avian, serotonin, tryptophan hydroxylase, raphe nuclei, hypothalamus.

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO	09
2.1 Objetivo Geral.....	09
2.2 Objetivos Específicos.....	09
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Animais experimentais.....	10
3.2 Preparação do tecido.....	10
3.3 Imuno-histoquímica para TPH	11
3.4 Imuno-histoquímica para 5-HT	13
3.5 Dupla imunofluorescência para 5-HT e TPH	14
4. RESULTADOS.....	16
4.1 Neurônios imunorreativos à TPH e 5-HT no bulbo	19
4.1.1 Rafe	19
4.1.2 Núcleo do trato solitário	23
4.1.3 Núcleo reticular lateral	24
4.1.4 Zona peri-fascículo longitudinal medial.....	25
4.1.5 Epêndima.....	26
4.2 Neurônios imunorreativos à TPH e 5-HT na ponte	26
4.2.1 Rafe	26
4.2.2 Locus coeruleus.....	29
4.2.3 Núcleo reticular lateral	30
4.2.4 Zona peri-fascículo longitudinal medial.....	31
4.2.5 Epêndima.....	31

4.3 Neurônios imunorreativos à TPH e 5-HT no mesencéfalo.....	33
4.3.1 A8	33
4.3.2 Núcleo linearis caudalis	34
4.3.3 Núcleo annularis	34
4.3.4 Zona peri-fascículo longitudinal medial.....	36
4.3.5 Área tegmental ventral.....	37
4.3.6 Epêndima.....	38
4.4 Neurônios imunorreativos à TPH e 5-HT no diencéfalo.....	38
4.4.1 Órgão paraventricular	38
4.4.2 Núcleo infundibular	40
4.4.3 Núcleo pré-mamilar.....	42
4.4.4 Núcleo paraventricular magnocelular.....	43
4.4.5 Estrato celular interno	43
4.4.6 Núcleo dorsomedial anterior talâmico.....	43
4.5 Resumo dos resultados obtidos.....	44
5. DISCUSSÃO.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

Sectioning System), no plano frontal com uma espessura de 40µm e coletados em PBS 0,01M, pH 7,2 em 5 compartimentos seriados. Os cortes foram mantidos em solução anticongelante no freezer a -20°C até o início dos ensaios imuno-histoquímicos.

3.3 Imuno-histoquímica para revelação da TPH

A imuno-histoquímica para TPH foi realizada pelo método *free-floating*. Primeiramente as secções foram lavadas 5 vezes (5 min cada lavagem) com PBS 0,01 M para remover o anticongelante. Após isso foi feito o bloqueio por 25 minutos através de uma solução bloqueadora contendo 0,5% soro normal de coelho (o soro normal tem como função bloquear sítios inespecíficos ao anticorpo secundário, portanto, o soro deve ser extraído da mesma espécie animal em que o anticorpo secundário foi produzido; Vector Laboratories, Burlingame, CA), 1% soro de albumina bovina (Sigma), 0,1% Triton X-100 (o qual diminui a ligação inespecífica do anticorpo ao tecido; SARDI, Rohm and Hass), 0,1% de gelatina (Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA) e 0,01% azida (Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA) em PBS 0,01 M e na temperatura ambiente. As secções foram então transferidas para uma solução de anticorpo primário, contendo o anticorpo anti-TPH (Chemicon International, AB 1541, produzido em ovelha) em uma diluição de 1: 3000, contendo 0,1% de Triton X-100, 1% soro de albumina bovina, 0,1% de gelatina e 0,01% azida em PBS 0,01M.

Este anticorpo já mostrou revelar imunorreatividade para TPH em neurônios hipotalâmicos (Vanhatalo e Soinila, 1999), em fibras da pituitária (Saland et al., 1993), em pericários da rafe em roedores (Allers and Sharp, 2003; Belin et al., 1991; Weissmann et al., 1987) e no tronco encefálico humano (Benarroch et al., 2002), regiões onde predomina a isoforma TPH2 (Walther and Bader, 2003). Este anticorpo também já mostrou reagir

intensivamente em células de intestino embrionário (Kruger et al., 2002) e em células de intestino adulto de roedores (Gershon et al., 1977) regiões estas conhecidas por expressar a isoforma TPH1.

As secções foram incubadas 12 horas nesta solução, em temperatura ambiente, câmara úmida e sob leve agitação. A seguir elas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,01 M durante 15 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada durante 40 minutos em 0,3% H₂O₂, 50% metanol e então lavadas em PBS 0,01M. As secções foram então incubadas por 2 horas, em temperatura ambiente com anticorpo secundário biotilado anti-ovelha feito em coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA), diluído em 1:1000. Em seguida foi feita a incubação durante 90 minutos com o complexo avidina-biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA), diluído em 1:1500.

A marcação TPH foi então visualizada usando o kit Vector VIP (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 15 minutos, resultando em uma marcação citoplasmática púrpura. As secções foram lavadas e estendidas sobre lâminas gelatinizadas com solução de alúmen de cromo e gelatina. Após secagem de 48 horas elas foram desidratadas em uma série gradativa de álcool e xilol antes de serem cobertas com DPX (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Experimentos controle consistiram de omissão do anticorpo primário ou secundário das soluções pertinentes e nenhuma marcação mostrou-se evidente nestas secções. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração púrpura no local da marcação pelos anticorpos. Em todas as reações imuno-histoquímicas secções de mesencéfalo de rato foram utilizadas como controle positivo.

As secções foram analisadas usando uma câmara acoplada a um microscópio óptico (Olympus, BH-2 equipado com objetivas com plano apocromático) para visualizar corpos celulares e fibras positivas para TPH. Fotomicrografias digitais (PixelINK, Ontário, Canadá) foram feitas de secções representativas utilizando o software PixelINK (Capture Standard Edition). Mensurações (maior diâmetro dos corpos celulares) foram feitas diretamente de imagens microscópicas na magnificação de 40x usando ferramentas de calibração e mensuração deste software.

O contraste e o brilho da fotomicrografia foram ajustados no Adobe Photoshop 7. As regiões do encéfalo foram identificadas e nomeadas de acordo com o Atlas Estereotáxico do encéfalo do pombo de Karten and Hodos (1967) e com a recente revisão de nomenclatura prosencefálica do Fórum de Nomenclatura de Encéfalo de Ave (Reiner et al., 2004).

3.4 Imuno-histoquímica para revelação da 5-HT

A imuno-histoquímica para 5-HT foi realizada pelo método *free-floating*. Primeiramente as secções foram lavadas 5 vezes (5 min cada lavagem) com PBS 0,01 M para remover o anticongelante. Após isso foi feito o bloqueio por 25 minutos através de uma solução contendo 0,5% soro normal de cabra, 1% soro de albumina bovina, 0,1% Triton X-100, 0,1% de gelatina e 0,01% azida em PBS 0,01 M em temperatura ambiente. As secções foram então transferidas para uma solução de anticorpo primário, contendo anticorpo anti-5-HT (Chemicon International, AB 938, feito em coelho) em uma diluição de 1: 1000, contendo 0,1% de Triton X-100, 1% soro de albumina bovina, 0,1% de gelatina 0,01% azida em PBS 0,01M.

As secções foram incubadas 12 horas nesta solução, a temperatura ambiente em câmara úmida e sob leve agitação. Após elas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,01 M durante 15 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada durante 40 minutos em 0,3% H₂O₂, 50% metanol e então lavadas em PBS 0,01M. As secções foram então incubadas por 2 horas, em temperatura ambiente com anticorpo secundário biotilado anti-coelho feito em cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA), diluído em 1:1000. Em seguida foi feita a incubação durante 90 minutos com o complexo avidina-biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA), diluído em 1:1500.

A marcação para 5-HT foi visualizada através do uso do kit Vector SG (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 10 minutos resultando em uma marcação citoplasmática cinza-azulada. As secções foram lavadas e

estendidas sobre lâminas gelatinizadas com solução de alúmen de cromo e gelatina. Após secagem de 48 horas elas foram desidratadas em uma série gradativa de álcool e xilol antes de serem cobertas com DPX (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Experimentos controle consistiram de omissão do anticorpo primário ou secundário das soluções pertinentes e nenhuma marcação mostrou-se evidente nestas secções. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração cinza no local da marcação pelos anticorpos.

As secções foram analisadas usando uma câmara acoplada a um microscópio óptico (Olympus, BH-2 equipado com objetivas com plano apocromático) para visualizar corpos celulares e fibras positivas para 5-HT. Fotomicrografias digitais (PixelINK, Ontário, Canadá) foram feitas de secções representativas utilizando o software PixelINK (Capture Standard Edition). Mensurações (maior diâmetro dos corpos celulares) foram feitas diretamente de imagens microscópicas na magnificação de 40x usando ferramentas de calibração e mensuração deste software. O contraste e o brilho da fotomicrografia foram ajustados no Adobe Photoshop 7. As regiões do encéfalo foram identificadas e nomeadas de acordo com o Atlas Estereotáxico do encéfalo do pombo de Karten and Hodós (1967) e com a recente revisão de nomenclatura prosencefálica do Fórum de Nomenclatura de Encéfalo de Ave (Reiner et al., 2004).

3.5 Dupla imunofluorescência para 5-HT e TPH

Para os experimentos de dupla marcação fluorescente as secções foram lavadas em PBS 0,01M, bloqueadas por 25 minutos em uma solução contendo 0,5% soro normal de cabra, 1% soro de albumina bovina, 0,1% Triton X-100, 0,1% de gelatina e 0,01% azida em PBS 0,01 M sob temperatura ambiente. As secções foram então transferidas para uma solução de anticorpo primário, contendo o anticorpo anti-5-HT (Chemicon International, AB 938, feito em coelho) em uma diluição de 1: 1000, contendo 0,1% de Triton X-100, 1% soro de albumina bovina,

0,1% de gelatina 0,01% azida em PBS 0,01M. Após a incubação de 12 horas as secções foram lavadas em PBS 0,01 M seguido da incubação por 2 horas e a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-coelho feito em cabra, conjugado com o Alexa Fluor 546 (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) na diluição de 1:1000. As secções foram subsequentemente lavadas em PBS 0,01 M durante 15 minutos e bloqueadas novamente com uma solução contendo 0,5% soro normal de coelho, 1% soro de albumina bovina, 0,1% Triton X-100, 0,1% de gelatina e 0,01% azida em PBS 0,01 M sob temperatura ambiente. As secções foram então transferidas para uma solução de anticorpo primário, contendo anticorpo anti-TPH (Chemicon International, AB 1541, feito em ovelha) em uma diluição de 1: 3000, contendo 0,1% de Triton X-100, 1% soro de albumina bovina, 0,1% de gelatina 0,01% azida em PBS 0,01M. Após a incubação de 12 horas as secções foram lavadas em PBS 0,01 M seguido da incubação por 2 horas e a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-ovelha feito em burro conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) na diluição de 1:1000.

Ao fim da reação fluorescente as secções foram lavadas e estendidas sobre lâminas gelatinizadas com solução de alúmen de cromo e gelatina. Após secagem ao abrigo da luz e poeira, elas foram cobertas com uma mistura de glicerol/PBS 0,01M e visualizadas usando uma câmera (Moticam 2300 3.0 MP) acoplada ao microscópio de fluorescência (Olympus, BX40) equipado com um sistema de filtro para fluoresceína (Alexa Fluor 488, absorção 494 e emissão 517) e rodamina (Alexa Fluor 546, absorção 554 e emissão 570). Fotomicrografias digitais foram feitas de secções representativas usando o software Moticam Images Plus 2.0. O contraste e o brilho foram ajustados usando o Adobe Photoshop 7.

4. RESULTADOS

Reações cromogênicas com o anticorpo para TPH usado no presente estudo produziram marcação densa em pericários e em processos neuronais proximais, sendo esta marcação distribuída homogeneamente no citoplasma. Esta intensa reação foi observada no núcleo dorsal da rafe presente nas secções mesencefálicas de controle positivo do rato (Fig. 2), usadas para evidenciar a eficácia da marcação cromogênica através deste anticorpo na TPH de mamífero.

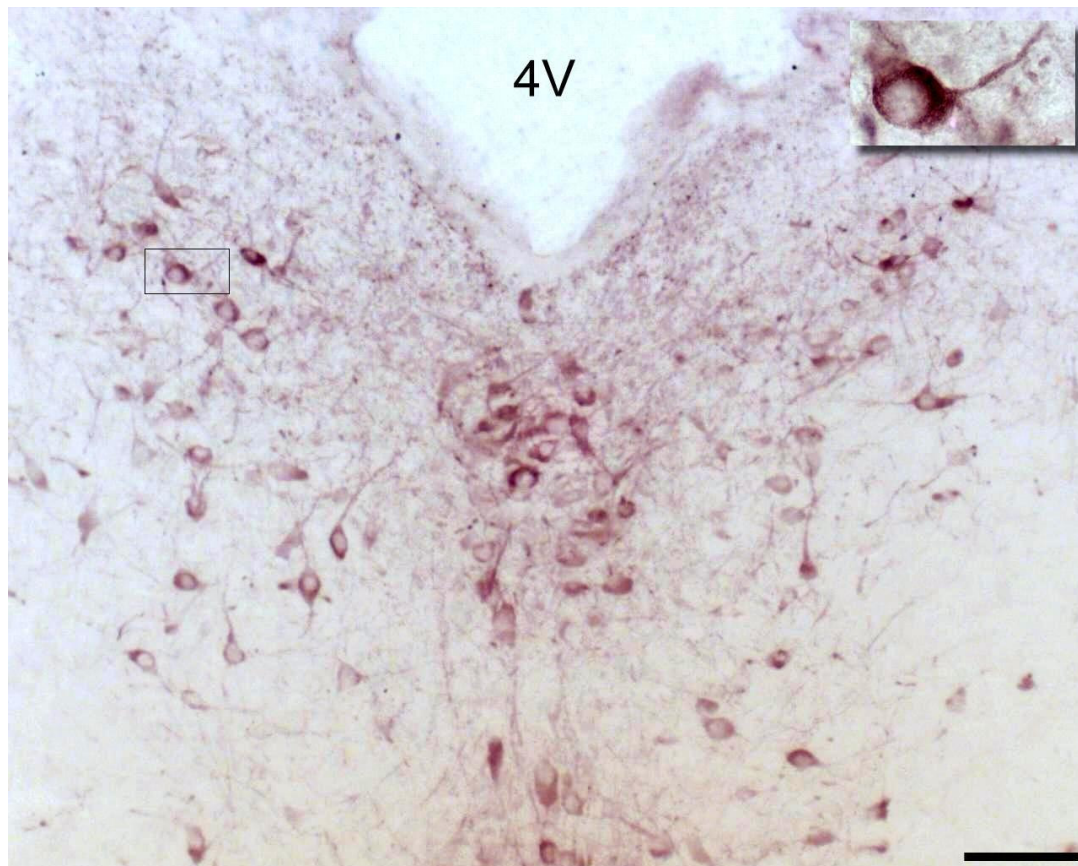


Fig. 2: Fotomicrografia de uma secção mesencefálica de rato ilustrando neurônios imunorreativos à TPH no núcleo dorsal da rafe. Barra de escala: 150 μ m. Veja lista para abreviações.

No pombo fibras imunorreativas à TPH foram localizadas principalmente ao longo de regiões mediais na parede do 3V e 4V e nas camadas subependimária /supra-ependimária da superfície ventral e dorsomedial do tronco encefálico. Pericários imunorreativos à TPH foram vistos estendendo-se do nível bulbar caudal até níveis hipotalâmicos mediais e foram principalmente localizados em regiões previamente descritas por possuir corpos celulares imunorreativos à 5-HT (Fig. 3).

A imuno-histoquímica para revelação da 5-HT indicou que a distribuição de corpos celulares imunorreativos à TPH sobrepõe, na maioria das vezes, os pericários contendo 5-HT. Entretanto, alguns agrupamentos celulares imunorreativos à TPH, fracamente marcados, foram observados em regiões as quais não possuem imunorreatividade à 5-HT (ex.: mSp, IDp e PMM). Experimentos de dupla marcação imunofluorescente indicam que a maioria dos pericários imunorreativos à TPH do tronco encefálico apresenta também imunorreatividade à 5-HT, e que agrupamentos hipotalâmicos mediais de células imunorreativas à TPH não mostram imunorreatividade serotoninérgica, exceto os neurônios do PVO e do INF.

Nas fotomicrografias as fibras e corpos celulares imunorreativos à TPH são de cor púrpura e marcação serotoninérgica, cor acinzentada. As fotomicrografias da reação fluorescente que mostram estruturas imunorreativas à TPH apresentam cor verde e as estruturas imunorreativas à 5-HT apresentam a cor vermelha.

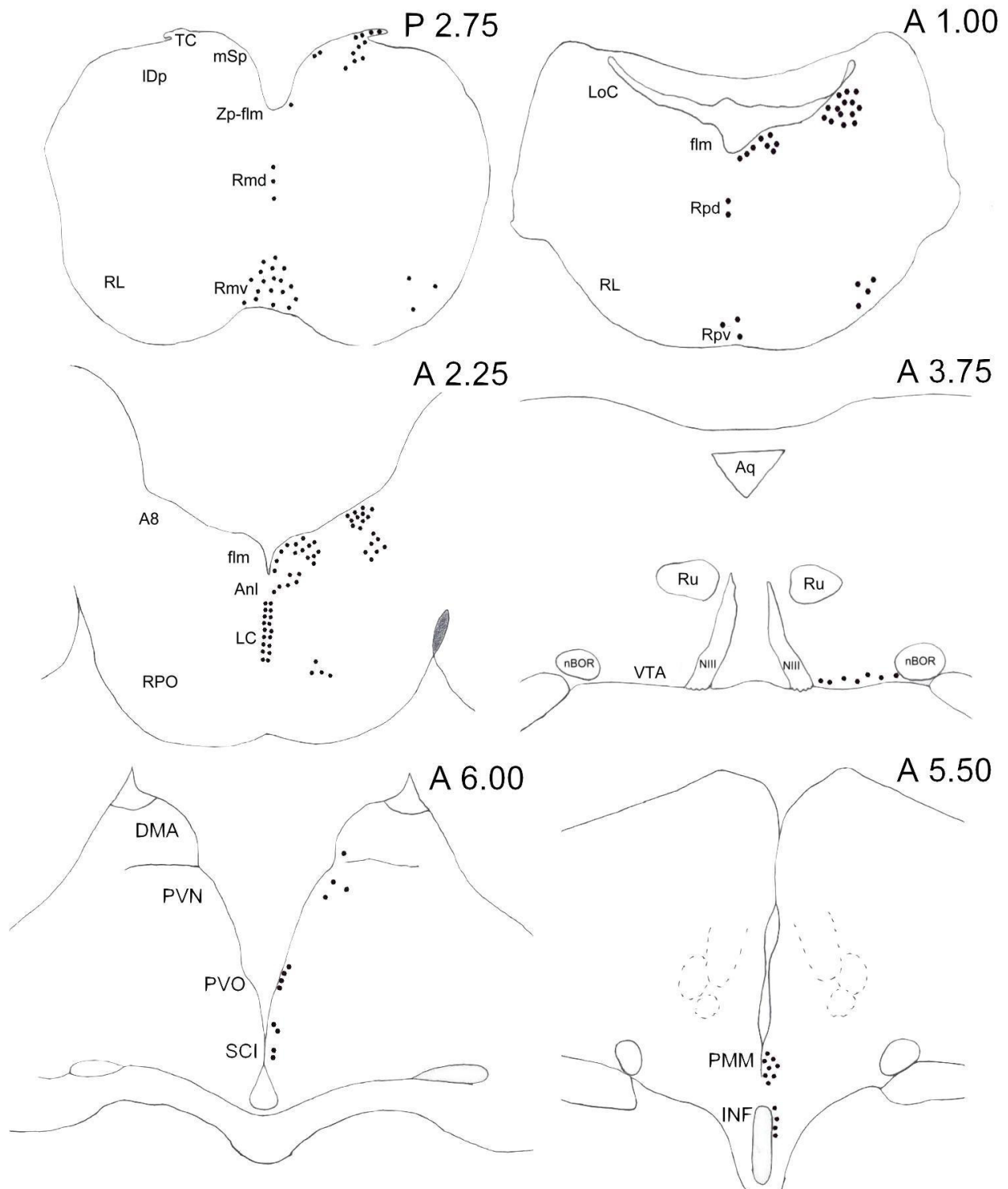


Fig. 3: Desenhos esquemáticos do tronco encefálico e diencefalo de pombo evidenciando a localização dos neurônios imunorreativos à TPH. Veja lista para as abreviações.

4.1 Neurônios imunorreativos à TPH e 5-HT no bulbo

4.1.1 Rafe

Neurônios imunorreativos à TPH foram observados em agrupamentos localizados na linha média bulbar em uma região coletivamente denominada de rafe (Fig.4 A). A rafe do pombo divide-se citoarquiteticamente em duas regiões distintas: o núcleo bulbar da rafe, pars ventralis (Rmv) e o núcleo bulbar da rafe, pars dorsalis (Rmd).

O Rmv é composto por grandes corpos celulares imunorreativos à TPH (acima de 30 μ m), fortemente marcados, com perfis poligonais, triangulares ou fusiformes (Fig.4 C). Apresentam imunorreatividade em processos bipolares ou multipolares. Marcação em dendritos primários, secundários e terciários é comumente visualizada nessas células (Fig.4 E).

O Rmd, localizado dorsalmente às células do Rmv, contém um menor número de pericários marcados (Fig.4 B). Possuem perfis principalmente fusiformes ou redondos e encontram-se localizados principalmente ao longo da linha média. Apresentam o citoplasma densamente marcado com núcleo bem definido (Fig.4 D).

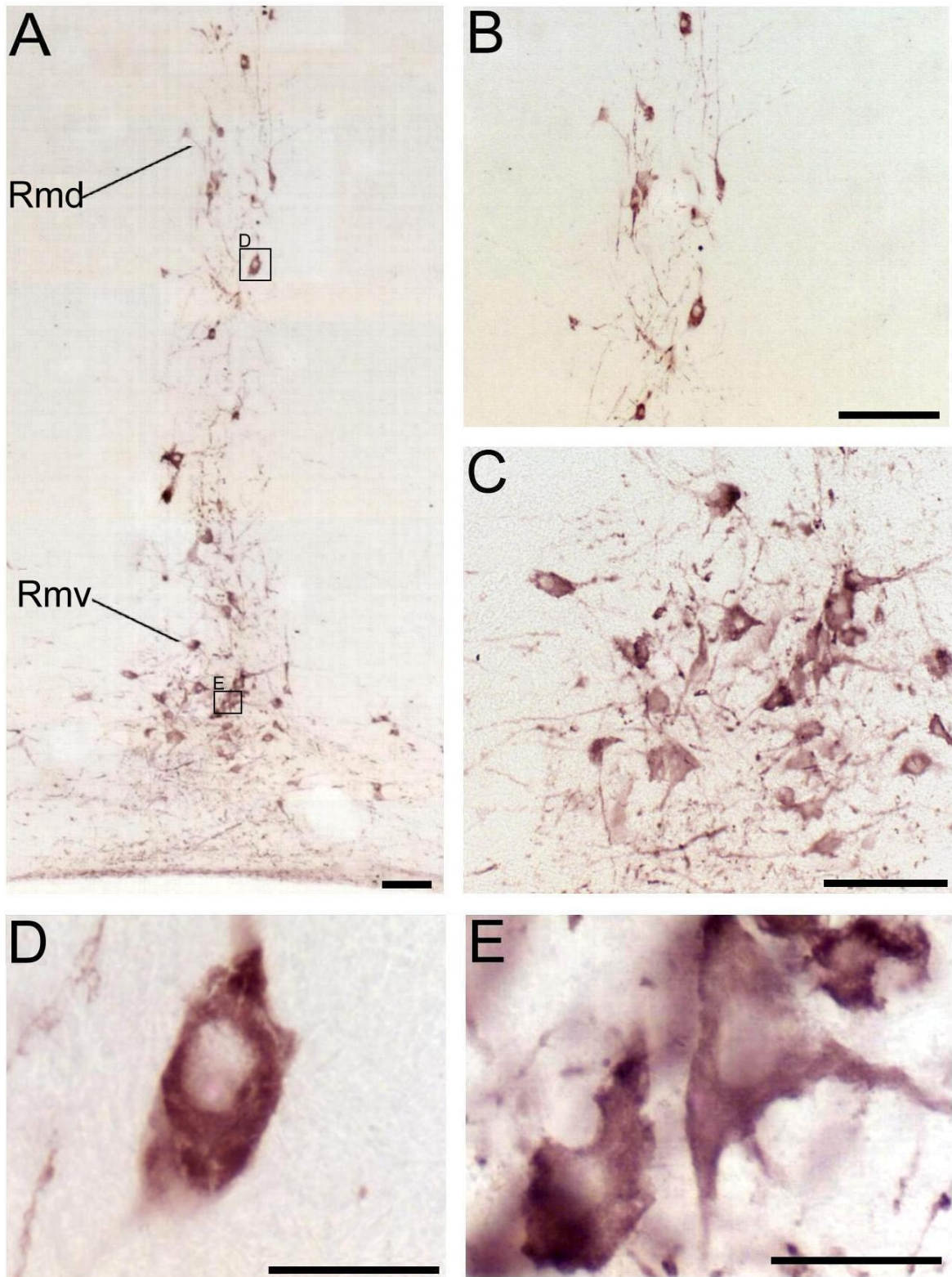


Fig. 4: (A) Neurônios localizados no complexo da rafe bulbar. (B) e (C) pericários e processos imunorreativos à TPH no Rmd e Rmv, respectivamente. (D) e (E) são magnificações dos quadros em (A) ilustrando a morfologia dos neurônios do Rmd e Rmv, respectivamente. Barra de escala: A-C: 150 μ m; D-E: 50 μ m. Veja lista para as abreviações.

Grande quantidade de processos e varicosidades densamente imunorreativas à TPH são observadas em todo o complexo da rafe com predominância no Rmv. Orientação horizontal pode ser visualizada em alguns destes processos (Fig. 5 A). Fibras densamente imunorreativas emergem do Rmv e orientam-se em direção ao epêndima. (Fig. 5 B).

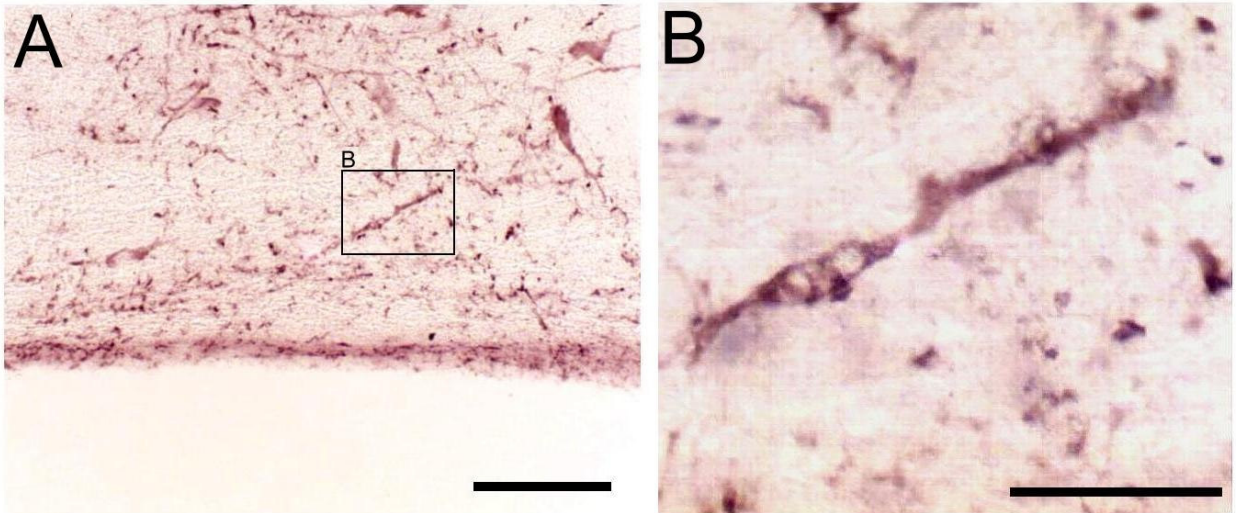


Fig. 5: (A) Ilustração dos processos imunorreativos à TPH e varicosidades espalhadas dentro do Rmv. (B) Magnificação do quadro em (A) ilustrando um processo imunorreativo à TPH. Barra de escala: A: 150 μ m; B: 50 μ m. Veja lista para as abreviações.

No Rmv e Rmd o padrão distribucional de pericários imunorreativos à 5-HT é comparável com a distribuição de pericários imunorreativos à TPH (Fig. 6 A). No Rmv os pericários serotoninérgicos imunorreativos possuem o citoplasma densamente marcado, porém apresentam poucos processos visíveis (Fig.6 C). Quantidade menor de pericários imunorreativos à 5-HT pode ser visualizada no Rmd, dispostos na linha média, com grande faixa citoplasmática marcada e núcleo bem definido (Fig.6 B).

Os experimentos de dupla marcação revelaram colocalização de 5-HT e TPH em pericários do Rmv e Rmd. Porém é possível notar que a marcação para TPH fluorescente difere da marcação cromogênica, pois não se observa imunoreatividade em processos neuronais e/ou varicosidades (Fig. 6 D-E).

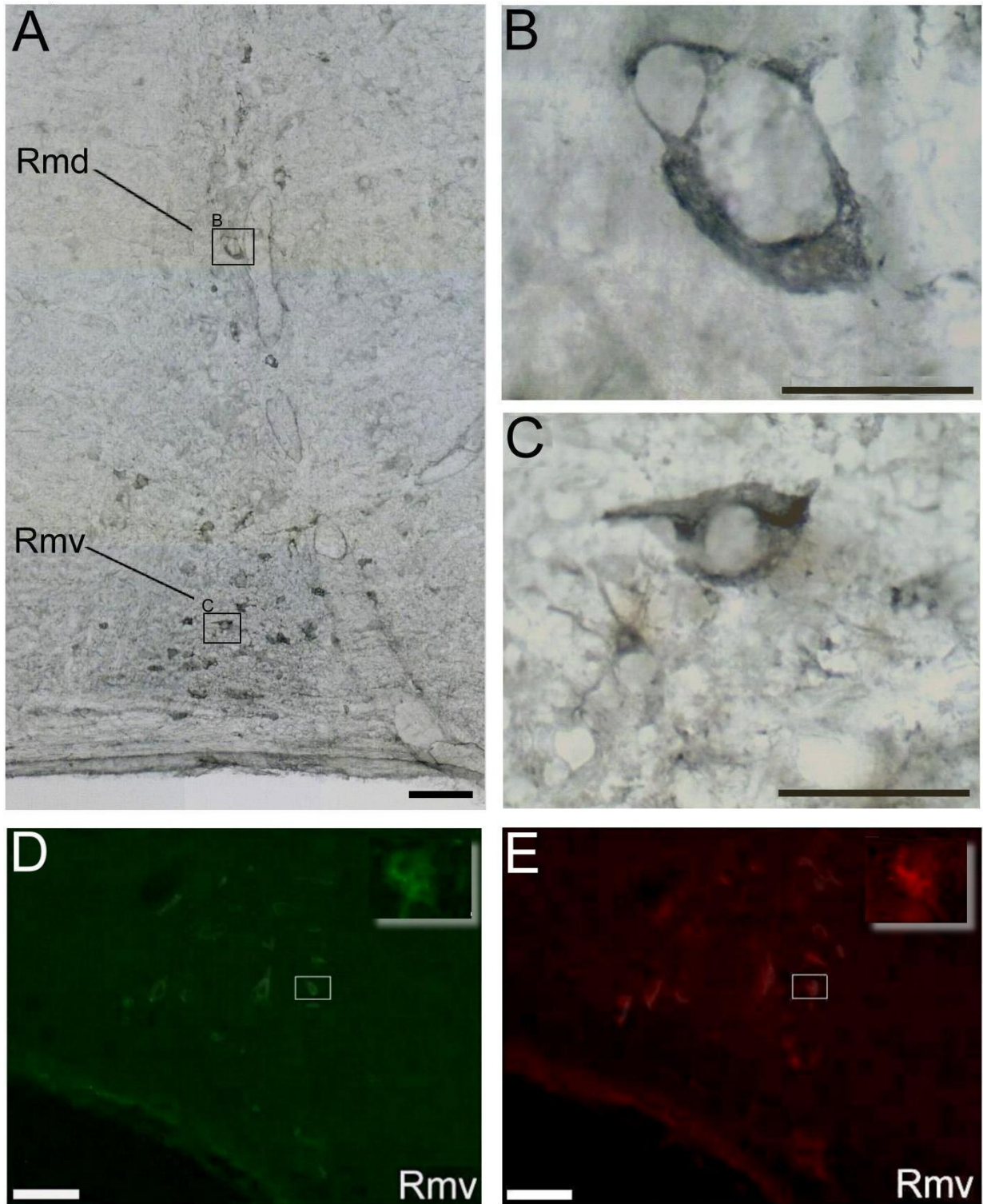


Fig. 6: (A) Ilustração de células contendo 5-HT no complexo da rafe. (B) e (C) são magnificações dos quadros em (A) de um neurônio imunorreativo do Rmd e Rmv, respectivamente. (D) e (E) ilustram a colocalização de TPH e 5-HT em células do Rmv, respectivamente. Barra de escala: A, D, E: 150 μ m; B-C: 50 μ m. Veja lista para as abreviações.

4.1.2 Núcleo do trato solitário

No bulbo dorsal, um número moderado de corpos celulares imunorreativos à TPH foram observados na taenia choroidea (TC) e em subnúcleos do NTS como o medialis superficialis pars posterior (mSp) e lateralis dorsalis pars posterior (IDp, Fig. 7 A). As células imunorreativas da TC tendem a ser mais fortemente marcadas que as dos subnúcleos. Estas pequenas células (abaixo de $14\mu\text{m}$) usualmente apresentam perfil redondo e nenhum processo imunorreativo (Fig. 7 B). Ao contrário, as células do mSp e IDp são fusiformes porém fracamente marcadas e com raros processos imunorreativos (Fig. 7 C-D).

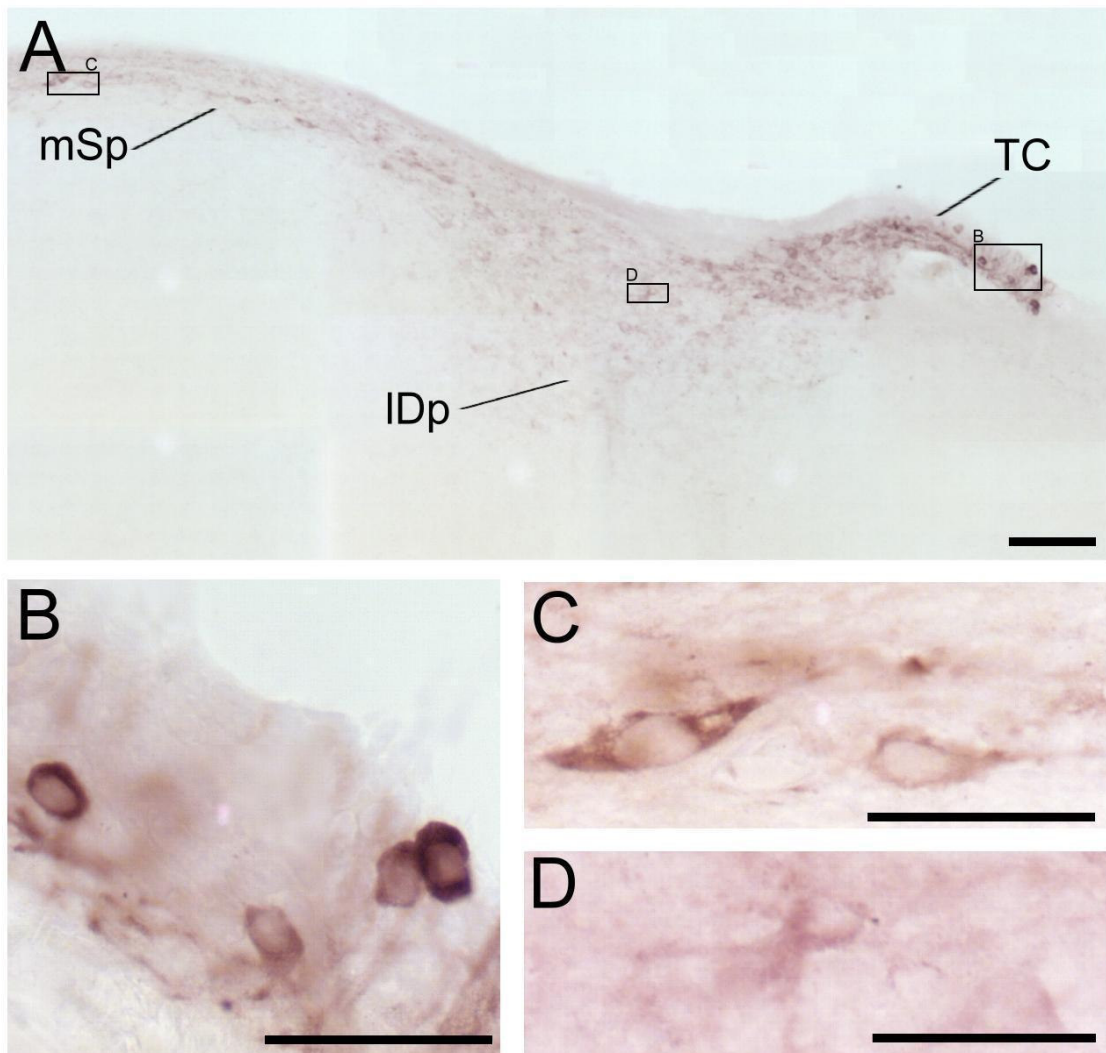


Fig. 7: (A) Ilustração da imunoreatividade de células da TC, mSp e IDp. (B), (C) e (D) são magnificações dos quadros em (A) ilustrando a morfologia das células da TC, mSp e IDp, respectivamente. Barra de escala: A: $150\mu\text{m}$; B-D: $50\mu\text{m}$. Veja lista para as abreviações.

Entretanto a imuno-histoquímica para 5-HT evidenciou apenas células imunorreativas na TC (Fig.8 A) e ausência de imunorreatividade nas outras regiões do NTS. Nos experimentos de dupla-marcação fluorescente foi possível observar colocalização de TPH e 5-HT em poucas células da TC (Fig.8 B-E). Não detectamos corpos celulares serotoninérgicos no mSp e IDp em ambos os experimentos de marcação cromogênica e fluorescente.

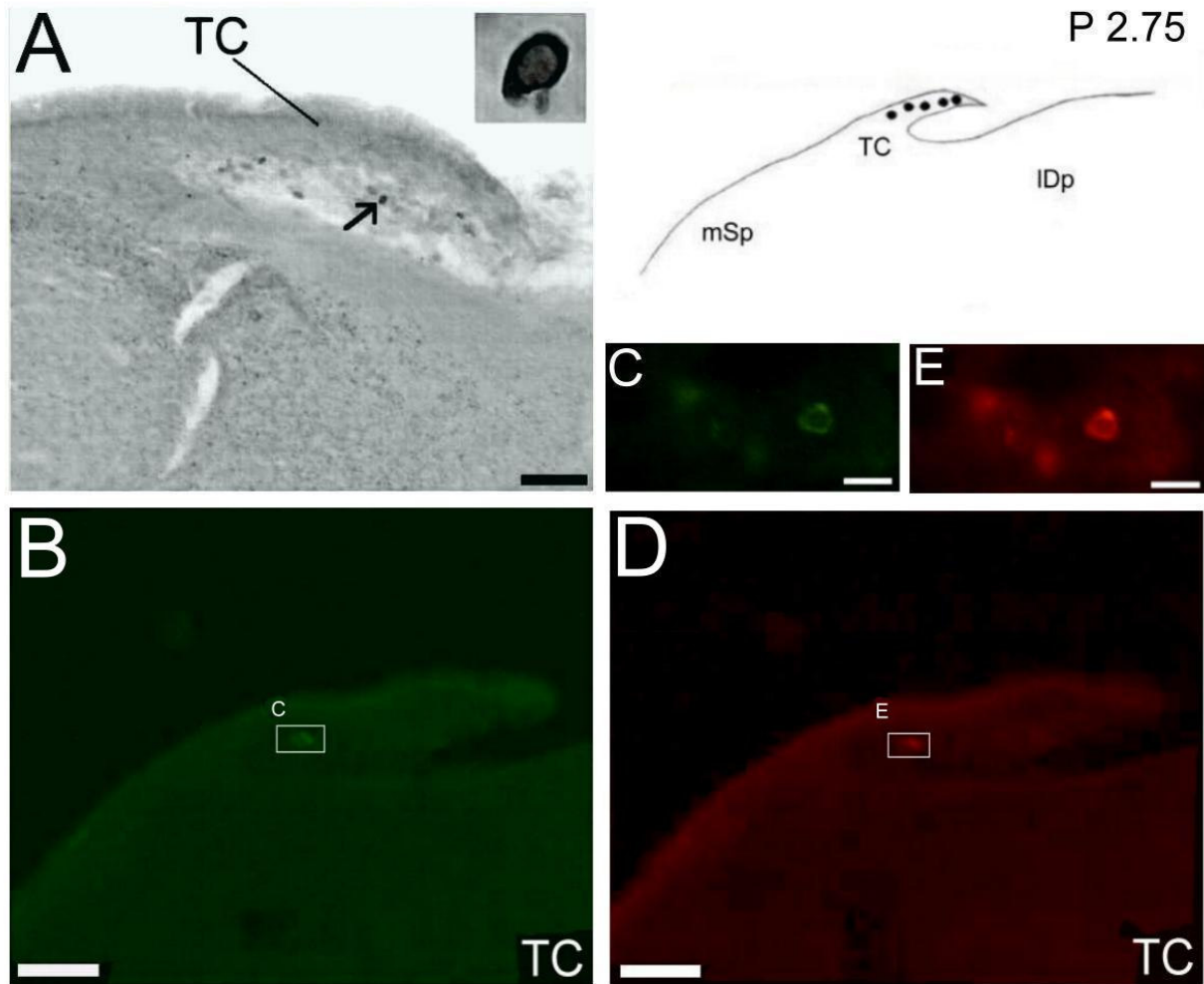


Fig. 8: (A) Células imunorreativas à 5-HT na TC. A flecha aponta para um neurônio serotoninérgico. (B) e (D) ilustram a colocalização de TPH e 5-HT em células da TC, respectivamente. (C) e (E) são ampliações dos quadros em (B) e (D) ilustrando a colocalização de TPH e 5-HT no mesmo neurônio da TC. Barra de escala: A, B, D: 150 μ m; C, E: 10 μ m. Veja lista para as abreviações.

4.1.3 Núcleo reticular lateral

Pequena quantidade de neurônios imunorreativos à TPH, densamente marcados, multipolares, ovóides ou elipsóides, de tamanho médio (entre 15-29 μ m) foi também observada no campo bulbar ventrolateral, ocupando

esparsamente o núcleo reticular lateral (RL; Fig. 9 A-B). Um pequeno número de corpos celulares imunorreativos à 5-HT foi observado nessa região (dado não mostrado).

4.1.4 Zona peri-fascículo longitudinal medial

Na zona peri-fascículo longitudinal medial (Zp-flm) processos e varicosidades imunorreativas à TPH são observadas, bem como um número reduzido de corpos celulares com perfil fusiforme e citoplasma densamente marcado (Fig. 9 C). Fraca imunorreatividade serotonérgica também foi evidenciada nessa região.

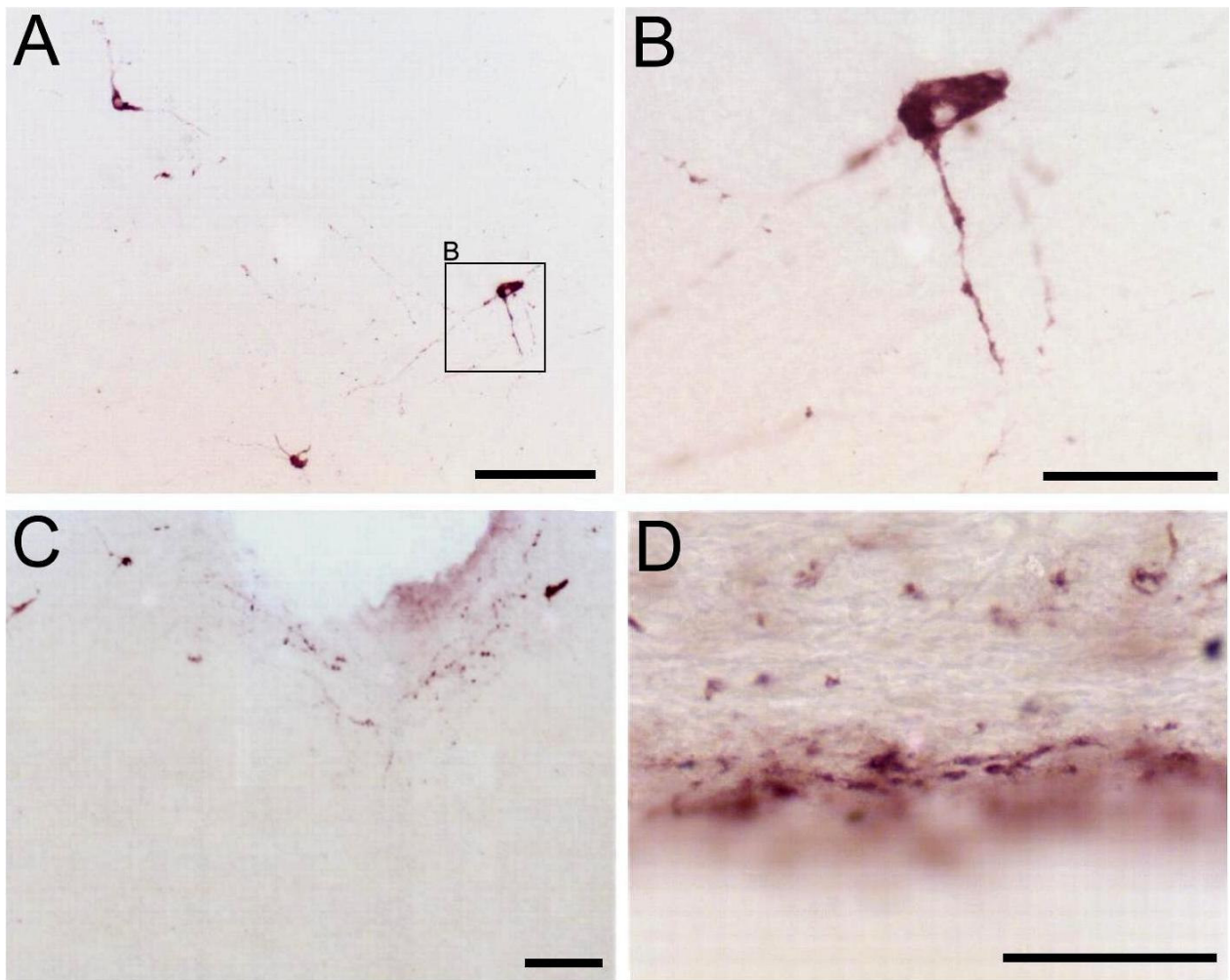


Fig. 9: (A) Células imunorreativas do RL. (B) Magnificação do quadro em (A) ilustrando a morfologia de um neurônio imunorreativo e seus processos. (C) Processos e varicosidades da Zp-flm. (D) Varicosidades do epêndima. Barra de escala: A, C: 150µm; B: 100µm; D: 50µm. Veja lista para as abreviações.

4.1.5 Epêndima

Uma densa rede de finos processos e varicosidades, com numerosos “*boutons en passage*”, parece originar-se nos pericários do Rmv, arranjadas ventralmente e ocupando as camadas supra e sub-ependimária da superfície externa ventral (Fig. 9 D) formando um denso emaranhado de processos imunorreativos à TPH estendendo-se do bulbo caudal até níveis pontinos. Entretanto a imuno-histoquímica para 5-HT não mostrou processos ou varicosidades imunorreativas.

4.2 Neurônios imunorreativos à TPH e 5-HT na ponte

4.2.1. Rafe

O complexo pontino da rafe apresentou uma diminuição de pericários imunorreativos à TPH quando comparado ao complexo bulbar da rafe (Fig. 10 A). Na linha média, pequena quantidade de pericários poligonais, moderadamente marcados foi observada no núcleo pontino da rafe, pars ventralis (Rpv, Fig. 10 C). Pequena quantidade também de corpos celulares fortemente marcados, fusiformes, bipolares e de tamanho reduzido foi observada na linha média do núcleo pontino da rafe, pars dorsalis (Rpd) localizado dorsalmente ao Rpv (Fig. 10 B).

No Rpv e Rpd o padrão distribucional de pericários imunorreativos à 5-HT foi comparável com a distribuição de corpos celulares imunorreativos à TPH (Fig. 11 A). No Rpv os pericários imunorreativos à 5-HT possuem estreita faixa citoplasmática marcada com núcleos bem definidos e sem marcação, porém apresentaram poucos processos visíveis (Fig.11 C, E). A porção da Rpd possuiu quantidade menor de corpos celulares densamente marcados, dispostos na linha média e apresentando ausência de processos imunorreativos (Fig.11 B, D).

Os experimentos de dupla marcação fluorescente revelaram colocalização de TPH e 5-HT em neurônios dos núcleos pontinos da rafe (dado não mostrado).

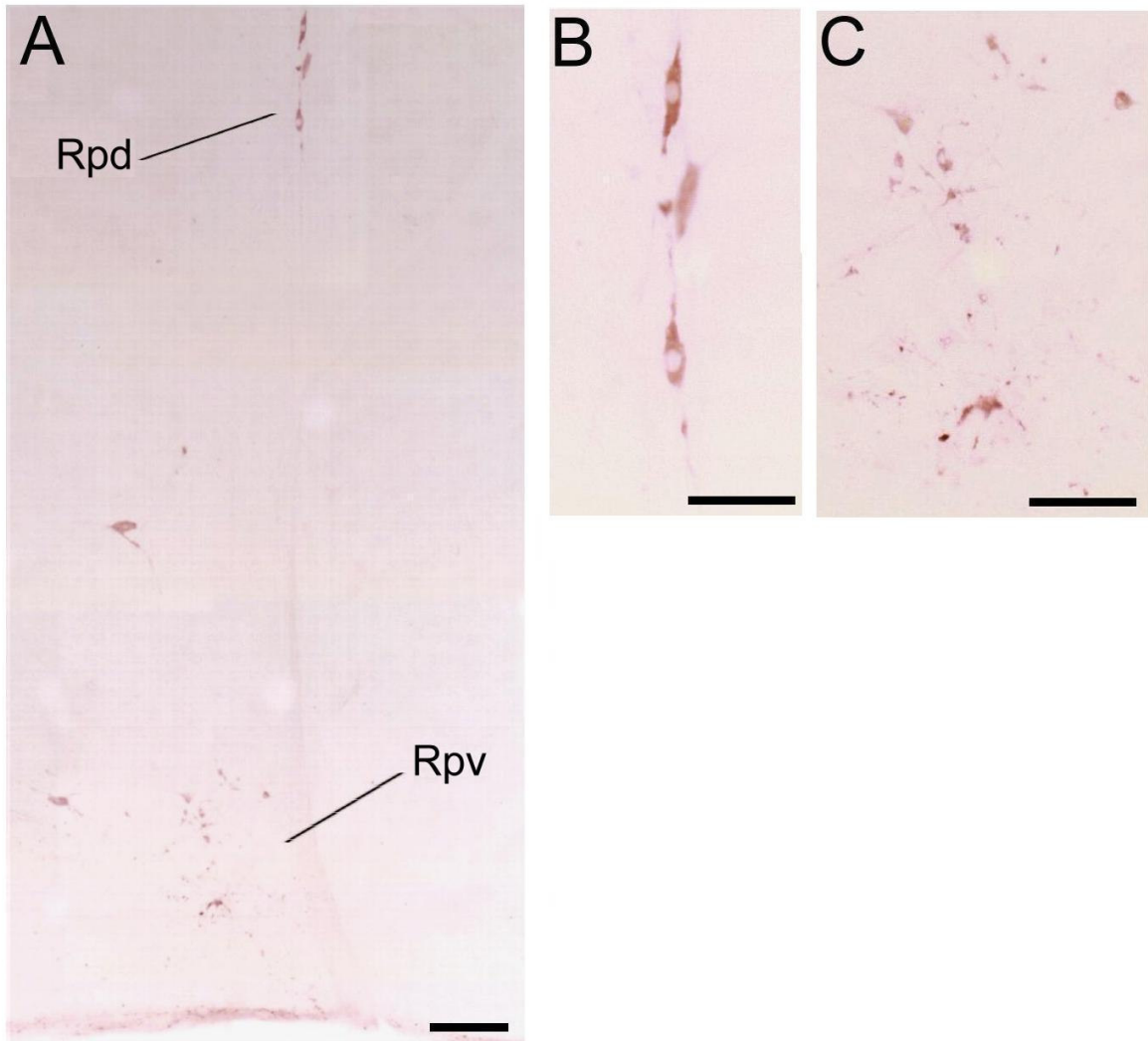


Fig. 10: (A) Neurônios localizados no complexo da rafe. (B) e (C) pericários e processos imunorreativos à TPH no Rpd e Rpv, respectivamente. Barra de escala: A-C: 150 μ m. Veja lista para as abreviações.

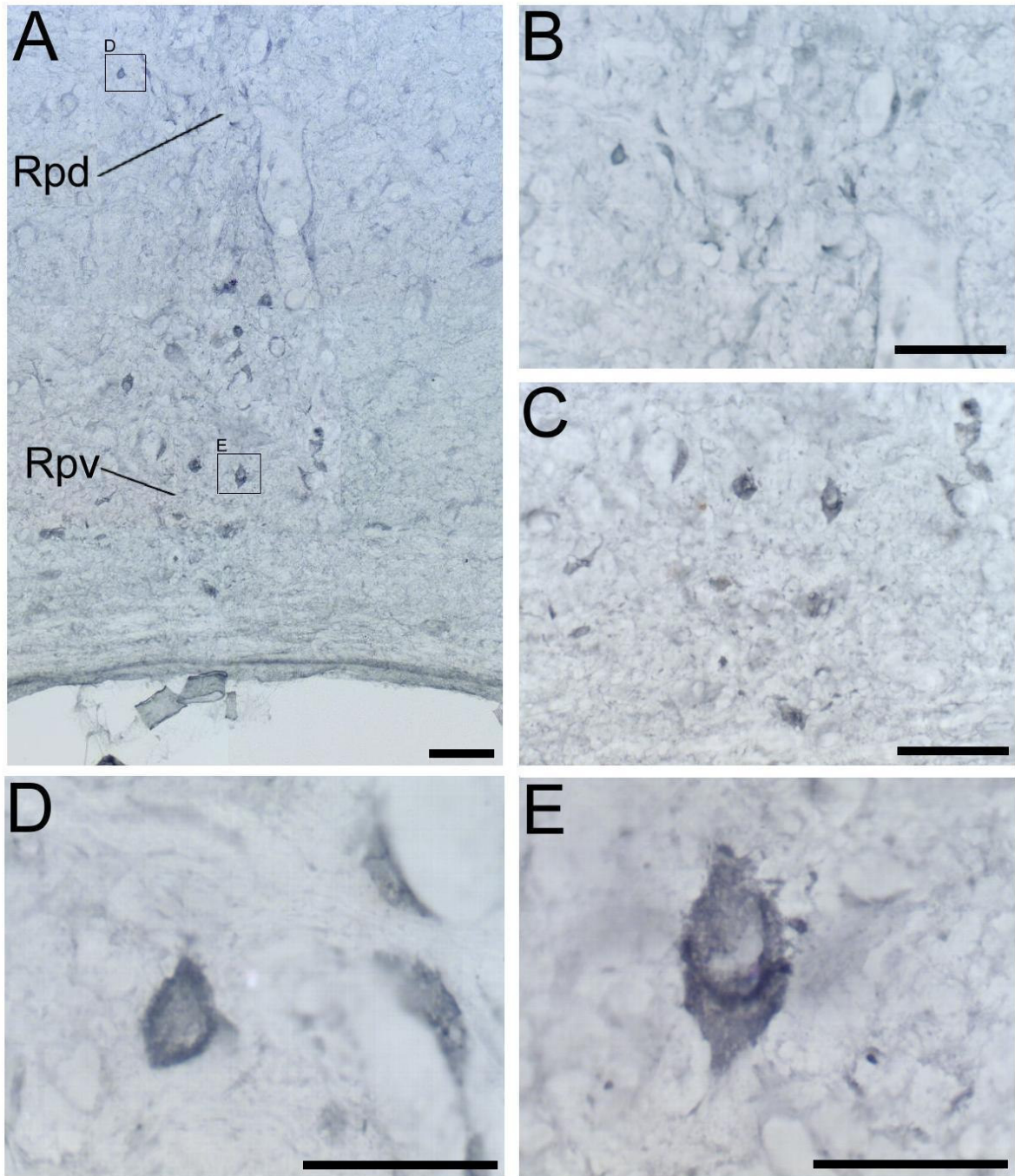


Fig. 11: (A) Neurônios localizados no complexo da rafe. (B) e (C) pericários e processos imunorreativos à 5-HT no Rpd e Rpv, respectivamente. (D) e (E) são magnificações dos quadros em (A) ilustrando a morfologia dos neurônios do Rpd e Rpv, respectivamente. Barra de escala: A-C: 150 μ m; D-E: 50 μ m. Veja lista para as abreviações.

4.2.2 Locus coeruleus

Um grupo concentrado de corpos celulares, de fracamente para moderadamente imunorreativos à TPH, são observados no LoC e mais esparsamente distribuído no núcleo subjacente subceruleus dorsalis (SCd, Fig. 12 A). Os neurônios do LoC possuem perfil redondo, com pouca imunorreatividade em processos proximais (Fig. 12 B). Corpos celulares imunorreativos à 5-HT podem ser visualizados dentro do LoC, apresentando fraca marcação citoplasmática (Fig. 12 C-D).

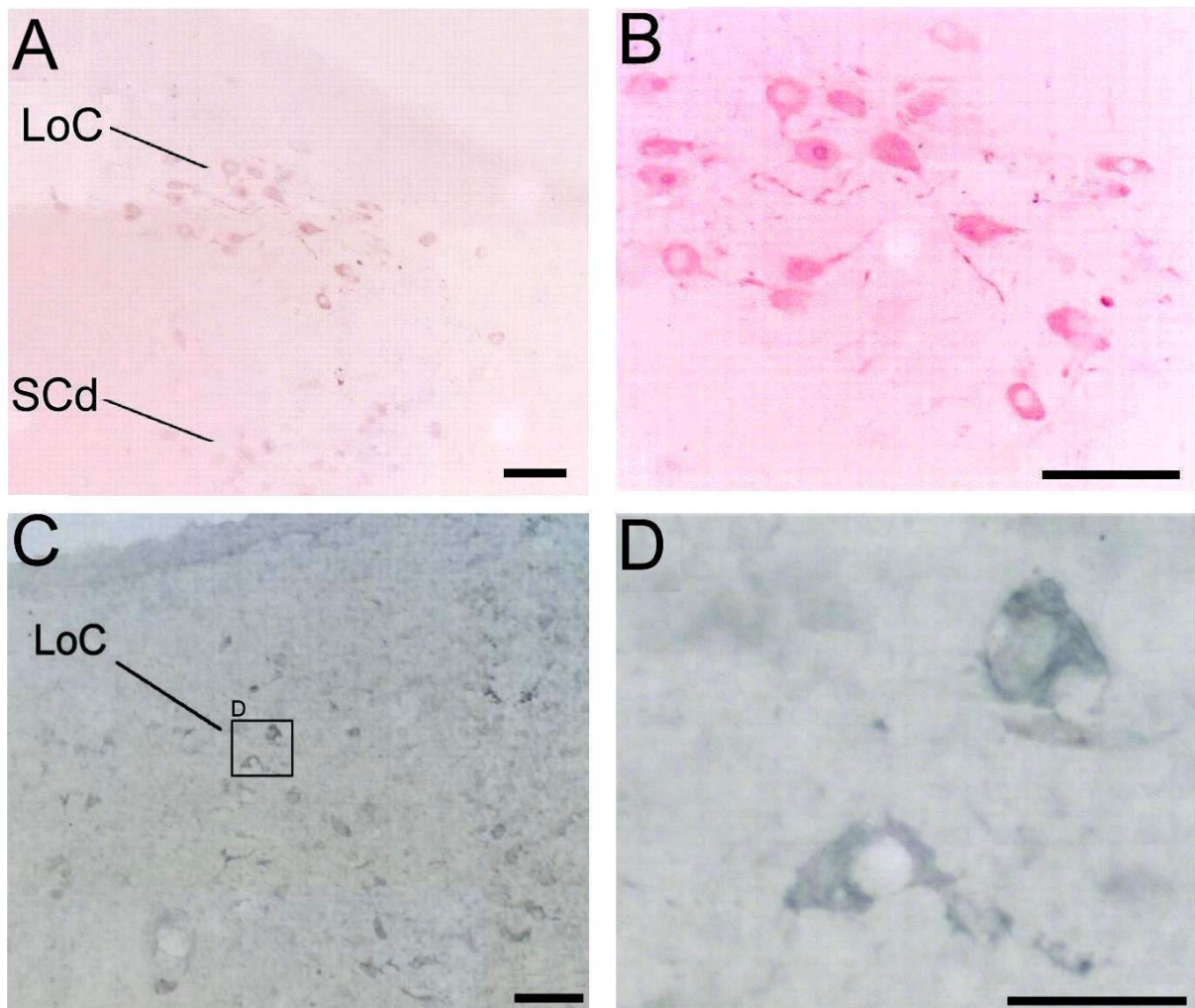


Fig. 12: (A) Neurônios imunorreativos à TPH no LoC e SCd. (B) Pericários e processos imunorreativos à TPH no LoC. (C) Ilustra um pequeno grupo de neurônios imunorreativos à 5-HT do LoC. (D) Magnificação do quadro em (C) ilustrando a morfologia dos neurônios imunorreativos à 5-HT do LoC. Barra de escala: A-C: 150 μ m; D: 100 μ m. Veja lista para as abreviações.

4.2.3 Núcleo reticular lateral

Um pequeno número de pericários imunorreativos à TPH, fortemente marcados, de tamanho médio, com perfis poligonais ou fusiformes e apresentando múltiplos processos foi observado no tegmento pontino ventrolateral em continuidade com as células do RL mostradas no bulbo (Fig. 13 A-B). No mesmo distrito pontino é possível observar número reduzido de pericários imunorreativos à 5-HT (Fig. 13 C-D).

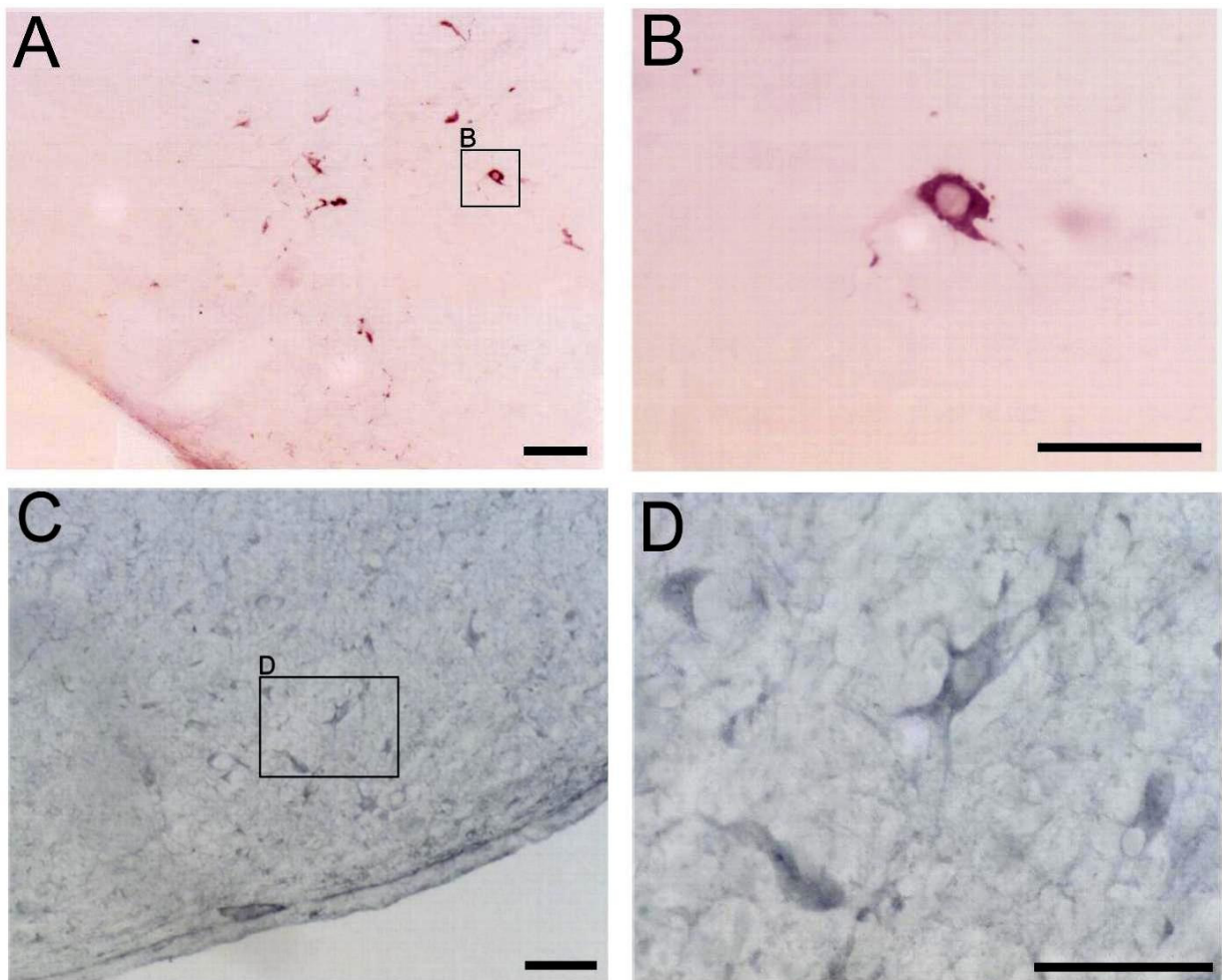


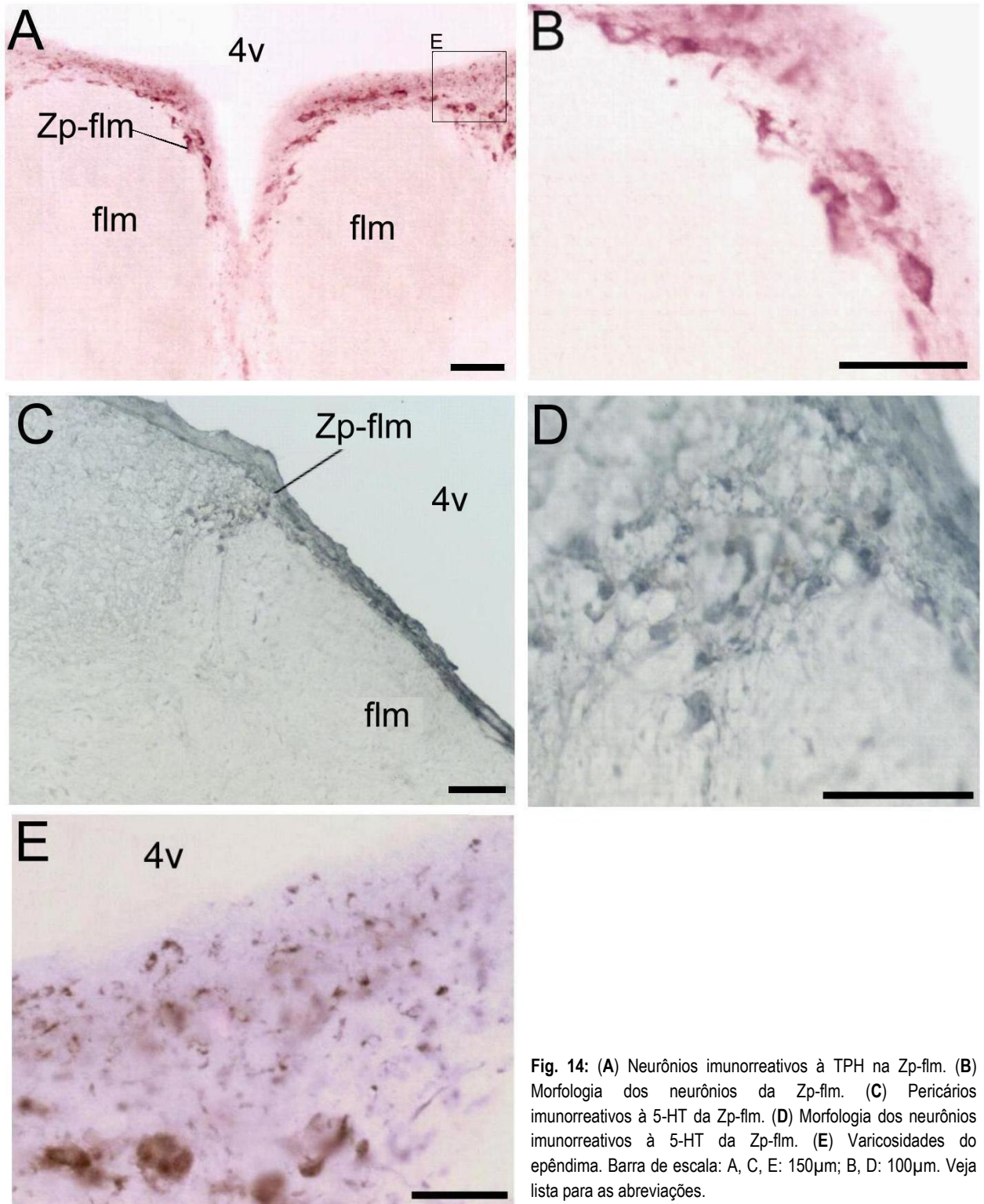
Fig. 13: (A) Neurônios imunorreativos à TPH no RL. (B) Magnificação do quadro em (A) ilustrando a morfologia de um neurônio do RL. (C) Pericários imunorreativos à 5-HT no RL. (D) Magnificação do quadro em (C) ilustrando a morfologia dos neurônios imunorreativos à 5-HT no RL. Barra de escala: A, C: 150 μ m; B, D: 100 μ m. Veja lista para as abreviações.

4.2.4 Zona peri-fascículo longitudinal medial

Quantidade moderada de corpos celulares e fibras imunorreativas à TPH foi visualizada na Zp-flm aumentando em toda a extensão rostro-caudal (Fig. 14 A). Esses pericários são de tamanho médio, fusiformes, ovais e triangulares e com o citoplasma fortemente marcado. Estão organizados em fileiras de corpos celulares comprimidos entre a superfície ventricular e os aspectos mediais e dorsais do flm (Fig. 14 B). Rostralmente, estas fileiras de células imunorreativas circundam dorsalmente o núcleo troclear e invadem o flm. Pequena quantidade de neurônios imunorreativos à 5-HT pode também ser visualizada na Zp-flm (Fig. 14 C-D).

4.2.5 Epêndima

Uma rede de fibras varicosas imunorreativas à TPH, originadas de corpos celulares da Zp-flm e projetando nas camadas supra e sub-ependimárias do 4V pode ser visualizada. Entretanto, esta rede parece ser mais densa na ponte do que no bulbo (Fig. 14 E). Varicosidades serotoninérgicas não foram visualizadas nessa região (dado não mostrado).



4.3 Neurônios imunorreativos à TPH e 5-HT no mesencéfalo

4.3.1 A8

Grande número de neurônios imunorreativos à TPH, fracamente marcados, espalha-se sobre o grupo celular dopaminérgico (A8; Fig. 15 A). Estes pericários apresentam perfis variados sendo poligonais, ovais ou fusiformes, de tamanho médio e apresentando núcleos bem definidos. Nessa mesma região é possível observar a presença de um pequeno agrupamento neuronal imunorreativo à 5-HT, porém em menor número quando comparado aos neurônios contendo TPH (Fig. 15 B). Experimentos de dupla fluorescência evidenciam ambas imunorreatividade à TPH e 5-HT simultaneamente em neurônios de A8 (Fig. 15 C-D).

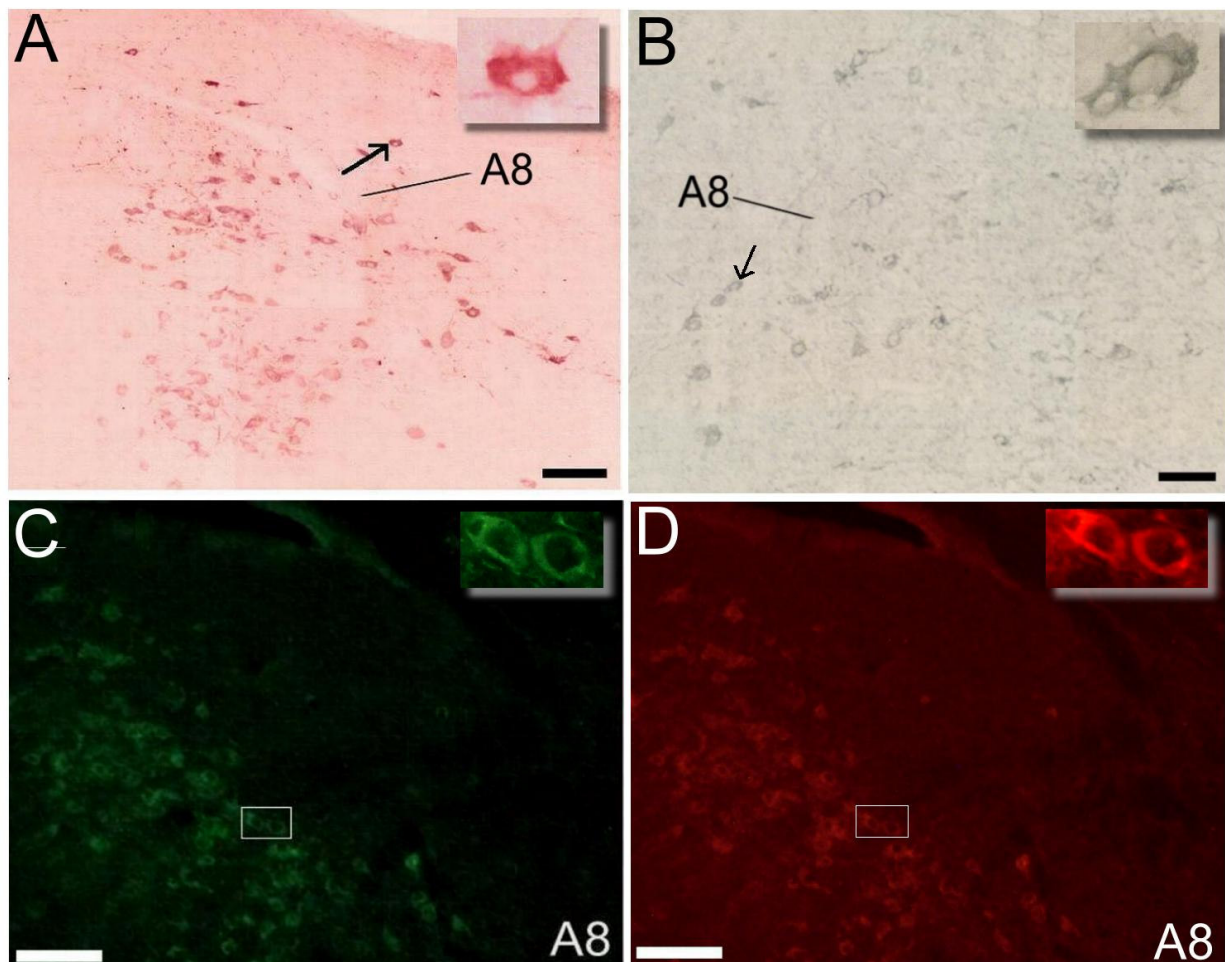


Fig. 15: (A) Neurônios imunorreativos à TPH no A8. (B) Pericários imunorreativos à 5-HT no A8. (C) e (D) Ilustram a colocação de TPH e 5-HT nos neurônios de A8, respectivamente. Barra de escala: A - D: 150 μ m. Veja lista para as abreviações.

4.3.2 Núcleo linearis caudalis

Na linha média, o núcleo linearis caudalis (LC) mostrou um elevado número de pequenos corpos celulares imunorreativos à TPH, redondos ou ovais, moderadamente marcados. Estes pericários estão organizados em duas fileiras paralelas ao longo da linha média (Fig. 16 A, B). Nas proximidades do LC, lateralmente ao fascículo tecto-reticular, uma modesta quantidade de pequenos somas fortemente marcados, foi observado no núcleo reticularis pontis oralis (RPO; Fig. 16 A). Neurônios contendo 5-HT são visualizados em grande quantidade dentro do LC (Fig. 17 A, B, D) e em menor quantidade no RPO (Fig. 17 A, F).

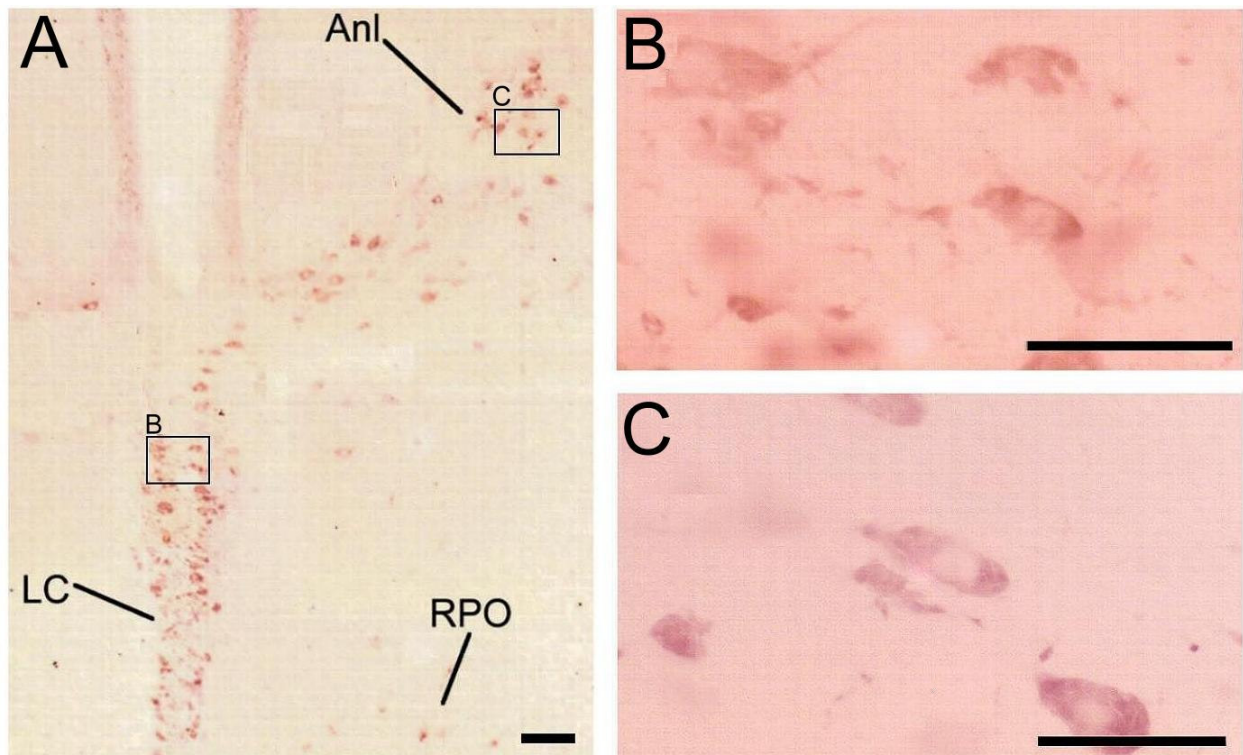


Fig. 16: (A) Neurônios imunorreativos à TPH no LC, Anl e RPO. (B) e (C) são ampliações dos quadros em (A) ilustrando a morfologia de pericários contendo TPH no LC e Anl, respectivamente. Barra de escala: A: 150 μ m; B-C: 100 μ m. Veja lista para as abreviações.

4.3.3 Núcleo annularis

Um segundo grupo de pericários imunorreativos à TPH, redondos, fusiformes e poligonais surgem ventrolateralmente ao flm, correspondendo ao núcleo annularis (Anl; Fig. 16 A, C). Formam uma aparente

continuidade com os neurônios de A8. Pericários contendo 5-HT também foram encontrados dentro desse núcleo

(Fig. 17 A, C, E).

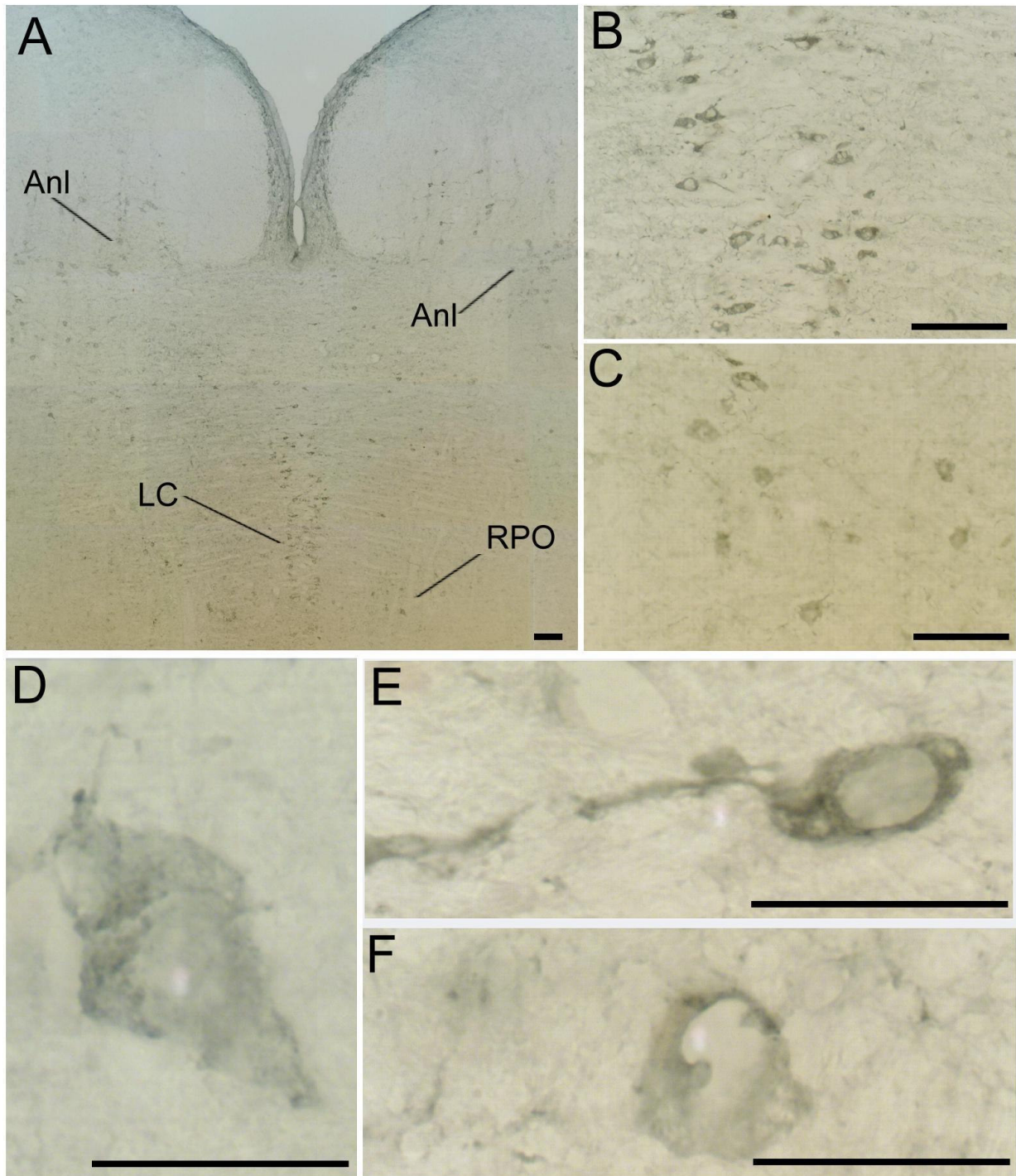


Fig. 17: (A) Neurônios imunorreativos à 5-HT no LC, Anl e RPO. (B) Ilustra pericários do LC imunorreativos à 5-HT. (C) Ilustra pericários imunorreativos à 5-HT do Anl (D), (E) e (F) ilustram a morfologia de pericários contendo 5-HT no LC, Anl e RPO respectivamente. Barra de escala: A-C: 150 μ m; D-F: 50 μ m. Veja lista para as abreviações.

4.3.4 Zona peri-fascículo longitudinal medial

Um grande número de neurônios imunorreativos à TPH, intensamente marcados, é visualizado na Zp-flm. Esses neurônios assumem distintos perfis (redondos, ovais, fusiformes e triangulares), com forte marcação citoplasmática. Além disso, há quantidade moderada de processos neuronais imunorreativos em toda a Zp-flm (Fig. 18 A). Pericários serotoninérgicos puderam ser observados dentro do corpo do flm (Fig. 18 B). Colocalização de TPH e 5-HT também foi evidenciada nesse distrito (Fig. 18 C-D).

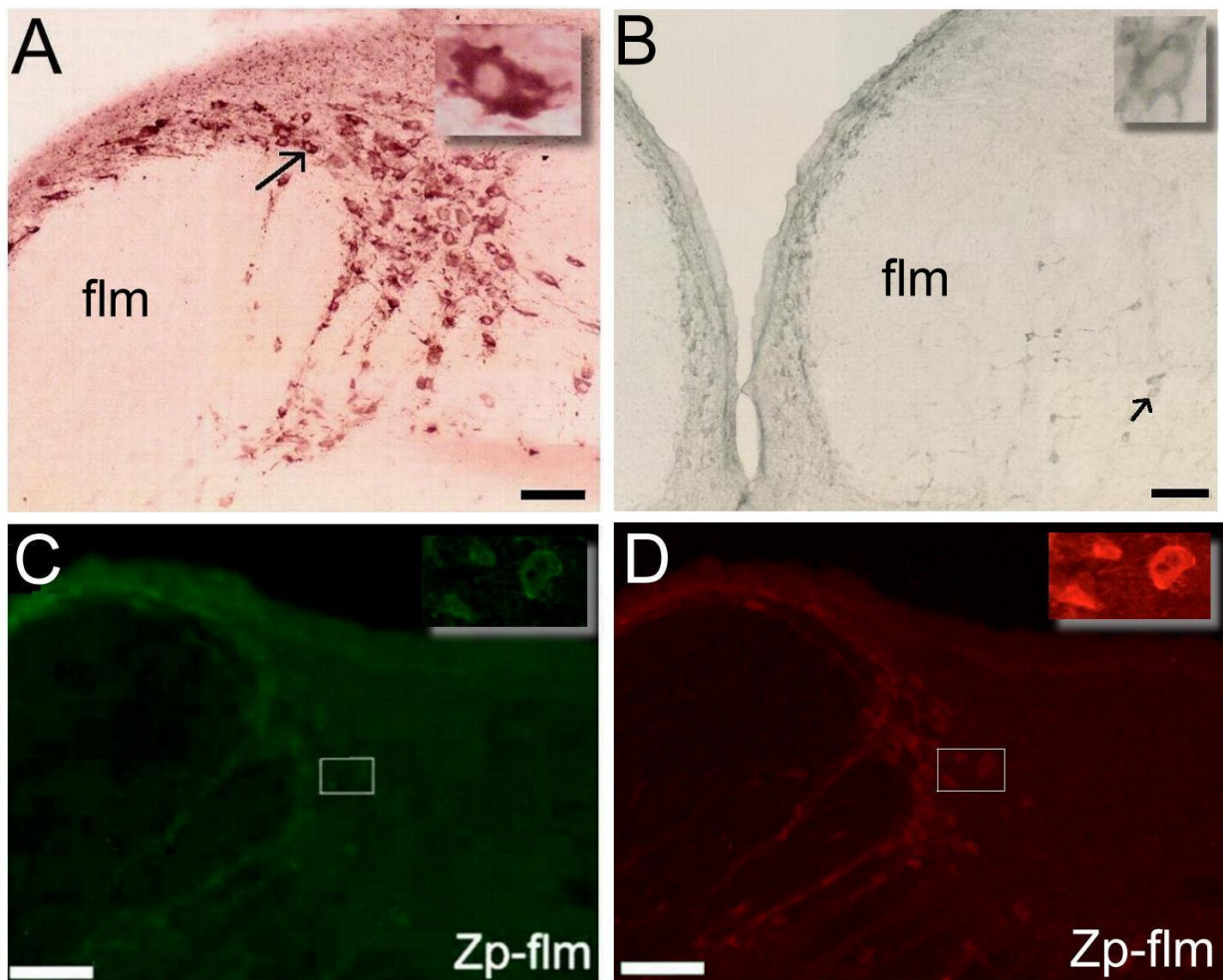


Fig. 18: (A) Neurônios imunorreativos à TPH na Zp-flm. (B) Pericários imunorreativos à 5-HT dentro do flm. (C) e (D) ilustram a colocalização de TPH e 5-HT na Zp-flm, respectivamente. Barra de escala: A-C: 150 μ m. Veja lista para as abreviações.

4.3.5 Área tegmental ventral

Rostral e ventral ao mesencéfalo observam-se um agrupamento com poucos corpos celulares imunorreativos à TPH densamente marcados (Fig. 19 A). Esses somas, imersos em uma moderada rede de fibras varicosas, localizam-se dentro da área tegmental ventral (VTA) e no núcleo tegmental ventrolateral (VT), uma região localizada lateralmente ao núcleo mesencefálico profundo, pars ventral (MPv) e ventralmente ao núcleo tegmental pedúnculo-pontino (TPc), na vizinhança do núcleo da raiz óptica basal (nBOR). Varicosidades e processos neuronais são visualizados em toda a extensão da VTA (Fig. 19 B-C). Nas reações cromogênicas para 5-HT evidenciamos diminuída quantidade de neurônios imunorreativos na VTA (dado não mostrado).

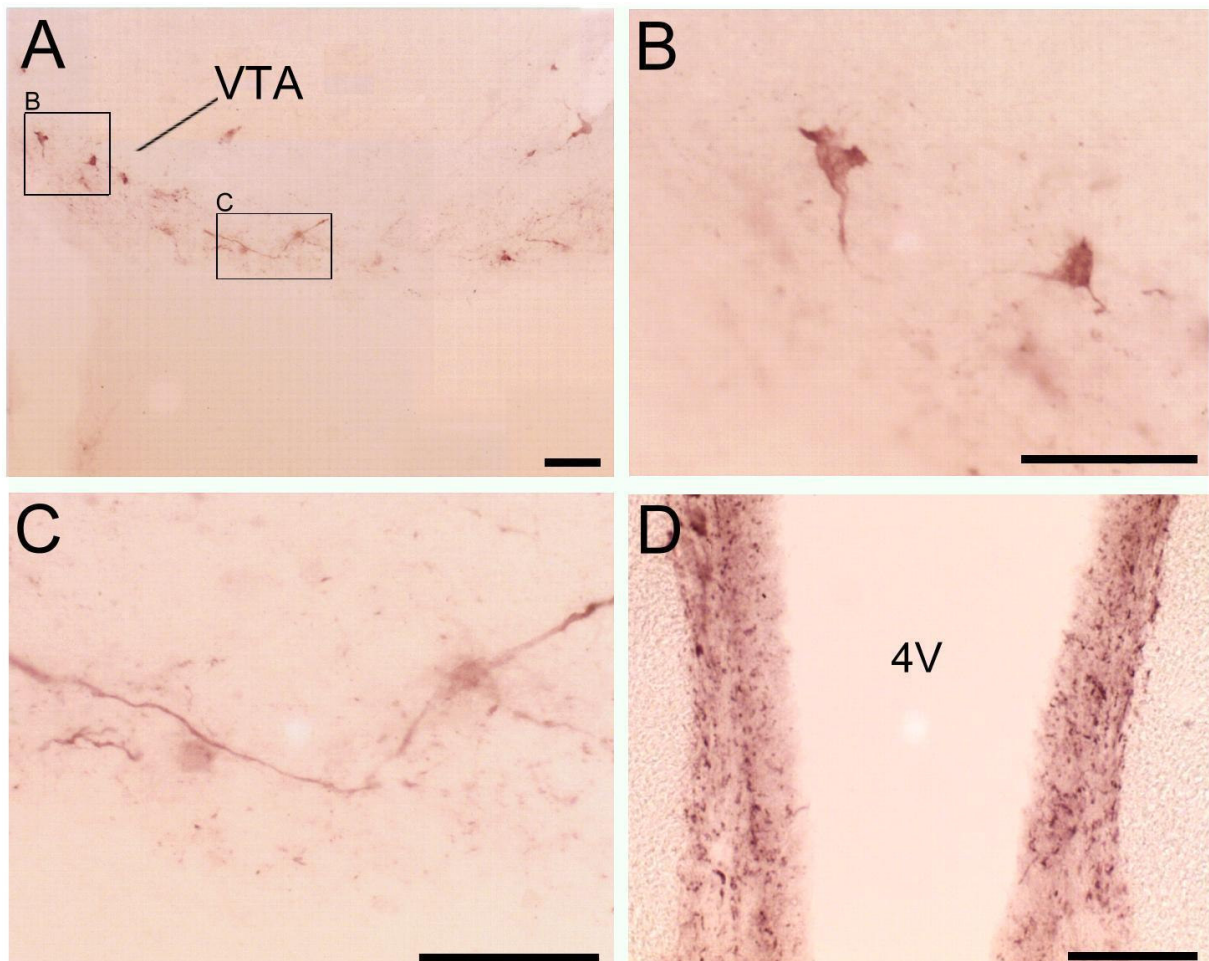


Fig. 19: (A) Neurônios imunorreativos à TPH na VTA. (B) e (C) são magnificações dos quadros em (A) ilustrando os corpos celulares e processos imunorreativos à TPH dentro do VTA, respectivamente. (D) ilustra as varicosidades do epêndima. Barra de escala: A-D: 150µm; B,C: 100µm. Veja lista para as abreviações.

4.3.6 Epêndima

Grande densidade de fibras supra e sub-ependimárias bem como grande quantidade de varicosidades imunorreativas à TPH são visualizadas na porção medial do 4V (Fig. 19 D), formando uma continuidade com o epêndima pontino. Nas reações cromogênicas para 5-HT realizadas nessa investigação, nenhuma estrutura serotoninérgica foi evidenciada nessa região.

4.4 Neurônios imunorreativos à TPH e 5-HT no diencéfalo

4.4.1 Órgão paraventricular

Na região periventricular do hipotálamo posterior, uma quantidade moderada de corpos celulares imunorreativos à TPH foi observada no PVO, o qual consiste em uma estrutura circunventricular (Fig. 20 A). Esses corpos celulares são redondos, com característica radial e dispostos ao redor da camada subependimária do 3V, evidenciando processos bipolares imunorreativos, direcionados ao espaço ventricular ou ao tegmento hipotalâmico (Fig. 20 B). Os processos direcionados ao 3V terminam em protrusões bulbosas na superfície ventricular (veja as ilustrações fluorescentes do PVO).

Neurônios imunorreativos à 5-HT também foram evidenciados no PVO (Fig. 20 C-D). As reações de dupla imunofluorescência demonstraram a presença de TPH e 5-HT simultaneamente nos neurônios bipolares que compõem o PVO. É possível visualizar a existência de protrusões bulbosas dos neurônios do PVO na superfície ventricular (Fig. 20 E-F).

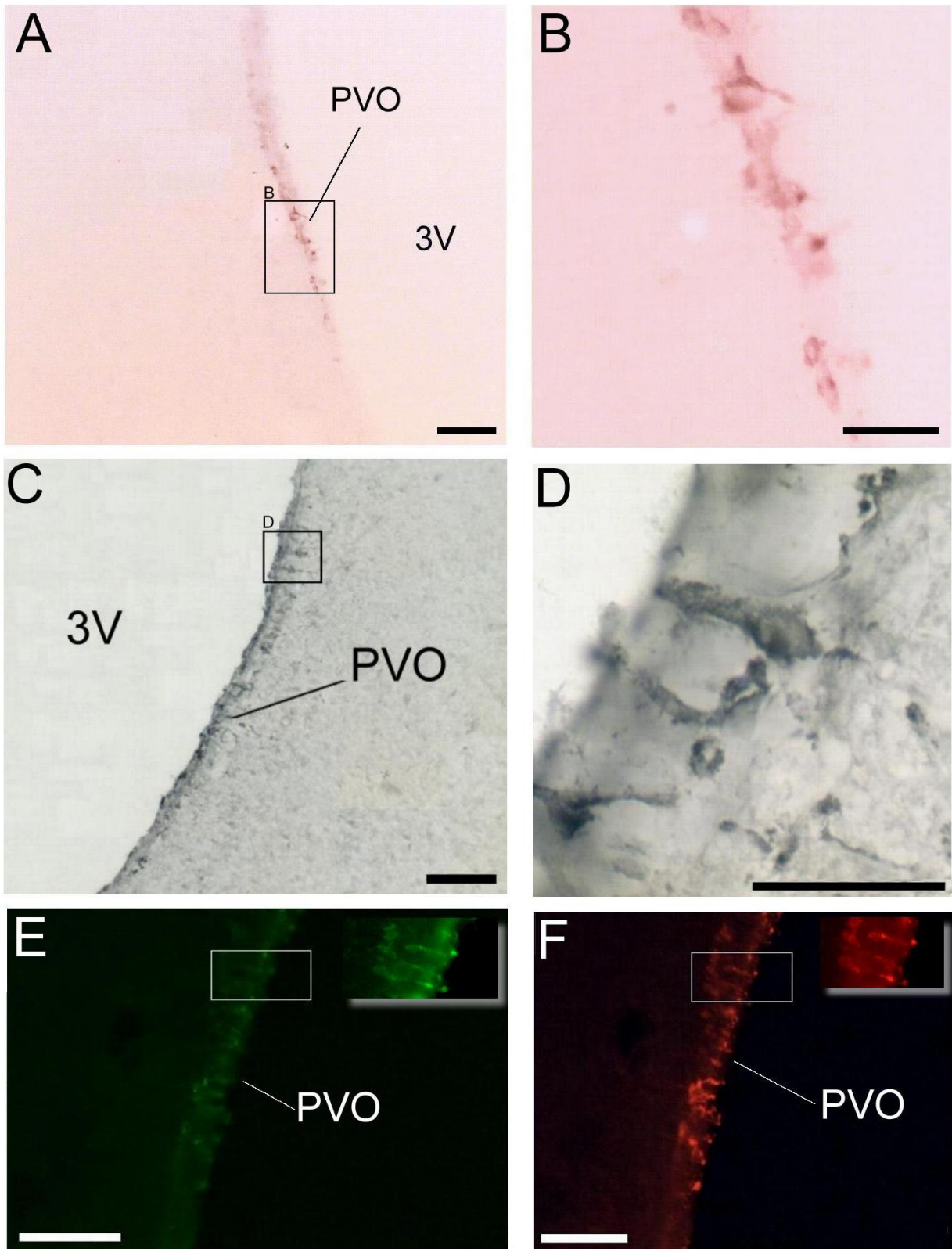


Fig. 20: (A) Neurônios do PVO imunorreativos à TPH. (B) Magnificação do quadro em (A) evidenciando a morfologia de um neurônio do PVO. (C) Neurônios serotoninérgicos do PVO. (D) Magnificação do quadro em (C) evidenciando a morfologia do neurônio imunorreativos à 5-HT do PVO. (E) e (F) ilustram a colocalização de TPH e 5-HT nos neurônios do PVO, respectivamente. Barra de escala: A, C, E, F: 150 μ m; B, D: 50 μ m. Veja lista para as abreviações.

4.4.2 Núcleo infundibular

Neurônios imunorreativos à TPH, densamente marcados e semelhantes aos do PVO em formato e localização periventricular, são observados nas paredes ventriculares do INF (Fig. 21 A-B), as quais constituem o recesso infundibular (Rel). O INF também apresenta imunorreatividade serotoninérgica (Fig. 21 C-D) e, de forma similar ao PVO, também colocalizam TPH e 5-HT em seus neurônios (Fig. 21 E-F).

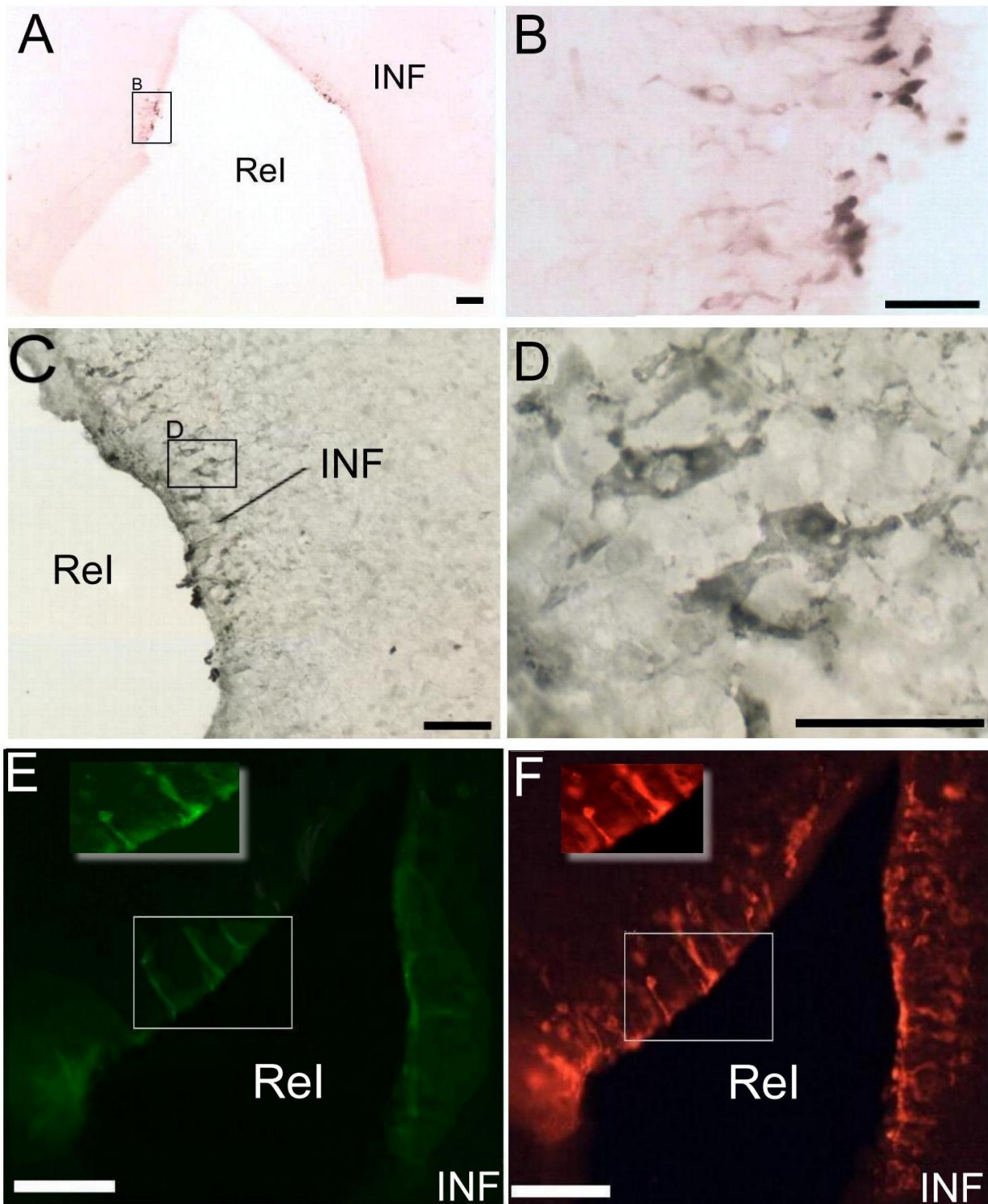


Fig. 21: (A) Neurônios do INF imunorreativos à TPH. (B) Magnificação do quadro em (A) evidenciando a morfologia de um neurônio do INF. (C) Neurônios imunorreativos à 5-HT do INF. (D) Magnificação do quadro em (C) evidenciando a morfologia do neurônio serotoninérgico do INF. (E) e (F) ilustram a colocalização de TPH e 5-HT nos neurônios do INF, respectivamente. Barra de escala: A, C, E, F: 150µm; B, D: 50µm. Veja lista para as abreviações.

4.4.3 Núcleo pré-mamilar

Neurônios imunorreativos à TPH, fortemente marcados, com perfil oval, triangular e fusiforme são visualizados concentrados em um pequeno agrupamento celular na porção medial do hipotálamo caudal, aqui nomeado como PMM (Fig. 22 A-C). Estas células parecem originar-se de um plexo de fibras varicosas que se dispõem medialmente e dorsalmente, estendendo-se até as paredes do 3V. É interessante notar, porém, que na reação cromogênica para 5-HT e também na dupla fluorescência, esse núcleo não apresentou imunorreatividade serotoninérgica, somente mostrou-se reativo à TPH (Fig. 22 D). É possível notar ainda dentro do PMM a presença de neurônios circundando dois vasos calibrosos, os quais atravessam transversalmente o hipotálamo (Fig. 22 E).

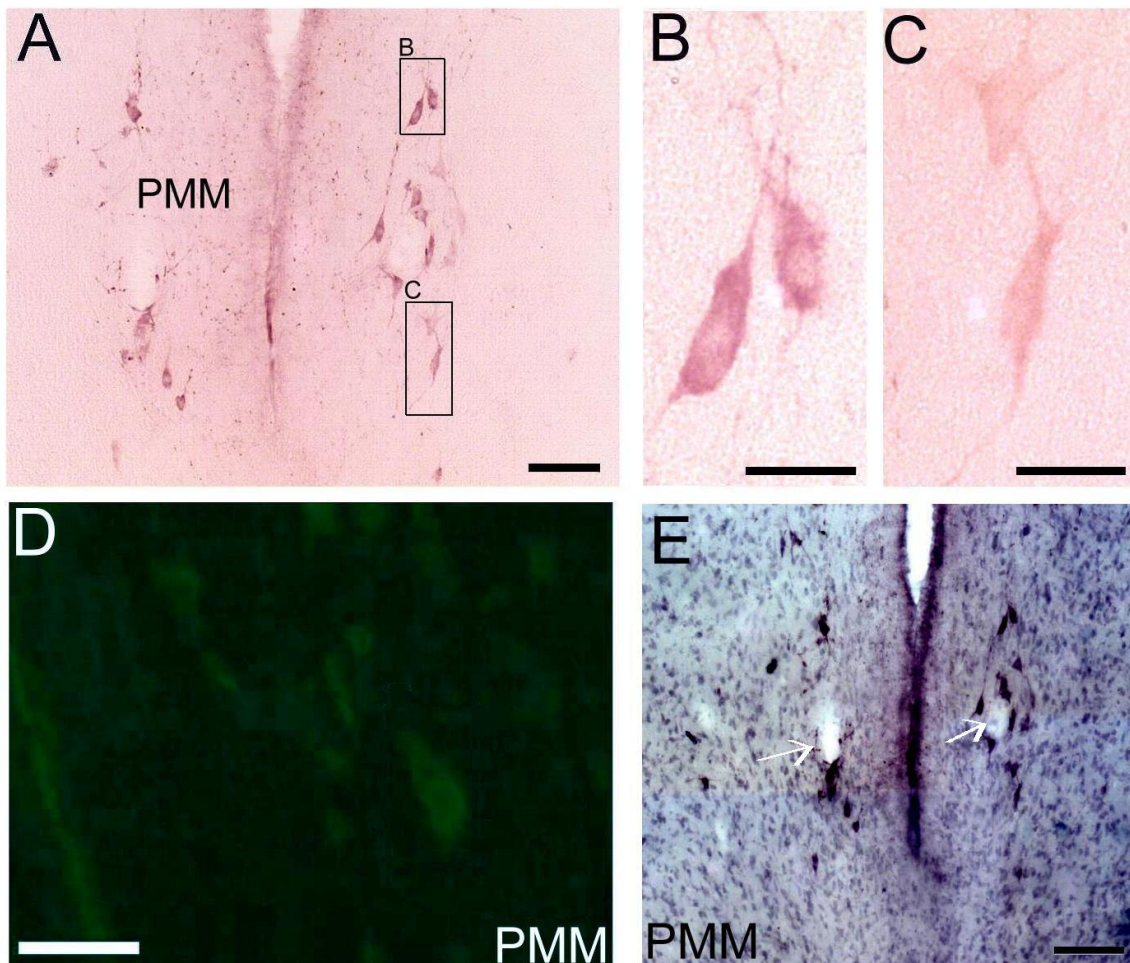


Fig. 22: (A) Neurônios do PMM imunorreativos à TPH. (B) e (C) são magnificações dos quadros em (A) ilustrando a morfologia dos neurônios desse núcleo. (D) Ilustra a reação fluorescente para TPH. (E) Ilustra a marcação Nissl do PMM. A flecha aponta para a presença de neurônios circundando os vasos sanguíneos. Barra de escala: A, C, E, F: 150 μ m; B, D: 50 μ m. Veja lista para as abreviações.

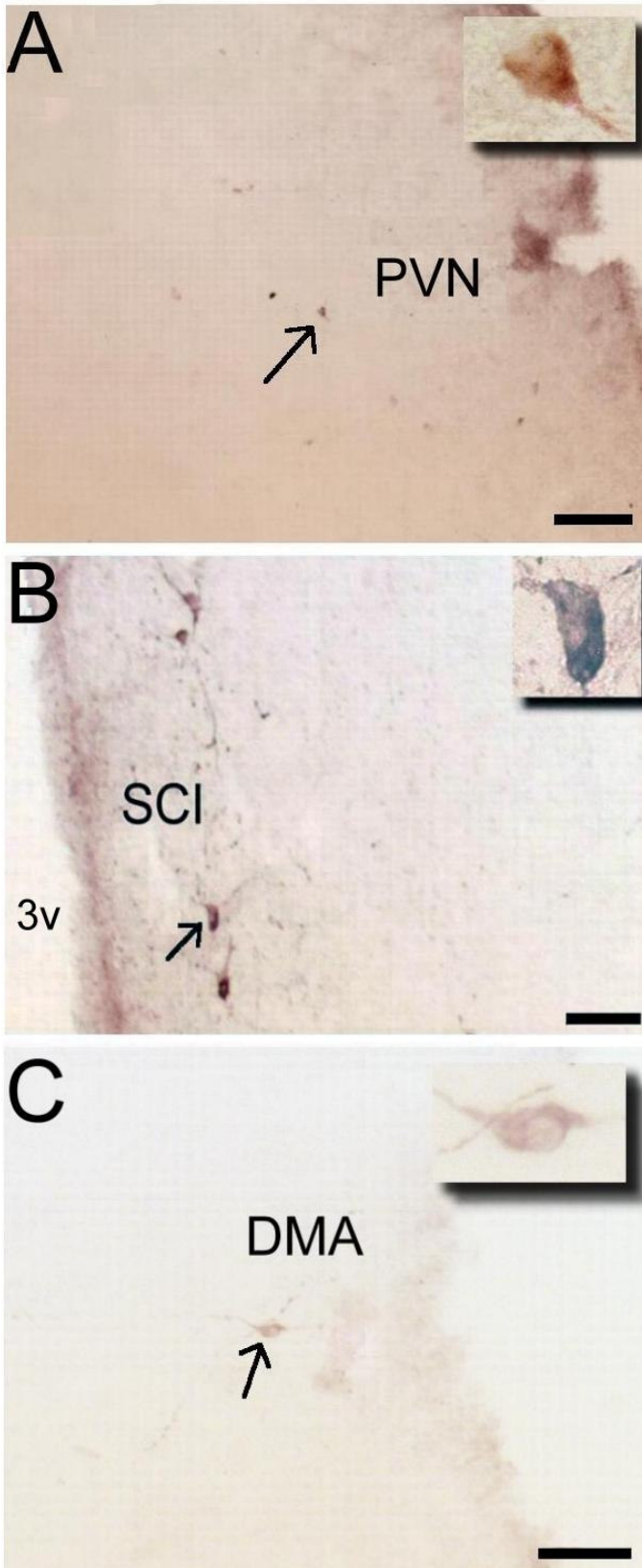


Fig. 23: (A) Neurônios imunorreativos à TPH no PVN. (B) Neurônios imunorreativos à TPH no SCI. (C) Neurônios imunorreativos à TPH no DMA. Barra de escala: A-C: 150 μ m. Veja lista para as abreviações.

4.4.4 Núcleo paraventricular magnocelular

O distrito correspondente ao núcleo paraventricular magnocelular (PVN) apresenta quantidade reduzida de pericários imunorreativos à TPH. Esses corpos celulares são fracamente marcados, apresentando perfis triangulares e fusiformes. Estão localizados difusamente dentro do núcleo e possuem poucos processos neuronais marcados (Fig. 23 A).

4.4.5 Estrato celular interno

No distrito pertencente ao estrato celular interno (SCI) visualiza-se um aglomerado de neurônios densamente marcados, ovais e emitindo poucos prolongamentos (Fig. 23 B). Grande quantidade de varicosidades imunorreativas é visualizada dentro deste núcleo.

4.4.6 Núcleo dorsomedial anterior talâmico

Em uma região correspondente ao núcleo dorsomedial anterior talâmico (DMA), às margens do sulco hipotalâmico, visualiza-se um único neurônio imunorreativo, oval, densamente marcado e apresentando processos igualmente imunorreativos (Fig. 23 C).

4.5 Resumo dos resultados obtidos

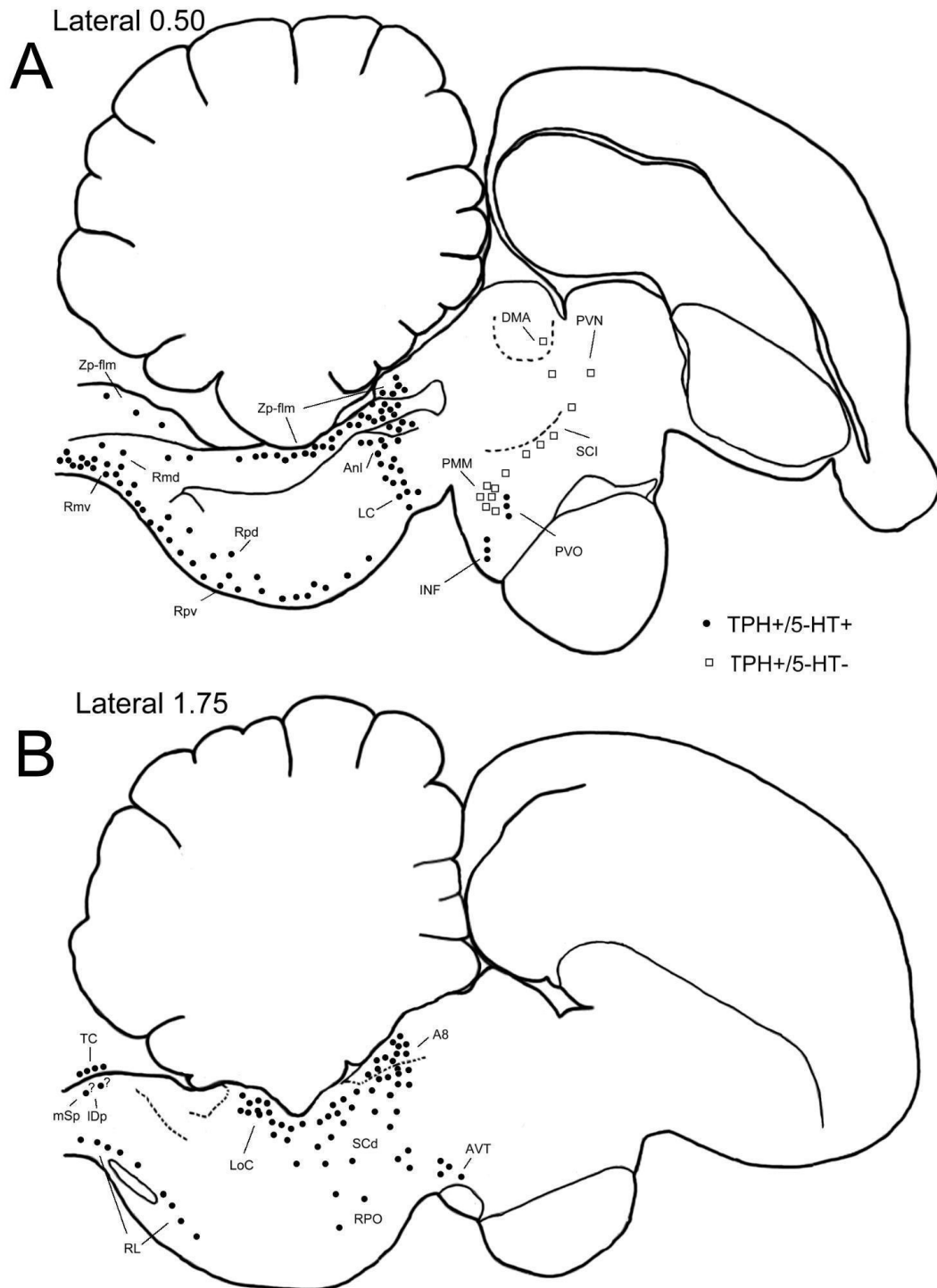


Fig. 24: Desenhos esquemáticos sagitais ilustrando as regiões que colocizam 5-HT e TPH (bolinha preta) e regiões que apresentam apenas a TPH (quadrado vazado). Veja lista para as abreviações.

DISCUSSÃO

Os métodos imuno-histoquímicos e fluorescentes empregados nesses experimentos diferiram em relação à marcação produzida. Nas reações cromogênicas para a TPH a marcação observada foi intensa. Porém nas reações fluorescentes, em decorrência do anticorpo secundário utilizado, a marcação para a TPH foi menos intensa. O contrário a essa situação foi observado com as marcações para 5-HT. A reação cromogênica produziu uma marcação pouco densa, já na fluorescência o anticorpo secundário utilizado produziu marcação citoplasmática abundante e densa.

Os dados do presente estudo representam a primeira descrição detalhada de corpos celulares e processos imunorreativos à TPH no encéfalo de ave. Nossos dados também mostram que a atividade da TPH co-existe com a atividade da 5-HT na maioria dos pericários do tronco encefálico, porém sua colocalização é parcial em algumas regiões hipotalâmicas (Fig. 24).

O anticorpo contra a TPH utilizado no presente estudo possui reatividade com ambas as isoformas de TPH (TPH1 e TPH2) presentes em células do tronco encefálico, hipotálamo, pineal e também em células de intestino (Gershon et al., 1977; Weissmann et al., 1987; Belin et al., 1991; Saland et al., 1993; Vanhatalo e Soinila, 1999; Benarroch et al., 2002; Kruger et al., 2002; Allers e Sharp, 2003; Walther e Bader, 2003). A elevada homologia entre os TPH-cDNAs clonados de aves e mamíferos (Darmon et al., 1988; Grenett et al., 1987; Boularand et al., 1990; Stoll et al., 1990; Florez et al., 1996) e também a homologia interespecífica da seqüência de aminoácidos das isoformas de TPH1 e TPH2 (Walther et al., 2003; Sakowski et al., 2006) e a sua presença em corpos celulares da pineal e tronco encefálico do peru (*Melleagris gallopavo*), respectivamente (Kang et al., 2007), sugerem que as reações observadas no presente estudo possivelmente refletem a atividade da TPH no encéfalo do pombo.

Corroborando esta possibilidade é o fato de que os neurônios imunorreativos à TPH foram observados massivamente presentes no núcleo dorsal da rafe de secções controle do mesencéfalo de ratos que foram processadas junto com as secções do encéfalo do pombo durante a mesma reação imuno-histoquímica (Fig. 2).

Os padrões de distribuição de corpos celulares imunorreativos à TPH no tronco encefálico aqui relatados são semelhantes ao padrão de distribuição observado após os experimentos imuno-histoquímicos com 5-HT no presente estudo. Assemelha-se também ao padrão descrito em estudos prévios sobre a distribuição de células imunorreativas à 5-HT no pombo (Challet et al., 1996; Häckl et al., 2005) e em outras espécies aviárias como na galinha (Sano et al., 1983; Yamada et al., 1984; Yamada e Sano, 1985; Hirunagi et al., 1992) e na codorna (Cozzi et al., 1991; Haida et al., 2004). Os pericários imunorreativos à TPH do bulbo caudal até o mesencéfalo foram localizados em regiões previamente descritas como contendo corpos celulares imunorreativos à 5-HT. Os experimentos de dupla marcação deste estudo revelaram que estes neurônios também exibem 5-HT, sugerindo que eles são verdadeiros neurônios serotoninérgicos e, desta forma, ativamente sintetizadores de 5-HT.

Entretanto, há certas discrepâncias com relação aos prévios resultados de 5-HT em pombos. No presente estudo, corpos celulares imunorreativos à TPH foram encontrados no complexo solitário, povoando a TC e nos subnúcleos IDp e mSp do NTS. Entretanto, imunoreatividade serotoninérgica foi observada apenas na TC. Os subnúcleos IDp e mSp e outras regiões do NTS não mostraram imunoreatividade à 5-HT.

Em um estudo no qual o foco principal era a anatomia química do NTS do pombo, neurônios imunorreativos à 5-HT foram descritos na TC, mas não foram observados no IDp ou no mSp (Berk et al., 1993a). É interessante destacar que, neurônios imunorreativos à 5-HT não são descritos no NTS de outras espécies aviárias (Yamada et al., 1984; Cozzi et al., 1991). Dentre as razões para estes achados divergentes podemos incluir a falta de neurônios imunorreativos à 5-HT nos subnúcleos do NTS e a sua usual fraca marcação nas reações imuno-histoquímicas.

Os neurônios imunorreativos à TPH no NTS foram pouco perceptíveis nas reações fluorescentes. Desta forma é possível que a reduzida quantidade de TPH dentro desses neurônios possa produzir quantidades não detectáveis de 5-HT (através dos nossos procedimentos). Desta forma não se torna possível afirmar se os neurônios do IDp e mSp colocalizam ou não TPH e 5-HT (Fig.24 B)

O complexo do NTS exerce uma importante função na transmissão da informação sensorial visceral para o tronco encefálico e para o prosencéfalo (Katz e Karten, 1983; Berk, 1991; Berk e Smith, 1994) e as regiões contendo TPH podem ser relevantes para esta função. A TC do encéfalo de ave é comparável à AP do mamífero, devido a três fatores: sua posição em relação ao NTS, a presença de um denso plexo vascular livre de barreira hemato-encefálica e a presença de neurônios catecolaminérgicos projetando-se para o tronco encefálico (Katz e Karten, 1983; Berk, 1991). As células da TC podem detectar mudanças químicas no sangue e transmitir esta informação para o bulbo ventrolateral e região parabraquial (Arends et al., 1988; Berk, 1991; Berk e Smith, 1994). É interessante notar que a presença de neurônios imunorreativos à 5-HT na TC contribui para esta comparação, uma vez que a AP de mamífero possui uma densa rede de corpos celulares imunorreativos à 5-HT (Takeuchi e Sano, 1983), bem como pericários imunorreativos à TPH (Weissmann et al., 1987).

Na divisão lateral e medial do NTS, os subnúcleos IDp e mSp respectivamente, contêm numerosos neurônios catecolaminérgicos que inervam o PVN e outras regiões prosencefálicas (Berk, 1991; Berk et al., 1993b; Moons et al., 1994; Marino-Neto e Armengol, 2000). Estas regiões são também importantes alvos de projeções hipotalâmicas e prosencefálicas descendentes (Berk, 1991). Enquanto a presença de fibras imunorreativas à 5-HT no NTS tem sido repetidamente relatada em primatas, carnívoros e roedores, células imunorreativas à 5-HT não foram relatadas dentro desses núcleos (Calzá et al., 1985; Weissmann et al., 1987; Maley, 1996).

O presente estudo sugere que diversos núcleos diencefálicos localizados nas paredes periventriculares contêm corpos celulares imunorreativos à TPH, porém apenas nos agrupamentos celulares circunventriculares do PVO e do INF encontramos células que co-expressam imunorreatividade serotoninérgica (Fig. 24 A).

O PVO é um órgão circunventricular, presente no hipotálamo de vertebrados não-mamíferos, composto por neurônios bipolares que contactam o fluido cérebro-espinhal através de seus dendritos, pericários e axônios. Devido à estrutura dessas células nervosas, foi atribuída uma função sensorial a elas (Vigh-Teichmann e Vigh, 1983; Vigh-Teichmann e Vigh, 1989). Seu epêndima forma um sulco bilateralmente nas paredes do 3º ventrículo e seus neurônios são altamente sensíveis à composição do fluido cérebro-espinhal ventricular (George e Meissl, 1987).

Uma das características mais notáveis dos neurônios que compõem o PVO são as protrusões bulbosas encontradas na sua superfície ventricular, como pode ser visualizada na Fig. 9-B, página 44 de Mestres e Rascher (1994). Esta superfície é uma zona de células justapostas com pólos apicais globulares que protudem para dentro do ventrículo. O tamanho destas estruturas no pombo é semelhante ao observado no pardal, no pato e na codorna. As protrusões observadas no pombo são bastante uniformes em formato e tamanho. Estas protrusões podem apresentar formato de bolha ou dedo como pode ser visualizado na Fig. 9-C e Fig. 9-E, página 44 de Mestres e Rascher (1994). Estas estruturas celulares especializadas parecem corresponder aos processos imunorreativos à TPH e 5-HT aqui observados (veja figuras 20 E-F e 21 E-F).

O sistema de neurônios do PVO, os quais contactam o fluido cérebro-espinhal, está presente, além de vertebrados não-mamíferos, nos mamíferos prototérios (Manger et al., 2002). Esta estrutura contêm pericários imunorreativos à 5-HT em répteis como na tartaruga (Sano et al., 1983) e no crocodilo (Rodrigues et al., 2008); e em aves como em pombos (Hirunagi et al., 1992; Challet et al., 1996), codorna (Cozzi et al., 1991; Haida et al., 2004) e galinha (Sano et al., 1983; Yamada et al., 1984; Hirunagi et al., 1992).

No estudo realizado com equídnas e ornitorrincos (mamíferos que pertencem à ordem Monotremata, ou seja, são ovíparos) evidenciou-se a presença de 5-HT dentro dos neurônios do PVO. Estes autores sugerem que é possível que a habilidade dos neurônios serotoninérgicos do hipotálamo de monotremos em produzir 5-HT é perdida nos mamíferos eutérios (placentários), porém estes mamíferos poderiam ter um grupo de neurônios no hipotálamo com a habilidade de acumular 5-HT (Manger et al., 2002). Esta habilidade de acumular 5-HT foi demonstrada por Fuxe e Ungerstedt (1967) após administração de 5-HT ICV em ratos pré-tratados com reserpina e um inibidor da MAO. Segundo esses autores, a 5-HT administrada ICV acumula-se especificamente dentro de neurônios serotoninérgicos localizados próximos dos ventrículos.

A mesma situação aplica-se às células imunorreativas à TPH e 5-HT presentes no INF. O INF, o qual contorna as paredes ventriculares do Rel, localiza-se caudalmente ao quiasma óptico e estende-se para dentro da neuro-hipófise (Mestres e Rascher, 1994). Nesta região, células contactando o fluido cérebro-espinhal imunorreativas à 5-HT tem sido observadas em répteis, como na tartaruga (Sano et al., 1983); nas aves, como em pombos (Reiner et al., 1994; Challet et al., 1996), codornas (Haida et al., 2004) e galinhas (Ikeda e Gotoh, 1971); e em mamíferos prototérios, como a equídna e o ornitorrinco (Manger et al., 2002).

As células ependimárias da superfície ventricular do INF e do PVO foram descritas detalhadamente nos pombos (Mestres and Rascher, 1994). No primeiro, além de típicos processos contendo microvilosidades, pequenas protrusões e cílios únicos (correspondendo aos tanicitos), há também estruturas apicais semelhante à cabeça com cílios únicos sobre uma superfície lisa e processos com uma superfície semelhante a botões em protrusão para dentro do espaço ventricular como podem ser visualizados na Fig. 7 B-D, página 42 de Mestres e Rascher (1994). Enquanto que no PVO, os processos celulares apicais globulares projetam-se para dentro do ventrículo.

Estas células serotoninérgicas do INF e PVO parecem estar idealmente situadas de modo a modificar a composição do fluido cérebro-espinhal através de informações hipotalâmicas e/ou influenciar funções neuroendócrinas através de sinais hipotalâmicos para o fluido cérebro-espinhal (Calas, 1975). A região infundibular assume uma importante posição na regulação neuroendócrina através da eminência mediana e da neuro-hipófise (Mestres e Rascher, 1994).

Substâncias neuroativas têm sido encontradas nas células que contactam o fluido cérebro-espinhal dos vertebrados não-mamíferos, incluindo catecolaminas, neuropeptídeo Y, substância P, galanina e 5-HT (Meek e Joosten, 1993; Batten et al., 1993; Molist et al., 1993; Lowry et al., 1996; Challet et al., 1996; Vetillard et al., 2002; Vigh et al., 2004). As células do PVO aviário não possuem imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH), a enzima limitante de síntese de catecolaminas, para dopamina- β -hidroxilase e para noradrenalina, mas são intensamente imunorreativas para dopamina (Reiner et al., 1983; Kiss e Péczeley, 1987; Baillach e Balthazart, 1993; Botjer, 1993; Reiner et al., 1994; Moons et al., 1994; Guglielmone, 1995; Moons et al., 1995), sugerindo que esta monoamina é capturada de fontes externas pelas células do PVO.

Os dados deste estudo sugerem que a 5-HT pode ser sintetizada diretamente por estas células circunventriculares, devido à presença de TPH. Adicionadas às células serotoninérgicas presentes na TC e ao massivo plexo de fibras subventriculares capazes de sintetizar 5-HT observadas nas paredes ventriculares mediais, estas células podem constituir um componente de um circuito serotoninérgico circunventricular com funções desconhecidas.

Contrastando com as células do PVO, os resultados aqui obtidos indicam que o PMM, um núcleo hipotalâmico caudal, contém pericários imunorreativos à TPH, porém com ausência de imunorreatividade serotoninérgica. O PMM parece corresponder ao grupo catecolaminérgico A11 no hipotálamo aviário (Kuenzel e van

Tienhoven, 1982; Kiss e Péczely, 1987; Bailhache e Balthazart, 1993; Reiner et al., 1994). Já foi evidenciado que esse núcleo contém neurônios imunorreativos à TPH que co-expressam TH e melatonina no peru (Thayananuphat et al., 2007a; Thayananuphat et al., 2007b, Kang et al., 2007). Estes autores também evidenciaram que os neurônios do PMM do peru expressam a isoforma TPH1 (a enzima-chave na biossíntese de melatonina), e a 5-HT N-acetiltransferase (a enzima regulatória na síntese de melatonina), mas não a isoforma TPH2 (que é a enzima limitante na via sintética de 5-HT). Nestas aves, a TH e a TPH desses neurônios são expressas em ritmo circadiano e podem estar funcionalmente relacionadas com mecanismos neuroendócrinos do comportamento reprodutivo aviário.

A presença destes atributos funcionais em outras espécies aviárias precisa ser examinada, porém a ausência de imunorreatividade serotoninérgica no PMM do pombo pode sugerir que as células imunorreativas à TPH observadas neste núcleo possam estar envolvidas na síntese de melatonina. Se esta especulação é verdadeira, a presença de um agrupamento de células hipotalâmicas sintetizadoras de melatonina em ordens separadas, como os Columbiformes (pombo) e os Galliformes (peru), pode sugerir que esta é uma característica conservada e funcionalmente relevante nas espécies aviárias.

No hipotálamo de roedores adultos, corpos celulares imunorreativos à TPH foram observados na parte dorsal do núcleo hipotalâmico posterior, na camada subependimária, na parte ventral do DMN, no núcleo periventricular, núcleo arqueado e na zona incerta (Weismann et al., 1987; Vanhatalo e Soinila, 1995; Vanhatalo e Soinila, 1996; Vanhatalo e Soinila, 1999).

Os neurônios imunorreativos à TPH dos núcleos arqueado e periventricular enviam axônios para a glândula pituitária e, semelhante ao observado no PMM do peru, foi evidenciado perfil dopaminérgico nessas células. Além de expressar imunorreatividade para TH (correspondendo aos agrupamentos catecolaminérgicos A11 e A12) e ser desprovido de imunorreatividade serotoninérgica mesmo após o pré-tratamento com L-triptofano e pargilina (Vanhatalo

e Soinila, 1995; Vanhatalo e Soinila, 1999). Os neurônios dopaminérgicos A13 da zona incerta também mostraram colocalização similar de TH e TPH e ausência de síntese de 5-HT (Vanhatalo e Soinila, 1996).

Essas populações celulares contrastam com os neurônios imunorreativos à 5-HT observados no DMN, que foram evidenciados ser desprovidos de imunorreatividade para TPH (Vanhatalo e Soinila, 1998), desse modo provavelmente captando a 5-HT de fontes externas.

As funções da TPH presente em neurônios catecolaminérgicos hipotalâmicos de mamíferos são desconhecidas. A expressão desta enzima pode estar relacionada com a síntese de outros compostos, como por exemplo, a melatonina. Estudos na literatura sobre a presença de neurônios melatoninérgicos no hipotálamo de mamíferos são raros e, portanto, existe a necessidade de maiores investigações. Desta forma, a presença de neurônios com atributos topográficos e neuroquímicos comparáveis no hipotálamo periventricular da ave sugere que eles podem representar uma característica comum e possivelmente importante no diencefalo de amniotas.

O sistema serotoninérgico no encéfalo de vertebrados tem demonstrado atributos estáveis em diferentes taxa. A estabilidade de neurônios contendo 5-HT em regiões do tronco encefálico e diencefalo evidencia o papel atuante desse neurotransmissor em inúmeros comportamentos. Parece possível que os neurônios que contactam o fluido cérebro-espinhal possam liberar 5-HT para dentro do 3V e, desta forma, ativar sistemas de receptores serotoninérgicos peri e paraventriculares obtendo uma ativação global desse sistema. Esta transmissão em volume de 5-HT no fluido cérebro-espinhal pode facilitar a coordenação entre atividades comportamentais e neuroendócrinas do pombo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, J.K., JOHNSON, P.L. A., HAY-SCHMIDT, B.J.D., MIKKELSEN, B. C. A., SHEKHARD, E. C. A., LOWRY, A. 2005. Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. *Neuroscience*. 133, 983–997.

ALENINA, N., BASHAMMAKH, S., BADER, M. 2006. Specifications and differentiation of serotonergic neurons. *Stem Cell Rev.* 2, 5-10.

ALESCI, R., BAGNOLI, P. 1988. Endogenous levels of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in specific areas of the pigeon CNS: effects of serotonin neurotoxins. *Brain Res.* 450, 259-271.

ALLERS, K. A. and SHARP, T. 2003 Neurochemical and anatomical identification of fast and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods in vivo *Neuroscience*. 122, 193–204.

ARENDS, J.J.A., WILD, J.M., ZEIGLER, H.P. 1988. Projections of the nucleus of the solitary tract in the *Columba livia*. *J. Comp. Neurol.* 278, 405-429.

BAILHACHE, T., BALTHAZART, J. 1993. The catecholaminergic system of the quail brain : immunocytochemical studies of dopamine β -hydroxylase and tyrosine hydroxylase. *J. Comp. Neurol.* 329, 230-256.

BATTEN, T.F., BERRY, P.A., MAQBOOL, A., MOONS, L., VANDESANDE, F. 1993. Immunolocalization of catecholamine enzymes, serotonin, dopamine and L-dopa in the brain of *Dicentrarchus labrax* (Teleostei). 31, 233-252.

BELIN, M.F., FEVRE-MONTANGE, M., REBOUL, A., DIDIER-BAZES, M., EHRET, M., MAITRE, M., TARDY, M. 1991. Primary dissociated cell culture of embryonic rat metencephalon: presence of GABA in serotonergic neurons. *Neurosci. Lett.* 29, 101-106.

BENARROCH, E.E., SCHMEICHEL, A.M., PARISI, J.E. 2002. Depletion of mesopontine cholinergic and sparing of raphe neurons in multiple system atrophy. *Neurology*. 59: 944-946.

BERK, M.L. 1991. Distribution and Hypothalamic Projection of Tyrosine-Hydroxylase Containing Neurons of the Nucleus of the Solitary Tract in the Pigeon. *J. Comp. Neurol.* 312, 391-403.

BERK, M.L., SMITH, S.E. 1994. Local and Commissural Neuropeptide-Containing Projections of the Nucleus of the Solitary Tract to the Dorsal Vagal Complex in the Pigeon. *J. Comp. Neurol.* 347, 369-396.

BERK, M.L., SMITH, S.E., KARTEN, H.J. 1993a. Nucleus of the Solitary Tract and Dorsal Motor Nucleus of the Vagus Nerve of the Pigeon: Localization of Peptide and 5-Hydroxytryptamine Immunoreactive Fibers. *J. Comp. Neurol.* 338, 521-548.

BERK, M.L., SMITH, S.E., MULLINS, L.A. 1993b. Distribution, Parabrachial Region Projection, and Coexistence of Neuropeptide and Catecholamine Cells of the Nucleus of the Solitary Tract in the Pigeon. *J. Comp. Neurol.* 327, 416-441.

BOTTJER, S.W. 1993. The distribution of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the brains of male and female zebra finches. *J. Neurobiol.* 24, 51-69.

BOULARAND S., DARMON M.C., GANEM, Y., LAUNAY, J.M., MALLETT, J. 1990. Complete coding sequence of human tryptophan hydroxylase. *Nucleic Acids Res.* 18, 4257.

BOUWKNECHT, J.A., SPIGA, F., STAUB, D.R., HALE, M.W., SHEKHAR, A., LOWRY, C.A. 2007. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: Relationship to Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res. Bull.* 72, 32-43.

BRAAK, H., BAUMGARTEN, H.G., FALCK, B. 1968. 5-Hydroxytryptamine im Gehirn der Eidechse (*Lacerta viridis* und *Lacerta muralis*). *Z. Zellforsch.* 90, 161-185.

- BRUN S.R.M.; LUZ V.; FERNANDEZ M.F.; PASCHOALINI M.A.; MARINO-NETO J. 2001. Atypical angiotensin receptors may mediate water intake induced by central injections of angiotensin II and of serotonin in pigeons. *Reg. Peptides*. 98, 127-135.
- CALAS, A. 1975. The avian median eminence as a model for diversified neuroendocrine routes. In *Brain-endocrine Interaction II. The Ventricular System in Neuroendocrine Mechanisms* (ed. K. M. Knigge, D. E. Scott & A. Weindl), pp. 54-69. Basel: Karger.
- CALZÁ, L., GIARDINO, L., GRIMALDI R., RIGOLI, M., STEINBUSCH, HW, TIENGO, M. 1985. Presence of 5-HT-positive neurons in the medial nuclei of the solitary tract. *Brain Res.* 347, 135-139.
- CHALETT, E., MICELI, D., PIERRE, J., REPÉRANT, J., MASICOTTE, G., HERBIN M., VESSELKIN, N.P. 1996. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the brain of the pigeon (*Columba livia*). *Anat. Embryol.* 193, 209-227.
- CHUNG, Y.I., PARK, D.H., KIM, M., BAKER, H., JOH, T.H. 2001. Immunochemical characterization of brain and pineal tryptophan hydroxylase. *J. Korean Med. Sci.* 16, 489-497.
- COON, S.L., MAZURUK, K., BERNARD, M., ROSEBOOM, P.H., KLEIN, D.C., RODRIGUEZ, I.R. 1996. The human serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87) gene (AANAT): structure, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics.* 34, 76-84.
- COOPER, J.R., BLOOM, F.E., ROTH, R.H. 1996. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. New York: Oxford University Press. p.355.
- COZZI, B., VIGLIETTI-PANZICA, C., ASTE, N., PANZICA, G.C. 1991. The serotonergic system in the brain of the Japanese quail. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 263, 271-284.
- DA SILVA R.A., DA SILVA A.S.S, POFFO M. J., RIBAS, D.C., FARIA MS, MARINO-NETO J., PASCHOALINI, M.A. 2007. Feeding behavior after metergoline or GR-46611 injections into the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pigeon *Behavioural Brain Research* 179, 248-257

DAHLSTRÖM, A., FUXE, K. 1964. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 232, 1-55.

DARMON, M.C., GUIBERT, B., LEVIEL, V., EHRET, M., MAITRE, M, MALLET, J. 1988. Sequence of two mRNAs encoding active rat tryptophan hydroxylase. *J. Neurochem.* 51, 312–316.

DICKE, U., WALLSTEIN, M., ROTH, G. 1997. 5-HT-like immunoreactivity in the brains of plethodontid and salamandrid salamanders (*Hydromantes italicus*, *Hydromantes genei*, *Plethodon jordani*, *Desmognathus ochrophaeus*, *Pleurodeles waltl*): an immunohistochemical and biocytin double-labelling study. *Cell Tissue Res.* 287, 513-523.

DWARIKA, S., MASEKO, B.C., IHUNWO, A.O., FUXE, K., MANGER, P.R. 2008. Distribution and morphology of putative catecholaminergic and serotonergic neurons in the brain of the greater canerat, *Thryonomys swinderianus*. *J. Chem. Neuroanat.* 35, 108-122.

EKSTRÖM, P., EBBESSON, S.O. 1989. Distribution of serotonin-immunoreactive neurons in the brain of sockeye salmon fry. *J. Chem. Neuroanat.* 2, 201-213.

FALCK, B., HILLARP, N.A., THIEME, G., TORP, A., 1962. Fluorescence of catecholamines and related compounds with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.* 10, 348–354.

FLOREZ, J.C., SEIDENMAN, K.J., BARRETT, R.K., SANGORAM, A.M., TAKAHASHI, J.S. 1996. Molecular cloning of chick pineal tryptophan hydroxylase and circadian oscillation of its mRNA levels. *Mol. Brain Res.* 42, 25-30.

FRANKFURT, M., LAUDER, J.M., AZMITIA, E.C. 1981. The immunocytochemical localization of serotonergic neurons in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett.* 24, 227-232.

FUXE, K., LJUNGGREN, L. 1965. Cellular localization of monoamines in the upper brain stem of the pigeon. *J. Comp. Neurol.* 125, 355-382.

FUXE, K., UNGERSTEDT, U. 1967. Localization of 5-hydroxytryptamine uptake in rat brain after intraventricular injection. *J. Pharm. Pharmacol.* 19, 335-337.

GABALDON, A.M., LOBNER, J.K., SAAVEDRA, S.L., WALLACE, J.A. 1992. Tryptophan hydroxylase-immunoreactive neurons occur in the hypothalamus of the chick embryo. *Soc. Neurosc. Abstract.* 18, 1471.

GEORGE, S. R., H. MEISSEL. 1987. An attempt to record neuronal activity in the paraventricular organ of *Rana esculenta* by means of a direct access to the infundibular recess. *Cell Tiss. Res.* 250, 53-56.

GERSHON, M.D., DREYFUS, C.F., PICKEL, V.M., JOH, T.H., REIS, D.J. 1977. Serotonergic neurons in the peripheral nervous system: identification in gut by immunohistochemical localization of tryptophan hydroxylase. *P. Natl Acad. of Sci. USA.* 74, 3086-3089.

GRAHAME-SMITH, D.G. 1964. Tryptophan hydroxylation in brain. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 16, 586-592.

GRENETT, H.E., LEDLEY, F.D., REED, L.L., WOO, S.L. 1987. Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *P. Natl Acad. of Sci. USA* 84, 5530-5534.

GUGLIELMONE, R. 1995. Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the paraventricular organ and in the spinal cord of the quail embryo: a fluorescence-histochemical study. *Cell Tissue. Res.* 281, 163-168.

HÄCKL, L.P.N., RICHTER, G.O., FARIA, M.S., PASCHOALINI, M.A., MARINO-NETO, J. 2005. Behavioral effects of 8-OH-DPAT injections into pontine and mesencephalic areas containing 5-HT-immunoreactive perikarya in the pigeon. *Brain Res.* 1035, 154-167.

HAIDA, Y., UBUKA, T., UKENA, K., TSUTSUI, K., OISHI, T., TAMOTSU, S. 2004. Photoperiodic response of serotonin- and galanin-immunoreactive neurons of the paraventricular organ and infundibular nucleus in Japanese Quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Zool. Sci.* 21, 575-582.

HAYCOCK, J.W., KUMER, S.C., LEWIS, D.A., VRANA, K.E., STOCKMEIER, C.A. 2002. A monoclonal antibody to tryptophan hydroxylase: applications and identification of the epitope. *J. Neurosci. Meth.* 114, 205-212.

HIRUNAGI, K., HASEGAWA, M., VIGH, B., VIGH-TEICHMANN, I. 1992. Immunocytochemical demonstration of serotonin-immunoreactive cerebrospinal fluid-contacting neurons in the paraventricular organ of pigeons and domestic chickens. *Brain Res.* 91, 327-330.

IKEDA, H., GOTOH, J. 1971. Distribution of monoamine-containing cells in the central nervous system of the chicken. *J. Pharmacol.* 21, 763-784.

JONNAKUTY, C., GRAGNOLI, C. 2008. What do we know about serotonin? *J. Cell. Physiol.* 217, 301-306.

KANG, S.W., THAYANANUPHAT, A., BAKKEN, T., EL HALAWANI, M.E. 2007. Dopamine-melatonin neurons in the avian hypothalamus controlling seasonal reproduction. *Neuroscience.* 150, 223-233.

KARASEK, M. 2007. Does melatonin play a role in aging processes? *J. Physiol. Pharmacol.* 58, 105-113.

KARTEN, H.J., HODOS, W.A. 1967. A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*). Baltimore: Johns Hopkins Press.

KATZ, D.M., KARTEN, H.J. 1983. Visceral representation within the nucleus of the tractus solitarius in the pigeon, *Columba livia*. *J. Comp. Neurol.* 218, 42-73.

KISS, J.Z., PÉCZELY, P. 1987. Distribution of tyrosine hydroxylase (TH)-immunoreactive neurons in the diencephalon of the pigeon (*Columba livia domestica*). *J. Comp. Neurol.* 257 (3), 333-346.

KRUGER, G.M., MOSHER, J.T., BIXBY, S., JOSEPH, N., IWASHITA, T., MORRISON, S. 2002. Neural Crest Stem Cells Persist in the Adult Gut but Undergo Changes in Self-Renewal, Neuronal Subtype Potential, and Factor Responsiveness. *Neuron.* 35: 657-669.

KUENZEL, W.J., van TIENHOVEN, A. 1982. Nomenclature and location of avian hypothalamic nuclei and associated circumventricular organs. *J. Comp. Neurol.* 206, 293-313.

LOWRY, C.A., RENNER, K.J., MOORE, F.L. 1996. Catecholamines in the central nervous system of a urodele amphibian: a microdissection study with emphasis on the distribution of epinefrine. *Brain Behav. Evol.* 48, 70-93.

MAEDA, T., FUJIMIVA, M., KITAHAMA, K., KIMURA, H. 1989. Serotonin neurons and their physiological roles. *Arch. Histol. Cytol.* 52, 113-120.

MALEY, B.E. 1996. Immunohistochemical Localization of Neuropeptides and Neurotransmitters in the Nucleus Solitarius. *Chem. Senses* 21, 367-376.

MANGER, P.R., FAHRINGER, H.M., PETTIGREW, J.D., SIEGEL, J.M. 2002. The Distribution and Morphological Characteristics of Serotonergic Cells in the Brain of the Monotremes. *Brain Behav. Evolut.* 60, 315-32.

MARINO-NETO J., ARMENGOL, J.A. 2000. Phenylethanolamine N-methyltransferase-immunoreactive neurons in the medulla oblongata of the pigeon (*Columba livia*) projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Behav. Evol.* 56, 184-195.

MEEK, J., JOOSTEN, H.W. 1993. Tyrosine hydroxylase immunoreactive cell groups in the brain of the teleost fish *Gnathonemus petersii*. *J. Chem. Neuroanat.* 6, 431-446.

MESTRES, P., RASCHER, K. 1994. The ventricular system of the pigeon brain: scanning electron microscope study. *J. Anat.* 184, 35-58.

METZGER, M., TOLEDO, C., BRAUN, K. 2002. Serotonergic innervation of the telencephalon in the domestic chick. *Brain Res. Bull.* 57, 547-551.

MICELI, D., REPE´RANT, J., RIO, J.P., HAINS P., MEDINA, M. 2002. Serotonin immunoreactivity in the retinal projecting isthmo-optic nucleus and evidence of brainstem raphe connections in the pigeon. *Brain Res.* 958, 122–129.

MICHELSSEN, K.A., SCHMITZ, C., STEINBUSCH, H.W.M. 2007. The dorsal raphe nucleus – From silver stainings to a role in depression. *Brain Res. Rev.* 55, 329-342.

MOHAMMAD-ZADEH, L.F., MOSES, L., GWALTNEY-BRANT, S.M. 2008. Serotonin: a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 31, 187-199.

MOLIST, P., RODRÍGUES-MOLDES, I., ANADÓN, R. 1993. Organization of catecholaminergic systems in the hypothalamus of two elasmobranch species, *Raja undulata* and *Scyliorhinus canicula*. A histofluorescence and immunohistochemical study. *Brain Behav. Evol.* 41, 290-302.

MOONS, L., D'HONDT, E., PIJCKE, K., VANDESANDE, F. 1995. Noradrenergic system in the chicken brain: immunocytochemical study with antibodies to noradrenaline and dopamine-beta-hydroxylase. *J Comp Neurol.* 360, 331-48.

MOONS, L., van GILS, J., GHIJSELS, E., VANDESANDE, F. 1994. Immunocytochemical localization of L-dopa and dopamine in the brain of the chicken (*Gallus domesticus*). *J. Comp. Neurol.* 346, 97-118.

NAKAMURA, K., HASEGAWA, H. 2007. Developmental role of tryptophan hydroxylase in the nervous system. *Mol. Neurobiol.* 35 (1), 45-54.

PARENT, A. 1979. Monoaminergic systems of the brain. In: *Biology of the Reptilia*. Vol 10. Academic Press, London, pp. 247-285.

PARENT, A. 1981. Comparative anatomy of the serotonergic systems. *J. Physiol.* 77, 147-56.

PICKEL, V.M., JOH, T.H., REISS, D.J. 1976. Monoamine synthesizing enzymes in central dopaminergic, noradrenergic and serotonergic neurons. Immunocytochemical localization by light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 24, 792-806.

PIERRE, J., REPERANT, J., WARD, R., VESSELKIN, N.P., RIO, J.P., MICELI, D., KRATSKIN, L. 1992. The serotonergic system of the brain of the lamprey *Lamprita fluviatilis*: an evolutionary perspective. *J. Chem. Neuroanat.* 5, 195-219.

REINER, A., KARLE, E.J., ANDERSON, K.D., MEDINA, L. 1994. Catecholaminergic perikarya and fibers in the avian nervous system. In: Smeets, W.J.A.J.; Reiner, A. *Phylogeny and development of catecholaminergic systems in the CNS of vertebrates.* Cambridge, England: Cambridge University Press. 135-181.

REINER, A., KARTEN, H.J., SOLINA, A.R. 1983. Substance P: Localization within paleostriatal-tegmental pathways in pigeons. *Neuroscience.* 9, 61-85.

REINER, A., PERKEL, D.J., BRUCE, L., BUTLER, A.B., CSILLAG, A., KUENZEL, W., MEDINA, L., PAXINOS, G., SHIMIZU, T., STRIEDTER, G.F., WILD, M., BALL, G.F., DURAND, S., GUNTURKUN, O., LEE, D.W., MELLO, C.V., POWERS, A., WHITE, S.A., HOUGH, G., KUBIKOVA, L., SMULDERS, T.V., WADA, K., DUGAS-FORD, J., HUSBAND, S., YAMAMOTO, K., YU, J., SIANG, C., JARVIS, E.D. 2004. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J. Comp. Neurol.* 473, 377-414.

REUSS, S. 1996. Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tissue Res.* 285, 353-78.

RITERS, L.V., ERICHSEN, J.T., KREBS, J.R., BINGMAN, V.P. 1999. Neurochemical evidence for at least two regional subdivisions within the homing pigeon (*Columba livia*) caudolateral neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 412, 469-487.

RODRIGUES, S.L., MASEKO, B.C., IHUNWO, A.O., FUXE, K., MANGER, P.R. 2008. Nuclear organization and morphology of serotonergic neurons in the brain of the Nile crocodile, *Crocodylus niloticus*. *J. Chem. Neuroanat.* 35, 133-145.

SAKOWSKI, S.A., GEDDES, T.J., THOMAS, D.M., LEVI, E., HATFIELD, J.S., KUHN, D.M. 2006. Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res.* 85, 11-18.

SALAND LC, SAMORA A, SANCHEZ P, CHAVEZ G. 1993. Immunocytochemical studies of tryptophan hydroxylase, tyrosine hydroxylase, and serotonin innervation in the aging rat neurointermediate pituitary. *Exp Neurol.* 121, 119-26.

SANO, Y., UEDA, S., YAMADA, H., TAKEUCHI, Y., GOTO, M., KAWATA, M. 1983. Immunohistochemical demonstration of serotonin-containing CSF-containing neurons in the submammalian paraventricular organ. *Histochem.* 77, 423-430.

SCHWARTZ, M.W., WOODS, S.C., PORTE JR, D., SEELEY, R.J., BASKIN D.G. 2000. Central nervous system of control intake. *Nature.* 404, 661-671.

SHIMIZU T., KARTEN, H.J. 1990. Immunohistochemical analysis of the visual Wulst of the pigeon *Columba livia*. *J. Comp. Neurol.* 300, 346– 369.

SILVA, R. A, OLIVEIRA, S.T., HACKL, L.P.N, SPILERE, C.C, FARIA ,M.S; MARINO-NETO J, PASCHOALINI MA . 2004. Ingestive behaviors and metabolic fuels after central injections of 5-HT1A and 5-HT1D/1B receptors agonists in the pigeon. *Brain Research*, 1026::274-283,.

SMEETS, W.J.A.A., STEINBUCH, H.W.M. 1988. Distribution of serotonin immunoreactivity in the forebrain and midbrain of the lizard *Gekko gekko*. *J. Comp. Neurol.* 271, 419-434.

SPIGA, F., LIGHTMAN, S. L., SHEKHAR, A., LOWRY, C.A. 2006. Injections of Urocortin 1 Into the Basolateral Amygdala Induce Anxiety-Like Behavior and c-Fos Expression In Brainstem Serotonergic Neurons. *Neuroscience* 138, 1265–1276.

STAUB, D.R., SPIGA, F., LOWRY, C. A. 2005. Urocortin 2 increases c-Fos expression in topographically organized subpopulations of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Brain Res.* 1044, 176 – 189.

STEFFENS, S.M., CASAS, D.C., MILANEZ, B.C., FREITAS, C.G., PASCHOALINI, M.A. , MARINO-NETO, J. 1997

Hypophagic and dipsogenic effects of central 5-HT injections in pigeons. *Brain Res. Bull.*, 44, 681-688.

STEINBUSCH, H.W.M. 1981. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat: cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6, 557-618.

STEINBUSCH, H.W., VERHOFSTAD, A.A., JOOSTEN, H.W. 1978. Localization of serotonin in the central nervous system by immunohistochemistry: Description of a specific and sensitive technique and some applications. *Neuroscience* 3, 811-819.

STOLL, J., KOZAK, C.A., GOLDMAN, D. 1990. Characterization and chromosomal mapping of a cDNA encoding tryptophan hydroxylase from a mouse mastocytoma cell line. *Genomics* 7, 88-96.

TAKEUCHI, Y., SANO, Y. 1983. Serotonin distribution in the circumventricular organs of the rat. *Anat. Embriol.* 167, 311-319.

THAYANANUPHAT, A., KANG, S.W., BAKKEN, T., MILLAN, J., EL HALAWANI, M.E. 2007a. Rhythm-dependent light induction of the c-fos gene in the turkey hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 19, 407-417.

THAYANANUPHAT, A., KANG, S.W., BAKKEN, T., MILLAN, J., EL HALAWANI, M.E. 2007b. Rhythmic dependent light induction of gonadotrophin-releasing hormone-I expression and activation of dopaminergic neurons within the pre-mammillary nucleus of the turkey hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 19, 399-406.

TOLEDO C.A., HAMASSAKI-BRITTO, D.E., BRITTO, L.R. 1995. Serotonergic afferents of the pigeon accessory optic nucleus, *Brain Res.* 705, 341-344.

UEDA, S., NOJYO, Y., SANO, Y. 1984. Immunohistochemical demonstration of the serotonin neuron system in the central nervous system of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Anat. Embryol.* 169 (3), 219-229.

UGRUMOV, M.V. 1997. Hypothalamic monoaminergic systems in ontogenesis: development and functional significance *Int. J. Develop. Biol.* 41, 809-816.

VANHATALO, S., SOINILA, S. 1995. Dopaminergic periventriculo-hypophyseal nerves show tryptophan-hydroxylase immunoreactivity but lack serotonin synthesis. *Brain Research* 687, 205-210.

VANHATALO, S., SOINILA, S. 1996. Superfluous expression of tryptophan hydroxylase in the zona incerta dopaminergic neurones. *Neuroreport*. 7, 2889-2892.

VANHATALO, S., SOINILA, S. 1998. Serotonin is not synthesized, but specifically transported, in the neurons of the hypothalamic dorsomedial nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 10, 1930-1935.

VANHATALO, S., SOINILA, S. 1999. Inducible expression of tryptophan hydroxylase without serotonin synthesis in hypothalamic dopaminergic neurons. *Exp. Neurol.* 157, 305-316.

VETILLARD, A., BENANNI, S., SALIGAUT, C., JEGO, P., BAILHACHE, T. 2002. Localization of tyrosine hydroxylase and its messenger RNA in the brain of rainbow trout by immunocytochemistry and in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.* 449, 374-389.

VIGH, B., MANZANO E SILVA, M.J., FRANK, C.L., VINCZE, C., CZIROK, S.J., SZABÓ, A., LUKÁTS, A., SZÉL, A. 2004. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histol. Histopathol.* 19, 607-628.

VIGH-TEICHMANN, I., VIGH, B. 1983. The system of cerebrospinal fluid contacting neurons. *Arch. Histol. Jpn.* 46, 427-468.

VIGH-TEICHMANN, I., VIGH, B. 1989. The cerebrospinal fluid-contacting neuron: A peculiar cell type of the central nervous system. *Immunocytochemical Aspects. Arch. Histol. Cytol.* 52, 195-207.

WALTHER, D.J., BADER, M. 2003. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1673-1680.

WALTHER, D.J., PETER, J.U., BASHAMMAKH, S., HORTNAGL, H., VOITS, M., FINK, H., BADER, M., 2003. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299, 76.

WEISSMANN, D., BELIN, M.F., AGUERA, M., MEUNIER, C., MAITRE, M., CASH, C.D., EHRET, M., MANDEL, P., PUJOL, J.F. 1987. Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *Neuroscience*. 23 (1), 291-304.

YAMADA, H., SANO, Y. 1985. Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken (*Gallus domesticus*). II. The distribution of the nerve fibers. *Biogenic Amines* 2, 21-36.

YAMADA, H., TAKEUCHI, Y., SANO, Y. 1984. Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken (*Gallus domesticus*) I. The distribution of the neuronal somata. *Biogenic Amines* 1, 83-94.