

RUTHNALDO RODRIGUES MELO DE LIMA

EXPRESSÃO DE FOS APÓS PULSO DE ESCURO NO NÚCLEO PRÉ-
GENICULADO DO TÁLAMO DO SAGUI (*Callithrix jacchus*).

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Psicobiologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Norte para
Título de Doutor.

Natal-RN
2013

RUTHNALDO RODRIGUES MELO DE LIMA

EXPRESSÃO DE FOS APÓS PULSO DE ESCURO NO NÚCLEO PRÉ-
GENICULADO DO TÁLAMO DO SAGUI (*Callithrix jacchus*).

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Psicobiologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Norte para
Título de Doutor.

ORIENTADOR: Jeferson de Souza Cavalcante

Natal-RN
2013

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de
Biociências

Lima, Ruthnaldo Rodrigues Melo de.

Expressão de fos após pulso de escuro no núcleo pré-geniculado do tálamo do Saguí (*Callithrix jacchus*) / Ruthnaldo Rodrigues Melo de Lima. – Natal, RN, 2013.

94 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Jeferson de Souza Cavalcante.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

1. *Callithrix jacchus* – Tese. 2. Ritmos biológicos – Tese 3. Núcleo pré-geniculado – Tese. I. Cavalcante, Jeferson de Souza. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 599.821

TÍTULO

EXPRESSÃO DE FOS APÓS PULSO DE ESCURO NO NÚCLEO PRÉ-GENICULADO DO TÁLAMO DO SAGUI (*Callithrix jacchus*).

AUTOR

RUTHNALDO RODRIGUES MELO DE LIMA

DATA DA DEFESA

30/08/2013

BANCA EXAMINADORA

Profº José Pablo Rubio-Garrido

Universidad Autónoma de Madrid, UAM.

Profª Luciana Pinato

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP.

Profº John Fontenele de Araújo

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN.

Profº Judney Cley Cavalcante

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN.

Profº Jeferson de Souza Cavalcante

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN.

“Um homem é um sucesso quando pula da cama de manhã e vai dormir à noite e, nesse meio tempo, só faz o que gosta”.

(Bob Dylan)

“Algo só é impossível até que alguém duvida e resolve provar o contrário”.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

“Aos meus pais, por toda dedicação e transposição dos seus sonhos nas minhas realizações”.

“Aos irmãos e demais familiares, pelo apoio e incentivo aos meus objetivos”.

“A todos aqueles que um dia foram meus professores. Em especial ao Prof^o Jeferson de Souza Cavalcante e a Prof^a Miriam Stela Maris de Oliveira Costa, por me proporcionarem toda a inspiração e transpiração de que necessita um cientista”.

“A todos os amigos cientistas. Em especial aos que integram o Laboratório de Neuratomia da UFRN.

“Aos meus amigos. Em especial a Marcos Daniel e Rilton, pelo companheirismo nos principais momentos da minha vida”.

“Aos familiares, pela amizade, disponibilidade, bons princípios e generoso acolhimento”.

“Aos músicos da Banda Forno, por proporcionarem o esquecimento de uma dura semana de trabalho durante os ensaios musicais”.

“Aos funcionários dos Departamentos de Morfologia, Fisiologia e do Núcleo de Primatologia da UFRN, por proporcionarem um ambiente saudável de trabalho”.

“Aos meus ex-alunos, por me ensinarem a ensinar”.

“Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio a pesquisa”.

“A Camila Regalado Galvão, pelos passados, presentes e futuros frutos do nosso amor”.

“A minha querida filha Heloísa, da qual cujo amor espero receber e que a mim tenha orgulho, pois não sei o que seria pior do que desapontá-la.

Sumário

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 - A organização temporal dos seres vivos	10
1.2 - O núcleo supraquiasmático.....	11
1.3 - O folheto intergeniculado	13
1.4 - O núcleo pré-geniculado	14
1.5 - O trato genículo-hipotalâmico em primatas	16
Figura 1	17
Figura 2	18
1.6 - Aspectos funcionais do folheto intergeniculado	19
1.7 - Aspectos funcionais do núcleo pré-geniculado	20
1.8 - O genes <i>c-fos</i>	21
1.9 - FOS e o sistema de temporização circadiana	22
1.10 - A expressão de FOS após estímulos não-fóticos	23
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVO.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 - Animais	27
4.2 - Manipulação dos animais.....	27
Figura 3	29
Figura 4	30
Tabela 1.....	30
Figura 5	31
Figura 6	33
Figura 7	34
4.3 - Anestesia.....	34
4.4 - Processamento do tecido.....	35
4.4.1 - <i>Perfusão e microtomia</i>	35
4.4.2 - <i>Imunohistoquímica</i>	36
Figura 8	37
5. RESULTADOS	38
5.1 - Expressão de FOS após pulso de escuro de 1h aplicado na HC4	38

5.2 - Expressão de FOS após pulso de escuro de 1h aplicado na HC18	38
Figura 9	40
Figura 10	41
Figura 11	42
Figura 12	43
Figura 13	44
Figura 14	45
Figura 15	46
Figura 16	47
Figura 17	48
Figura 18	49
Figura 19	49
Figura 20	50
Figura 21	50
Figura 22	51
Figura 23	51
Figura 24	52
Figura 25	52
Figura 26	53
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES	62
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
9. REFERÊNCIAS	64
Apêndice	83
Artigo publicado.....	84

RESUMO

O núcleo pré-geniculado (NPG) do tálamo de primatas é um aglomerado neuronal, em forma de capuz, localizado dorsomedialmente ao principal retransmissor de informações visuais para o córtex cerebral, o núcleo geniculado lateral dorsal (GLD). Diversos estudos citoarquitetônicos, neuroquímicos e de projeções retinianas têm apontado o NPG como estrutura homóloga ao folheto intergeniculado (FIG) de roedores. O FIG recebe terminais retinianos e parece estar envolvido na integração de informações fóticas e não-fóticas retransmitindo-as, através do trato geniculohipotalâmico (TGH), ao principal oscilador circadiano em mamíferos, o núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo. Desse modo, o FIG participa no controle da ritmicidade biológica modulando a atividade do NSQ. Estudos farmacológicos e de lesão concluem que o FIG é fundamental no processamento de informações não-fóticas as quais são transmitidas ao NSQ. Outros trabalhos verificaram que, especialmente, neurônios imunorreativos ao neuropeptídeo Y (NPY) respondem a esse tipo de estímulo, determinados por sua co-localização com a proteína FOS.

Ainda não foi determinado se o NPG responde, expressando a proteína FOS, a estímulos não-fóticos nem tampouco a natureza neuroquímica dessas células. Assim, aplicamos um pulso de escuro em fases circadianas específicas e analisamos o padrão de expressão da proteína FOS no NPG do sagui (*Callithrix jacchus*). Verificamos que em todos os animais analisados a expressão de FOS foi maior em relação ao grupo controle. Houve uma maior expressão de FOS quando o pulso de escuro foi aplicado durante o dia subjetivo entre os grupos estudados. Ainda, uma sub-região do NPG, sabidamente imunorreativa a NPY, apresentou um maior número de células FOS-positivas em relação à sua outra região imediatamente mais dorsal.

Os nossos dados corroboram com a teoria de que o NPG e o FIG são estruturas homólogas que se modificaram anatomicamente durante o processo evolutivo, mas mantiveram suas principais características neuroquímicas e funcionais. No entanto, estudos de lesão e hodológicos ainda são necessários para uma conclusão mais precisa.

ABSTRACT

The pregeniculate nucleus (PGN) of the primate's thalamus is an agglomerate neuronal having a cap shaped located dorsomedially to the main relay visual information to the cerebral cortex, the dorsal lateral geniculate nucleus (GLD). Several cytoarchitectonic, neurochemical and retinal projections studies have pointed PGN as a structure homologous to intergeniculate leaflet (IGL) of rodents. The IGL receives retinal terminals and appears to be involved in the integration of photic and non-photoc information relaying them, through geniculo-hypothalamic tract (TGH), to the main circadian oscillator in mammals, the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus. Thus, the IGL participates in the control of the biological rhythm by modulating the activity of the SCN. Pharmacological and IGL injury studies conclude that it is critical in the processing of non-photoc information which is transmitted to the SCN. Other studies have found that especially neurons immunoreactive to neuropeptide Y (NPY) respond to this type of stimulation, determined by its co-location with the FOS protein.

Has not been determined if the PGN responds, expressing the FOS protein, to the non-photoc stimulus nor the neurochemical nature of these cells. Thus, we apply a dark pulse in the specific circadian phases and analyze the pattern of expression of FOS protein in PGN of the marmoset (*Callithrix jacchus*). We found that in all animals analyzed the FOS expression was higher in the experimental than in the control group. There was a higher expression of FOS when the dark pulse was applied during the subjective day between the groups. Still, a subregion of the PGN, known by immunoreactive to NPY, had a greater number of FOS-positive cells in relation to his other just close dorsal region.

Our data corroborate the theory that the PGN and IGL are homologous structures that were anatomically modified during the evolutionary process, but kept its main neurochemical and functional characteristics. However, injury and hodological studies are still needed for a more accurate conclusion.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – A organização temporal dos seres vivos

O fenômeno de rotação da terra durante seu curso de translação ao redor do sol fornece um estímulo de periodicidade regular que, durante o processo evolutivo, certamente causou uma enorme pressão seletiva sobre os organismos vivos e serviu de base adaptativa para o que hoje chamamos de ritmos circadianos. Provavelmente, os ritmos circadianos representam a forma de adaptação mais usualmente utilizada pelos organismos e podem ser identificados tanto em indivíduos procarióticos quanto em eucarióticos. Eles podem ser ajustados pelos ciclos ambientais externos (*Zeitgebers*), conhecidos também como agentes sincronizadores, dos quais o ciclo claro-escuro diário é a pista ambiental mais efetiva para sincronização desses ritmos (Moore, 1999; Rotenberg et al., 2003).

Inicialmente, os ritmos biológicos eram considerados meramente reflexos das flutuações ambientais. Posteriormente, descobriu-se que há uma organização temporal em um ser vivo, e esta se expressa tanto pela reação aos estímulos ambientais quanto pela ritmicidade endógena. O estudo sistemático das características temporais da matéria viva teve início na década de 60 e esse ramo do conhecimento foi denominado de Cronobiologia. Para alguns pesquisadores era importante abordar as propriedades fundamentais dos ritmos circadianos e as bases biológicas dos osciladores e de seus mecanismos. Desse modo, buscavam encontrar nos seres vivos algum sistema ou estrutura capaz de responder pelos ritmos biológicos (Araújo e Marques, 2002; Rotenberg et al., 2003). Hoje, sabemos que o sistema nervoso dos mamíferos possui um conjunto de estruturas neurais interligadas, incluindo na sua composição um marca-passo encarregado da geração do ritmo, vias sincronizadoras e vias de saídas aos efetores comportamentais (Moore-Ede et al., 1982; Moore, 1999; Cavalcante et al., 2006; Morin e Alen; 2006; Dibner et al., 2010; Golombeck e Rosenstein, 2010). A expressão de comportamentos rítmicos está sob o controle dessas estruturas que, conjuntamente, formam o sistema de temporização circadiana.

1.2 – O núcleo supraquiasmático (NSQ)

A busca por uma estrutura que respondesse pela geração da ritmicidade biológica deu-se a partir da década de 60. A hipótese era de que a mesma seria encontrada no hipotálamo, já que era sabido da sua importância no controle do meio interno e por estar sob influência de diversos sistemas sensoriais (Harris, 1955; Powell et al., 1965). Já tinha sido demonstrado uma diversidade de efeitos neuroendócrinos após alteração dos níveis de iluminação ambiental. Desse modo, concluiu-se que o sistema visual estaria fornecendo tal informação luminosa ao hipotálamo (Harris, 1955; Critchlow, 1963). Experimentos pioneiros realizados por Curt Richter (1967), lesando progressivamente o sistema nervoso e verificando o efeito das lesões nos ritmos biológicos, também apontavam para o mesmo caminho. Posteriormente, demonstrou-se que a lesão do NSQ de ratos abolia os ritmos circadianos de atividade, ingestão de água e liberação de corticosterona, indicando ser o NSQ responsável pela geração desses ritmos (Moore e Eichler, 1972; Stephan e Zucker, 1972).

Com a predição de que o principal agente sincronizador seria o ciclo claro-escuro, Moore e Lenn (1972) começaram a buscar o “relógio biológico” pelos olhos e identificaram uma projeção das células retinianas a um pequeno par de núcleos no assoalho do hipotálamo. Tal projeção foi denominada de tracto retino-hipotalâmico (TRH). Hendrickson et al. (1972), avaliando comparativamente o padrão das projeções retinianas ao NSQ em diversos mamíferos (ratos, porcos da índia, coelhos, gatos e *Macaca mullata*), verificaram organizações que se mostraram bastante variadas, com predominância contralateral ou ipsilateral ou ainda de forma simétrica, dependendo da espécie em questão. Na maior parte dos indivíduos estudados, foi vista uma distribuição destas fibras concentradas na porção ventrolateral do núcleo. Diversos estudos corroboram esta afirmação (Moore e Lenn, 1972; Johnson et al., 1988; Levine et al., 1991; Costa et al., 1999; Nascimento Jr. et al., 2010; Pinato et al., 2009). Embora apresente variações morfológicas, o NSQ de todos os mamíferos pesquisados, até o momento, se apresenta como um grupo de células localizado dorsalmente ao quiasma óptico e lateralmente ao terceiro ventrículo, separado da parede do mesmo

apenas por uma faixa de células que constitui o núcleo periventricular (Moore-Ede et al., 1982; Cassone et al., 1988; Morin e Alen, 2006; Morin, 2013).

O NSQ tem sido bastante estudado no que diz respeito a sua caracterização citoarquitetônica e citoquímica, no qual identificamos duas principais sub-populações de neurônios. Nos mamíferos, de uma forma geral, encontramos a primeira população neuronal localizada na região dorsomedial do núcleo, sendo caracterizada por produzir vasopressina (VP) e a segunda localizada na porção ventrolateral do núcleo, produtora de polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) (Card et al., 1981; Card e Moore, 1984; Cassone et al., 1988; Morin, 2013).

No NSQ de hamsters (Card e Moore, 1984; Morin e Blanchard; 1995) e ratos (Moore et al., 2002; Morin et al., 2006) terminais imunoreativos a NPY foram encontrados somente na porção ventrolateral do núcleo (região retinorecipiente). Nessas espécies de roedores, a presença de neuropeptídeo-Y (NPY) parece ser, em quase sua totalidade, proveniente dos neurônios do FIG, visto que a lesão do FIG provoca uma drástica redução desse neurotransmissor em seus NSQ (Harrington et al., 1985; Morin e Blanchard, 2001). Também, foram identificados terminais imunorreativos a NPY no NSQ de saguis, no entanto, não se tem determinada sua origem (Costa et al., 1999; Cavalcante et al., 2002; Pinato et al., 2009).

Fibras e terminais imunorreativos à serotonina (5-HT) foram descritos na porção ventrolateral do NSQ de vários mamíferos, incluindo ratos (Van den Pol e Tsujimoto, 1985), hamsters (Card e Moore, 1984), camundongos (Cassone et al., 1988) e em gatos e *Macaca fuscata* (Ueda et al., 1983). Em contrapartida, a distribuição dessas fibras no NSQ do sagui está concentrada na região dorsal (Cavalcante et al., 2002; Pinato et al., 2007) e no *Cebus apella* as fibras apresentam-se esparsas sem aparente regionalização (Pinato et al., 2007). A fonte de 5-HT do NSQ é proveniente do núcleo mediano da rafe mesencefálica (Meyer-Bernstein e Morin, 1996; Hay-Schmidt et al., 2003) e desempenha um importante papel na regulação dos ritmos circadianos, como demonstrado em estudos de lesão (Smale et al., 1990; Meyer-Bernstein e Morin, 1998) e de estimulação elétrica (Meyer-Bernstein e Morin, 1999).

1.3 – O Folheto Intergeniculado (FIG)

Na medida em que o NSQ se firmava como principal marca-passo circadiano, um estudo realizado por Swanson et al. (1974), em gatos e ratos, e outro por Ribak e Peters (1975), em ratos, mostraram que a injeção de aminoácidos marcados no corpo geniculado lateral ventral (GLV) revelava uma projeção bilateral, com predominância ipsilateral, para o NSQ e que esta projeção era restrita a região ventrolateral. Hickey e Spear (1976), baseados na diferença das projeções retinianas para o complexo geniculado lateral do tálamo, observaram uma estrutura localizada entre o núcleo geniculado lateral dorsal (GLD) e o GLV. Assim, denominaram-na de FIG, devido sua forma fina e alongada e por localizar-se entre os núcleos geniculados laterais. Quase uma década mais tarde, Pickard (1985), mostrou que essas projeções retinianas ao FIG são provenientes das mesmas células ganglionares que se projetam para o NSQ, devido à bifurcação de seus axônios. Card e Moore (1982) identificaram a presença de terminais imunorreativos ao polipeptídeo pancreático das aves (APP) na região ventrolateral do NSQ e de neurônios marcados na borda dorsal do GLV. A lesão do GLV levava a uma diminuição da imunorreatividade a APP no NSQ, então, eles concluíram tratar-se de uma nova projeção ao marca-passo circadiano. Moore et al. (1984) encontraram resultados semelhantes para NPY. Foi denominado de tracto geniculado-hipotalâmico (TGH) a projeção do FIG ao NSQ, entretanto, sua confirmação somente foi possível a partir de estudos com traçadores neurais. A injeção de um traçador retrógrado no NSQ e uma técnica de dupla marcação imunohistoquímica para NPY e o respectivo traçador revelaram que alguns neurônios NPY-positivos do FIG projetam-se para o NSQ (Harrington et al., 1987; Goel et al., 1999; Moore e Card, 1994b).

Existem basicamente dois tipos de neurônios no FIG de roedores. Um tipo é caracterizado pela co-localização de ácido gama-aminobutírico (GABA) e encefalina (ENK), e se projeta exclusivamente para o FIG contralateral. O outro grupo é caracterizado pela co-localização de GABA e NPY, que se projeta predominantemente para o NSQ através do TGH (Moore, 1992; Moore e Card, 1994a; Morin e Allen 2006). Em hamsters, ainda pode ser identificado um terceiro tipo de neurônio,

imunorreativo à neurotensina (NT), que apresenta uma alta co-localização com NPY (Morin e Blanchard, 2001). Nesses animais, o TGH possui contribuição das células produtoras de GABA e ENK (Morin e Blanchard, 1995). Sem dúvida, uma das principais características desse folheto é a presença dessa população de neurônios imunorreativos a anticorpos contra NPY e que se projetam para o NSQ, num padrão que se superpõe à distribuição de fibras do TRH (Mantyh e Kemp, 1983).

O FIG tem uma grande importância para a modulação dos ritmos circadianos, como sugerido por estudos farmacológicos ou combinados com estudos de lesão. Embora esses estudos mostrem que o FIG não está envolvido diretamente com a sincronização, diversos outros aspectos comportamentais confirmam sua importância para a ritmicidade biológica (Albers et al., 1984; Johnson et al., 1989; Biello et al., 1991; Meyer-Bernstein et al., 1993; Huhman e Albers, 1994; Pickard, 1994). Alguns pesquisadores sugerem uma participação do FIG na transmissão de informação fótica para o NSQ (Harrington e Rusak, 1988; Aronin et al., 1990). Outros trabalhos apontam para uma participação na transmissão não-fótica para o NSQ (Rusak et al., 1989; Pickard, 1994; Janik e Mrosovsky, 1994). Moore e Card (1994a) sugerem que o FIG, através da projeção de suas células produtoras de NPY para o NSQ pelo TGH, integra as informações fóticas com as não-fóticas necessárias para modificar a função do marca-passo. Já os estudos de atividade celular, mapeando a expressão da proteína do gene *c-fos*, mostram que o FIG responde tanto a estímulos fóticos quanto não-fóticos, mas quando se verifica a neuroquímica das células envolvidas torna-se claramente evidente a participação dos neurônios imunorreativos a NPY nos eventos não-fóticos em detrimento dos fóticos (Janik et al., 1995).

1.4 – O Núcleo Pré-Geniculado (NPG)

A organização do complexo geniculado lateral do tálamo de primatas é substancialmente diferente do de roedores (figura 1). O GLD é um extenso aglomerado celular que apresenta uma morfologia laminada. Este núcleo é circundado por um grupo celular que é reconhecido como núcleo pré-geniculado (NPG) (Jones, 2007). Moore (1989), identificou um grupo de células imunorreativas a NPY em uma

região em forma de cunha, situada medialmente ao GLD, a qual tinha sido previamente caracterizada como NPG. O NPG tem sido descrito compreendendo duas porções distintas: a primeira localizada numa região látero-dorsal ao GLD, que é contínua com o núcleo reticular do tálamo; e a outra situada numa região dorsomedial ao mesmo, a qual continua-se com a zona incerta medialmente (Moore, 1993; Jones, 2007). Avaliando a organização do complexo geniculado lateral de primatas (rhesus e humanos). Moore (1993), em um estudo comparativo entre primatas (rhesus e humanos) e roedores, sugeriu que o NPG é o homólogo do FIG e do GLV de roedores, baseando-se no padrão de distribuição das aferências retinianas e de algumas características neuroquímicas. Assim, ele sugeriu que o FIG dos primatas estaria localizado no NPG em uma vasta região imediatamente medial ao GLD e que o GLV ficaria mais dorsalmente.

Em sagui, verificou-se que NPG recebe projeção bilateral da retina e apresenta imunorreatividade para NPY (neurônios), 5-HT e SP (fibras) e proteínas ligantes de cálcio (PV e CB), fornecendo indícios dessa estrutura ser homóloga ao FIG e GLV dos roedores (Costa et al., 1998; Lima et al., 2012). Nesses animais, o NPG foi descrito contendo duas sub-regiões facilmente distinguíveis baseado em aspectos citoarquitetônicos (figura 2), com uma lâmina interna (NPGli), próxima ao GLD, onde são encontrados neurônios pequenos (8 μ m) e outra externa (NPGle) onde são encontrados neurônios grandes (30 μ m). Acredita-se que a NPGli seja equivalente ao FIG e a NPGle ao GLV de roedores (Lima et al., 2012). Outro estudo em primata (*Cebus apella*) também identificou terminais retinianos no NPG e a presença de neurônios imunorreativos ao NPY (Pinato et al., 2009).

Chevassus-au-Louis e Cooper (1998) discutem a evolução do FIG em roedores ao NPG dos primatas. Esses autores acreditam que o aumento do volume do GLD concomitante com a expansão do pedúnculo cerebral definiram as modificações observadas no complexo geniculado lateral dos primatas em comparação aos roedores.

1.5 – O trato genículo-hipotalâmico em primatas.

A presença de neurônios NPY-positivos no NPG do sagui e de fibras e terminais na porção ventrolateral do NSQ fornece indícios da existência de um TGH nessa espécie (Costa et al., 1998; Lima et al., 2012). Essas células, localizadas na camada mais interna do NPG, formam um moderado plexo de fibras e terminais nessa região e praticamente não se estendem para outras porções do NPG. Essas informações são sugestivas de um NPG contendo o equivalente ao FIG e GLV dos roedores (Lima, 2008). Em humanos, o TGH pode estar ausente ou ser de pouca importância, uma vez que foram encontrados poucos neurônios NPY-positivos no NPG e numerosas células imunorreativas a NPY no NSQ, bem como a presença de fibras de forma dispersa e escassa. Isso pode indicar diferenças na organização do sistema de temporização circadiana entre humanos e outros primatas (Moore, 1993).

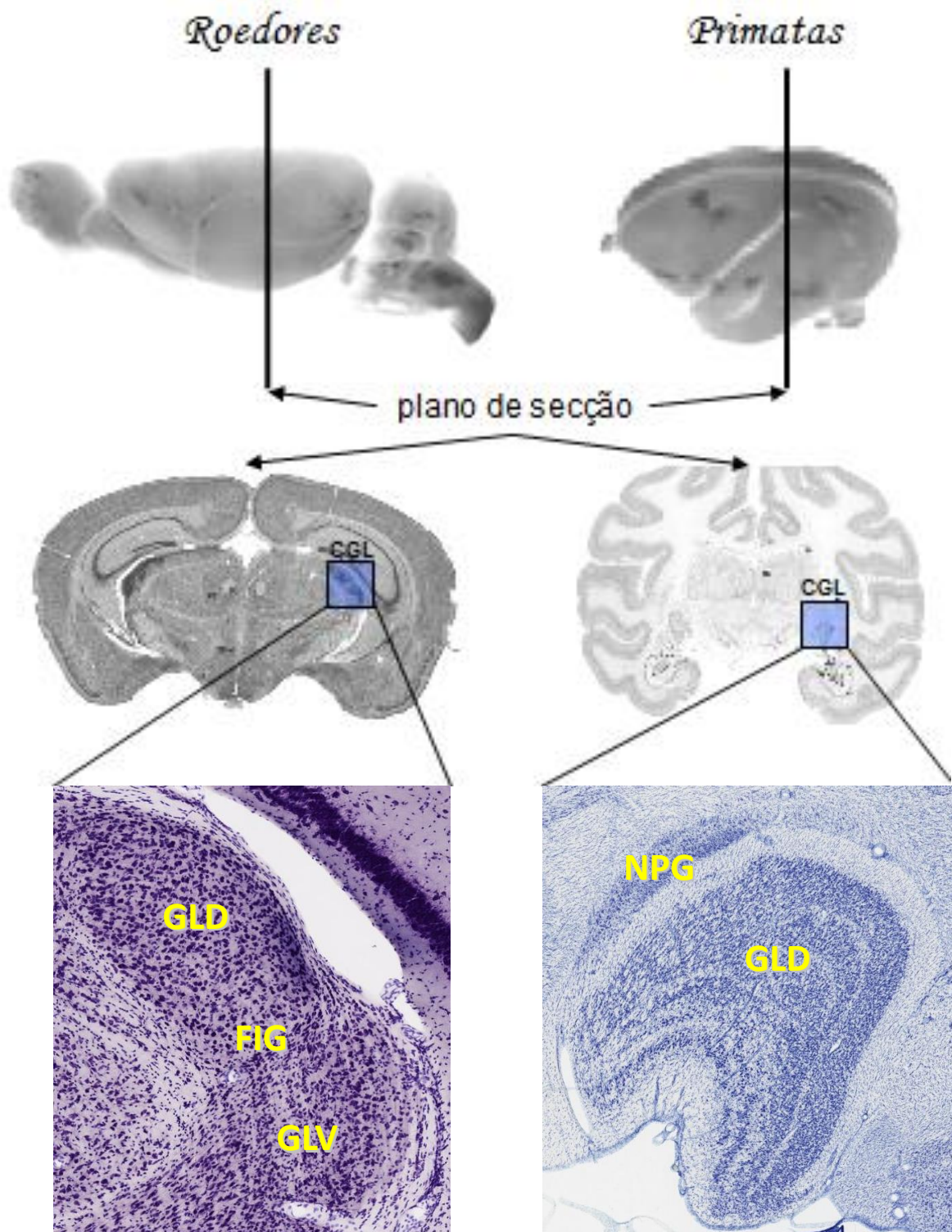


Figura. 1 – Morfologia do complexo geniculado lateral do tálamo de roedor (à esquerda) e primata (à direita). GLD (núcleo geniculado lateral dorsal), GLV (núcleo geniculado lateral ventral), FIG (folheto intergeniculado), NPG (núcleo pré-geniculado). Secções coronais coradas pela técnica de Nissl. (Adaptado de brain maps.org).

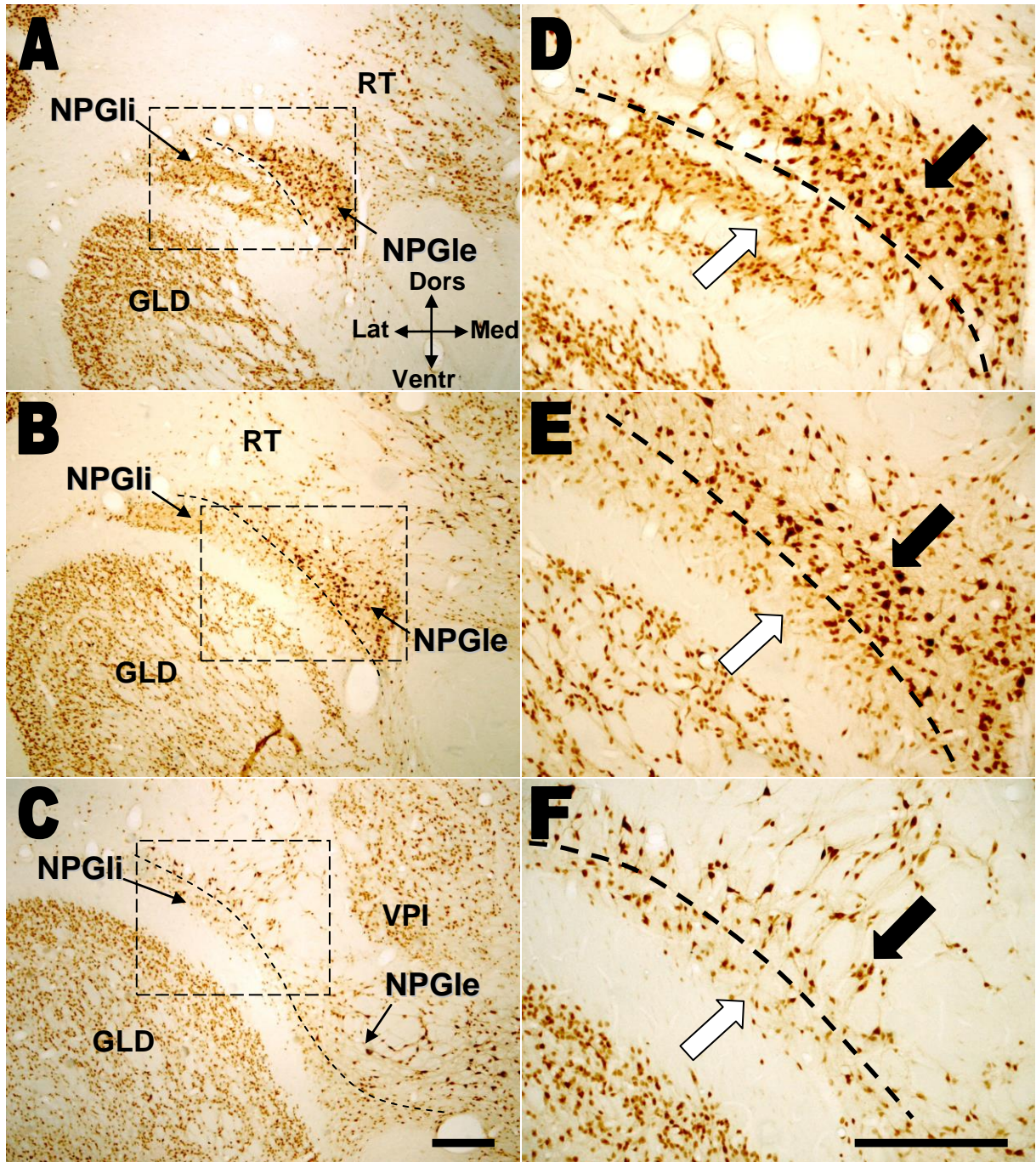


Figura 2 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do núcleo pré-geniculado do sagüi em níveis rostral (A), médio (B) e caudal (C), mostrando a citoarquitetura após imunohistoquímica contra NeuN. Os quadros pontilhados representam os respectivos aumentos mostrados em D-F. As linhas pontilhadas dividem o NPG em duas lâminas, interna (setas claras) e externa (setas escuras) (D-F). NPGli, lâmina interna do núcleo pré-geniculado; NPGle, lâmina externa do núcleo pré-geniculado; GLD, núcleo geniculado lateral dorsal; RT, núcleo reticular do tálamo; VPI, núcleo ventral pósteroinferior do tálamo; Dors, dorsal; Vent, ventral; Lat, lateral; Med, medial. Barras: 300 μ m. (arquivo pessoal).

1.6 – Aspectos Funcionais do FIG.

Sugere-se que o FIG participa da regulação do ciclo sono-vigília, do controle visuomotor e da ritmicidade biológica (Harrington, 1997; Morin e Blanchard, 2005). Estudos farmacológicos ou combinados com estudos de lesão revelam que o FIG tem uma grande importância para a modulação dos ritmos circadianos. Embora esses trabalhos mostrem que o FIG não está envolvido diretamente com a sincronização, diversos outros aspectos comportamentais confirmam sua importância para a ritmicidade biológica (Albers et al., 1984; Johnson et al., 1989; Biello et al., 1991; Meyer-Bernstein et al., 1993; Huhman e Albers, 1994; Pickard, 1994).

Alguns pesquisadores sugerem uma participação do FIG na transmissão de informação fótica para o NSQ (Harrington e Rusak, 1988; Aronin et al., 1990). Em acordo com essa idéia, outros autores mostram, por exemplo, que hamsters com lesão do FIG apresentam um maior atraso de fase no início da noite subjetiva e um menor avanço de fase no final da noite subjetiva na CRF (curva de resposta dependente de fase) para luz; também mostram um encurtamento do período em livre-curso em claro constante, não se verificando o aumento deste quando são transferidos da condição de escuro para claro constante (Harrington e Rusak, 1986; Pickard et al., 1987); a lesão bilateral do FIG desses animais leva a um maior tempo de resincronização após mudanças de fase em condições ambientais de claro-escuro (Johnson et al., 1989) e o fenômeno da bipartição (splitting) dos NSQ, quando submetidos a condições de claro constante, é menos freqüente (Harrington e Rusak, 1988). Esses efeitos podem ser interpretados como o papel fótico do FIG, entretanto, eles também podem ser devido a uma redução da atividade locomotora do animal (Janik e Mrosovsky, 1994), muito embora alguns trabalhos não tenham identificado tais alterações após lesão do FIG.

A maioria dos estudos aponta para a importância do papel não-fótico do FIG e diversos fatores estão ao seu favor, já que foram observados em vários experimentos de lesão bilateral do FIG desses roedores uma drástica diminuição de sua atividade locomotora (Johnson et al., 1989), uma inibição ou redução das mudanças de fase provocadas por administração de triazolam (Mrosovsky e Salmon, 1990) e roda de atividade (Janik e Mrosovsky, 1994) e um aumento do período em livre-curso nas

condições de escuro constante (Pickard, 1994). A hipótese do papel não-fótico do FIG é apoiada ainda pelas respostas obtidas a partir de estudos de sua própria estimulação elétrica (Rusak et al., 1989), bem como de injeções de NPY dentro do NSQ. Ambos os estímulos promovem mudanças de fase nos ritmos circadianos, no entanto, essas mudanças são diferentes daquelas promovidas pela luz. As CRF para esses estímulos se assemelham a uma CRF não-fótica. Em resumo, a ativação do sistema FIG-TGH resulta em mudanças de fase que são diferentes das provocadas pela luz, e incluem avanço de fase durante o dia subjetivo e atraso durante a noite subjetiva. Isto parece ser um mecanismo de “feedback” que regula a função do marca-passo e parece estar associado com o aumento de atividade locomotora durante o estímulo (Moore, 1992; 1999), embora alguns trabalhos mostrem que nem todos os estímulos não-fóticos mediados pelo FIG estão associados a incremento de atividade locomotora (Biello et al., 1991; Biello e Mrosovsky, 1993).

Moore e Card (1994a) sugerem que o FIG, através da projeção de suas células produtoras de NPY para o NSQ pelo TGH, integra as informações fóticas com as não-fóticas necessárias para modificar a função do marca-passo. Já os estudos de atividade celular, mapeando a expressão da proteína do gene *c-fos*, mostram que o FIG responde tanto a estímulos fóticos quanto não-fóticos, mas quando se verifica a neuroquímica das células envolvidas torna-se claramente evidente a participação dos neurônios imunorreativos a NPY nos eventos não-fóticos em detrimento dos fóticos (Janik et al., 1995).

1.7 – Aspectos Funcionais do NPG.

Um estudo realizado por Livingston e Mustari (2000), em *Macaca mullata* e *M. fascicularis*, relata que algumas regiões do NPG mantêm conexões recíprocas com o colículo superior (CS) e com o núcleo do tracto óptico (NTO). Essas conexões são características do GLV de roedores que, por sua vez, estão envolvidas no papel visuomotor desses animais. Assim, conclui-se que, ao menos em parte, o NPG dos primatas contenha o equivalente ao GLV. Esse estudo foi restrito ao sistema visuomotor e não avaliou a possibilidade do NPG desses primatas apresentarem

conexões com os centros do sistema de temporização circadiana. Estudos eletrofisiológicos realizados em macacos rhesus demonstram que neurônios do NPG, localizados imediatamente dorsal ao GLD, respondem à iluminação do campo visual e que esse efeito é independente de movimentos oculares. Ainda, alguns efeitos visuais tônicos, observados no NPG após iluminação do campo visual, podem agir via sistema inibitório possivelmente a partir de células gabaérgicas presentes nessa camada (Livingston e Fedder, 2003). No sagui, a região descrita por esse estudo coincide com a NPGli, entretanto, essas células somente foram identificadas ocupando a NPGle. Sabemos que essa região recebe uma pequena quantidade de fibras retinianas com predominância contralateral (Lima et al., 2012).

1.8 – O gene *c-fos*.

O gene *c-fos* pertence a um grupo de genes conhecidos como genes de expressão imediata (IEGs). Experimentos pioneiros realizados em 1985 mostraram que estes são ativados após um adequado estímulo celular, podendo suas proteínas ser encontradas alguns minutos após o estímulo, justificando o nome dado a esses genes (Morgan e Curran, 1995). A descoberta dos IEGs e suas respectivas proteínas trouxeram uma nova perspectiva para o estudo funcional do sistema nervoso, no qual poder-se-ia mapear a atividade neuronal após um determinado tipo de estímulo e, através de técnicas imunohistoquímicas convencionais, analisar tal efeito levando em conta aspectos qualitativos e quantitativos da marcação da proteína expressa (Morgan e Curran, 1995).

Um dos IEGs mais estudados foi o *c-fos* e sua proteína específica, FOS (Morgan e Curran, 1995). Sem dúvida a sua característica mais notável é a expressão rápida e transitória, onde os IEGs codificam fatores transcricionais (FT) que irão regular diversos genes. Dependendo do FT e do gene teremos uma modificação plástica e adaptativa específica na célula. Por exemplo, os FT podem ativar genes responsáveis por formar receptores de membrana, canais iônicos, estruturas do citoesqueleto, neurotransmissores, entre outros. Entre os fatores transcricionais encontramos os constitutivos (FTC) e os induzidos (FTI). O mecanismo que controla a

produção dos FTC não está muito bem elucidado, no entanto, os FTI estão envolvidos numa complexa cascata molecular, com a participação de segundos mensageiros e dos próprios FTC atuando em regiões promotoras específicas do DNA. Nem todos os IEGs codificam FT, alguns podem produzir diretamente outras substâncias, como por exemplo, enzimas citoplasmáticas (fosfatases e cicloxigenases) (Herdegen e Leah, 1998).

Muito já se sabe sobre as funções dos FT no sistema nervoso, entre elas podemos citar: memória (Bourtchuladze et al., 1994), apoptose (Smeyne et al., 1993), regeneração axonal (Schaden et al., 1994) e até mesmo a sincronização dos ritmos circadianos (Wollnik et al., 1994). Em relação a esta última, os principais IEGs envolvidos são c-fos e JunB. Eles formam heterodímeros e se ligam a uma região promotora do DNA conhecida como sítio AP-1 (Herdegen e Leah, 1998).

1.9 – FOS e o Sistema de Temporização Circadiana.

A expressão de FOS apresenta variação circadiana e está regulada por mecanismos diferentes, comparando-se distintas regiões envolvidas nos ritmos biológicos, como o NSQ, FIG e o núcleo paraventricular do tálamo (PVT) e entre as variadas situações experimentais, seja ela de claro ou escuro constante, claro-escuro ou fotoperíodo esqueleto (Edelstein et al., 2000).

Beulé e Amir (1999) demonstram que a expressão de FOS e JunB no NSQ e FIG mantêm uma forte correlação com as mudanças de fase após estímulos fóticos e que a intensidade da expressão dessas proteínas apresenta forte ligação com a diferença entre as 24 horas do ciclo claro-escuro ambiental e o período endógeno do animal. Experimentos envolvendo pulsos de luz mostram que esta induz a expressão de FOS no NSQ e a quantidade da proteína expressa depende da hora circadiana em que o estímulo é aplicado (Peters et al., 1996; Schumann et al., 2006). Embora haja controvérsias, a expressão de FOS parece ser essencial nas mudanças de fase provocada pela luz, visto que sua expressão é bastante pronunciada no NSQ e coincidente com os momentos onde tais mudanças são mais propícias (Aronin et al., 1990; Kornhauser et al., 1990; Abe e Rusak, 1994).

Edelstein e Amir (1995) mostraram que diversos estímulos não-fóticos são mais eficientes quando aplicados durante o dia subjetivo, ao contrário dos pulsos de luz, em que a expressão de FOS é bem mais pronunciada durante a noite subjetiva. Além disso, os estímulos não-fóticos não são capazes de induzir FOS no NSQ a ponto de ser estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle (Mikkelsen et al., 1998).

1.10 – A Expressão de FOS após Estímulos Não-fóticos.

Todas as pistas temporais que não são luz são denominadas pistas não-fóticas (alimento, odor, vocalização, roda de atividade, escuro, etc.). Elas podem mudar a fase do oscilador biológico e modular a sincronização fótica (Challet e Pévet, 2003). Os estímulos ambientais sejam eles fóticos ou não-fóticos atuam direta ou indiretamente sobre o oscilador circadiano, através das vias neurais de sincronização, modificando sua atividade e ajustando os ritmos biológicos do indivíduo à dinâmica do ecossistema no qual está inserido (Janik et al., 1995; Mikkelsen et al., 1998).

Avaliando as mudanças de fase decorrentes da aplicação de estímulos não-fóticos, em animais mantidos sob condições constantes, percebe-se que a curva de resposta dependente de fase (CRF) é a imagem especular da CRF para luz, ou seja, apresenta avanços de fase (AvF) durante o dia subjetivo e relativa insensibilidade durante a noite subjetiva. Entretanto, os estímulos de escuro (pulsos de escuro), que consistem em interromper momentaneamente a condição de claro constante, produzem uma CRF diferente da curva não-fótica. A CRF para o escuro apresenta AvF durante o dia subjetivo e início da noite subjetiva e atrasos de fase (AtF) no final da noite subjetiva (Boulos e Rusak, 1982a; 1982b; Ellis et al., 1982; Dwyer e Rosenwasser, 2000; 2002; Rosenwasser e Dwyer, 2001).

A expressão de FOS apresenta correlação positiva com os momentos em que as mudanças de fase são mais propícias, sugerindo que esta proteína participa do mecanismo molecular de ajuste dos centros circadianos. Assim, para estímulos não-fóticos, a maior expressão de FOS é verificada durante o dia subjetivo (Edelstein e Amir, 1995; Mikkelsen, et al., 1998). Em roedores, as células do FIG respondem de

forma satisfatória a estímulos não-fóticos e em especial as que contêm NPY (Janik et al., 1995). Este grupo celular parece estar mais envolvido na transmissão da informação desses estímulos do que propriamente aos pulsos de luz (Janik et al., 1995). Ainda, a injeção de NPY dentro do NSQ reproduz o efeito dos estímulos não-fóticos. Neste caso, observa-se a redução na expressão de FOS e inibição das mudanças de fase provocada por pulsos de luz, quando estes são aplicados momentos após a injeção (Janik et al., 1995; Eldestein e Amir, 1995; 1996).

2. JUSTIFICATIVA

O folheto intergeniculado do tálamo de roedores é integrante fundamental no sistema de temporização circadiana, um circuito neural que responde pela geração e sincronização dos ritmos biológicos. Apesar de não estar envolvido diretamente na geração da ritmicidade, o núcleo influencia intensamente a atividade do núcleo supraquiasmático hipotalâmico (marca-passo circadiano), demonstrado através de estudos farmacológicos e de lesão. As principais características desse folheto são: a presença de terminais retinianos; de células imunorreativas a neuropeptídeo Y, as quais expressam FOS após estímulos não-fóticos; e a eferência direta para o núcleo supraquiasmático. Em todos os primatas estudados até o momento, tanto do velho quanto do novo mundo, o núcleo pré-geniculado do tálamo é considerado o provável homólogo do folheto intergeniculado e do núcleo geniculado lateral ventral dos roedores. Foram identificados neurônios imunorreativos a neuropeptídeo Y e uma densa projeção retiniana predominantemente na região mais interna do núcleo. Para concluir se este núcleo é na realidade homólogo do folheto intergeniculado de roedores é extremamente necessário determinar o seu papel funcional e suas conexões (hodologia). Desse modo, o núcleo pré-geniculado deverá apresentar características semelhantes ao seu provável correspondente, as quais acreditamos terem sido conservadas filogeneticamente. Os aspectos funcionais do núcleo pré-geniculado ainda são desconhecidos e o presente trabalho pretende esclarecer algumas dessas questões. A descrição do Sistema de Temporização Circadiana em primatas é fundamental, pois representará um avanço na compreensão dos mecanismos neurais da ritmicidade biológica em humanos, uma vez que o sagui (*Callithrix jacchus*) é uma filogeneticamente mais próxima, levando-se em consideração que a maioria dos trabalhos foram desenvolvidos em roedores.

3. OBJETIVO

Avaliar a resposta celular do núcleo pré-geniculado do sagui (*Callithrix jacchus*), mapeando a expressão da proteína FOS, após aplicação de um estímulo não-fótico (pulso de escuro).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Animais

Para realização deste projeto foram utilizados 07 saguis (*Callithrix jacchus*), nascidos em cativeiro, cedidos pelo Núcleo de Primatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (NP-UFRN), com autorização do IBAMA (n° 1/24/92/0039-00), os quais foram submetidos a procedimentos experimentais de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA-UFRN), em que foi assinado um TERMO DE RESPONSABILIDADE em data posterior, visto que tal Comissão ainda não havia sido instituída na data de aprovação do referido projeto. Assim, seguimos inicialmente os princípios éticos de experimentação animal adotados pela National Research Council of National Academy publicadas no livro “Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research”. Uma versão em formato pdf está disponível gratuitamente no site da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) – <http://www.sbnec.gov.br/links>.

Os saguis foram acompanhados durante toda a pesquisa por um médico veterinário para atestar as boas condições de saúde dos mesmos. Os mesmos animais utilizados nessa pesquisa também serviram dois outros projetos desenvolvidos pelo Laboratório de Neuratomia da UFRN, como: (1) Caracterização Neuroquímica e Mapeamento da Projeção Retiniana para o Complexo Parabraquial do Saguí (*Callithrix jacchus*); e (2) Mapeamento da Proteína Neuronal (NeuN) no Encéfalo do Saguí (*Callithrix jacchus*).

4.2 – Manipulação dos Animais

Cada animal foi mantido individualmente em uma gaiola, medindo 76 cm de altura x 50 cm de largura x 60 cm de comprimento, equipada com comedouro, bebedouro, poleiro e toca de PVC (aberta superiormente), postos dentro de uma sala com isolamento acústico parcial, iluminação artificial (250 lux), temperatura ($26,7 \pm$

0,3°C) e umidade controladas ($78,2 \pm 6\%$). Um exaustor era ligado 01 vez por semana, durante 24 horas, para renovação do ar da sala. A gaiola estava equipada com um sensor infravermelho sensível ao movimento que, por sua vez, era conectado a uma placa de aquisição de dados (National Instruments, NI PCI – 6025E) em uma sala vizinha de onde foram obtidos os registros do ciclo de atividade-reposo do animal.

Os saguis eram alimentados 2 vezes ao dia (1 vez entre 06:00 h – 11:00 h e outra entre 13:00 h – 17:00 h), em horários aleatórios, e com água *ad libitum*.

Em nosso desenho experimental (figura 3), os saguis (01 animal por vez) foram mantidos em regime de claro-escuro 12:12, sendo 250 lux na fotofase e escuro total na escotofase. Esta condição foi mantida até que todos os animais estivessem devidamente sincronizados por pelo menos 7 dias. Decorrido esse tempo, os animais foram submetidos à condição de claro constante com iluminação de intensidade fixa de 250 lux até expressarem seu ritmo sem referências de pistas ambientais (livre-curso). Após duas semanas em livre-curso, suficiente para a estabilização do período (Erkert, 1989), foi aplicado um estímulo não-fótico (pulso de escuro) com duração de 1 h (uma hora), atingindo horas circadianas (HC) específicas dos saguis previstas com auxílio do software El Temps (Antoni Diez-Noguera, Barcelona, 1999). Para fazer tal previsão calculamos o período endógeno do animal (τ) em décadas (dez dias, imediatamente antecedentes ao pulso) pelo teste de Sokolov-Bushell, obtendo um valor em minutos, o qual subtraído de 1440 min (equivalente a 24 h) nos forneceu uma referência para a mudança de fase diária (MF). Em seguida, dividiu-se o τ por 24 para definir as HCs. Assim, ajustou-se o “timer” para interromper a passagem de corrente elétrica para as luzes da sala na hora prevista e com a duração desejada.

Um software (Aschoff) desenvolvido na base de pesquisa LabCrono/UFRN foi usado para registrar o ciclo de atividade/reposo de cada animal, utilizando para isso um sensor infravermelho (JFL-Equipamentos Eletrônicos, IDX-1000) adaptado à gaiola, que detectava cada movimento do animal gerando um sinal elétrico. O sinal elétrico gerado pelo sensor era enviado para a placa de aquisição de dados, que armazenava informações a cada 05 minutos, totalizando 288 pontos de registro de atividade ao longo de 24 horas. Estudos comparativos entre dados captados por softwares com dados obtidos através de registros de observação comportamental

demonstram que 97% das vezes em que este tipo de sensor é ativado, o sinal corresponde ao deslocamento do animal, embora ele seja capaz de detectar qualquer tipo de movimento (Santos, 2000).

A determinação dos horários do início da atividade foi obtida através da totalização dos dados em intervalos de 15 minutos e calculada a frequência média diária de atividade. Como início da atividade (HC 0) foi considerado o primeiro intervalo de 15 minutos com valor superior ou igual a 10% da média de atividade diária, que se mantivesse por um mínimo de 30 minutos dentro de 1 hora. Como fim da atividade foi considerado o último intervalo de 15 minutos com valor superior ou igual a 10% da média diária, antecedido por no mínimo 30 minutos de atividade dentro de 1 hora (critério adaptado a partir de Glass et al., 2001). O critério de definição da HC atingida pelo pulso de escuro foi determinado pelo início do pulso, mesmo que o término deste ocorra em HC subsequente.

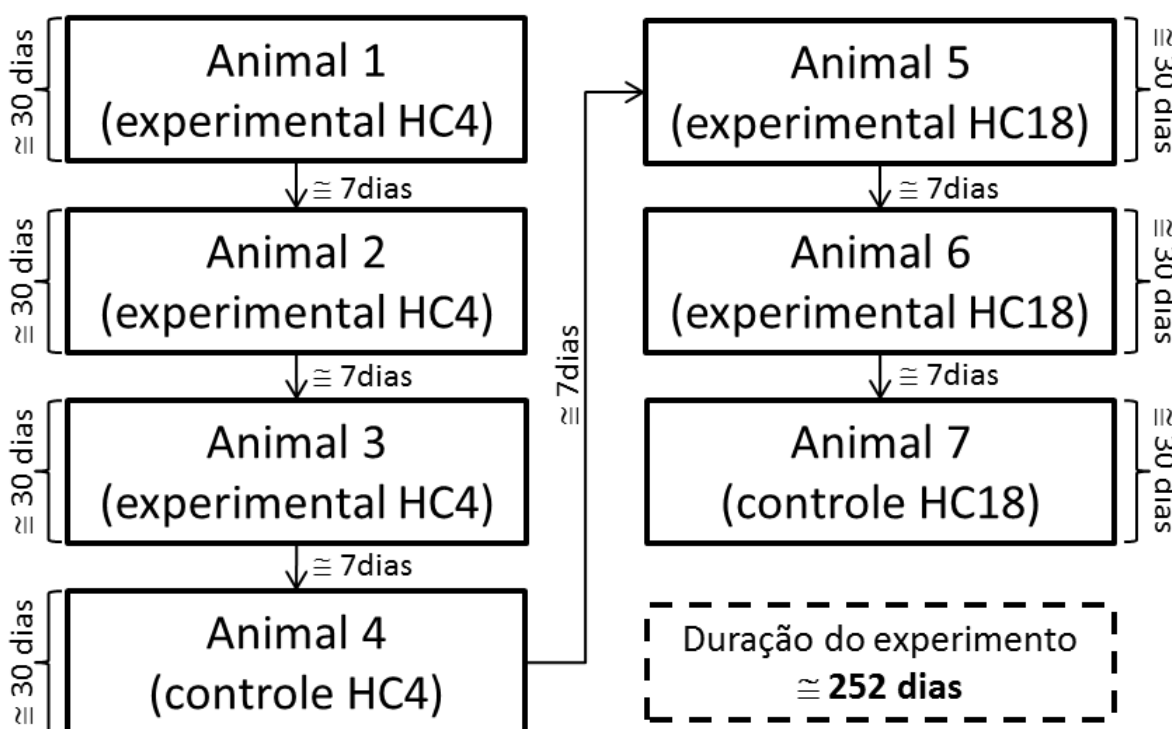


Figura. 3 – Desenho experimental com respectiva duração prevista. Cada animal foi individualmente isolado em ambiente experimental controlado aproximadamente por 30 dias até a aplicação do estímulo e captura (experimental) ou apenas captura (controle). Após cada captura, o animal subsequente foi posto em experimento após 07 dias, período o qual foi realizada limpeza da sala e manutenção e verificação dos equipamentos.

Os pulsos foram aplicados visando atingir o dia subjetivo entre a HC 4 e 6 e noite subjetiva entre a HC 18 e 20. Esses pontos foram escolhidos por estarem com respostas bem caracterizadas nas CRFs não-fólicas e possuírem correlação positiva com a expressão de FOS em trabalhos com roedores (Janik et. al., 1995; Mikkelsen, et. al., 1998, Rosenwasser e Dwyer, 2001). Em sagui, pulsos de escuro também induzem significativos avanços de fase no meio do dia subjetivo e atrasos no meio da noite subjetiva nessas HCs específicas (Silva, 2007) (Figuras 4 e 5 e tabela 1).

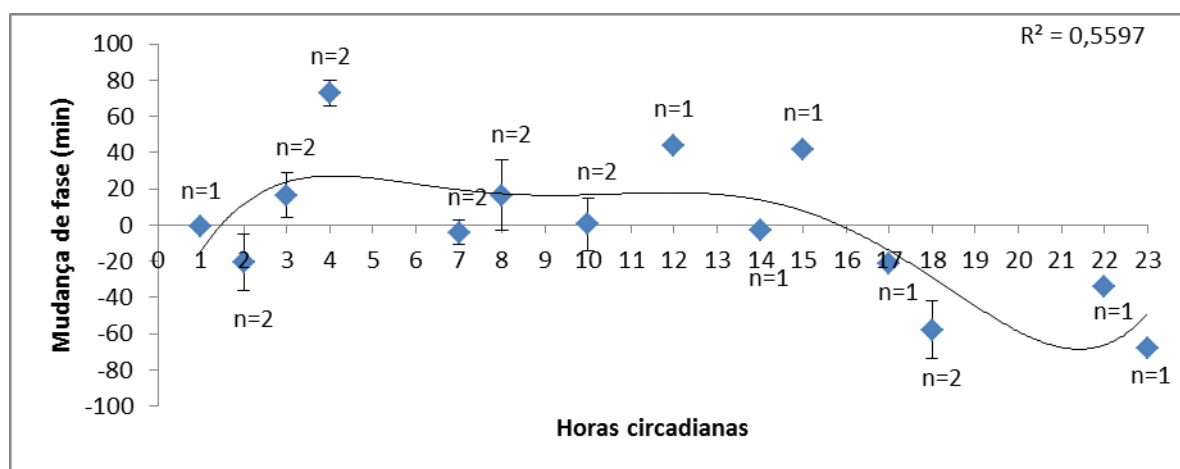


Figura 4. Curva de resposta de fase após pulso de escuro de 1h do sagui. (R^2) Coeficiente de determinação. Arquivo do Laboratório de Cronobiologia da UFRN.

Tabela 1. Valores obtidos nas mudanças de fase após pulso de escuro, referentes à figura 5. Hora circadiana (HC), erro padrão (SE), intervalo de confiança (95% CI), mudança de fase provocada pelo pulso (MF pulso) e significância estatística (p). Natal-RN 2013. Arquivo do Laboratório de Cronobiologia da UFRN.

HC	SE	95% CI	MF pulso	Significância (p)
HC4 ¹ (A)	4,613	35 - 57	80	< 0,0001
HC4 ² (B)	4,522	44 - 65	66	< 0,0001
HC18 ¹ (C)	2,605	53 - 66	42	< 0,0001
HC18 ² (D)	2,416	80-92	74	< 0,0001

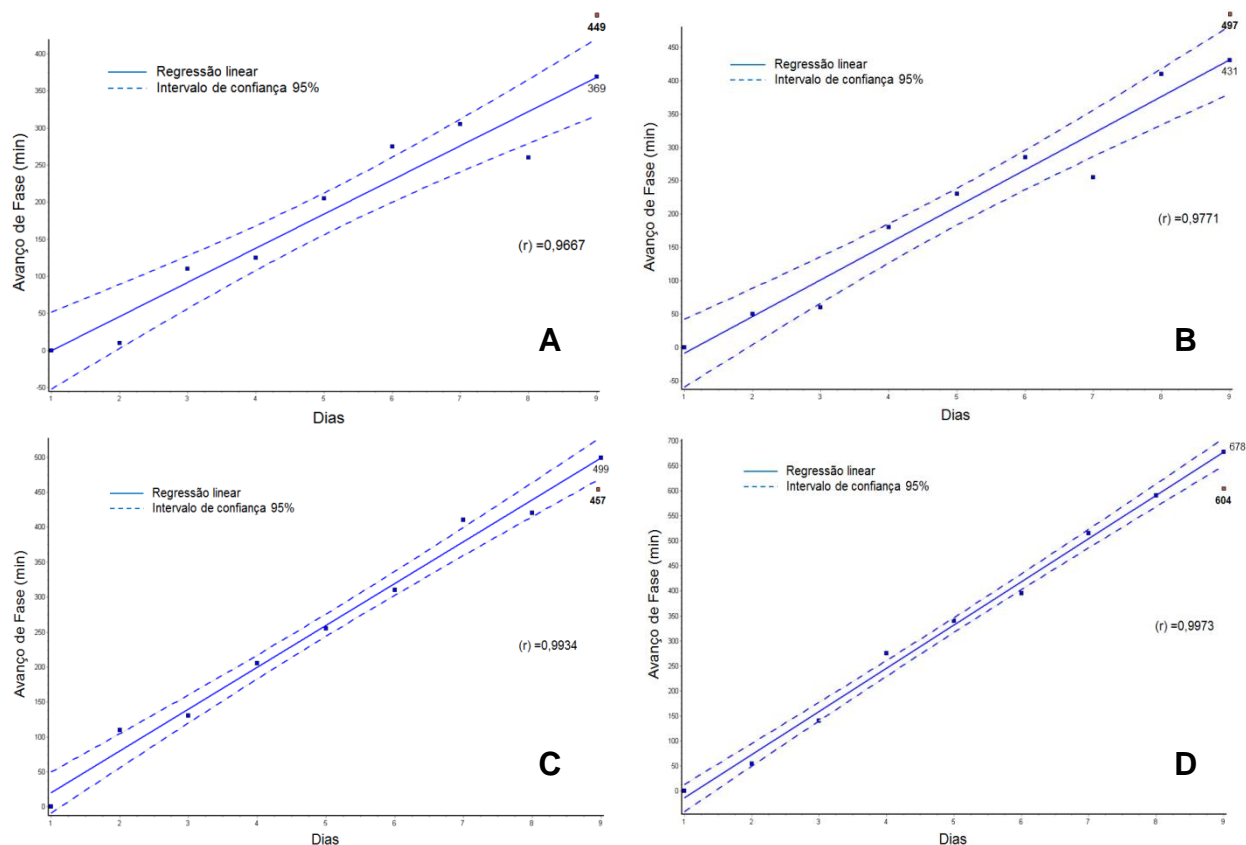


Figura 5. Regressão linear demonstrando o efeito do pulso de escuro na mudança de fase após 9 dias em livre-curso. O último ponto da regressão ($x=9$), em azul, representa a previsão da mudança de fase caso não fosse aplicado o pulso, e o que de fato ocorreu é representado com seu valor em negrito. A e B representam pulsos aplicados na HC4, e C e D na HC18. (r) coeficiente de correlação de Pearson. Arquivo do Laboratório de Cronobiologia da UFRN.

Três animais receberam o estímulo na HC 4 (fig. 6A-C) e dois na HC 18 (fig. 7A-B), consistindo o nosso grupo experimental. Um animal da HC 4 (fig. 6D) e um da HC 18 (fig. 7C) foram submetidos às mesmas condições do grupo experimental, exceto pelo fato de não terem recebido o pulso de escuro, consistindo o nosso grupo controle. Trinta minutos após o pulso, permanecendo nas mesmas condições experimentais, os saguis foram capturados, anestesiados e perfundidos (procedimentos descritos adiante, no tópico 4.4.1). Posteriormente removemos os encéfalos e realizamos cortes deste tecido (microtomia). Os animais do grupo controle foram capturados em HC semelhantes a do grupo experimental e, em seguida, submetidos aos mesmos procedimentos. Após esta etapa, realizamos imunohistoquímica contra a proteína FOS (procedimento descrito adiante, no tópico 4.4.2), utilizada como

indicador de atividade neuronal. Para mensurar a expressão de FOS, utilizamos como parâmetro o número de células FOS-positivas por campo (coincidente com os limites do NPG), com auxílio do software Canvas X, comparando os resultados intragrupos e intergrupos.

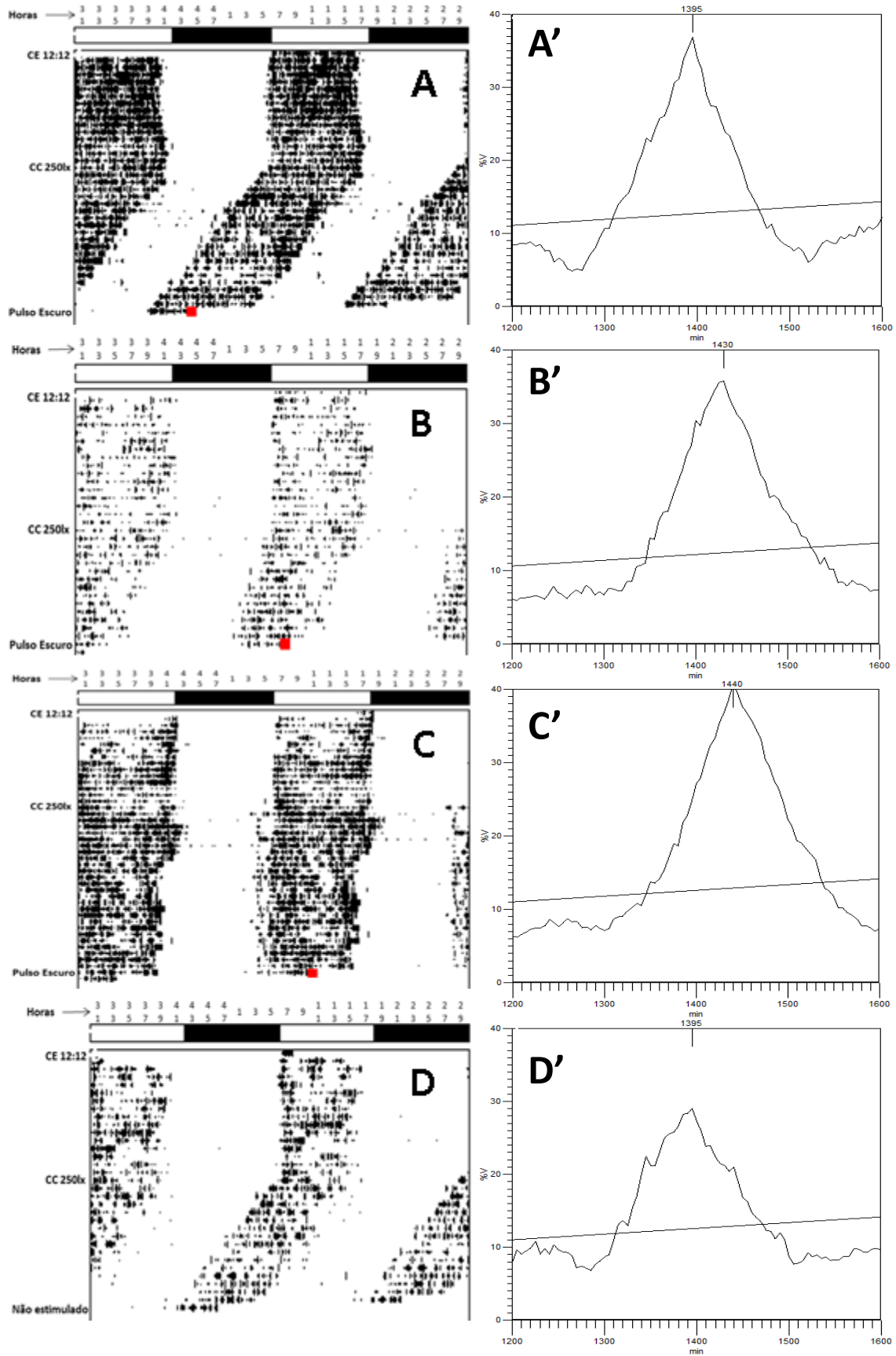


Figura 6. Actogramas (esquerda) e periodogramas (direita) dos animais da HC4. (A-C) Grupo experimental. (D) Grupo controle. (A' - D') periodogramas (Sokolov-Bushell) dos animais A-D.

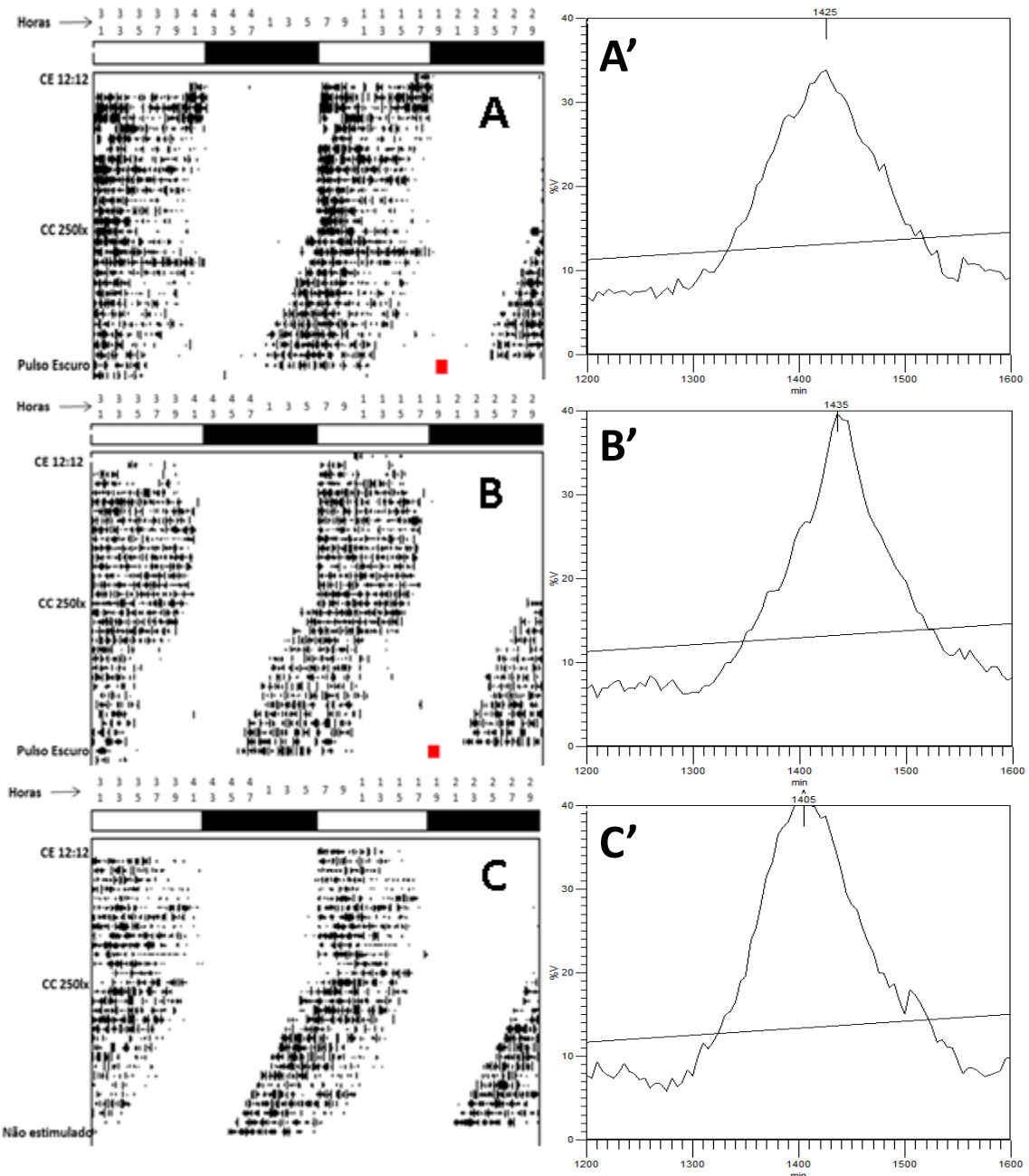


Figura 7. Actogramas (esquerda) e periodogramas (direita) dos animais da HC18. (A-B) Grupo experimental. (C) Grupo controle. (A'- C') periodogramas (Sokolov-Bushell) dos animais A-C.

4.3 – Anestesia

Os saguis foram capturados e receberam como medicação pré-anestésica o sulfato de atropina na dose de 0,04 mg/Kg, por via subcutânea, e 2 mg/Kg de tramadol, por via muscular. Após 15 minutos, administrou-se como indutor anestésico,

por via intramuscular, uma mistura contendo ketamina (200 mg/Kg) e xilazina (20 mg/Kg) e, para manutenção da anestesia, foi utilizado isoflurano, por via inalatória, através de máscara e oxigênio 100%.

4.4 – Processamento do Tecido

4.4.1 – *Perfusão e Microtomia*

Os animais foram anestesiados e perfundidos em uma capela de perfusão. Introduziu-se uma agulha de 20 x 1,5 mm, previamente conectada a uma bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Parmer, Niles, IL), no ápice do coração atingindo o ventrículo esquerdo, logo após seccionou-se o átrio direito para o escoamento do líquido vascular. Inicialmente, 350 ml de solução salina a 0,9%, pH de 7,4, com heparina (Hipolabor, 5000 UI/ml) na concentração de 2 ml/L, à temperatura ambiente, foi impulsionado pelo leito vascular durante 4 minutos (100 ml/min), seguindo-se 700 ml de solução fixadora (paraformaldeído a 4%, Vetec Química Fina) em tampão fosfato (PB) 0,1 M, a um pH de 7,4, em temperatura ambiente. Metade da solução fixadora foi infundida em fluxo rápido (35 ml/min), e a outra metade em fluxo lento (17,5 ml/min), totalizando 30 min de perfusão. Em seguida, os encéfalos foram removidos da cavidade craniana e pós-fixados por 4 horas na mesma solução fixadora e logo após transferidos para uma solução de sacarose a 30% (Nuclear-CAQ) em PB 0,1 M, até serem submetidos à microtomia. Dessa maneira, seccionamos os encéfalos por microtomia de congelação (gelo seco), em um micrótomo manual. Obtivemos secções coronais de 30 μ m, as quais foram distribuídas sequencialmente em 6 compartimentos, cada compartimento contendo sempre uma das seis secções, de modo que a distância entre uma secção e a seguinte de um mesmo compartimento fosse de aproximadamente 180 μ m. As secções de todos os compartimentos foram armazenadas em uma solução anti-congelante contendo PB 0,1 M, pH 7,4.

4.4.2 – *Imunohistoquímica*

A reação foi feita pelo método ABC (protocolo avidina-biotina complexo peroxidase; ABC, kit Elite, Vector labs, Burlingame, CA, USA) para marcação simples com imunoperoxidase. A concentração do anticorpo utilizado seguiu as especificações técnicas do fabricante.

As secções de um compartimento de cada vez foram lavadas (5 vezes de 5 minutos) com tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, sob agitação automática, e pré-tratadas com peróxido de hidrogênio a 0,3% em PB por 20 minutos para inativação da peroxidase endógena. Colocamos os cortes em contato com o anticorpo primário obtido em coelho (Oncogene Research Products; [1:10000]) diluído em PB, contendo Triton-X 100 a (ICN Biomedicals) 0,4% e soro normal (Sigma Chemical Company; [1:50]) do animal em que foi obtido o anticorpo secundário durante 18 a 24 horas (20°C). Em seguida, as secções foram colocadas em contato com o anticorpo secundário biotilado obtido em cabra (Jackson Immunoresearch Laboratories; [1:1000]), diluído em Triton-X 100 a 0,4%, por 90 minutos. Após esta etapa, incubamos os cortes numa solução contendo avidina e biotina (2%) previamente diluída (30 minutos antes) em Triton-X 100, por 90 minutos. Para visualizar a reação, os cortes foram colocados num recipiente em contato com um cromógeno, uma solução de diaminobenzidina (DAB_{tetra}) (Sigma, St Louis, MO, USA) a 2,5% diluída em PB (0,1M / pH 7,4). Adicionamos à solução da DAB 2 ml de uma solução contendo 80 mg/ml de sulfato de amônio e níquel diluído em água destilada.

Revelamos a reação final adicionando-se uma solução contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,003% como substrato, obtendo-se da região marcada uma cor cinza azulado. Finalizamos com 5 lavagens, de 5 minutos cada, com PB (0,1 M, pH 7,4). Sempre, entre cada uma das etapas descritas anteriormente, foram realizadas essas lavagens no tecido. Em seguida, os cortes foram montados em lâminas de vidro (Specimen) previamente gelatinizadas com gelatina-alúmem-cromo (Vetec Química Fina) que, após secarem a temperatura ambiente, foram mergulhadas em uma solução de tetróxido de ósmio a 0,05%, por 30 segundos, para intensificação da reação. Posteriormente, as lâminas passaram pelo processo de desidratação em álcoois

(Cromato Produtos Químicos) de concentrações gradativamente maiores (70, 90 e 100%), 5 minutos cada, e deslipidificados com xilol (Cromato Produtos Químicos), mergulhados em dois recipientes por 5 minutos cada, em seguida foram cobertas com lamínulas usando-se DPX (Aldrich Milwaukee, WI).

A avaliação dos resultados imunohistoquímicos foi feita com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus, BX-41) utilizando-se campo claro. As imagens foram digitalizadas utilizando uma câmera (Nikon, DXM-1200) acoplada ao microscópio e conectada a um computador, sendo subsequentemente operacionalizadas para ajuste de brilho e contraste com o programa Canvas X (Fig. 8A). Os esquemas e desenhos da marcação imunohistoquímica foram elaborados utilizando também o programa Canvas X (Fig. 8C e 8E). Os limites do NPG e suas sub-regiões foram delimitados a partir das imagens digitalizadas das secções coradas com a técnica de Nissl, as quais foram sobrepostas às secções adjacentes marcadas com FOS para ajuste dos limites do NPG (Fig. 8B) e identificação dos neurônios imunorreativos, assinalados com um ponto (Fig. 8C). Foram considerados como neurônios FOS-positivos aqueles cuja marcação apresentou-se visivelmente intensa (Fig. 8D).

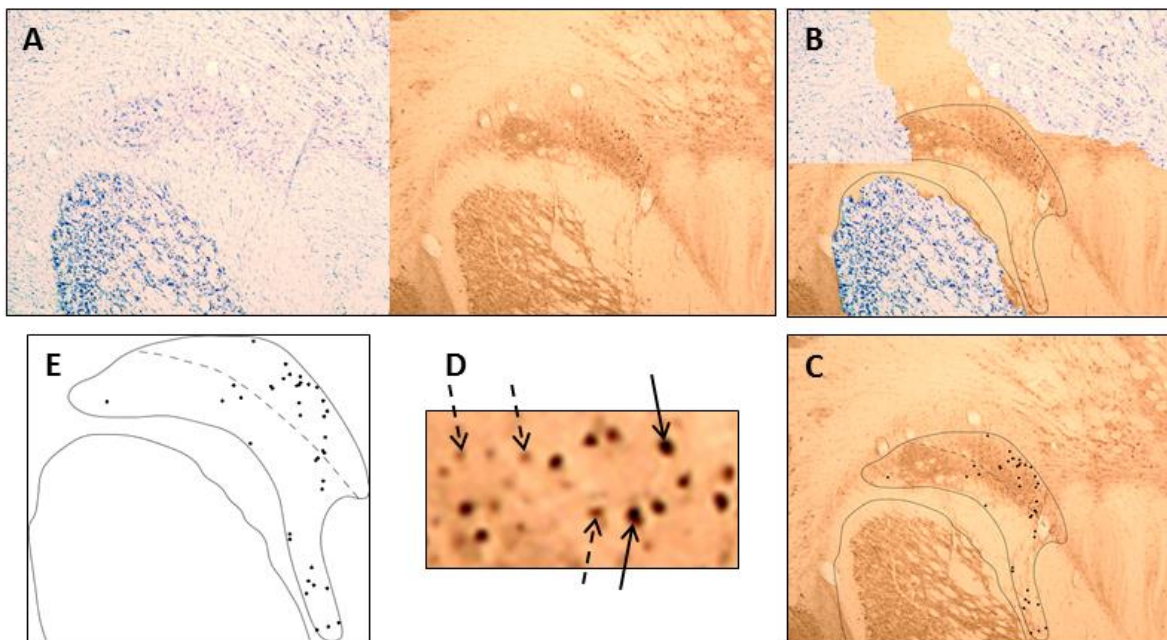


Figura 8. Edição das fotomicrografias do NPG do sagui. (A) Imagens digitalizadas e ajustadas em brilho e contraste, Nissl (esquerda) e FOS (direita). (B) Imagens sobrepostas (Nissl e FOS) para delimitação do NPG. (C) Limites do NPG delimitados e núcleos vizinhos. (D) Contagem de neurônios imunorreativos à FOS, setas contínuas indicam neurônios considerados na contagem e setas pontilhadas os neurônios não contados. (E) Esquema representando o resultado final da expressão de FOS no NPG.

5. RESULTADOS

5.1 – Expressão de FOS após pulso de escuro de 1h aplicado na HC4.

Todos os estímulos aplicados atingiram corretamente a HC prevista e tiveram duração exata de 1 hora. O animal 3 apresentou o maior período endógeno, 1430 min. (figuras 6C-C'), e a menor expressão de FOS (figura 11). Os animais 1 e 2 apresentaram os menores períodos endógenos dentro do grupo experimental, 1385 min (figuras 6A-A'), e 1420 min. (figuras 6B-B'), respectivamente, e um maior número de neurônios imunorreativos à FOS (figuras 09 e 10, respectivamente). O animal 4 (controle) apresentou período endógeno de 1395 min. (figuras 6D-D') e o menor número de neurônios marcados (figura 12). De modo geral, em todos os casos analisados a expressão de FOS foi mais evidente no grupo experimental e os maiores aglomerados neuronais foram identificados nas secções mais caudais do NPG (Figura 13). O animais 1 e 2 apresentaram um número total de 152 e 153 células FOS-positivas, respectivamente, e o animal 3 obteve uma menor expressão com 43 células apenas (Figura 18). A lâmina interna do NPG (NPGli) mostrou maior responsividade ao estímulo mostrando 95, 103 e 28 células FOS-positivas nos animais 1, 2 e 3, respectivamente, em comparação com a lâmina externa (NPGle) a qual mostrou 57, 50 e 15 células (Figura 23). O grupo controle apresentou 15 neurônios imunorreativos à FOS na NPGli e 15 na NPGle (Figura 18). Verificou-se uma maior densidade celular localizada na NPGli especialmente em níveis mais caudais, cujo valor total estimou-se em média 255 células por mm². Em contrapartida, a NPGle apresentou uma densidade de aproximadamente 192 células por mm² (Figura 25).

5.2 – Expressão de FOS após pulso de escuro de 1h aplicado na HC18.

Todos os estímulos aplicados atingiram corretamente a HC prevista e tiveram duração exata de 1 hora. Os animais 5 e 6 apresentaram períodos endógenos de 1425 e 1435 min, respectivamente (figuras 7A-A' e 7B-B'). No entanto, houve uma maior expressão de FOS neste último (figura 15). O animal 7 (controle) apresentou período

endógeno de 1405 min. (figura 7C-C') e o menor número de neurônios FOS-positivos (figura 16). De modo geral, em todos os casos analisados a expressão de FOS foi mais evidente no grupo experimental e os maiores aglomerados neuronais foram identificados nas secções mais caudais do NPG (Figura 17). Os animais 5 e 6 apresentaram um número total de 17 e 48 células FOS-positivas, respectivamente, e o animal 7 obteve uma menor expressão com 10 células apenas (Figura 19). As lâminas interna e externa do NPG apresentaram idêntica responsividade ao estímulo, mostrando 9 e 10 células FOS-positivas na NPGli e 23 e 25 células na NPGle, ambas nos animais 5 e 6, respectivamente (Figura 24). O animal controle apresentou 1 neurônio imunorreativo à FOS na NPGli e 9 na NPGle. Verificou-se uma maior densidade celular localizada na NPGle especialmente em níveis mais caudais, cujo valor total estimou-se em média 78 células por mm². Em contrapartida, a NPGli apresentou uma densidade de aproximadamente 65 células por mm² (Figura 26).

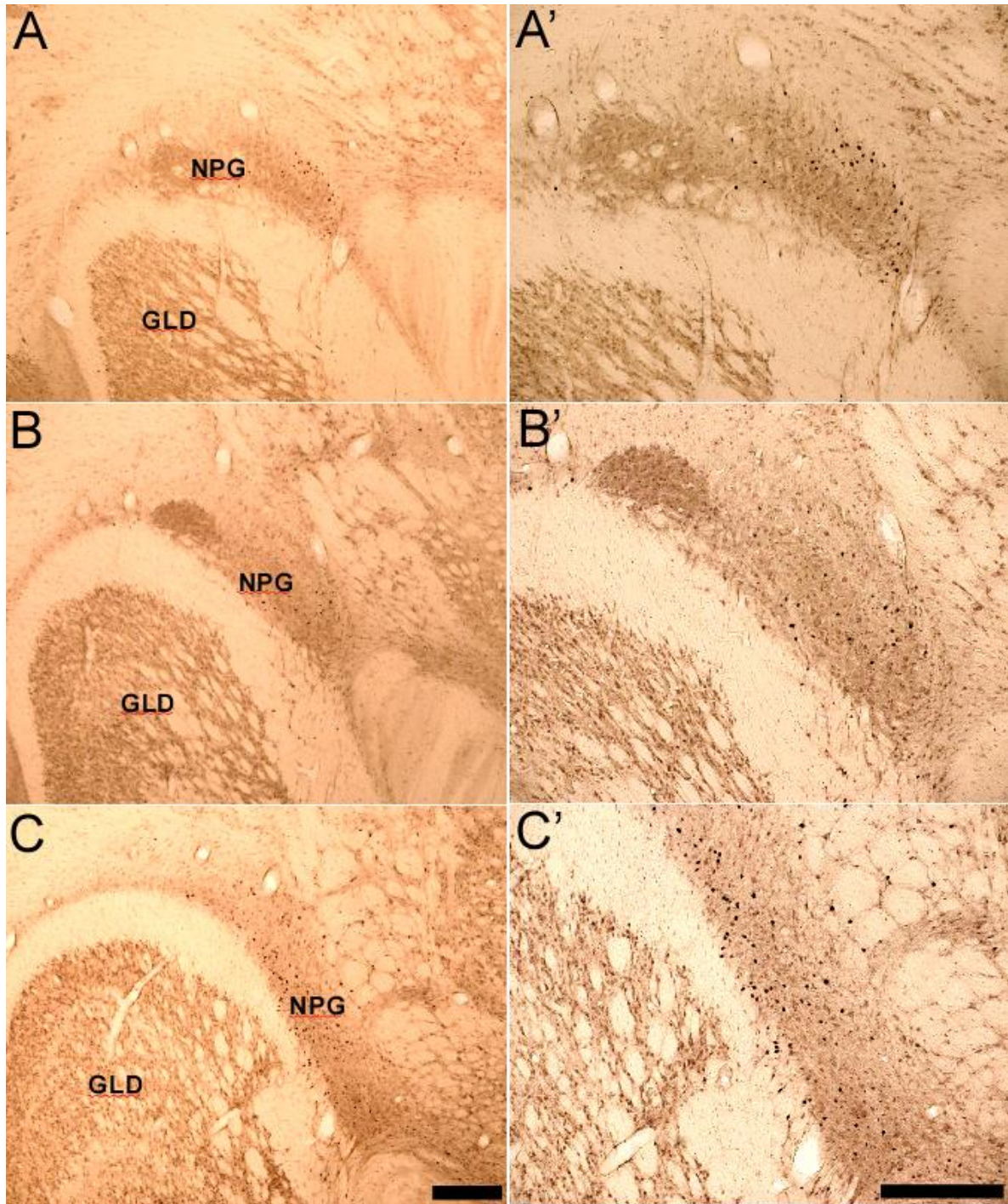


Figura 9. Fotomicrografias em campo claro de seções coronais do encéfalo do sagui (animal 1) em níveis rostral (A), médio (B) e caudal (C), mostrando neurônios imunorreativos para FOS após aplicação de um pulso de escuro de 1h na HC4. (A'-C') Respectivas imagens em maior aumento. NPG (núcleo pré-geniculado) e GLD (núcleo geniculato lateral dorsal). Barras 300 μ m.

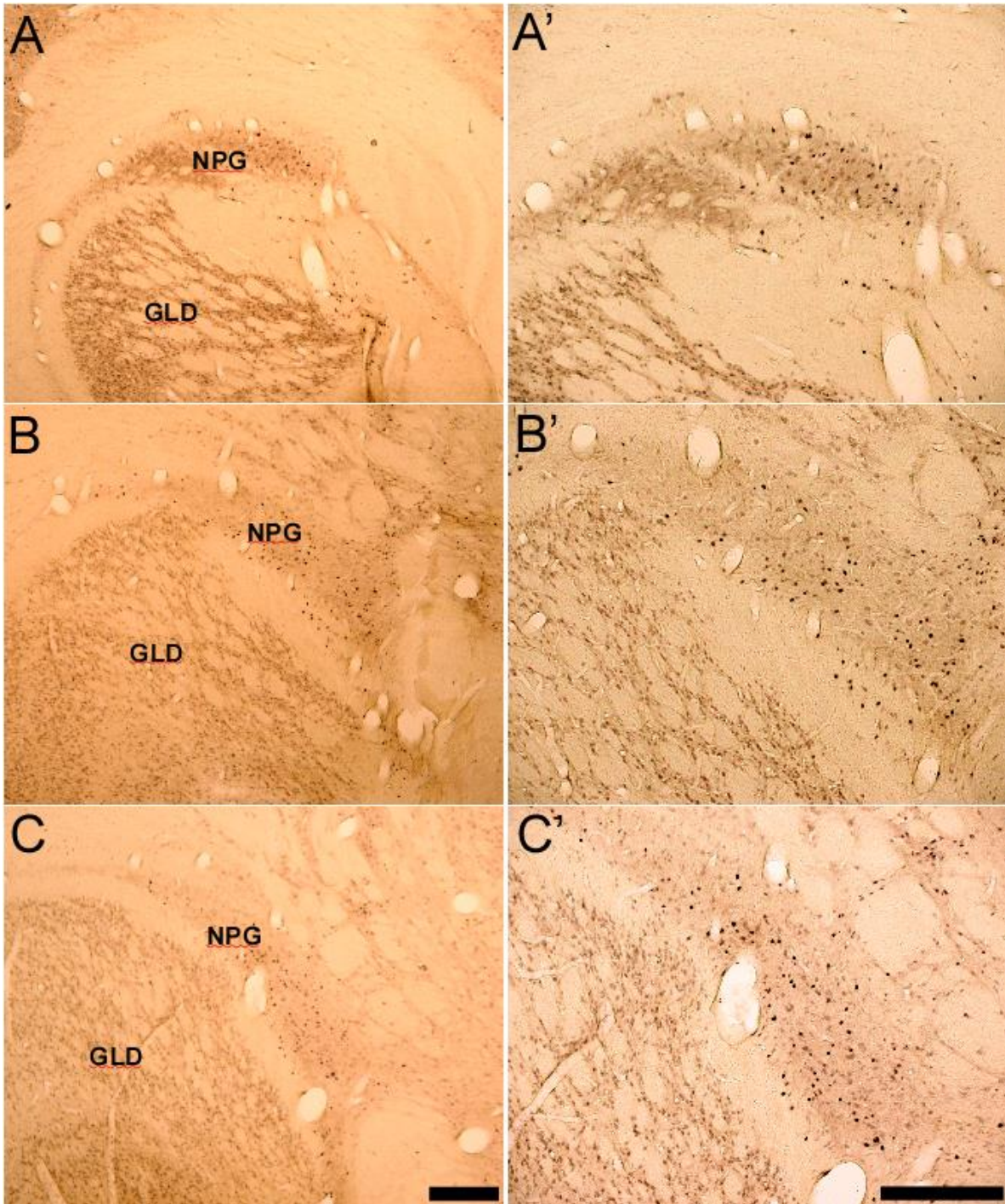


Figura 10. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui (animal 2) em níveis rostral (A), médio (B) e caudal (C), mostrando neurônios imunorreativos para FOS após aplicação de um pulso de escuro de 1h na HC4. (A'-C') Respectivas imagens em maior aumento. NPG (núcleo pré-geniculado) e GLD (núcleo geniculado lateral dorsal). Barras 300 μ m.

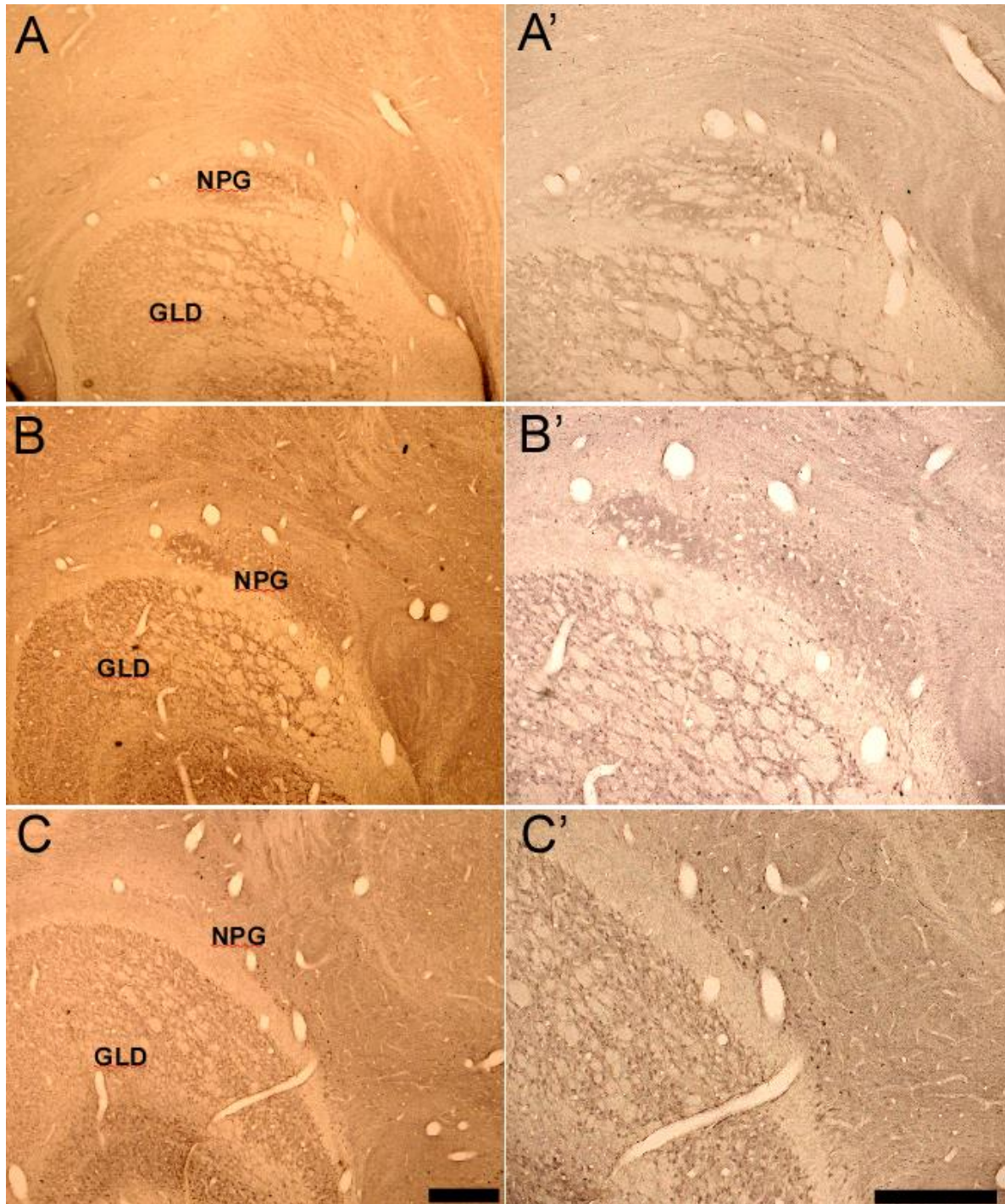


Figura 11. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui (animal 3) em níveis rostral (A), médio (B) e caudal (C), mostrando neurônios imunorreativos para FOS após aplicação de um pulso de escuro de 1h na HC4. (A'-C') Respectivas imagens em maior aumento. NPG (núcleo pré-geniculado) e GLD (núcleo geniculado lateral dorsal). Barras 300 μ m.

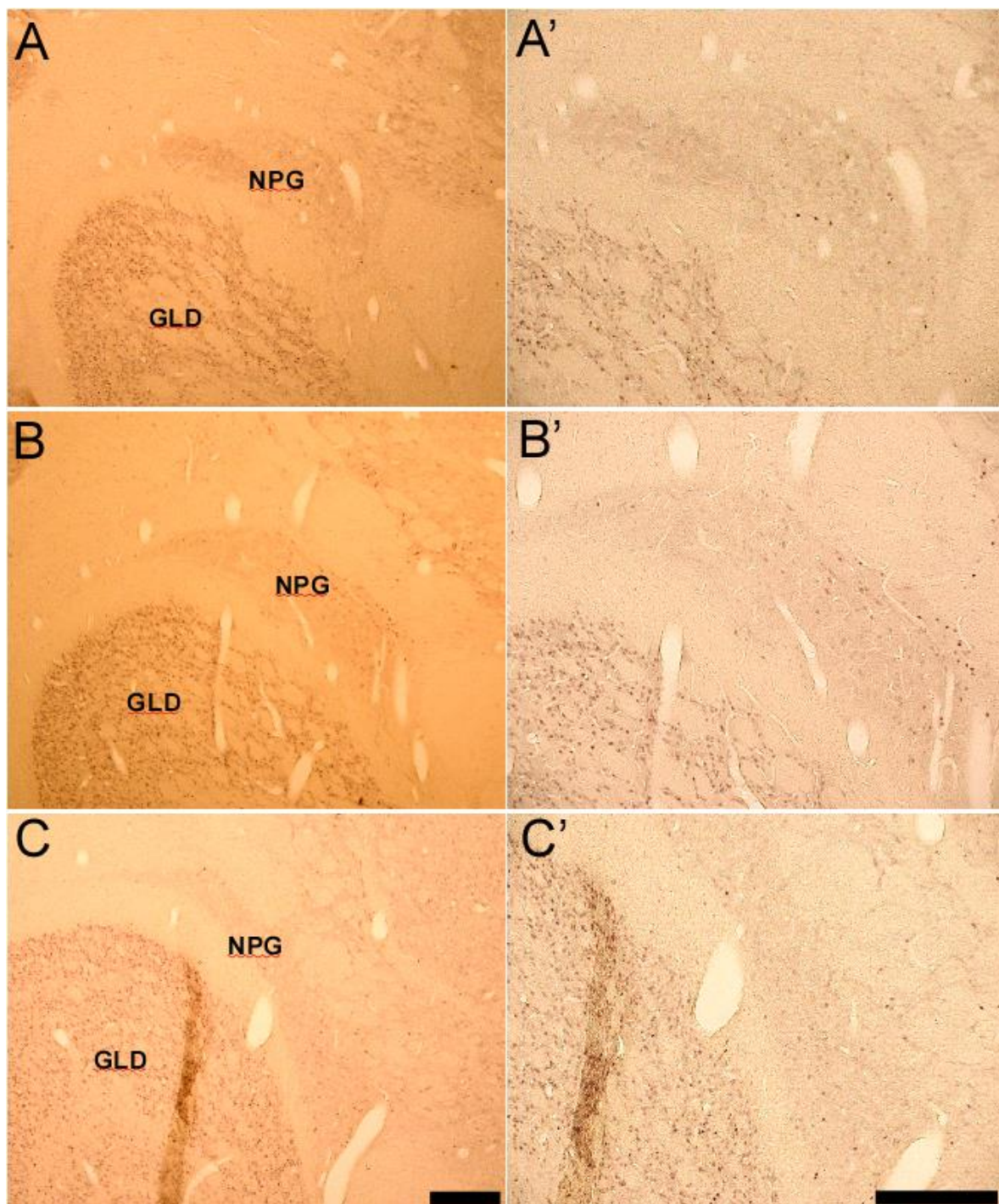


Figura 12. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui (animal 4) em níveis rostral (A), médio (B) e caudal (C), mostrando imunorreatividade para FOS na HC4 no grupo controle. (A'-C') Respectivas imagens em maior aumento. NPG (núcleo pré-geniculado) e GLD (núcleo geniculado lateral dorsal). Barras 300 μ m.

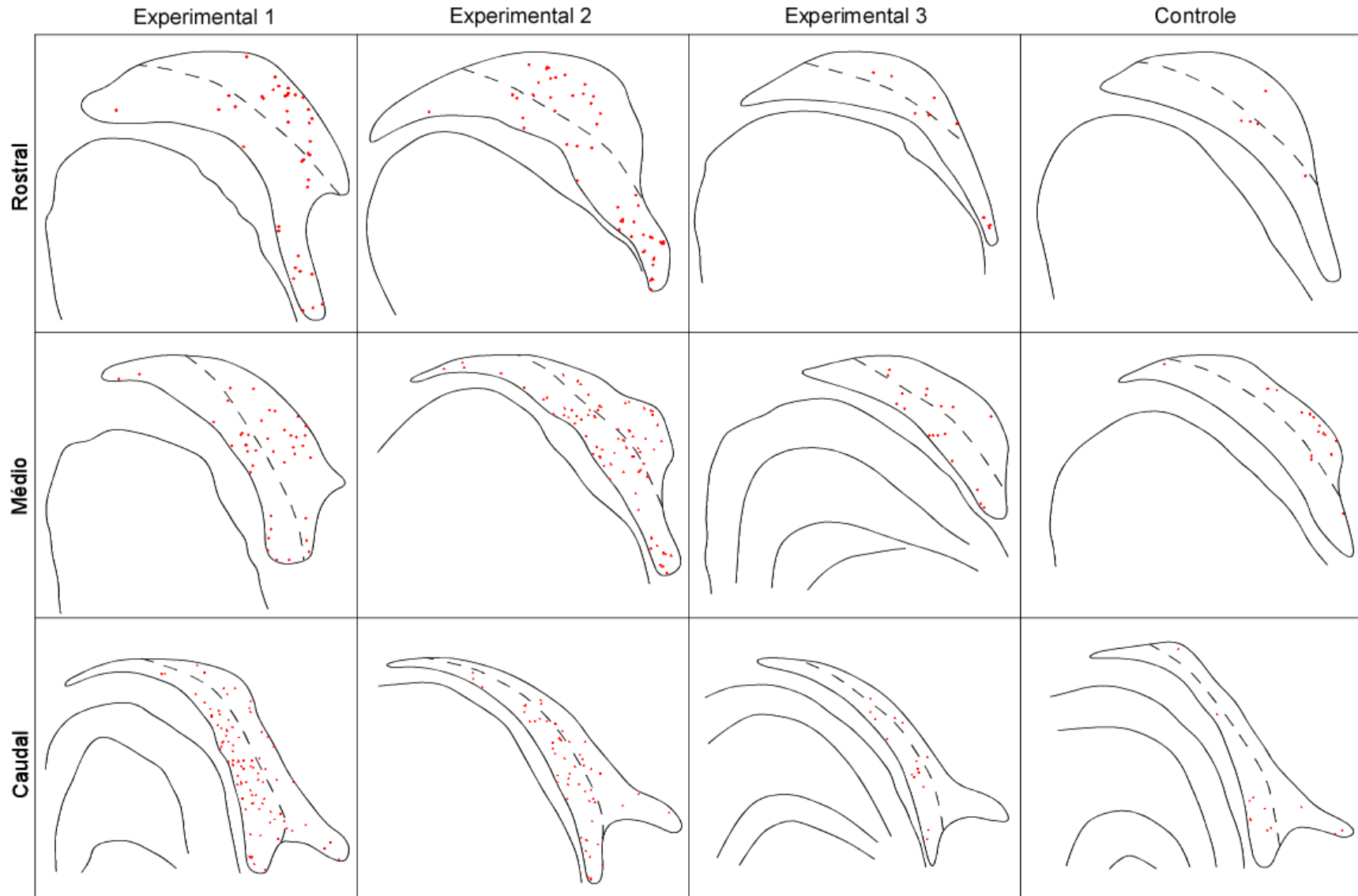


Figura 13. Esquemas comparativos da expressão de FOS no NPG entre os animais experimentais e controle após pulso de escuro de 1h aplicado na HC4. Cada ponto vermelho representa um neurônio marcado.

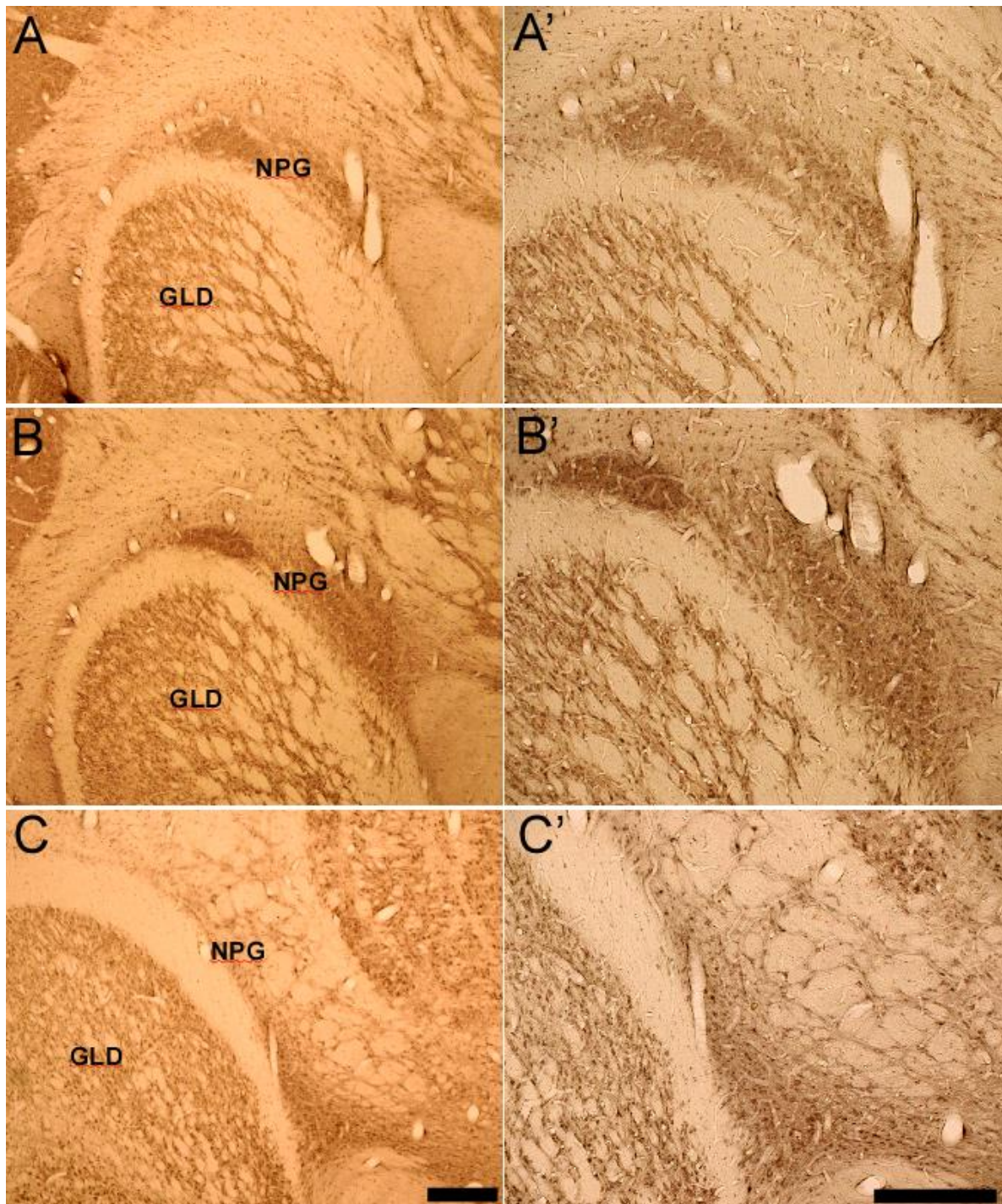


Figura 14. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui (animal 5) em níveis rostral (A), médio (B) e caudal (C), mostrando neurônios imunorreativos para FOS após aplicação de um pulso de escuro de 1h na HC18. (A'-C') Respective imagens em maior aumento. NPG (núcleo pré-geniculado) e GLD (núcleo geniculado lateral dorsal). Barras 300 μ m.

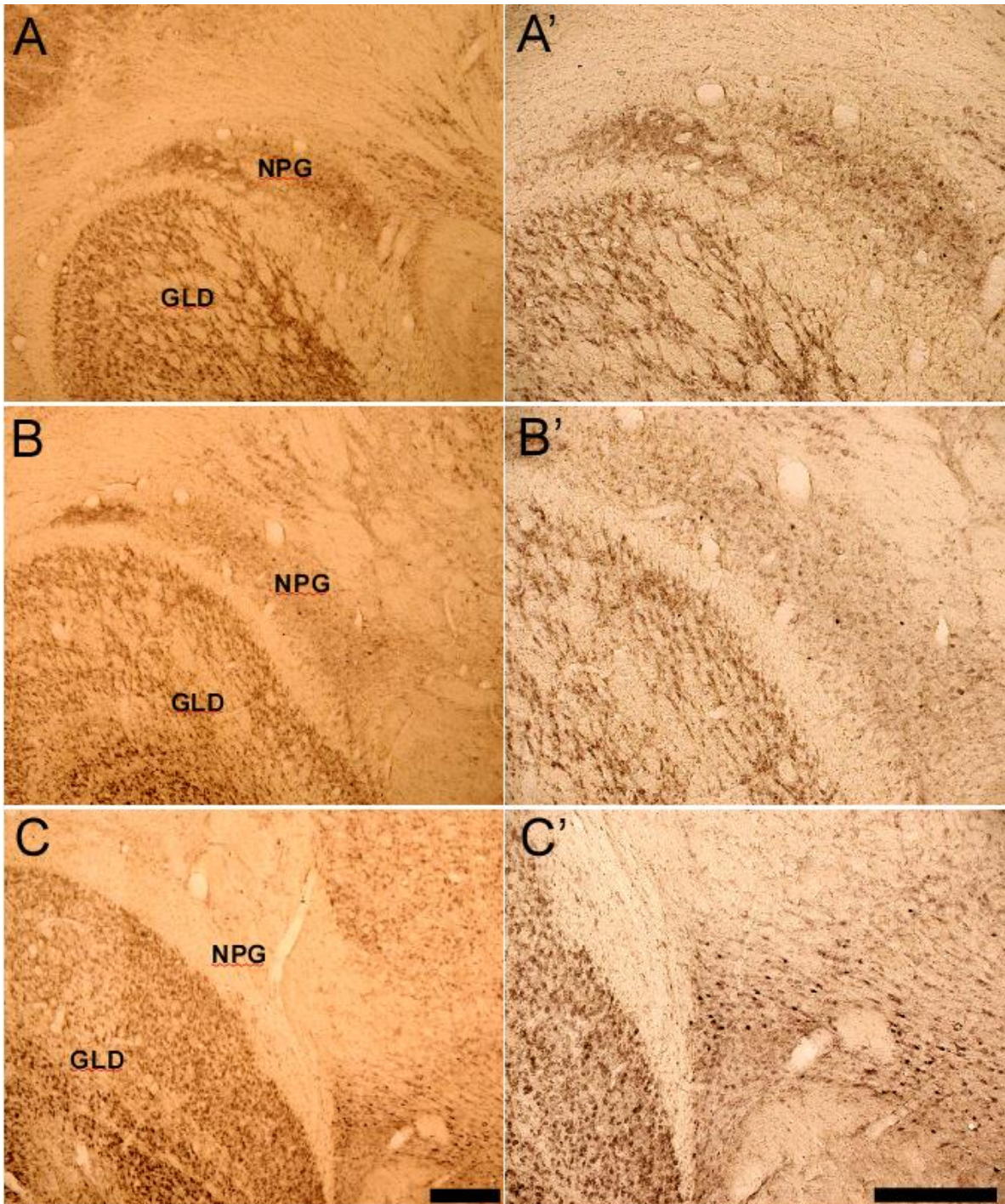


Figura 15. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui (animal 6) em níveis rostral (A), médio (B) e caudal (C), mostrando neurônios imunorreativos para FOS após aplicação de um pulso de escuro de 1h na HC18. (A'-C') Respectivas imagens em maior aumento. NPG (núcleo pré-geniculado) e GLD (núcleo geniculado lateral dorsal). Barras 300 μ m.

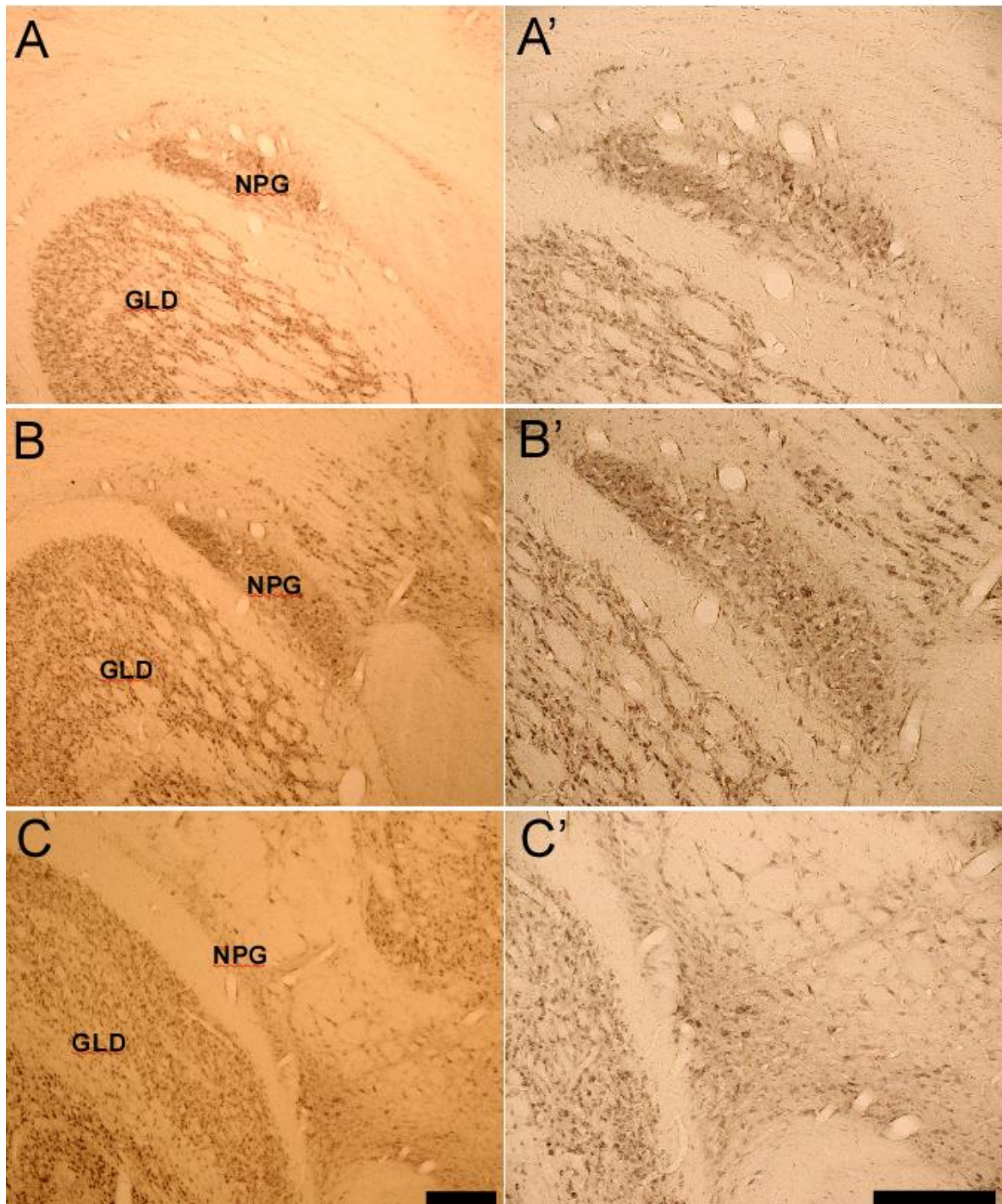


Figura 16. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui (animal 7) em níveis rostral (A), médio (B) e caudal (C), mostrando imunorreatividade para FOS na HC18 no grupo controle. (A'-C') Respectivas imagens em maior aumento. NPG (núcleo pré-geniculado) e GLD (núcleo geniculado lateral dorsal). Barras 300 μ m.

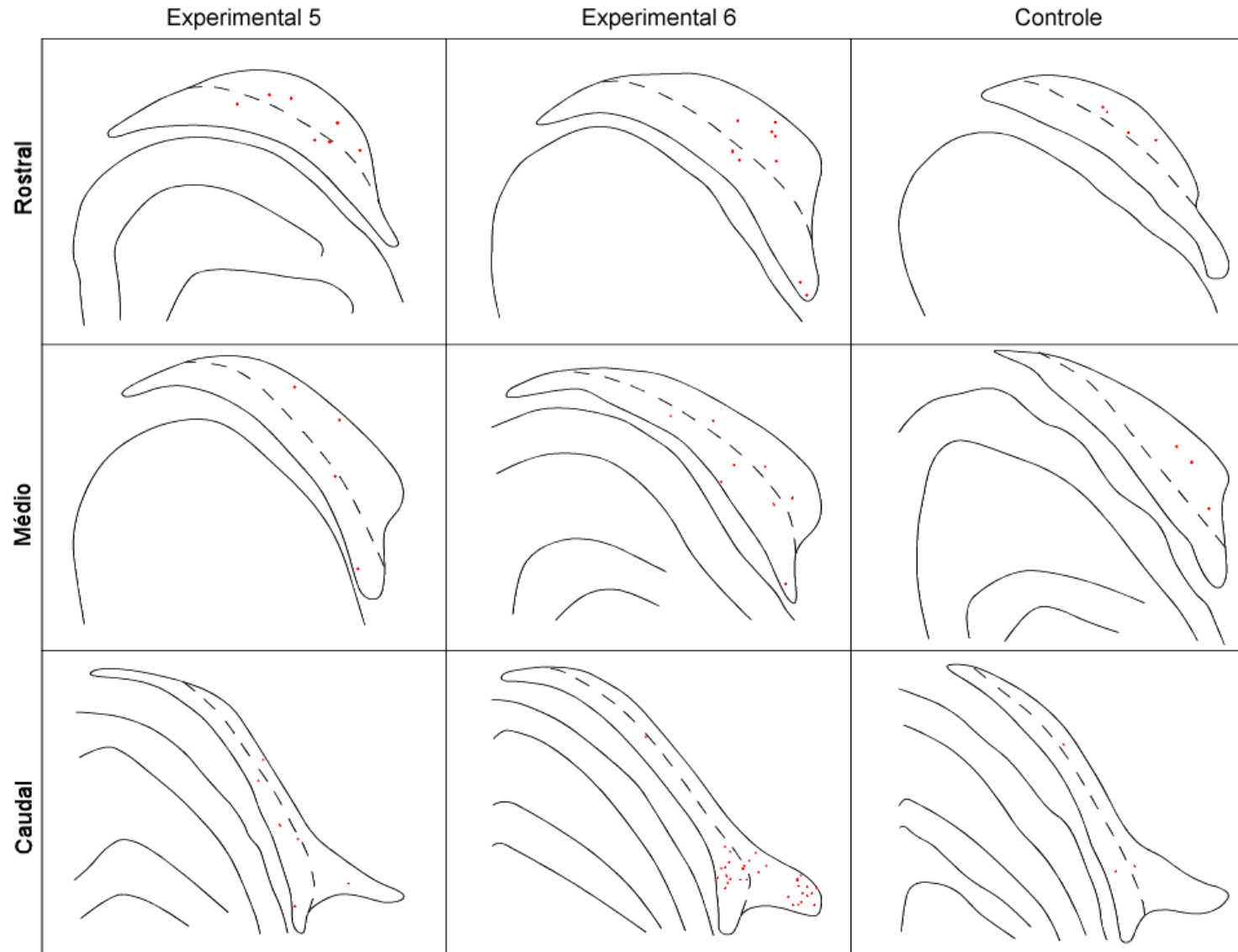


Figura 17. Esquemas comparativos da expressão de FOS no NPG entre os animais experimentais e controle após pulso de escuro de 1h aplicado na HC18. Cada ponto vermelho representa um neurônio marcado.

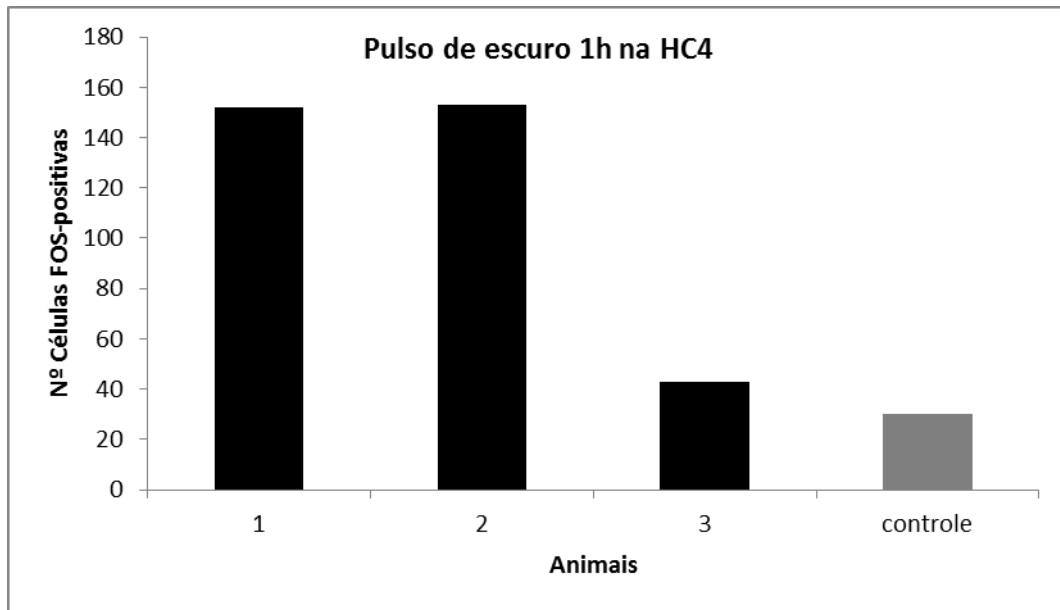


Figura 18. Gráfico descritivo da expressão de FOS no NPG do sagui entre os grupos experimental (1-3) e controle, após 1h de pulso de escuro na HC4.

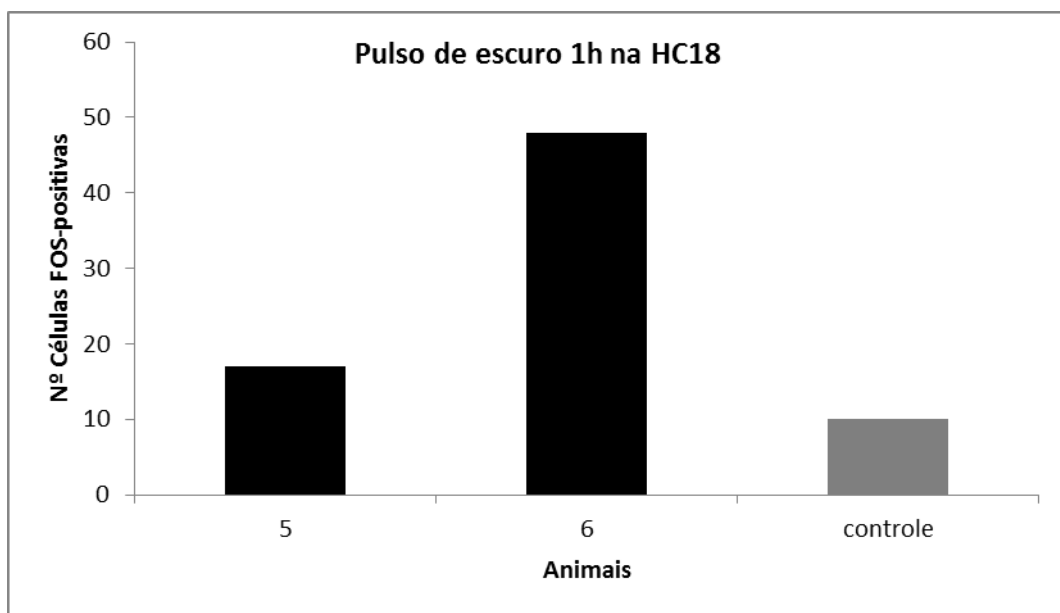


Figura 19. Gráfico descritivo da expressão de FOS no NPG do sagui entre os grupos experimental (5 e 6) e controle, após 1h de pulso de escuro na HC18.

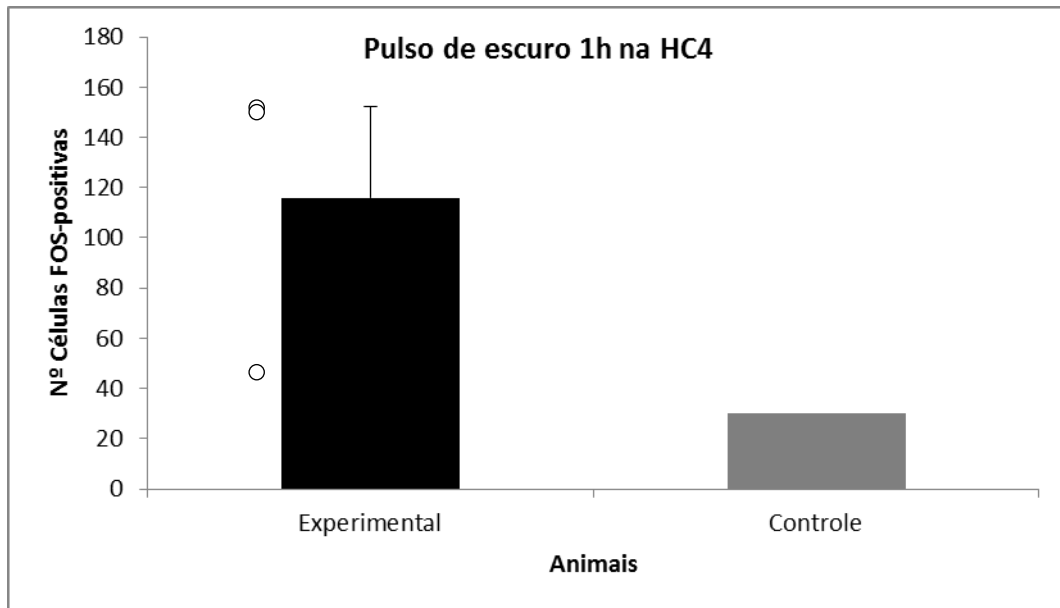


Figura 20. Média e erro padrão (barra) da expressão de FOS no NPG do sagui entre os grupos experimental e controle, após 1h de pulso de escuro na HC4. Círculos indicam os valores da série.

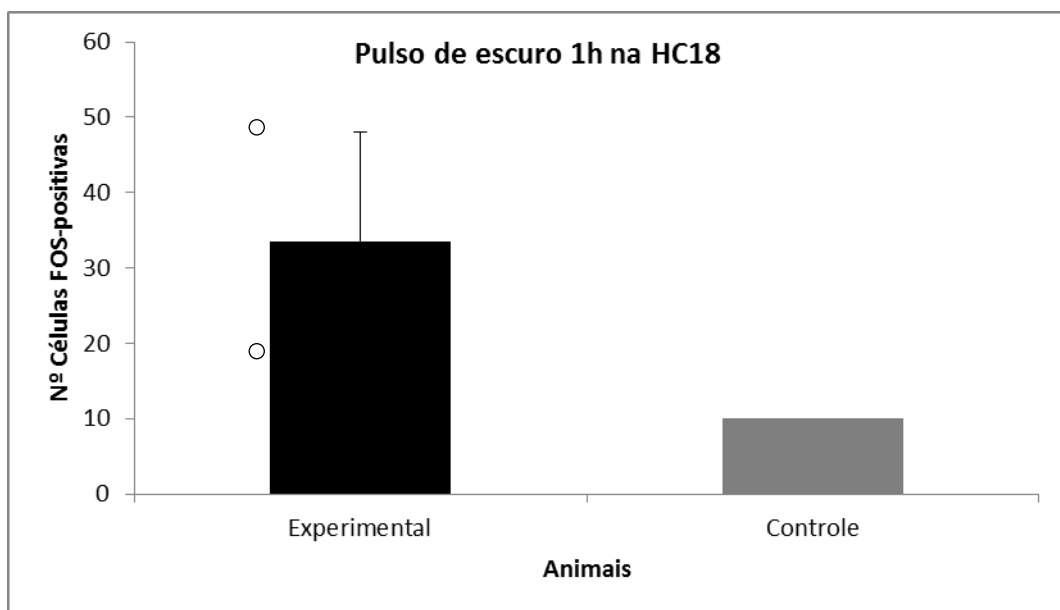


Figura 21. Média e erro padrão (barra) da expressão de FOS no NPG do sagui entre os grupos experimental e controle, após 1h de pulso de escuro na HC18. Círculos indicam os valores da série.

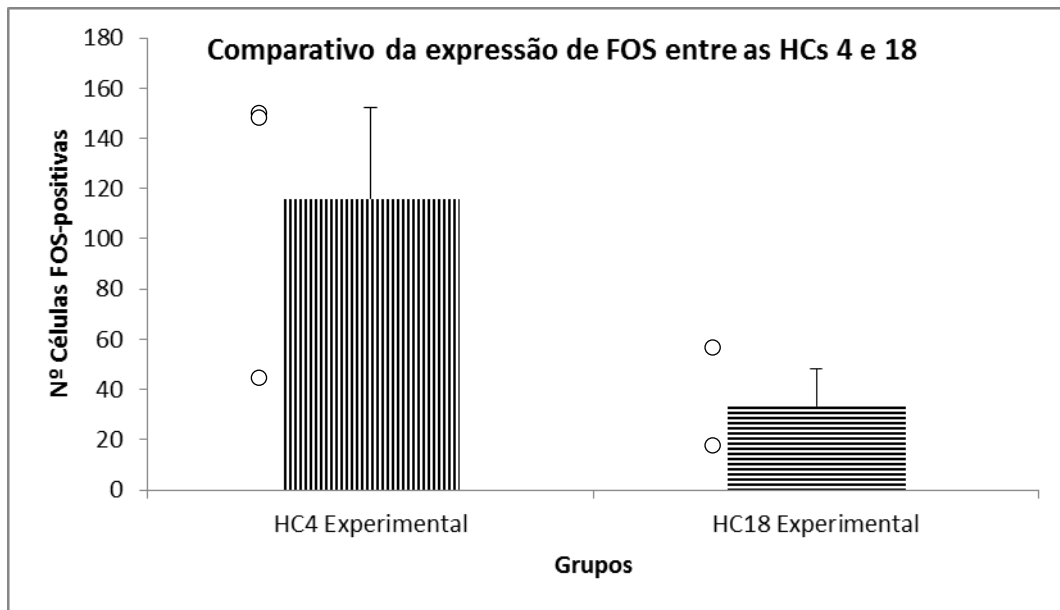


Figura 22. Média e erro padrão (barras) da expressão de FOS no NPG do sagui entre os grupos experimentais, após 1h de pulso de escuro. Círculos indicam os valores da série.

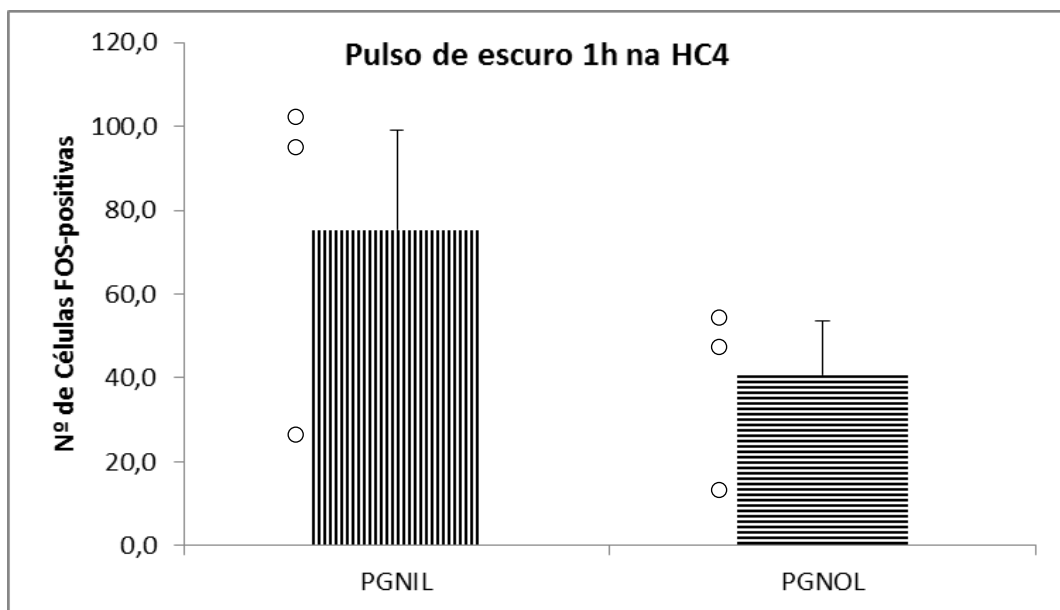


Figura 23. Média e erro padrão (barras) da expressão de FOS entre as lâminas do NPG dos saguis da HC4 experimentais. Círculos indicam os valores da série.

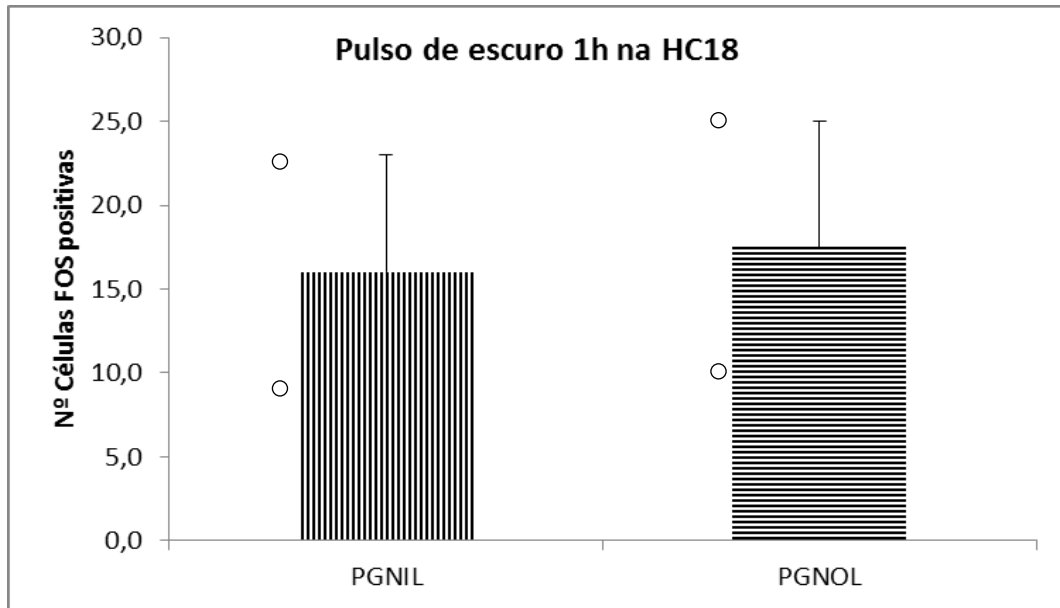


Figura 24. Média e erro padrão (barras) da expressão de FOS entre as lâminas do NPG dos saguis da HC18 experimentais. Circulos indicam os valores da série.

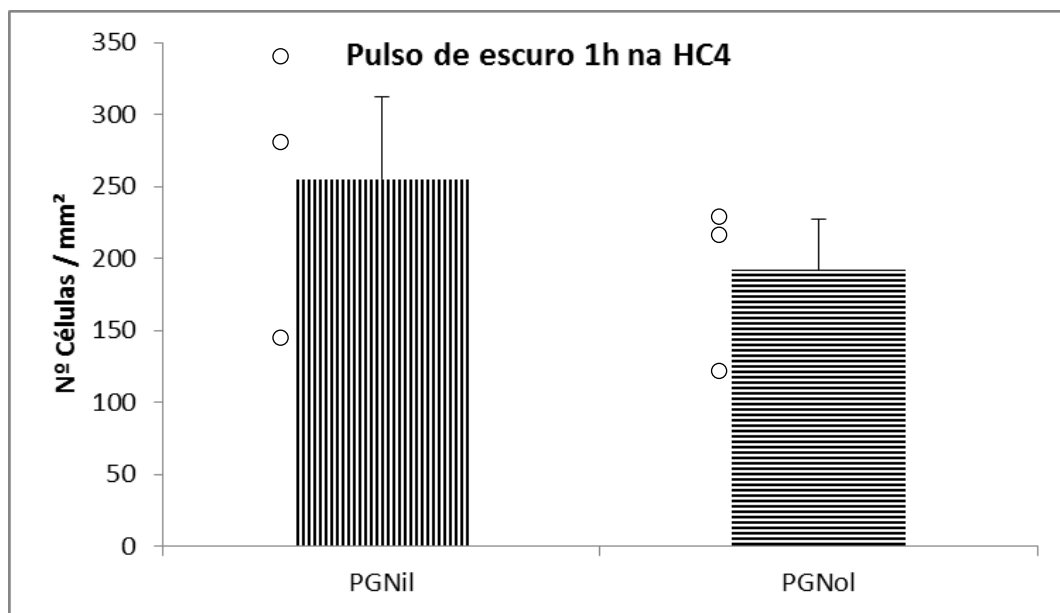


Figura 25. Densidade de células FOS-positivas no NPG após pulso de escuro de 1h na HC4. O número total de células do NPG foi dividido pela soma das áreas das secções transversas de cada nível (rostral, médio e caudal). PGNil (lâmina interna do NPG) e PGNol (lâmina externa do NPG). Circulos indicam os valores da série.

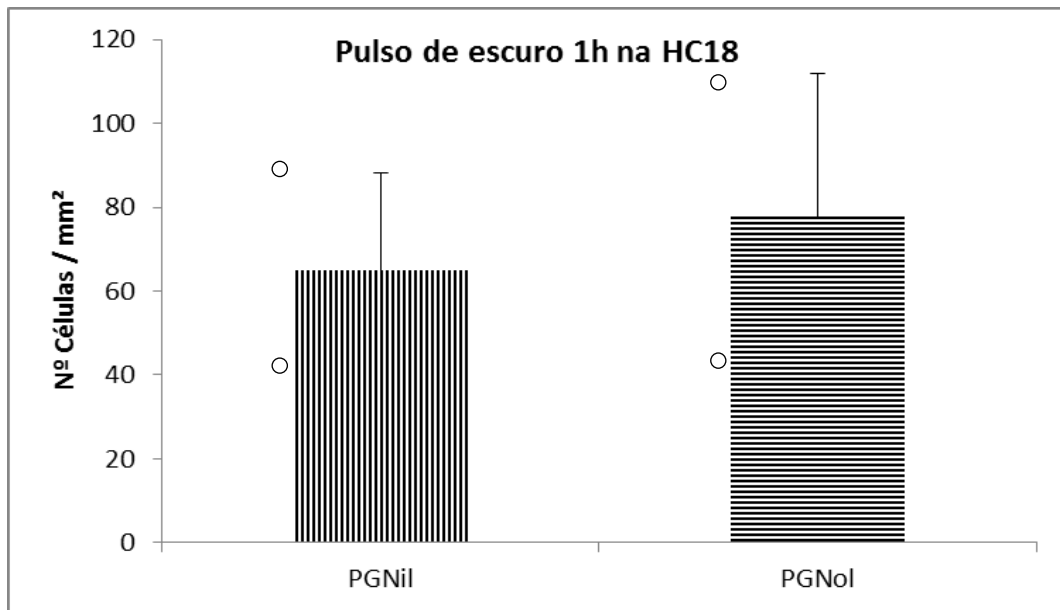


Figura 26. Densidade de células FOS-positivas no NPG após pulso de escuro de 1h na HC18. O número total de células do NPG foi dividido pela soma das áreas das secções transversas de cada nível (rostral, médio e caudal). PGNil (lâmina interna do NPG) e PGNoI (lâmina externa do NPG). Círculos indicam os valores da série.

6. DISCUSSÃO

A aplicação de pulsos de escuro para avaliar a expressão de FOS no FIG de roedores ou NPG de primatas não foi abordada na literatura até o momento. Identificamos uma maior expressão de FOS no NPG dos animais do grupo experimental e, assim, sugerimos que este núcleo participa de funções relacionadas à ritmicidade circadiana. Características de citoarquitetura, neuroquímicas e o padrão de projeções retinianas levam a crer numa sub-especialização dentro do NPG do sagui, o qual possui uma lâmina interna (NPGli) correspondente ao FIG e uma externa (NPGle) equivalente ao GLV (Lima et al., 2012). Mostramos que a NPGli apresentou um maior número de células FOS-positivas após o pulso de escuro e esse dado corrobora com a ideia da referida homologia. Independente da natureza do pulso de escuro, sabemos que estímulos fóticos e não-fóticos são capazes de induzir a expressão de FOS no FIG de roedores (Mikkelsen et al., 1998). O perfil da expressão de FOS após estímulos não-fóticos no complexo geniculado lateral de hamsteres (Janik et al., 1995) e ratos (Peters et al., 1996; Beaulé e Amir, 1999) mostra quase que exclusivamente neurônios marcados no FIG em comparação ao GLD e GLV. No entanto, outros estímulos não-fóticos como roda de atividade (Janik e Mrosovsky, 1992); mudança de ambiente, injeção intraperitoneal de solução salina e restrição física (Edelstein e Amir, 1995); injeção de benzodiazepínicos (Janik e Mrosovsky, 1994); e estimulação elétrica (Rusak et al., 1989) são os mais comumente utilizados e verifica-se que são capazes de induzir a expressão de FOS no FIG desses roedores.

Estímulo de roda de atividade induz aumento da expressão de FOS no FIG de hamsteres, cujos picos de expressão se encontram nas HC4 e HC22, sem diferenças entre as fases, e na HC12 não se observa mudança significativa (Janik e Mrosovsky, 1992; Janik et al., 1995). Edelstein e Amir (1995) mostraram que estímulos de mudança de ambiente e restrição física aumentam a expressão de FOS no FIG de ratos e é mais evidente no ZT4 do que no ZT16. Nesse ínterim, se os estímulos não-fóticos são fase-específicos é uma questão que precisa ser melhor explorada. Sabe-se que os pulsos de luz induzem a expressão de FOS no FIG de ratos em fases circadianas que diferem daquelas onde a luz pode promover o “resetting” do NSQ (Park et al., 1993; Peters et al., 1996). Ao contrário do FIG, a expressão de FOS no NSQ de hamsteres é

diminuída quando se estimula sua atividade motora (roda de atividade) em uma fase onde o mesmo estaria em repouso (Janik e Mrosovsk, 1992). Alguns autores sugerem que as mudanças de fase provocadas por roda de atividade envolve a participação do FIG, sendo possível que a inibição de FOS no NSQ seja via TGH (Biello et al., 1994; Biello e Mrosovsky, 1996; Janik et al., 1995; Mrosovsky, 1995).

Neurônios do FIG recebem informação fótica da retina, provenientes de células ganglionares que bifurcam seus axônios, em que o outro ramo se projeta para a porção ventrolateral do NSQ, formando o TRH (Pickard, 1985). Pulsos de luz induzem a expressão de FOS no FIG, no entanto, na maior parte dos neurônios, essa proteína não está co-localizada com NPY (Janik et al., 1995). Pulsos de luz elevam significativamente o nível de NPY no NSQ na HC0 e os pulsos de escuro na HC12, sugerindo que o FIG é importante na retransmissão de informações nas fases de transição do ciclo claro-escuro (Shinohara et al., 1993). Os pulsos de luz induzem a expressão de FOS no FIG em fase circadianas onde tal expressão no NSQ não é verificada. Portanto, é possível que mecanismos diferentes regulem a expressão de FOS nesses núcleos (Edelstein e Amir, 1996). A administração sistêmica de MK-801 (antagonista NMDA) reduz a expressão de FOS no NSQ de ratos, mas não tem efeito sobre o FIG (Edelstein e Amir, 1996). Os efeitos do pulso de luz podem ser bloqueados usando-se oligonucleotídeos complementares (antisense) para *c-fos* e *junB*, sugerindo que FOS participa dos mecanismos moleculares do reset do NSQ (Wollnik et al., 1994).

A injeção de NPY no interior do NSQ produz avanços de fase durante o dia subjetivo e atrasos durante a noite subjetiva (Alber e Ferris, 1984). Portanto, a CRF para o NPY se assemelha a uma CRF não-fótica (Mrosovsky et al., 1992). Treep et al. (1995) encontraram que a estimulação elétrica do FIG incrementa a expressão de FOS no NSQ de hamsters, mas esse resultado foi atribuído a uma estimulação antidrômica de células ganglionares da retina, as quais bifurcam seus axônios para o NSQ dorsal e o FIG. Quando foi realizada a enucleação desses animais o aumento da expressão de FOS não foi evidente após a estimulação elétrica do FIG. No nosso estudo, escolhemos apenas dois pontos durante o livre-curso dos animais para aplicar os pulsos de escuro, o que não permitiu traçar um perfil circadiano da expressão de FOS no NPG para esse estímulo, mas, de outro modo, identificamos uma maior expressão

de FOS quando estes foram aplicados durante o dia subjetivo. Sugerimos, portanto, que o pulso de escuro pode agir por um mecanismo fótico via TRH, uma vez que os estímulos não-fóticos não são fase-específicos, ao contrário dos pulsos de luz. Apesar de termos verificado uma maior expressão de FOS nos grupos experimentais e durante o dia subjetivo, o baixo tamanho da amostra não nos permitiu averiguar se a diferença encontrada entre os grupos é estatisticamente significativa.

A CRF para o escuro tem sido descrita em diversas espécies de mamíferos, tanto de hábitos noturnos como diurnos. Em *Hamsteres* (noturno) (Boulos e Rusak, 1982a; Ellis et al., 1982) e *Octodon degus* (diurno) (Lee e Labyak, 1997) podem ser observadas algumas diferenças na CRF para o escuro. Ambos, hamsteres e *degus*, apresentam atraso de fase entre as HC18 e 20, sendo o atraso de fase mais prolongado nesse último. O *degus* apresenta um avanço de fase bastante expressivo entre as HC10 e 17, mas nos hamsteres esses avanços se encontram entre as HC3 e 10, período no qual o *Octodon degus* apresenta significativos atrasos de fase. Estudos realizados em esquilos (Hut et al., 1999) e saguis (Ney et al., 1998), ambos animais diurnos, o estímulo de roda de atividade e mudança de ambiente, respectivamente, revelam algumas diferenças na CRF não-fótica. No sagui, a CRF demonstra avanços de fase no fim da noite e início do dia subjetivo, já no esquilo os avanços de fase se encontram no fim do dia subjetivo. No mamífero diurno *Tupaia belangeri*, nenhuma resposta é observada após 3 horas de pulso de escuro (Meijer et al., 1990). No sagui, pulsos de escuro promovem avanço de fase quando aplicados durante o dia subjetivo e início da noite subjetiva e atraso de fase no fim da noite subjetiva (Lima, 2008; Silva, 2007). Sabe-se que o significado ecológico do escuro é diferente para espécies diurnas e noturnas. No entanto, a grande variação de respostas a esses estímulos ambientais entre as espécies pode refletir diferenças nos seus mecanismos fisiológicos acerca do sistema circadiano. A relação de fase entre as pistas ambientais e o relógio circadiano podem apresentar significados inversos entre essas espécies, ou seja, nos mecanismos celulares e moleculares desencadeados por cada um desses estímulos (Rosenwasser e Dwyer, 2001).

Roedores diurnos e noturnos diferem em sua resposta a pulsos de luz e escuro. No entanto, ambos os tipos de roedores produzem respostas robustas para intensos e curtos pulsos de luz e longos pulsos de escuro (Lee e Labyak, 1997), embora já tenha

sido demonstrado significativas mudanças de fase com pulsos de escuro de 15 minutos (Rosenwasser e Dwyer, 2002). As diferenças nas CRF são atribuídas às variações de protocolos nos parâmetros dos estímulos e sua relação com a diurnidade ou noturnidade é difícil de estabelecer (Lee e Labyak, 1997; Hut et al., 1999). As vias neurais as quais os estímulos fóticos e não-fóticos alcançam o NSQ também é importante. Em uma mesma espécie, animais com períodos semelhantes podem produzir respostas muito diferentes aos pulsos de luz e ao escuro (Lee e Labyak, 1997).

As vias neurais responsáveis pela indução de *c-fos* no FIG após estímulos não-fóticos não são bem compreendidas (Mikkelsen et al., 1998). No entanto, sabe-se que o FIG recebe aferências serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (DR) (Azmita e Segal, 1978), noradrenérgicas do locus coeruleus (Legoratti-Sanchez et al., 1989) e colinérgicas do prosencéfalo basal e tegmento mesopontino (Bina et al., 1993). Experimentos que alteram o estado de alerta do animal, como os estímulos não-fóticos, podem ativar esses grupamentos neuronais (Jacobs et al., 2000; Jones, 1991; Semba, 1991). Por exemplo, o DR está envolvido no controle do ciclo sono-vigília e envia eferências para o FIG (Meyer-Bernstein e Morin, 1996). A estimulação elétrica do DR é capaz de reduzir a expressão de FOS no NSQ após pulsos de luz (Meyer-Bernstein e Morin, 1999), do mesmo modo que a estimulação elétrica do FIG (Rusak et al., 1989). O efeito da estimulação elétrica do DR sobre a expressão de FOS no FIG após estímulos fóticos e não-fóticos ainda não foi descrito. Entretanto, a injeção de 8-OH-DPAT (agonista serotoninérgico dos receptores 5HT_{1A,7}) diretamente FIG não é capaz modificar a fase do ritmo circadiano, sugerindo que a ação do DR segue outra via neural (Mintz et al., 1997). De outro modo, foi demonstrado que neurônios serotoninérgicos do DR exercem ação inibitória nas células do FIG, modulando a liberação de glutamato do TRH agindo no receptor 5HT_{1B} (Pickard et al., 1999; Blasiak et al., 2006). No sagui foi identificada uma densa concentração de fibras e terminais imunorreativos a serotonina em todo o NPG (Lima et al., 2012).

A lesão do FIG de hamsteres inibe as mudanças de fase provocadas por estímulos não-fóticos, como roda de atividade e injeção de benzodiazepínicos (Janik e Mrosovsky, 1994). As mudanças de fase provocadas por pulsos de escuro em hamsteres são menos afetadas nesses casos (Harrington e Rusak, 1988), sugerindo que

os efeitos do pulso de escuro no NSQ podem ser mediados diretamente pelas projeções retinianas (Dwyer e Rosenwasser, 2002). Em roedores, vias neurais provenientes da rafe mesencefálica (serotoninérgica) e área pré-tectal (colinérgica) inibem a expressão de FOS no NSQ e sua ativação está relacionada ao aumento de atividade locomotora após estímulos não-fóticos (Dibner et al., 2010). No sagui, não foi verificado incremento na atividade locomotora após pulsos de escuro (Lima, 2008), sugerindo que a via de entrada para expressão de FOS no NPG possa ser pelo TRH, por se tratar de um animal diurno em que o escuro não representa um estímulo motivador de atividade locomotora. É sabido que células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs), contendo o fotorpigmento melanopsina, principalmente as do tipo M1, projetam massivamente para o NSQ e FIG (Ketema et al., 2009). As ipRGCs exibem adaptação à luz e ao escuro e fazem sinapse na camada plexiforme interna com células bipolares e amácrinas, sugerindo que os cones e bastonetes podem ser capazes de modular a resposta luminosa (Belenky et al., 2003). A expressão de *c-fos* em camundongos knockout para melanopsina é cerca de 40% menor em relação ao grupo selvagem após pulsos de luz, indicando que as células ganglionares contendo melanopsina não são essenciais para os estímulos fóticos, mas que contribuem significativamente para magnitude das respostas (Ruby et al., 2002). A luz e o escuro podem ser sinalizados por cones e bastonetes às ipRGCs através das vias ON ou OFF. A via ON é ativada na transição escuro-claro, enquanto a via OFF na transição claro-escuro (Wong et al., 2007). Altimus et al. (2008), usando camundongos mutantes para as opsinas das ipRGCs e dos cones e bastonetes, demonstraram que o efeito dos pulsos de luz e de escuro são inefetivos para estimular o sono e a vigília, respectivamente, indicando que as vias de ambos cones e bastonetes e melanopsina são necessárias para modular os efeitos da luz e escuro no estado de alerta do animal (sono).

Um dos aspectos mais peculiares na resposta do FIG aos estímulos não-fóticos é uma alta co-localização de neurônios NPY-positivos que expressam FOS. Essas células parecem estar mais envolvidas na transmissão desse tipo de estímulo do que propriamente aos pulsos de luz (Janik et al., 1995). A ausência de trabalhos mostrando a expressão de FOS após pulsos de escuro no FIG restringe demasiadamente nossa capacidade de discutir sobre a natureza e o efeito desse estímulo. O uso de técnicas de dupla marcação imunohistoquímica contra NPY e FOS é crucial na determinação

dessas questões, bem como o papel funcional do NPG no sistema circadiano, uma vez que essas células compõem o TGH de roedores (Harrington et al., 1987) e respondem preferencialmente a estímulos não-fóticos (Janik et al., 1995). Especula-se a existência de um TGH em primatas não humanos, mas sua presença ainda não foi demonstrada (Moore, 1989). Um grande número de células imunorreativas a FOS foi identificada em uma área (NPGli) que apresenta uma alta imunorreatividade para NPY (Lima et al., 2012). Assim, julgamos plausível que exista uma co-localização dessas substâncias nos neurônios do NPG do sagui.

O gene de expressão imediata (IEG) *c-fos* codifica uma subunidade ativadora de transcrição da proteína 1 (AP-1) (Greenberg e Ziff, 1984; Muller et al., 1983). A proteína FOS forma heterodímeros com a família de proteínas Jun, (c-Jun, JunB, JunD) e estas se ligam ao AP-1, encontrado em regiões promotoras de muitos genes celulares (Chiu et al., 1988; Halazonetis et al., 1988). A expressão de *c-fos* pode ser rapidamente mobilizada por uma variedade de estímulos incluindo um análogo do glutamato, ácido caínico (KA) (Ferkany et al., 1984; Smeyne et al., 1992). Camundongos mutantes para *c-fos* (*c-fos^{f/f}CaMKIIacre*) apresentam hiperexcitabilidade, hipercitotoxicidade e maior mortalidade em resposta à administração de KA em comparação aos selvagens (Jin et al., 2002; Zhang et al., 2002), indicando que o *c-fos* é um regulador da excitabilidade neuronal e sobrevivência. O NPY é hiper-regulado após a administração de KA em camundongos normais e em mutantes *c-fos* sua expressão é reduzida (Wu et al., 2004). Como já comentado, os sinais fóticos convergem ao NSQ via TRH (glutamato) e TGH (GABA, ENK e NPY) e os não-fóticos, ligados ao estado comportamental do animal, parecem ser mediados pelos núcleos da rafe serotoninérgicos (mediano e dorsal da rafe) e FIG, também via TGH (Dibner et al., 2010).

É concebível que a diminuição na expressão de FOS observada após estímulos não-fóticos no NSQ seja mediada por fatores transcricionais inibitórios agindo na região promotora de *c-fos* (Foulkes e Sassone-Corsi, 1992). Um possível gene codificador desse fator é o CREM (modulador do elemento de resposta ao monofosfato cíclico de adenosina), o qual tem sido demonstrado codificar fatores transcricionais ativadores e inibidores por splicing alternativo (Foulkes e Sassone-Corsi, 1992). Um dos fatores inibidores codificados por CREM é o ICER (repressor

precoce do monofosfato cíclico de adenosina), o qual é expresso em altos níveis durante a noite na glândula pineal e está envolvido na síntese de melatonina (Molina et al., 1993; Stehle et al., 1993).

Os principais trabalhos de revisão sobre o sistema de temporização circadiana apontam para a importância de neurônios NPY-positivos do FIG na transmissão de estímulos não-fóticos para o NSQ (Dibner et al., 2010; Golombek e Rosenstein, 2010; Morin, 2013). Como já vimos, esses neurônios foram encontrados no NPG de algumas espécies de primatas (Moore, 1989; Pinato et al., 2009; Lima et al., 2012). Estudos com outros núcleos encefálicos de roedores trazem evidências de que o NPY pode ser regulado por FOS (Viñuela e Larsen, 2001; Wu et al., 2004) e a expressão de *c-fos* modulada por NPY (Intodi et al., 2008; Tsai et al., 2009). Por exemplo, a injeção intraperitoneal de KA induz a expressão de FOS em neurônios do hipocampo e essa expressão aumenta a produção NPY, a qual atinge seu pico após 8 horas (Smeyne et al., 1992; Sonnenberg et al., 1989). A injeção cerebral intraventricular de NPY induz a expressão de FOS na divisão medial do núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos (Bai-Han et al., 1994). A estimulação elétrica do nervo mediano de ratos induz a liberação de NPY, o qual estimula a expressão de FOS no núcleo cuneiforme (Tsai et al., 2009).

Diferentes neurotransmissores podem ativar a expressão de *c-fos*, principalmente os grupamentos catecolaminérgicos e glutamatérgicos (Herrera e Robertson, 1996). Por exemplo, um antagonista glutamatérgico, o MK-801, atenua a expressão de FOS na porção rostral e ventrolateral do NSQ de hamsteres (Abe et al., 1991; 1992). A mecamilamina, um antagonista colinérgico, bloqueia a expressão de FOS no NSQ de hamsteres após pulsos de luz (Zhang et al., 1993). A administração de L-DOPA (precursor da dopamina) induz altos níveis de FOS nos núcleos estriados, accumbens e áreas do neocórtex de ratos (Robertson et al., 1989). Cocaína e amfetamina (substâncias simpaticomiméticas) são capazes de induzir a expressão de FOS nos núcleos caudado e putamen de ratos e esse efeito é bloqueado quando usado um antagonista do D1 (receptor 1 de dopamina) (Graybiel et al., 1990). A administração de ioimbina (agonista adrenérgico do receptor α_2) incrementa a expressão de FOS no *locus coeruleus*, núcleo central da amígdala, núcleo da estria terminal, bulbo ventrolateral, núcleo do trato solitário e paraventricular do hipotálamo

de ratos (Gubits et al., 1989; Tsujino et al., 1992), sendo sua expressão parcialmente inibida pela prazosina (bloqueador adrenérgico) (Tsujino et al., 1992). A administração de morfina (agonista opioide, age em receptores de encefalina e endorfina) induzem a expressão de FOS nos núcleos caudado e putamen do rato, tendo seu efeito inibido pelo antagonista naloxone (Chang et al., 1988). Agonistas colinérgicos também induzem a expressão de *c-fos* em ratos (Bernard et al., 1993; Gudehithlu et al., 1993). A injeção de nicotina induz a expressão de FOS em neurônios do núcleo terminal medial, em núcleos do sistema óptico acessório, interpenduncular, caudal linear e área tegmentar ventral do rato (Pang et al., 1993). Já a administração de pilocarpina (agonista muscarínico) induz a expressão de FOS no córtex cerebral, sendo seu efeito inibido pela pirenzepina (Weiner et al., 1991). Ainda, tem sido descrito a ativação de *c-fos* pela serotonina. A fenfluramina (agonista serotoninérgico produz um incremento de FOS nos núcleos caudado, putamen, paraventricular do hipotálamo e central da amígdala de ratos (Richard et al., 1992). Assim, podemos concluir que em modelos roedores múltiplos sistemas de neurotransmissores estão envolvidos na regulação da expressão do gene *c-fos*. O NPG do sagui apresenta fibras e terminais glutamatérgicos e serotoninérgicos e neurônios imunorreativos a GABA, NPY e ENK (Lima et al., 2012). Considerando as similaridades neuroquímicas, acreditamos que a proteína FOS também esteja atuando na modulação da expressão neuroquímica dos núcleos neuronais do STC do sagui.

7. CONCLUSÕES

- I. O pulso de escuro é capaz de induzir a expressão de FOS no núcleo pré-geniculado do sagui.
- II. O efeito do pulso de escuro é mais evidente quando este é aplicado durante o dia subjetivo.
- III. A maior expressão de FOS na lâmina interna do núcleo pré-geniculado pode indicar uma subespecialização funcional dentro do núcleo.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desce a primeira descrição sobre o núcleo pré-geniculado de primatas em 1909 por Cécile Vogt-Mugnier, uma neurologista francesa, até as recentes publicações, dentre as quais incluímos nosso trabalho (ver página 84), foram feitos enormes avanços a respeito desse núcleo talâmico. Em diversas espécies de primatas, descreveu-se, às vezes de forma mais ou menos profunda, sua citoarquitetura, neuroquímica, projeções retinianas, eletrofisiologia e atividade funcional. No entanto, ainda não foi possível demonstrar de modo indubitável a resolução final aos apontamentos teóricos sobre a morfofisiologia do referido núcleo. Sabíamos o que era necessário realizar e acreditávamos no sucesso de nosso desenho experimental, mas alguns eventos e procedimentos imporiam enormes dificuldades. Conseguimos demonstrar seu papel funcional usando a proteína FOS como marcador de atividade celular. Todavia, percebemos que técnicas de dupla marcação imunohistoquímica e a injeção de traçadores neuronais no NPG são indispensáveis para se chegar a conclusões mais precisas. Os resultados da expressão de FOS após pulsos de escuro no NPG foram corroborativos com a ideia de homologia para com o FIG de roedores, sendo essa a principal contribuição científica. Durante a execução do projeto surgiram novas ideias e, ao final, percebemos seu enorme potencial de expansão. Acreditamos estar no caminho certo.

9. REFERÊNCIAS

Abe H, Rusak B. 1994. Physiological mechanisms regulating photic induction of fos-like protein in hamster suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Behav Rev* 18: 531-536.

Abe H, Rusak B, Robertson HA. 1991. Photic induction of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus is inhibited by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Neurosci Mt* 127: 9-12.

Abe H., Rusak B, Robertson, HA. 1992. NMDA and non-NMDA receptor antagonists inhibit photic induction of Fos protein in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Bull* 2: 831-835.

Albers HE, Ferris CF, Leeman SE, Goldman BD. 1984. Avian pancreatic polypeptide phase shifts hamster circadian rhythms when microinjected into the suprachiasmatic region. *Science* 223: 883-885.

Altimus CM, Güler AD, Villa KL, McNeill DS, LeGates TA, Hattar S. 2008. Rods-cones and melanopsin detect light and dark to modulate sleep independent of image formation. *PNAS* 105(50): 19998-20003.

Araújo JF, Marques N. 2002. Cronobiologia: uma multidisciplinaridade necessária. *Margem* 15: 95-112.

Aronin N, Sagar SM, Sharp FR, Schwartz WJ. 1990. Light regulates expression of a Fos-related protein in rat suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5959-5962.

Azmita, E.C., Segal, M., 1978. An autoradiographic analysis of the differential ascending projection of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 179, 641–668.

Bai-Han Li, Bin Xu, Rowland NE, Kalra SP. 1994. c-fos expression in the rat brain following central administration of neuropeptide Y and effects of food consumption. *Brain Research* 665: 277-284.

Bernard V, Dumartin B, Lamy E, Bloch B. 1993. Fos immunoreactivity after stimulation or inhibition of muscarinic receptors indicates anatomical specificity for cholinergic control of striatal efferent neurons and cortical neurons in the rat. *Eur J Neurosci* 5: 1218-1225.

Blasiak A, Pekala D, Lewandowski MH. 2006. Involvement of NMDA receptors in glutamate-induced neuronal activity of rat intergeniculate leaflet in vitro. *Neuroscience* 24: 2769–2780.

Beaulé C, Amir S. 1999. Photic entrainment and induction of immediate-early genes within the rat circadian system. *Brain Research* 821: 95-100.

Biello SM, Harrington ME, Mason R. 1991. Geniculo-hypothalamic tract lesions block chlordiazepoxide-induced phase advances in Syrian hamsters. *Brain Res* 552: 47-52.

Belenky MA, Smeraski CA, Provencio I, Sollars PJ, Pickard GE. 2003. Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *Journal of Comparative Neurology* 460(3): 380-393.

Biello SM, Janik D, Mrosovsky N. 1994. Neuropeptide Y and behaviorally induced phase shifts. *Neuroscience* 62: 273-279.

Biello SM, Mrosovsky N. 1993. Circadian phase-shifts induced by chlordiazepoxide without increased locomotor activity. *Brain Research* 622 (1-2): 58-62

Biello SM, Mrosovsky N. 1996. Phase response curve to neuropeptide Y in wild type and tau mutant hamsters. *J Biol Rhythms* 11: 27-34.

Bina KG, Rusak B, Semba K. 1993. Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *Journal of Comparative Neurology* 335 (2): 295-307

Boulos Z, Rusak B. 1982a. Circadian phase-response curves for dark pulses in the hamster. *J Comp Physiol* 146: 411-417.

Boulos Z, Rusak B. 1982b. Phase-response curves and the dual-oscillator model of circadian pacemakers. In *Vertebrate Circadian Systems: Structure and Physiology*, J Aschoff, S Daan, GA Groos, eds, pp 215-223, Springer, New York.

Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Schütz G, Silva AJ. 1994. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79: 59-68.

Card JP, Brecha N, Karten HJ, Moore RY. 1981. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide containing cells and process in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J Neurosci* 1: 1289-1303.

Card JP, Moore RY. 1982. Ventral lateral geniculate nucleus efferents to the rat supraquiasmatic nucleus exhibit avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivity. *J Comp Neurol* 206: 390-396.

Card JP, Moore RY. 1984. The suprachiasmatic nucleus of the gold hamster: immunohistochemical analysis of the cell and fiber distribution. *Neuroscience* 13: 415-431.

Cassone VW, Speh JC, Card JP, Moore RY. 1988. Comparative anatomy of the mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 3: 71-91.

Cavalcante JS, Alves AS, Costa MSO, Britto LRG. 2002. Differential distribution of afferents containing serotonin and neuropeptide Y within the marmoset suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 927: 200-203.

Cavalcante JS, Nascimento Júnior ES, Costa MSMO. 2006. Componentes centrais do sistema de temporização circadiana: o núcleo supraquiasmático e o folheto intergeniculado. *Neurociências* 3: 1-10.

Challet E, Pévet P. 2003. Interactions between photic and nophotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Frontiers in Bioscience* 8, 246-257.

Chang SL, Squinto SP, Harlan, RE. 1988. Morphine activation of c-fos expression in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 698-704.

Chevassus-Au-Louis N, Cooper, HM. 1998. Is there a geniculohypothalamic tract in primates? A comparative immunohistochemical study in the circadian system of strepsirhine and haplorhine species. *Brain Res* 805: 213-219.

Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. 1988. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54 (4): 541-552.

Costa MSMO, Moreira LF, Alones V, Lu J, Santee UR, Cavalcante JS, Moraes PRA, Britto LRG, Menaker M. 1998. Characterization of the circadian system in a brazilian species of monkey (*Callithrix jacchus*): Immunohistochemical analysis and retinal projections. *Biol Rhythm Res* 29: 510-520.

Costa MSMO, Santee UR, Cavalcante JS, Moraes PRA, Santos NP, Britto LRG. 1999. Retinohypothalamic projections in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): A study using cholera toxin subunit. *J Comp Neurol* 415: 393-403.

Critchlow V. 1963. The role of light in the neuroendocrine system. In: *Advances in neuroendocrinology*. A. W. Nalbandov, ed. Urbana: Univ. of Illinois Press.

Dibner C, Schibler U, Albrecht U. 2010. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual Review of Physiology* 72: 517-549.

Dwyer SM, Rosenwasser AM. 2000. Effects of light intensity and restraint on dark-pulsed-induced phase shifting during subjective night in Syrian hamsters. *J Biol Rhythms* 15: 491-500.

Dwyer SM, Rosenwasser AM. 2002. Phase shifting the hamster circadian clock by 15-minute dark pulses. *J Biol Rhythms* 17: 238-247.

Eldstein K, Amir S. 1995. Non-photoc manipulations induced expression of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet in the rat. *Brain Res* 690: 254-258.

Eldstein K, Amir S. 1996. Constant light induces persistent fos expression in the rat intergeniculate leaflet. *Brain Research* 731: 221-225.

Eldstein K, Beaulé C, Rodney D'abramo, Amir S. 2000. Expression profiles of JunB and c-Fos proteins in the rat circadian system. *Brain Research* 870: 54-65.

Ellis GB, McKlveen RE, Turek KW. 1982. Dark pulses affect the circadian rhythm of activity in hamster kept in constant light. *Am J Physiol* 242: 44-50.

Erkert HG. Characteristics of the circadian activity rhythm in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *American Journal of Primatology* 17(4): 271-286.

Ferkany JW, Zaczek R, Coyle JT. 1984. The mechanism of kainic acid neurotoxicity. *Nature* 308 (5959): 561.

Foulkes NS, Sassone-Corsi P. 1992. More is better: Activators and repressors from the same gene. *Cell* 68: 411-414.

Glass JD, Tardif SD, Clements R, Mrosovsky N. 2001. Photic and nonphotic circadian phase resetting in a diurnal primate, the common marmoset. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 280: 191-197.

Goel N, Lee TM, Smale L. 1999. Suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet in the diurnal rodent (*Octodon degus*): Retinal projections and immunocytochemical characterization. *Neuroscience* 92: 1491-1509.

Golombek AD, Rosenstein RE. 2010. Physiology of Circadian Entrainment. *Physiol Rev* 1063-1102.

Graybiel A M, Moratalla R, Robertson HA. 1990. Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc natn Acad Sci* 87: 6912-6916.

Greenberg ME, Ziff EB. 1984. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311(5985): 433-438.

Gubits RM, Smith TM, Fairhurst JL, Yu H. 1989. Adrenergic receptors mediate changes in c-fos mRNA levels in brain. *Brain Res Mol Brain Res* 6: 39-45.

Gudehithlu KP, Neff NH, Hadjiconstantinou M. 1993. C-fos and NGFI-A mRNA of rat retina: evidence for light-induced augmentation and a role for cholinergic and glutamate receptors. *Brain Res* 631: 77-82.

Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P. C-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55 (5): 917-924.

Harrington ME. 1997. The ventral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 705-727.

Harrington ME, Nance DM, Rusak B. 1985. Neuropeptide Y immunoreactivity in the hamster geniculo-suprachiasmatic tract. *Brain Res Bull* 15: 465-472.

Harrington ME, Nance DM, Rusak B. 1987. Double-labeling of neuropeptide Y immunoreactive neurons which project from the geniculate to the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 410: 275-282.

Harrington ME, Rusak B. 1988. Ablation of the geniculo-hypothalamic tract alters circadian activity rhythms of hamsters housed under constant light. *Physiol Behav* 42: 183-189.

Harris GW. 1955. Neural control of the pituitary gland. Monograph 3. *Physiol Soc*. London: Arnold 1955.

Hay-Schmidt A, Vrang N, Larsen PJ, Mikkelsen JD. 2003. Projections from the raphe nuclei to suprachiasmatic nucleus of the rat. *J Chem Neuroanat* 25: 293-310.

Hendrickson AE, Wagoner N, Cowan WM. 1972. An autoradiographic and electron microscope study of retino-hypothalamic connections. *Z Zellforsch*. 135: 1-26.

Herdegen T, Leah JD. 1998. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Research Reviews* 28: 370-490.

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

Hickey TL, Spear PD. 1976. Retinogeniculate projections in hooded and albino rats. *Exp Brain Res* 24: 523-529.

Horowitz SS, Blanchard JH, Morin LP. 2004. Intergeniculate leaflet and ventral geniculate nucleus afferent connections: an anatomical substrate for functional input from the vestibulo-visuomotor system. *J Comp Neurol* 474: 227-245.

Huhman KL, Albers HE. 1994. Neuropeptide Y microinjected into the suprachiasmatic region phase shifts circadian rhythms in constant darkness. *Peptides* 15: 1475-1478.

Hut RA, Mrosovsky N, Daan S. 1999. Nonphotic entrainment in a diurnal mammal, the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *Journal of Biological Rhythms* 14 (5): 409-419.

Intondi AB, Dahlgren MN, Eilers MA, Taylor BK. 2008. Intrathecal neuropeptide Y reduces behavioral and molecular markers of inflammatory or neuropathic pain. *Pain* 137: 352-365.

Jacobs EH, Yamatodani A, Timmerman H. 2000. Is histamine the final neurotransmitter in the entrainment of circadian rhythms in mammals? *Trends Pharmacol Sci* 21(8): 293-8.

Janik D, Mikkelsen JD, Mrosovsky N. 1995. Cellular colocalization of fos and neuropeptide Y in the intergeniculate leaflet after nonphotic phase-shifting events. *Brain Res* 698: 137-145.

Janik D, Mrosovsky N. 1992. Gene expression in the geniculate induced by a nonphotic circadian phase shifting stimulus. *NeuroReport* 3 (7): 575-578.

Janik D, Mrosovsky N. 1994. Intergeniculate leaflet lesions and behaviorally-induced shifts of circadian rhythms. *Brain Res.* 651: 174-182.

Johnson RF, Morin LP, Moore RY. 1988. Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res* 462: 301-312.

Johnson RF, Moore RY, Morin LP. 1989. Lateral geniculate lesions alter circadian activity rhythms in the hamster. *Brain Res Bull* 22: 411-422.

Jones EG. 1985. *The Thalamus*. New York: Plenum. pp 723-733.

Jones EG. 1991. Cellular organization in the primate postcentral gyrus. In: *Information Processing in the Somatic Sensory System*. O Franzen, J Westman Ed. London: Macmillan. pp 95-107.

Jones EG. 2007. *The Thalamus, Second Edition*. Cambridge University Press, Cambridge. Volume II.

Ketema NP, Talib BS, Gianluca T. 2009. The role of retinal photoreceptors in the regulation of circadian rhythms. *Rev Endocr Metab Disord* 10: 271-278.

Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE, Takahashi JS. 1990. Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 5: 127-134.

Lee TM, Labyak SE. 1997. Free-running rhythms and light- and dark-pulse phase response curves for diurnal *Octodon degus* (Rodentia). *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 273 (1 42-1): 278-286.

Legoratti-Sanchez MO, Guevara-Guzman R, Solano-Flores LP. 1989. Electrophysiological evidences of a bidirectional communication between the locus coeruleus and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research Bulletin* 23 (4-5): 283-288.

Levine JD, Weiss ML, Rosenwasser AM, Miselis RR. 1991. Retinohypothalamic tract in the female albino rat: a study using horseradish peroxidase conjugated to cholera toxin. *J Comp Neurol* 305: 344-360.

Lima RRM. 2008. 101f. Caracterização do núcleo pré-geniculado do sagui (*Callithrix jacchus*): projeção retiniana, neuroquímica e atividade celular (expressão de FOS). Natal. Dissertação de Mestrado – Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Lima RRM, Pinato L, Nascimento RBS, Engelberth RCGJ, Nascimento Jr. ES, Cavalcante JC, Britto LRG, Costa MSMO, Cavalcante JS. 2012. Retinal projections and neurochemical characterization of the pregeniculate nucleus of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Journal of Chemical Neuroanatomy* 44(1): 34-44.

Livingston CA, Fedder SR. 2003. Visual-ocular motor activity in the macaque pregeniculate complex. *Journal of Neurophysiology* 90 (1): 226-244.

Livingston CA, Mustari MJ. 2000. The anatomical organization of the macaque pregeniculate complex. *Brain Research* 876: 166-179.

Mantyh PW, Kemp JA. 1983. The distribution of putative neurotransmitters in the lateral geniculate nucleus of the rat. *Brain Res* 288: 344-348.

Meijer JH, Daan S, Overkamp GJF, Hermann PM. 1990. The two-oscillator circadian system of tree shrews (*Tupaia belangeri*) and its response to light and dark pulses. *J Biol Rhythms* 5: 1-16.

Meyer-Bernstein EL, Harrington ME, Rahamani T. 1993. A phase-response curve to the benzodiazepine chlordiazepoxide and effect of geniculo-hypothalamic tract ablation. *Physiol Behav* 53: 58-63.

Meyer-Bernstein EL, Morin LP. 1996. Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and this role in circadian rhythm modulation. *J Neurosci* 16: 2097-2111.

Meyer-Bernstein EL, Morin LP. 1998. Destruction of serotonergic neurons in the median raphe nucleus blocks circadian rhythms phase shift to triazolam, but not to novel wheel access. *J Biol Rhythms* 13: 494-505.

Meyer-Bernstein EL, Morin LP. 1999. Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduce light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythms phase shifts. *Neuroscience* 92: 267-279.

Mikkelsen JD, Vrang N, Morosovsky N. 1998. Expression of Fos in the circadian system following nonphotic stimulation. *Brain Res Bull* 47(4): 367-376.

Mintz EM, Gillespie CF, Marvel CL, Huhman KL, Albers HE. 1997. Serotonergic regulation of circadian rhythms in Syrian hamsters. *Neuroscience* 79: 563-569.

Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. 1993. Inducibility and negative autoregulation of CREM: An alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75: 875-886.

Moore RY. 1989. The geniculohypothalamic tract in monkey and man. *Brain Res* 486: 190-194.

Moore RY. 1992. The organization of the human circadian system. In: Swaab DF, Hofman MA, Mirmiran M, Ravid R, Leeuwen FW. Editors. *Prog Brain Res* 93: 101-117.

Moore RY. 1993. Organization of the primate circadian system. *J Biol Rhythms Suppl* 8: 3-9.

Moore RY. 1999. Circadian Timing. In Zigmond, M. J., Bloom, F. E., Landis, S. C., Roberts, J. I., Squire, L. R., Editors. *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic Press. pp.1189-1206.

Moore RY, Card JP. 1994a. Intergeniculate leaflet: An anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol* 344: 403-430.

Moore RY, Card JP. 1994b. Visual afferents and suprachiasmatic nucleus pacemaker function. IN: Nakgawm H, Oomura Y, Nagai K. (eds) *New Functional Aspect of the Suprachiasmatic Nucleus of the hypothalamus*. London: John Libbey. pp. 1-13.

Moore RY, Eichler VB. 1972. Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain Res* 42: 201-206.

Moore RY, Gustafson EI, Card JP. 1984. Identical immunoreactivity of afferents to the rat suprachiasmatic nucleus with antisera against pancreatic polypeptide, molluscan cardioexcitatory peptide and neuropeptide Y. *Cell Tissue Research* 236: 41-46.

Moore RY, Lenn NJ. 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 180: 1-14.

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

Moore RY, Weis R, Moga MM. 2000. Efferent projections of the intergeniculate leaflet and the ventral lateral geniculate nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 420: 398-418.

Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA. 1982. *Physiology of the Circadian Timing System. The Clocks That Time Us*, Cambridge, Harvard Univ Press, cap.2.

Morgan JI, Curran T. 1995. Immediate-early genes: ten years on. *Trends Neuroscience* 18: 66-67.

Morin LP. 2013. Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Experimental Neurology* 243: 4-20.

Morin LP, Allen CN. 2006. The circadian visual system. *Brain Res Reviews* 51: 1-60.

Morin LP, Blanchard JH. 1995. Organization of the hamster intergeniculate leaflet: NPY and ENK projections to the suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet and posterior limitans nucleus. *Visual Neurosci* 12: 57-67.

Morin LP, Blanchard JH. 2001. Neuromodulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *J Comp Neurol* 437: 79-90.

Morin LP, Blanchard JH. 2005. Descending projections of the hamster intergeniculate leaflet: relationship to the sleep/arousal and visuomotor systems. *J Comp Neurol* 487: 204-216.

Morin LP, Shivers KY, Blanchard JH, Muscat L. 2006. Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 137: 1285-1297.

Mrosovsky N. 1995. A non-photic gateway to the circadian clock of hamsters. In: Chadwick DJ, Ackrill K., eds. *Circadian clocks and their adjustment*. Chichester. Ciba Foundation Symposium 183: 154-174.

Mrosovsky N, Salmon PA. 1990. Triazolam and phase-shifting acceleration re-evaluated. *Chronobiol Int* 7: 35-41.

Mrosovsky N, Salmon PA, Menaker M, Ralph MR. 1992. Nonphotic phase shifting in hamster clock mutants. *J Biol Rhythms* 7: 41-49.

Ney V, Avramut M, Blank JL, Tardiff SD, Glass JD. 1998. Behavioral and serotonergic circadian clock resetting in a diurnal monkey, the common marmoset. Poster abstract, 6th meeting of the Society for Research on Biological Rhythms, Amelia Island, Jacksonville, FL, USA.

Pang Y, Kiba H, Jayaraman A. 1993. Acute nicotine injections induce c-fos mostly in non-dopaminergic neurons of the midbrain of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 20: 162-170.

Park HT, Baek SY, Kim BS, Kim JB, Kim JJ. 1993. Profile of Fos-like immunoreactivity induction by light stimuli in the intergeniculate leaflet is different from that of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 610: 334-339.

Peters RV, Aronin N, Schwartz WJ. 1996. c-Fos expression in the rat intergeniculate leaflet: photic regulation, co-localization with Fos-B, and cellular identification. *Brain Reserch* 728: 231-241.

Pickard GE, Smith BN, Belenky M, Rea MA, Dudek FE, Sollars PJ. 1999. 5-HT1B receptor-mediated presynaptic inhibition of retinal input to the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 19: 4034-4045.

Pickard GE. 1985. Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neurosci Lett* 55: 211-217.

Pickard GE. 1994. Intergeniculate leaflet ablation alters circadian rhythms in the mouse. *Neuro Report* 5: 2186-2188.

Pinato L, Allemandi W, Abe LK, Frazão R, Cruz-Rizzolo RJ, Cavalcante JS, Costa MSMO, Nogueira MI. 2007. 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 Research* 1149: 101-110.

- Pinato L, Frasnão R, Cruz-Rizzolo RJ, Cavalcante JS, Nogueira MI. 2009. Immunocytochemical characterization of the pregeniculate nucleus and distribution of retinal and neuropeptide Y terminals in the suprachiasmatic nucleus of the Cebus monkey. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 37(4): 207-213.
- Powell TPS, Cowan WM, Raisman G. 1965. The central olfactory connexions. *J Anat* 99: 791-813.
- Ribak CE, Peters A. 1975. An autoradiographic study of the projections from the lateral geniculate body of the rat. *Brain Res* 92: 241-268.
- Richard D, Rivest S, Rivier C. 1992. The 5-hydroxytryptamine agonist fenfluramine increases Fos-like immunoreactivity in the brain. *Brain Res* 594: 131-137.
- Richter CP. 1967. Sleep and Activity: their relation to the 24-hour clock. *Proc Assoc Res Nerv Ment Dis* 45: 8-27.
- Robertson GS, Robertson HA. 1989. Evidence that L-dopa-induced rotational behavior is dependent on both striatal and nigral mechanisms. *Journal of Neuroscience* 9: 3326-3331.
- Rosenwasser AM, Dwyer SM. 2001. Circadian phase shifting: Relationships between photic and nonphotic phase-response curves. *Physiology Behaviour* 73: 175-183.
- Rotenberg L, Marques N, Menna-Barreto L. 2003. O caráter endógeno da ritmicidade biológica. In: *Histórias e Perspectivas da Cronobiologia. Cronobiologia: Princípios e Aplicações*, ed. EDUSP, 3ª edição, São Paulo, pp. 35-37.
- Ruby FN, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC, O'Hara BF. 2002. Role of Melanopsin in Circadian Responses to Light. *Science* 298(5601): 2211-2213.

Rusak B, Meijer JH, Harrington ME. 1989. Hamster circadian rhythms are phase-shifted by electrical stimulation of the geniculo-hypothalamic tract. *Brain Res* 493: 283-291.

Santos ET, Maitelli A, Araujo JF. 2000. Sistema de Aquisição e Processamento de Sinais Biológicos para Estudo de Ritmos Biológicos de Animais em Cativero. In Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Florianópolis: Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Vol. 1, pp. 595-601.

Schaden H, Stürmer CAO, Bähr M. 1994. GAP-43 immunoreactivity and axon regeneration in retinal ganglion cells of the rat. *J Neurobiol* 25: 1570-1578.

Schumann DM, Cooper HM, Hofmeyr MD, Bennet NC. 2006. Light induced Fos expression in the suprachiasmatic nucleus of the four striped field mouse, *Rhabdomys pumilio*: A southern African diurnal rodent. *Brain Research Bulletin* 70: 270-277.

Semba K. 1991. The cholinergic basal forebrain: A critical role in cortical arousal. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 295: 197-218.

Shinohara K, Tominaga K, Fukuhara C, Otori Y, Inouye SIT. 1993. Processing of photic information within the intergeniculate leaflet of the lateral geniculate body: assessed by neuropeptide Y immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neuroscience* 56: 813-822.

Silva CA. 2007. Efeitos de vocalizações de co-específicos e do escuro sobre o ritmo circadiano da atividade motora em sagüis (*Callithrix jacchus*). Natal. Dissertação de Mestrado – Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Smale L, Michels KM, Moore RY, Morin LP. 1990. Destruction of the hamster serotonergic system by 5,7-DHT: effects on circadian rhythm phase, entrainment and response to triazolam. *Brain Res* 515: 9-19.

Smeyne RJ, Schilling K, Robertson L, Luk D, Oberdick J, Curran T, Morgan JI. 1992. Fos-lacZ transgenic mice: Mapping sites of gene induction in the central nervous system. *Neuron* 8 (1): 13-23.

Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ, Miao GG, Schilling K, Robertson LM, Curran T, Morgan JI. 1993. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature* 363: 166-169.

Sonnenberg J, Macgregor-Leon P, Curran T, Morgan J. 1989. Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor Ap-1 complexes after seizure. *Neuron* 3: 359–365.

Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pévet P, Sassone-Corsi P. 1993. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 365: 314-320.

Stephan FK, Zucker I. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci* 69: 1583-1586.

Swanson LW, Cowan WM, Jones EG. 1974. An autoradiographic study of the efferent connections of the ventral geniculate nucleus in the albino rat and the cat. *J Comp Neurol* 56: 143-64.

Treep JA, Abe H, Rusak B, Goguen DM. 1995. Two distinct retinal projections to the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 10: 299-307.

Tsai YJ, Lin CT, Huang CT, Wang HY, Tien LT, Chen SH, Lue JH. 2009. Neuropeptide Y modulates c-Fos protein expression in the cuneate nucleus and contributes to mechanical hypersensitivity following rat median nerve injury. *Journal of Neurotrauma* 26: 1609–1621.

Tsujino T, Sane H, Kubota Y, Hsieh ST, Miyajima T, Saito K, Nakajima M, Saito N, Yokoyama M. 1992. Expression of Fos-like immunoreactivity by yohimbine and clonidine in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 226: 69-78.

Ueda S, Kawata M, Sano Y. 1983 Identification of serotonin- and vasopressin immunoreactivities in the suprachiasmatic nucleus of four mammalian species. *Cell Tiss Res* 234: 237-248.

Van den Pol AN, Tsujimoto KL. 1985. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neural antigens. *Neuroscience* 15: 1049-1086.

Viñuela MC; Larsen PJ. 2001. Identification of NPY-Induced c-Fos expression in hypothalamic neurones projecting to the dorsal vagal complex and the lower thoracic spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology* 438: 286–299.

Weiner ED, Kalasapudi VD, Papolos DF, Lachman HM. 1991. Lithium augments pilocarpine-induced fos gene expression in rat brain. *Brain Res* 553: 117-122.

Wollnik F, Brysch W, Uhlmann E, Gillardon F, Bravo R, Zimmermann M, Schlingensiepen KH, Herdegen T. 1994. Block c-Fos and JunB expression by antisense-oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock. *Eur J Neurosci* 7: 388-393.

Wong KY, Dunn FA, Graham DM, Berson DM. 2007. Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors. *J Physiol* 582: 279–296.

Wu Y, Zhang D, Lou D, Fan Y, Aronow B, Xu M, Zhang J. 2004. c-fos regulates neuropeptide Y expression in mouse dentate gyrus. *Neuroscience Letters* 363: 6-10.

Zhang J, Zhang D, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ, Xu M. 2002. c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nature Genetics* 30 (4): 416-420.

Zhang Y, Van Reeth O, Zee PC, Takahashi JS, Turek FW. 1993. Fos protein expression in the circadian clock is not associated with phase shifts induced by a nonphotic stimulus, triazolam. *Neurosci Lett* 164: 203-208.

Apêndice



Retinal projections and neurochemical characterization of the pregeniculate nucleus of the common marmoset (*Callithrix jacchus*)

Ruthnaldo R.M. Lima^a, Luciana Pinato^b, Rayane B.S. Nascimento^a, Rovena Clara G.J. Engelberth^a, Expedito S. Nascimento Junior^a, Judney C. Cavalcante^a, Luiz R.G. Britto^c, Miriam S.M.O. Costa^a, Jeferson S. Cavalcante^{a,*}

^a Laboratory of Neuroanatomy, Federal University of Rio Grande do Norte, 59072-970 Natal, RN, Brazil

^b Department of Speech-Language and Hearing Therapy, São Paulo State University, 17525-900 Marília, SP, Brazil

^c Department of Physiology and Biophysics, University of São Paulo, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 January 2012

Received in revised form 22 March 2012

Accepted 7 April 2012

Available online 15 April 2012

Keywords:

Pregeniculate nucleus
Primate
Circadian timing system
Cholera toxin
Immunohistochemical
Intergeniculate nucleus

ABSTRACT

In mammals, the suprachiasmatic nucleus (SCN) and the intergeniculate leaflet (IGL) are the main components of the circadian timing system. The SCN is the site of the endogenous biological clock that generates rhythms and synchronizes them to environmental cues. The IGL is a key structure that modulates SCN activity and is responsible for the transmission of non-photoc information to the SCN, thus participating in the integration between photic and non-photoc stimuli. Both the SCN and IGL receive projections of retinal ganglion cells and the IGL is connected to the SCN through the geniculohypothalamic tract. Little is known about these structures in the primate brain and the pregeniculate nucleus (PGN) has been suggested to be the primate equivalent of the rodent IGL. The aim of this study was to characterize the PGN of a primate, the common marmoset (*Callithrix jacchus*), and to analyze its retinal afferents. Here, the marmoset PGN was found to be organized into three subsectors based on neuronal size, pattern of retinal projections, and the distribution of neuropeptide Y-, GAD-, serotonin-, enkephalin- and substance P-labeled terminals. This pattern indicates that the marmoset PGN is equivalent to the IGL. This detailed description contributes to the understanding of the circadian timing system in this primate species considering the importance of the IGL within the context of circadian regulation.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The circadian timing system, a group of neural structures responsible for the generation and modulation of circadian rhythms, is formed by oscillators, modulating structures and synchronizing pathways (Cavalcante et al., 2006; Morin and Allen, 2006). The suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus is the main central circadian pacemaker in the mammalian brain and its functions have been extensively studied (Moore and Eichler, 1972; Stephan and Zucker, 1972; Gillette, 1991; Schwartz, 1991; Golombek and Rosenstein, 2010). The SCN is constantly the subject of significant revisions neurochemical, hodological (Costa et al., 1998, 1999; Cavalcante et al., 2002, 2008, 2011; Ramanathan et al., 2006; Morin, 2007; Nascimento Jr. et al., 2010), and molecular (Ukai and Ueda, 2010) studies. After the SCN had been established as the primary circadian pacemaker, a study conducted on rats in which labeled amino acids were injected into the ventral lateral

geniculate nucleus (VLG) of the thalamus revealed the presence of bilateral projections with ipsilateral predominance to the SCN, which were apparently restricted to the ventrolateral region (Ribak and Peters, 1975). At the same time, based on differences in retinal projections to the lateral geniculate thalamic complex, other investigators identified a structure between the dorsal lateral geniculate nucleus (DLG) and VLG, which appeared as fine, elongated layers. This structure was called the intergeniculate leaflet (IGL) (Hickey and Spear, 1976).

Pharmacological and combined lesion studies suggest that the IGL plays an important role in the modulation of circadian rhythms (Albers et al., 1984; Johnson et al., 1989; Biello et al., 1991; Meyer-Bernstein et al., 1993; Huhman and Albers, 1994; Pickard, 1994). Some studies indicate that the IGL participates in the transmission of photic information to the SCN (Harrington and Rusak, 1988; Aronin et al., 1990), whereas others suggest that the IGL integrates the photic and non-photoc information necessary to modify pacemaker function (Harrington and Rusak, 1988; Janik and Mrosovsky, 1994; Moore and Card, 1994). In this respect, the geniculohypothalamic tract (GHT), which consists of projections of neuropeptide Y (NPY)-positive neurons from the IGL to the SCN, acts as the main modulatory pathway of SCN activity. Studies

* Corresponding author at: A.C. UFRN, Postal Box 1548, 59078-970, Brazil.
Tel.: +55 84 3215 3409; fax: +55 84 3211 9207.

E-mail address: jefsc@uol.com.br (J.S. Cavalcante).

investigating cellular activity by mapping the expression of *c-fos* gene have shown that IGL neurons respond to photic and non-photoc stimuli (Janik et al., 1995). However, determination of the neurochemical phenotype of the cells involved clearly demonstrated that most NPY-positive neurons participate in non-photoc rather than photic events (Janik et al., 1995).

The IGL is anatomically well defined in rodents; however, difficulties exist in establishing its boundaries in primates (Jones, 2007). The lateral geniculate thalamic complex of primates consists of two nuclei: the DLG and the pregeniculate nucleus (PGN). The first is equivalent to the same structure seen in rodents, whereas the PGN continues to be a matter of much controversy (Moore, 1993; Jones, 2007). Several studies suggest the PGN to be homologous to the rodent IGL and VLG (Moore, 1993) and the expressive difference in shape between the rodent IGL/VLG and the primate PGN has been interpreted to be a consequence of the evolutionary process. In this respect, the dramatic expansion of adjacent structures in the primate brain, namely the cerebral peduncle and the DLG itself, resulted in changes in the topographical relationship between the PGN and DLG from a ventrolateral to a dorsomedial position (Chevassus-Au-Louis and Cooper, 1998; Jones, 2007).

PGN neurons are characterized by substantial morphological variety (Babb, 1980), showing immunoreactivity to several neuroactive substances such as gamma-aminobutyric acid (GABA), enkephalin, NPY, substance P (SP), serotonin (5-HT), and calcium-binding proteins in specific regions (Moore, 1993; Costa et al., 1998; Cavalcante et al., 2008; Pinato et al., 2009). Furthermore, retinorecipient and non-retinorecipient areas have been identified in the primate PGN (Costa et al., 1998; Pinato et al., 2009). Neurochemical abundance and differentiation of retinal from extraretinal inputs are common features of the rodent IGL and VLG and are also useful to define the boundaries between these two structures. These characteristics may also be suitable tools in morphological studies investigating the possible relationship between the rodent IGL and VLG and the primate PGN and its subdivisions (Livingston and Mustari, 2000). Most of the current controversy is due to discrepancies in nomenclature, divergent techniques, insufficient data, or differences among species (Livingston and Mustari, 2000).

The interspecies variability of the cellular morphology, neurochemistry, and retinal projections found in the nuclei of the circadian timing system (SCN, IGL and PGN) cannot be easily related to behavioral data. Data reported for insects, diurnal rodents, nocturnal rodents, old world monkeys and new world monkeys do not suggest any association with photoperiodism, diurnality or nocturnality, and eye position, for example (Goel et al., 1999). On the other hand, studies assessing the expression of the clock genes (*per 1* and *per 2*) (Vosko et al., 2009) and of the proto-oncogene *c-fos* (Krajnak et al., 1997; Jiao et al., 1999) indicate behavioral differences among diurnal and nocturnal animals.

The existence of an IGL and GHT in primates is a crucial issue concerning the adequacy of primate models for the study of human circadian physiology. Moreover, the conservation of this nucleus and pathway during phylogeny is a question of basic interest for comparative anatomy (Chevassus-Au-Louis and Cooper, 1998). The aim of the present study was to analyze PGN neurons in a New World primate species, focusing specifically on their morphology, distribution and neurochemical phenotype, and to identify the terminal fields of retinal projections in this nucleus.

2. Materials and methods

Five adult male marmosets (280–380 g) from the Primatology Center of the Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil, were used in this study. The use of the animals was authorized by the Brazilian Environmental Protection Agency (IBAMA Register No. 1/24/92/0039-0). The animals were housed under natural conditions of temperature and humidity in a light–dark cycle, with food and

water being freely available. The experimental procedures were in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research of the National Research Council.

2.1. Retinal projections

The marmosets were anesthetized with sodium thiopental (Cristália, São Paulo, Brazil; 40 mg/kg, i.p.), placed on an operating table and secured in a head holder, and tetracaine hydrochloride was applied topically to the cornea. Next, the animals received a unilateral intraocular injection of cholera toxin subunit b (CTb; List Biological Laboratories, Inc., Campbell, CA, USA). For this purpose, 80 μ l of a 1 mg/ml aqueous CTb solution containing 10% dimethylsulfoxide was injected into the vitreous humor with a 30-gauge needle attached to a micropump (Masterflex, Cole-Parmer, Niles, IL, USA) at a rate of 1 μ l/min. The ocular surface was cleaned continuously with saline during surgery in order to minimize reflux and spreading of the tracer to the extraocular muscles and to prevent postoperative local infection. In addition, the needle was removed only 15 min after the end of the injection. The ocular surface was again washed with saline and an antibiotic ointment was applied topically. Five to 7 days post-injection, the marmosets were anesthetized with sodium thiopental and perfused transcardially with 400 ml phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 500 IU heparin (Liquemin, Roche, São Paulo, Brazil), followed by 700 ml 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The brains were removed from the skull, postfixed in the same fixative solution for 2–4 h, and transferred to a solution containing 30% sucrose in 0.1 M PBS, pH 7.4. Each brain was serially cut in the coronal plane into 30- μ m thick sections with a freezing sliding microtome. The sections were placed sequentially in six compartments (one section per compartment), with the distance between one section and the next in the same compartment being approximately 180 μ m. All sections in the six compartments were stored in antifreeze solution. Each compartment was then individually processed to reveal one of the following substances: CTb, NPY, glutamic acid decarboxylase (GAD), enkephalin, SP, 5-HT, or neuron-specific nuclear protein (NeuN). In all cases, one of the compartments was processed by the Nissl technique (thionin dye) to facilitate tracing the boundaries of the structures studied and for analysis of cytoarchitecture.

For the detection of CTb, free-floating sections were incubated for 18–24 h with goat anti-CTb IgG primary antibody (List Biological Laboratories, Inc.), diluted 1:9000, containing 2% normal donkey serum in 0.3% Triton X-100 and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Next, the sections were incubated with the biotinylated secondary antibody (donkey anti-goat IgG; Jackson Labs, Westgrove, PA, USA), diluted 1:1000, for 90 min, followed by incubation with the avidin-biotin peroxidase solution (ABC Elite kit, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) for 90 min. The reaction was developed by the addition of diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 0.01% H₂O₂ in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The sections were washed (5 \times , 5 min) with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, between each step and at the end of the procedure. The sections were then dried, dehydrated in a graded alcohol series, cleared in xylene, and coverslipped with neutral mounting medium (DPX; Sigma).

2.2. Neurochemical procedure

For immunostaining, the sections were washed in phosphate buffer and incubated with the primary antibodies for 18–24 h at room temperature. The following antibodies were used: rabbit anti-NPY, hamster anti-GAD, hamster anti-enkephalin, rat anti-SP, rabbit anti-5-HT, and mouse anti-NeuN (for details, see Table 1). Next, the sections were incubated with the appropriate secondary antibodies (Table 1) and the ABC protocol was used for immunodetection as described for CTb.

Sections in which the primary antibodies were omitted and replaced with normal serum from the same species served as controls. Under these conditions, staining was completely abolished.

3. Results

3.1. Cytoarchitecture (Nissl and NeuN)

The marmoset PGN was identified as a compact wedge-shaped cell cluster located dorsomedially to the DLG, with the two structures comprising the lateral geniculate thalamic complex (Fig. 1A–C). The PGN was formed by two parts, the inner portion (located near the DLG) and outer portion adjacent to the reticular thalamic nucleus (RT) and ventrolateral posterior thalamic nuclei (VLP). The outer portion of the PGN appeared to be subdivided into two additional layers, forming at the end three cellular layers that differed in their neuronal population (Figs. 1D–F and 2D–F). At first glance, the double-layer feature of the outer portion was difficult to distinguish since the two layers contained the same types of

Table 1
Characteristics of antibodies used.

	Host and marked target	Source-Company	Catalog code	Lot number	Working dilution
Primary antibodies	Goat anti-CTb	List Biological Labs, Campbell, CA, USA	703	7032A	1:9000
	Rabbit anti-NPY	Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA	N9528	066H4842	1:1000
	Mouse anti-GAD		G1166	047K1073	1:500
	Rabbit anti-5-HT		S5545	035H4810	1:5000
	Rabbit anti-ENK	Peninsula Laboratories INC, San Carlos, CA, USA	T4290	010607-1	1:1000
	Guinea pig anti-SP		T5019	021077-5	1:1000
Secondary antibodies	Mouse anti-NeuN	Chemicon Internat. Inc., Temecula, CA, USA	MAB377	LV1457494	1:1000
	Donkey anti-goat	Jackson ImmunoResearch Labs, Westgrove, PA, USA	705,065,003	71,434	1:1000
	Goat anti-rabbit		111,065,003	74,532	1:1000
	Goat anti-guinea pig		106,065,003	70,510	1:1000
	Rabbit anti-mouse	Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA	B8520	072K4876	1:200

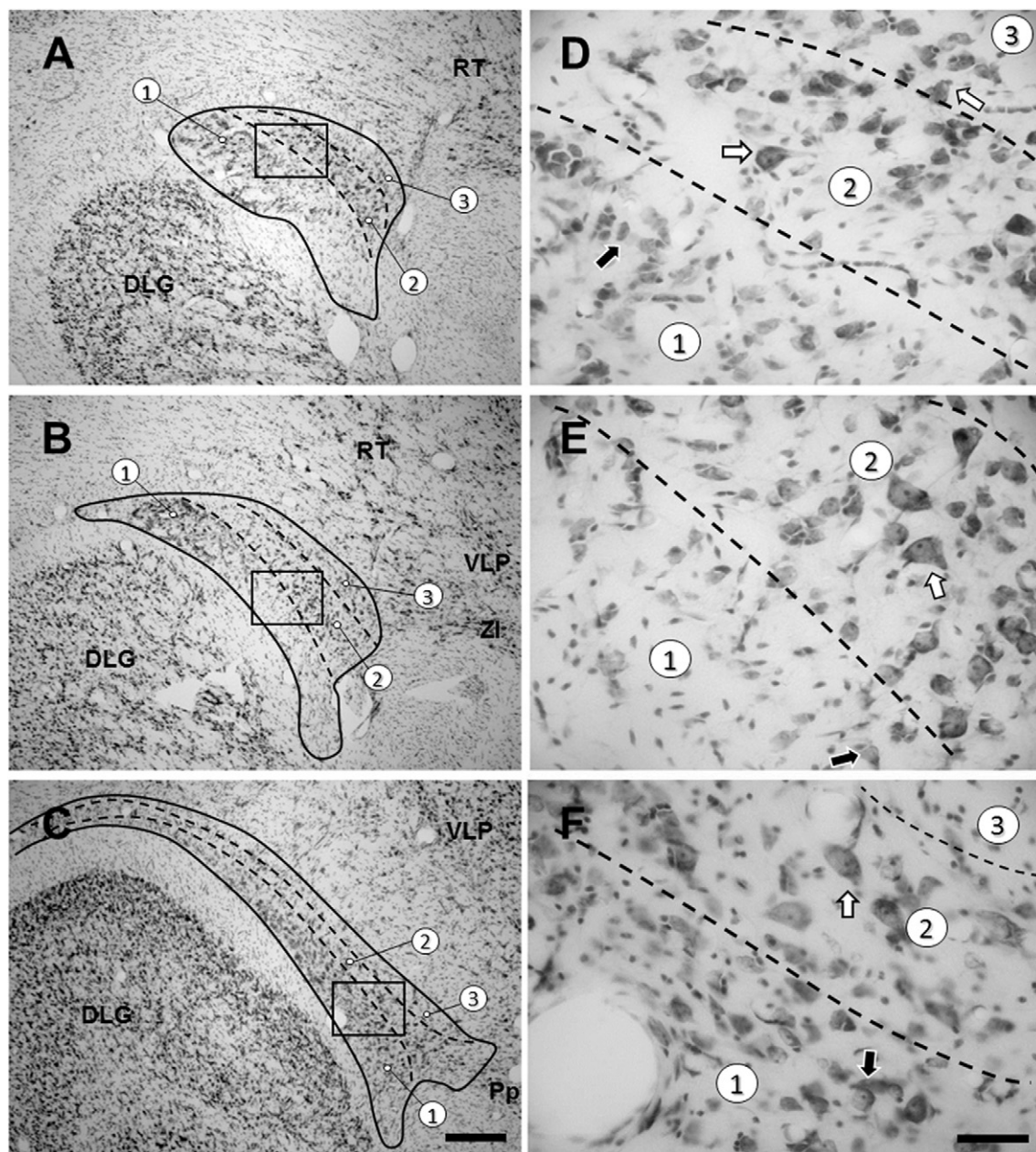


Fig. 1. Photomicrographs of the brain sections of *Callithrix jacchus* showing the components of PGN in bright field. (A, B and C) PGN stained by Nissl technique at rostral, middle and caudal levels, respectively. (D, E and F) High magnification of the squares area in A, B and C, respectively. Compact lines show PGN boundaries. Dashed lines show limits between the layers. (1) Pregeniculate nucleus inner lamina; PGNil, (2) pregeniculate nucleus ventral outer lamina; PGNvol and (3) pregeniculate nucleus dorsal outer lamina; PGNdol. Black arrows (small neurons) and white arrows (large neurons). DLG (dorsal lateral geniculate nucleus), RT (reticular thalamic nucleus), VLP (ventral lateral posterior nucleus), Pp (peripeduncular nucleus) and ZI (zona incerta). Scale bar 300 μ m (A, B and C) and 50 μ m (D, E and F).

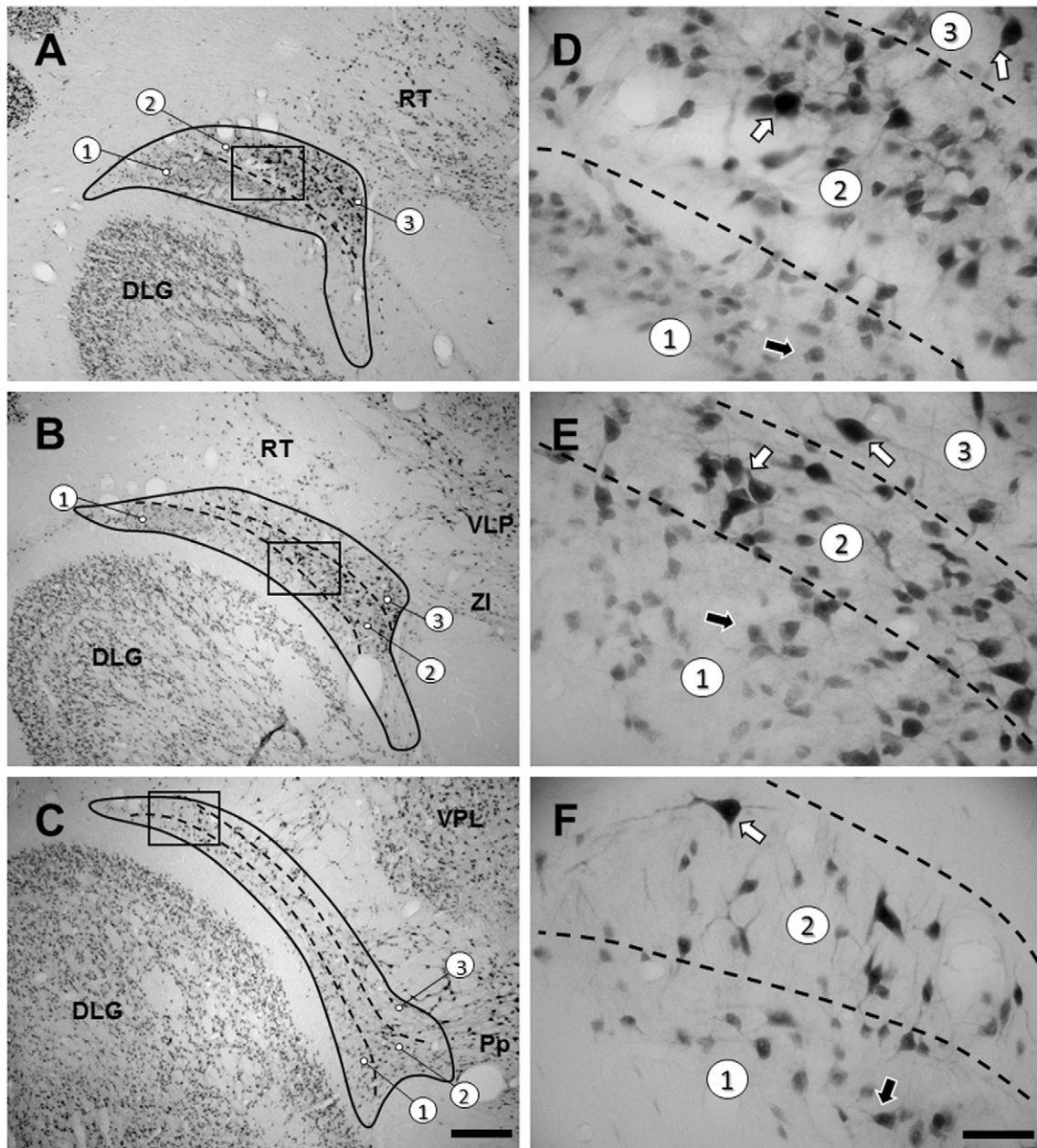


Fig. 2. Photomicrographs of the brain sections of *Callithrix jacchus* showing the components of PGN in bright field. (A, B and C) Immunoreactivity against NeuN in the PGN at rostral, middle and caudal levels, respectively. (D, E and F) High magnification of the squares area in A, B and C, respectively. Dashed lines show limits between the layers. (1) Pregeniculate nucleus inner lamina; PGNil, (2) pregeniculate nucleus ventral outer lamina; PGNvol and (3) pregeniculate nucleus dorsal outer lamina; PGNdol. Black arrows (small neurons) and white arrows (large neurons). DLG (dorsal lateral geniculate nucleus), RT (reticular thalamic nucleus), VLP (ventral lateral posterior nucleus), Pp (peripeduncular nucleus) and ZI (zona incerta). Scale bar 300 μm (A, B and C) and 50 μm (D, E and F).

neurons. Small neurons were detected in layer 1 (8 μm), and medium (15 μm) to large (30 μm) neurons in layers 2 and 3 (Figs. 1D–F and 2D–F). Although the exact boundaries required further defining criteria such as retinal projections and neurochemistry (topics reported below), it was possible to identify these layers based on differences in cell density (Fig. 2A and B). The designation pregeniculate nucleus inner lamina (PGN_{il}) was adopted for layer 1 (inner portion), pregeniculate nucleus ventral outer lamina (PGN_{vol}) for layer 2 (ventral part of outer portion), and pregeniculate nucleus dorsal outer lamina (PGN_{dol}) for layer 3 (dorsal part of the outer portion). Immunohistochemical staining with antibody against NeuN permitted a better establishment of the cytoarchitecture than that observed by Nissl staining (Fig. 2). Anatomical PGN boundaries and their related structures could be more clearly defined, including the DLG located ventrolaterally (Fig. 2A–C), the RT located dorsally

(Fig. 2A and B), and the zona incerta (mid-level) (Fig. 2B) or peripeduncular nucleus (caudal level) (Fig. 2C) located medially. No glial cell was stained by this technique, a fact permitting better visualization of neuron morphology and distribution (Fig. 2D–F).

3.2. Retinal projections

CTb staining provided clear evidence of the retinorecipient nature of the DLG and PGN (Fig. 3). Fibers and terminals provided an unequivocal tool for delimitation of this multifaceted structure and almost all the PGN layers are discernible, with strong predominance of contralateral labeling for the injected eye (Fig. 3). The trilaminar structure of the PGN was evident at all levels on the contralateral side (Fig. 3A–C), particularly at the rostral (Fig. 3A) and middle levels (Fig. 3B). On the ipsilateral side,

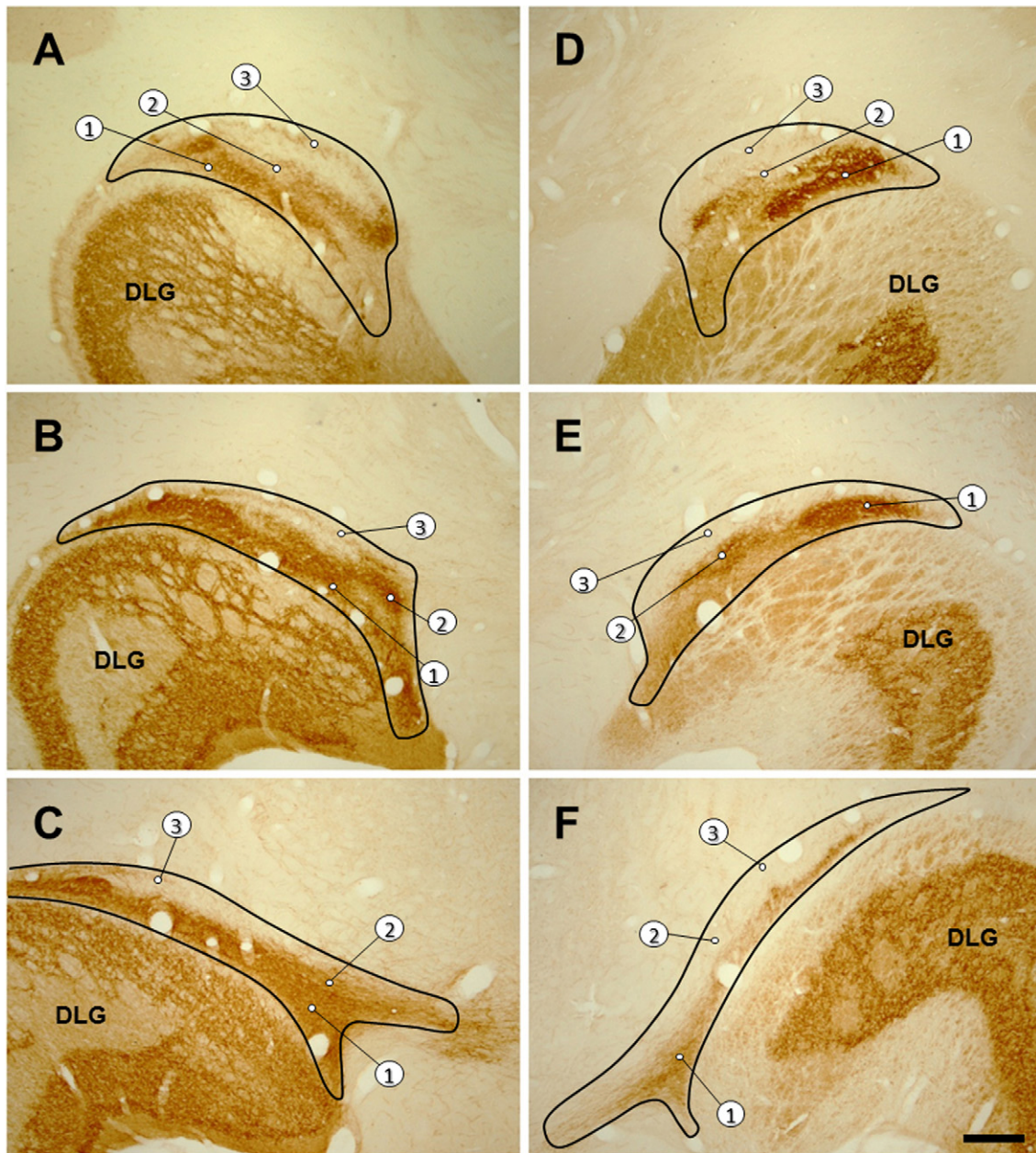


Fig. 3. Photomicrographs of the brain sections of *Callithrix jacchus* showing the components of PGN in bright field. (A, B and C) CTb immunoreactivity in the contralateral PGN at rostral, middle and caudal levels, respectively. (D, E and F) CTb immunoreactivity in the ipsilateral PGN at rostral, middle and caudal levels, respectively. (1) Pregeniculate nucleus inner lamina; PGNIl, (2) pregeniculate nucleus ventral outer lamina; PGNvol and (3) pregeniculate nucleus dorsal outer lamina; PGNdol. DLG (dorsal lateral geniculate nucleus). Scale bar 300 μ m.

the layer 1 exhibits a dense CTb-immunoreactive fiber plexus, whereas layer 2 has a lower density than layer 1 and layer 3 is poorly innervated (Fig. 3D–F). The almost complete absence of staining in layer 3 at all levels conferred a bilaminar appearance to the PGN (Fig. 3D–F). Boundaries were clearly defined by this technique, particularly for layer 1 in the ipsilateral sections due to staining differences between this layer and the other two layers (Fig. 3D–F).

3.3. Neuropeptide Y

NPY immunoreactivity was only detected in layer 1 at all levels (Fig. 4A–C). Small spindle-shaped and spherical labeled neurons, as well as labeled neuropil, were identified throughout layer 1 of the PGN at all levels (Fig. 4D–F). This distribution pattern was important for defining the boundaries of layer 1.

3.4. Glutamic acid decarboxylase

Immunostaining for GAD revealed a few widespread large and polygonal neurons in layer 2 at all levels (Fig. 5A–C). A few labeled neurons were also found scattered in layer 1, especially at the intermediate level. These neurons presented the same morphology as those occurring in layer 2.

3.5. Serotonin

A dense network of 5-HT-immunoreactive fibers and terminals with varicosities was found scattered throughout the nucleus at all levels (Fig. 5D–F). These serotonergic terminals did not exhibit any specific orientation. Analysis of 5-HT immunoreactivity permitted the definition of the outline of the PGN without the need for differentiation of its layers at any level (Fig. 5D–F).

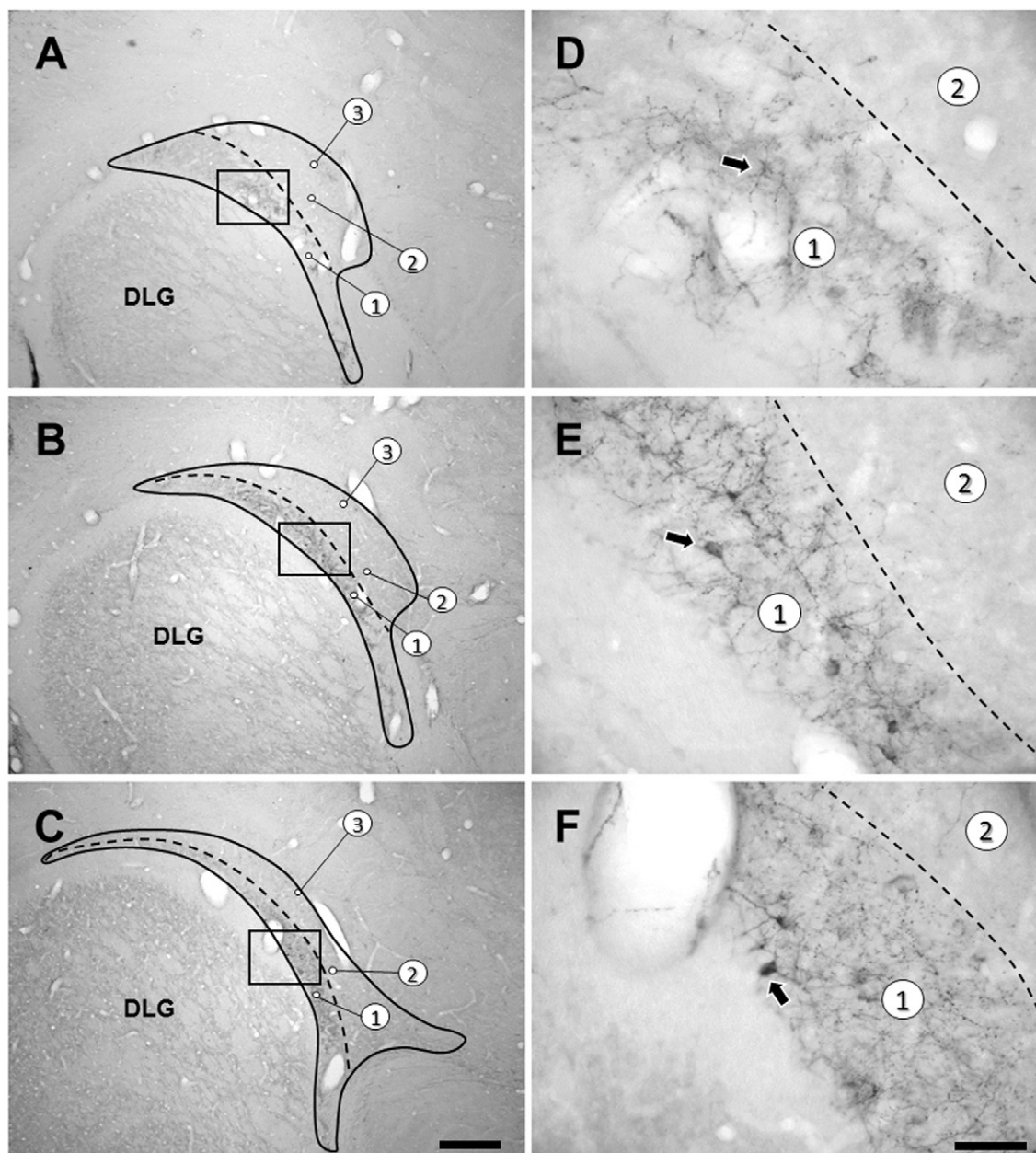


Fig. 4. Photomicrographs of the brain sections of *Callithrix jacchus* showing the components of PGN in bright field. (A, B and C) Immunoreactivity against NPY in the PGN at rostral, middle and caudal levels, respectively. (D, E and F) High magnification of the squares area in A, B and C, respectively. (1) pregeniculate nucleus inner lamina; PGNil, (2) pregeniculate nucleus ventral outer lamina; PGNvol and (3) pregeniculate nucleus dorsal outer lamina; PGNdol. Black arrows (NPY-positive neurons). DLG (dorsal lateral geniculate nucleus). Scale bar 300 μm (A, B and C) and 50 μm (D, E and F).

3.6. Enkephalin

ENK immunoreactivity was restricted to layer 1 at rostral levels. At the intermediate and caudal levels, layer 1 showed a dense neuropil, whereas layer 2 had only a sparse neuropil staining (Fig. 6A–C). In addition to NPY immunoreactivity, enkephalin staining contributed to define the boundaries of layer 1 of the PGN.

3.7. Substance P

Immunostaining for SP indicated a trilaminar structure of the PGN at all levels (Fig. 6D–F). A plexus of labeled fibers and terminals with varicosities and without any specific orientation was seen within layers 1 and 3 of the PGN, mainly at the middle and caudal levels (Fig. 6E and F, respectively). The SP-immunostaining pattern

permitted to define the boundaries of all layers since the absence of staining in layer 2 (located in an intermediate position) contrasted with the staining of layers 1 and 3 (Fig. 6D–F).

4. Discussion

4.1. Anatomical organization and cytoarchitecture of the pregeniculate nucleus

The PGN was first mentioned in 1909 by Vogt, who described it as a cluster of cells resembling a hood that surrounds the DLG. Despite the conflicting results regarding the anatomical organization of the PGN (Livingston and Mustari, 2000), our findings agree with the description of most authors, identifying the PGN as a lamina hood-shaped structure whose cells occupy an area dorsomedial to the DLG.

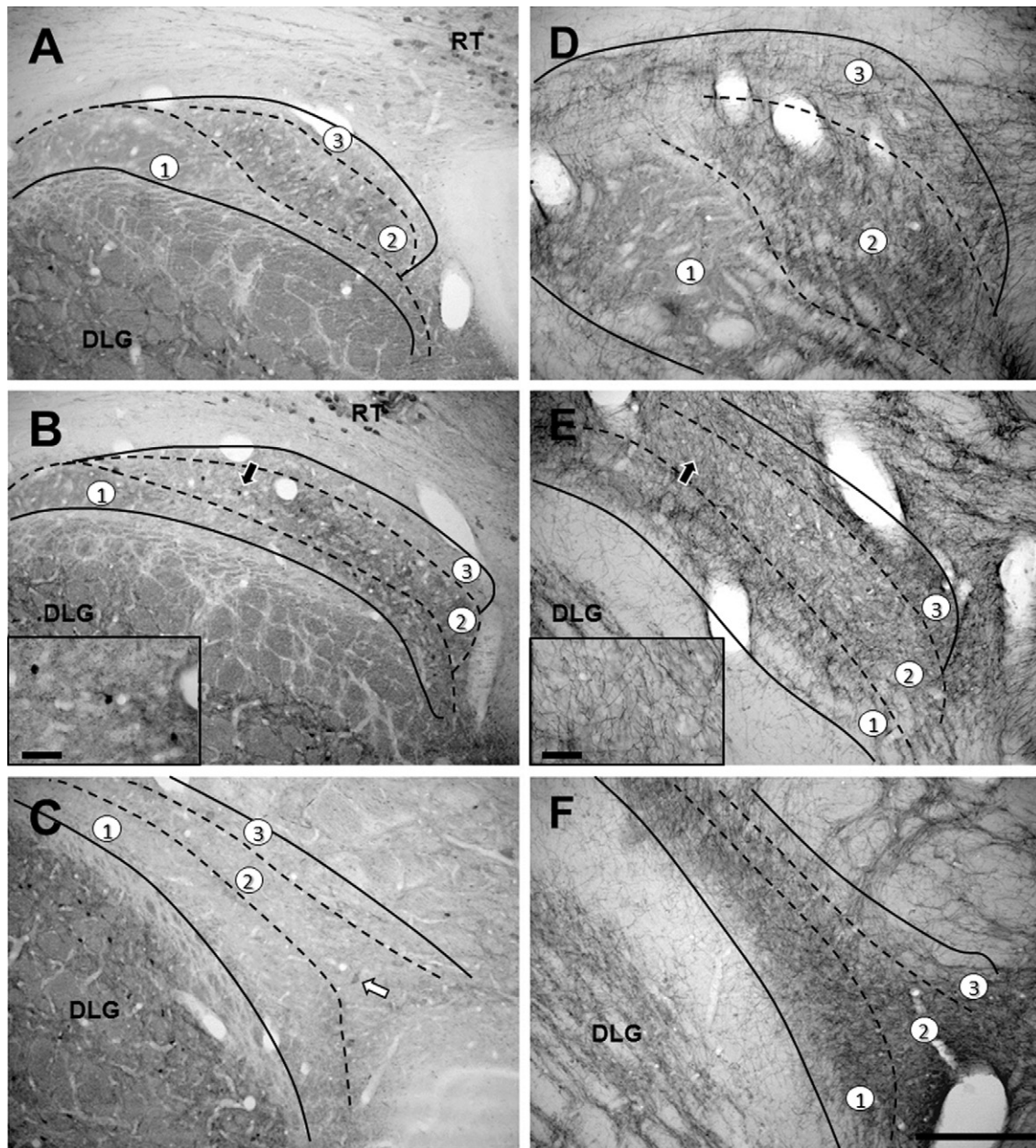


Fig. 5. Photomicrographs of the brain sections of *Callithrix jacchus* showing the components of PGN in bright field. (A, B and C) Immunoreactivity against GAD in the PGN at rostral, middle and caudal levels, respectively. (D, E and F) Immunoreactivity against 5-HT in the PGN at rostral, middle and caudal levels, respectively. (1) Pregeniculate nucleus inner lamina; PGNil, (2) pregeniculate nucleus ventral outer lamina; PGNvol and (3) pregeniculate nucleus dorsal outer lamina; PGNdol. The magnification of the square delimited area is shown in details in the upper-right corner each respectively pictures. Dashed lines show limits between the layers. DLG (dorsal lateral geniculate nucleus), RT (reticular thalamic nucleus) and Put (putamen). Scale bar 300 μ m.

The PGN was first described as a bilaminar structure based exclusively on cell morphology data (Balado and Franke, 1937). The present study characterized the PGN as a trilaminar structure that consists of an inner portion with small neurons and an outer portion (layers 2 and 3) with medium and large neurons. The difference in cell density led to the division of the outer portion into these two layers. The exclusive presence of large and polygonal neurons in the outer portion and of small, spindle-shaped and spherical neurons in the inner portion permitted the clear distinction between these two parts.

In some of the primate species studied, analysis of neuronal PGN morphology revealed the same basic types of neurons found here (Polyak, 1957; Niimi et al., 1963; Hendrickson, 1973; Babb, 1980; Livingston and Mustari, 2000), but structural differences in the nucleus were observed. In *Macaca mulatta*, the PGN is defined

as a bilaminar structure consisting of an inner and an outer layer (Babb, 1980). A bilaminar structure of the PGN has also been described for many other primate species, including man (Niimi et al., 1963). However, these authors reported the presence of additional portions in the bilaminar structure of the PGN, although not with certainty (Niimi et al., 1963; Babb, 1980). It remains unknown whether the discrepancies in PGN structure seen between primates represent functional differences. Further investigations are needed to clarify this evolutionary aspect.

A close relationship was observed between the RT and PGN at mid-caudal levels where these nuclei may fuse. We believe that the lateral group described as part of the PGN is in fact the RT (Jones, 2007; Moore, 1989). This assumption can be explained by the common embryological origin of the PGN and RT, which arise from the ventral diencephalon (Polyak, 1957). This issue should be

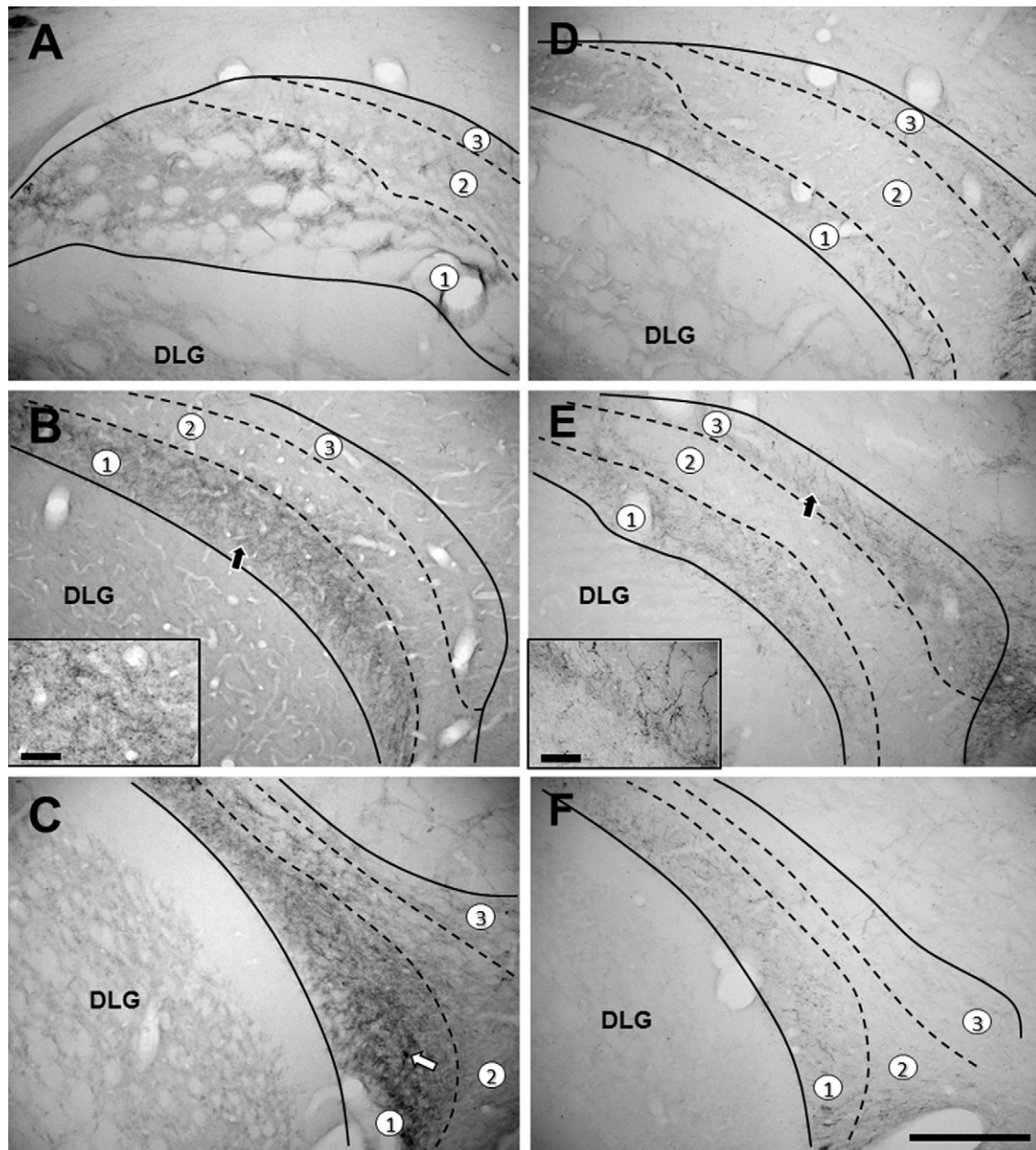


Fig. 6. Photomicrographs of the brain sections of *Callithrix jacchus* showing the components of PGN in bright field. (A, B and C) Immunoreactivity against ENK in the PGN at rostral, middle and caudal levels, respectively. (D, E and F) Immunoreactivity against SP in the PGN at rostral, middle and caudal levels, respectively. (1) Pregeniculate nucleus inner lamina; PGNil, (2) pregeniculate nucleus ventral outer lamina; PGNvol and (3) pregeniculate nucleus dorsal outer lamina; PGNdol. The magnification of the square delimited area is shown in details in the upper-right corner each respectively pictures. DLG (dorsal lateral geniculate nucleus). Scale bar 300 μ m.

reviewed carefully since some studies consider the RT to be a lateral component of the PGN (Livingston and Mustari, 2000).

There is debate in the literature whether or not the primate PGN corresponds to the IGL and VLG of rodents (Moore, 1993). The Nissl method reveals small neurons and oval perikarya in the IGL (Hickey and Spear, 1976). A second type of neuron can be found in Golgi preparations, which occupies the most rostral portion, has a soma and dendritic pleomorphic than of the caudal region. In the latter preparations, the morphology of neuronal cells more closely resembles that seen by Nissl staining, with the observation of more elongated neurons (Moore and Card, 1994). The VLG can be divided into two subsectors based on neuronal morphology, i.e., an internal and an external layer. VLG neurons in the external layer are polygonal and are larger than in the internal layer as can be seen by Nissl staining (Rockel et al., 1972; Swanson et al., 1974). The same neuronal morphological diversity as described for the rodent IGL

and VLG was observed in the marmoset PGN. The PGNil presented the same cell diversity as the IGL, and the PGNvol and PGNdol showed the same diversity as the VLG. However, the two neuronal populations described for the PGNvol and PGNdol were evenly distributed, whereas in the VLG these two cell types are topographically organized, establishing two subsectors. However, the most densely distributed cell population was observed in the PGNvol. Retinal projections and neurochemical analysis were essential to draw more accurate conclusions of whether or not these structures are homologous.

NeuN is a neuron-specific protein that is important for differentiation and neuronal function (Mullen et al., 1992). No immunoreactivity to this protein has been detected in glial cells. Although NeuN is considered to be a nuclear protein, it is also found in the cytoplasm but staining is less intense than in the nucleus (Mullen et al., 1992). The PGN of the common marmoset

(*Callithrix jacchus*) expressed strong NeuN immunoreactivity, confirming the results obtained by Nissl staining and permitting better visualization of neuron morphology and distribution. Differently, no NeuN-labeled neurons were detected in the PGN of the capuchin monkey (*Cebus apella*) (Nascimento et al., 2010). NeuN may be an important neuro-regulatory molecule and its absence in some neuronal cell types suggests that other molecules assume this role in NeuN-negative neurons (Mullen et al., 1992). Comparison of the expression of this protein between primate and non-primate species may contribute to the understanding of the role of NeuN as a neuronal marker in this physiological system. The fact that there are no studies on NeuN immunoreactivity in the rodent IGL and VLG significantly limits our discussion.

4.2. Retinal projections

In rats, the pattern of retinal afferents is a peculiar feature that can be used to characterize and differentiate components of the lateral geniculate complex (Moore, 1993). In these animals, retinal afferents show a characteristic distribution in the IGL and VLG, with these projections generally presenting a discrete (Moore and Card, 1994) or strongly contralateral predominance (Goel et al., 1999) in the IGL, whereas the VLG almost exclusively receives contralateral retinal fibers (Moore, 1993). Bilateral retinal projections to the ventral portion of the PGN were identified in macaque monkeys, but no fibers or terminals were found in the dorsal region (Jones, 2007). The presence of bilateral fibers and terminals has already been demonstrated in the PGN of the marmoset, with these projections being concentrated in the ventral portion and sparse in the dorsal area (Costa et al., 1998). A comparative analysis between monkeys and humans suggests that the ventral portion of the PGN, which receives bilateral retinal projections and is closer to the DLG, would be equivalent to the rodent IGL and the furthest corresponds to the VLG since it almost exclusively receives contralateral fibers (Moore, 1993).

The ipsilateral retinal projections to the IGL of the lateral geniculate complex of the rodent thalamus are in contrast to the lack of labeling in the DLG and VLG. This clearly delimits the IGL of these animals (Moore and Card, 1994; Goel et al., 1999). On the basis of these findings, the CTb-immunoreactive terminals found in the ipsilateral PGN of the marmoset in this study suggest that this region is homologous to the rodent IGL. We therefore conclude that the labeled part in the PGNil corresponds to the rodent IGL. The VLG of rodents consists of an internal and an external portion, with the latter receiving almost all retinal fibers (Swanson et al., 1974; Hickey and Spear, 1976). Thus, the staining pattern in the outer portion of the PGN indicates that the PGNvol (layer 2) is equivalent to the external portion of the VLG and the PGNdol (layer 3) corresponds to the internal portion, suggesting that the outer portion of the PGN is homologous to the rodent VLG.

We therefore believe that the organization of retinal afferents in the IGL and VLG of rodents is phylogenetically preserved in the marmoset PGN.

Another interesting aspect is that retinal fibers make synaptic contact with NPY- and enkephalin-immunoreactive neurons in the IGL of rats (Takatsuji et al., 1991). In the present study, cells with the same neurochemical pattern were observed in the PGN. Comparative analysis of fiber location and retinal cell populations suggests that this also applies to the marmoset since NPY- and enkephalin-positive neurons were detected in a region rich in retinal fibers.

4.3. Neurochemical characteristics

4.3.1. Neuropeptide Y

In rodents, the presence of NPY immunoreactivity is used to define the anatomical limits of the IGL. NPY-immunoreactive

neurons and a moderate network of stained fibers can be seen throughout the rostrocaudal extension of the IGL, differentiating it from other nuclei in the lateral geniculate complex (Moore and Card, 1994). This nucleus also shows co-localization of NPY and GABA. These NPY-immunoreactive neurons that form the GHT are the source of NPY-immunoreactive terminals in the SCN (Moore and Card, 1994). The presence of this cell population in the marmoset PGN and of NPY-immunoreactive fibers in the ventrolateral portion of the SCN provides evidence of the existence of the GHT in this species (Costa et al., 1998). In humans, NPY-immunoreactive neurons are also found in the PGN. However, NPY-immunoreactive fibers are scattered and scarce in the SCN, whereas numerous NPY-positive cells are observed in this nucleus. This may indicate differences in the organization of the human circadian timing system compared to other mammals (Moore, 1989). In addition, our results showed the presence of NPY-positive neurons in the marmoset PGNil, forming a moderate plexus of fibers and terminals in this region and almost no projections to the outer portion. This finding suggests that the PGNil is equivalent to the IGL of rodents.

4.3.2. Enkephalin

In most rodents, enkephalin-immunoreactive neurons and fibers can be identified in the IGL and VLG (Mantyh and Kemp, 1983). With respect to morphology, enkephalin-immunoreactive neurons in the IGL are similar to those containing NPY and are densely concentrated in the caudal portion of the nucleus. These cells also co-localize with GABA and project to the contralateral IGL. Enkephalin-immunoreactive neurons are present throughout the rostrocaudal extension of the IGL, a pattern that overlaps with that of NPY-immunoreactive cells, but staining is less intense than that of NPY (Moore and Card, 1994). In hamsters, these neurons also project fibers to the SCN via the GHT (Morin and Blanchard, 1995). Since enkephalin-immunoreactive neuropil aggregates were found in the marmoset PGN, we suggest the existence of contralateral projections. However, a combined hodological and immunohistochemical approach using neural tracer and enkephalin will help clarify whether projections similar to those seen in the hamster exist in the marmoset SCN and PGN. Enkephalin-immunoreactive neurons in the rodent VLG can be identified in the transition between its inner and outer portions, with a slight predominance in the outer portion (Mantyh and Kemp, 1983). The presence of a weak neuropil staining for enkephalin in the outer portion of the marmoset PGN (PGNvol) partially corroborates with the hypothesis that this region corresponds to the rodent VLG, in that the equivalent of the VLG in primates exhibits a slightly different neurochemical organization. Scattered enkephalin-positive neurons and fibers have been detected in the PGN of the macaque monkey and only labeled fibers were observed in humans (Moore, 1993). These findings on enkephalin distribution in a specific subsector of the marmoset PGN may reflect interspecies neurochemical differences also among primates.

4.3.3. Glutamic acid decarboxylase

Immunohistochemistry using antibodies against GABA has produced variable and often unreliable results for the IGL of rodents. In contrast, GAD, an enzyme that synthesizes GABA, provides more reliable immunohistochemical results (Moore and Card, 1994).

Numerous GAD-positive neurons are found to be distributed along the IGL, in addition to a dense plexus of fibers with varicosities. The same immunoreactive pattern is seen in the VLG and DLG, with the staining being less dense in the DLG than in the IGL and VLG. There is no obvious morphological difference between GAD-positive neurons of the IGL and VLG; however, they are more densely distributed in the former (Moore and Card,

1994). The distribution of GAD-positive neurons in the PGN of the marmoset indicates a different organization when compared to the pattern described for rodents, with a predominance of GAD immunoreactivity in the PGNvol. GAD co-localized with NPY or enkephalin may not exist in this species since the latter neurotransmitters were only detected in the PGNil. Assuming that the GHT and reciprocal connections exist between PGNs and exhibit the same neurochemical organization as found in rodents, both layers of the PGN would contribute to the formation of these pathways.

4.3.4. Serotonin

A dense plexus of 5-HT-immunoreactive fibers and terminals is found in the IGL and VLG of several rodent species (Moore and Card, 1994; Mantyh and Kemp, 1983). The lateral geniculate complex of rats contains immunoreactive columns of serotonin fibers and terminals running in the dorsal-ventral direction. These fibers have a striking striated pattern and many varicosities, which are most intense in the IGL and the magnocellular aspect of the VLG (Amir et al., 1998). Serotonergic projections to the IGL originate in the dorsal raphe nucleus and functional analysis indicates that behavioral activation induces phase shifts of rhythms through these projections (Morin and Allen, 2006). The pattern of distribution of 5-HT fibers in the marmoset PGN seems to be homogeneous in all layers. The presence of varicosities and the widespread non-oriented fibers in the PGN may be indicative that the serotonergic system may have a modulatory, diffuse action upon that nucleus. Non-photic information is evolutionarily most important for rodents, since they are mostly nocturnal. The serotonergic system acts by conveying non-photic information for the IGL and the oriented organization of these fibers may indicate a more refined and selective function. High concentrations of 5-HT in the PGN suggests a role of this neurotransmitter in the control of behavioral state and biological rhythmicity in this species. The identification of 5-HT-immunoreactive neurons in midbrain raphe nuclei combined with hodological techniques is needed to draw conclusions regarding the origin of fibers in the PGN.

4.3.5. Substance P

The origin of SP-immunoreactive fibers in the rodent IGL and VLG is unclear (Morin et al., 1992; Piggins et al., 2001). One possibility is that these fibers originate from retinal ganglion cells, as demonstrated in the SCN where they overlap with retinohypothalamic tract fibers and terminals (Takatsuji et al., 1991; Mikkelsen and Larsen, 1993). Several studies have demonstrated the importance of SP for the control of biological rhythms. Injecting SP into the SCN promotes an increase in their metabolic activity (Shibata et al., 1992), blocking its receptor (NK1) promotes a significant change in phases of the rhythms under certain experimental conditions (Challet et al., 2001).

A moderate to high density SP staining of fibers and terminals is observed in the IGL of the rat, hamster and mouse. Most of these fibers have few varicosities. A sparse to moderate staining of fibers and terminals is found in the internal portion of the VLG of those animals, with the fibers presenting few varicosities. Furthermore, no cell bodies are identified at any level of the lateral geniculate complex (Piggins et al., 2001). In the marmoset, the marked concentrations of SP-positive fibers in the PGNil and PGNdol indicate a high degree of phylogenetic conservation in the organization of these fibers. This suggestion is supported by the demonstration of SP immunoreactivity in the IGL and VLG of rodents. Fibers are well labeled in the IGL, whereas in the VLG fibers are mainly concentrated in the internal portion of this nucleus (Moore and Card, 1994; Piggins et al., 2001). The marmoset PGN shows a moderate plexus of fibers with some varicosities distributed mainly in the intermediate and caudal levels, similar to

rodents. Thus, the two labeled regions found in the marmoset PGN (PGNil and PGNdol) may be homologous to the IGL and internal portion of the VLG, respectively. No SP immunoreactivity is detected in the PGNvol or external portion of the VLG.

5. Conclusion

The PGN of primates shows several similarities to the IGL and VLG of rodents. Cytoarchitecture, retinal projections and neurochemical analysis identified subsectors in the PGN that seem to be homologous to the IGL and VLG. In this respect, the characteristics of the PGNil identified in this study suggest this structure to be homologous to the rodent IGL. Further hodological, electrophysiological and gene expression studies are needed to define the anatomical organization and physiological role of the PGN in the primate circadian timing system.

Acknowledgements

This study was supported by CNPq, CAPES, PROPESQ-UFRN and FAPESP.

References

- Albers, H.E., Ferris, C.F., Leeman, S.E., Goldman, B.D., 1984. Avian pancreatic polypeptide phase shifts hamster circadian rhythms when microinjected into the suprachiasmatic region. *Science* 223, 883–885.
- Amir, S., Robinson, B., Ratovitski, T., Rea, M.A., Stewart, J., Simantov, R., 1998. A role for serotonin in circadian system revealed by the distribution of serotonin transporter and light-induced fos immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet. *Neuroscience* 84 (4), 1059–1073.
- Aronin, N., Sagar, S.M., Sharp, F.R., Schwartz, W.J., 1990. Light regulates expression of a Fos-related protein in rat suprachiasmatic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 5959–5962.
- Babb, R.S., 1980. The pregeniculate nucleus of the monkey (*Macaca mulatta*): I. A study at the light microscopy level. *Journal of Comparative Neurology* 190, 651–672.
- Balado, M., Franke, E., 1937. Das Corpus Geniculatum Externum, Eine Anatomische-Klinische Studie. In: *Monographien aus dem Gesamtgebiete der Neurologie und Psychiatrie*, Heft 62, Springer-Verlag, Berlin.
- Biello, S.M., Harrington, M.E., Mason, R., 1991. Geniculo-hypothalamic tract lesions block chlordiazepoxide-induced phase advances in Syrian hamsters. *Brain Research* 552, 47–52.
- Cavalcante, J.S., Pontes, A.L.B., Engelberth, R.C.G.J., Cavalcante, J.C., Nascimento Jr., E.S., Borda, J.S., Pinato, L., Costa, M.S.M.O., Toledo, C.A.B., 2011. 5-HT_{1B} receptor in the suprachiasmatic nucleus of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neuroscience Letters* 488, 6–10.
- Cavalcante, J.S., Britto, L.G.R., Toledo, C.A.B., Nascimento Jr., E.S., Lima, R.R.M., Pontes, A.L.B., Costa, M.S.M.O., 2008. Calcium-binding proteins in the circadian centers of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the rock cavy (*Kerodon rupestris*) brains. *Brain Research Bulletin* 76, 354–360.
- Cavalcante, J.S., Nascimento Jr., E.S., Costa, M.S.M.O., 2006. Componentes centrais do sistema de temporização circadiana: o núcleo supraquiasmático e o folheto intergeniculato. *Neuroscience* 3, 273–282.
- Cavalcante, J.S., Alves, A.S., Costa, M.S.M.O., Britto, L.R.G., 2002. Differential distribution of afferents containing serotonin and neuropeptide Y within the marmoset suprachiasmatic nucleus. *Brain Research* 927, 200–203.
- Challet, E., Dugovic, C., Turek, F.W., Olivier, V.R., 2001. The selective neurokinin 1 receptor antagonist R116301 modulates photic responses of the hamster circadian system. *Neuropharmacology* 40, 408–415.
- Chevassus-Au-Louis, N., Cooper, H.M., 1998. Is there a geniculohypothalamic tract in primates? A comparative immunohistochemical study in the circadian system of strepsirrhine and haplorhine species. *Brain Research* 805, 213–219.
- Costa, M.S.M.O., Santee, U.R., Cavalcante, J.S., Moraes, P.R.A., Santos, N.P., Britto, L.R.G., 1999. Retinohypothalamic projections in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): a study using cholera toxin subunit B. *Journal of Comparative Neurology* 415 (3), 393–403.
- Costa, M.S.M.O., Moreira, L.F., Alones, V., Lu, J., Santee, U.R., Cavalcante, J.S., Moraes, P.R.A., Britto, L.R.G., Menaker, M., 1998. Characterization of the circadian system in a Brazilian species of monkey (*Callithrix jacchus*): Immunohistochemical analysis and retinal projections. *Biological Rhythm Research* 29, 510–520.
- Gillette, M.U., 1991. SCN electrophysiology in vitro: rhythmic activity and endogenous clock properties. In: Klein, D.C., Moore, R.Y., Reppert, S.M. (Eds.), *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 125–143.
- Goel, N., Lee, T.M., Smale, L., 1999. Suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet in the diurnal rodent (*Octodon degus*): retinal projections and immunocytochemical characterization. *Neuroscience* 92, 1491–1509.
- Golombek, D.A., Rosenstein, R.E., 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiological Reviews* 90 (3), 1063–1102.

- Harrington, M.E., Rusak, B., 1988. Ablation of the geniculo-hypothalamic tract alters circadian activity rhythms of hamsters housed under constant light. *Physiology and Behavior* 42 (2), 183–189.
- Hendrickson, A.E., 1973. The pregeniculate nucleus of the monkey. *Anatomical Record* 175, 341.
- Hickey, T.L., Spear, P.D., 1976. Retinogeniculate projections in hooded and albino rats. *Experimental Brain Research* 24, 523–529.
- Huhman, K.L., Albers, H.E., 1994. Neuropeptide Y microinjected into the suprachiasmatic region phase shifts circadian rhythms in constant darkness. *Peptides* 15 (8), 1475–1478.
- Janik, D., Mikkelsen, J.D., Mrosovsky, N., 1995. Cellular colocalization of Fos and neuropeptide Y in the intergeniculate leaflet after nonphotic phase-shifting events. *Brain Research* 698 (1–2), 137–145.
- Janik, D., Mrosovsky, N., 1994. Intergeniculate leaflet lesions and behaviorally-induced shifts of circadian rhythms. *Brain Research* 651 (1–2), 174–182.
- Jiao, Y.-Y., Lee, T.M., Rusak, B., 1999. Photic responses of suprachiasmatic area neurons in diurnal degus (*Octodon degus*) and nocturnal rats (*Rattus norvegicus*). *Brain Research* 817 (1–2), 93–103.
- Johnson, R.F., Morin, L.P., Moore, R.Y., 1989. Lateral geniculate lesions alter circadian activity rhythms in the hamster. *Brain Research Bulletin* 22, 411–422.
- Jones, E.G., 2007. *The Thalamus*, second ed. Cambridge University Press, New York.
- Krajnak, K., Dickenson, L., Lee, T.M., 1997. The induction of Fos-like proteins in the suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflet by light pulses in Degus (*Octodon degus*) and rats. *Journal of Biological Rhythms* 12 (5), 401–412.
- Livingston, C.A., Mustari, M.J., 2000. The anatomical organization of the macaque pregeniculate complex. *Brain Research* 876, 166–179.
- Mantyh, P.W., Kemp, J.A., 1983. The distribution of putative neurotransmitters in the lateral geniculate nucleus of the rat. *Brain Research* 288 (1–2), 344–348.
- Meyer-Bernstein, E.L., Harrington, M.E., Rahamani, T., 1993. A phase-response curve to the benzodiazepine chlordiazepoxide and effect of geniculo-hypothalamic tract ablation. *Physiology and Behavior* 53, 58–63.
- Mikkelsen, J.D., Larsen, P.J., 1993. Substance P in the suprachiasmatic nucleus of the rat: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Histochemistry* 100, 3–16.
- Moore, R.Y., 1993. Organization of the primate circadian system. *Journal of Biological Rhythms* 8, 3–9.
- Moore, R.Y., 1989. The geniculohypothalamic tract in monkey and man. *Brain Research* 486, 190–194.
- Moore, R.Y., Card, J.P., 1994. Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *Journal of Comparative Neurology* 344, 403–430.
- Moore, R.Y., Eichler, V.B., 1972. Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain Research* 42, 201–206.
- Morin, L.P., 2007. SCN organization reconsidered. *Journal of Biological Rhythms* 22 (1), 3–13.
- Morin, L.P., Allen, C.N., 2006. The circadian visual system. *Brain Research Reviews* 51, 1–60.
- Morin, L.P., Blanchard, J.H., 1995. Organization of the hamster intergeniculate leaflet: NPY and ENK projections to the suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet and posterior limitans nucleus. *Visual Neuroscience* 12, 57–67.
- Morin, L.P., Blanchard, J.H., Moore, R.Y., 1992. Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the hamster. *Visual Neuroscience* 8, 219–230.
- Mullen, R.J., Buck, C.R., Smith, A.M., 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201–211.
- Nascimento, R.B.S., Borda, J.S., Engelberth, R.C.G.J., Medeiros, R.O., Frazão, R., Pinato, L., Pontes, A.L.B., Nascimento Jr., E.S., Nogueira, M.I., Cruz-Rizzolo, R.J., Costa, M.S.M.O., Cavalcante, J.S., 2010. The presence of neuronal-specific nuclear protein (NeuN) in the circadian timing system of the capuchin monkey (*Cebus paella*). *Sleep Science* 3 (1), 36–39.
- Nascimento Jr., E.S., Cavalcante, J.S., Cavalcante, J.C., Costa, M.S.M.O., 2010. Retinal afferents to the thalamic mediodorsal nucleus in the rock cavy (*Kerodon rupestris*). *Neuroscience Letters* 475 (1), 38–43.
- Niimi, K., Kaneseke, T., Takimoto, T., 1963. The comparative anatomy of the ventral nucleus of the lateral geniculate body in mammals. *Journal of Comparative Neurology* 121, 313–324.
- Pickard, G.E., 1994. Intergeniculate leaflet ablation alters circadian rhythms in the mouse. *Neuroreport* 5, 2186–2188.
- Piggins, H.D., Samuels, R.E., Coogan, A.N., Cutler, D.J., 2001. Distribution of substance P and neurokinin-1 receptor immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflet of hamster, mouse, and rat. *Journal of Comparative Neurology* 438, 50–65.
- Pinato, L., Frazão, R., Cruz-Rizzolo, R.J., Cavalcante, J.S., Nogueira, M.I., 2009. Immunocytochemical characterization of the pregeniculate nucleus and distribution of retinal and neuropeptide Y terminals in the suprachiasmatic nucleus of the *Cebus* monkey. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 37 (4), 207–213.
- Polyak, S., 1957. The pregeniculate gray nucleus and the pupillary reflex pathway. In: Klüver, H. (Ed.), *The Vertebrate Visual System*. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Ramanathan, C., Nunez, A.A., Martinez, G.S., Schwartz, M.D., Smale, L., 2006. 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 Research* 1073/1074, 348–358.
- Ribak, C.E., Peters, A., 1975. An autoradiographic study of the projections from the lateral geniculate body of the rat. *Brain Research* 92, 241–268.
- Rockel, A.J., Heath, C.J., Jones, E.G., 1972. Afferent connections to diencephalon in the marsupial phalanger and the question of sensory convergence in the "posterior group" of the thalamus. *Journal of Comparative Neurology* 145, 105–130.
- Schwartz, W.J., 1991. SCN metabolic activity in vitro. In: Klein, D.C., Moore, R.Y., Ruppert, S.M. (Eds.), *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 157–190.
- Shibata, S., Tsuneyoshi, A., Hamada, T., Tominaga, K., Watanabe, S., 1992. Effect of substance P on circadian rhythms of firing activity and the 2-deoxyglucose uptake in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Research* 597, 257–263.
- Stephan, F.K., Zucker, I., 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69, 1583–1586.
- Swanson, L.W., Cowan, W.M., Jones, E.G., 1974. An autoradiographic study of the efferent connections of the ventral geniculate nucleus in the albino rat and the cat. *Journal of Comparative Neurology* 56, 143–164.
- Takatsujii, K., Miguel-Hidalgo, J.J., Tohyama, M., 1991. Retinal fibers make synaptic contact with neuropeptide Y and enkephalin immunoreactive neurons in the intergeniculate leaflet of the rat. *Neuroscience Letters* 125, 73–76.
- Ukai, H., Ueda, H.R., 2010. Systems biology of mammalian circadian clocks. *Annual Review of Physiology* 72, 579–603.
- Vosko, A.M., Hagenauer, M.H., Hummer, D.L., Lee, T.M., 2009. Period gene expression in the diurnal degu (*Octodon degus*) differs from the nocturnal laboratory rat (*Rattus norvegicus*). *American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 296 (2), 353–361.