

RAISSA RODRIGUES DE LIMA

**A Zona Incerta no sagüi (*Callithrix jacchus*): Análise Citoarquitetônica,
Neuroquímica e Projeção Retiniana**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Rio Grande do Norte, para
obtenção do título de Mestre em
Psicobiologia.**

**Natal-RN
2008**

RAISSA RODRIGUES DE LIMA

**A Zona Incerta no sagüi (*Callithrix jacchus*): Análise citoarquitetônica,
neuroquímica e projeção retiniana**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Rio Grande do Norte, para
obtenção do título de Mestre em
Psicobiologia.**

Orientador: Jeferson de Souza Cavalcante

**Natal-RN
2008**

Título

A Zona Incerta no sagüi (*Callithrix jacchus*): Projeção retiniana e análise neuroquímica

Autor

RAISSA RODRIGUES DE LIMA

Data da Defesa

30 / 10 / 2008

Banca Examinadora

Prof^a Luciana Pinato
Universidade de São Paulo, USP

Prof^a Miriam Stela Maris de Oliveira Costa
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN

Prof^o Jeferson de Souza Cavalcante
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN

“... Pra que tanta pressa de chegar
A nenhum lugar se não se tem
Convicção pra acreditar
Que quem espera vê além ...”

Adryana Ribeiro

*“Aos meus pais **Ana Maria Corsino Rodrigues de Lima e Francisco Gomes de Lima** dedico este trabalho pela contribuição primordial, sem a qual não teria chegado à finalização de mais essa etapa em minha vida. Com o amor e cuidado, a confiança, o amparo e a consolação na presença constante, quando na ausência física, fortaleceram-me quando eu sentia o peso da responsabilidade aliada ao cansaço. A eles agradeço todas as conquistas em minha vida”.*

AGRADECIMENTOS

“À **Força Divina** que sempre me guia e me ilumina em todos os momentos de minha vida, e pela qual sou eternamente grata”.

“Ao meu orientador Prof. Dr. **Jeferson de Souza Cavalcante** pela colaboração dedicada e pela experiência que serviram de aprendizado e motivação para que eu siga em frente”.

“À Prof^ª. Dr^ª **Miriam Stela M. O. Costa** do Laboratório de Neuroanatomia pela contribuição do exemplo, do caráter e da profissional que com toda sua simplicidade acolhe a nós iniciantes de forma ‘humana’ e calorosa”.

“Aos meus irmãos **Carlos Odilon e Caio César** pela força, e a todos os familiares que me apoiaram, acolheram e torceram por mim, principalmente nos momentos mais difíceis”.

“Aos meus amigos queridos, em especial a **Maria Lúcia Lira de Andrade** e **Maria Luciana Lira de Andrade**, que fazem parte da minha vida e que me ajudaram sempre através da cumplicidade, do amor e incentivo aos meus ideais”.

“Às amigas da graduação, **Ana Luíza C. Gouveia** e **Andrea Dantas de Medeiros**, pela amizade constante, pelas palavras de entusiasmo assim como pelas alegres conversas que me ajudaram a superar o estresse do dia-a-dia”.

“Aos amigos e colegas do Laboratório de Neuroanatomia: **Ruthnaldo Lima, Francimar Santos, Renata Duarte, Rovena Engelberth, André Pontes, Márcia Albuquerque, Regina Oliveira, Twyla Barros, Rayane Nascimento, Janáina Borda, Talyta Albuquerque, Leandro Freitas, Expedito Nascimento Jr, e Sebastião Franco**, e à turma de Psicobiologia de 2006, pela ajuda, pelo apoio, companheirismo, coleguismo e pelos momentos alegres de confraternizações, mostrando-me que o valor de um trabalho construído em conjunto rende frutos verdadeiramente mais saudáveis, construtivos e recompensadores”.

“Aos professores da Psicobiologia pela partilha do conhecimento para a construção dos mestres da turma de 2006”.

“Aos funcionários do Núcleo de Primatologia da UFRN por colaborarem de forma harmoniosa”.

“A Marília Gabryella Santos de Andrade e Maria das Graças Cavalcanti da Secretaria da Pós-graduação e da Fisiologia da UFRN pelo atendimento agradável e atencioso, assim como pela torcida positiva”.

“Aos demais funcionários do Departamento de Fisiologia e Morfologia da UFRN”.

“À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro à pesquisa”.

LISTA DE ABREVIATURAS

3v = Terceiro Ventrículo

5-HT = Serotonina

APP = Polipeptídio Pancreático de Aves

AV = Núcleo Antero Ventral

CB = Calbindina

CF = Campo de Forel

CI = Cápsula Interna

CM = Corpos Mamilares

CS = Colículo Superior

CTb = Subunidade B da Toxina Colérica

FIG = Folheto Intergeniculado

FLM = Fascículo Longitudinal Medial

GABA = Ácido gama-aminobutírico

GFAP = Proteína Fibrilar Estrutural de Astrócito da Glia

GLD = Núcleo Geniculado Lateral Dorsal

GLU = Glutamato

GLV = Núcleo Geniculado Lateral ventral

Hp = Hipocampo

MD = Núcleo Mediodorsal do Tálamo

MET = Lâmina Medular Externa

NeuN = proteína neuronal nuclear específica

NOS = Sintase do óxido Nítrico

NPG = Núcleo Pré-Geniculado

NPY = Neuropeptídeo Y

NSQ = Núcleo Supraquiasmático

PC = Pedúnculo Cerebral

PCM = Pedúnculo Cerebelar Médio

Put = Putamem

PV = Parvalbumina

PvT = Núcleo Paraventricular do Tálamo

RT = Núcleo Reticular do Tálamo

Sbt = Núcleo Subtalâmico

SNC = Substância Negra Compacta

SND = Substância Negra Difusa

SS = Somatostatina

TGH = Trato Geniculo-Hipotalâmico

TH = Tirosina Hidroxilase

TO = Trato Óptico

TRH = Trato Retino-Hipotalâmico

VIP = Polipeptídio Intestinal Vasoativo

VP = Vasopressina

ZI = Zona Incerta

ZIdm = Zona Incerta Dorsomedial

ZIvl = Zona Incerta Ventrolateral

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1 – Discriminação dos reagentes utilizados na imuno-histoquímica.

FIG. 1 – Citoarquitetura da Zona Incerta do sagüi (técnica de Nissl).

FIG. 2 – Imunorreatividade contra NeuN na Zona Incerta do sagüi.

FIG. 3 – Imunorreatividade contra CTb na Zona Incerta do sagüi.

FIG. 4 – Imunorreatividade contra GFAP na Zona Incerta do sagüi.

FIG. 5 – Imunorreatividade contra CB na Zona Incerta do sagüi.

FIG. 6 - Imunorreatividade contra PV na Zona Incerta do sagüi.

FIG. 7 – Imunorreatividade contra CR na Zona Incerta do sagüi.

FIG. 8 – Imunorreatividade contra VIP na Zona Incerta do sagüi.

FIG. 9 – Imunorreatividade contra VP na Zona Incerta do sagüi.

FIG. 10 – Imunorreatividade contra GABA na Zona Incerta do sagüi

FIG. 11 – Imunorreatividade contra 5-HT na Zona Incerta do sagüi.

FIG. 12 – Esquema ilustrativo das subdivisões da ZI em roedores.

SUMÁRIO:

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Projeções Retinianas.....	16
1.2 Projeções Retinianas para áreas classicamente não-retinorecipientes....	19
1.3 Zona Incerta (ZI)	20
1.3.1. Subdivisões da ZI.....	20
1.3.2 Hodologia da ZI	21
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Sujeito	24
4.2 Injeção de CTb	25
4.3 Perfusão	25
4.4 Remoção do encéfalo e microtomia.....	26
4.5 Coloração citoarquitetônica.....	26
4.6 Imuno-histoquímica.....	27
4.7 Análise dos resultados	30
5. RESULTADOS	30
5.1 – Citoarquitetura	30
5.1.1. Nissl	30
5.1.2. NeuN.....	31
5.2. Projeções Retinianas.....	31

5.3 - GFAP	31
5.4 - Proteínas ligantes de cálcio	32
5.4.1. CB	32
5.4.2. PV	32
5.4.3. CR.....	32
5.5 - VIP	33
5.6 - VP	33
5.7 - GABA.....	33
5.8 - 5-HT	33
Figura 1.....	34
Figura 2.....	35
Figura 3.....	36
Figura 4.....	37
Figura 5.....	38
Figura 6.....	39
Figura 7.....	40
Figura 8.....	41
Figura 9.....	42
Figura 10.....	43
Figura 11.....	44
6. DISCUSSÃO.....	45
6.1 – Citoarquitetura	45
6.1.1 - Nissl.....	45

6.1.2 - NeuN	48
6.2 – Projeções Retinianas.....	49
6.3 - GFAP	51
6.4 - Proteínas Ligantes de cálcio (PLCa).....	52
6.4.1 - CB.....	52
6.4.2 - PV	54
6.4.3 - CR	58
6.5 - VIP	59
6.6 - VP.....	60
6.7 - GABA.....	60
6.8 - 5-HT	64
7. CONCLUSÕES.....	67
8. PERSPECTIVAS.....	68
9. REFERÊNCIAS.....	69
10. ANEXO	96

RESUMO

As projeções retinianas em mamíferos costumam ser agrupadas, classicamente, em três grandes sistemas funcionais: O sistema visual primário, o sistema óptico acessório e o sistema de temporização circadiana. Porém as projeções retinianas também alcançam locais considerados como classicamente não-visuais, um dos quais agrupa os neurônios da zona incerta (ZI), alvo deste estudo.

O sistema visual primário inclui o complexo geniculado lateral talâmico formado pelo núcleo geniculado lateral dorsal, o folheto intergeniculado e o núcleo geniculado lateral ventral, além de outros componentes. O sistema óptico acessório é formado por pequenos núcleos: núcleos terminais dorsal, lateral, medial e o núcleo intersticial do fascículo posterior superior. Estes núcleos participam da atividade visuo-motora. O sistema de temporização circadiana é composto pelo núcleo supraquiasmático do hipotálamo, tido como principal marcapasso circadiano, vias sincronizadoras e vias de saída aos efetores, e o folheto intergeniculado, que parece agir como modulador do marcapasso. As projeções retinianas também alcançam áreas classicamente não-visuais, entre elas, a zona incerta. Esta região está localizada no tálamo ventral e tem sido implicada em várias propriedades funcionais incluindo processamento somato-sensório e nociceptivo, resposta motora, comportamento sócio-sexual, de comer e beber, em sintomas de doenças neurodegenerativas, despertar e atenção. Apresenta também conexão com diversas áreas do sistema nervoso central proporcionando a esta região a associação com diversas funções.

O objetivo neste trabalho foi caracterizar a projeção retiniana no *Callithrix jacchus* (sagüi), um primata do Novo Mundo, através do traçador anterógrado a unidade B da toxina colérica, bem como analisar a citoarquitetura, utilizando o Nissl e NeuN, e a neuroquímica com substâncias neuroativas como a serotonina, o GABA, o VIP, VP, além de GFAP e proteínas ligantes de cálcio.

A zona incerta apresentou uma divisão diferenciada da presente na literatura na citoarquitetura, tanto pelo método de Nissl como neuroquímico por NeuN, com uma subdivisão ventrolateral e dorsomedial. A neuroquímica para as outras

substâncias corrobora com essa divisão. O GFAP foi quase em completo negativo para a ZI, resultado este ainda não evidenciado em trabalhos anteriores. A projeção retiniana no sagüi, diferentemente de outros primatas, e roedores, alcançou a porção caudal somente. Este trabalho contribui para que novos estudos sejam realizados tomando por base essa subdivisão bem como a localização das substâncias neuroativas associadas a possíveis comportamentos em que a zona incerta esteja envolvida.

Palavras-chave: Zona incerta, projeção retiniana, neuroquímica, *Callithrix jacchus*

ABSTRACT

The retinal projections in mammals usually reach, classically, three major functional systems: the primary visual system, the accessory optic system, and the circadian timing system. But the retinal projections also reach areas classically considered non-visual, one of which groups the neurons of the zona incerta (ZI), target this study.

The primary visual system includes thalamic lateral geniculate complex is formed by the dorsal lateral geniculate nucleus, intergeniculate leaflet and the ventral lateral geniculate nucleus and other components. The accessory optic system is composed of the small nuclei: nuclei terminal dorsal, lateral, medial and the interstitial nucleus of the superior posterior fasciculus. These nuclei are involved in visuo-motor activities. The circadian timing system is comprised of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus, that act as master circadian pacemaker, entraining pathways and efferents pathways to the effectors, and the intergeniculate leaflet, that seems to act as a modulator of the pacemaker. The retinal projections too reach classically considered non-visual areas, including the zona incerta. This region is localized in the ventral thalamus and has been implicated in various functional properties including nociceptive and somatosensory processing, motor response, sociosexual behaviour, feeding and drinking, in symptoms of neurodegenerative diseases, arousal and attention. It also displays connection with several areas of central nervous system.

The aim of this study was characterize the retinal projection in the zona incerta of *Callithrix jacchus* (sagüi), a primate of the New World through the anterograde axonal transport of the cholera toxin subunit b and analyze the citoarchicteture using Nissl and NeuN, and neurochemical substances such as serotonin, GABA, VIP, VP, GFAP and binding-calcium proteins.

The zona incerta showed a different division of the literature in citoarquitectura, both by means of Nissl as neurochemical by NeuN, with a subdivision ventrolateral and dorsomedial. The neurochemical to the other substances corroborate with this subdivision. The GFAP was almost completely negative for the zona incerta, result non evidenced in previous studies yet. The

retinal projection in sagüi, unlike other primates and rodents, reached the caudal portion only. This work helps to make further studies are conducted based on this subdivision and the localization of the neurochemical substances associated with possible behaviors that the zona incerta is involved.

Keywords: Zona incerta, retinal projection, neurochemistry, *Callithrix jacchus*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Projeções Retinianas

As projeções retinianas em mamíferos costumam ser agrupadas, classicamente, em três grandes sistemas funcionais: O sistema visual primário, o sistema óptico acessório e o sistema de temporização circadiana (Kaas e Huerta, 1988). Porém as projeções retinianas também alcançam locais considerados como classicamente não-retinorecipientes, um dos quais agrupa os neurônios da zona incerta (ZI), alvo deste estudo.

No sistema visual primário, o núcleo geniculado lateral dorsal (GLD) recebe uma expressiva inervação da retina, sendo o maior e mais bem conhecido relê no caminho para o córtex visual primário de mamíferos. Já o núcleo geniculado lateral ventral (GLV), também alvo retino-recipiente do sistema visual primário, é normalmente dividido numa camada interna, mais medial e uma camada mais externa, mais lateral, em roedores (ver Jones, 2007). Outro componente retino-recipiente é o complexo pré-tectal que compreende um conjunto de núcleos situados na transição mesodiencefálica, funcionalmente relacionado com a via do reflexo pupilar à luz e nistagmo optocinético (Hutchins e Weber, 1985). Este complexo foi estudado anatomicamente em um primata do Novo Mundo, o macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) (Weber, 1985), no qual foram definidos cinco núcleos: pré-tectal anterior, posterior e medial, do trato óptico e olivar pré-tectal, todos eles recebendo projeção retiniana (Hutchins e Weber, 1985). Ainda no sistema visual primário, o colículo superior (CS) é uma importante estação visual subcortical que se apresenta como uma estrutura laminada, contendo em geral sete camadas em primatas e em outros mamíferos, e que ocupa o tecto rostral do mesencéfalo recebendo inervação da retina basicamente sobre suas camadas superficiais (Kaas e Huerta, 1988). O CS tem um duplo papel na visão, participando da transmissão de informação visual para estruturas talâmicas associadas com a percepção visual e com a conversão de informações visuais e de outros tipos em sinais de controle dos movimentos da cabeça e dos olhos (Kaas e Huerta, 1988).

O sistema óptico acessório compreende pequenos núcleos no mesencéfalo que recebem projeções da retina (Kaas e Huerta, 1988). Na maioria dos mamíferos é constituído por três núcleos: o terminal dorsal, o terminal lateral, e o terminal medial (Kaas e Huerta, 1988). Estudos na década de 1990 acrescentaram mais um núcleo a esse grupo, o núcleo intersticial do fascículo posterior superior, localizado mais rostralmente (Blanks *et al.*, 1995). Funcionalmente sabe-se que esses núcleos participam da atividade visuo-motora (Simpson, 1984).

O sistema de temporização circadiano é responsável pela geração e modulação dos ritmos circadianos que são oscilações manifestadas pelos seres vivos para a maioria das funções e comportamentos, com o período entre 20 e 28 horas, tomando como base o ciclo claro-escuro ambiental que é de aproximadamente 24 horas. Estes ritmos são comprovadamente endógenos, porém sincronizados com o ciclo claro-escuro do dia solar (ver Marques e Menna-Barreto, 2003). O sistema de temporização circadiano é constituído por um conjunto de estruturas neurais interligadas, incluindo na sua composição um marca-passo encarregado da geração do ritmo, vias sincronizadoras e vias de saída aos efetores comportamentais (Rusak e Zucker, 1979; Moore-Ede *et al.*, 1982; Meijer e Rietveld, 1989; Hastings *et al.*, 1991; Moore, 1992, 1994; Turek, 1994; Morin e Allen, 2006; Cavalcante *et al.*, 2006). As estruturas neurais que recebem projeção retiniana são os núcleos supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo e o folheto intergeniculado do tálamo (ver Cavalcante *et al.*, 2006). O NSQ é o principal marca-passo do sistema de temporização circadiano e tem sido objeto de exaustiva pesquisa nas últimas décadas, logo depois da confirmação da projeção da retina para essa área (Hendrickson *et al.*, 1972; Moore e Lenn, 1972; Moore, 1973), a qual foi denominada de trato retino-hipotalâmico (TRH). A lesão desse conjunto de células resulta na perda da ritmicidade para uma série de funções circadianas (Moore e Eichler, 1972; Stephan e Zucker, 1972), como também foi observado que estas células apresentam ritmicidade circadiana na sua frequência de disparo, que se mantém em condições ambientais constantes (Gillette, 1991), bem como na atividade metabólica (Schwartz, 1991; Newman, 1991). Na medida em que o NSQ se firmava como principal marca-passo

circadiano, um estudo realizado na década de 1970 por Ribak e Peters em ratos, mostrou que a injeção de aminoácidos marcados no GLV revelava uma projeção bilateral, com predominância ipsilateral para o NSQ e que esta projeção era restrita à região ventrolateral (Ribak e Peters, 1975). Dois anos mais tarde, Hickey e Spear, baseado na diferença das projeções retinianas para o complexo geniculado lateral do tálamo, observaram uma estrutura localizada entre o GLD e o GLV (Hickey e Spear, 1976) e a denominaram de folheto intergeniculado (FIG). Estudos posteriores verificaram conexão da região ventrolateral do NSQ e de neurônios na borda dorsal do GLV, e concluíram tratar-se de uma nova projeção ao marca-passo circadiano (Card e Moore, 1982), denominada de tracto geniculado-hipotalâmico (TGH) esta projeção que seria 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 neuropeptídeo (NPY) e o respectivo traçador revelaram que alguns neurônios NPY-positivos do FIG projetam-se para o NSQ (Harrington e Rusak, 1987). Essa região tem uma grande importância para a modulação dos ritmos circadianos em roedores, como sugerido por estudos farmacológicos e/ou combinados com estudos de lesão (Albers *et al.*, 1984; Johnson *et al.*, 1989; Biello *et al.*, 1991; Meyer-Bernstein *et al.*, 1993; Huhman e Albers, 1994; Pickard, 1994). 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 em roedores. Isto parece ser um mecanismo de “feedback” que regula a função do marca-passo, particularmente mediando o efeito sobre a atividade locomotora (Moore, 1992; 1999). Moore e Card (1994) 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, mas segundo estudos de genes de expressão imediata, o FIG responde principalmente a estímulos não-fóticos (Janik *et al.*, 1995).

1.2 Projeções Retinianas para áreas classicamente não-retinorecipientes

Estudos de projeção retiniana usando traçadores mais sensíveis e técnicas mais apuradas começaram a apontar para a existência de projeções retinianas para áreas classicamente não visuais. O hipotálamo foi bastante explorado com relação a essas projeções. A utilização de traçadores neurais mais sensíveis, tais como a toxina colérica, tornou evidente a existência de projeções para outras regiões do hipotálamo além do NSQ, em várias espécies de mamíferos como o gato (Johnson *et al.*, 1988; Murakami *et al.*, 1989), em rato (Levine *et al.*, 1991), em hamster (Youngstrom *et al.*, 1991), e em sagüi (Costa *et al.*, 1999). As áreas retino-recipientes que se destacam no hipotálamo nestes trabalhos são: área pré-óptica medial, área pré-óptica lateral, núcleo pré-óptico mediano, área hipotalâmica anterior, área hipotalâmica lateral, núcleo supraóptico, área retroquiasmática e zona subparaventricular.

Também foram descritas em várias espécies de mamíferos, projeções ópticas adicionais dirigidas a outras estruturas usualmente não consideradas como parte do sistema visual, como por exemplo, o colículo inferior no rato, macaco *Rhesus* (Itaya e Van Hoesen, 1982) e gato (Palof *et al.*, 1985), o núcleo ântero-dorsal do tálamo no mussaranho das árvores (Conrad e Stumpf, 1975) e no hamster (Youngstrom *et al.*, 1991), e até mesmo estruturas telencefálicas, tais como o tubérculo olfativo e o núcleo da banda diagonal de Broca, no hamster, coelho, ouriço, preguiça, morcego, tamanduá, hirace, e *Macaca fascicularis* (Cooper *et al.*, 1989) e em rato (Levine *et al.*, 1991). O complexo mesencefálico da rafe também tem sido alvo de diversos estudos que apontam para uma projeção direta da retina nesta área, principalmente sobre o núcleo dorsal da rafe (Foote *et al.*, 1978; Shen e Semba, 1994; Kawano *et al.*, 1996; Fite *et al.*, 1999; Fite e Janusonis, 2001; Frazão *et al.*, 2008). Outro alvo de projeção direta da retina é o complexo nuclear parabraquial, como mostra trabalhos recentes (Fite e Janusonis, 2002; Engelberth *et al.*, 2008). No sagüi, tanto a linha média do tálamo como alguns núcleos intralaminares também recebem fibras/terminais direto da retina (Cavalcante *et al.*, 2005). Em roedores, estudo com traçadores demonstrou projeção retiniana para a zona incerta nos subsetores ventral e

caudal. Desses subsectores, o caudal parece apresentar maior marcação de fibras retinianas (Power *et al.*, 2001).

Um trabalho de pós-graduação de nosso grupo apontou para projeções retinianas em diversas áreas classicamente não-retinorecipientes, entre elas a ZI (Cavalcante, 2002). Como este trabalho tinha a ênfase em áreas classicamente visuais, as características desta projeção não foram discutidas em detalhes. A ZI, principalmente em roedores, é uma região bastante abordada em estudos eletrofisiológicos e neuroquímicos, portanto, desperta certa curiosidade a respeito desta projeção. Passamos agora a descrever particularmente a ZI que é o alvo deste estudo.

1.3 Zona Incerta (ZI)

A ZI é um agrupamento neuronal derivado embriologicamente do tálamo ventral que tem sido implicada em várias propriedades funcionais incluindo o processamento somato-sensório e nociceptivo, resposta motora, comportamento sócio-sexual, de comer e beber, despertar e atenção. Constitui-se em um distrito subcortical que exibe um alto grau de convergência de informação neural de diferentes estruturas (ver Jones, 2007).

1.3.1. Subdivisões da ZI

Em algumas espécies a ZI foi dividida em subsectores, estes variam entre os autores que usam métodos diferentes ou até alguns em comum. Suas subdivisões no rato foram caracterizadas em seis porções por Kawana e Watanabe, 1981, de acordo com tamanho e forma do pericário neuronal e arranjo das células: *Pars rostro-polaris*, *Pars ventralis*, *Pars dorsalis*, *Pars caudalis*, *Pars magnocellularis* e *Pars retro-polaris* (Kawana e Watanabe, 1981). Outros estudos têm considerado quatro subsectores: rostral, caudal, ventral e dorsal, em rato (Nicoletis *et al.*, 1992; Kim *et al.* 1992; Lin *et al.*, 1995; Nicoletis *et al.*, 1995; Kolmac *et al.*, 1998; Mitrofanis e Mikuletic, 1999), macaco (Ma e hunt, 1992), e em gatos cinco subsectores incluindo a subdivisão dorsolateral, que se

estende lateralmente ao reticular talâmico (May *et al.*, 1997). Cada um desses apresenta diferentes citoarquitetura, caráter imuno-histoquímico e também vários padrões de conectividade. Com relação à imunocitoquímica em rato, em estudo demonstrou a presença de células imunorreativas à ácido gama amino-butírico (GABA) e parvalbumina (PV) principalmente no setor ventral, calbindina (CB) no setor caudal, NADPH-diaforase e glutamato (GLU) no setor dorsal, somatostatina (SS) e tirosina hidroxilase (TH) ou sintase do óxido nítrico (NOS) no setor rostral (Kolmac e Mitrofanis, 1999). Em um estudo realizado com macaco *Rhesus* (*Macaca mullata*), a ZI foi também dividida em 4 subsetores inicialmente denominados pólo anterior, lâmina superior, lâmina inferior e pólo posterior. Contudo, pela não-identificação das bordas, a subdivisão da ZI resumiu-se a duas regiões: lâmina dorsal e lâmina ventral (Ma *et al.*, 1992).

1.3.2 Hodologia da ZI

As principais aferências da ZI são originárias das seguintes regiões: retina, complexo nuclear sensorio-trigeminal, núcleo central do complexo amigdalóide, área hipotalâmica lateral e posterior, núcleo ventromedial do hipotálamo, núcleo reticular do tálamo, núcleo talâmico posterior, GLV e medial, complexo ventrobasal, área pretectal, núcleo peripeduncular, camadas intermédia e profundas do CS, colículo inferior, núcleo coclear, formação reticular mesencefálica, rafe mesencefálica, substância cinzenta periaquedutal, complexo parabraquial, pars reticulata da substância nigra, áreas perirubrais, núcleo intersticial de Cajal, núcleo reticular mesencefálico profundo, cuneiforme, núcleo cerebelar interposto e lateral, núcleo tegmental pedunculopontino, área tegmental ventral, núcleo reticular pontino, núcleo periculomotor, núcleo do trato espinhal trigeminal, pars interpolaris, núcleo grácil e cuneatus, núcleo da coluna dorsal, e várias áreas do córtex cerebral assim como: o córtex cingulado, córtex somato-sensorio primário e secundário, córtex motor primário, córtex pré-frontal, córtex estriato, cortex occipital, neocórtex temporal e núcleo supraquiasmático (Roger e Cadusseau, 1985; Petras, 1969; Mitrofanis e Mikuletic, 1999; May *et al.*, 1997; Shaw e Mitrofanis, 2001; Lechner *et al.*, 1993; Barthó *et al.*, 2002; Shammah-

Lagnado *et al.*, 1985; Çavdar *et al.*, 2006; Leak e Moore, 2001; Power *et al.*, 2001, Mitrofanis, 2002). Com relação à projeção retiniana, parece existir um subsetor que recebe aferências dos principais centros visuais do cérebro, como a retina, o GLD, o CS e o córtex occipital, localizado numa camada lateral da ZI em rato, assim também como recebe aferência do pretecto e núcleo posterior lateral do tálamo (Power *et al.*, 2001).

Com relação às eferências, a ZI de ratos origina projeções ascendentes e descendentes que alcançam estruturas do tronco cerebral (formação reticular mesencefálica, núcleo tegmentar dos pares compactos pedunculo-pontino, área parabraquial, núcleo reticular pontino oral, caudal pontino, gigantocellularis e medula oblonga, pares ventrais), núcleo precerebelar (núcleo reticular tegmentar pontino, núcleo pontino e complexo olivar inferior), camadas profundas e intermediárias do CS, núcleo pretectal (anterior, posterior e medial), núcleo periolocomotor (núcleo intersticial de Cajal, núcleo de Darkschewitsch e núcleo da comissura posterior), a porção parvocellular do núcleo rubro, substância cinzenta central, núcleo tegmentar dorsal lateral, corno ventral da medula espinhal cervical, núcleos talâmicos (parafascicular, médio central, paracentral, lateral central, núcleo talâmico ventromedial, núcleo reuniens, medial posterior), núcleo talâmico não-específico (parafascicular, médio central, paracentral, lateral central, núcleo talâmico ventromedial, núcleo reuniens), gânglio basal (núcleo intrapeduncular e globo pálido), estruturas hipotalâmicas (núcleo hipotalâmico posterior, áreas hipotalâmicas dorsal e lateral), e o distrito subpalidal dorsal da substância anonimata, núcleo supraquiasmático, banda diagonal de Broca e núcleo central da amígdala (Ricardo, 1981; Kolmac *et al.*, 1998; May *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1995; Çavdar *et al.*, 2006; Moga e Moore, 1997; Wagner *et al.*, 1995; Trageser e Keller, 2004; Power *et al.*, 2001).

2. JUSTIFICATIVA

A ZI é uma região diencefálica que apresenta uma rica rede de conexões com áreas diversas, uma neuroquímica diversificada e participação em vários comportamentos. Estudos têm sido realizados na ZI de mamíferos, principalmente em roedores, abordando a hodologia, neuroquímica e as relações funcionais como as relacionadas a processamentos nociceptivos, somato-sensórios, visuais e de participação em sintomas nas doenças neurodegenerativas. Porém, em primatas poucos relatos foram elaborados abrindo lacunas importantes, principalmente a respeito de uma projeção proveniente da retina. Portanto, como sujeito experimental utilizamos um primata do Novo Mundo, o sagüi (*Callithrix jacchus*), na expectativa de encontrar resultados de uma caracterização neuroquímica ainda não realizada em estudos anteriores, bem como da projeção retiniana nesta espécie, que possam servir de base para futuros estudos hodológicos e funcionais associados com as substâncias presentes na ZI desse primata. Por fim, evidencia-se a necessidade de compreensão desta área no maior número de espécies desta ordem zoológica.

3. OBJETIVOS

Nosso objetivo neste trabalho é mapear a projeção retiniana para a ZI do sagüi (*Callithrix jacchus*) (foto abaixo), através da injeção intra-ocular da subunidade b da toxina colérica (CTb), bem como caracterizar, por meio da técnica de imunohistoquímica, o conteúdo neuroquímico desta região visando definir possíveis subregiões desta área no sagüi.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sujeito

O sagüi (*Callithrix jacchus*) é um primata do gênero *Callithrix* pertencente à família Callitrichidae, originário do nordeste brasileiro. Caracteriza-se pelo pequeno porte, pesa de 250g a 400g, consiste em uma espécie diurna que vive em pequenos grupos familiares e é facilmente adaptável à vida em cativeiro (Erkert *et al.*, 1986; Erkert, 2008; Menezes *et al.*, 1993).



Sagüi

Foram utilizados seis animais adultos jovens, machos e fêmeas, todos provenientes do Núcleo de Primatologia de Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os animais estavam em boas condições de saúde. Todos os procedimentos utilizados estavam de acordo com as normas estabelecidas pelo guia de cuidados e uso de mamíferos em pesquisas comportamentais e neurocientíficas (2003).

4.2 Injeção de CTb

Para investigar as projeções retinianas fizemos inicialmente um rastreamento anterógrado com CTb. Sob anestesia intra-peritoneal com tiopental sódico na dose de 400 mg/kg, o animal foi colocado em um aparato de modo a facilitar o manuseio dos equipamentos. Efetuou-se uma injeção intraocular (olho esquerdo) de aproximadamente 80 µl de uma solução aquosa de CTb a 1% em tampão fosfato 0,1 M contendo também dimetil-sulfóxido a 10%. A injeção foi realizada através de uma agulha calibre 30 introduzida na junção córneo-escleral, atingindo o corpo vítreo a um ângulo de aproximadamente 45 graus. A velocidade da injeção é equivalente a 1 µl por minuto, sob pressão, com o auxílio de uma micro-bomba. Ao término da injeção, a agulha permaneceu no local durante 15 a 30 minutos a fim de evitar refluxo da solução, e o olho do animal foi lavado com salina.

4.3 Perfusão

Depois de sete dias de sobrevida, o animal foi novamente anestesiado com tiopental sódico na dose de 400 mg/kg por via peritoneal, e em seguida colocado em decúbito dorsal sob uma grade em uma capela de perfusão. A grade encontrava-se inclinada num ângulo de aproximadamente 45 graus, para favorecer a fixação do tecido nervoso. Uma vez certificado de que o animal estava profundamente anestesiado, iniciou-se o procedimento cirúrgico.

Com o auxílio de uma pinça de Allis foi preso o processo xifóide do animal tracionando-o para cima, enquanto lhe foi seccionada a pele, partes moles e as costelas pelas bordas inferiores do gradil costal, sendo a incisão prolongada pelas paredes laterais do tórax até que o coração fosse exposto dentro da cavidade torácica. Uma agulha conectada a uma bomba peristáltica foi introduzida no ventrículo esquerdo através do ápice do coração na direção da aorta ascendente e posteriormente, realizou-se uma pequena incisão no átrio direito, com a finalidade de escoar as soluções de perfusão, e então ligada a bomba peristáltica (Cole Parmer). A impulsão de 300ml de solução salina a 0,9% em tampão fosfato

0,1M, pH 7,4 com heparina (Liquemine, Lilly, 2 ml/1000ml de solução salina) foi feita a um fluxo de 100ml por minuto, com o objetivo de lavar o sistema circulatório do animal prevenindo a formação de coágulos e possibilitando a melhor penetração do fixador nos tecidos.

Em seguida foi introduzido 900ml de solução fixadora (paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, acrescido de ácido pícrico a 0,2% e glutaraldeído a 0,2%) em duas velocidades. Na primeira metade, numa velocidade de 90ml/min e na segunda metade a uma velocidade de 25ml/min aproximadamente, de modo que todo o fluxo de soluções durasse em torno de 30 minutos.

4.4 Remoção do encéfalo e microtomia

O encéfalo foi removido da cavidade craniana através da secção de tecidos moles e osteotomia dos ossos da calota craniana, passadas pelo menos duas horas após a perfusão. Armazenou-se o encéfalo em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, a 4°C, até que fosse possível realizar a microtomia. Esta solução foi trocada a cada dois dias, caso ultrapassasse o intervalo de 48h.

Para a microtomia, o encéfalo foi congelado por gelo seco e seccionado em micrótomo de deslizamento, obtendo-se secções coronais de 30µm, coletadas seriadamente em seis compartimentos com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Cada compartimento obteve um corte de cada seqüência de 6 (seis), de modo que a distância entre uma secção e a seguinte no mesmo compartimento foi de aproximadamente 180 µm. As secções foram conservadas a 4°C para que fossem realizados os processamentos subseqüentes, ou em solução anticongelante caso após mais de uma semana fossem utilizadas.

4.5 Coloração citoarquitetônica

Uma das séries de cada encéfalo foi utilizada para coloração pelo método de Nissl, utilizando o corante Thionina, e outra série para a imunorreatividade contra NeuN. Através da coloração pela técnica de Nissl todas as células são

tingidas, neurônios ou células da glia, proporcionando ao pesquisador a possibilidade de identificá-las através de seus tamanhos, forma e localização, para o NeuN somente os neurônios são marcados. Estas técnicas têm como finalidade delimitar os grupamentos neuronais.

4.6 Imuno-histoquímica

Nesta etapa, séries diferentes das estruturas nervosas do animal foram utilizadas e submetidas à análise imuno-histoquímica, empregando o protocolo ABC (Avidina-Biotina Complexo peroxidase). Nesta análise, anticorpos foram usados para identificar as seguintes substâncias neuroativas em corpos celulares ou terminais: CTb, marcador nuclear neuronal (NeuN), proteína acídica fibrilar glial (GFAP), as proteínas ligantes de cálcio (CB, PV e CR), e o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), vasopressina (VP), GABA e serotonina (5-HT).

O protocolo ABC utilizado segue as etapas seguintes:

1. Os cortes foram submetidos a (4) quatro lavagens, durante 10 minutos em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, em agitador orbital;
2. As sessões foram colocadas em uma solução de boridreto de sódio a 1% durante 15 minutos, em agitador orbital. Os cortes foram lavados em (quatro) lavagens de 10 minutos cada, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Após as lavagens, os cortes foram incubados em etanol/H₂O₂ por 5 minutos. Este pré-tratamento visa retirar o excesso de aldeídos e recuperar a antigenicidade;
3. Seguem-se (quatro) lavagens em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 de 10 minutos cada;
4. As secções foram colocadas em contato com o anticorpo primário em solução Triton X- 100 a 4% acrescido de soro normal do animal em que foi obtido o anticorpo secundário, durante 18 a 24 horas, à temperatura ambiente, em rotor. A diluição do anticorpo primário foi específica para cada caso;

5. Logo após seguiram-se (3) três lavagens em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 ,de 10 minutos cada;
6. Em seguida, os cortes entraram em contato com anticorpo secundário em solução em Triton X.-100 a 0,4%, durante 90 minutos, à temperatura ambiente, em rotor;
7. Ao final deste período, seguiram-se novamente (3) três lavagens em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 , de 10 minutos cada;
8. As secções foram coradas e colocadas em contato com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC elite, Vector) a uma diluição 1:100 em Triton X-100 a 0,4% contendo NaCl. Os cortes ficaram nesta solução durante 90 minutos, sob agitação lenta em redor;
9. Seguiram-se ao fim deste período, quatro lavagens em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, de 10 minutos cada;
10. A reação final seguiu colocando-se os cortes em um meio contendo H_2O_2 a 0,03% como substrato para peroxidase e a 3,3', 4,4' – tetrahidrocloreto-diaminobenzidina (DAB-Sigma), como cromógeno. A H_2O_2 foi oferecida de maneira indireta, colocada na solução glicose oxidase e β -D glicose. A primeira agiu sobre a segunda liberando H_2O_2 ;
11. Logo após, seguiram-se novamente quatro lavagens, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, de (dez) minutos cada;
12. Os cortes foram montados em lâmina de vidro previamente gelatinizadas e postas a secar à temperatura ambiente;
13. Após a secagem, mergulhou-se as lâminas rapidamente em solução de tetróxido de ósmio a 0,05% para intensificação da reação, seguindo-se a desidratação e diafanização dos cortes. As lâminas foram montadas e as lâminas estavam prontas para serem examinadas ao microscópio óptico.

Tabela 1: Especificações técnicas das substâncias utilizadas na imunohistoquímica. Natal, RN. 2008.

Antígeno	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário	Soro Normal
NeuN	Camundongo [1:1000] Chemicon	Coelho [1:200] Sigma	Coelho [1:50]
CTb	Cabra [1:9000] List Biological	Asno [1:200] Sigma	Asno [1:200]
GFAP	Camundongo [1:2000] Sigma	Coelho [1:200] Sigma	Coelho [1:50]
CB	Camundongo [1:1000] Sigma	Coelho [1:200] Sigma	Coelho [1:50]
PV	Camundongo [1:5000] Sigma	Coelho [1:200] Sigma	Coelho [1:50]
CR	Coelho [1:1000] Chemicon	Cabra [1:1000] Jackson	Cabra [1:50]
VIP	Coelho [1:1000] Península Laboratories	Asno [1:1000] Jackson	Asno [1:50]
VP	Coelho [1:500] Península Laboratories	Asno [1:1000] Jackson	Asno [1:50]
GABA	Camundongo [1:500] Sigma	Coelho [1:200] Sigma	Coelho [1:50]
5-HT	Coelho [1:5000] Protos Biotech	Cabra [1:1000] Jackson	Cabra [1:50]

4.7 Análise dos resultados

As sessões montadas em lâminas foram analisadas através de microscópio óptico (Olympus BX41) em campo claro. As imagens digitais foram obtidas através do acoplamento de uma câmera de vídeo ao microscópio para a documentação dos resultados e os esquemas ilustrativos montados através do programa Adobe Ilustration para análise final.

5. RESULTADOS

5.1 – Citoarquitetura

5.1.1. Nissl

Nas secções coronais coradas pelo método de Nissl com o corante Thionina, a ZI apresentou-se como um conjunto de neurônios localizado acima do núcleo subtalâmico e abaixo do tálamo dorsal, medial à capsula interna e lateral à área hipotalâmica. Em continuidade medial à ZI localiza-se o campo de Forel (CF), com células semelhantes às da ZI adjacente (Fig. 1D-F).

Nas secções rostrais, a ZI foi visualizada como uma continuidade do núcleo reticular se estendendo na direção medial, bem próximo ao terceiro ventrículo, e com uma extensão e tamanho menor nas outras porções (Fig. 1A). Nas secções intermédias, pode-se perceber um aumento do agrupamento neuronal e uma subdivisão de acordo com o arranjo das células, em ventrolateral (ZIVl) e dorsomedial (ZIDm), de forma que a subdivisão ZIVl é visualizada como tendo uma concentração maior de células formando uma faixa sobre o fascículo lenticular que a separa do subtálamo, e a dorsomedial possui células espalhadas (Fig. 1B). Nas secções caudais houve um alongamento do grupo neuronal incerto avançando mais medialmente, em direção ao Campo de Forel, que a porção intermédia, e de forma semelhante a esta apresentou uma maior densidade celular numa região mais lateral (Fig. 1C).

5.1.2. NeuN

Nas secções rostrais, a ZI apresentou células fortemente marcadas, assim como o reticular localizado lateralmente (Fig. 2A). Nas secções intermédias, as células marcadas apresentam-se de forma semelhante à marcação de Nissl, com um aglomerado ventrolateral e outro dorsomedial (Fig. 2B). Nas secções caudais, ocorre uma distribuição espalhada, mais uma vez se assemelhando ao Nissl. As células bem marcadas se misturam às células do CF, localizadas próximas ao terceiro ventrículo (Fig. 2C). A extensão da porção caudal é maior que na intermédia.

5.2. Projeções Retinianas

Fibras e terminais imunorreativas a CTb (IR-CTb) foram visualizados na ZI ipsilateral e contralateral. A predominância da marcação foi na contralateral (Fig. 3). Entre as três porções da ZI somente a caudal apresentou as fibras IR-CTb (Fig. 3A-E), numa região ventral e próxima ao GLD, como uma continuação do pré-geniculado (Fig. 3A e B). Possíveis botões sinápticos podem ser visualizados (Fig. 3B e D).

5.3 – GFAP

Encontramos marcação quase totalmente negativa para GFAP nos níveis intermédio e caudal, com algumas poucas células IR-GFAP, e a extensão dessa marcação concordando com a delimitação pelo método de Nissl (Fig. 4). O nível rostral foi apresentado células marcadas (Fig. 4A). No nível intermédio pode-se perceber que tanto a ZI como o núcleo subtalâmico são marcados negativamente (Fig. 4B). O nível caudal tem a conformação bem semelhante às marcações para NeuN e para o Nissl (Fig. 4C). A imunorreatividade negativa é percebida na ZI e no CF (Fig. 4C).

5.4 - Proteínas ligantes de cálcio

5.4.1. CB

A ZI do sagüi apresentou células de corpo ovóide IR-CB (Fig. 5E). Na porção rostral, poucas células foram marcadas, sempre acompanhadas com neurópila (Fig. 5A e D). Na porção intermédia houve uma densidade celular imunorreativa maior (Fig 5B), com células mais densamente marcadas (Fig. 5E). Pode ser visualizada uma concentração na ZIvl, e algumas células na ZIdm (Fig. 5F). Na porção caudal observa-se uma maior quantidade de células marcadas com distribuição esparsa, com uma pequena concentração ventrolateral (Fig. 5C).

5.4.2. PV

A ZI apresentou IR-PV mais densamente na sua porção caudal, com uma concentração lateral (Fig. 6). Na porção rostral há pouca marcação (Fig. 6A). Na porção intermédia, a concentração ocorre na região ventrolateral, com algumas poucas células na região mais medial (Fig. 6B e E). Na porção caudal as células continuam com uma concentração maior na parte lateral da ZI, porém a quantidade de células IR-PV é maior que na intermédia (Fig. 6C). As células são maiores que as marcadas contra CB e CR. Os corpos celulares das células IR-PV na ZI são ovóides e grandes, algumas sendo alongadas (Fig. 6D).

5.4.3. CR

A IR-CR na ZI marcou poucas células na porção rostral (Fig. 7A). Na intermédia, a marcação foi maior, mas de forma esparsa e apresentando uma pequena concentração próxima à borda dorsal (Fig. 7B e E) e uma outra na região ventrolateral, como numa continuação com o reticular (Fig. 7E). Na porção caudal, as células imunorreativas também foram espalhadas, assim como observado para as células do CF marcadas como uma continuidade da região mais medial da ZI caudalmente (Fig. 7C). Percebe-se uma marcação maior na região mais dorsal também para a porção caudal da ZI (Fig. 7C).

5.5 – VIP

A ZI apresentou IR-VIP nas três porções: rostral, intermédio e caudal. Na porção rostral ocorreram poucas células marcadas (Fig. 8A). Na intermédia, as células marcadas apresentaram-se espalhadas, porém conseguimos visualizar uma concentração celular IR-VIP maior na ZIvl (Fig. 8B e F), estendendo-se desde o núcleo reticular talâmico e apresentando células densamente marcadas (Fig. 8D). Na porção caudal, as células imunorreativas também se apresentaram espalhadas, mas com uma pequena concentração na parte dorsal (Fig. 8C). Ocorre também outra concentração mais medial próximo ao campo de Forel.

5.6 – VP

Na ZI do sagüi a IR-VP foi muito semelhante à IR-VIP. As células marcadas foram encontradas nas três porções, rostral, intermédio e caudal (Figuras 9A-C). Na intermédia, percebemos uma concentração na região ventrolateral no núcleo, assim como foi para VIP (Fig. 9 E-F).

5.7 - GABA

Foram observadas células IR-GABA nas três porções da ZI do sagüi (Fig. 10A-F). Na porção rostral houve pouca quantidade de células marcadas (Fig. 10A e 10G). Na intermédia observou-se uma faixa concentrada na região ventrolateral embora tenha ocorrido a presença de neurônios IR-GABA na porção dorsolateral (Fig. 10B e 10H). Na porção caudal observou-se uma marcação mais espalhada tomando toda a ZI (Fig. 10C e 10I).

5.8 - 5-HT

Em nosso trabalho identificamos a marcação de fibras e terminais IR-5HT (Fig. 11A-F) nas três porções da ZI, de forma espalhada. Não visualizamos a presença de células IR-5HT na ZI do sagüi.

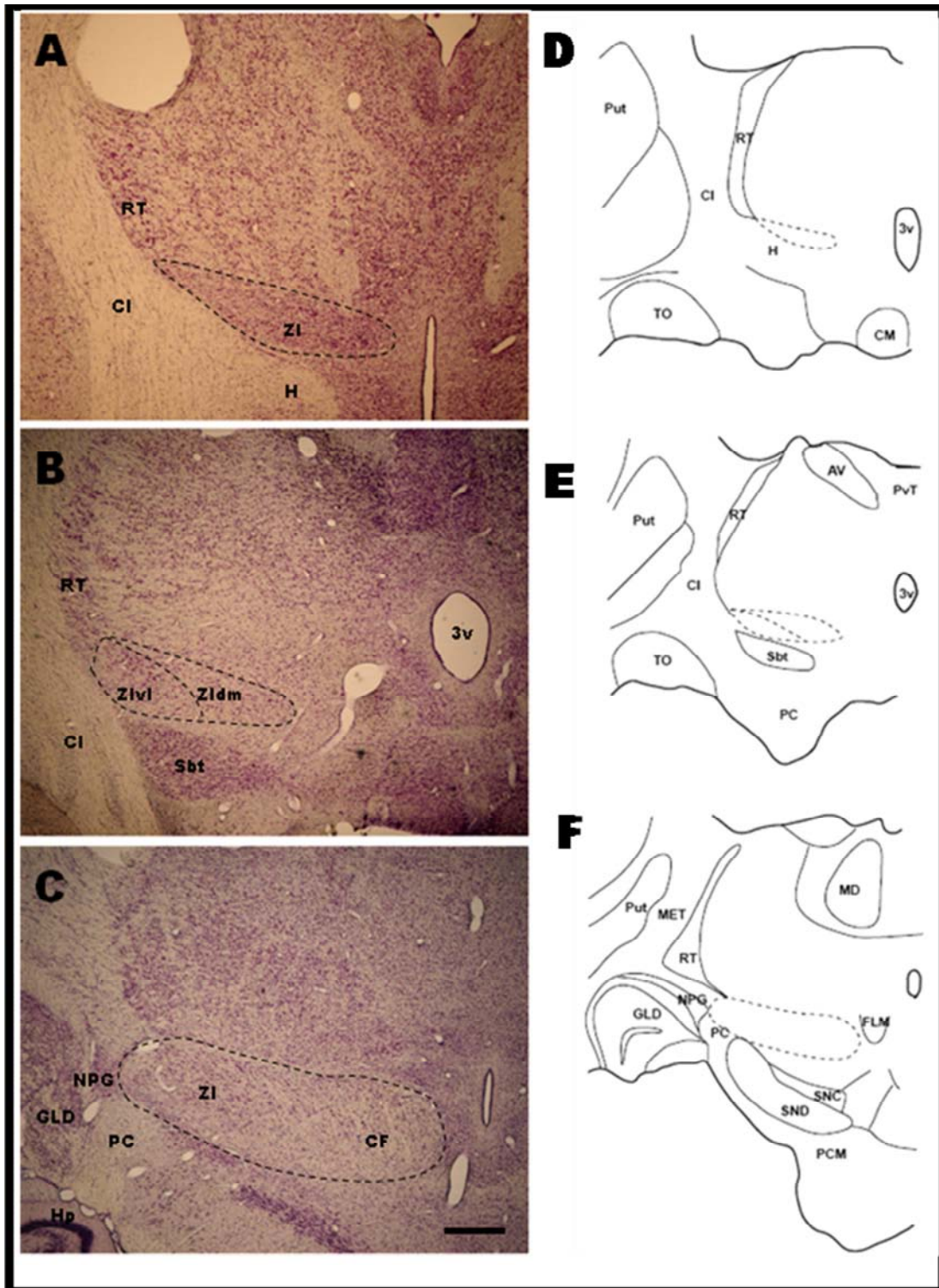


Figura 1. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagüi coradas pelo método de Nissl, evidenciando a ZI (tracejado) nos níveis rostral (A), intermédio (B) e caudal (C). Esquema ilustrações de secções coronais do encéfalo do sagüi localizando a ZI (tracejado) em relação a diversos conjuntos nucleares do sagüi (D, E e F). Barra de escala: 80 μ m.

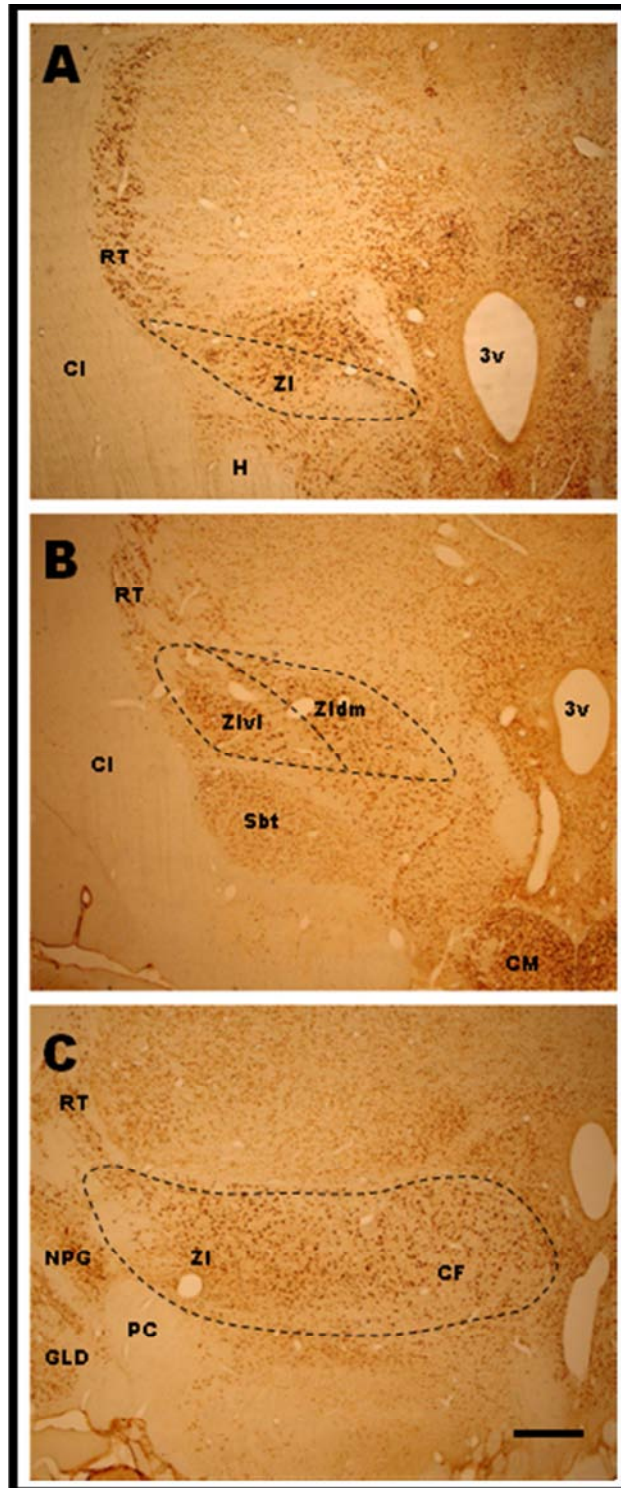


Figura 2. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagüi mostrando a imunorreatividade contra NeuN (NeuN-IR), em níveis rostral (A), intermédio (B) e caudal (C) na ZI (tracejado) do sagüi. Barra de escala: 80 μ m.

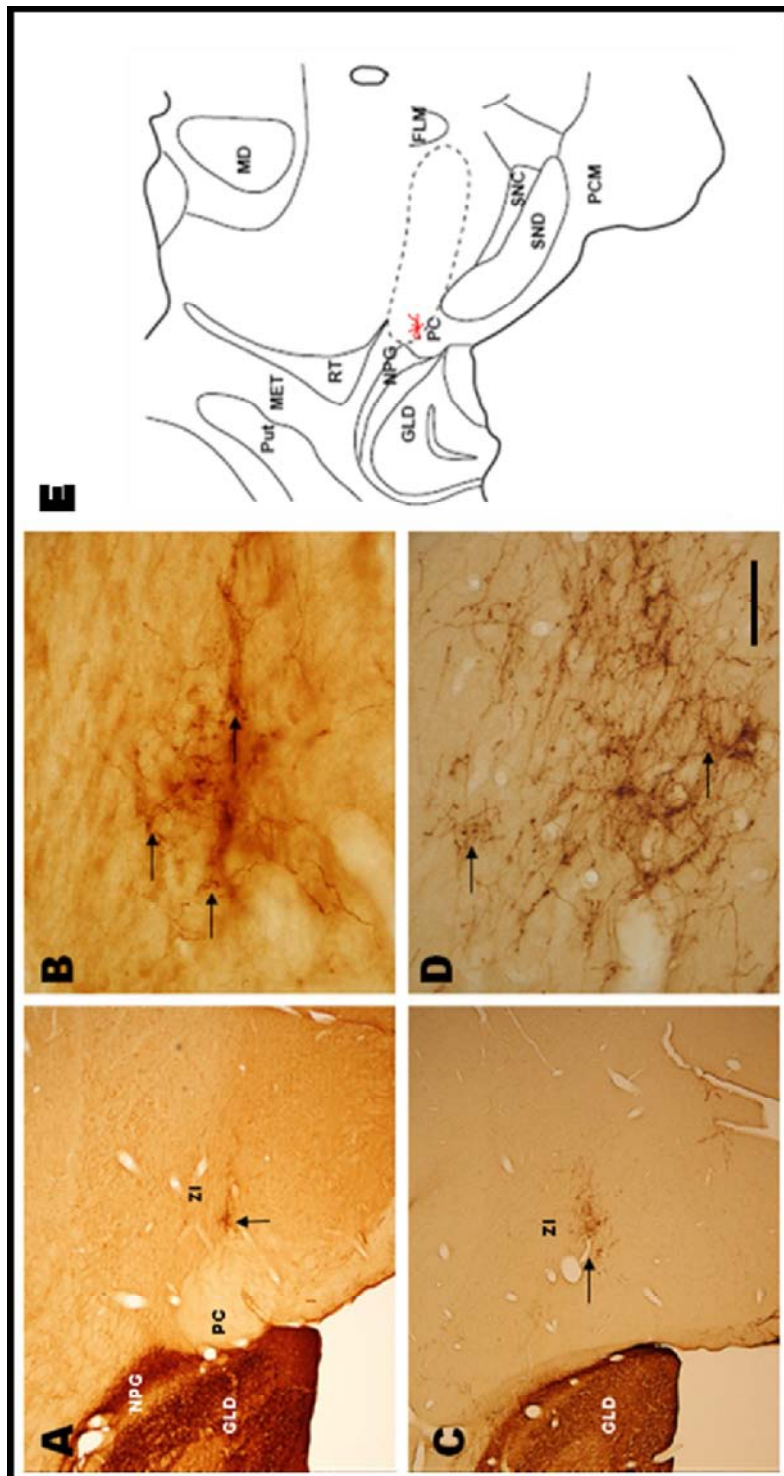


Figura 3. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagüi mostrando (setas) fibras/terminais imunorreativas contra CTb (CTb-IR) na ZI de dois casos experimentais (A e C). Em (B) e (D) detalhes das fibras/terminais CTb-IR de (A) e (C) respectivamente. Em (E) esquema ilustrando a distribuição de fibras/terminais (vermelho) na ZI caudal do sagüi. Barra de escala: 60 μ m em A e C e 15 μ m em B e D

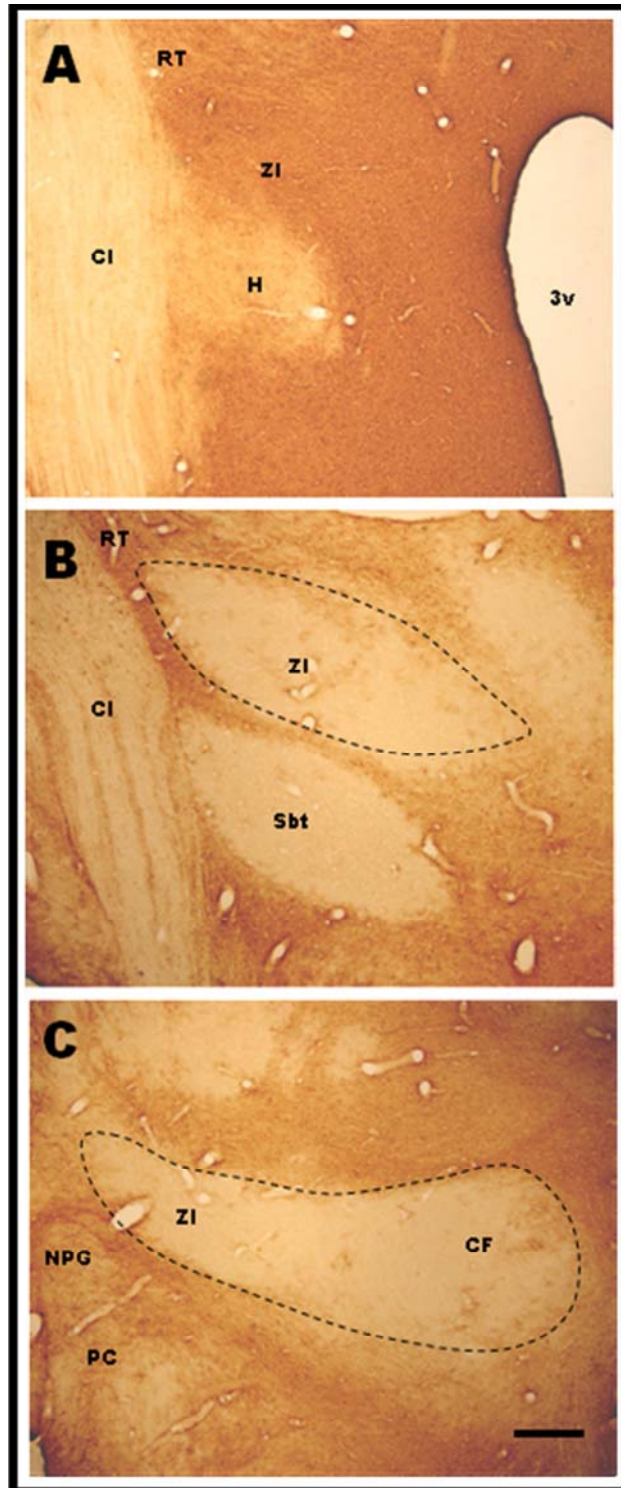


Figura 4. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagüi mostrando a imunorreatividade contra GFAP nos níveis rostral (A), intermédio (B) e caudal (C) da ZI. Barra de escala: 80 μ m.

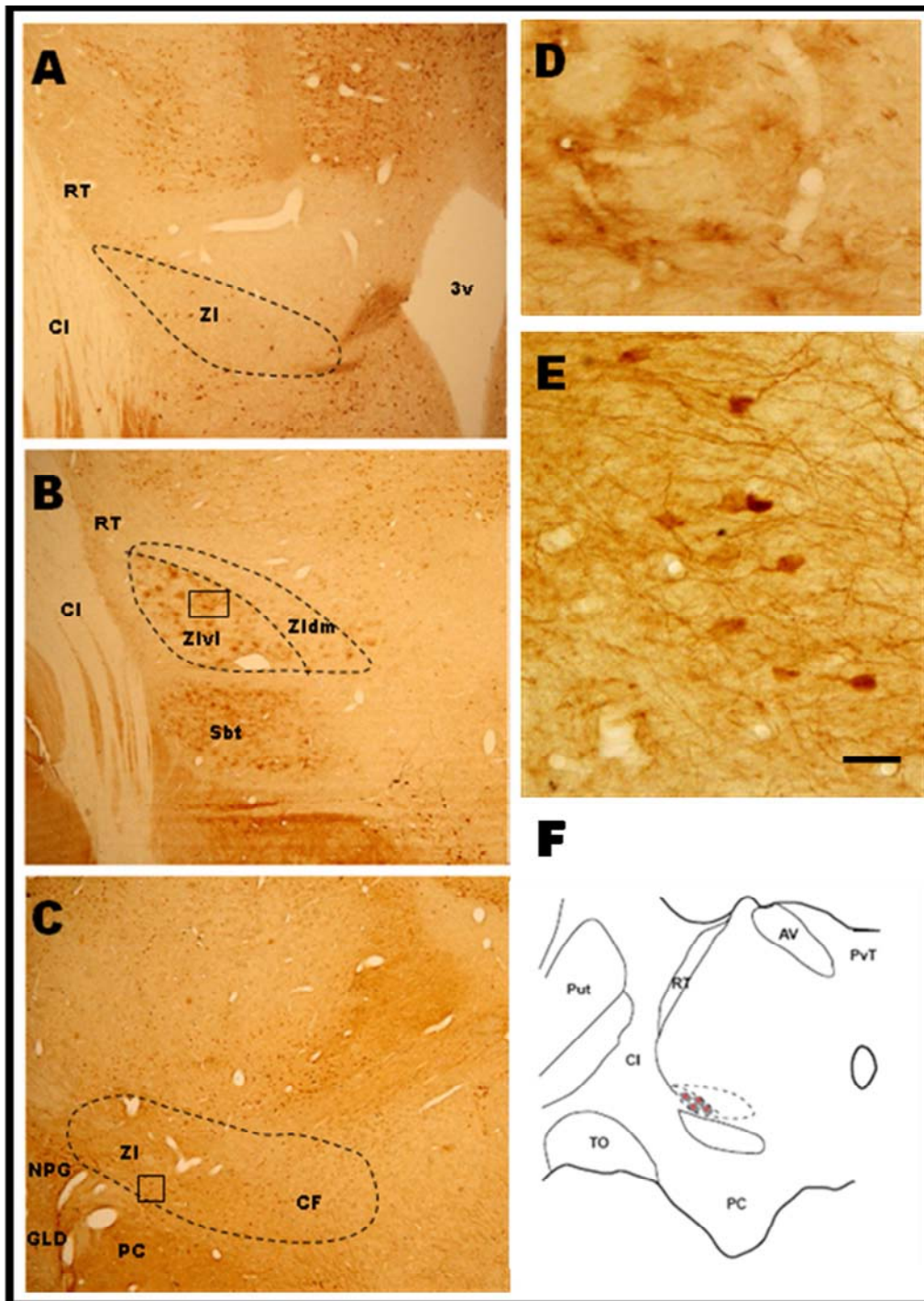


Figura 5. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagüi mostrando a imunoreatividade contra calbindina (IR-CB) nos níveis rostral (A), intermédio (B) e caudal (C) da ZI. Em (D) detalhe de células com neurópila IR-CB na ZI intermédia (janela em B). Em (E) detalhe de células IR-CB na ZI caudal (janela em C). Em (F) a ilustração da IR-CB concentrada na porção Zlvi intermédia, pontos (vermelhos) representando corpos celulares IR-CB, e a mancha (cinza) representa neurópila IR-CB. Barra de escala: 80 μ m em A, B e C e 15 μ m em D e E.

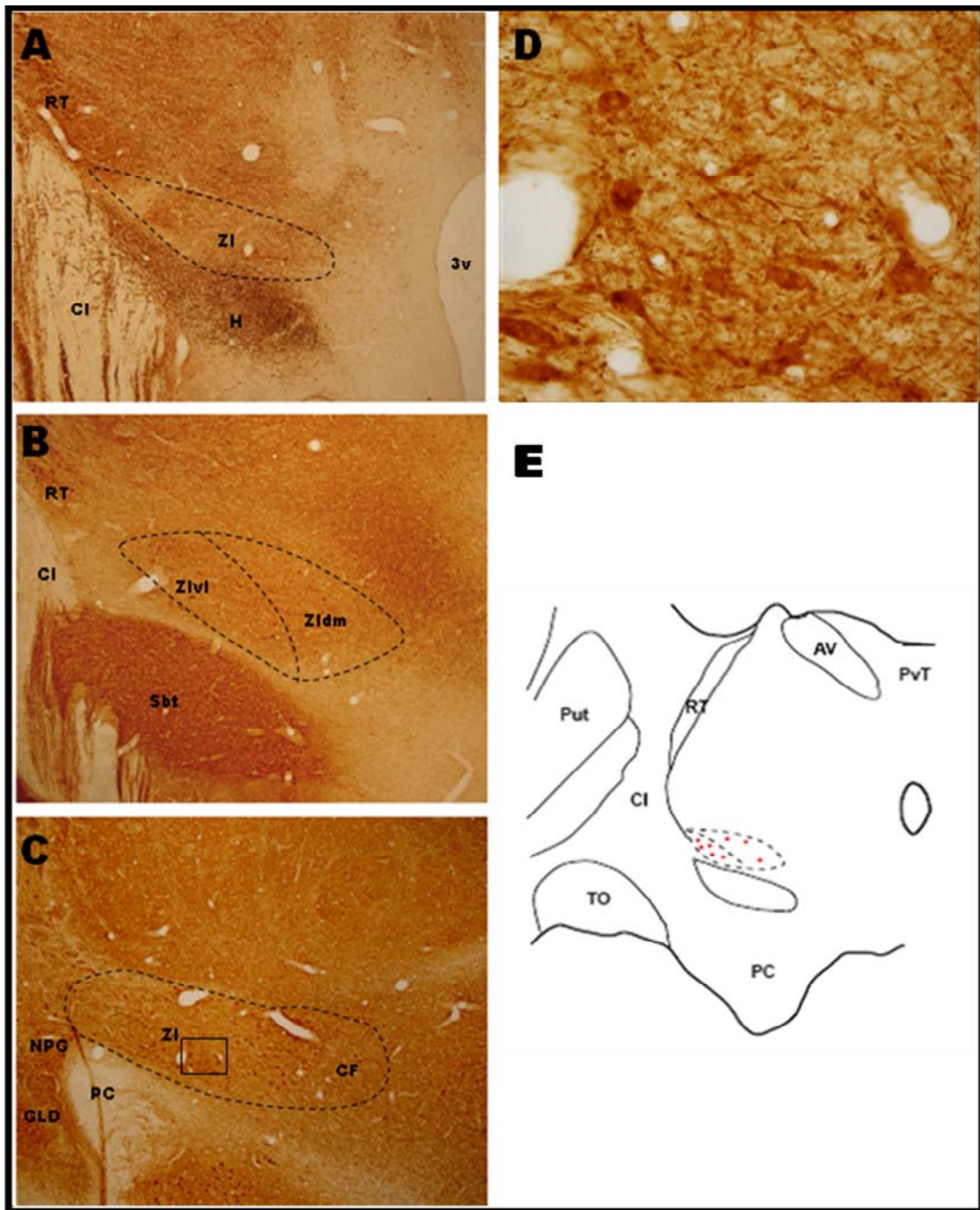


Figura 6. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagüi mostrando a imunoreatividade contra parvalbumina (PV-IR) nos níveis rostral (A), intermédio (B) e caudal (C) da ZI. Em (D) detalhe de células PV-IR na ZI caudal (janela em C). Em (E) esquema representando as células IR-PV (Pontos vermelhos) na ZI. Barra de escala: 80 µm em A, B e C e 15 µm em D.

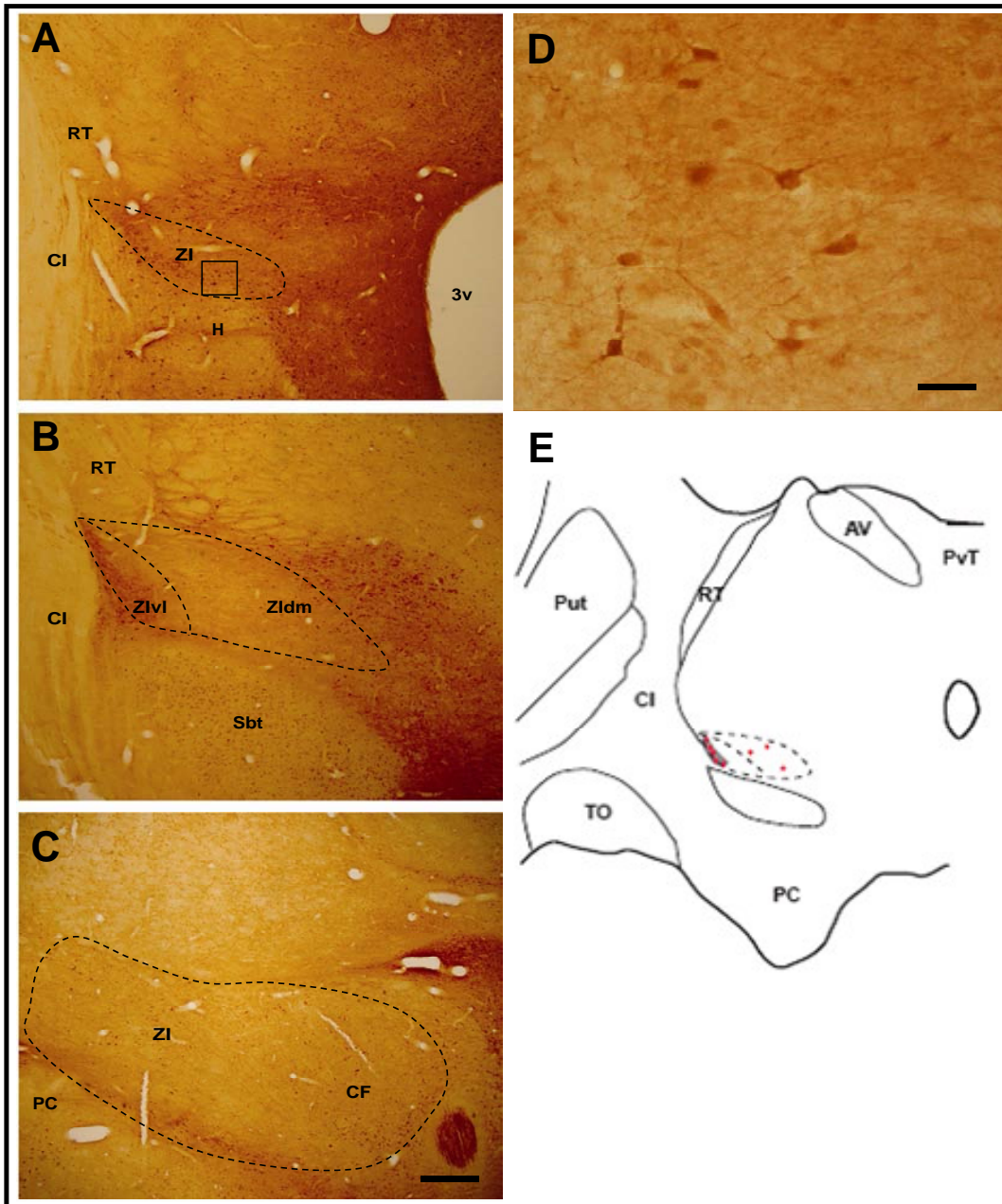


Figura 7. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagüi mostrando a imunorreatividade contra calretinina (IR-CR) nos níveis rostral (A), intermédio (B) e caudal (C) da ZI. Em (D) detalhe de células IR-CR na ZI intermédia (janela em B). Em E esquema ilustrativo mostrando a distribuição de corpos celulares (vermelho) e neurópila (cinza) na ZI do sagüi. Barra de escala: 80 μ m em A, B e C e 15 μ m em D.

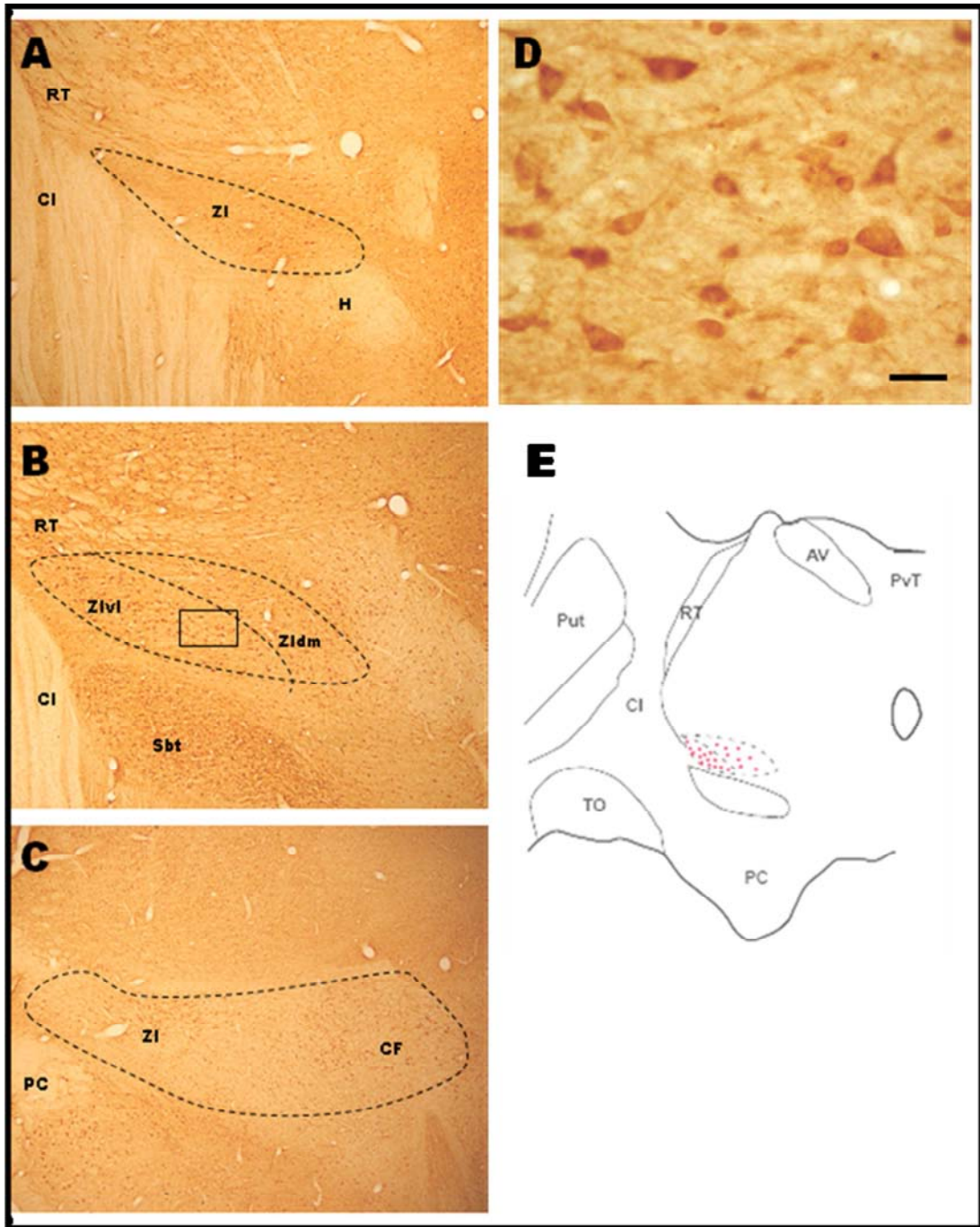


Figura 8. Fotomicrografias em campo claro de seções coronais do encéfalo do sagüi mostrando a imunorreatividade contra polipeptídeo intestinal vasoativo (IR-VIP) nos níveis rostral (A), intermédio (B) e caudal (C) da ZI. Em (D) detalhe de células IR-VIP na ZI intermédia (janela em B). Em (E) esquema ilustrando a distribuição de corpos celulares (vermelho) IR-VIP na ZI do sagüi. Barra de escala: 80 µm em A, B e C e 15 µm em D.

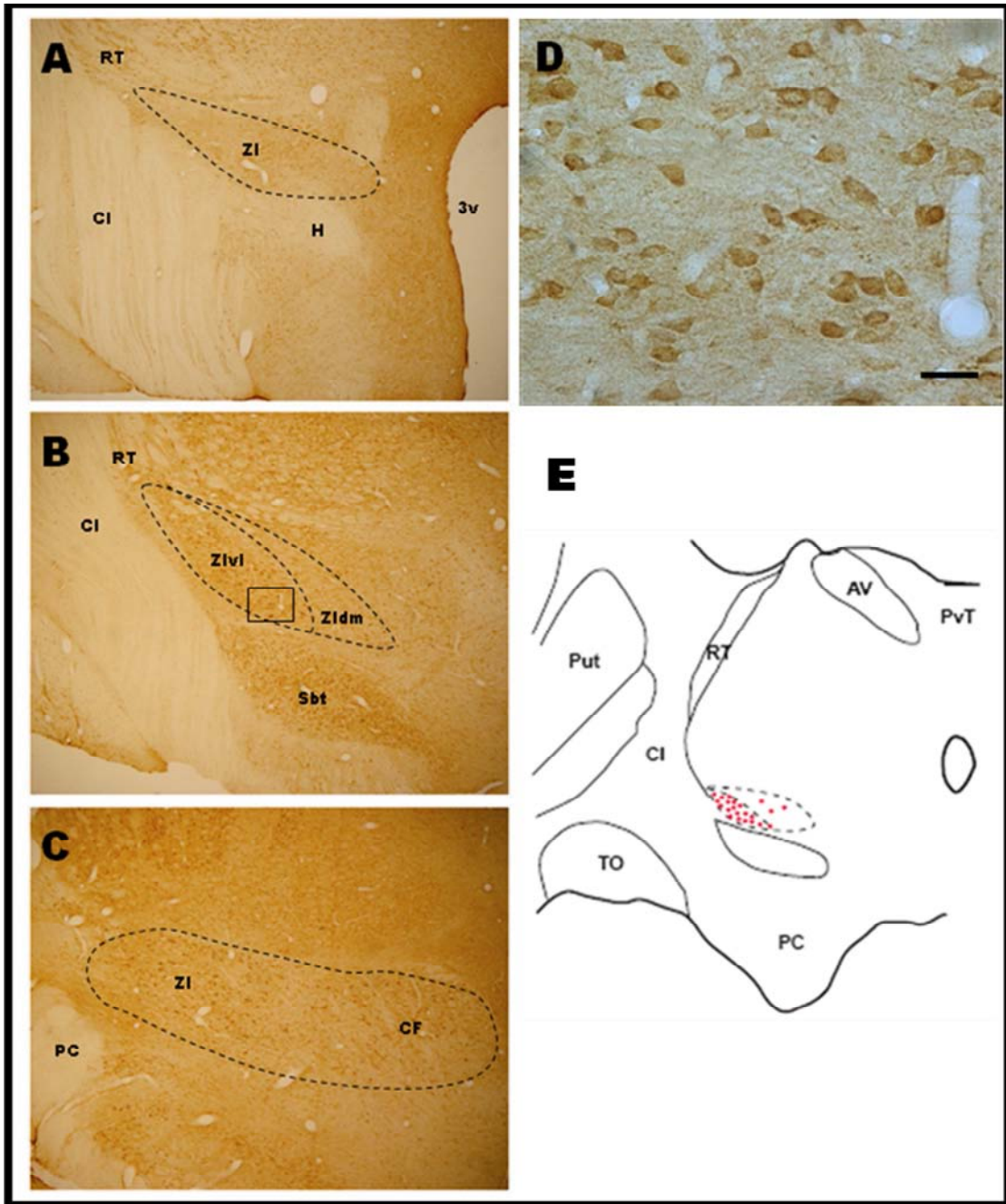


Figura 9. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagüi mostrando IR-VP nos níveis rostral (A), intermédio (B) e caudal (C) da ZI. Em (D) detalhe de células IR-VP na ZI caudal (janela em B). Em (E) esquema ilustrando a distribuição de corpos celulares (**vermelho**) na ZI. Barra de escala: 80 μ m em A, B e C e 15 μ m em D.

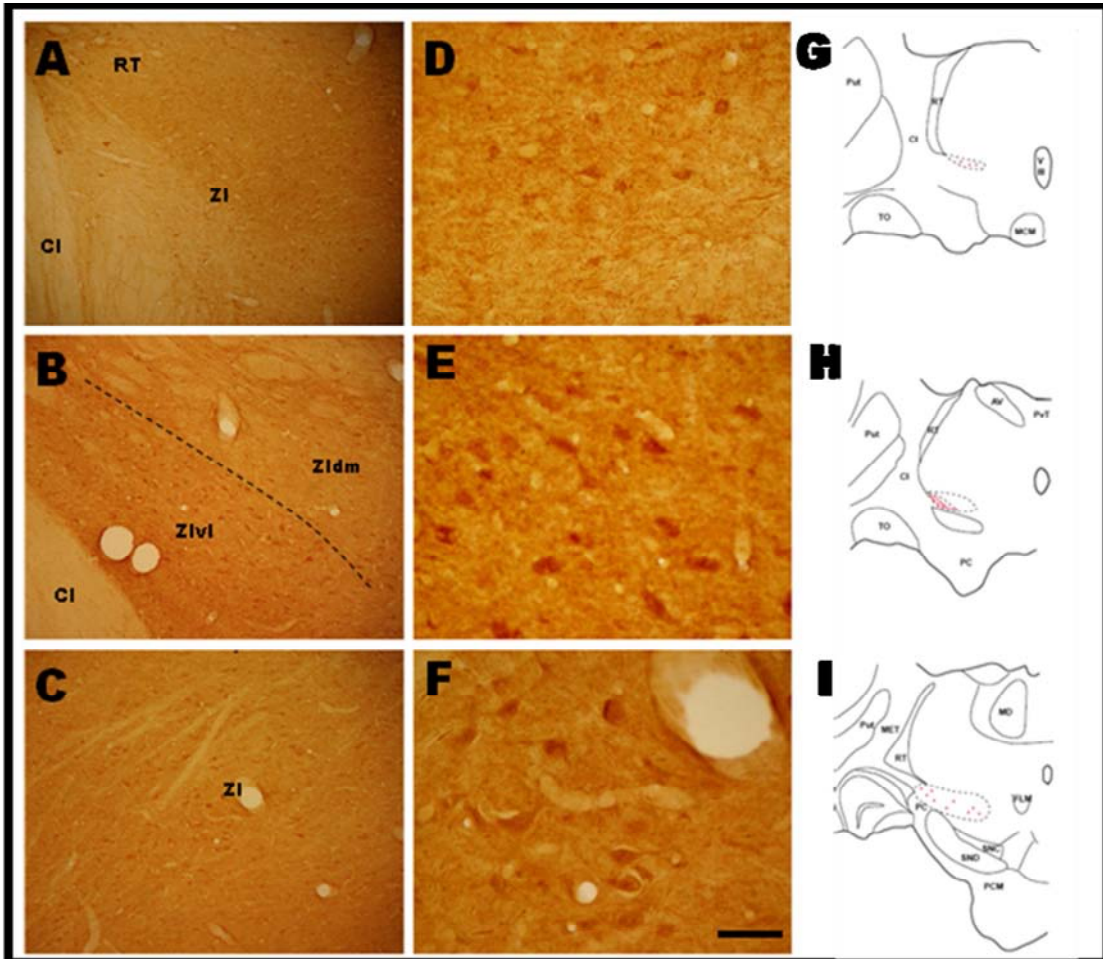


Figura 10. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagüi mostrando IR-GABA nos níveis rostral (A), intermédio (B) e caudal (C) da ZI. Em (D, E e F) detalhes de células IR-GABA de (A), (B) e (C) respectivamente. Em (G), (H) e (I) esquema ilustrativo mostrando a distribuição dos corpos celulares (**vermelho**) IR-GABA na ZI do sagüi. Barra de escala: 40 μ m em A, B e C e 15 μ m em D, E e F.

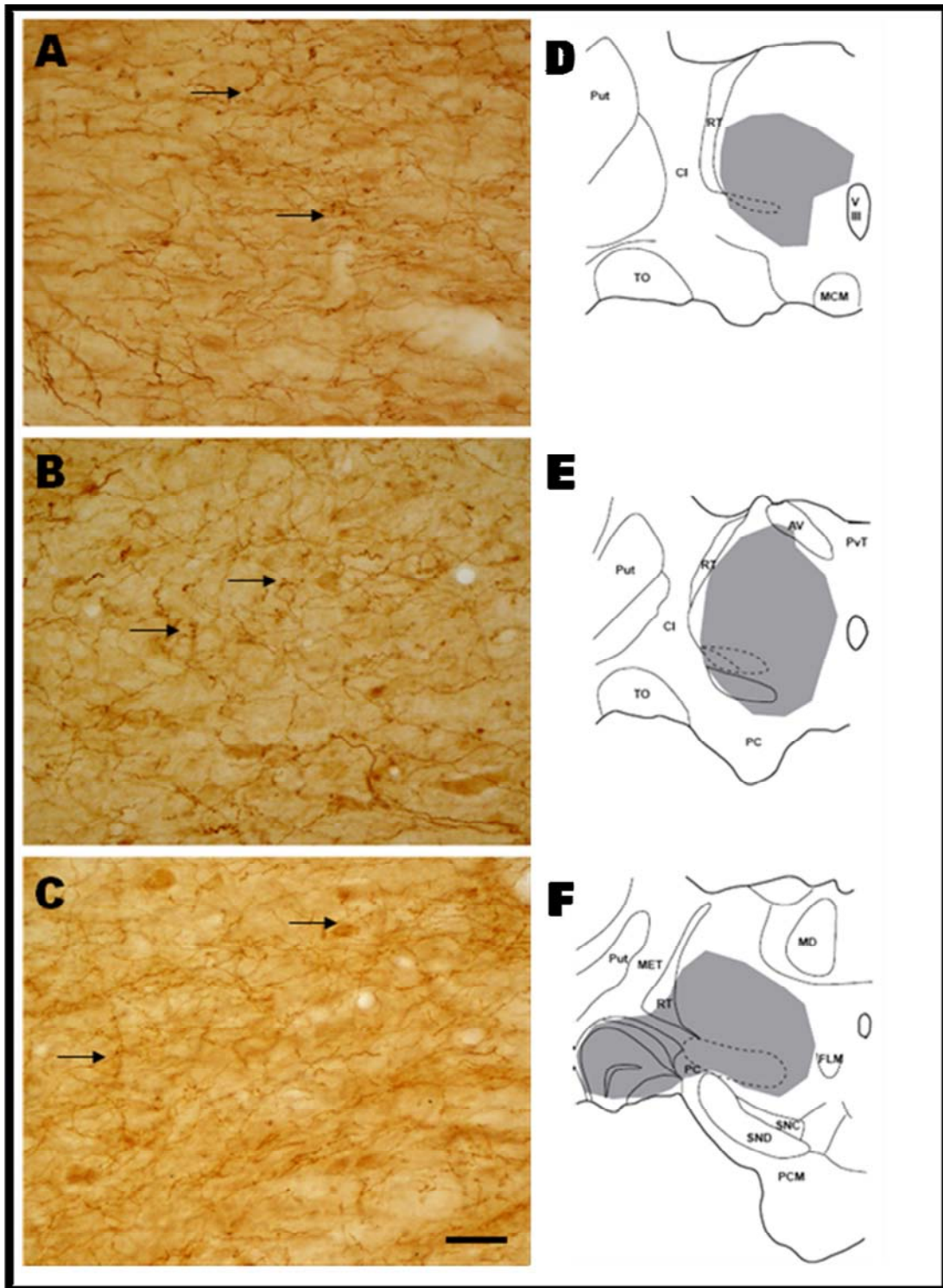


Figura 11. Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagüi mostrando a IR-5HT nos níveis rostral (A), intermédio (B) e caudal (C) da ZI. Setas apontam para terminais IR-5HT com pericários. Em (D), (E) e (F) figura ilustrativa mostrando a distribuição de fibras (cinza) IR-5HT no tálamo do sagüi, incluindo a ZI (delimitação). Barra de escala: 15 μ m em A, B e C.

6. DISCUSSÃO

A ZI é um agrupamento neuronal derivado embriologicamente do tálamo ventral que tem sido implicada em várias propriedades funcionais incluindo o processamento somato-sensório e nociceptivo, resposta motora, comportamento sócio-sexual, de comer e beber, em sintomas de doenças neurodegenerativas, despertar e atenção. Constitui-se em um distrito subcortical que exhibe um alto grau de convergência de informação neural de diferentes estruturas neurais (ver Jones, 2007).

6.1 – Citoarquitetura

6.1.1 – Nissl

De acordo com nossos resultados, a ZI pode ser dividida em três porções, rostral, intermédia e caudal. A intermédia apresentou-se com uma diferenciação de densidade celular que permitiu uma subdivisão em dorsomedial (ZIdm) e ventrolateral (ZIVl). Sendo a ZIVl a região com maior concentração celular formando uma pequena banda, enquanto na ZIdm as células estão mais espalhadas. Em outras espécies, a técnica de Nissl permitiu uma caracterização da citoarquitetura da ZI de forma homogênea. Subdivisões aferidas, concordante ou discordante, pelos pesquisadores foram dadas a esse conjunto de neurônios no tálamo de delimitação nem sempre claramente definida.

Em um dos primeiros estudos citoarquitetônicos dividiu-se a ZI de roedores em três partes: caudalis, principalis 1, e principalis 2 (Kuzemenky, 1977). Já Kawana e Watanabe em 1981, caracterizaram a ZI também de roedor em seis subdivisões (Fig. 12), de acordo com tamanho e forma do pericário neuronal e arranjo das células: 1) *Pars rostro-polaris* (ZIr): porção mais anterior contendo células pequenas de forma fusiforme ou arredondadas, 2) *Pars ventralis* (ZIV): sobre o núcleo subtalâmico e pedúnculo cerebral contendo células de tamanho médio fusiformes ou multipolares, 3) *Pars dorsalis* (ZId): adjacente ao *pars rostro-polaris* anteriormente e ao *par caudal* posteriormente, contém pequenas e médias, fusiformes ou arredondadas, 4) *Pars caudalis* (ZIc): bordado pelo *par*

ventral e dorsal anteriormente e pelo rostro-polaris posteriormente, contém células pequenas e média, multipolares, fusiformes ou arredondadas, 5) *Pars magnocellularis* (ZIm): localizado póstero-medialmente contendo células poligonais e grandes, 6) *Pars retro-polaris* (ZIp): localizado na porção posterior, contém células pequenas, fusiformes, arredondadas ou poligonais. Em ratos outros estudos têm considerado quatro subdivisões: rostral, dorsal, ventral e caudal, para ratos (Nicolelis *et al.*, 1992; Kim *et al.* 1992; Lin *et al.*, 1995; Nicolelis *et al.*, 1995; Kolmac *et al.*, 1998; Mitrofanis e Mikuletic, 1999). Cada um desses com diferentes citoarquitetura, caráter imuno-histoquímico e vários padrões de conectividade. Por exemplo, com relação à imunocitoquímica em rato, um trabalho demonstrou a presença de células imunorreativas à ácido gama amino-butírico (GABA) e parvalbumina (PV) principalmente no setor ventral, calbindina (CB) no setor caudal, NADPH-diaforase e glutamato (GLU) no setor dorsal, somatostatina (SS) e tirosina hidroxilase (TH) ou sintase do óxido nítrico (NOS) no setor rostral (Kolmac e Mitrofanis, 1999). As subdivisões também estão correlacionadas com conexões específicas. Em ratos, a subdivisão ventral projeta-se para a ponte basilar, ao CS e para uma fonte tectal no tálamo dorsal, e núcleo lateral central (Romanowski *et al.*, 1985; Kawana e Watanabe, 1982; Kim *et al.*, 1992). Em contraste, a subdivisão dorsal projeta-se ao núcleo parafascicular do tálamo e ao córtex somato-sensório (Romanowski *et al.*, 1985; Kawana e Watanabe, 1982; Nicolelis *et al.*, 1992). Em gato, a subdivisão ventral é reciprocamente conectada com o CS e o pretecto, mostrando similaridade de padrão conectivo com outras espécies, incluindo o rato e o macaco (May *et al.*, 1997). Em um estudo realizado com macaco *Rhesus* (*Macaca mullata*), a ZI foi também dividida em 4 subsetores denominados pólo anterior, lâmina superior, lâmina inferior e pólo posterior. Relacionando com os seis subsetores relatados por kawana e Watanabe anteriormente, o pólo anterior correspondendo aos *pars rostro-polaris*, a lâmina superior aos *pars dorsalis*, a lâmina inferior aos *pars ventralis*, a camada posterior dorsal aos *pars magnocellularis*, a camada posterior média aos *pars caudalis*, e a camada posterior ventral ao *pars retro-polaris*. Se a relação for feita com os quatro subsetores mencionados anteriormente em rato,

tem-se que o pólo anterior corresponde à ZI rostral, a lâmina superior à ZI dorsal, a lâmina inferior à ZI ventral, e o pólo posterior à ZI caudal. Porém, os quatro subsetores resumiram-se a duas regiões, devido a não-identificação das bordas: pólo anterior e lâmina superior consistindo na lâmina dorsal, e a lâmina inferior e o pólo posterior consistindo na lâmina ventral (Ma *et al.*, 1992). Resultados bem diferentes dos encontrados no sagüi, alvo de nosso estudo.

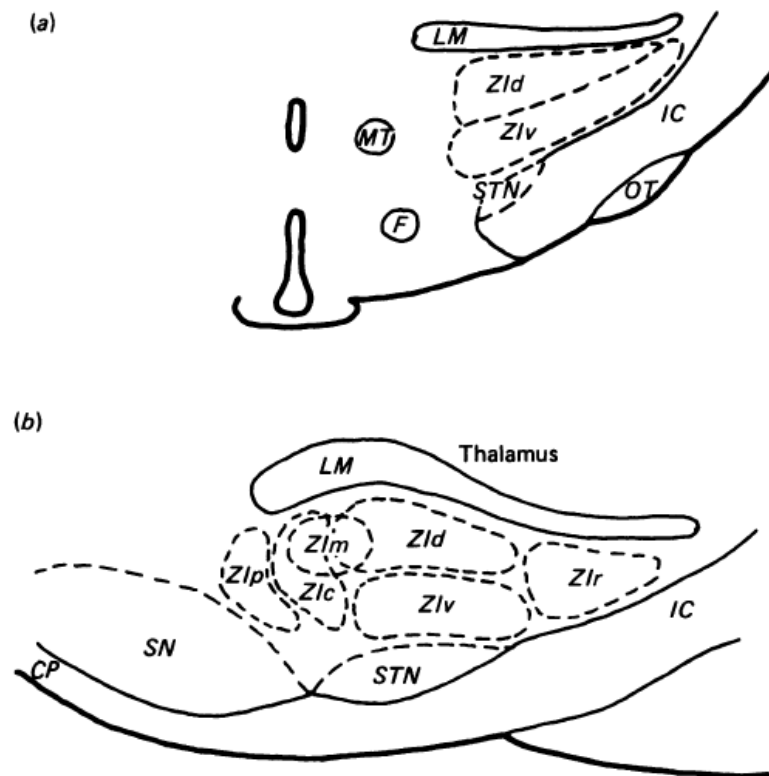


Figura 12: Esquema ilustrando as seis subdivisões da ZI em rato, corte sagital (a) e coronal (b). Modificado do trabalho Romanowski et al, 1985.

Ainda no trabalho de Ma e colaboradores, foi possível identificar 2 tipos celulares em cada lâmina da ZI: neurônio de projeção e interneurônio, com diferenças no tamanho do corpo em que a célula principal (neurônio de projeção) apresenta-se maior e é contactada pelos interneurônios. Observou-se uma complexa série intranuclear entre os interneurônios vizinhos, o que proporciona uma modulação pelos interneurônios (Ma *et al.*, 1992).

Segundo a descrição de Jones, 2007, a ZI pode também ser caracterizada com três principais divisões que seria a anterior, intermédia e posterior. A intermédia sendo dividida com maior ou menor precisão em lâminas, onde a porção dorsal apresenta uma concentração de células maiores, próximo ao fascículo talâmico. A porção posterior não apresenta mais a laminação, as células menores são mais proeminentes e se constitui na porção mais larga da ZI, sendo em roedores e monotremados a parte maior da ZI (ver Jones, 2007). Diferente de nossos resultados, a porção dorsal não apresentou células maiores, porém na porção caudal também visualizamos células menores além de representar a região de maior extensão da ZI.

6.1.2 – NeuN

NeuN é uma proteína nuclear específico-neuronal expressa na maioria dos tipos celulares neuronais de sistema nervoso de vertebrados. Devido à especificidade desta expressão, tem se tornado um marcador universal para fenótipos neuronais pós-mitótico e usado para distinguir neurônios de outros tipos celulares que não expressam a proteína, bem como da glia (Mullen *et al.*, 1992). NeuN não marca o núcleo de célula nervosa imatura até que ela alcance o estágio de desenvolvimento que ao menos apresente uma função madura (Wolf *et al.*, 1996). A imuno-histoquímica contra NeuN confirma a vantagem da técnica sob a de Nissl em que neurônios são realmente distinguíveis da glia (Mensah-Brown e Garey, 2006). Além disso, o Nissl marca células grandes com abundantes ribossomos, mas muitos pequenos interneurônios permanecem difíceis de distinguir de células gliais, ao contrário do NeuN que marca pequenas células neuronais (Hemult *et al.*, 1996). A delimitação citoarquitetônica por Nissl na ZI do sagüi nos forneceu uma base para comparação com a distribuição das células IR-NeuN. Os neurônios foram bem marcados para todas as porções da ZI. A distribuição destas células foi semelhante nas porções rostral, intermédia e caudal. Com uma densidade levemente maior do que o Nissl, isso pode ter sido pelo fato de um ser uma técnica imuno-histoquímica e outra de coloração. Nas

secções rostrais, pode-se visualizar poucas células em comparação com os outros níveis. Nas secções intermédias, a delimitação da ZI em ZIvl e ZIdm apresentou-se mais evidente do que na marcação com o Nissl. A subdivisão ZIdm abrange uma área um pouco maior que a ZIvl. Na secção caudal, as células nervosas estão esparsamente distribuídas, e a marcação abrange células do CF, na região mais medial a ZI. O tamanho das células varia de pequeno para grande em todas as porções da ZI. NeuN pode ser usado para estudos de perda neuronal em epilepsia, doenças neurodegenerativas ou outras condições (ver Hemult *et al.*, 1996). O estudo da distribuição de células IR-NeuN na ZI pode significar um suporte para a análise da participação da ZI em doenças neurodegenerativas como o mal de Parkinson. Estudos mostraram através do uso de marcador metabólico e análises eletrofisiológicas que em ratos com Parkinson a ZI é hiperativa, assim como outros estudos demonstraram que a estimulação profunda da ZI alivia o tremor proximal em pacientes com esclerose múltipla (Alusi *et al.*, 2001; Heise e Mitrofanis, 2004). Em um trabalho recente, a caracterização da marcação de NeuN em ratos e gerbil na substância negra reticulata demonstrou a diferença na imunorreatividade entre as espécies (Kumar e Buckmaster, 2007). Estudos funcionais posteriores são necessários para a compreensão da forte expressão da proteína na zona incerta.

6.2 – Projeções Retinianas

Os nossos resultados apontam para a presença de fibras/terminais IR-CTb na porção caudal da ZI do sagüi, concentrando-se em sua região mais ventral. As fibras são bem características de terminais. Em gato, um trabalho utilizando CTb detectou terminais marcados na ZI contralateral e ipsilateral, com uma marcação descontínua de aferências da retina nas porções medial e lateral da ZI (Matteau *et al.*, 2003). Os nossos dados apontam para uma predominância contralateral. Em ratos, estudo utilizando dois traçadores anterógrados e retrógrados demonstrou que a área retino-recipiente na ZI seria a camada lateral das porções dorsal, ventral, e caudal, podendo ocorrer ocasionalmente na porção rostral da ZI (Power *et al.*, 2001). Em hamster, as fibras retinianas que passam através do NSQ

continuam dorsalmente e invadem a ZI em porções mediais, recebendo projeção do trato óptico em forma de fascículos. Segundo o autor, áreas retino-recipientes que também recebem do NSQ, como a ZI, podem integrar informação fótica e circadiana para modular comportamento e fisiologia, ou pode mediar através de efeitos de luz mas que não envolvam o sistema circadiano (Youngstrom *et al.*, 1991). Em camundongo, um trabalho demonstrou projeção retiniana para a ZI, mas não identificou a porção retino-recipiente (Abrahamson e Moore, 2001).

A ZI pode ser dividida funcionalmente: o subsetor somato-sensorial seria nas regiões mediais das subdivisões ventral e dorsal (Nicoletis *et al.*, 1992), e o motor, em regiões mediais de todas as subdivisões (Mitrofanis e deFonseka, 2001). Deste modo a ZI poderia influenciar comportamentos e circuitos sensoriais e motores através de suas conexões integrando com a informação fótica que recebe. Porém, interessante no sagüi, a única porção que visualizamos receber projeção da retina foi o nível mais caudal. Devido à intercomunicação que existe entre as subdivisões e setores da ZI, como também a ZI ipsilateral e contralateral (Power e Mitrofanis, 1999), as informações luminosas podem ser passadas de uma subdivisão para outra. Outro fato interessante é que já foi demonstrada uma forte conectividade da região ventral da ZI intermédia, em ratos, com áreas visuais, como o CS e o pretecto (May *et al.*, 1997). Portanto a presença de fibras nesta região pode estar envolvida com alguma forma de processamento visual. Mesmo considerando que os nossos resultados mostrem uma projeção da região ventral da ZI caudal, isso pode ser atribuído a uma variação anatômica entre espécies.

6.3 – GFAP

GFAP, proteína acídica fibrilar glial, é principalmente expressa em astrócitos, nos quais constitui um marcador seletivo, e a expressão específica de GFAP neste tipo celular sugere que tenha importante papel funcional no sistema nervoso central. Por exemplo, a alta regulação dos filamentos intermédios astrocitários (GFAP) tem um grau crucial na gliose reativa (Liedtke *et al.*, 1996; McCall *et al.*, 1996). A respeito de seu papel neuroprotetor, depois que ocorre

uma injúria no sistema nervoso central, há uma indução anormal de GFAP (sinal de ativação astrogliar e gliose durante a neurodegeneração) considerada deletéria para a regeneração do sistema nervoso central porque os astrócitos fortemente reativos ao GFAP representam um obstáculo no estabelecimento de prevenção de contatos neurais e circuitaria normais (Anderson *et al.*, 2003). Recentes trabalhos sugerem que células que expressam o GFAP dão origem a populações específicas de neurônios durante o desenvolvimento (Kriegstein e Gotz, 2003), assim como células radiais gliais dão origem aos oligodendrócitos (Malatesta *et al.*, 2003).

Astrócitos representam a maior população cerebral no sistema nervoso central de mamíferos e estão intimamente associados com os neurônios. Este tipo celular foi inicialmente considerado como um substrato em papéis metabólicos e de suporte no sistema nervoso central. Contudo sabe-se que eles provêm mais que suporte trófico e estrutural para neurônios, astrócitos respondem ao aumento da concentração livre de Ca^{2+} depois da estimulação com uma variedade de neurotransmissores, neuromoduladores e hormônios. Eles têm um importante papel no guia de desenvolvimento na migração neuronal, na regulação de neurotransmissores e níveis iônicos, com papel neuroprotetor, na nutrição de neurônios e na produção de fatores neurotróficos (ver Eysseric *et al.*, 2000).

Nenhum trabalho tem mostrado a marcação contra o GFAP na ZI. Nossos resultados mostram a imunorreatividade negativa na ZI, mesmo não sendo totalmente negativa, devido à marcação de poucas células abrangendo áreas nos três níveis que concordam com nossas delimitações para o NeuN e Nissl, incluindo o CF e dorsalmente, o núcleo subtalâmico. Interessante observar que a ZI se caracteriza por um agrupamento neuronal de ricas conexões com córtex, tálamo, hipotálamo, tronco cerebral e medula espinhal além de apresentar diferentes funções, provavelmente como consequência das variadas áreas com as quais se comunica e da interconectividade entre os seus subsectores. Sendo assim, a negatividade contra o GFAP, faz-se relevante para estudos posteriores a respeito da contribuição dessas células num agrupamento neuronal complexo funcionalmente e neuroquimicamente.

6.4 - Proteínas Ligantes de cálcio (PLCa)

6.4.1 - CB

Na transmissão nervosa, os mensageiros intracelulares medeiam efeitos dos neurotransmissores em eventos celulares, entre esses mensageiros encontram-se as PLCa (Cheung, 1980), estas regulam os efeitos dos íons Ca^{2+} no metabolismo intracelular. As Proteínas discutidas neste trabalho foram a CB, a PV e a CR que são da mesma família, “EF-HAND”, de baixo peso molecular, solúveis e que se ligam com alta afinidade ao íon Ca^{2+} apresentando seqüência de aminoácidos semelhante (Kretsinger, 1980; Goodman *et al.*, 1979). Essas proteínas ocorrem em subpopulações de neurônios diferentes no sistema nervoso central e periférico, podendo ser distinguidas pelos processos específicos ligados à mobilização de Ca^{2+} (Rogers, 1987; Celio, 1990), e tendo sido relacionadas ao controle da divisão, movimentação e a processos de crescimento celular (Campbell, 1983). As proteínas são marcadores usados para uma visualização citoarquitetônica assim como de grupamentos celulares (Celio, 1990). Existe uma variabilidade de expressão das PLCa entre as espécies animais que podem servir de indícios das suas funções no sistema nervoso (Scotti e Nitsch, 1991).

Os nossos resultados mostram a presença de imunorreatividade positiva para as três PLCa abordadas em nosso experimento. A marcação pela IR-CB ocorreu em poucas células nas porções rostral da ZI, e na intermédia esta marcação estava mais concentrada ZIvl. O setor caudal foi o que apresentou o maior número de células marcadas, de forma esparsa, porém observamos um aglomerado de células na porção ventral neste nível. Estes resultados concordam com o trabalho de Kolmac e Mitrofanis (1999) de caracterização imunocitoquímica com ratos e gatos, em que a CB ocorreu em todos os setores da ZI apresentando o somata com formato arredondado pequeno, às vezes ovóide, e com maior número na ZI caudal (Kolmac e Mitrofanis, 1999). Mitrofanis e colaboradores em 2004 analisaram a distribuição da CB na ZI de *Macaca fascicularis*, e detectaram a presença desta proteína em todo o núcleo de forma homogênea. A marcação obtida em nossos resultados de células IR-CB na

ZI rostral apresenta-se como uma extensão do núcleo reticular do tálamo, também observado em um trabalho de proteínas ligantes de cálcio no sagüi (FitzGibbon *et al.*, 2000). Neste mesmo trabalho foi descrita uma marcação mais evidente na ZI caudal na região mais dorsal, contrário ao observado em nossos resultados, com esparsa distribuição na ZI intermédia e caudal ainda assim apresentando um aglomerado ventrolateral na intermédia, e uma pequena faixa ventral na caudal. Estes autores ainda mostraram que a ZI poderia ser dividida em dorsal e ventral de acordo com as proteínas ligantes de cálcio.

Alguns trabalhos mostram a presença de CB em regiões retino-recipientes (Silver *et al.*, 1996; Costa e Britto, 1997; Hamada *et al.*, 2001, Bryan *et al.*, 2000; Cavalcante *et al.*, 2008), e parece que com a ZI ocorre o mesmo, pois a sua porção caudal, mais ventralmente, é retino-recipiente apresentando em nosso trabalho clara marcação de fibras terminais da retina, além da marcação IR-CB nesta mesma região. Em hamster, um estudo demonstrou que as células contendo CB são importantes por retransmitir a informação fóptica do NSQ ventral para o dorsal que não recebe projeção retiniana (Hamada *et al.*, 2003).

Em estudo com camundongo mutante para o gene da CB percebe-se que a CB tem papel importante no controle da sinalização de cálcio dendrítica ao nível de células Purkinje, e a alteração da sinalização de cálcio nos dendritos dessa célula contribui para prejuízo na coordenação motora (Airaksinen *et al.*, 1997). Ocorre a baixa regulação na expressão de CB em cérebros de pacientes pós-mortem com esquizofrenia, desordem bipolar e grande depressão (ver Farré-Castany *et al.*, 2007). No Parkinsonismo em ratos, foi possível verificar que a estimulação profunda da ZI pode prover sintomas motores sem seqüelas neurofisiológicas associadas, vistas também na estimulação do subtalâmico, mas provocou uma medição motora contralateral maior que a estimulação no núcleo subtalâmico, sendo melhor para o tratamento do Mal de Parkinson refratário tratado medicamente (Plaha *et al.*, 2006). D'Orlando e colaboradores em 2001, concluíram em seu trabalho com excitotoxicidade celular que as proteínas ligantes de cálcio CB, assim como a CR, têm efeito protetor se a injúria for de curta duração.

6.4.2 - PV

A PV pertence ao subgrupo das proteínas tampão com três domínios, dois dos quais se ligam ou para Ca^{2+} ou Mg^{2+} (Lee *et al.*, 2000) encontrada além do cérebro, no músculo, osso e nas glândulas endócrinas (ver Jones e Hendry, 1989). Segundo alguns trabalhos, o tipo celular que contém PV é dominante na ZI (Nicolelis *et al.*, 1992; Kolmac e Mitrofanis, 1999). Em um estudo com sagüi, a marcação da ZI apareceu pouco na porção dorsal e estas células estão predominantemente junto à borda com o núcleo ventrolateral talâmico e núcleo posterior lateral talâmico, enquanto que a porção ventral teve maior densidade de células grandes IR-PV e uma maior marcação da neurópila comparada à porção dorsal. Rostralmente, a marcação foi esparsa e semelhante à porção dorsal, e caudalmente foi dominada pelo tipo de marcação da ventral (FitzGibbon *et al.*, 2000). Neste mesmo trabalho, de um modo geral, pode-se dividir a ZI em duas porções, dorsal e ventral de acordo com as PLCa. As células IR-PV foram maiores que as IR-CR e IR-CB (FitzGibbon *et al.*, 2000). Em nossos resultados a marcação também foi maior na porção ventrolateral que na dorsomedial da ZI intermédia, similar à ventral do trabalho anterior, porém caudalmente a marcação foi a maior entre os níveis da ZI mas de forma esparsa. Em outro trabalho, com primata (*Macaca fascicularis*) as células IR-PV são de corpo ovóide e tamanho médio com processos dendríticos marcados, encontradas em todos os setores com distribuição desigual, com uma concentração na porção ventral (Mitrofanis *et al.*, 2004). No trabalho de Kolmac e Mitrofanis, em 1999, realizado em ratos e gatos, obteve-se o resultado da marcação IR-PV em quase toda a porção ventral da ZI, com células de corpos grandes e ovóides ou pequenos e alongados, supondo que as de corpo grande possam ser células de projeção enquanto as de corpos pequenos, interneurônios. Também foram vistas células nos outros setores, mas em menor quantidade, embora na porção dorsolateral de gatos tenha sido registrado 65% de células marcadas. Esses dados corroboram com os nossos, de células ovóides e grandes. No trabalho de Arai e colaboradores em 1994, a ZI ventral de rato apresentou células IR-PV nas suas porções mais dorsais.

No cerebelo de aves, PV tem sido pensada estar envolvida na regulação da síntese de alguns componentes da membrana em crescimento de dendritos e axônios (Braun *et al.*, 1986), já no tálamo de rato não tem sido encontrada correlação entre a expressão de PV e um período conhecido de crescimento axonal (Frassoni *et al.*, 1991). Existe co-localização de PV e GABA em algumas áreas neurais, em algumas partes do cérebro como no córtex cerebral, no hipocampo e no cerebelo foi mostrada a co-localização de GABA e PV (Celio *et al.*, 1986; Kosaka *et al.*, 1987). Já em um estudo de imunorreatividade contra as proteínas ligantes de cálcio em macaco, os interneurônios GABAérgicos da maioria do tálamo dorsal, classificados como neurônios de rápido “*spiking*” (disparo), não apresentaram IR-PV, também não se detectou a co-localização em parte do núcleo reticular e em algumas células do GLD, no núcleo geniculado medial magnocelular e no epitálamo (Jones e Hendry, 1989). Neste mesmo trabalho, aproximadamente 30% das células neuronais da ZI foram IR-PV e uma densa neurópila também foi marcada.

As células GABAérgicas e IR-PV da ZI se projetam ao CS (Nicoletis *et al.*, 1992), e são importantes por gerar movimentos orientados dos olhos e da cabeça a partir de um novo estímulo (Schall, 1995; Moschovakis, 1996). A atividade celular de projeção eferente da ZI em macacos apresenta picos antes do início da sacada e no final desta, inferindo assim que as células da ZI inibam as do CS. Essa pausa levaria ao disparo da atividade colicular gerando o movimento dos olhos e da cabeça (Ma, 1996). Com a perda de PV, poderia ocorrer uma maior excitabilidade, os níveis de cálcio poderiam aumentar e estimular a liberação excessiva de GABA no CS, e essa projeção levaria a uma sobreatividade inibitória no CS somando às outras projeções GABAérgicas dos núcleos do gânglio basal. Com isso, haveria uma supressão dos movimentos orientados da cabeça e dos olhos, o que acontece nos casos parkinsonianos (ver Heise e Mitrofanis, 2005).

A concentração de PV é alterada em humanos e animais com epilepsia e outras desordens neurológicas, assim como há a diminuição da proteína em cérebros de pacientes pós-morte com esquizofrenia, desordem bipolar e grande

depressão (ver Farré-Castany *et al.*, 2007). Arai e colaboradores, 1987, demonstraram a perda de neurônios imunorreativos a PV em pacientes com Alzheimer, outro trabalho demonstrou a mesma perda para o Mal de Parkinson (Kobayashi *et al.*, 1990).

A respeito da participação da ZI em sintomas de doenças neurodegenerativas vários trabalhos tem sido feitos em modelos experimentais animais, inclusive em humanos. Em ratos com Parkinson, verificou-se que a ZI é hiperativa, através de uso de marcador metabólico e análises eletrofisiológicas, sendo uma região que envia projeções glutamatérgicas aos núcleos do gânglio da base, substância negra e núcleo tegmental pedúnculo pontino que se degeneram no Mal de Parkinson (Heise e Mitrofanis, 2004). De acordo com Nandi *et al.* (2002b), a atividade anormal da região da ZI contribui para os sintomas do Mal de Parkinson, assim como outros estudos também apontam o papel da ZI na patofisiologia de movimentos anormais involuntários na doença (Hassler *et al.*, 1965; Gross *et al.*, 1999). Porém, a estimulação da ZI parece promover o benefício clínico como mostrado em alguns estudos: abole a catalepsia humana (Wardas *et al.*, 1987), tendo em vista que a ZI também tem relação com o papel do controle postural; em pacientes que sofrem de desordem obsessiva compulsiva (Mallet *et al.*, 2002); estudos clínicos demonstraram que a estimulação profunda da ZI alivia o tremor proximal em pacientes com esclerose múltipla (Alusi *et al.*, 2001; Nandi *et al.*, 2002 a e b), assim como a bradiquinesia e aquinesia em pacientes com Parkinson (Henderson *et al.*, 2002; Voges *et al.*, 2002); em outro trabalho também foi constatado que a estimulação de alta frequência é clinicamente efetiva para aliviar os sintomas motores parkinsonianos mais comumente aplicada no NST anterodorsal e dorsalmente na ZI adjacente (Saint-Cyr *et al.*, 2002; Voges *et al.*, 2002). Em outros estudos demonstrou-se que a lesão cirúrgica da ZI também promove benefício de sintomas motores do Mal de Parkinson (ver Mundinger, 1965). Assim a ZI participa não somente dos sintomas motores como também de distúrbios no despertar como a diminuição do sono, da atenção como os movimentos anormais dos olhos e do controle visceral como a constipação, que estão associados com a

doença, indicando que poderia formar perspectivas de tratamentos farmacológicos e cirúrgicos da doença, e que ainda deve ser determinado se a estimulação de diferentes setores da ZI promove sintomas clínicos diferentes (ver Mitrofanis, 2005).

A quantidade de neurônios IR-PV diminui no córtex de cérebros de pacientes com Síndrome de Down (Kobayashi *et al.*, 1990), e no hipocampo neurônios IR-PV são perdidos em subcampos tais como o CA3, o subiculum e o presubiculum (Brady e Mufson, 1997). Em um trabalho sobre o efeito da PV na morte de neurônios excitatórios revelou que a ausência desta proteína nos neurônios motores pode contribuir para a vulnerabilidade deste tipo celular, levando a morte excitotóxica mediada pelo cálcio, que estaria associada à pobre capacidade da célula em tamponar o cálcio (Bosch *et al.*, 2002). Nossos resultados mostram que a porção caudal da ZI apresenta maior quantidade de PV, sendo a região associada à função motora, assim a proteína pode ter grande importância na funcionalidade desta porção da ZI.

O envolvimento funcional da ZI no fenômeno motor somático e mecanismos de integração sensório-motora é indicado por alguns estudos. Em gato, estimulação elétrica da ZI leva a respostas motoras (Jones e Leavitt, 1974), em macacos registros por microeletrodos demonstrou que unidades da ZI respondem a manipulações passivas dos braços e a estímulo visual, sendo ativadas quando o animal alcança objetos de interesse e fadiga durante a performance de tarefa de trilha visuomotora (Crutcher *et al.*, 1980). Legg, 1979, relatou através de estudo comportamental que ratos com a ZI lesionada foram prejudicados em uma tarefa motora que requeria discriminação da intensidade de luz, sugerindo que a ZI possa ter ligação com vias envolvidas na transferência de informação visual para circuitos motores. A informação do movimento dos braços podem alcançar a ZI pela projeção do núcleo da coluna dorsal, e a informação visual através de, por exemplo, áreas visuais do córtex cerebral, do pretecto, e núcleo geniculado lateral ventral (Shammah-Lagnado *et al.*, 1985).

6.4.3 - CR

A CR é uma proteína ligante de cálcio conhecida como a subclasse das proteínas de gatilho, apresentando seis domínios, cinco dos quais se ligam ao cálcio (Kuznicki *et al.*, 1996). Esta proteína pode estar envolvida mais na modulação de mudanças transitórias de Ca^{2+} do que no controle do nível restante do cálcio (Dowd *et al.*, 1992).

Em nosso trabalho encontramos marcação maior na região dorsal da ZI intermédia, semelhante ao trabalho de Arai e colaboradores em 1994, realizado em ratos. Assim como também em um trabalho com sagui, as células IR-CR foram espalhadas pela ZI, tendo a porção dorsal uma quantidade um pouco maior que a ZI ventral, e a morfologia das células IR-CR foram similares às IR-CB (FitzGibbon *et al.*, 2000). Em ratos adultos, esta porção da ZI também apresenta neurônios de projeção cortical que alcançam as camadas superficiais, particularmente a camada I (ver Nicolelis *et al.*, 1995). A CR e CB estão presentes em neurônios do tálamo que se projetam às camadas profundas V e VI, e à superficial I do córtex. Essas projeções profundas podem alterar a excitabilidade de neurônios piramidais, assim como as projeções para a camada superficial também podem modular a atividade por contactar os dendritos ou finais distais das células piramidais (Arai *et al.*, 1994).

É aceito que anticorpos para as três proteínas ligantes de cálcio marquem os níveis do sistema visual, onde a complementaridade ascende da retina, mantém-se no tálamo, nos núcleos acessórios, no colículo superior, e no córtex visual (Andressen *et al.*, 1993). A zona incerta é marcada pra as três proteínas analisadas em nosso trabalho, sendo um agrupamento neuronal que recebe projeção retiniana diretamente em sagüi. Em macaco, as proteínas estão presentes no pretecto (Scripser *et al.*, 1991), e os marcadores contra as proteínas coincidem com as aferências da retina no pretecto (Nabors e Mize, 1991).

6.5 – VIP

VIP é o peptídeo vasoativo intestinal (Mutt e Said, 1970) com distribuição espalhada no sistema nervoso central e periférico (Fahrenkrug, 1979). Receptores VIP têm sido caracterizados em vários mamíferos e outras espécies de vertebrados (Alexandre *et al.*, 1999), assim como também em invertebrados como moluscos, insetos (Kaufmann *et al.*, 1995; Andries *et al.*, 1991) e anelídeos (Németh *et al.*, 2002). O VIP não somente é o maior regulador de secreção gastrointestinal, mas também tem um importante papel na regulação da motilidade gastrointestinal, causando relaxamento dos músculos intestinais e gástricos, e fisiologicamente medeia o relaxamento descendente do reflexo peristáltico (Grider *et al.*, 1998). Não há trabalho realizado na ZI que aborda a presença de IR-VIP. Em nossos resultados a marcação contra VIP ocorreu em todas as porções da ZI, rostral, intermédio e caudal. A porção rostral apresentou menos marcação. De acordo com o trabalho de Spencer *et al.*, 1988, a maioria das funções viscerais está associada à ZI rostral, outros estudos têm registrado que a lesão na ZI rostral causa uma diminuição da ingestão de água e comida (Tonelli e Chiaraviglio, 1995; Dalton e Grossman, 1982; Evered e Mogenson, 1976). Em nosso trabalho uma marcação mais concentrada ocorreu na porção intermédia na região ventrolateral, e a porção caudal também apresentou muitas células IR-VIP. Estudos têm mostrado que o setor somatosensório da ZI localiza-se nas porções ventral, dorsal e caudal que recebem aferências da medula espinhal, do córtex parietal e do núcleo trigeminal em ratos (Nicoletis *et al.* 1992; Shaw e Mitrofanis, 2002), enquanto a ZI ventral se projeta para núcleos talâmicos de alta-ordem (Ricardo, 1981; Romanowski *et al.*, 1985). Outras importantes funções do VIP incluem a participação da regulação da atividade de células gliais e da proliferação celular, controle do metabolismo do glicogênio, modulação da plasticidade celular e estimulação da liberação de fatores neuroprotetores, como a secreção de gliotransmissores e gliopeptídeos envolvidos na comunicação intercelular (ver Masmoudi-Kouki *et al.*, 2006).

6.6 – VP

VP é o hormônio vasopressina, liberado fisiologicamente em resposta ao aumento da osmolaridade, o qual é sentido dentro de receptores sensitivos no hipotálamo, por exemplo (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004). Não há relatos sobre a IR-VP na ZI na literatura. Em nossos resultados encontramos IR-VP em células em todos os setores da ZI, com uma maior concentração na região ventrolateral da porção intermédia, semelhante à marcação com VIP. Estudo com lesão na ZI mostrou que houve um prejuízo na ingestão de bebida, como resposta à sede osmótica periférica, como também, uma redução na bebida secundária (ver Mok e Mogenson, 1986; Evered e Mogenson, 1976). Outros estudos mostram que a lesão eletrolítica da ZI medial e rostral prejudicou vários comportamentos controladores do balanço homeostático incluindo a quebra da ingestão de água regulatória, prejuízo do apetite de sódio e deficiência da reatividade do paladar (Kiefer e Grijalva, 1980; Walsh e Grossman, 1973; 1976). A liberação de VP é regulada por diferentes neurotransmissores aminérgicos e peptidérgicos, dentre eles a serotonina (Falke, 1991). Como relatado neste trabalho, a ZI recebe projeção serotoninérgica que provavelmente modula as células IR-VP.

6.7 – GABA

GABA é o principal neurotransmissor no sistema nervoso central (Qume e Fowler, 1996). Este trabalho é o primeiro a realizar a imunorreatividade contra GABA na ZI de sagüis. Encontramos marcação em todas as porções, rostral, intermédia e caudal. Em estudos anteriores, o GABA tem sido encontrado na ZI em diferentes mamíferos. Em um trabalho com primata, a maioria das células da ZI central foi imunorreativa à GABA (Mitrofanis *et al.*, 2004), em rato, a ZI ventral é tida como a região com mais alto nível de células GABAérgicas (Nicoletis *et al.*, 1995; Ficalora e Mize, 1989; Araki e McGeer, 1984). Kim *et al.*, 1992, demonstraram que a parte ventral é imunorreativa a GABA e GAD, uma enzima sintetizadora de GABA. Kolmac e Mitrofanis, 1999, analisaram a presença de GABA e GAD em rato e gato, constatando a marcação da maioria na ZI ventral e poucas nos outros setores, totalizando o número de células IR-GABA na ZI ventral 80-85%, na dorsal 20-25% e na caudal 10%.

Imunorreatividade contra GAD também foi observada em outros trabalhos (Oertel *et al.*, 1982; Ottersen e Storm-Mathison, 1984; Ficalora e Mize, 1989; Nicoletti *et al.*, 1992, 1995; Nagai *et al.*, 1983; Araki e McGeen, 1984). Em gato observaram uma concentração da marcação de células IR-GABA na porção mediolateral na banda ventral da ZI e também espalhadas dorsalmente, e que quase todas as células na porção ventral que projetam ao CS são também imunorreativas a GABA. Em nosso trabalho encontramos a marcação IR-GABA concentrada na região ventrolateral da porção intermédia o que corrobora com alguns resultados descritos anteriormente. Mas de forma geral, houve marcação na ZI completa.

Sabe-se que o CS está relacionado a reflexos visuais. A ZI apresenta conexão eferente com o colículo partindo da porção ventral, assim também como recebe do CS na mesma porção em primata. Em rato, os neurônios da porção ventral se projetam ao colículo e as projeções tecto-incerto terminam na porção dorsal (Jones, 2007). Hikosaka e Wurtz, 1983, registraram respostas relacionadas a movimentos dos olhos em células da ZI. As vias incerto-tectais foram registradas se originando de células GABAérgicas localizadas ventralmente (Araki e McGeer, 1984; Ficalora e Mize, 1989).

Em gato, o papel das células incertotectais na geração dos movimentos dos olhos é sugerido pela observação que algumas células da ZI exibem uma pausa em suas velocidades de disparo altamente tônica de forma abrupta antes do início da sacada (Hikosaka e Wurtz, 1983). Nesse estudo, muitas células da ZI ventral se estenderam na porção dorsolateral e se projetaram para as camadas profunda e intermédia do CS. Desde que essas camadas profundas dão origem às principais vias para os centros de fixação do olhar no tronco cerebral e na medula espinhal no gato e em outros mamíferos (Hall e May, 1984; May *et al.*, 1993; Olivier *et al.*, 1991) é consistente a idéia de que a ZI contribua para o controle de movimentos orientados dos olhos e da cabeça. Essas mesmas camadas contêm um número de células que se projetam de volta à ZI, aparentemente terminando nas células incerto-tectais, então o impulso inibitório da ZI para o tecto pode ser influenciado por um feedback do CS. Kim *et al.*, 1992, através de traçador

retrógrado HRP no CS e anterógrado na ZI de HRP, em ratos, verificaram também que a subdivisão ventral provê uma projeção GABAérgica organizada topograficamente para a camada celular do CS que contém uma grande parte do feixe pré-dorsal. Ma *et al.*, 1991, verificaram que a projeção incerto-tectal, em macacos, é para camadas profundas que iniciam a geração do movimento sacádico. Outro estudo sugere, que em macacos, os neurônios da ZI têm moderadas velocidades de atividade tônica e diminuem durante os movimentos sacádicos dos olhos, implicando que a ZI iniba o CS e desiniba durante o movimento sacádico (Ma *et al.*, 1992). A pausa perisacádica está relacionada com a duração da sacada, quanto mais longa esta for, maior será a pausa (Ma, 1996).

Crutcher *et al.*, 1980, em um estudo com macacos da ZI observaram que muitas células são ativas quando o animal alcança objetos ao redor, movimento provavelmente acompanhado por movimentos dos olhos e da cabeça. Em um outro estudo, com gatos, mostrou-se que a ZI recebe aferências somato-sensórias com informação da área do corpo estimulada, de forma mapeada, sobrepondo-se às células que se projetam ao CS podendo influenciar na atividade que gera a orientação da cabeça e dos olhos acerca da localização do estímulo (Mitrofanis, 2005).

Ma, em 1996, observou que em primata a pausa na atividade tônica em algumas células da ZI ocorria antes da sacada contribuindo para o disparo de células pré-motoras no CS relacionadas à sacada. A distribuição da via incerto-tectal indica que neurônios GABAérgicos na ZI ventral têm papel na modulação desta atividade no CS e na produção da orientação de movimentos. Neste estudo, o pretecto anterior é a principal fonte de impulso para a porção que envia para o colículo, assim o núcleo pretectal poderia afetar a atividade relacionada à fixação do olhar pelo CS. Deste modo, a projeção incerto-tectal poderia contribuir para determinar a seleção do alvo ou mudança de fixação do olhar em função da necessidade interna do animal. Por exemplo, um estudo mostrou que em carneiros privados de alimento quando colocados diante de deste aumenta a liberação de GABA, e quando privados de sal em contato com este também

aumentam a liberação de GABA (Kendrick e Baldwin, 1986). Parece que a resposta motora pela ZI está de acordo com a combinação entre necessidades internas e o estímulo externo (Mitrofanis *et al.*, 2004). Estes resultados indicam que o GABA pode ser um importante neurotransmissor em circuitos neurais controladores da regulação de ingestão de comida (Kendrick *et al.*, 1991).

Ainda relacionando a ZI na participação de funções visuais, em um estudo com ratos, para avaliar a participação da ZI na discriminação visual, realizou-se uma lesão na sua parte lateral e posterior, os animais exibiram um déficit na aquisição da discriminação sucessiva do claro versus obscuro em uma tarefa, relacionada à intensidade relativa, assim como também da discriminação do branco versus preto simultâneos submetidos a uma iluminação. Assim a ZI foi sugerida fazer parte de um sistema visual que medeia discriminação de intensidade relativa visual, em que o GLV direciona a uma significativa informação de intensidade luminosa (Legg, 1979).

Propõe-se que a ZI tenha papel inibitório na projeção ao córtex. Um trabalho realizado por Startz *et al.*, 1951, com a remoção da entrada GABAérgica da ZI ao córtex pôde produzir uma dessincronização. Outro trabalho de Enber *et al.*, 1995, através de lesão na ZI provocou o aumento da atividade cortical e alargamento dos campos receptivos no córtex somatosensório de ratos. A precisa função da entrada GABAérgica para a camada I do neocortex é desconhecida mas é concebível que seja inibitória e/ou modulatória em dendritos distais corticais (Ma *et al.*, 1997). Propõe-se então que os neurônios da ZI através de ricas interconexões podem ser capazes de produzir um sinal de saída GABAérgica o qual sincronizaria populações de células relés em núcleos talâmicos de alta-ordem.

Com relação à atividade motora, em um estudo foi realizada injeção na ZI de ratos de bicuculina, um antagonista GABA, que provocou o aumento da locomoção (Periér *et al.*, 2002). Em outros estudos com macacos (Crossman *et al.*, 1984), as mesmas injeções na zona incerta induziram torcicolo e comportamento circulares (circling), em estudos com gatos, a injeção na ZI resultou em inclinação da cabeça junto ao eixo longitudinal do corpo (Murer e

Pazo 1993), e quando injetado dentro da ZI lateral ocorreu indução de movimentos anormais como pular, torção axial, e movimentos anormais da cabeça também e dos membros (Periér *et al.*, 2002). Em estudo com humanos, a subtalotomia, lesão no subtálamo, aboliu vários tipos de tremores bem como a rigidez enquanto a estimulação os facilitou (ver Struppler, 1982).

6.8 - 5-HT

A 5-HT é um neurotransmissor presente no cérebro que se origina de um pericário relativamente pequeno localizado nos sistema da rafe metencefálico e mesencefálico que envia axônios para quase todas as áreas do sistema nervoso central, e influencia vários circuitos neuronais incluindo aqueles implicados na ritmicidade circadiana (ver Jacobs e Azmitia, 1992). Os neurônios serotoninérgicos da rafe mediana têm sido implicados em um número de eventos incluindo regulação de certos tipos de comportamento, sono e regulação neuroendócrina (ver Azmitia, 1978). Nossos resultados no sagüi demonstraram a presença de fibras e terminais imunorreativos a 5-HT, mas não de células. Trabalhos anteriores têm demonstrado a presença de células imunorreativas a 5-HT, em rato a ZI medial contém células serotoninérgicas (Bosler *et al.*, 1984). Sugere-se que a 5-HT esteja relacionada a uma variedade de processos neuroendócrinos como a modulação de secreção de prolactina e gonadotropina (Bosler *et al.*, 1984), visto que a ZI apresenta o trato incerto-hipotalâmico que tem papel estimulatório no controle da liberação de gonadotropina (Mackenzie *et al.*, 1984), o que poderia estar relacionado à projeção serotoninérgica que recebe. Outro trabalho demonstrou imunorreatividade à 5-HT em neurônios da ZI de ratos espalhados em todos os setores, mas não em gatos (Kolmac e Mitrofanis, 1999). A dorsal da rafe e o núcleo magno da rafe enviam projeção para a ZI em ratos (Lechner *et al.*, 1993).

A 5-HT foi demonstrada ter papel na modulação de impulsos fóticos, com aplicação durante o dia subjetivo, resultando em avanço de fase da atividade do ritmo circadiano de neurônios (Medanic e Gillete, 1992; Prosser *et al.*, 1990), efeito mediado por receptor 5-HT_{1A} (Prosser *et al.*, 1992) e pelo receptor 5-HT₇,

encontrado no NSQ (Belenky e Pickard, 2001) bem como na ZI (Siddiqui *et al.*, 2004). Devido a esta influência da projeção serotoninérgica em circuitos relacionados ao ritmo circadiano, principalmente através da informação fótica que chega na rafe, a projeção serotoninérgica para a ZI, poderia prover, através das várias conexões que estabelece com grupos neuronais funcionalmente diferentes, um guia para determinados comportamentos. A ZI medial contém hipocretina (Vidal *et al.*, 2005), que integra influências nutricionais-metabólicas, e fóticas-circadianas (ver Selbach e Haas, 2006), implicada no controle do ciclo sono-vigília e na regulação de ingestão de comida (De Lecea *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1999), assim como também outro estudo constatou na ZI medial a presença do hormônio concentrador de melanina (HCM) que tem sido relatado estar envolvido na regulação do metabolismo de energia (Presee *et al.*, 1996).

A ZI dorsal e rostral estão mais associadas com a função do despertar, sugerindo-se que a ZI faça parte de um circuito relacionado ao despertar por suas conexões com os principais centros do tronco, como o núcleo reticular pontino e o mesencéfalo, e do tálamo, principalmente com o tálamo dorsal influenciando no estado geral de alerta (Kolmac *et al.*, 1998; Power e Mitrofanis, 2001; Steriade *et al.*, 1982; Munk *et al.*, 1996; Shaw e Mitrofanis, 2001). As projeções da ZI aos centros hipotalâmicos poderiam ser vistas como caminhos potencialmente capazes de convergir a informação sensorial multimodal para o hipotálamo como sugerido por Nauta e Haymaker (1969) e as projeções eferentes da ZI para o hipotálamo posterior poderiam estar envolvidas no ciclo sono-vigília (McGinty, 1969).

A 5-HT tem sido mostrada uma região que modula a atividade talamo-cortical (ver McCormick, 1992). A ZI recebe projeção do córtex da camada V e a maioria sendo de áreas límbicas e frontais (Mitrofanis e Mikuletic, 1999), além de vários núcleos do tronco cerebral (Kolmac *et al.*, 1998) e envia para núcleos talâmicos de alta-ordem que enviam ao córtex (Lévesque *et al.*, 1996; Barthó *et al.*, 2002; Mitrofanis e Mikuletic, 1999), essas projeções são GABAérgicas e podem modular a transmissão talâmica (Sherman e Guillery, 1998). Dessa forma, a ZI poderia ser modulada pela serotonina através das projeções da rafe, e

através de suas aferências e eferências corticais, além das projeções retinianas, manter um circuito integrador de informações influenciando vários comportamentos.

7. CONCLUSÕES

1) A técnica de Nissl revela agrupamentos neuronais no nível intermédio da ZI, com uma concentração ventrolateral e dorsomedial no sagüi, ao invés de ventral e dorsal apenas. A imuno-histoquímica contra NeuN também revelou esse arranjo celular na ZI intermédia. Contudo, para uma análise da citoarquitetura, o NeuN pareceu proporcionar uma melhor visualização dos agrupamentos.

2) A ZI no sagüi apresenta fibras e terminais retinianos somente na porção caudal, diferente dos dados em roedores, mas com a semelhança da predominância contralateral.

3) A ZI apresenta imunorreatividade contra GFAP, na porção rostral, mas quase completamente negativa na porção intermédia e caudal, nesta última, estendendo-se ao Campo de Forel.

4) A ZI apresenta marcação contra as proteínas ligantes de cálcio e GABA, com pequenas concentrações ventrolaterais, de diferentes intensidades, assim corroborando com as limitações citoarquitetônicas.

5) Para VIP e VP a ZI apresenta concentrações bastante precisas para a concentração ventrolateral e dorsomedial, com o detalhe de que o VP e o VIP não haviam sido analisados na ZI anteriormente.

6) Fibras e terminais imunorreativos a 5-HT são encontrados nas três porções da ZI de forma bastante espalhada, porém células não são marcadas contra 5-HT como em trabalhos anteriores com roedores e gatos. A serotonina não havia sido analisada em primatas.

8. PERSPECTIVAS

Este trabalho foi o primeiro a caracterizar a zona incerta do sagüi (*Callithrix jacchus*) e a fornecer resultados de neuroquímica com algumas substâncias não trabalhadas em estudos anteriores. Uma subdivisão da ZI fornecida pela citoarquitetura encontrada neste trabalho é relevante, visto que se diferencia das demais da literatura. Tendo em vista esses resultados, juntamente com as características das projeções retinianas na ZI, que fornecem uma base para estudos posteriores aliados à conectividade e funcionalidade das subdivisões da ZI no sagüi, um primata do Novo Mundo, poderá servir de comparação com as outras espécies da mesma ordem analisadas até então. Assim, uma continuação pode ser dada a partir dos dados fornecidos por esse trabalho:

- Estudo funcional da ZI do sagüi através da expressão das proteínas de genes imediatos após determinados estímulos como visual, sexual entre outros;
- Estudo da hodologia da ZI do sagüi, analisando as subdivisões ventrolateral e dorsomedial;
- Estudo da co-localização de substâncias neuroquímicas no sagüi;
- Estudo de lesão nas subdivisões ventrolateral e dorsomedial da ZI no sagüi;
- Estudo de comparação da ZI do sagüi com outros primatas, assim como com roedores.

9. REFERÊNCIAS

Abrahamson EE, Moore RY. 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 916:172-191.

Airaksinen MS, Eilers J, Garaschuk O, Thoenen H, Konnerth A, Meyer M. 1997. Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1488-1493.

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.

Alexandre D, Anouar Y, Jegou S, Fournier A, Vaudry H. 1999. A cloned frog vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor exhibits pharmacological and tissue distribution characteristics of both VPAC1 e VAPC2 receptors in mammals. *Endocrinology* 140:1285-93.

Alusi SH, Worthington J, Glickman S, Bain PG. 2001. A study of tremor multiple sclerosis. *Brain* 124:720-730.

Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS, Nilsson M. 2003. Astrocytes and stroke networking for a survival?. *Neurochem Res* 28:293-305.

Andressen C, Blümcke I, Celio MR. 1993. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tiss Res* 271:181-208.

* Normas técnicas de acordo com o periódico internacional: The Journal of Comparative Neurology

Andres JC, Belemtougri G, Tramu G. 1991. Multiple peptide immunoreactivities in the nervous system of *Aeschna cyanea* (Insecta, Odonata). *Histochem* 96:139-48.

Antunes-Rodrigues J, De Castro M, Elias LLK. 2004. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84:169-208.

Arai H, Emson PC, Mountjoy CQ, Carassco LH, Heizmann CW. 1987. Loss of parvalbumin-immunoreactivity neurones from cortex in Alzheimer-type dementia. *Brain Res* 418:164-169.

Arai R, Jacobowitz DM, Deura S. 1994. Distribution of calretinin, calbindin D-28k, and parvalbumin in the rat thalamus. *Brain Res Bull* 33:595-614.

Araki M, McGeer EG. 1984. Presumptive γ -aminobutyric acid pathways from the midbrain to the superior colliculus studied by a combined horseradish peroxidase- γ -aminobutyric acid transaminase pharmacohistochemical method. *Neuroscience* 13: 433-439.

Azmitia EC. 1978. The serotonin-producing neurons of the midbrain medial and dorsal raphe nuclei. In: *Handbook of Psychopharmacology*. L.L. Iversen, S. Iversen and S. H. Snyder, eds. Plenum Press, New York, in press.

Barthó P, Freund TF, Acsády L. 2002. Selective GABAergic innervation of thalamic nuclei from zona incerta. *Europ J Neurosci* 16:999-1014.

Belenky MA, Pickard GE. 2001. Subcellular distribution of 5-HT(1B) and 5-HT(7) receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* 432:371-388.

Biello SM, Harrington ME, Mason R. 1991. Genuculo-hypothalamic tract lesions block chlordiazepoxide-induced phase advances in Syrian hamsters. *Brain Res* 522:47-52.

Blanks RI, Clarke RJ, Fausto L, Giolli RA, Phan SV, Torige Y. 1995. Projections of the lateral terminal accessory optic nucleus of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Comp Neurol* 354:511-532.

Bosch LVD, Schwaller B, Vleminckx V, Meijers B, Stork S, Ruehlicke T, Houtte, Bosler O, Joh TH, Beaudet A. 1984. Ultrastructural relationship between serotonin and dopamine neurones in the rat arcuate nucleus and medial zona incerta: a combined autoradiographic and immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 48:279-285.

Bosch LVD, Schwaller B, Vleminckx V, Meijers B, Stork S, Ruehlicke T, Houtte EV, Klaassen H, Celio MR, Missiaens L, Robberecht W, Berchtold MW. 2002. Protective Effect of Parvalbumin on Excitotoxic motor neuron death. *Exp Neurol* 174:150-161.

Bosler O, Joh TH, Beaudet A. 1984. Ultrastructural relationship between serotonin and dopamine neurones in the rat arcuate nucleus and medial zona incerta: a combined autoradiographic and immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 48:279-285.

Brady DR, Mufson EJ. 1997. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of alzheimer's diseased brain. *Neuroscience* 80: 1113-1125.

Braun K, Schachner M, Scheich H, Heizman CW. 1986. Cellular localization of the Ca²⁺ binding protein parvalbumin in the developing avian cerebellum. *Cell Tissue Res* 243:69-78.

Bryan DN, LeSauter J, Silver R, Romero MT. 2000. Retinal innervation of calbindin-D28K cells in the hamster suprachiasmatic nucleus: ultrastructural characterization. *J Biol Rhythms* 15:103-111.

Campbell AK. 1983. Intracellular calcium: its universal role as regulator. In: Gutfreund H (ed) *Monographs in molecular biophysics and biochemistry*. Wiley, New York, pp 1-556.

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

Cavalcante JS, Britto LRG, Toledo CAB, Nascimento Junior ES, Lima RRM, Pontes ALB, Costa MSMO. 2008. Calcium-binding proteins in the circadian centers of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the rock cavy (*Kerodon rupestris*) brains. *Brain Res Bull.* 76:354 -360.

Cavalcante JS, Costa MSMO, Santee UR, Britto LRG. 2005. Retinal projections to the midline and intralaminar thalamic nuclei in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Brain Res* 1043:42-47.

Cavalcante JS, Nascimento Junior ES, Costa MSMO. 2006. Componentes centrais do sistema de temporização circadiana: O núcleo supraquiasmático e o folheto intergeniculado. *Neurociencias* 3:273-282.

Cavalcante JS. Mapeamento das projeções retinianas ao diencéfalo e mesencéfalo do sagüi (*Callithrix jacchus*). 2002. Tese de (Doutorado) p.35, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Çavdar S, Onat F, Çakmak Y Ö, Saka E, Yananlı HR, Aker R. 2006. Connections of the zona incerta to the reticular nucleus of the thalamus in the rat. *J Anat* 209:251-258.

Celio MR, Scharer L, Morrison JH, Normqan AW, Bloom FE. 1986. Calbindin immunoreactivity alternates with cytochrome c-oxidase-rich zones in some layers of the primate visual cortex. *Nature* 323:715-717.

Celio MR. 1990. Calbindin D-28K and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375-475.

Cheung WY. 1980. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207:19-27.

Conrad CD, Stumpf WE. 1975. Direct visual input to the limbic system: crossed retinal projections to the nucleus anterodorsalis thalami in the tree shrew. *Exp Brain Res* 23:141-149.

Cooper HM, Mick G, Magnin M. 1989. Retinal projection to mammalian telencephalon. *Brain Res* 477:350-357.

Costa MSMO, Britto LRG. 1997. Calbindin Immunoreactivity delineates the circadian visual centers of the brain of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Brain Res Bull* 43:369-373.

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.

Crossman AR, Sambrook MA, Jackson A. 1984. Experimental hemichorea/hemiballismus in the monkey. Studies in the intracerebral site of action in a drug-induced dyskinesia. *Brain* 107:579-596.

Crutcher MD, Branch MH, DeLong MR, Georgopoulos AP. 1980. Activity of zona incerta neurons in the behaving primate. *Soc Neurosci Abstr* 6:676.

D'Orlando C, Fellay B, Schwaller B, Salicio V, Bloc A, Gotzos V, Celio M R. 2001. Calretinin and calbindin D-28k delay the onset of cell death after excitotoxic stimulation in transfected P19 cells. *Brain Res* 909:145-158.

Dalton LD, Grossman SP. 1982. Responses to dietary adulterations in rats with zona incerta lesions. *Physiol Behav* 29:51-60.

De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel W N, Van de Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. 1998. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad USA* 95:322-327.

Dowd DR, MacDonald PN, Komm BS, Haussler MR, Miesfeld RL. 1992. Stable expression of the calbindin-D28k complementary DNA interferes with the apoptotic pathway in lymphocytes. *Mol Endocrinol* 6:1843-1848.

Enber FF, Armstrong-James MA, Diamond ME. 1995. Changes in receptive field properties of rat barrelfield neurons following thalamic lesions. *Soc Neurosci Abstr* 15:1220.

Engelberth RCGJ, Pontes ALB, Nascimento RBS, Lima RRM, Lima RR, Toledo CAB, Costa MSMO, Britto LRG, Cavalcante JS. 2008. Discrete retinal input to the parabrachial complex of a new-world primate, the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neurosci Lett* 443:99-103.

Erkert HG, Nagel B, Stephani I. 1986. Light and social effects on the free-running circadian activity rhythm in common marmosets (*Callithrix jacchus*; Primates): social masking, pseudo-splitting, and relative coordination. *Behav Ecol Sociobiol* 18: 443-452.

Erkert HG. 2008. Diurnality and nocturnality in nonhuman primates: comparative chronobiological studies in laboratory and nature. *Biol Rhythm Res* 39(3):229-267.

Evered MD, Mogenson GJ. 1976. Regulatory and secondary water intake in rats with lesions of the zona incerta. *Am J Physiol* 230:1049-1057.

Eysseric H, Gonthier B, Soubeyran A, Richard MJ, Develoouse D, Barret L. 2000. Effects of chronic ethanol exposure on acetaldehyde and free radical production by astrocytes in culture. *Alcohol* 21:117-125.

Fahrenkrug J. 1979. Vasoactive polypeptide: measurement, distribution and putative neurotransmitter function. *Digestive* 19:149-169.

Falke N. 1991. Modulation of oxytocin and vasopressin release at the level of the neurohypophysis. *Prog Neurobiol* 36:465-84.

Farré-Castany MA, Schwaller B, Gregory P, Barski J, Mariethoz C, Eriksson JL, Tetko IV, Wolfer D, Celio MR, Schmutz I, Albrecht Urs, Villa AEP. 2007. Differences in locomotor behavior revealed in mice deficient for the calcium-

binding proteins parvalbumin, calbindin D-28k or both. *Behav Brain Res* 178:250-261.

Ficalora AS, Mize RR, 1989. The neurons of the substantia nigra and zona incerta which project to the cat superior colliculus are GABA immunoreactive: a double-label study using GABA immunocytochemistry and lectin retrograde transport. *Neuroscience* 29:567-581.

Fite KV, Janusonis S, Foote W, Bengston L. 1999. Retinal afferents to the dorsal raphe nucleus in rats and mongolian gerbils. *J Comp Neurol* 414:476-484.

Fite KV, Janusonis S. 2001. Retinal projections to the dorsal raphe nucleus in the Chilean degus (*Octodon degus*). *Brain Res* 895:139-145.

Fite KV, Janusonis S. 2002. Optic afferents to the parabrachial nucleus. *Brain Res* 943:9-14.

FitzGibbon T, Solomom SG, Goodchild AK. 2000. Distribution of calbindin, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the reticular thalamic nucleus of the marmoset: evidence for a medial leaflet of incertal neurons. *Exp Neurol* 164:371-383.

Foote WE, Taber-Pierce E, Edwards L. 1978. Evidence for a retinal projection to the midbrain raphe of the cat. *Brain Res* 156:135-140.

Frasconi C, Bentivoglio M, Spreafico R, Sanchez MP, Puellas L, Fairen A. 1991. Postnatal development of calbindin and parvalbumin immunoreactivity in the thalamus of the rat. *Dev Brain Res* 58:243-249.

Frazão R., Pinato L, Silva AV, Britto LRG, Oliveira JA, Nogueira MI. 2008. Evidence of reciprocal connections between the dorsal raphe nucleus and the retina in the monkey *Cebus apella*. *Neurosci Lett* 430:119-123.

Gillete MU. 1991. Electrophysiology in vitro: rhythmic activity and endogenous clock properties. In: Klein DC, Moore RY, Reppert SM(eds). *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. Oxford: Oxford Univ Press p125-143.

Goodman M, Pechere JF, Haiech J, Demaille JG. 1979. Evolutionary diversification of structure and function in the family of intracellular calcium-binding proteins. *J Mol Evol* 13:331-352.

Grider JR, Foxx-Orenstein AE, Jin JG. 1998. 5-Hydroxytryptamine₄ receptor initiate the peristaltic reflex in human, rat, and guinea pig intestine. *Gastroenterology* 115:370-380.

Gross CE, Boraud T, Guehi D, Bioulac B, Bezard E. 1999. From experimentation to the surgical treatment of parkinson's disease: prelude or suite in basal ganglia research? *Prog Neurobiol* 56:509-532.

Hall WC, May PJ. 1984. The anatomical basis for sensorimotor transformations in the superior colliculus. *Contrib Sensory Physiol* 8:1-40.

Hamada T, LeSauter J, Lokshin M, Romero M-T, Yan L, Venuti JM, Silver R. 2003. Calbindin influences response to photic input in suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 23(26):8820-8826.

Hamada T, LeSauter J, Venuti JM, Silver R. 2001. Expression of period genes; rhythmic and non-rhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. *J Neurosci* 21:7742-7750.

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

Hassler R, Mundinger F, Riechert T. 1965. Correlations between clinical and autptic findings in stereotaxic operations of parkinsonism. *Conf Neurol* 26:282-29.

Hasting JW, Rusak B, Boulos Z. 1991. Circadian rhythms: the physiology of biological timing. In: Prosser L. ed. *An Physiol.*, Wiley-Liss, Inc, p.435-546.

Heise CE, Mitrofanis J. 2004. Evidence for a glutamatergic projection from the zona incerta to the basal ganglia in rats. *J Comp Neurol* 468:482-495.

Heise CE, Mitrofanis J. 2005. Reduction in parvalbumin expression in the zona incerta after 6OHDA lesion in rats. *J Neurocytol* 34:421-434.

Hemult K Wolf, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blümcke I. 1996. NeuN: A useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J histochem cytochem* 44:1167-1171.

Henderson JM, Pell M, O'Sullivan DJ, McCusker EA, Fung VS, Phedges, Halliday GM. 2002. Postmortem analysis of bilateral subthalamic electrode implants in Parkinson disease. *Mov Dis* 17:133-137.

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

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

Hikosaka O, Wurtz RH. 1983. Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata. I. Relation of visual and auditory responses to saccades. *J Neurophysiol* 49:1230-1253.

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

Hutchins B, Weber JT. 1985. The prectal complex of the monkey: a reinvestigation of the morphology and retinal terminations. *J Comp Neurol* 232:425-442.

Itaya SK, Van Hoesen GW. 1982. Retinal innervation of the inferior colliculus I rat and monkey. *Brain Res* 233:45-52.

Jacobs BL, Azmitia EC. 1992. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72:165-229.

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

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

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

Jones, EG. 2007. *The thalamus*. V II. Cambridge University Press. 1679 pp.

Jones EG, Hendry SHC. 1989. Differential calcium binding protein immunoreactivity distinguishes classes of relay neurons in monkey thalamic nuclei. *Europ J Neurosci* 1, n° 3.

Jones EG, Leavitt RY. 1974. Retrograde axonal transport and the demonstration of non-specific projections to the cerebral cortex and striatum from thalamic intralaminar nuclei in the rat, cat and monkey. *J Comp Neurol* 154:349-378.

Kaas JH, Huerta MF. 1988. The subfornical visual system of primates. *Comp Primat Biol* 4:327-391.

Kaufmann W, Kerschbaum HH, Hauser-Kronberger C, Hacker GW, Hermann A. 1995. Distribution and seasonal variation of vasoactive intestinal (VIP)-like peptides in the nervous system of *Helix pomatia*. *Brain Res* 695:125-36.

Kawana E, Watanabe K. 1981. A cytoarchitectonic study of zona incerta in the rat. *J Hirnforsch* 22:535-541.

Kawano H, Decker K, Reuss S. 1996. Is there a direct retina-raphe-suprachiasmatic pathway in the rat?. *Neurosci Lett* 212:143-146.

Kendrick KM, Baldwin BA. 1986. The activity of neurons in the lateral hypothalamus and zona incerta of sheep responding to the sight or approach of food is modified by learning and satiety and reflects food preference. *Brain Res* 375:320-28.

Kendrick KM, Hinton MR, Baldwin BA. 1991. GABA release in the zona incerta of the sheep in response to the sight and ingestion of food and salt. *Brain Res*, 550:165-168.

Kiefer SW, Grijalva CV. 1980. Taste reactivity in rats following lesions of the zona incerta or amygdala. *Physiol Behav* 25:549-554.

Kim U, Gregory E, Hall WC. 1992. Pathway from the zona incerta to the superior colliculus in the rat. *J Comp Neurol* 321:555-575.

Kobayashi K, Heizmann CW, Braun K. 1990. Changes in Ca²⁺-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Neurosci Lett* 113:17-22.

Kolmac CI, Mitrofanis J. 1999. Distribution of various neurochemicals within zona incerta: An immunocytochemical and histochemical study. *Anat Embryol* 199:265-280.

Kolmac CL, Power BD, Mitrofanis J. 1998. Patterns of connections between the zona incerta and brainstem in rats. *J Comp Neurol* 396:544-555.

Kosaka T, Katsamaru H, Kawaguchi Y, Hama K, Wu J-Y, Heizmann CW. 1987. GABAergic neurones containing the Ca⁺⁺-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res* 419:119-130.

Kretsinger RH. 1980. Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC Crit Rev* 8:119-138.

Kriegstein AR, Gotz M. 2003. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43:37-43.

Kumar SS, Buckmaster PS. 2007. Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra *pars reticulata*. *Brain Res* 1142:54-60.

Kuzemsky J. 1977. Contribution to the cytoarchitectonics of the zona incerta and Forel's field in the rodents. *Folia Morph (Praha)* 25:366-370.

Kuznicki J, Isaacs KR, Jacobowitz DM. 1996. The expression of calretinin in transfected PC12 cells provides no protection against Ca^{2+} -overload or trophic factor deprivation. *Biochim. Biophys. Acta* 1313:194-200.

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

Lechner J, Leah JD, Zimmermann M. 1993. Brainstem peptidergic neurons projecting to the medial and lateral thalamus and zona incerta in the rat. *Brain Res* 603:47-56.

Lee S-H, Schwaller B, Neher E. 2000. Kinetics of Ca^{2+} binding to parvalbumin in chromaffin cells: implications for Ca^{2+} transients of neuronal dendrites. *J Physiol* 525:419-432.

Legg CR. 1979. Visual discrimination impairments after lesions in zona incerta or lateral terminal nucleus of accessory optic tract. *Brain Res* 177: 461-478.

Lévesque M, Gagnon S, Parent A, Deschênes M. 1996. Axonal arborisations of cortico-striatal and cortico-thalamic fibers arising from the second somatosensory area in the rat. *Cereb Cortex* 6:759-770.

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* 306:344-360.

Liedtke W, Edelmana W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS. 1996. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17:607-615.

Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong P J, Nishino S, Mignot E. 1999. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98:365-376.

Lin RCS, Sessler FM, Chapin JK. 1995. Functional organization of the rat zona incerta. *Soc Neurosc Abstr* 21:106.

Ma TP, Hu X-J, Anavi Yakir, Rafols JA. 1992. Organization of the zona incerta in the macaque: a nissl and golgi study. *J Comp Neurol* 320:273-290.

Ma TP, Hunt NK. 1992. Saccade-related neurons in the macaque's zona incerta have omnivectoral pauses. *Soc Neurosc Abstr* 18:701.

Ma TP, Porter JD, May PJ. 1991. Reciprocal connections between the zona incerta and superior colliculus in the macaque. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 32:897.

Ma TP. 1996. Saccade-related omnivectoral pause neurones in the primate the zona incerta. *Neuroreport* 7:2713-2716.

Ma TP, Johnson JC, Hoskins GA. 1997. Organization of the zona incerta in the macaque: an electron microscopic study. *Anat Rec* 249:259-275

Mackenzie FJ, Hunter AJ, Daly C. 1984. Evidence that the dopaminergic incerto-hypothalamic tract has a stimulatory effect on ovulation and gonadotrophin release. *Neuroendocrinology* 39:289-295.

Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Gotz M. 2003. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751-764.

Mallet L, Mesnage V, Houeto J-L. 2002. Compulsions, Parkinson disease and stimulation. *Lancet* 360:1302-1304.

Marques N, Menna-Barreto L. 2003. *Cronobiologia: Princípios e aplicações*. Edusp, p. 435.

Masmoudi-Kouki O, Gandolfo P, Leprince J, Vaudry D, Pelletier G, Fournier A. 2006. PACAP stimulates biosynthesis and release of endozepines from rat astrocytes. *Ann NY Acad Sci* 1070:411-6.

Matteau I, Boire D, Ptito M. 2003. Retinal projections in the cat: a cholera toxin B subunit study. *Visual Neurosci* 20:481-493.

May PJ, Hall WC, Porter JD, Sakai ST. 1993. The comparative anatomy of nigral and cerebellar control over tectally initiated orienting movements. *In Role of the cerebellum and basal ganglia in voluntary movement* (eds Mano N, hamada I, DeLong R), 221-231. Elsevier, Amsterdam.

May PJ, Sun W, Halls WC. 1997. Reciprocal connections between the zona incerta and the pretectum and superior colliculus of the cat. *Neuroscience* 77:1091-1114.

McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, Zhang CL, Pearce RA, Chiu SY, Messing A. 1996. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (GFAP) alters neuronal deletion physiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6361-6366.

McCormick DA. 1992. Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex. *J Clin Neurophysiol* 9:212-223.

McGinty DJ. 1969. Somnolence recovery and hyposomnia following ventromedial diencephalic lesions in the rat. *Electroenceph Clin Neuro* 26:70-79.

Medanic M, Gillette MU. 1992. Serotonin regulates the phase of the rat suprachiasmatic circadian pacemaker in vitro only during the subjective day. *J Physiol* 450:629-642.

Meijer JH, Rietveld WJ. 1989. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev* 69:671-707.

Menezes AAL, Moreira LFS, Azevedo CVM, Costa SF, Castro CSS. 1993. Behavioral rhythms in the captive common marmoset (*Callithrix jacchus*) under natural environmental conditions. *Braz J Med Biol Res* 26:741-745.

Mensah-Brown EPK, Garey LJ. 2006. The superior colliculus of the camel: a neuronal-specific nuclear protein (NeuN) and neuropeptide study. *J Anat* 208:239-250.

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

Mitrofanis J, Ashkan K, Wallace BA, Benabid A-L. 2004. Chemoarchitectonic heterogeneities in the primate zona incerta: clinical and functional implications. *J Neurocytol* 33:429-440.

Mitrofanis J, deFonseka R. 2001. Organisation of connections between the zona incerta and the interposed nucleus. *Anat Embryol* 204:153-159.

Mitrofanis J, 2002. Evidence for an auditory subsector within zona incerta of rats. *Anat Embryol* 205:453-462

Mitrofanis J. 2005. Projections of somatosensory cortex and frontal eye fields onto incertotectal neurons in the cat. *Neuroscience* 130:1-15.

Mitrofanis J, Mikuletic L. 1999. Organization of the cortical projection to the zona incerta of the thalamus. *J Comp Neurol* 412:173-185.

Moga MM, Moore RY. 1997. Organization of neural inputs to the supraquiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 389:508-534.

Mok D, Mogenson GJ. 1986. Contribution of zona incerta to osmotically induced drinking in rats. *Am J Physiol-Reg I* 251:823-832.

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

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

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

Moore RY. 1973. Retinohypothalamic projections in mammals: a comparative study. *Brain Res* 49:403-409.

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

Moore RY. 1994 Functional organization of the supraquiasmatic nucleus. In: Guileminault C. eds. Fatal familial isomnia: inherited prion diseases, sleep and the thalamus. Raven Press, p. 191-201.

Moore RY. 1999. Circadian Timing. In Zigmond, MJ, Bloom, FE, Landis, SC, Robers JI, Squire LR, Editors. Fundamental Neuroscience. San Diego: Academic Press. pp. 1189-1206.

Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA. 1982. The clocks that time us: physiology of the circadian timing system. Cambridge: Harvard Univ. Press, p.448.

Morin LP, Allen CN. 2006. The circadian visual system, 2005. Brain Res Rev 51:1-60.

Moschovakis AK. 1996. The superior colliculus and eye movement control. Curr Opin in Neurobiol 6:811-816.

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. Development 116:201-211.

Mundinger F. 1965. Stereotaxic interventions on the zona incerta area for treatment of extrapyramidal motor disturbances and their results. Confin Neurol 26:222-230.

Munk MH, Roelfserna PR, Konig P, Engel AK, Singer W. 1996. Role of the reticular activation in the modulation of intracortical synchronization. Science 272: 225-226.

Murakami DM, Miller JD, Fuller CA. 1989. The retinohypothalamic tract in the cat: retinal ganglion cell morphology and pattern of projection. *Brain Res* 482:283-296.

Murer MG, Pazo JH. 1993. Circling behaviour induced by activation of GABA_A receptors in the subthalamic nucleus. *NeuroReport* 4:1219-1222.

Mutt V, Said SI. 1970. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 169:1217-1218.

Nabors LB, Mize RR. 1991. A unique neuronal organization in the cat pretectum revealed by antibodies to the calcium-binding protein calbindin-D28k. *J Neurosci* 11:2460-2476.

Nagai T, McGeer PL, McGeer EG. 1983. Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat forebrain and midbrain. *J Comp Neurol* 218:220-238.

Nandi D, Chir M, Liu X, Bain P, Parkin S, Joint C, Winter J, Stein JF, Scott R, Gregory R, Aziz T. 2002a. Electrophysiological confirmation of the zona incerta as a target for surgical treatment of disabling involuntary arm movements in multiple sclerosis: use of local field potentials. *J Clin Neurosci* 9:64-68.

Nandi D, Aziz TZ, Liu X, Stein JF. 2002b. Brainstem motor loops in the control of movement. *Mov Dis* 17:822-827.

Nauta WJH, Haymaker W. 1969. Hypothalamic nuclei and fiber connections. In W. Haymaker W, Anderson E, Nauta WJH (Eds). *The Hypothalamus*, Charles C Thomas Springfield 136-209.

Németh J, Oroszi G, Jakab B, Magyarlaki M, Szilvássy Z, Róth E. 2002. I-labelling and purification of peptide hormones and bovine serum albumin. *J Radioanal Nucl Ch* 251:129-33.

Newman GC. 1991. SCN Metabolic activity in vitro. In: Kelen DC, Moore RY, Reppert SM. (eds). *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. Oxford: Oxford Univ. Press, p. 157-190.

Nicolelis MAL, Chapin JK, Lin RCS. 1992. Somatotopic maps within the zona incerta relay parallel GABAergic somatosensory pathways to the neocortex, superior colliculus, and brainstem. *Brain Res* 577:134-141.

Nicolelis MAL, Chapin JK, Lin RCS. 1995. Development of direct GABAergic projectins from the zona incerta to the somatosensory cortex of the rat. *Neuroscience* 65:609-631.

Oertel WH, Tappaz ML, Berod A, Mugnaini E. 1982. Two-color immunohistochemistry for dopamine and GABA neurons in rat substantia nigra and zona incerta. *Brain Res Bull* 9:463-474.

Olivier E, Chat M, Grantyn A. 1991. Retrocaudal and lateromedial density distributions of superior colliculus neurons projecting in the predorsal bundle and to the spinal cord: a retrograde HRP study in the cat. *Expl Brain Res* 87:268-282.

Ottersen OP, Storm-Mathisen J. 1984. Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J Comp Neurol* 229:374-392.

Paloff AM, Usunoff KG, Hinoova-Palova DV, Ivanov DP. 1985. Retinal innervation of the inferior colliculus in adult cats: electron microscopic observations. *Neurosci Lett* 54:339-344.

Periér C, Tremblav L, Féger J, Hirsch EC. 2002. Behavioral consequences of bicuculline injection in the subthalamic nucleus and the zona incerta in rat. *J Neurosci* 22(19): 8711-8719.

Petras JM. 1969. Some efferent connections of the motor and somatosensory cortex of simian primates, and felid, canid and procyonid carnivores. *Ann NY Acad Sci* 167:469-505.

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

Plaha P, Bem-Shlomo Y, Patel NK, Gill SS. 2006. Stimulation of the caudal zona incerta is superior to stimulation of the subthalamic nucleus in improving contralateral parkinsonism. *Brain* 129:1732-1747.

Power BD, Mitrofanis J. 2001. Zona incerta: substrate for contralateral interconnectivity in the thalamus of rats. *J Comp Neurol* 436: 52-63.

Power BD, Leamey CA, Mitrofanis J. 2001. Evidence for a visual subsector within the zona incerta. *Visual Neurosci* 18:179-186.

Power BD, Mitrofanis J. 1999. Evidence for extensive inter-connections within the zona incerta in rats. *Neurosci Letters* 267:9-12.

Presse F, Sorokovsky I, Max JP, Nicolaidis S, Nahon JL. 1996. Melanin-concentrating hormone is a potent anorectic peptide regulated by food-deprivation and glucopenia in the rat. *NS* 71: 735-745.

Prosser RA, Heller HC, Miller JD. 1992. Serotonin phase shifts of the mammalian circadian clock: effects of tetrodotoxin and high Mg^{2+} . *Brain Res* 573:336-340.

Prosser RA, Miller JD, Heller HC. 1990. A serotonin agonist phase-shifts the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res* 534:336-339.

Qume M, Fowler L. 1996. Effects of Chronic oral treatment with GABA-transaminase inhibitors on the GABA system in brain, liver, kidney and plasma of the rat. *Bioch Pharm.* 52:1355-1363.

Ribak CE, Peters A. 1975. An autoradiographic study of the projections from the lateral geniculate body of the rat. *Brain Res* 92:241-268.

Ricardo JA. 1981. Efferent connections of the subthalamic region in the rat II. The zona incerta. *Brain Res* 214:43-60.

Roger M, Cadusseau J. 1985. Afferents to the zona incerta in the rat: a combined retrograde and anterograde study. *J Comp Neurol* 241:480-492.

Rogers JH. 1987. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally by neurons. *J Cell Biol* 105:1343-53.

Romanowski CAJ, Mitchel IJ, Crossman AR. 1985. The organization of the efferent projections of the zona incerta. *J Anat* 143:75-95.

Rusak B, Zucker I. 1979. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev* 59:449-526.

Saint-Cyr JA, Hoque T, Pereira LC, Dostrovsky JO, Hutchison WD, Mikulis DJ, Abosch A, Sime E, Lang AE, Lozano AM. 2002. Localization of clinically effective stimulating electrodes in the human subthalamic nucleus on magnetic resonance imaging. *J Neurosurg* 97:1152-1166.

Schall JD. 1995. Neural basis of saccade target selection. Review in Neuroscience 6:63-85.

Schwartz WJ. 1991. SCN Metabolic activity in vitro. In: Kelen DC, Moore RY, Reppert SM. (eds). Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock. Oxford: Oxford Univ. Press, pp. 144-156.

Scotti AL, Nitsch C. 1991. The perforant path in the seizure sensitive gerbil contains the Ca²⁺ - binding protein parvalbumin. Exp Brain Res 85:137-143.

Scripter J, Harrison L, Cusick CG, Weber JT. 1991. Calbindin-D28k and parvalbumin localization in the pretectal complex and adjacent visual structures of the squirrel monkey. Soc Neurosci Abst 17:112.

Selbach O, Hass HL. 2006. Hypocretins: the timing of sleep and waking. Chronobiol Int 23:63-70.

Shammah-Lagnado SJ, Negrão N, Ricardo JA. 1985. Afferent connections of the zona incerta: a horseradish peroxidase study in the rat. Neurosci 15:109-134.

Shaw VE, Mitrofanis J. 2001. Lamination of spinal cells projecting to the zona incerta of rats. J Neurocyt 30:695-704.

Shaw VE, Mitrofanis J. 2002. Anatomical evidence for somatotopic maps in zona incerta of rat. Anat Embryol 206: 119-130.

Shen H, Semba K. 1994. Direct retinal projection to the dorsal raphe nucleus in the rat. Brain Res 635:159-168.

Sherman SM, Guillery RW. 1998. On the actions that one nerve cell can have on another: distinguishing 'drivers' from 'modulators'. Proc Natl Acad Sci USA 95:7121-7126.

Siddiqui A, Abu-Amara M, Aldairy C, Hagan JJ, Wilson C. 2004. 5-HT7 receptor subtype as a mediator of the serotonergic regulation of luteinizing hormone release in the zona incerta. Eur J Pharmacol 491:77-84.

Silver R, Romero MT, Besmer HR, Leak R, Nunez JM, LeSauter J. 1996. Calbindin-D28K cells in the hamster SCN Express light-induced Fos. NeuroReport 7:1224-1228.

Simpson JJ. 1984. The accessory optic system. Ann Visual Neurosci 7:13-41.

Spencer S E, Sawyer W B, Loewy A D, 1988. L-Glutamate stimulation of the zona incerta in the rat decreases heart rate and blood pressure. Brain Res, 458: 72-81.

Startz TE, Taylor CW, Magoun HW. 1951. Ascending conduction in reticular activating system, with special reference to the diencephalon. J Neurophysiol 14: 461-477.

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

Stephan H, Baron G, Schwerdtfeger WK. 1980. The brain of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). Berlin: Springer-Verlog.

Steriade M, Parent A, Ropert N, Kitsikis A. 1982. Zona incerta and the lateral hypothalamic afferents to the midbrain reticular core of the cat-HRP and electrophysiological study. *Brain Res* 238: 13-28.

Struppler A. 1982. Contributions of electromyography to stereotaxy. In *Stereotaxy of the human brain: anatomical, physiological and clinical applications* (eds Schaltenbrand G and Walker A E) 436-448. Georg Thieme, Stuttgart.

Tonelli L, Chiaraviglio E. 1995. Dopaminergic neurons in the zona incerta modulates ingestive behavior in rats. *Physiol Behav* 58:725-729.

Trageser JC, Keller A. 2004. Reducing the uncertainty: gating of peripheral inputs by zona incerta. *J Neurosci* 24:8911-8915.

Turek FW. 1994. Circadian rhythms. *Recent Prog Hormone Res* 49:43-90.

VanBrederode JF, Mulligan KA, Hendrickson AE. 1990. Calcium-binding proteins as markers for subpopulation of GABAergic neurons in monkey striate cortex. *J Comp Neurol* 298:1-22.

Vidal L, Blanchard J, Morin LP. 2005. Hypothalamic and zona incerta neurons expressing hypocretin, but not melanin concentrating hormone, project to the hamster intergeniculate leaflet. *Neurosci* 134:1081-1090.

Voges J, Volkmann J, Allert N, Lehrke R, Koulousakis A, Freund HJ, Sturm V. 2002. Bilateral high-frequency stimulation in the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson disease: correlation of therapeutic effect with anatomical electrode position. *J Neurosurg* 96:269-279.

Wagner CK, Eaton MJ, Moore KE, Lookingland KJ. 1995. Efferent projections from the region of medial zona incerta containing A13 dopaminergic neurons: a PHA-L anterograde tract-tracing study in the rat. *Brain Res* 677:229-237.

Walsh L, Grossman SP. 1973. Zona incerta lesions: disruption of regulatory water intake. *Physiol Behav* 11:885-887.

Walsh LL, Grossman SP. 1976. Zona incerta lesions impair osmotic but not hypovolemic thirst. *Physiol Behav* 16:211-215.

Wardas J, Ossowska K, Wolfarth S. 1987. The role of gamma-aminobutyric acid mechanisms of the zona incerta-lateral hypothalamus in the catalepsy and muscle rigidity evoked by morphine. *Brain Res* 408:363-366.

Weber JT. 1985. Pretectal complex and accessory optic system of primates. *Brain Behav Evolut* 26:117-140.

Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R. 1996. NeuN: A useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* 44:1167-1171.

Youngstrom TG, Weiss ML, Nunez AA. 1991. Retinofugal projections to the hypothalamus, anterior thalamus and basal forebrain in hamsters. *Brain Res Bull* 26:403-411.