LEILA MARIA GUISSONI CAMPOS

PROJEÇÕES HIPOTALÂMICAS DO NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO COM BASE
NA DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS IMUNORREATIVAS PARA VIP E AVP NO *CEBUS*
APELLA

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2013

LEILA MARIA GUISSONI CAMPOS

Projeções hipotalâmicas do núcleo supraquiasmático com base na distribuição de fibras imunorreativas para VIP e AVP no *Cebus apella*.

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Campos, Leila Maria Guissoni.

Projeções hipotalâmicas do núcleo supraquiasmático com base na distribuição de fibras imunorreativas para VIP e AVP no *Cebus apella* / Leila Maria Guissoni Campos. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Maria Inês Nogueira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Plasticidade e hodologia de sistemas neurais envolvidos em reflexos e ritmos.

Versão do título para o inglês: Suprachiasmatic nucleus projections for hypothalamic areas according to VIP and AVP immunoreactivity in the *Cebus apella* monkey.

1. Núcleo supraquiasmático 2. *Cebus apella* 3. Hipotálamo 4. VIP 5. AVP 6. Ritmos circadianos I. Nogueira, Profa. Dra. Maria Inês II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0160/2013

Candidato(a): Leila Maria Guissoni Campos.

Título da Tese: Projeções hipotalâmicas do núcleo supraquiasmático com base na distribuição de fibras imunorreativas para VIP e AVP no *Cebus apella*.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Inês Nogueira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 049.13

São Paulo, 05 de agosto de 2013.

REF.: Protocolo nº 133/2008.

"Padrão de projeções de duas subpopulações de neurônios do NSQ do macaco prego"

Prezada Professora,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 26.03.2015.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma. Sra.

Profa. Dra. MARIA INES NOGUEIRA

Departamento de Anatomia

Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*Dedico esse trabalho aos meus pais João e Phina,
responsáveis pela minha formação pessoal e profissional, pelo amor e apoio durante toda
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãs, pela presença e apoio.

À professora e orientadora Maria Inês Nogueira, por todas as oportunidades. Serei eternamente grata.

A Professora Dra. Luciana Pinato, pelo apoio, pela amizade.

Aos amigos eternos que a pós graduação colocou na minha vida, Silvinha, Mike, Livia, Vanderlei, Daniella, Vitor, Carlos Haemmerle, pela amizade sincera, pelas intermináveis discussões regadas de desabafos, de ciência, de companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Neurociências do Departamento de Anatomia: Bárbara, Roberto Tangoa, Renné, Wilma, Rômulo, Muniz, Cauê, Bandeira, Carlos Sampaio e Amrita.

Ao Professor Dr. Ii-Sei Watanabe, Sônia, Marta, Boleta, Kelly e alunos Carlos, Diego, Fernando e Adriano, por todo o auxílio e colaboração com o espaço, equipamentos e com a microscopia eletrônica.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas, por toda a assistência prestada durante a realização deste trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro do desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Ciências Morfofuncionais, pela oportunidade e facilidades oferecidas.

Ao Departamento de Anatomia e ao Instituto de Ciências Biomédicas, pela utilização de seus espaços e recursos.

À Pró-reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, pelo auxílio financeiro concedido.

“Quando eu tinha 17 anos, li uma declaração que dizia algo mais ou menos assim: ‘se você viver cada dia da sua vida como se fosse o último, um dia, com toda certeza, você estará certo’. Isso me impressionou e pelos últimos 33 anos eu me olhei no espelho todas as manhãs e perguntei a mim mesmo: ‘Se hoje fosse o último dia da minha vida, estaria fazendo o que planejo fazer hoje?’ Se a resposta fosse não por repetidas vezes, eu sabia que precisava mudar.”

Steve Jobs.

RESUMO

Campos LMG. Projeções hipotalâmicas do núcleo supraquiasmático com base na distribuição de fibras imunorreativas para VIP e AVP no *Cebus apella*. [tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

O núcleo hipotalâmico supraquiasmático (SCh), apresenta caracterização neuroquímica com duas subpopulações principais de células produtoras de polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e argenina vasopressina (AVP). As fibras imunorreativas (IR) a AVP e VIP eferentes do SCh apresentam características morfológicas que possibilitam seu rastreamento a longas distâncias dentro do hipotálamo. No presente estudo mapeamos as fibras e terminais VIP e AVP IR nas áreas hipotalâmicas do primata *Cebus apella* utilizando a técnica de imunohistoquímica. Assim, foi realizada a identificação das áreas hipotalâmicas recipientes do SCh, utilizando o mapeamento associado à análise morfológica das fibras destas duas substâncias neuroativas. As fibras VIP e AVP IR com características de fibras eferentes do SCh foram identificadas em porções anteriores: hipotálamo anterior, área pré-óptica, área hipotalâmica lateral, SPZV; e porções mais caudais: porção retroquiasmática, área tuberal. Os resultados indicam um padrão similar de distribuição de fibras VIP e AVP IR em áreas hipotalâmicas descritas como recipientes das projeções do SCh, quando comparado com outras espécies descritas na literatura.

Palavras-chave: Núcleo supraquiasmático. *Cebus apella*. Hipotálamo. VIP. AVP. Ritmos circadianos.

ABSTRACT

Campos LMG. Suprachiasmatic nucleus projections for hypothalamic areas according to VIP and AVP immunoreactivity in the *Cebus apella* monkey. [Ph. D. thesis (Sciences Morphofunctional)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

The suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus, contains a variety of different neurons that tend to form two major subpopulations within the nucleus, the vasoactive intestinal peptide (VIP) and vasopressin (AVP). The immunoreactive (IR) fibers derived from the VIP and AVP IR cells of the SCN present morphological characteristics that allow their specific tracking in long distances within the hypothalamus. In the present investigation we mapped VIP and AVP IR terminals in hypothalamic areas of the primate *Cebus apella* using immunohistochemistry, and identified SCN recipient areas in the hypothalamus using the mapping distribution of IR fibers associated with morphological analysis of these two neuroactive substances fibers. VIP and AVP IR fibers with characteristics from SCN were identified in the rostral anterior hypothalamic, medial preoptic area, lateral hypothalamic area, and more caudally in SPZV and retrochiasmatic tuberal area. The results indicate that there is a similarity in the pattern of VIP and AVP IR fibers in hypothalamic recipients areas from SCN projections when compared with species described in the literature.

Keywords: Suprachiasmatic nucleus. *Cebus apella*. Hypothalamus. VIP. AVP. Circadian rhythms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de modelo simplificado do sistema de temporização circadiano (STC).....	15
Figura 2 - Esquema de divisão do hipotálamo.....	17
Figura 3 - Nissl e NeuN. Citoarquitetura das áreas hipotalâmicas do encéfalo do primata <i>Cebus apella</i>	30
Figura 4 - Imunoperoxidase de AVP e VIP no SCh.....	32
Figura 5 - Imunofluorescência de VIP e AVP no SCh.....	33
Figura 6 - Morfologia de neurônios AVP IR na porção shell do núcleo SCh.....	34
Figura 7 - Morfologia de neurônios AVP IR em diferentes áreas encefálicas.....	35
Figura 8 - Morfologia das fibras AVP IR na região SPVZ.....	36
Figura 9 - Botões terminais AVP IR.....	37
Figura 10 - Morfologia de fibras VIP e AVP IR.....	37
Figura 11 - Diferenciação morfológica entre fibras AVP e vasos sanguíneos.....	38
Figura 12 - Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão.....	40
Figura 13 - Análise da distribuição de fibras AVP e VIP IR.....	43
Figura 14 - Análise da distribuição de fibras AVP e VIP IR.....	44
Figura 15 - Análise da distribuição de fibras AVP e VIP IR.....	45
Figura 16 - Análise da distribuição de fibras AVP IR.....	46
Figura 17 - Análise da distribuição de fibras AVP IR.....	47
Figura 18 - Esquema simplificado de distribuição de fibras AVP e VIP IR com morfologia similar às do SCh, no hipotálamo.....	48
Figura 19 - Distribuição de todas as fibras AVP e VIP IR mapeadas no hipotálamo.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos primários e secundários e as respectivas diluições utilizadas..... 26

Tabela 2 - Análise da área dos pericários de neurônios AVP IR do núcleo PaV em comparação aos neurônios AVP IR do núcleo SCh..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS

3V - terceiro ventrículo	NPY - neuropeptídeo Y
5-HT - 5 hidroxitriptamina Serotonina	opt - tracto óptico
ABC - complexo avidina biotina	ox - quiasma óptico
AHA - área hipotalâmica anterior	PACAP - polipeptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase
AHL - área hipotalâmica lateral	PaV - Núcleo paraventricular do hipotálamo
AHP - área hipotalâmica posterior	PGN - núcleo pré geniculado
Arc - núcleo arqueado	PV - parvalbumina
AVP - argenina vasopressina	PV - núcleo paraventricular do tálamo
AVPe - núcleo periventricular anteroventral	RCh - área retroquiasmática
CB - calbindina	SCh - núcleo supraquiasmático
CCK - colecistoquinina	SNA - sistema nervoso autônomo
CR - calretinina	SO - núcleo supra óptico
DAB - 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloreto	SOR - núcleo óptico parte retroquiasmática
DMH - núcleo dorsomedial do Hipotálamo	SOX - decussação supraoptica
DMSO - dimetilsulfóxido	SP - substância P
ENK - encefalina	SPVZ - zona subparaventricular
FIG - folheto intergeniculado	STC - sistema de temporização circadiana
GABA - ácido gama-aminobutírico	SV - núcleo subventricular
GAD - descarboxilase do ácido glutâmico	TGH - trato geniculado hipotalâmico
GFAP - proteína ácida fibrilar glial	TRH - trato retino hipotalâmico
GLU - aminoácido excitatório glutamato	VIP - polipeptídeo intestinal vasoativo
GRP - peptídeo gastrina	VMH - núcleo ventro medial do hipotálamo
IR - imunorreatividade	ZP - zona periventricular
LH - hipotálamo lateral	ZM - zona medial
LHRH - hormônio liberador do hormônio luteinizante	ZL - zona lateral
LPO - área lateral pré optica	
ME - eminência mediana	
MPA - área pré – óptica medial	
NeuN – proteína nuclear específica de neurônios	
NOS- óxido nítrico sintase	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.2 Aspectos anatômicos do SCh e o Hipotálamo.....	16
1.3 Neuroquímica do SCh.....	18
1.4 VIP e AVP do SCh.....	19
2 JUSTIFICATIVAS.....	22
3 OBJETIVOS.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Animais.....	24
4.2 Perfusão transcárdica.....	24
4.3 Técnica de Nissl (Tionina).....	25
4.4 Imuno-histoquímica.....	26
4.4.1 <i>Imunoperoxidase.....</i>	26
4.4.2 <i>Imunofluorescencia.....</i>	27
<u>4.4.2.1 Imunofluorescência para AVP e Von Willebrand.....</u>	27
4.5 Microscopia eletrônica.....	28
4.6 Análise Microscópica.....	29
4.7 Análise morfológica.....	29
5 RESULTADOS.....	30
5.1 Citoarquitetura do SCh.....	30
5.2 Caracterização e organização neuroquímica do SCh com base nas substancias neuroativas AVP e VIP.....	31
5.2.1 <i>Neurônios AVP e VIP IR no SCh.....</i>	31
5.3 Análise da morfologia de neurônios AVP IR no SCh.....	34
5.4 Análise da morfologia de fibras AVP e VIP IR no hipotálamo.....	36
5.5 Diferenciação morfológica de fibras AVP IR e vasos sanguíneos...	38
5.6 Análise da distribuição de Fibras AVP e VIP IR.....	41
5.6.1 <i>Fibras AVP IR.....</i>	41
5.6.2 <i>Fibras VIP IR.....</i>	41
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	59

APÊNDICE A - Artigos publicados.....	68
APÊNDICE B - Artigos submetidos.....	71
APÊNDICE C - Artigos em preparação.....	75

1 INTRODUÇÃO

A maioria das espécies apresenta ritmos biológicos fisiológicos, endócrinos e comportamentais marcados por variações diárias ou sazonais de temperatura, umidade e períodos fóticos. Esta capacidade adaptativa que aperfeiçoa a eficiência dos sistemas biológicos está baseada em mecanismos que promovem a organização temporal dos fenômenos fisiológicos do organismo com o meio ambiente em que ele vive (Moore-Ede et al., 1982; Reppert, Weaver, 2002).

Os chamados ritmos biológicos circadianos oscilam em períodos ao redor de 24 horas e persistem em condições ambientais constantes o que indica a existência de um sistema de oscilação endógeno composto por um marca-passo circadiano central dominante, o núcleo supraquiasmático (SCh), e por vias aferentes e eferentes deste núcleo (Moore-Ede et al., 1982). Este sistema de oscilação ou sistema de temporização circadiano (STC) permite ao organismo antecipar-se e preparar-se para as alterações que ocorrem no ambiente natural, podendo assim otimizar os seus comportamentos de acordo com os padrões rítmicos ambientais.

Figura 1 - Esquema de modelo simplificado do sistema de temporização circadiano (STC).

Esquema simplificado do STC mostrando o oscilador central, que representa o núcleo supraquiasmático (SCh), sob influência de fatores de entrada como o ciclo claro-escuro e a expressão de ritmos em vários aspectos fisiológicos como a atividade e repouso por meio de estruturas consideradas vias de saída que podem representar conexões neurais diretas e/ou fatores secretados. Fonte: Adaptado de Sehgal (2004).

Nos mamíferos o STC é constituído por um conjunto complexo de estruturas hierárquicas na qual o oscilador central, o SCh é capaz de impor o seu período aos osciladores secundários, como exemplo o núcleo dorso medial do hipotálamo (DMH)

(Gooley et al., 2006) e pode ser influenciado por vias neurais e por secreções endócrinas (Cipolla-Neto et al., 1988).

A oscilação circadiana do SCh deve-se à capacidade oscilatória autônoma de suas células que por sua vez decorre de alças de retro-alimentação de transcrição e translação resultando na expressão rítmica dos genes do relógio ou “clock genes” (Reppert, Weaver, 2001). Estes componentes “clock” incluem, entre outros, três genes da família *Per*: *Per1*, *Per2* e *Per3* (Zylka et al., 1998), o gene *Clock* (King et al., 1997), genes “cryptochrome” *Cry1* e *Cry2* (Kume et al., 1999) e o *BMAL1* (Gekakis et al., 1998).

A determinação do SCh como oscilador central veio por meio de experimentos clássicos que mostraram que: 1) lesões no SCh levam a perda dos ritmos circadianos para uma série de parâmetros comportamentais e fisiológicos (Moore, Eichler, 1972), 2) Existem ritmos de atividade elétrica dentro do SCh após isolamento do resto do cérebro, numa preparação conhecida como ‘ilha hipotalâmica’ (Inouye, Kawamura, 1979), 3) partes do cérebro que normalmente exibem uma variação circadiana na atividade neuronal deixam de fazê-lo após isolamento cirúrgico do SCh, 4) O transplante de SCh fetal recupera a ritmicidade circadiana em roedores arrítmicos por lesão bilateral prévia do SCh (Lehman et al., 1987) e 5) Quando é feito esse tipo de transplante, se forem utilizados animais mutantes com período circadiano mais curto como doadores, o hospedeiro recupera a ritmicidade circadiana com período similar ao do doador (Ralph et al., 1990).

1.2 Aspectos anatômicos do SCh e o Hipotálamo

O hipotálamo tem sido didaticamente dividido em 4 regiões antero-posteriores identificadas como área pré óptica, área anterior, área tuberal e área mamilar (Le Gros Clark, 1938 apud Simerly, 1995) nas quais estão distribuídas no sentido médio lateral 3 zonas longitudinais distintas denominadas zonas periventricular, medial e lateral (Crosby, Woodburne, 1940¹ apud Simerly, 1995).

A zona periventricular contém a maioria dos neurônios hipofisários, que projetam para eminência mediana e modulam a hipófise anterior (adeno hipófise), e

¹ Crosby EC, Woodburne RT. The comparative anatomy of the preoptic area and the hypothalamus. Proc Assoc Res Nervous Mental Dis. 1940;20:52-169.

também grande parte dos neurônios magnocelares que projetam para hipófise posterior (neuro hipófise).

Na zona medial, núcleos bem distintos constituem áreas com amplas conexões com o telencéfalo, regiões límbicas e intra-hipotalâmicas além de algumas conexões com tálamo e tronco encefálico. Este conjunto de núcleos é responsável pela iniciação de diversos comportamentos e pela integração entre as zonas periventricular e lateral.

Na zona lateral, os neurônios estão distribuídos entre as fibras do feixe prosencefálico medial, formando um núcleo intersticial. Esta zona é reconhecida como área integradora, com núcleos envolvidos em fenômenos como alerta e comportamentos motivados (Saper et al., 1979; Simerly, 1995; Watts, Swanson, 1987).

O SCh está localizado na zona periventricular e embora apresente variações interespecíficas quanto à forma tridimensional, volume, densidade e tamanho das células, apresenta organização conservada em mamíferos, como um par de aglomerados de pequenos neurônios situados no hipotálamo anterior, adjacentes ao terceiro ventrículo (3V) e imediatamente dorsal ao quiasma óptico (ox) (Cassone et al., 1988; Lydic et al., 1982; Pinato et al., 2007).

Figura 2 - Esquema de divisão do hipotálamo.

Esquema de divisão do hipotálamo evidenciando em A, as quatro regiões hipotalâmicas de anterior (A) para posterior (P): área pré óptica, área anterior, área tuberal e área mamilar. Entre a área pré-óptica e a área anterior está a localização do núcleo SCh (supraquiasmático). Em B divisão do hipotálamo em três zonas longitudinais distintas ao nível do SCh denominadas: zonas periventricular (ZP) (próxima ao terceiro ventrículo 3V), medial (ZM) e lateral (ZL).

1.3 Neuroquímica do SCh

A grande complexidade funcional deste núcleo tem sido atribuída em parte, à sua composição neuroquímica, caracterizada por diferentes populações neuronais e terminais que produzem e/ou liberam diferentes substâncias neuroativas. Esta composição apresenta pequenas variações interespecíficas entre roedores, e importantes diferenças entre roedores e primatas.

No SCh de roedores foram descritos neurônios imunorreativos (IR) a óxido nítrico sintase (NOS) (Decker, Reuss, 1994; Wang, Morris, 1996), proteínas ligantes de cálcio calbindina (CB), parvalbumina (PV) e calretinina (CR) (Marshall et al., 2000; Résibois, Rogers, 1992), ácido gama-amino-butírico (GABA), descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) (Abrahamson, Moore, 2001; Moore, Speh, 1993), encefalina (ENK) (Smale et al., 1991), colecistoquinina e somatostatina (Moore et al., 2002), proteína nuclear específica de neurônios (NeuN) (Geoghegan, Carter, 2008), argenina vasopressina (AVP) e polipetídeo intestinal vasoativo (VIP) (para revisão ver Moore et al., 2002; Morin, Alen, 2006).

Ainda em roedores, o neuropeptídeo Y (NPY) foi descrito apenas em terminais e fibras, predominando na porção ventral do SCh de hamster (Card, Moore, 1984; Morin et al., 1992; Ueda et al., 1986), e rato (Morin et al., 2006; Ueda et al., 1986; Van den Pol, Tsujimoto, 1985). Fibras e terminais imunorreativos ao polipeptídeo liberador de gastrina (GRP) foram encontrados em ratos. O aminoácido excitatório glutamato (GLU), e a colecistoquinina (CCK) em ratos e camundongos respectivamente (Meziane et al., 1997; Van den Pol, 1991), enquanto que os terminais imunorreativos a serotonina (5-HT) foram observados em todas as espécies estudadas (Abrahamson, Moore, 2001; Card, Moore, 1984; Cassone et al., 1988; Moore, Speh, 2004; Negroni et al., 2003; Ueda et al., 1983). A substância P (SP) apesar de apresentar denso plexo de terminais IR no SCh do rato, apresenta escassez de terminais no camundongo e no *Octodon degus* (Abrahamson, Moore, 2001; Goel et al., 1999). A proteína ácida fibrilar glial (GFAP), abundante no hipotálamo também apresenta imunoreatividade nos limites do núcleo SCh em hamster, camundongos, e na porção ventral do SCh de ratos (Morin et al., 1989, Ibata et al., 1999).

Em primatas, foram encontrados, até o momento, neurônios NPY IR no SCh em duas espécies, lêmures (Bons et al., 1990) e humanos (Mai et al., 1991). Células imunorreativas a CB também foram descritas nesta classe (Costa et al., 1998; Mai et al., 1991). Quanto aos neurônios imunorreativos à AVP (AVP IR) e VIP (VIP IR), em humanos, assim como em roedores, apresentam-se em porções topograficamente distintas do SCh, sendo a distribuição dos neurônios AVP IR médio dorsal e VIP IR ventral (Dai et al., 1997). Contrariamente, em outros primatas os neurônios VIP IR foram observados na porção dorsal (Costa et al., 1998), ou central do SCh (Moore, Speh, 2004).

Em relação às fibras e terminais foram observados no SCh de primatas 5-HT IR (Cavalvante et al., 2002; Moore, Seph, 2004, Pinato et al., 2007; Ueda et al., 1983), NPY IR (Cavalcante et al., 2002; Pinato et al., 2007; Pinato et al., 2009; Ueda et al., 1986), SP IR (Costa et al., 1998), peptídeo gastrina (GRP IR) e GLU IR (Abrahamson, Moore, 2001; Card, Moore, 1984; Morin et al., 2006; Ueda et al., 1983; Van den Pol, 1991; Van den Pol, Tsujimoto, 1985). A proteína GFAP também foi descrita em astrócitos do SCh de primatas (Morin et al., 1989; Stopa et al., 1999).

1.4 VIP e AVP do SCh

Dentre todos os constituintes neuroquímicos citados, VIP e AVP são as principais substâncias neuroativas do SCh. Além de estar relacionado diretamente à complexidade funcional, o arranjo diferencial destas duas populações de neurônios faz parte dos critérios funcionais e neuroquímicos que determinam a divisão em porções ventrolateral e dorsomedial desse núcleo (Abrahamson, Moore, 2001; Ueda et al., 1983; Watts, Swanson, 1987).

Na maioria das espécies as células VIP IR tendem a estarem localizadas na porção ventral ou ventrolateral enquanto as células AVP IR tendem a estar na porção dorsomedial do SCh (Card, Moore, 1984; Moore, 1992; Morin et al., 1992; Ueda et al., 1983; Van den Pol, Tsujimoto, 1985). Entretanto, ocorrem variações, como por exemplo, neurônios VIP IR na porção dorsal do núcleo no sagüi (Costa et al., 1998) e neurônios AVP IR localizados no contorno lateral do SCh no camundongo (Abrahamson, Moore, 2001). A divisão anátomo-funcional do SCh em porção ventrolateral e dorsomedial também é conhecida como core e shell (Card, Moore, 1991; Moore et al., 2002; Van den Pol, Tsujimoto, 1985).

A **região ventrolateral "core"** neuroquimicamente caracterizada como produtora de **VIP**, possui fibras eferentes VIP IR para a porção shell e para fora do núcleo (Dai et al., 1997; Jacomy et al., 1999, para revisão Moore, 2013), porém está principalmente relacionada ao mecanismo de sincronização dos ritmos circadianos aos eventos externos sendo assim o local de entrada para as três principais aferências do SCh:

- O trato retino hipotalâmico (TRH) formado por projeções retinianas (Hendrickson et al., 1972; Moore, Lenn, 1972) cujos principais neurotransmissores, identificados em roedores, são o aminoácido excitatório GLU (Moffet et al., 1990), e o Polipeptídeo Hipofisário Ativador de Adenilato Ciclase (PACAP) (Antle, Silver, 2005).
- O trato geniculado hipotalâmico (TGH), que em roedores, tem origem no folheto intergeniculado do tálamo (FIG) (Hickey, Spear, 1976), cujo núcleo homólogo em primatas é o pré-geniculado PGN (Pinato et al., 2009) tem como principal neurotransmissor o NPY (Moore et al., 2002; Morin et al., 2006; Ueda et al., 1986).
- Projeções serotoninérgicas que caracterizam a terceira maior fonte de aferências do SCh proveniente do núcleo mediano da rafe (Hay-Schmidt et al., 2003; Moga, Moore, 1997). Fibras e terminais IR a 5-HT ocupam toda região ventral do SCh de ratos (Van den Pol, Tsujimoto, 1985) e outros roedores (Negroni et al., 1997), já no primata *Callithrix jacchus* apresentam maior concentração nas áreas central e dorsal (Cavalcante et al., 2002) enquanto que no primata *Cebus apella* estão esparsamente distribuídos pela periferia do núcleo (Pinato et al., 2007).

A **região dorsomedial "shell"** do SCh relacionada com geração de ritmos circadianos é constituída por uma população de células neuronais produtoras de **AVP** (Cassone et al., 1988; Ramanathan et al., 2006), que se projetam em menor número para a porção core e em maior número do SCh para outras regiões cerebrais caracterizadas como áreas recipientes, representa a principal área de saída do SCh (Abranhamson, Moore, 2001; Cassone et al., 1988).

As projeções eferentes do SCh descritas em roedores não vão muito além de áreas talâmicas e hipotalâmicas (Watts, Swanson, 1987), estas incluem a área hipotalâmica anterior (AHA), posterior (AHP) e lateral (AHL). Dorsalmente, o núcleo

apresenta projeções para a chamada zona subparaventricular (SPVZ), núcleo paraventricular do hipotálamo (PaV) e região septal (Watts, Swanson, 1987). Algumas destas áreas projetam de volta para o SCh, sendo que a SPVZ parece atuar como centro redistribuidor e amplificador, das funções do SCh (Morin et al. 1994). As conexões com o sistema límbico estão estabelecidas principalmente por meio de conexões com os núcleos adjacentes, como por exemplo, o paraventricular do hipotálamo (PaV), que representa importante elo neuroanatômico entre os efeitos fóticos e o mecanismo neuroendócrino, com implicações na coordenação do sistema nervoso autônomo (SNA) e controle do comportamento emocional (Watts, 1991; Watts e Swanson, 1987). Em humanos foi demonstrado que o SCh projeta-se principalmente para porções centrais e mediais da AHA, PaV e DMH (Daí et al., 1997).

Uma das formas de estudar as eferências do SCh é pela injeção de traçadores anterógrados neste núcleo, que demonstraram serem AVP IR e VIP IR os dois grupamentos celulares responsáveis pelo maior contingente de eferências do SCh, característica esta conservada no SCh dos mamíferos já estudados, incluindo humanos (Buijs, 1997; Leak, Moore, 2001; Watts, Swanson, 1987). Essa condição tornou possível o estudo das eferências do SCh pela análise da imunorreatividade destas duas substâncias. Corroborando com este fato, diversos estudos mostraram ainda que as fibras AVP e VIP IR com origem no SCh apresentam características específicas que as diferenciam de outros possíveis grupamentos neuronais com células IR a estas duas substâncias.

2 JUSTIFICATIVAS

A comprovada variação interespecífica dos diferentes componentes do STC, aliada à possibilidade de investigação desse sistema em modelo primata, ressaltam a importância de mapear a distribuição de fibras imunorreativas (IR) às substâncias neuroativas AVP e VIP no primata *Cebus apella*, a fim de identificar as áreas recipientes destas fibras. A significância funcional dessas fibras tem relação direta com as funções do SCh. Fibras IR a AVP e VIP originadas do SCh marcam as principais eferências do SCh em mamíferos (Abrahamson, Moore, 2001; Buijs, 1997; Watts, Swanson, 1987). Elas apresentam características morfológicas tais como: fibras finas e varicosas, botões irregularmente espaçados ao longo de suas trajetórias com presença de botões terminais dilatados, que permitem diferenciá-las de fibras oriundas de outras populações neuronais, por exemplo, com as fibras AVP e VIP oriundas de neurônios magnocelulares do PaV, núcleo supra ótico (SO), córtex e amígdala respectivamente, que apresentam calibre maior, e poucas varicosidades ao longo do trajeto (Abrahamson, Moore, 2001). Os estudos que associaram a técnica imuno-histoquímica ao uso de traçadores obtiveram resultados similares, confirmando a eficácia dessa metodologia (Abrahamson, Moore, 2001; Dai et al., 1997; Morin et al., 1994; Watts, Swanson, 1987). Portanto, este trabalho teve como intuito mapear a distribuição das fibras neuroativas AVP e VIP no hipotálamo do primata *Cebus apella* utilizando-se a técnica de imuno-histoquímica associada ao estudo das características morfológicas das fibras encontradas no SCh, e assim identificar as áreas recipientes dessas fibras no hipotálamo.

3 OBJETIVOS

- Mapear os terminais IR às substâncias neuroativas AVP e VIP em áreas hipotalâmicas do primata *Cebus apella*.
- Identificar as principais áreas hipotalâmicas recipientes de fibras VIP e AVP IR oriundas do SCh no primata *Cebus apella* utilizando como referência as características morfológicas das fibras AVP e VIP IR descritas em outras espécies.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O *Cebus apella*, também conhecido como macaco-prego, pertence à família dos cebídeos, animais de hábito diurno, arborícolas são considerados os primatas mais inteligentes das Américas (Freese, Oppenheimer, 1981). Eles exibem extraordinária diversidade de comportamentos e dieta oportunística (Terborgh, 1983) que conseguem explorar devido, em parte, a sua grande habilidade manual (Fragaszy et al., 1990; Lavalley, 1999).

A morfologia do seu cérebro, sulcos e giros, bem como a posição relativa das áreas neuroanatômicas funcionais, são comparáveis aos macacos do Velho Mundo (Gattass et al., 1981, 1987; Fiorani et al., 1989; Gattass, Gross, 1981; Padberg et al., 2005; Rosa et al., 1988). Estas mesmas características não são encontradas em outros macacos do Novo Mundo, mostrando que existem diferenças no padrão citoarquitetural do encéfalo mesmo entre membros da mesma ordem (Bourne et al., 2007).

No presente estudo, foram utilizados encéfalos de três macacos-prego (*Cebus apella*) adultos, machos, pesando entre 2 e 3 Kg, provenientes do Núcleo de Procriação de Macacos-Prego da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com iluminação natural e receberam dieta controlada à base de ovos, frutas, ração granulada com proteínas, milho seco e água *ad libitum*. Os procedimentos relativos à manipulação dos animais atendem às disposições básicas contidas no “*Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research* (2003)” e foram aprovados pelo comitê de ética local nº 133.

4.2 Perfusão transcardíaca

Após anestesia com 0,2 ml de Diazepan (União Química Farmácia Nacional S.A, Brasil), 0,3 ml de Lisador (Laboratório Americano de Farmacoterapia S. A, Brasil) e Tiopental sódico (Fontoveter, Brasil) na dosagem de 30 mg/Kg, os animais foram perfundidos com 1 litro de solução salina 0,9% pH 7,0, seguido de 2 litros de formaldeído 4% em tampão sódio acetato 0,1 M (pH 6,0, 4 °C) e de 2 litros de

ormaldeído 4% em tampão borato de sódio 0,1 M (pH 9,5, 4 °C), para propiciar maior interação das moléculas do formaldeído com os componentes do tecido. Após perfusão, 2 encéfalos foram seccionados em dois blocos, e colocados em solução crioprotetora composta por tampão borato pH 9,0 mais 10% de glicerol (Labsynth produtos para laboratórios Ltda, Brasil) e 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) por 5 dias, seguido de imersão em solução similar com 20% de glicerol.

Após a crioproteção, os blocos encefálicos foram crio-seccionados em criostato (Leica CM 1850, Microsystems AG, Wetzlar, Hesse, Alemanha), em cortes com 30 µm de espessura e armazenados em 10 séries em solução anti-congelante composta por 240 ml de etilenoglicol (Labsynth produtos para laboratórios Ltda, Brasil), 200 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4, 200 ml de água e 120 g de sacarose (Labsynth produtos para laboratórios Ltda, Brasil), onde permaneceram até o processamento em técnica imuno-histoquímica e coloração em Nissl.

4.3 Técnica de Nissl (Tionina)

A técnica de Nissl foi utilizada com o intuito de explorar a análise da citoarquitetura dos núcleos hipotalâmicos.

Para tanto os cortes encefálicos foram lavados em tampão 0,1M pH 7.4, em seguida montados em lâminas previamente gelatinizadas onde permaneceram secando em temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida foram submetidos a coloração de Nissl, que consiste na desidratação do tecido por utilização de diferentes concentrações de alcoóis (70% 1 hora, 95% duas vezes por 3 minutos, 100% duas vezes por 3 minutos cada), seguida de deslipidificação em recipientes com xilol. Na sequência, o tecido é reidratado em concentrações de alcoóis decrescentes (inverso do processo anterior), submerso em água destilada por 2 minutos e colocado 30 a 40 segundos na solução tionina a 0,25%.

Em seguida os cortes foram lavados em água destilada e novamente desidratados e deslipidificados como descrito anteriormente, acrescentando imersão em álcool 95% e ácido acético a 1%, por 3 segundos. As lâminas foram cobertas com lâminulas com meio de montagem DPX.

4.4 Imuno-histoquímica

Foram utilizadas as técnicas de imuno-histoquímica para imunoperoxidase simples e imunofluorescência. Os anticorpos (AC) foram utilizados em diluições específicas (**Tabela 1**) após testes com diferentes diluições.

Tabela 1 - Anticorpos primários e secundários e as respectivas diluições utilizadas.

Anticorpos	Fabricante	Diluição dos AC
VIP	Abcam rabbit policlonal	1:250
AVP	Abcam rabbit policlonal	1:1000
Fator de Von Willebrand	Abcam Mouse	1:100
FITC	Jackson Immuno Research fluoresceína goat anti rabbit/mouse	1:200
NeuN	Millipore/mouse	1:1000
Rodamina	Jackson Immuno Research goat anti rabbit	1:200

4.4.1 Imunoperoxidase

Séries adjacentes de cortes encefálicos de cada animal foram processadas com técnicas de imuno-histoquímica para VIP, AVP, e NeuN. Os cortes foram lavados em solução composta por Tris (Amresco, Solon, EUA), cloreto de sódio (Labsynth, Brasil), Triton X-100 (Amresco, Solon, EUA) e H₂OD (TBS-TX 0,05 M) pH 7,6. Em seguida, os cortes foram incubados separadamente para cada anticorpo por 48 horas a 4°C em tampão TBS-TX 0,05 M contendo 2% de soro normal e anticorpo primário contra VIP, AVP e NeuN. Após lavagens em TBS-TX 0,05 M, os cortes foram incubados por 2 horas em solução contendo 2% de soro normal junto com Biotinilado específico. Na sequência os cortes foram lavados em TBS-TX 0,05 M, incubados por 2 horas em solução contendo complexo avidina biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA) e lavados com tampão Tris-HCL, pH 7,6.

A marcação foi revelada utilizando 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) como cromógeno, com H₂O₂ (33%)

(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Na seqüência os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e desidratados, sendo as lâminas cobertas com lamínulas utilizando como meio de montagem DPX (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA).

4.4.2 Imunofluorescência

Cortes encefálicos contendo o SCh foram processados com técnicas de imunofluorescência com dupla marcação para VIP e para AVP. Para tanto os cortes foram lavados em solução tampão TBS-TX 0,05 M e incubados tampão TBS-TX 0,05 M contendo 2% de soro normal por 2 horas, depois foi acrescentado o anticorpo primário contra VIP. Passado o tempo de incubação de 48 horas, os cortes foram lavados novamente em TBS-TX 0,05 M, e novamente incubados em solução contendo 2% de soro normal com anticorpo conjugado FITC específico para a espécie que o anticorpo primário foi sintetizado, por 2 horas. Em seguida, os cortes foram lavados novamente em TBS-TX 0,05 M e incubados por 48 horas com anticorpo primário AVP. Após esse período, os cortes foram lavados com tampão TBS-TX 0,05 M e incubados por 2 horas em solução contendo 2% de soro normal e anticorpo secundário Rodamina específico para a espécie que o anticorpo primário foi sintetizado. Em seguida os cortes encefálicos foram montados em lâminas gelatinizadas, cobertos com lamínulas utilizando glicerol como meio de montagem e analisados em microscópio de fluorescência.

4.4.2.1 Imunofluorescência para AVP e Von Willebrand

Foi realizada imunofluorescência para AVP e vasos sanguíneos (anticorpo Fator de Von Willebrand), para facilitar a diferenciação entre as fibras AVP IR durante as análises da morfologia de fibras.

Cortes encefálicos contendo o SCh foram separados e lavados em solução tampão TBS-TX 0,05 M, em seguida foram incubados na mesma solução contendo 2% de soro normal com anticorpos primários contra AVP e Fator de Von Willebrand por 48 horas. Em seguida, os cortes foram lavados em solução tampão TBS-TX 0,05 M e incubados por 2 horas em solução 2% de soro normal e anticorpos secundários FITC (mouse) e Rodamina (rabbit), específicos para cada anticorpo primário. Em seguida, os cortes encefálicos foram montados em lâminas gelatinizadas, cobertos

com lamínulas utilizando glicerol como meio de montagem e analisados em microscópio de fluorescência.

4.5 Microscopia eletrônica

A metodologia de microscopia eletrônica foi utilizada no presente estudo para facilitar a análise morfológica e identificação das diferenças estruturais entre as fibras AVP IR e possíveis vasos sanguíneos marcados com AVP. Os cortes encefálicos foram lavados em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,4 e pós-fixados em solução de OsO₄ a 1%, tamponada em cacodilato de sódio, por 2 h, a 4° C. Em seguida lavados em solução salina a 0,9%, e imersos em solução aquosa de acetato de uranila a 0,5%, por 8 h, em temperatura ambiente. Após esse tempo foram desidratados em bateria de concentrações crescentes de alcoóis [70%, 80%, 90%, 95% (3 minutos) e 4x 100% (3 minutos cada)] e óxido de propileno (2X, 3 minutos cada). Em seguida iniciamos a inclusão dos cortes em resina, preparada sob a proporção de 1:1 entre óxido de propileno e resina Spurr (Electron Microscopy Sciences, USA), onde permaneceram em misturador rotatório por um período de 4 h. A mistura foi substituída por resina pura e disposta no misturador por um período de 16 h. Em seguida, novamente substituída por resina pura, deixando em estufa a 37 °C, por 1 h. Ao término desse processo foi feita a inclusão do material em molde de borracha, permanecendo por 5 dias em estufa a 60°C.

Passado esse período, o bloco de resina foi trimado, para a obtenção da região de interesse do tecido incluso, em seguida foram feitos os cortes semi-finos, em espessura de 2 µm, com faca de vidro, em ultra-micrótomo (Leica Ultracut UCT, Leica Microscopes - Áustria). Os cortes foram montados em lâminas histológicas de vidro e corados com solução de azul de toluidina a 1%, para visualização em microscópio de luz das respectivas estruturas de interesse.

Confirmado o local de interesse, realizamos uma nova trimagem, com maior restrição à área de interesse, para realização de cortes ultrafinos, em espessura de 90 nm, realizados com faca de diamante. Os cortes foram coletados em telas de cobre, com 200 “mesh”, contrastados com a solução de acetato de uranila saturada (Reynolds, 1963; Watson, 1958; Watanabe, Yamada, 1983). As telas foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 1010, em 80 kV, QBP Lab, Cardomy Road, Sta Lucia, USA).

4.6 Análise Microscópica

As análises dos cortes encefálicos processados com as técnicas de imunoperoxidase e imunofluorescência foram feitas utilizando microscopia de campo claro, e microscopia de fluorescência (microscópio *Nikon Eclipse E1000*, adaptado a câmera digital *CoolSNAP-Pro Color*, e microcomputador com *software* Image-Pro®Plus (Média Cybernetics, Silver Spring, MA, Estado Unidos). As figuras foram ajustadas com brilho, contraste e equilíbrio com auxílio do programa Adobe Photoshop CS2 (Saper, 1999). Para a realização dos desenhos esquemáticos foi utilizada câmera lúcida acoplada a microscópio (Leica, Alemanha). Os desenhos foram digitalizados e editados com o programa Canvas 6 (Deneba). Para a identificação das áreas encefálicas foram utilizados os atlas “A stereotaxic Atlas of the Brain of Cebus Monkey (*Cebus apella*)” e “The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates, 2009”, associado a metodologia de coloração Nissl e imunoperoxidase para NeuN. Na análise da morfologia neuronal de PaV em comparação ao núcleo SCh, verificamos a média da área dos neurônios do SCh comparado com a média da área dos neurônios do núcleo PaV. Utilizamos Teste t de Student para amostras independentes. Os cortes encefálicos destinados ao processamento de microscopia eletrônica de transmissão foram analisados em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010, em 80 kV.

4.7 Análise morfológica

Neste trabalho, utilizou-se o software de processamento e análise de imagens digitais ImageJ (McMaster Biophotonics Facility, do Canadá) como ferramenta para medição das populações neuronais do núcleo SCh. Com base nas informações fornecidas pelas das imagens digitais, obtivemos parâmetros que possibilitaram a descrição, interpretação e entendimento dos resultados (Sage 2011). A função Analyze Particles do software Image J foi utilizada para investigar as diferenças morfológicas entre duas subpopulações neuronais IR a AVP evidenciadas nos limites da porção shell do núcleo SCh. Os valores foram comparados com os dados morfométricos de neurônios de outros locais também produtores de AVP.

5 RESULTADOS

5.1 Citoarquitetura do SCh

Para definir a citoarquitetura e a delimitação das áreas hipotalâmicas de interesse utilizamos a coloração por Nissl (Figura 3 A, B, C) e metodologia de imunoperoxidase para NeuN (Figura 3 D, E, F). Apesar do marcador NeuN ter se mostrado pouco eficiente para delimitações citoarquitetônicas do núcleo SCh (Figura 3 D), seus resultados foram complementares ao método Nissl em relação as outras áreas de interesse.

O núcleo supraquiasmático apresentou-se como um par de aglomerados de neurônios superior ao quiasma óptico e adjacente ao terceiro ventrículo. Seus limites são melhor evidenciados pela coloração de Nissl que marca fortemente suas células (Figura 3 A e B), ao contrário do anticorpo contra NeuN que marcou duas populações específicas de neurônios intrínsecos ao SCh, uma mais ventral no nível anterior e uma central no nível posterior (Figura 3 D e E).

Figura 3 - Nissl e NeuN. Citoarquitetura das áreas hipotalâmicas do encéfalo do primata *Cebus apella*.

Fotomicrografias de cortes encefálicos do primata *Cebus apella* corados pelo Método de coloração Nissl em A, B e C e submetidos a técnica de imunoperoxidase com anticorpo contra NeuN em D, E e F. A e B mostram dois diferentes níveis do núcleo supraquiasmático (SCh), em A nível mais rostral do núcleo e em B nível mais caudal, em ambos os limites do núcleo estão evidenciados pelo pontilhado. D e E mostram a marcação para NeuN com poucos neurônios marcados dentro dos limites do SCh ao contrário das áreas adjacentes. Em C e F, cortes encefálicos mostrando hipotálamo em nível posterior, com os pontilhados delimitando as áreas hipotalâmicas núcleo dorso medial do hipotálamo (DMH) e núcleo ventro medial do hipotálamo (VMH), núcleo Arqueado (Arc), eminência mediana (ME), terceiro ventrículo (3V), área pré óptica medial (MPA), quiasma optico (ox). As barras de calibração representam 100µm.

5.2 Caracterização e organização neuroquímica do SCh com base nas substâncias neuroativas AVP e VIP

Após a definição da citoarquitetura do SCh e outras áreas hipotalâmicas direcionamos as análises para a caracterização neuroquímica das substâncias AVP e VIP nos diferentes níveis encefálicos do hipotálamo e do SCh pela utilização da metodologia de imunoperoxidase (Figura 4) e por imunofluorescência (Figura 5).

5.2.1 Neurônios AVP e VIP IR no SCh

Os resultados obtidos a partir da metodologia de imunoperoxidase e imunofluorescência evidenciam organização complexa do SCh, caracterizada pelos dois grupos celulares AVP e VIP IR com localização semelhante à de outras espécies já estudadas desde roedores a humanos (Abrahamson, Moore, 2001; Daí et al., 1997; Leak, Moore, 2001) o que reforça o fato de ser esta uma característica filogeneticamente preservada.

Os neurônios VIP IR foram verificados na região ventrolateral do SCh com sobreposição ao ox (Figura 4 A e A.2, Figura 5 A e B), em região topograficamente distinta dos neurônios AVP, verificados na porção dorso médio lateral do SCh (Figura 4 A e A.1, Figura 5 A e B). Neurônios VIP IR de outros locais como amígdala e córtex apresentaram pericários e fibras com morfologia diferente daqueles vistos nos limites do SCh.

Observamos a presença de neurônios AVP IR de diferentes tamanhos e morfologia na região shell do núcleo SCh (Figura 6 A e A.1).

Figura 4 - Imunoperoxidase de AVP e VIP no SCh.

Fotomicrografias de cortes encefálicos do primata *Cebus apella* processados pela técnica de imunoperoxidase para AVP (A.1) e VIP (A.2). Em A sobreposição das imagens dos dois cortes. Em A e A.1, neurônios AVP na porção dorsal, médio e lateral do SCh, enquanto que neurônios VIP IR são encontrados na porção ventral do núcleo (A e A.2). Barra 100µm.

Figura 5 - Imunofluorescência de VIP e AVP no SCh.

Fotomicrografia de cortes encefálicos do primata *Cebus apella* processado pela técnica de Imunofluorescência para VIP (amarelo) e AVP (vermelho) em dois diferentes níveis do núcleo supraquiasmático (SCh) (A-nível caudal; B-nível rostral). As duas populações neuronais VIP IR e AVP IR ocupam localizações distintas dentro dos limites do SCh. Neurônios AVP IR (vermelho) na porção dorsal, médio e lateral e neurônios VIP IR na porção ventro lateral (A e B). Barra 100µm.

5.3 Análise da morfologia de neurônios AVP IR no SCh.

A morfologia diferenciada entre os neurônios AVP IR da porção shell do SCh chamou atenção pela presença de neurônios com pericários fortemente marcados com fibras densas (Figura 6 A, B, C e 7A – seta vazia), e outros com pericários menores e fibras mais delgadas (Figura 6 A, B, C e 7A – seta cheia) encontrados nos diferentes níveis encefálicos do núcleo SCh. Estes dados sugerem a presença de duas populações neuronais AVP IR morfologicamente distintas e mescladas na porção shell do núcleo. Para investigar essa hipótese, foram realizadas medidas morfométricas da área dos pericários desses dois grupos de neurônios dentro dos limites do SCh (**Tabela 2**). Além disso, estes dados morfométricos foram comparados com as medidas realizadas da área dos pericários de neurônios do núcleo PaV (Figura 7 B) também produtores de AVP (**Tabela 2**).

Figura 6 - Morfologia de neurônios AVP IR na porção shell do núcleo SCh.

Fotomicrografias em campo claro de cortes encefálicos do primata *Cebus apella* processados pela técnica de imunoperoxidase contra AVP evidenciando a morfologia de neurônios e fibras AVP IR na porção shell do núcleo SCh delimitada pelo pontilhado (A, B, C). Setas vazias indicam neurônios maiores, com pericários fortemente marcados por AVP e as setas cheias apontam neurônios menores com marcação menos intensa para AVP (A, B, C). Barra 200µm.

Figura 7 - Morfologia de neurônios AVP IR em diferentes áreas encefálicas.

Fotomicrografias em campo claro de cortes encefálicos do primata *Cebus apella* processados pela técnica de imunoperoxidase contra AVP evidenciando a morfologia de neurônios e fibras AVP IR na porção shell do núcleo SCh (A). Setas vazias apontam neurônios com pericários fortemente marcados por AVP e as setas cheias apontam neurônios menores no SCh (A). B ilustra neurônio IR AVP do núcleo PaV. Barra 20 μ m.

A média da área dos pericários de neurônios AVP IR com diferentes tamanhos na região shell do SCh mostrou um agrupamento de neurônios maiores SCh 1 (AVP – 101 μ m²) em relação a uma população de neurônios menores SCh 2 (AVP – 60 μ m²). As duas populações de neurônios apresentaram a área dos pericários menor do que os neurônios AVP IR localizados fora dos limites do SCh, no núcleo PaV (AVP – 296 μ m²) (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise da área dos pericários de neurônios AVP IR do núcleo PaV em comparação aos neurônios AVP IR do núcleo SCh.

média da área dos neurônios AVP IR dos núcleos PaV e SCh		áreas comparadas	p value
PaV (neurônios)	296 μ m ²	PaV x SCh 1	0,00051*
SCh 1 (AVP-neurônios maiores)	101 μ m ²	PaV x SCh 2	0,00025*
SCh 2 (AVP-neurônios menores)	60 μ m ²	SCh 1 x SCh 2	0,0052*

A média da área dos neurônios é estatisticamente diferente (*dados com $p \leq 0,05$) quando comparamos o núcleo PaV (média 296 μ m²) em relação à população neuronal do SCh 1 (AVP-neurônios maiores – média 101 μ m²), sendo $p = 0,00051$. Assim como a média da área dos neurônios difere no núcleo PaV (média 296 μ m²) em relação à população neuronal do SCh 2 (AVP-neurônios menores – média 60 μ m²) sendo $p = 0,00025$. Enquanto que a média da área dos neurônios SCh 1 (AVP-neurônios maiores – média 101 μ m²) difere em relação à população neuronal do SCh 2 (AVP-neurônios menores – média 60 μ m²) sendo $p = 0,0052$.

5.4 Análise da morfologia de fibras AVP e VIP IR no hipotálamo

O estudo das fibras AVP e VIP IR no hipotálamo do *Cebus apella* foi utilizado com o objetivo de identificar diferenças morfológicas entre fibras presentes e/ou com origem no SCh e fibras de outras áreas hipotalâmicas também produtoras dessas substâncias. Nossos resultados corroboram com dados descritos na literatura (Abrahamson, Moore, 2001) a respeito da morfologia diferenciada de fibras AVP e VIP IR originadas em neurônios do SCh. Verificamos que fibras AVP e VIP IR originadas nos neurônios do SCh são finas e varicosas com presença de bulbos irregularmente espaçados ao longo de suas trajetórias (Figura 8, Figura 9, Figura 10 C, D, G, H), além de botões terminais dilatados (Figura 9 A, B). Essa característica morfológica possibilitou diferenciar fibras AVP IR do SCh (Figura 10 C, D) em relação aos outros locais hipotalâmicos produtores de AVP, respectivamente neurônios magnocelulares do PaV e SO, cuja a morfologia é caracterizada por fibras espessas sem a presença de bulbos ou botões terminais dilatados (Figura 10 A, B). No que diz respeito às fibras VIP IR encontramos apenas um padrão morfológico em todo o hipotálamo, caracterizado pela presença de bulbos irregularmente espaçados ao longo de suas trajetórias e botões terminais dilatados (Figura 10 G, H), o que indica fortemente a origem supraquiasmática destas fibras, diferentemente do padrão morfológico de fibras VIP IR originadas de outras áreas encefálicas como córtex e complexo da amígdala (Figura 10 E, F).

Figura 8 - Morfologia das fibras AVP IR na região SPVZ.

Desenho esquemático feito em câmara lúcida. Distribuição das fibras IR AVP em região dorsal ao SCh, na região SPVZ (A). Em B, imagem em maior aumento destacando morfologia diferenciada entre as fibras com ausência de varicosidades originadas no PaV (setas vermelhas) e fibras com presença de varicosidades originadas no SCh (setas azuis). Barra de calibração 200 μ m.

Figura 9 - Botões terminais AVP IR.

Fotomicrografias em campo claro da região de AVPe (no núcleo periventricular anteroventral) em A, MPA (área pré-optica medial) em B destacando em ambas fibras AVP IR com botões terminais. Setas indicam botões terminais. Barra 20 μ m.

Quando analisamos o sentido das fibras AVP e VIP IR em relação ao corte frontal, respeitando os limites ventro dorsal e médio lateral do corte encefálico, observamos predominância de fibras VIP IR representadas por pequenos pontos (Figura 10 cabeça de setas em G, H), possivelmente evidenciando fibras VIP IR em sentido ântero-posterior em relação aos cortes, cortadas transversalmente. Já às fibras AVP IR, seguindo os mesmos critérios de análise, apresentaram-se longas, distribuídas nos sentidos ventro dorsal e médio lateral do corte frontal (Figura 10 C, D). Apesar das fibras AVP e VIP IR coexistirem praticamente nas mesmas áreas, diferentes padrões de distribuição demonstram que as mesmas formam vias com sentidos diferentes. Além disso, as fibras VIP IR aparentam ter diferentes sentidos.

Figura 10 - Morfologia de fibras VIP e AVP IR

Fotomicrografias em campo claro evidenciando morfologia de fibras AVP IR (A, B, C e D) e VIP IR (E, F, G e H). As setas indicam em A fibras AVP IR do núcleo SO, em B fibras AVP IR do núcleo PaV, ambas sem varicosidades e em C e D fibras AVP IR do núcleo Sch com varicosidades. As setas em E indicam fibras de neurônios VIP IR do córtex do cíngulo, em F fibras VIP IR da região do complexo amgdaloide, ambas sem varicosidades. Em G e H, as setas indicam fibras VIP IR com varicosidades e trajeto longitudinal, e as cabeças de setas indicam vários pontos marcados com VIP que sugerem ser fibras VIP IR cortadas transversalmente, ambas encontradas nos limites do Sch e áreas adjacentes. Barra 20 μ m.

5.5 Diferenciação morfológica de fibras AVP IR e vasos sanguíneos

A caracterização das fibras AVP e VIP IR deixou claro as diferenças entre a morfologia das fibras eferentes do SCh em relação aos demais locais produtores de AVP e VIP no hipotálamo do *Cebus apella*. No entanto, com o intuito de esclarecer se as fibras marcadas com AVP no presente estudo poderiam ser confundidas com vasos sanguíneos realizamos dupla imunofluorescência com AVP e o Fator de Von Willebrand (marcador de vasos sanguíneos) (Figura 11). O resultado da dupla marcação não evidenciou colocalização de AVP e vasos sanguíneos marcados com Fator de Von Willebrand nas regiões analisadas, (Figura 11 C) mostrando especificidade do anticorpo anti-AVP na marcação de fibras AVP IR.

Figura 11 - Diferenciação morfológica entre fibras AVP e vasos sanguíneos.

Fotomicrografia de dupla imunofluorescência contra Fator de Von Willebrand (A) e AVP (B). Em C, sobreposição das duas marcações (Merge) mostrando que não houve colocalização (amarelo) de fibras marcadas com AVP (vermelho) com vasos sanguíneos marcados pelo Von Willebrand (verde) em regiões produtoras de AVP no encéfalo do primata *Cebus apella*. Em D, detalhe de C mostrando vaso sanguíneo (*) marcado com Von Willebrand (verde). Barra 100µm. Ox (quiasma óptico), So (supra óptico).

Ainda com o intuito de confirmar que não houve equívoco na análise de entre fibras nervosas e vasos sanguíneos, foi realizado estudo de diferenciação morfológica entre estas duas estruturas com a técnica de microscopia eletrônica de

transmissão. Esta técnica permitiu identificar as diferenças estruturais entre as fibras AVP IR e vasos sanguíneos nas regiões hipotalâmicas analisadas (Figura 12). As imagens deixam claro que mesmo que houvesse a marcação indesejada de vasos sanguíneos com o anticorpo anti AVP, a morfologia do vaso sanguíneo apresentaria características estruturais muito diferentes e facilmente diferenciáveis das fibras nervosas sendo o capilar uma estrutura com maior calibre do que a fibra nervosa (Figura 12 A, C, C'). Além disso, o capilar, ao contrário da fibra, apresenta luz em seu interior (Figura 12 A).

Figura 12 - Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão.

Fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão no hipotálamo anterior ao nível do núcleo SCh em região com forte marcação para neurônios e fibras AVP IR. Em A, a seta indica a parede de um vaso e a cabeça de seta indica fibras colágenas da parede do vaso (aumento de 6.000X). Em A', a cabeça de seta indica as fibras colágenas (aumento de 30.000X). Em B (aumento de 6.000X), a seta indica núcleo (N) de neurônios AVP e asteriscos a presença de grânulos eletrodensos. B', o asterisco indica grânulos eletrodensos IR comumente encontrados em microscopia eletrônica para o neuropeptídeo AVP (Ibata et al., 1999) (aumento de 40.000X). Em C e C', as setas indicam fibras (aumento de 6.000X e 25.000X respectivamente).

5.6 Análise da distribuição de Fibras AVP e VIP IR

5.6.1 Fibras AVP IR

A análise do padrão de distribuição das fibras AVP IR mostrou feixes de fibras densamente localizadas nas áreas adjacentes ao SCh. A densidade de fibras AVP IR com morfologia similar às encontradas no SCh diminui ao longo dos cortes hipotalâmicos tanto no sentido anterior quanto no sentido posterior ao núcleo. Dentro dos limites do SCh foi observada pequena quantidade de fibras AVP IR na porção core do núcleo, sobrepostas à neurônios VIP IR.

Dentre as áreas hipotalâmicas analisadas, foram visualizadas fibras AVP IR com morfologia similar às do SCh em:

1) Área pré-óptica hipotalâmica: zona periventricular (no núcleo periventricular anteroventral (AVPe) e área pré-óptica medial (MPA)); zona medial (fibras em MPA, AHA); (Figura 13).

2) Área hipotalâmica anterior: zona periventricular (pequenas fibras no SCh, no núcleo subventricular (SV) (Figura 5 B, Figura 13), fibras em SPVZ porção medial, fibras no núcleo PaV, AVPe e ox); zona medial (em AHA, em toda região de MPA, e no ox); zona lateral fibras no SO e área lateral pré optica (LPO) (Figuras 14, 15, 16).

3) Área hipotalâmica tuberal: zona periventricular (fibras AVP IR na área retroquiasmática (RCh), no núcleo arqueado (Arc), poucas fibras na região ventral do DMH e eminência mediana (ME)); zona medial (fibras AVP IR foram visualizadas no núcleo ventro medial hipotalâmico (VMH), AHA); zona lateral (fibras AVP IR na parte retroquiasmática do núcleo óptico (SOR), na decussação supraóptica (SOX), no tracto óptico (opt) e no hipotálamo lateral (LH) (Figura 16, 17).

Ao comparar a distribuição das fibras AVP IR com as VIP IR foi verificado que fibras AVP IR estão presentes em níveis mais caudais em relação às fibras VIP IR (Figura 16, 17).

A distribuição das fibras AVP IR com morfologia similar às daquelas de outros locais produtores de AVP no hipotálamo também foram destacadas nos esquemas de mapeamento por câmera lúcida (Figuras 13, 14, 15, 16, 17).

5.6.2 Fibras VIP IR

Embora a maior concentração de fibras VIP IR tenha sido visualizada nas áreas adjacentes ao SCh, fibras VIP IR foram visualizadas além dos limites ântero posterior deste núcleo. A maior densidade de fibras VIP IR estava concentrada nas zonas periventriculares, mediais e laterais da área pré-óptica e da área anterior do hipotálamo e em menor densidade na área hipotalâmica tuberal. Nos limites pertencentes ao SCh observamos grande quantidade de fibras VIP IR na porção shell do núcleo, juntamente com neurônios AVP IR.

Dentre as áreas hipotalâmicas analisadas, foram visualizadas fibras VIP IR com morfologia similar às do SCh:

1) Na área pré-óptica hipotalâmica: zona periventricular (fibras em locais como SV, MPA, AVPe e ox); zona medial (fibras por toda região MPA); zona lateral fibras em LPO ((Figura 13, Figura 14).

2) Na área hipotalâmica anterior: fibras por toda área hipotalâmica nas diferentes zonas, sendo mais escassas em zonas laterais e mais densas em zonas periventriculares. Na zona periventricular (fibras VIP IR no SCh, na SPVZ lateral e na região do PaV; na zona medial (fibras na AHA, MPA); na zona lateral (fibras mais difusas no LH (Figura 14).

3) Na área hipotalâmica tuberal: zona periventricular (poucas fibras na área RCh) (Figura 16); zona medial (poucas fibras na porção rostral de VMH e DMH) (Figura 17) zona lateral (poucas fibras na região do núcleo SO, e LH) (Figura 15).

Figura 13 - Análise da distribuição de fibras AVP e VIP IR.

Desenhos esquemáticos da distribuição das fibras AVP IR e VIP IR na área pré-óptica hipotalâmica (rostral ao limite anterior do núcleo supraquiasmático (SCH)). Em A, desenho da distribuição das fibras AVP IR e VIP IR em corte encefálico ao nível da área pré-óptica hipotalâmica representando as principais áreas com fibras AVP IR (vermelho) e VIP IR (preto): LPO (área pré óptica lateral), MPA (área pré optica medial), AVPe (núcleo periventricular antero ventral), SV (núcleo sub ventricular). Em B, detalhe da localização do SCH em maior aumento. OX (quiasma óptico), 3V (terceiro ventrículo).

Figura 14 - Análise da distribuição de fibras AVP e VIP IR.

Desenhos esquemáticos da distribuição das fibras AVP IR e VIP IR na área hipotalâmica anterior. Em A, desenho da distribuição das fibras AVP IR e VIP IR em corte encefálico ao nível da área hipotalâmica anterior representando as principais áreas com fibras AVP IR (vermelho) e VIP IR (preto): LPO (área pré óptica lateral), MPA (área pré óptica medial), PaV (núcleo paraventricular). Em B, detalhe do Sch em maior aumento. OX (quiasma óptico), 3V (terceiro ventrículo).

Figura 15 - Análise da distribuição de fibras AVP e VIP IR.

Desenhos esquemáticos da distribuição das fibras AVP IR e VIP IR na área hipotalâmica anterior. Em A, desenho da distribuição das fibras AVP IR e VIP IR em corte encefálico ao nível da área hipotalâmica anterior representando as principais áreas com fibras AVP IR (vermelho) e VIP IR (preto): MPA (área pré óptica medial) e PaV (núcleo paraventricular). Em B, detalhe do SCH em maior aumento. OX (quiasma óptico), 3V (terceiro ventrículo).

Figura 16 - Análise da distribuição de fibras AVP IR.

Desenhos esquemáticos da distribuição das fibras AVP IR em corte encefálico ao nível da área hipotalâmica tuberal representando as principais áreas com fibras AVP IR (preto): MPA (área pré-óptica medial), PaV (núcleo paraventricular) e SO (núcleo supra-óptico). OX (quiasma óptico), 3V (terceiro ventrículo).

Figura 17 - Análise da distribuição de fibras AVP IR.

Desenho esquemático da distribuição das fibras AVP IR (preto) em corte encefálico ao nível da área hipotalâmica tuberal mostrando fibras AVP IR nas áreas: DMH (núcleo dorso medial), VMH (núcleo ventro medial), Arc (núcleo arqueado), SOR (parte retroquiasmática do núcleo óptico), SOX (decussação supraóptica), opt (trato óptico), ME (eminência mediana), 3V (terceiro ventrículo).

Na análise da distribuição das fibras IR verificamos a coexistência de fibras AVP e VIP IR com morfologia similar a encontrada no SCh do primata *Cebus apella* nas seguintes áreas hipotalâmicas: MPA, PaV, AHA, VMH, DMH, com exceção da área SO. Nos limites pertencentes ao SCh observamos grande quantidade de fibras VIP IR na porção shell do núcleo, juntamente com neurônios AVP IR (Figura 18).

Figura 18 - Esquema simplificado de distribuição de fibras AVP e VIP IR com morfologia similar às do SCh, no hipotálamo.

Desenho esquemático dos dois núcleos SCh (direito e esquerdo) com as subdivisões core e shell. Os pontos pretos representam os pericários dos neurônios e as linhas pretas representam as projeções. O esquema resume os dados do presente estudo mostrando a coexistência de fibras AVP e VIP IR com morfologia similar a encontrada no SCh do primata *Cebus apella* nas seguintes áreas hipotalâmicas: MPA (área pré óptica medial), PaV (núcleo paraventricular), AHA (área hipotalâmica anterior), DMH (núcleo dorso medial), VMH (núcleo ventro medial), Arc (núcleo arqueado), com exceção da área SO (núcleo supra óptico) que apresentou apenas fibras VIP IR. Além disso, as fibras AVP e VIP IR encontradas no núcleo SV indicam conexões entre os dois núcleos.

Resumindo, o padrão de distribuição de todas as fibras IR mapeadas mostram que fibras AVP IR com morfologia similar aquelas encontradas no SCh encontram-se concentradas em sua maioria nas zonas periventricular e medial do hipotálamo (Figura 19 B setas vermelhas) e apresentam distribuição além dos limites do núcleo SCh (Figura 19 A setas vermelhas). Na porção mais posterior da área tuberal hipotalâmica há uma diminuição na densidade destas fibras (Figura 19 A setas vermelhas) em relação às fibras AVP IR de outras áreas hipotalâmicas (Figura 19 A setas verdes). Fibras VIP IR (Figura 19 A setas pretas) também apresentaram distribuição além dos limites antero posterior do SCh. No entanto, ao contrário das fibras AVP, as fibras VIP IR alcançam as zonas mediais e laterais (Figura 19 B setas pretas). No sentido antero posterior as fibras VIP IR são encontradas em maior quantidade nos cortes mais anteriores do hipotálamo em comparação à área tuberal hipotalâmica.

Figura 19 - Distribuição de todas as fibras AVP e VIP IR mapeadas no hipotálamo

Esquema de divisão do hipotálamo evidenciando em A, as quatro áreas hipotalâmicas de anterior (A) para posterior (P): área pré óptica, área anterior, área tuberal e área mamilar. Entre a área pré-óptica e a área anterior está localizado o núcleo SCh. Em B, divisão do hipotálamo em três zonas longitudinais distintas ao nível do SCh denominadas: zonas periventricular (ZP) (próxima ao terceiro ventrículo -3V), medial (ZM) e lateral (ZL). Setas vermelhas representam fibras AVP IR com morfologia similar as fibras encontradas no SCh. Setas verdes representam fibras AVP IR com morfologia similar às outras áreas hipotalâmicas produtoras de AVP. Setas pretas representam fibras VIP com morfologia similar as fibras encontradas no SCh.

6 DISCUSSÃO

A complexidade funcional do SCh pode ser relacionada as vias de entrada, ao processamento de informações pelas distintas populações neuronais intrínsecas, e vias de saída que comunicam o SCh a componentes efetores responsáveis por diferentes funções regulando assim a fisiologia do indivíduo como um todo. Assim, a transmissão da informação gerada no SCh e sincronizada por sinais aferentes se dá via eferências deste para áreas recipientes localizadas principalmente no hipotálamo. O resultado desencadeia de forma rítmica e sincronizada processos funcionais como a periodicidade de secreção de hormônios, variações de temperatura, ingesta alimentar, propensão e duração do ciclo sono-vigília (Provencio et al., 2002; Saper, 2013).

É possível verificar na literatura descrições quanto à organização neuroquímica, o padrão de projeções aferentes e eferentes do SCh e de outras estruturas do STC em várias espécies. Nosso grupo têm se dedicado a elucidar diferentes aspectos anatômicos do STC no primata *Cebus apella*. Em estudos anteriores foram descritos a morfologia do núcleo e o padrão das três principais aferências ao SCh (Pinato et al., 2007; Pinato et al., 2009), projeções retinianas para estruturas envolvidas no STC como a rafe e o núcleo pré geniculado (Frazão et al., 2008; Pinato et al., 2009) e a caracterização neuroquímica do SCh (Rocha et al., 2013, dados não publicados).

Iniciamos a investigação sobre as eferências do SCh, com algumas tentativas de injeção de traçador *pós mortem* em encéfalo do *Cebus apella*. Várias dificuldades técnicas foram encontradas, como a de se estabelecer o tempo exato para o traçador percorrer as distâncias desejadas neste tecido. Assim, concluímos que o mapeamento das fibras eferentes pela injeção de traçador exigiria muitos espécimes, o que no caso do animal em questão, tornou a técnica inviável.

O mapeamento de fibras eferentes do SCh tem sido realizado com sucesso tanto em roedores quanto humanos através do estudo do padrão de distribuição das fibras AVP e VIP IR que apresentam características morfológicas similares aquelas encontradas no SCh e diferenciadas em relação aos outros locais produtores de AVP e VIP em áreas hipotalâmicas. Estudos associaram a técnica imuno-histoquímica ao uso de traçadores e obtiveram resultados similares, confirmando a eficácia dessa metodologia (Dai et al., 1997; Watts, Swanson, 1987).

Assim, no presente estudo, apresentamos o mapeamento das fibras VIP e AVP IR no hipotálamo do *Cebus apella* e pretendemos agora compará-los com os resultados de outros mamíferos descritos na literatura focando nas diferenças e ou similaridades anatômicas quer sejam evolutivas ou entre animais diurnos e noturnos.

Para descrever adequadamente as similaridades na divisão do núcleo e a localização específica dos neuropeptídeos, utilizamos os termos core e shell descritos em outras espécies (Cassone et al., 1988; Evans et al., 2011; Moore, 1993; Vasalou, Henson, 2011). Da mesma maneira as áreas que apresentaram fibras VIP e AVP IR com morfologia similar as do SCh foram classificadas como as principais áreas recipientes desse tipo de fibra.

No que se refere à divisão anatomo funcional do SCh, nosso estudo evidenciou neurônios VIP IR na porção ventro lateral do SCh, e neurônios AVP IR na porção dorso medial em concordância com o descrito em outras espécies (Abrahamson, Moore, 2001; Moore et al., 2002; Morin et al., 2006; para revisão Moore, 2013; Reghunandanan, Reghunandanan, 2006; Van den Pol, Tsujimoto, 1985), incluindo ratos transgênicos (Ueta et al., 2011). A co-localização entre estas duas populações neuronais descrita em humanos (Romijn et al., 1999), não foi verificada no *Cebus*. É interessante ressaltar que no presente estudo foram visualizados neurônios AVP IR com diferentes tamanhos localizados em um mesmo corte nos limites do SCh. Essa característica pode indicar a presença de duas populações neuronais distintas AVP IR na porção shell do *Cebus apella*.

As fibras AVP e VIP IR originadas nas porções core e shell do SCh apresentaram morfologia específica com varicosidades irregularmente espaçadas ao longo de suas trajetórias e presença de botões terminais dilatados, diferentemente daquelas observadas em outras áreas produtoras de VIP e AVP, resultado similar ao descrito em outras espécies (Buijs et al., 1997; 1993; Dai et al., 1997; Watts, Swanson, 1987). Essa condição permitiu inferir que fibras VIP e AVP IR eram originadas do SCh mesmo quando localizadas a longas distâncias deste núcleo. Alguns processos como modulação de atividade neuronal, e neurotransmissão difusa tem sido relacionados a esse tipo de morfologia axonal com varicosidades ao longo do trajeto de diferentes axônios (Shepherd, Raastad, 2003; Zhang et al., 2011).

Em nosso estudo fibras AVP IR com características semelhantes as do SCh, mais precisamente da região shell foram encontradas mais densamente nas zonas

periventriculares e mediais do hipotálamo, enquanto fibras VIP IR com características semelhantes as do SCh, mais precisamente da região “core”, são esparsas para zonas mediais e laterais do hipotálamo e alcançaram a zona lateral hipotalâmica.

A disposição das fibras nas regiões periventriculares apresenta característica topográfica conservada entre mamíferos, como é o exemplo do padrão de distribuição de fibras AVP e VIP IR na SPVZ e PaV, descrita no presente estudo, em roedores (Leak, Moore, 2001), e humanos (Dai et al., 1997; Dai et al., 1998). Foram evidenciadas fibras AVP e VIP IR do SCh rostralmente na área hipotalâmica anterior e área pré-óptica medial; lateralmente para área hipotalâmica lateral; mais caudalmente na SPZV e área tuberal retroquiasmática com coexistência em algumas áreas hipotalâmicas: MPA, PaV, AHA, VMH, DMH.

Nos limites do SCh as fibras dos neurônios VIP IR apresentaram distribuição na porção shell do núcleo, sobrepostas à população de neurônios AVP IR, similar ao descrito em roedores e humanos (Kalsbeek et al., 1993; Watts e Swanson, 1987, Dai et al., 1997). Já as fibras dos neurônios AVP IR apresentaram-se também, embora em menor quantidade, na região core do SCh corroborando com dados descritos no hamster e rato (Kalsbeek et al., 1993; Watts, Swanson, 1987). Essa característica intrínseca reflete especialidades funcionais das porções core e shell, na geração, controle e expressão da ritmicidade circadiana (Moore et al., 2002), uma vez que já foi descrita em roedor a presença de sinapses entre essas duas populações neuronais nos limites do SCh (Jacomy et al., 1999).

A população neuronal VIP IR, por exemplo, é relacionada ao mecanismo de sincronização dos ritmos circadianos. Enquanto que a população AVP IR, considerada a principal área de saída do SCh, é responsável pela à geração de ritmos circadianos (Cassone et al., 1988; Dai et al., 1997; Daikoko et al., 1992; para revisão Moore, 2013; Ramanathan et al., 2006).

Ultrapassando os limites do SCh, fibras AVP IR e poucas fibras VIP IR foram encontradas em porções ventrais e mediais ao núcleo, mais precisamente no SV, conhecidamente uma área de passagem de fibras, o que sugere que existam conexões entre o SCh direito e o esquerdo, característica similar ao que é encontrado em roedores (Ibata et al., 1999) e descrita como importante substrato anatômico para uma determinada ação através do qual o marcapasso circadiano regula entradas relacionadas as informações ambientais (Jacomy et al., 1999).

Localizada dorsalmente ao SCh, estendendo-se em direção à borda ventral do PaV e ventralmente a AHA, a SPVZ tem sido descrita como área amplificadora das funções do SCh, sendo caracterizada como o principal componente no fluxo de saída da regulação circadiana (Watts, 1991; Watts, Swanson, 1987). Essa região recebe a mais densa projeção do SCh, e ao mesmo tempo projeta-se para este núcleo e áreas recipientes, como descrito no rato (Watts, Swanson, 1987) e hamster (Kalsbeek et al., 1993).

As análises do presente estudo evidenciaram fibras AVP IR na ZSPV na porção medial, próximas ao 3V. Já as fibras VIP IR foram verificadas em menor proporção na SPVZ, sendo que a maior densidade de fibras VIP IR apresentou orientação paralela e lateral às fibras AVP IR, mostrando que devem existir conexões AVP IR e algumas fibras VIP IR entre o SCh e a SPVZ no *Cebus apella* e estas estão organizadas topograficamente de maneira diferente entre si, similar ao descrito em roedores e humanos (Leak, Moore, 2001).

A ZSPV pode representar um sítio adicional para a modulação de certos ritmos circadianos (Watts, 1991). Uma das suas funções seria retransmitir sinais de temporização para o núcleo DMH, que por sua vez influencia ciclos circadianos de alimentação, vigília-sono, atividade locomotora e secreção de corticosteróides (Chou et al., 2003). Lesão em neurônios da porção ventral da SPVZ causam a alteração de ritmos circadianos como sono-vigília, atividade locomotora, e pequenos efeitos sobre temperatura corporal, (Lu et al., 2001). Por outro lado, se as lesões forem na porção dorsal de SPVZ, ou seja, ventral ao núcleo PaV, os efeitos são opostos, caracterizados por perda total do ritmo da temperatura corporal, e poucos efeitos sobre os comportamentos sono-vigília, e atividade locomotora (Saper, 2013).

Similar as descrições em rato, hamster e humanos tanto por imunohistoquímica quanto com o uso de traçadores, observamos fibras AVP e VIP IR alcançando a porção ventral do PaV e AHA (Abrahamson, Moore, 2001; Buijs et al, 1993; Dai et al., 1998; Morin et al., 1992; Vrang et al., 1995; Watts, Swanson, 1987). No *Cebus apella*, assim como em roedores, o PaV pôde ser visto próximo ao 3V, alcançando maior extensão ao longo da parede do 3V ao nível tuberal. Esta localização no meio do diencéfalo margeando uma região de grande difusão de líquido céfalo-raquidiano torna o PaV a maior região integradora do hipotálamo, envolvida na manutenção da homeostase (Schlenker, 2005).

O PaV é caracterizado pela presença de neurônios magnocelulares que também sintetizam AVP. Apesar dessa condição, não tivemos dificuldades na diferenciação morfológica das fibras AVP IR do PaV com as originadas no SCh. O PaV funcionalmente está envolvido na regulação da ingestão de alimento, função neuroendócrina e uma gama de respostas autonômicas (Kalsbeek et al., 2004).

Na comparação entre as distribuições das fibras de AVP e VIP IR nesta região, verificou-se que as fibras AVP IR apresentaram distribuição mais densa na parte ventral do PaV em relação as fibras VIP IR. No *Cebus apella*, assim como no rato (Vrang et al., 1995), foram visualizadas fibras AVP IR similares as do SCh também na borda medial do PaV as quais podem ter relação com o circuito neural do PaV sobre o controle da produção rítmica circadiana de melatonina na pineal sob influência do SCh (Reghunandanan, Reghunandanan, 2006). Funcionalmente, o PaV está envolvido na regulação da ingestão de alimento, função neuroendócrina, e uma gama de respostas autonômicas (Kalsbeek et al., 2004; Schlenker, 2005).

O núcleo SO, assim como o PaV, apresenta fibras AVP IR de neurônios que sintetizam AVP intrínsecos ao próprio núcleo (Poulain, Wakerley, 1982). Nesse caso porém, não foram identificadas fibras AVP IR com característica similar ao do SCh. Apesar disto, não se descarta a possibilidade da existência destas fibras em meio ao denso aglomerado de fibras AVP IR calibrosas provenientes do próprio núcleo. Ao contrário, na análise de fibras VIP IR, foram verificadas fibras do SCh, embora em pouca quantidade, distribuídas em porções caudais do SO.

Em roedores foram descritas projeções eferentes do SCh para o SO (Kalsbeek, 2006; Trudel, Bourque, 2010), o que reforça a idéia que o SCh pode desempenhar função importante na geração do padrão circadiano de atividade nos neurônios magnocelulares que sintetizam AVP, tanto no SO, quanto no PaV (Stephan et al., 1981; Watts, Swanson, 1987).

No presente estudo foi verificada a presença de fibras AVP e VIP IR com morfologia semelhante às encontradas no SCh em direção ao hipotálamo anterior na MPA, nas proximidades de AHA e AVPe. Quando analisamos o padrão de distribuição de todas as fibras AVP e VIP IR no hipotálamo anterior, ou seja, com ou sem morfologia similar as fibras do SCh evidenciamos fibras AVP IR em maior quantidade que VIP IR. No entanto, quando analisamos a morfologia das fibras, ou seja, quando caracterizamos as fibras AVP IR com origem no SCh e descartamos as

fibras com origem em outras áreas observamos que as fibras VIP e AVP IR apresentam mesma proporção nesta área.

Os resultados do presente estudo, seguindo o princípio geral de organização do hipotálamo (Saper et al., 1979), mostram que, como descrito em roedores, que as fibras do SCh não se encontram de forma abundante além dos limites do hipotálamo (Watts et al., 1991).

Fibras AVP e VIP IR foram visualizadas na MPA, conhecidamente uma das poucas áreas relacionadas ao sistema sono-vigília que recebe projeções diretas do SCh em roedores (Watts, Swanson, 1987). A MPA, embora de tamanho relativamente pequeno, contém populações neuronais complexas responsáveis em controlar a temperatura, sono, e reprodução (McGinty, Szymusiak, 1990; Satinoff, 1978).

Além da MPA, a região AVPe apresentou imunorreatividade para fibras AVP e VIP IR. Em ratos, esta é uma região responsável pela integração de sinais hormonais e ambientais para neurônios LHRH (hormônio liberador hormônio luteinizante) (Simerly, 1998) e apresenta além de projeções eferentes diretas do SCh, receptores para VIP e AVP (Vida et al., 2010) em neurônios que contêm estrógeno (Watson et al., 1995). Já em camundongos as projeções AVP IR do SCh fazem sinapses com neurônios que sintetizam Kisspeptina na AVPe (Vida et al., 2010).

A área AVPe em ratos, é uma região responsável pela integração de sinais hormonais e ambientais para neurônios LHRH (hormônio liberador hormônio luteinizante) (Simerly, 1998). Assim, nossos resultados apontam para a hipótese de que a presença de fibras nas áreas AVPe e em MPA no *Cebus apella* caracterize, assim como em roedores, uma relação funcional entre sinais circadianos e o controle de picos hormonais (Watson et al., 1995).

Outro importante núcleo onde foram visualizadas fibras AVP e VIP IR, foi o núcleo DMH, localizado no hipotálamo posterior, adjacente ao terceiro ventrículo, caudal ao núcleo paraventricular do hipotálamo, dorsal ao núcleo ventromedial e ventral à zona incerta. Sua borda medial é próxima ao 3V, enquanto que a caudal é pouco distinta (Thompson et al., 1996). O DMH tem sido associado a uma variedade respostas comportamentais e fisiológicas, que incluem ingesta alimentar (Dalton et al., 1981), reprodução (Gallo, 1981), comportamentos do estresse (Shekhar, Katner, 1995) e ritmos circadianos (Chou et al., 2003).

Nesse núcleo foram observadas poucas fibras AVP e VIP IR nas porções rostral e ventral, em sua maioria botões terminais com morfologia característica das fibras do SCh. Nas porções mais caudais do núcleo apareceram somente fibras AVP IR, também com botões terminais com morfologia característica das fibras do SCh. Na região dorsal do DMH as fibras AVP IR apresentaram-se mais espessas e sem varicosidades sem as características das fibras do SCh. Projeções do SCh para o DMH já foram demonstradas em rato e hamster (Buijs et al., 1993; Hoorneman, Buijs, 1982; Kalsbeek et al., 1993; Watts, 1991).

Em análise, as fibras AVP e VIP IR vistas no DMH com morfologia similar as do SCh do *Cebus apella*, podem indicar relação com a distribuição do sinal circadiano, uma vez que projeções recíprocas do DMH para o SCh (Acosta-Galvan et al., 2011), assim como as conexões do DMH com distintas áreas hipotalâmicas reforçam a idéia de que o DMH é essencial para distribuição de sinais circadianos e metabólicos no hipotálamo (Horst, Luiten, 1986).

Evidências anatômicas como projeções GABAérgicas do DMH para a área pré-óptica ventrolateral (VLPO), cuja a condição é promover estímulos especificamente durante a fase de sono, podem estar associadas com a propagação dessas informações circadianas. Outra condição se refere a presença do gene clock *Per1* nas células do DMH. Essas células produzem orexina, também chamada hipocretina, responsáveis em regular a excitação, vigília e apetite (Mahoney et al., 2013).

No VMH foram identificadas fibras AVP e VIP IR com características morfológicas similares as do SCh e estas se estenderam para porções ventrolaterais do núcleo sugerindo ser esta mais uma área recipiente das projeções do SCh. Em ratos, foram descritas eferências do SCh para o VMH (Watts, Swanson, 1987; Zaborsky, Makard, 1979) que está envolvido na regulação autonômica, neuroendócrina (Kiba et al., 1992) e na produção de corticosterona (Honma et al., 1987).

Em hamster, a conexão do SCh com o VMH tem sido associada às alterações de ritmo circadiano na presença de atividades locomotoras (Mrosovsky, Salmon, 1987). Quanto aos aspectos funcionais do VMH no *Cebus apella*, futuros estudos, caracterizando neuroquimicamente as populações neuronais recipientes nesta e nas outras áreas mapeadas neste estudo, serão importantes para elucidar os aspectos funcionais destas projeções.

Os dados apresentados no presente estudo sugerem características semelhantes do *Cebus apella* em comparação a outros primatas e roedores, quanto à organização topográfica dos neurônios VIP e AVP IR (Buijs, 1997; Card, Moore, 1991; Leak, Moore, 2001; Moore et al., 2002; Van den Pol, Tsujimoto, 1985), quanto a morfologia diferenciada das fibras AVP e VIP IR do SCh (Abrahamson, Moore, 2001; Morin et al., 1994; Watts, Swanson, 1987) e quanto a presença de fibras AVP e VIP IR em áreas descritas como recipientes das projeções eferentes do SCh (Buijs, 1997; Leak, Moore, 2001; Watts, Swanson, 1987). A comparação desse estudo – *Cebus apella* com os diferentes mamíferos descritos na literatura quanto às projeções eferentes do SCh, levanta aspectos relacionados à evolução e fisiologia como a persistência das principais características das populações neuronais e características morfológicas das fibras AVP e VIP IR do SCh no *Cebus apella*. Além de ressaltar a idéia de que as mesmas apresentam uma função importante e indispensável entre as espécies, serve como base para discussão de estudos do STC neste primata e em diferentes espécies.

7 CONCLUSÕES

- A população neuronal AVP IR intrínseca ao SCh é composta por dois subgrupos de tamanhos diferentes na porção shell do núcleo.
- Diferenças morfológicas nos axônios AVP e VIP IR permitiram distinguir as fibras com origem no SCh de fibras com origem em outros locais produtores de AVP e VIP.
- Fibras AVP e VIP IR com morfologia similar as fibras com origem no SCh coexistem nas seguintes áreas hipotalâmicas do primata *Cebus apella*: VMH, DHM, MPA, AHA, PaV, SPVZ e SV.
- O padrão de distribuição de fibras AVP e VIP IR encontrada nas áreas hipotalâmicas do *Cebus apella* corrobora com os dados descritos em outras espécies.
- As fibras AVP IR aparecem em porções mais mediais da SPVZ, e PaV em relação as fibras VIP IR. Essa característica pode representar populações neuronais distintas recipientes para estas duas substâncias neuroativas dentro de uma mesma área, o que deve ser explorado em futuro estudo.

REFERÊNCIAS²

- Abrahamson EE, Moore RY. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 2001;916:172-91.
- Acosta-Galvan G, Yi CX, van der Vliet J, Jhamandas JH, Panula P, Angeles-Castellanos M, Del Carmen Basualdo M, Escobar C, Buijs RM. Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;5;108(14):5813-8.
- Antle MC, Silver R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci.* 2005;28:145–51.
- Bons N, Mestre N, Netter A, Danger JM, Piletier G, Vaudry H. Localization and characterization of neuropeptide Y in the brain of *Microcebus murinus* (Primate, Lemurian). *J Comp Neurol.* 1990;298:343-61.
- Bourne JA, Warner CE, Upton DJ, Rosa MGP. Chemoarchitecture of the middle temporal visual area in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): laminar distribution of calcium-binding proteins (calbindin, parvalbumin) and nonphosphorylated neurofilament. *J Comp Neurol.* 2007;500:832–49.
- Buijs RM, Markman MM, Hou YX and Shinn S. Projections of the suprachiasmatic nucleus to stress-related areas in the rat hypothalamus: A light and electron microscopical study. *J. Comp. Neurol.* 1993;335:42-54.
- Buijs RM. Anatomical basis for the expression of circadian rhythms: efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* 1997;111:229-40.
- Card JP, Moore RY. The organization of visual circuits influencing the circadian activity of the suprachiasmatic nucleus. In: Klein DC, Moore RY, Reppert SM, editors. *Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock.* New York: Oxford University Press. 1991;p51-71.
- Card JP, Moore RY. The suprachiasmatic nucleus of the golden hamster: immunohistochemical analysis of the cell and fiber distribution. *Neuroscience.* 1984;13:415-31.
- Cassone VM, Speh JC, Card JP, Moore RY. Comparative anatomy of the mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms.* 1988;3:71-91.

² De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Cavalcante JS, Alves AS, Costa MSMO, Britto LRG. Differential distribution of afferents containing serotonin and neuropeptide Y within the marmoset suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 2002;927:200-3.

Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J: Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* 2003;23:10691-702.

Cipolla-Neto J, Marques N, Menna-Barreto, L, editors. *Introdução ao estudo da cronobiologia*. São Paulo: Ícone/EDUSP; 1988.

Costa MSMO, Moreira LF, Alones V, Lu J, Santee UR, Cavalcante JS, Moraes PRA, Britto LRG, Menaker M. Characterization of the circadian system in a brazilian species of monkey (*Callithrix jacchus*): Immunohistochemical analysis and retinal projections. *Biol Rhythm Res.* 1998;29:510-20.

Dai J, Swaab DF, Van der Vliet J, Buijs RM. Postmortem tracing reveals the organization of hypothalamic projections of the suprachiasmatic nucleus in the human brain. *J Comp Neurol.* 1998 Oct;400(1):87-102.

Dai J, Swaab DF, Buijs RM. Distribution of vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) fibers in the human hypothalamus with special emphasis on suprachiasmatic nucleus efferent projections. *J Comp Neurol.* 1997 Jul 14;383(4):397-414.

Dalton LD, Carpenter RG, Grossman SP. Ingestive behavior in adult rats with dorsomedial hypothalamic lesions. *Physiol Behav.* 1981Jan;26(1):117-23.

Decker K, Reuss S. Nitric oxide-synthesizing neurons in the hamster suprachiasmatic nucleus: A combined NOS- and NADPH- staining and retinohypothalamic tract tracing study. *Brain Res.* 1994;666:284-288.

Evans JA, Leise TL, Castanon-Cervantes O, Davidson AJ. Intrinsic regulation of spatiotemporal organization within the suprachiasmatic nucleus. *PLoS One.* 2011Jan 7;6(1):e15869.

Fiorani JR M, Gattass R, Rosa MGP, Sousa APB. Visual area MT in the Cebus monkey: location, visuotopic organization, and variability. *J Comp Neurol.* 1989;287:98–118.

Fragaszy DM, Visalberghi E, Robinson JG. Variability and Adaptability in the Genus *Cebus*. *Folia Primatologica.* 1990;54:114-8.

Frazão R, Pinato L, da Silva AV, Britto LR, Oliveira JA, Nogueira MI. Evidence of reciprocal connections between the dorsal raphe nucleus and the retina in the monkey *Cebus apella*. *Neurosci Lett.* 2008 Jan 10;430(2):119-23.

Freese CH, Oppenheimer JR. The Capuchin Monkeys, Genus *Cebus*. Em: *Ecology and Behavior of Neotropical Primates*. Coimbra-Filho AF, Mittermeier RA, editors. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 1981. v.1, p.331-90.

- Gallo RV. Effect of electrical stimulation of the dorsomedial hypothalamic nucleus on pulsatile LH release in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*. 1981 Mar;32(3):134-8.
- Gattass R, Gross CG. Visual topography of the striate projection zone in the posterior superior temporal sulcus (MT) of the macaque. *J Neurophysiol*. 1981;46:621–38.
- Gattass R, Gross CG, Sandell JH. Visual topography of V2 in the macaque. *J Comp Neurol*. 1981;201:519–39.
- Gattass R, Sousa APB, Rosa MGP. Visual topography of V1 in the Cebus monkey. *J Comp Neurol*. 1987;259:529–48.
- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*. 1998 Jun;280(5369):1564-9.
- Geoghegan D, Carter DA. A novel site of adult doublecortin expression: neuropeptide neurons within the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *BMC Neurosci*. 2008; Jan4;9:2.
- Goel N, Lee TM, Smale L. Suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet in the diurnal rodent *Octodon degus*: retinal projections and immunocytochemical characterization. *Neuroscience*. 1999;92(4):1491-509.
- Gooley JJ, Schomer A, Saper CB. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neuroscience*. 2006;9:398-407.
- Hay-Schmidt A, Vrang N, Larsen PJ, Mikkelsen JD. Projections from the raphe nuclei to the suprachiasmatic nuclei of the rat. *J Chem Neuroanat*. 2003;25:293-310.
- Hendrickson AE, Wagoner N, Cowan WM. An autoradiographic and electron microscope study of retino-hypothalamic connections. *Z Zellforsch*. 1972;135:1-26.
- Hickey TL, Spear PD. Retinogeniculate projections in hooded and albino rats. *Exp Brain Res*. 1976;24:523-529.
- Honma S, Honma KI, Nagasaka T, Hiroshige T. The ventromedial hypothalamic nucleus is not essential for the prefeeding corticosterone peak in rats under restricted daily feeding. *Physiol. Behav*. 1987;39:211-5.
- Hoorneman EMD and Buijs RM. Vasopressin fibers pathways in the rat brain following suprachiasmatic nucleus lesioning. *Brain Res*. 1982;243:235-41.
- Horst GJ, Luiten PG. The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. *Brain Res Bull*. 1986 Feb;16(2):23-48.

Ibata Y, Okamura H, Tanaka M, Tamada Y, Hayashi S, Iijima N, Matsuda T, Munekawa K, Takamatsu T, Hisa Y, Shigeyoshi Y, Amaya F. Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Front Neuroendocrinol.* 1999Jul;20(3):241-68.

Inouye ST, Kawamura H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76:5962-5966.

Jacomy H, Burlet A, Bosler O. Vasoactive intestinal peptide neurons as synaptic targets for vasopressin neurons in the suprachiasmatic nucleus. Double-label immunocytochemical demonstration in the rat. *Neuroscience.* 1999;88(3):859-70.

Kalsbeek A. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms.* 2006;21(6):458-69.

Kalsbeek A, Teclemariam-Mesbah R, Pevet P. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*), *J. Comp. Neurol.* 1993;332:293-314.

Kalsbeek A, La Fleur S, Van Heijningen C, Buijs R M. Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci.* 2004;24(35):7604-13.

Kiba T, Tanaka K, Endo O, Inoue S. Role of vagus nerve in increased DNA synthesis after hypothalamic ventromedial lesions in rat liver. *Am J Physiol.* 1992 Mar;262(3 Pt 1):G483-7.

King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell.* 1997;89(4):641-53.

Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell.* 1999;98(2):193-205.

Lavalle AC. Capuchin (*Cebus paella*) Tool Use in Captive Naturalistic Environment. *International Journal of Primatology.* 1999;20(3):399-413.

Leak RK, Moore RY. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J Comp Neurol.* 2001;433:312-334.

Le Gros Clark WE. Morphological aspects of the hypothalamus. In Le Gros Clark WE, Beattie J, Riddoch G, Dott NM, editors. *The hypothalamus.* Oliver & Boyd; 1938. p. 1-68.

Lehman MM, Silver R, Gladstone WR, Kahn MR, Gibson M, Brittman EL. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci.* 1987;7:1626-38.

- Lu J., Zhang YH, Chou TC, Gaus SE, Elmquist JK, Shiromani P, Saper CB. Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep–wake cycle and temperature regulation. *J. Neurosci.* 2001;21:4864–74.
- Lydic R, Albers HE, Tepper B, Moore-Ede MC. Three-dimensional structure of the mammalian suprachiasmatic nuclei: a comparative study of five species. *J Comp Neurol.* 1982;204:225-37.
- Mai JK, Kedziora O, Teckhaus L, Sofroniew MV. Evidence for subdivisions in the human suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol.* 1991;305:508-25.
- Mahoney CE, Brewer JM, Bittman EL. Central control of circadian phase in arousal-promoting neurons. *PLoS One.* 2013;8(6):e67173.
- Marshall ST, Faanunu AI, Bult A. Calretinin is not a marker for subdivisions within the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 2000;854:216-9.
- McGinty D, Szymusiak R. Keeping cool: a hypothesis about the mechanisms and functions of slow-wave sleep. *Trends Neurosci.* 1990 Dec;13(12):480-7.
- Menaker M. Circadian photoreception. *Science.* 2003; 299:213-4.
- Meziane H, Devigne C, Tramu G, Soumireu-Mourat B. Distribution of cholecystokinin immunoreactivity in the BALB/c mouse forebrain: an immunocytochemical study. *J chem. Neuroant.* 1997;12:191-209.
- Moffet JR, Williamson L., Palkovits M, Namboodiri MAA. N-acetylaspartylglutamate: A transmitter candidate for the retinohypothalamic tract. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:8065-9.
- Moga MM, Moore RY. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 1997;389:508-34.
- Moore-Ede MC, Sulaman FM, Fuller CA. The clocks that time us: physiology of the circadian timing system. Cambridge: Harvard Univ Press; 1982. 448 p.
- Moore RY, Eichler VB. Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain Res.* 1972;42:201-6.
- Moore RY, Lenn NJ. A retinohypothalamic projections in the rat. *J Comp Neurol.* 1972; 180:1-14.
- Moore RY. The organization of the human circadian system. In: Swaab DF, Hofman MA, Mirmiran M, Ravid R, Leeuwen FW, editors. *Prog Brain Res.* 1992;93:101-117.
- Moore RY. Circadian timing. In: Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, editors. *Fundamental neuroscience.* Nova York, EUA: Academic Press; 1999;1189-206.

Moore RY. Organization of the primate circadian system. *J. Biol. Rhythms* 1993;8:s3-s9.

Moore RY, Speh JC. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett.* 1993;150:112-6.

Moore RY, Speh JC. Serotonin innervations of the primate suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 2004;1010:169-73.

Moore RY, Speh JC, Leak RK. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tiss Res.* 2002;309:89-98.

Moore RY. The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;119:1-28.

Morin LP. The Circadian Visual System. *Brain Research Reviews.* 1994;67:102-27.

Morin LP and Allen CN. The circadian visual system. *Brain Res Rev.* 2006; 51:1-60.

Morin LP, Blanchard J, Moore RY. Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. *Vis Neurosci.* 1992;8:219-30.

Morin LP, Johnson RF, Moore RY. Two brain nuclei controlling circadian rhythms are identified by GFAP immunoreactivity in hamsters and rats. *Neurosci Lett.* 1989;99:55-60.

Mrosovsky N, Salmon P A. A behavioural method for accelerating reentrainment of rhythms to new light-dark cycles. *Nature.* 1987;330:372-3.

Negróni J, Nevo E, Cooper HM. Neuropeptidergic organization of the suprachiasmatic nucleus in the blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*). *Brain Res Bull.* 1997;44:633-9.

Padberg J, Disbrow E, Krubitzer L. The organization and connections of anterior and posterior parietal cortex in titi monkeys: do New World monkeys have an area 2? *Cereb Cortex.* 2005;15:1938-63.

Paxinos P, Petrides M, Toga AW. The rhesus monkey brain – in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 2009.409 p.

Pinato L, Allemandi W, Abe LK, Frazão R, Cruz-Rizzolo RJ, Cavalcante JS, Costa MS, Nogueira MI. A comparative study of cytoarchitecture and serotonergic afferents in the suprachiasmatic nucleus of primates (*Cebus apella* and *Callithrix jacchus*) and rats (Wistar and Long Evans strains). *Brain Res.* 2007.May 29;1149:101-10.

Pinato L, Frazão R, Cruz-Rizzolo RJ, Cavalcante JS, Nogueira MI. Immunocytochemical characterization of the pregeniculate nucleus and distribution of retinal and neuropeptide Y terminals in the suprachiasmatic nucleus of the Cebus monkey. *J Chem Neuroanat.* 2009;37(4):207-13.

Poulain DA, Wakerley JB. Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience*. 1982;7(4):773-808.

Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature*. 2002;415-493.

Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian rhythms period. *Science*. 1990;247:975-8.

Ramanathan C, Nunez AA, Martinez GS, Schwartz MD, Smale L. Temporal and spatial distribution of immunoreactive PER1 and PER2 proteins in the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region of the diurnal grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *Brain Res*. 2006 Feb 16;1073-1074:348-58.

Résibois A, Rogers JH. Calretinin in the brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience*. 1992;46:101-34.

Reuss S, Burger K. Substance P-like immunoreactivity in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of *Phodopus sungorus* – relation to daytime, photoperiod, sex and age. *Brain res*. 1994;638:189-95.

Reghunandanan V, Reghunandanan R. Neurotransmitters of the suprachiasmatic nuclei. *J Circadian Rhythms*. 2006;4:2.

Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:647-76.

Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002;418:935–41.

Romijn HJ, van Uum JF, Emmering J, Goncharuk V, Buijs RM. Colocalization of VIP with AVP in neurons of the human paraventricular, supraoptic and suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*. 1999 Jun 19;832(1-2):47-53.

Rosa MGP, Sousa APB, Gattass R. Representation of the visual field in the second visual area in the Cebus monkey. *J Comp Neurol*. 1988;275:326–45.

Sage D., Watershed Segmentation; École Polytechnique Fédérale de Lausanne
Disponível em: <http://bigwww.epfl.ch/sage/soft/watershed/index.html>. Acesso em: 02 abr. 2011

Saper CB. Image is everything. *J Comp Neurol*. 1999;412(3):381-2.

Saper CB; Swanson LW; Cowan WN. An autoradiographic study of the efferent connections of the hypothalamic area in the rat. *J Comp Neurol*. 1979;183(4):689-706.

Satinoff E. Neural organization and evolution of thermal regulation in mammals. *Science*. 1978;201(4350):16-22.

Schlenker, E. H. Integration in the PVN: another piece of the puzzle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289(3):R653-5.

Sehgal A. *Molecular biology of circadian rhythms*. Hoboken, NJ. Wiley-Liss; 2004.

Shekhar A, Katner JS. Dorsomedial hypothalamic GABA regulates anxiety in the social interaction test. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995 Feb;50(2):253-8.

Shepherd GM, Raastad M. Axonal varicosity distributions along parallel fibers: a new angle on a cerebellar circuit. *Cerebellum*. 2003;2(2):110-3.

Smale L, Blanchard J, Moore RY, Morin LP. Immunocytochemical characterization of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet in the diurnal ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Brain res*. 1991;563:77-86.

Simerly RB. Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. 2nd ed. Academic Press; 1995. p. 353-76.

Simerly RB. Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behav Brain Res*. 1998; v.92, p.195-203.

Stephan FK, Berkley KJ, Moss RL. Efferent connections of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. 1981;6:2625-41.

Stopa EG, Volicer L, Kuo-Leblank V, Harper D, Lathi D, Tate B, Satlin A. Pathologic evaluation of the human suprachiasmatic nucleus in severe dementia. *J Neuropath Exp Neurol*. 1999;58:29-39.

Terborgh, J. *Five New World primates: a study in comparative ecology*. Princeton: Princeton University Press. 1983:260.

Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW. Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol*. 1996;376 (1):143-73.

Trudel E, Bourque CW. Central clock excites vasopressin neurons by waking osmosensory afferents during late sleep. *Nat Neurosci*. 2010;13(4):467-74.

Ueda S, Kawata M, Sano Y. Identification of serotonin- and vasopressin immunoreactivities in the suprachiasmatic nucleus of four mammalian species. *Cell Tiss*. 1983;Res 234:237-48.

Ueda S, Kawata M, Sano Y. Identification of neuropeptide Y immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus and the lateral geniculate nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J. comp Neurol*. 1986;191:661-702.

Ueta Y, Dayanithi G, Fujihara H. Hypothalamic vasopressin response to stress and various physiological stimuli: visualization in transgenic animal models. *Horm Behav*. 2011;59(2):221-6. Epub 2010 Dec 23.

Van den Pol AN, Tsujimoto KL. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience*. 1985;15:1049-86.

Vasalou C, Henson MA. A multicellular model for differential regulation of circadian signals in the core and shell regions of the suprachiasmatic nucleus *J Theor Biol*. 2011 Nov 7; 288:44-56. Aug 22.

Vida B, Deli L, Hrabovszky E, Kalamatianos T, Caraty A, Coen CW, Liposits Z, Kalló I. Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol*. 2010 Sep;22(9):1032-9.

Wang H, Morris JF. Presence of neuronal nitric oxide synthase in the suprachiasmatic nuclei of mouse and rat. *Neuroscience*. 1996;74:1059-68.

Watts AG, Swanson LW. Efferent projection of the suprachiasmatic nucleus II Studies using retrograde transport of Fluorescent Dyes and Simultaneous Peptides Immunohistochemistry in the Rat. *J. Comp Neurol*. 1987;258:230-52.

Watts AG, Swanson LW. Efferent projection of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol*. 1987;258:204-229.

Watts AG. The efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: anatomical insights into the control of circadian rhythms. In *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock* Edited by: Klein DC, Moore RY Reppert SM. New York: Oxford Univ Press; 1991. p. 77-106.

Watson RE Jr, Langub MC Jr, Engle MG, Maley BE. Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region. *Brain Res*. 1995;689:254-64.

Vrang N, Larsen PJ, Moller M, Mikkelsen JD. Topographical organization of the rat suprachiasmatic-paraventricular projection. *J Comp Neurol*. 1995;353:585-603.

Zaborsky L and Makard GB. Intrahypothalamic connections: An electron microscopic study in the rat brain. *Exp. Brain Res*. 1979;34:201-15.

Zhang ZW, Kang JI, Vaucher E. Axonal varicosity density as an index of local neuronal interactions. *PLoS One*. 2011;6(7):e225-43.

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*. 1998 Jun;20(6):1103-10.

S100 β Protein Expression: Gender- and Age-Related Daily Changes

M. I. Nogueira · S. Y. Abbas · L. G. M. Campos ·
W. Allemandi · P. Lawson · S. H. Takada ·
E. C. Azmitia

Accepted: 10 January 2009 / Published online: 11 February 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract S100 β is a soluble protein released by glial cells mainly under the activation of the 5-HT_{1A} receptor. It has been reported as a neuro-trophic and -tropic factor that promotes neurite maturation and outgrowth during development. This protein also plays a role in axonal stability and the plasticity underlying long-term potentiation in adult brains. The ability of S100 β to rapidly regulate neuronal morphology raises the interesting point of whether there are daily rhythm or gender differences in S100 β level in the brain. To answer this question, the S100 β expression in adult female and male rats, as well as in adult female CD-21 and S100 β $-/-$ female mice, were investigated. Scintillation counting and morphometric analysis of the immunoreactivity of S100 β , showed rhythmic daily expression. The female and male rats showed opposite cycles. Females presented the highest value at the beginning of the rest phase (5:00 h), while in males the maximum value appeared in the beginning of the motor activity period (21:00 h). These results confirm previous

S100 β evaluations in human serum and cerebrospinal fluid reporting the protein's function as a biomarker for brain damage (Gazzolo et al. in Clin Chem 49:967–970, 2003; Clin Chim Acta 330:131–133, 2003; Pediatr Res 58:1170–1174, 2005), similar behavior was also observed for GFAP in relation to Alzheimer Disease (Fukuyama et al. in Eur Neurol 46:35–38, 2001). The data should be taken into account when considering S100 β as a biomarker of health condition. In addition, the results raise questions on which structure or condition imposes these rhythms as well as on the physiological meaning of the observed gender differences.

Keywords S100 β protein · Biomarkers · Neuroplasticity · Daily rhythms · ³⁵S immunoreactivity · Optic density

Introduction

The glial S100 β molecule is a member of a family of proteins named S100 which is the subject of many reviews, owing to its unique properties and chemical nature [1–5]. S100 β , a cytokine-like calcium-binding protein, has an established co-relationship with neurodegenerative diseases, apoptosis, Alzheimer's disease, Down's syndrome, and brain injury, in which it is over-expressed [6–8]. Extracellularly S100 β modulates neuronal activity and synaptic plasticity, in the intracellular space, it acts as a potent inhibitor of phosphorylation on different substrates such as C-Kinase and Tau [4, 8, 9]. After binding in specific sites of the membrane, S100 β proteins may modify the activity of adenylate cyclase, probably via G proteins [10]. The extent to which S100 β binds to the cellular membrane is regulated by Ca²⁺, K⁺ and Na⁺ ion concentrations

M. I. Nogueira · S. Y. Abbas · P. Lawson · E. C. Azmitia
Department of Biology, Center for Neural Science,
New York University, 100 Washington Square East,
New York, NY 10003, USA

M. I. Nogueira (✉) · L. G. M. Campos · W. Allemandi ·
S. H. Takada
Departamento de Anatomia, Laboratory of Neuroscience,
Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo,
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 Cidade Universitária,
São Paulo, SP CEP 05508-900, Brazil
e-mail: minog@usp.br

S. Y. Abbas
C. V. Starr Laboratory for Molecular Neuropharmacology,
Department of Anesthesiology, Weill Medical College
of Cornell University, 1300 York Avenue, Room A-1050,
New York, NY 10021, USA

Análise da expressão do mRNA da proteína S100 β em adipócitos de pacientes com diabetes melito tipo 2

Analysis of the mRNA expression of the S100 β protein in adipocytes of patients with diabetes mellitus, type 2

Mike Yoshio Hamasaki¹, Mario Hiroyuki Hirata², Rosario Dominguez Crespo Hirata², Silvia Tchernin Himelfarb², Leila Maria Guissoni Campos¹, Maria Inês Nogueira¹

RESUMO

Objetivo: O presente trabalho objetiva compreender a possível relação do nível de expressão gênica do mRNA da proteína S100 β em adipócitos com o diabetes melito do tipo 2, pela comparação de dados de portadores dessa doença com os de indivíduos normoglicêmicos. **Materiais e métodos:** Foram selecionadas amostras de tecido adiposo de oito pacientes da Seção de Coronárias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), sendo quatro do grupo diabetes e quatro do grupo de normoglicêmicos. Essas amostras foram submetidas à técnica de RT-PCR em tempo real. **Resultados:** Por meio do *Test-t de Student* para os valores de diferença entre os ciclos threshold (Δ Ct), observou-se que houve aumento de aproximadamente 15 vezes ($p = 0,015$) da expressão do mRNA da proteína S100 β nos adipócitos dos indivíduos do grupo diabetes quando comparado aos do grupo controle. **Conclusão:** Nossos resultados evidenciam, de forma inédita, coexistência entre o aumento da expressão do gene S100 β e a patologia do diabetes melito do tipo 2. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012;56(7):435-40

Descritores

Diabetes; S100beta; RT-PCR; adipócitos; biomarcador

ABSTRACT

Objective: This study aims to explore the possible relationship between the expression level of S100 β protein mRNA with *diabetes mellitus* type 2 in adipocytes from patients with this disease in comparison with normoglycemic individuals. **Materials and methods:** Samples of adipose tissue of eight patients from the coronary section of the Instituto Dante Pazzanese of Cardiology (IDPC), four in Group Diabetes and four of Normoglycemic group, were evaluated by RT-PCR real time. **Results:** An increase around 15 times values, between the threshold cycle (Δ Ct), of mRNA expression of S100 β protein in adipocytes of the diabetes group was observed in comparison to the control group ($p = 0.015$). **Conclusion:** Our results indicate, for the first time, that there is coexistence of increased expression of the S100 β and the type 2 *diabetes mellitus* gene. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012;56(7):435-40

Keywords

Diabetes; S100beta; RT-PCR; adipocytes; biomarker

¹ Laboratório de Neurociências, Instituto de Ciências Biomédicas III (ICBIII), Departamento de Anatomia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

² Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, SP, Brasil

Correspondência para:

Maria Inês Nogueira
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415
05508-900 – Cidade Universitária
São Paulo, SP, Brasil
minog@usp.br

Recebido em 7/Jun/2011
Aceito em 30/Ago/2012

INTRODUÇÃO

O termo diabetes melito (DM) engloba um grupo de doenças metabólicas de etiologia múltipla, caracterizado por hiperglicemia crônica com alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, em função da deficiente ação da insulina nos tecidos

alvos, em consequência de alterações na secreção e/ou ação da insulina (1).

De acordo com dados referidos no “Dossiê de Diabetes – Programa de Controle da Diabetes Mellitos – 1998”, da Direção Geral de Saúde e Sociedade Portuguesa de Diabetologia, “a DM constitui grave

Article

Immunohistochemistry and ultrastructural characteristics of nerve endings in the oral mucosa of rat

Ii-sei Watanabe^{1,*}, Fernando José Dias¹, João Paulo Mardegan Issa²,
Carlos Alexandre dos Santos Haemmerle¹, Diego Pulzatto Cury¹,
Silvia Honda Takada¹, Marcia Consentino Kronka Sosthenes⁴,
Marcelo Cavenaghi Pereira da Silva³, Leila M. G. Campos¹,
Maria Inês Nogueira¹ and Mamie Mizusaki Iyomasa²

¹Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, ³Department of Anatomy, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil and ⁴University Hospital João de Barros Barreto, Federal University of Pará, Belém, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: watanabe@icb.usp.br

Abstract The sensory nerve endings of the rat tongue, cheek and palate were studied using immunohistochemical staining and transmission electron microscopy analysis. The specimens were fixed in modified Karnovsky solution and embedded in Spurr resin. Substance P, calcitonin gene-related peptide (CGRP)- and protein gene product 9.5 (PGP 9.5)-containing nerve fibers in the rat tongue, cheek and palate were examined by electronic microscopical analysis and immunohistochemical localization. These fibers run very close to the basal lamina of the epithelium and extend into the filiform and fungiform papillae. Numerous plexiform fibers immunoreactive for substance P, CGRP and PGP 9.5 were found in the connective tissue of mucosa. Electron microscopic observations showed clearly immunostained nerve fibers, which are located very close to the basal lamina of epithelial cells. Some electron-dense granules may be observed in the axoplasm of both substance P and CGRP immunoreactive fibers. Several lamellar corpuscles into the subepithelial connective tissue papillae, Merkel corpuscles and numerous thin unmyelinated and myelinated axons were observed. The terminal axons revealed numerous mitochondria, neurofilaments, microtubules and clear vesicles in the base of axoplasmic protrusions. The lamellar cells showed caveolae and interlamellar spaces filled by amorphous substance. Between the lamellar cells and axoplasmic membrane, and in the adjacent lamellae region, desmosome-type junctions were observed. The quantitative and morphometric analysis showed nerve endings with an average area of $4.83 \pm 3.4 \mu\text{m}^2$ and 19.4 internal mitochondria in this site and the organized corpuscles with an average area of $79.24 \pm 27.24 \mu\text{m}^2$ and 24.23 internal mitochondria in this place. All the structures observed are involved in the transmission of pain and mechanoreceptors stimulus of these oral mucosae.

Keywords Lamellated corpuscles, nerve endings, immunohistochemistry, mitochondria, TEM, rat

Received 25 June 2012, accepted 19 September 2012; online 25 October 2012

Submetido a Neurochemical Research

Neuroanatomical mapping of S100B in the rat under physiological conditions: An immunohistochemical study

Campos, L.M.G.^a; Pinato, L.^b; Hamasaki, M.Y.^a; Nogueira, M.I.^{a*}

^aInstitute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

^b Department of Speech-Language and Hearing Therapy, São Paulo State University, Marília, SP, Brazil.

Abstract

The relevance of S100B as a biomarker for pathological diseases in fluids, such as cerebrospinal fluid (CSF), has already been established. However, it is also important to establish the normal localization of S100B immunoreactivity in the brain for any discussion of its function under normal physiological conditions. This knowledge is also important for any future comparisons to pathological conditions. To gain this knowledge, we performed a systematic evaluation of S100B immunoreactivity in the rat central nervous system during normal physiological conditions. In addition, we determined which markers can provide a confident identification of central nervous system cells, which will allow further exploration of their function and help determine how these cells can assume different properties under different conditions and in different locations. Cellular phenotypes were identified by double labeling for either S100B or NeuN immunoreactivity or for S100B and glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity. By comparing S100B and GFAP labeling, this study also addresses the reported use of S100B as an effective identifier of astrocytes in comparison to GFAP in neural tissue. Labeling showed a heterogeneous distribution. This labeling was predominantly localized to the cerebral and cerebellar cortices, hippocampus and periventricular areas. Many different cell types were labeled in these areas. GFAP primarily labeled fibrous astrocytes during a normal state, while S100B gives a more complete picture if one looks for general cell alterations or dynamic changes that can occur in tissue. Therefore, this study suggests that for identifying astrocytes, S100B is better than GFAP.

Keywords: biomarker, calcium-binding protein, immunohistochemistry, mapping, brain.

Intrinsic Organization of the Suprachiasmatic Nucleus in the Capuchin Monkey

Rocha VA¹, Frazão R¹, Campos LMG¹, Mello, P¹, Donato, J Jr³, Cruz-Rizzolo, RJ⁴, Nogueira MI^{1,5}, Pinato, L^{2,5*}.

¹Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, SP, Brazil.

²Department of Speech Language and Hearing Therapy, São Paulo State University, Marília, SP, Brazil.

³Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, SP, Brazil.

⁴Department of Basic Sciences, São Paulo State University - Araçatuba, SP, Brazil.

Abstract

The suprachiasmatic nucleus (SCN), which is the main circadian biological clock in mammals, is composed of multiple cells that function individually as independent oscillators to express the self-sustained mRNA and protein rhythms of the so-called clock genes. Knowledge regarding the presence and localization of the proteins and neuroactive substances of the SCN are essential for understanding this nucleus and for its successful manipulation. Although there have been advances in the investigation of the intrinsic organization of the SCN in rodents, little information is available in diurnal species, especially in primates. This study, which explores the pattern of expression and localization of PER2 protein in the SCN of capuchin monkey, evaluates aspects of the circadian system that are common to both primates and rodents. Here, we showed that PER2 protein immunoreactivity is higher during the light phase. Additionally, the complex organization of cells that express vasopressin, vasoactive intestinal polypeptide, neuron-specific nuclear protein, calbindin and calretinin in the SCN, as demonstrated by their immunoreactivity, reveals an intricate network that may be related to the similarities and differences reported between rodents and primates in the literature.

Keywords: biological rhythms, diurnal monkey, neuroanatomy, Per2.

Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular (icv) LPS is mediated by a local synthesis of melatonin

Luciana Pinato^{1,2}; Sanseray da Silveira Cruz-Machado¹; Daiane G. Franco¹; Leila M.G. Campos³; Erika Cecon¹; Pedro A.C.M. Fernandes¹; Jackson C. Bittencourt³; Regina P. Markus^{*1}

¹Laboratory of Chronopharmacology, Department of Physiology, Institute of Biosciences, University of São Paulo (USP), 05508-090, São Paulo, SP, Brazil.

²Department of Speech, Language and Hearing Therapy, São Paulo State University (UNESP), 17525-900, Marília, SP, Brazil.

³Laboratory of Chemical Neuroanatomy, Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

ABSTRACT

Although melatonin is mainly produced by the pineal gland, an increasing number of extra-pineal sites of melatonin synthesis have been described. We have previously demonstrated the existence of a bidirectional communication between the pineal gland and the immune system, which drives the switch between melatonin sources from the pineal gland to peripheral organs during the mounting of an innate immune response. In the present study we show that acute neuroinflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) injected directly into the lateral ventricles of adult rats reduces the nocturnal peak of melatonin in the plasma, while induces its synthesis in the cerebellum, but not in the cortex or hippocampus. The increase in cerebellar melatonin content is dependent on nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcriptional factor activation, which positively regulates the expression of the key enzyme in melatonin synthesis (arylalkylamine N-acetyltransferase; AA-NAT). Interestingly, LPS treatment leads to neuronal death in the hippocampus and cortex, but not in the cerebellum. This privileged protection of cerebellar cells is abrogated if G-protein coupled melatonin receptors are blocked by its antagonist, luzindole, suggesting that the local production of melatonin protects cerebellar neurons from LPS toxicity. This is the first demonstration of a switch between pineal and extra-pineal melatonin production in the central nervous system following neuroinflammatory response, having direct implications to the differential susceptibility to neuronal death in specific brain areas.

Keywords: pineal gland, arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT), immune-pineal axis, neuroinflammation, melatonin receptors, nuclear factor kappa B (NF- κ B).

Assessment of S100B gene expression over time in the brain of newborn rats subjected to anoxia

Mike Yoshio Hamasaki^a; Daniella Sabino Batagello^a; Leila Maria Guissoni Campos^a; Rosario Dominguez Crespo Hirata^b; Mario Hiroyuki Hirata^b; Maria Inês Nogueira^{a*}

^a Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

^b Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, SP, Brazil

Abstract

Background: The biochemical markers of the central nervous system and protein S100 beta in particular have recently gained the attention of the scientific community. Despite the increasing number of studies on the relationship between protein S100 beta and hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE), few studies have analyzed the expression of S100 beta directly in the nervous tissue. Similarly, few studies have assessed the brain areas affected by this type of encephalopathy. This type of data is of paramount importance because the extent of the brain involvement is large in most cases of HIE, causing damage in multiple brain areas. In addition, investigation of the mRNA levels of the S100 beta gene in various brain areas over time might provide useful data for the elucidation of the role that this protein plays in the physiopathology of neonatal HIE. **Objectives:** The aim of the present study was to investigate the temporal variation in the expression of S100 beta gene mRNA in the hippocampus, cerebellum, and cerebral cortex of newborn rats on postnatal day four (P4) under conditions of anoxia compared with control rats by means of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Methods:** The study was performed using two groups male and female albino rats (*Rattus norvegicus*, Wistar strain): Experimental Anoxia (EA) and Experimental Control (EC). The animals in both EA and EC were distributed in the following subgroups relative to the time elapsed since the application of the stimuli predefined for each group: two, four, six, 12, and 24 hours. A system adapted and validated at our laboratory (J Neurosci Methods. 198:62, 2011) was used to apply the stimuli to both groups. Statistical analysis of gene expression was performed by means of two-factor ANOVA (time and stimulus) followed by Tukey's multiple comparison test. The significance level was established as $p \leq 0.05$. **Results:** Anoxia induced a peak in the S100 beta expression after two hours in the hippocampus and cerebellum. With respect to the cerebral cortex, S100 beta never exhibited a significant increase in the EA group compared with the EC group. **Conclusions:** The results of the present study represent a crucial contribution to the elucidation of the role protein S100 beta plays as a biomarker in HIE, as well as a contribution to the elucidation of the role the corresponding gene plays in the physiopathology of the disease.

Key words: biomarker; cerebellum; cerebral cortex; hypoxic-ischemic encephalopathy; hippocampus; RT-PCR.

Suprachiasmatic nucleus projections for hypothalamic areas according to VIP and AVP immunoreactivity in the *Sapajus apella* monkey.

Campos LMG; Pinato L; Cruz-Rizzolo RJ; Ii-Sei Watanabe, Nogueira MI.

Abstract

The suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus, considered the endogenous circadian master clock, in the most of studied species, contains a variety of different neurons that tend to form two major subpopulations within the nucleus, one that produces vasoactive intestinal peptide (VIP) and other vasopressin (AVP). The immunoreactive (IR) fibers derived from the VIP and VP IR cells of the SCN present morphological characteristics that allow their RECONHECIMENTO and specific tracking within the hypothalamus. In the present investigation we aimed map VIP and VP IR terminals in hypothalamic areas of the primate *Sapajus apella* using immunohistochemistry for the neuropeptide VIP and VP. As a consequence, we also aimed characterize SCN recipient areas in the hypothalamus associating the mapping distribution of fibers IR with morphological analysis of these two neuroactive substances. The SCN VIP and VP IR fibers showed a specific morphology compared to other sources. The fibers are thinner and varicose with bulbs and buttons dilated irregularly spaced along their trajectories. These fibers were identified in the rostral anterior hypothalamic area, medial hypothalamic preoptic area, laterally to the lateral hypothalamic area, and more caudally in SPZV and retrochiasmatic tuberal area. In the morphological analysis of the intrinsic neurons to SCN, we found VP IR neurons grouped in two neuronal subpopulations with different measures (area, perimeter) in the shell portion of the nucleus. There was a higher density of VP IR fibers located in areas at the same level of SCN in coronal sections. These fibers proceeding toward the posterior hypothalamus and the medial periventricular areas compared with the VIP IR fibers. We also verified the coexistence of VIP and VP IR fibers in the hypothalamic areas analyzed. The results indicate that in the primate *Sapajus apella* there is a similarity in the pattern of distribution of VIP and VP fibers in the hypothalamic areas and also in SCN recipient's areas when compared with nocturnal rodent species described in the literature.

Keywords: Suprachiasmatic nucleus. *Cebus apella*. Hypothalamus. VIP. AVP. Circadian rhythms.