

UNIVERSIDADE DE MARÍLIA

JEFERSON SANTIAGO

INFLUÊNCIA CIRCADIANA EM NEURÔNIOS DA SUBSTÂNCIA NEGRA

MARÍLIA

2020

JEFERSON SANTIAGO

INFLUÊNCIA CIRCADIANA EM NEURÔNIOS DA SUBSTÂNCIA NEGRA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação da Universidade de Marília para obtenção do título de Mestre em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação, na área de concentração Bases Estruturais e Funcionais da Reabilitação.

Orientadora: Profa. Dra. Leila Maria Guissoni Campos

Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Pinato

MARÍLIA

2020

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura: Jeferson Santiago

Comitê de Ética da FFC – UNESP/ Marília
Protocolo nº: 538/2019

Santiago, Jeferson

Influência circadiana em neurônios da substância negra /
Jeferson Santiago. - Marília: UNIMAR, 2020.
57 f.

Dissertação (Mestrado Interdisciplinar em Interações
Estruturais e Funcionais na Reabilitação – Arquitetura, Estrutura e suas
Relações com a Reabilitação Funcional) – Universidade de Marília,
Marília, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Leila Maria Guissoni Campos

1. Dopamina 2. Primata 3. Ritmo Circadiano 4. Substância
Negra I. Santiago, Jeferson

CDD – 615.8

FOLHA DE APROVAÇÃO

JEFERSON SANTIAGO

INFLUÊNCIA CIRCADIANA EM NEURÔNIOS DA SUBSTÂNCIA NEGRA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação da Universidade de Marília para obtenção do título de Mestre em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação, na área de concentração na área de concentração Bases Estruturais e Funcionais da Reabilitação.

Orientador: Profa. Dra. Leila Maria Guissoni Campos

Aprovado em: ____/____/____

Coordenação do Programa de Mestrado em Interações Estruturais e Funcionais
na Reabilitação

Considerações: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha Família, sobretudo meus pais Laura e José Roberto, que nunca pouparam esforços para possibilitar a minha formação, primeiramente como cidadão e, posteriormente como Médico.

Dedico, também, este trabalho àqueles que são os responsáveis pelo nosso estudo e dedicação diários na busca de promover continuamente um melhor cuidado para as suas doenças – os Pacientes.

Enfim, dedico este trabalho a todos os meus Professores desde a pré-escola até a Pós-graduação por terem sido fonte de inspiração e exemplo de dedicação e comprometimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela possibilidade de exercer a profissão que amo.

Gostaria de agradecer a Profa. Leila Guissoni pela orientação desta dissertação e sobretudo pela compreensão das dificuldades de agenda para realizar o referido trabalho.

Agradeço também a Profa. Luciana Pinato coorientadora, e peça fundamental na realização dos experimentos através da possibilidade de utilizar o seu laboratório na Unesp de Marília.

Não posso deixar de agradecer aos alunos de iniciação científica Gyovanna, Gizelle e ao Augusto, técnico do Laboratório da Unesp que auxiliaram na parte experimental do trabalho.

Por último, porém não menos importante, agradeço à Universidade de Marília e a Família Serva por me propiciar, primeiramente a formação acadêmica, uma vez que sou egresso da Faculdade de Medicina e, posteriormente, por me acolher como preceptor da Instituição e possibilitar a minha evolução como médico.

INFLUÊNCIA CIRCADIANA EM NEURÔNIOS DA SUBSTÂNCIA NEGRA

RESUMO: Os ritmos circadianos são caracterizados como ritmos biológicos que oscilam ao redor de 24 horas, como, por exemplo, os ritmos fisiológicos de temperatura corporal, de secreção de alguns hormônios, comportamento alimentar, ciclos de sono e vigília, atividade e repouso, memória, percepções sensoriais e motricidade. Esses fenômenos são orquestrados a partir do núcleo hipotalâmico supraquiasmático, considerado o relógio biológico nos mamíferos. A capacidade funcional desse núcleo em gerar oscilações circadianas reside na expressão autônoma dos chamados clock genes em suas células. A descoberta de clock genes possibilitou a identificação de outras áreas do encéfalo capazes de gerar ritmicidade circadiana. A substância negra *pars compacta*, responsável em participar de vários circuitos dentro do sistema nervoso, entre eles o circuito motor, funções cognitivas, e funções emocionais e viscerais, atualmente vem sendo correlacionada a ações circadianas. Apesar disso, o papel do sistema circadiano nas populações neurais dessa área, ainda não foi totalmente esclarecido. Nossa hipótese é de que o ciclo claro escuro poderia influenciar neurônios produtores de dopamina da substância negra, o que provavelmente influenciaria suas funções como coordenação motora, modulação emocional e comportamental. O objetivo desse trabalho foi descrever a identidade celular e possíveis diferenças temporais dia/noite no padrão de expressão da proteína relógio Per2, conhecida envolvida nos mecanismos oscilatórios encefálicos, na SN *pars compacta* do primata *Sapajus apella* pelo uso da técnica de imunohistoquímica. Os resultados evidenciaram marcação expressiva do anticorpo Per2 nos neurônios da porção *pars compacta* nos dois períodos dia e noite. A marcação foi específica para população neuronal parvo celular, indicando imunoexpressão de Per2 em neurônios dopaminérgicos da porção *pars compacta* da substância negra. Esses dados podem sugerir que a presença de genes relógio em áreas classicamente não relacionadas ao controle circadiano, assim como a possibilidade de alterações em sua expressão em condições fisiológicas expande as formas tradicionais de se discutir as funções da substância negra *pars compacta* e nos leva a reconsiderar a importância fisiológica, comportamental e psicopatológica destes ritmos região-específicos em diferentes áreas encefálicas.

Palavras-chave: Ritmos circadianos. Primata. Substância negra. Dopamina.

CIRCADIAN INFLUENCE IN NEURON OF THE SUBSTANTIA NIGRA

ABSTRACT: Circadian rhythms oscillate around 24 hours as seen, for example, in physiological rhythms of body temperature, secretion of some hormones, eating behavior, sleep and wake cycles, wake-rest cycle, memory, sensory perceptions and motor skills. The suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus, considered the biological clock of mammals, controls circadian rhythms. The functional capacity of this nucleus to generate circadian oscillations resides in the autonomous expression of clock genes in its cells. The discovery of clock genes enabled the identification of other areas of the brain capable of generating circadian rhythmicity. The substantia nigra *pars compacta*, responsible for participating in several circuits within the nervous system, including the motor circuit, cognitive functions, emotional and visceral functions, is currently being correlated with circadian actions. Despite this, the role of the circadian system in neural populations in this area is not clear. We hypothesize that the light-dark cycle could influence dopamine neurons in the substantia nigra and its functions such as motor coordination, emotional and behavioral modulation. The objective of this study was to identify the cellular identity and possible day/night differences of the expression pattern of the Per2 clock protein, involved in brain oscillatory mechanisms in the substantia nigra *pars compacta* of the primate *Sapajus apella* by the use of immunohistochemistry. The results showed expressive labeling of the Per2 antibody on neurons of the *pars compacta* in both periods, day and night. The specific labeling of Per2 protein was observed in the parvocellular neuronal population of the substantia nigra *pars compacta*. The presence of clock genes in areas classically unrelated to circadian control, as well as the possibility of changes in their expression under physiological conditions, expand the traditional view of the functions of the substantia nigra *pars compacta* and leads us to reconsider the physiological, behavioral and psychopathological importance of these region-specific rhythms of different brain areas.

Keywords: Circadian rhythms. Primata. Substantia nigra. Dopamine.

LISTA DE ABREVIATURAS

AVP – Arginina-vasopressina
BMAL1 – Brain and muscle arnt-like protein 1
CC – Pilar cerebri
CCK – Colecistocinina
CLOCK – Circadian locomotor output cycles kaput
CRY – Cryptochrome
DA – Dopamina
DAPI – 4',6'diamidino-2-phenylindole
DAT – Transportador de dopamina
DP – Doença de Parkinson
GABA – Ácido gama-amino butírico
GRP – Peptídeo liberador de gastrina
MAOa – Monoamino Oxidase A
NSQ – Núcleo supraquiasmático
PER – Period
SN – Substância negra
SNC – Sistema nervoso central
SNc – Substância negra *pars compacta*
SNr – Substância negra *pars reticulata*
TH – Tirosina hidroxilase
VIP – Polipeptídeo intestinal vasoativo
VTA – Área tegmental ventral
ZT - Zeitgeber

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia da área encefálica substância negra *pars compacta* (SNc) destacada em A e B 33

Figura 2 – Fotomicrografias de imunofluorescência de secções frontais do encefálo do primata *Sapajus apella* mostrando células marcadas com Per2-IR (verde) em A e C, DAPI em (azul) em B e C 34

Figura 3 – Fotomicrografia de imunofluorescência de secção frontal do encefálo do primata *Sapajus apella* mostrando células marcadas com Per2-IR na substância negra *pars compacta* 34

Figura 4 – Distribuição da proteína relógio Per2 na substância negra *pars compacta* do primata *Sapajus apella* 35

Figura 5 – Média \pm e.p.m do número de células imunorreativas a Per2-IR em cortes encefálicos representativos de toda extensão ântero-posterior da substância negra *pars compacta* do primata *Sapajus apella* (N=3 por horário) perfundidos em um horário do dia e da noite 36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVO	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Animais.....	27
4.2 Perfusão transcardíaca.....	27
4.3 Imuno-histoquímica.	28
4.4 Análise microscópica.....	29
4.5 Análise morfológica.....	29
4.6 Análise Estatística.....	29
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	49
ANEXO	57

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Oscilações biológicas que ocorrem em um período de 24 horas são denominadas ritmos circadianos (PIN, 2019). Esses ritmos derivam de um sistema marcador temporal intrínseco conhecido como ciclo circadiano, que permite ao organismo antecipar variações ambientais e coordenar processos biológicos (CHA et al, 2019). Essa sincronização é feita a partir de estímulos ambientais, como informações fóticas externas via retina, e a partir de estímulos internos via endócrina, além de estímulos sistêmicos (DIBNER et al, 2010; KIM et al, 2017).

Quase todos os seres vivos apresentam essa ritmicidade nos processos biológicos, desde arqueobactérias até seres eucariontes mais evoluídos. O ritmo circadiano permite adaptação em diversos tipos de mudanças ambientais, a fim de alcançar melhores condições de vida e sobrevivência (SINGH, et al., 2019).

Exemplos desses processos regulados pelo ciclo circadiano incluem o estado de sono e vigília, variações no metabolismo, temperatura corporal e secreção hormonal, pressão arterial, frequência cardíaca, ingestão de alimentos, desempenho psicomotor e percepção (MOORE et al, 1982; DIBNER et al, 2010; SON et al, 2011; CHA et al, 2019).

Apesar de existirem estímulos externos para o controle dos ritmos circadianos, esses processos são regulados também mesmo sem um estímulo do ambiente (SINGH, et al.,2019).

Em mamíferos, o coordenador desse sistema é o núcleo supraquiasmático (NSQ) localizado no hipotálamo, considerado o relógio central do organismo (RALPH et al., 1990; REPPERT; WEAVER, 2002). O NSQ é constituído de aproximadamente 20.000 neurônios, expressando neuropeptídeos distintos, como a arginina vasopressina (AVP), polipeptídeos intestinal vasoativo (VIP), peptídeo liberador de gastrina (GRP), calretinina, colecistocinina (CCK), etc (TOKUDA et al., 2018; YUAN et al., 2018). O correto funcionamento do NSQ é fundamental ao equilíbrio cognitivo, cardiovascular, metabólico, humoral, entre outros (MCGLASHAN et al., 2018).

Esse local é considerado o relógio mestre por ser capaz de sincronizar o relógio interno a partir de informações externas, a fim de estabelecer o controle circadiano da fisiologia e comportamento (KIM et al, 2017). Seu circuito como um todo é sincronizado por células retinorreceptores, as quais respondem ao tempo solar (HAMNETT et al., 2019).

O NSQ possui uma autônoma oscilação circadiana nas células, sendo caracterizado por uma realimentação transcricional/traslacional (HAMNETT et al, 2019). O mecanismo regulador básico desse sistema consiste em um feedback negativo contínuo, no qual a produção de genes chamados clock genes é periodicamente suprimido pela expressão de suas próprias proteínas. (DUNLAP, 1999; PANDA et al, 2002; NAGANO et al, 2019).

Todo esse mecanismo circadiano é mantido por fatores de transcrição CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) e BMAL1 (brain and muscle Arnt-like protein 1) junto a seus co-repressores PER (period) e CRY (cryptochrome) (ZHAO et al, 2014; KRIEBS et al., 2017; TAKEUCHI et al, 2018). Esses fatores são chamados de genes relógios, e funcionam basicamente por 2 ciclos de retroalimentação positiva e negativa de transcrição e tradução.

A descoberta de clock genes possibilitou a identificação de outras áreas do encéfalo capazes de gerar ritmicidade circadiana. Oscilações diárias na expressão de genes foram identificadas em núcleos do tálamo e hipotálamo, amígdala, bulbo olfatório cerebelo, hipocampo (DIBNER et al, 2010; GUISSONI CAMPOS et al., 2015; GUISSONI CAMPOS et al., 2018). Em outro estudo foram relatadas também oscilações da expressão desses genes em regiões do cérebro relacionadas às variações do humor e sistema de recompensa (SIDOR; MCCLUNG, 2014; RADWAN et al., 2018).

Atualmente funções circadianas estão sendo associadas a substância negra (SN), uma área encefálica localizada anteriormente ao tegmento mesencefálico e posteriormente ao pilar cerebri (CC), sendo constituída por neurônios pigmentados, ricos em neuromelanina, chamados “nigrossomos” (MASSEY et al., 2017; RADWAN et al., 2018; JIN et al, 2019).

A divisão anatômica da SN consiste em duas regiões distintas funcionalmente: a SN superior e anterior (ventral) *pars reticulata* (SNr) e a SN *pars compacta* inferior e posterior (SNC). Os neurônios da SNr constituem um dos núcleos responsáveis pela saída dos gânglios da base, e junto ao segmento interno do globo pálido, se projetam ao tálamo (MASSEY et al., 2017). Já a SNC possui neurônios dopaminérgicos que se projetam até o estriado, havendo reciprocamente também uma via estriatonigral (MASSEY et al., 2017).

A substância negra participa da via nigroestriatal, que se projeta para o núcleo estriado (núcleo caudado e putâmen) e está envolvida no planejamento motor e execução de movimentos (RADWAN et al., 2018). Além da via nigroestriatal, essa região faz parte também da via mesolímbica e mesocortical (CAVALCANTI et al., 2016). As três vias estão envolvidas em manifestações comportamentais, motricidade, aprendizado, recompensa e em condições patológicas, como doença de Parkinson, esquizofrenia, mudanças do humor, déficit de atenção e hiperatividade e abuso de drogas (BARROT, 2014).

Seu principal neurotransmissor, dopamina, desempenha um papel importante no controle motor, recompensa, regulação do humor e comportamento (RADWAN et al., 2018). Logo, defeitos na sinalização da dopamina implicam em uma variabilidade de desordens como esquizofrenia, doença de Parkinson e, mais recentemente descoberto, desordens como a depressão relacionada com o estilo de vida moderno pelo aumento da exposição à luz artificial, trabalhos por turnos e viagens através de fusos horários, passíveis de causar perturbação no ciclo circadiano e no ciclo sono/vigília. (AREY et al, 2014).

Além da dopamina, outros neurotransmissores como serotonina, orexina, noradrenalina e GABA, são capazes de exibir uma ritmicidade circadiana (INUTSUKA; YAMANAKA, 2013; CASTANEDA et al, 2004; RADWAN et al., 2018).

Há uma associação entre ritmos circadianos e regulação emocional em doenças neurodegenerativa como visto, por exemplo, na doença de Parkinson (DP) (WULFF et al., 2010; KIM et al., 2017). Já foram relatadas evidências de que o ritmo circadiano é alterado na DP, pelo fato de as alterações motoras flutuarem ao longo do dia, piorando no período da tarde e no começo da noite (HAYASHI et al., 2013).

16 Introdução

Apesar das descobertas sugerirem uma relação patológica entre ciclo circadiano e sistema dopaminérgico, os mecanismos que levam a essas alterações permanecem desconhecidos (HAYASHI et al., 2013). De qualquer forma os dados parecem indicar relação bidirecional entre ritmos circadianos e sistema dopaminérgico independente das condições, fisiológicas ou patológicas.

No presente estudo foi explorada a presença e a relação da expressão da proteína relógio Per2 em populações neuronais da SN *pars compacta* do primata *Sapajus apella*, uma vez que as observações sugerem haver uma interação fundamental entre neurônios dessa região e ritmos circadianos.

2. JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Entender como os ritmos endógenos são gerados e/ou modulados em diferentes áreas encefálicas, representa uma das vertentes das pesquisas em cronobiologia. A caracterização dessa proteína relógio em neurônios SN *pars compacta* do primata *Sapajus apella* pode representar uma interação fundamental entre neurônios produtores de dopamina e ritmos circadianos e reforçar o conceito de que proteínas relógio não só desempenhem papéis fisiológicos importantes no sistema de temporização circadiana, mas também em mecanismos funcionais relacionados a comportamentos motores e cognitivos, incluindo manifestações de motricidade, aprendizado, e recompensa vistos nas vias de conexão SN e núcleos da base.

Assim, considerando-se as possíveis diferenças interespecíficas, tornam-se imprescindíveis os estudos em primatas não humanos, como no caso do macaco-prego (*Sapajus apella*) proposto no presente estudo. Uma vez que a caracterização da proteína relógio Per2 na substância negra dessa espécie diurna pode representar e reforçar a interação de ritmos biológicos sobre o funcionamento da SN.

3. OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Descrever a identidade celular e possíveis diferenças temporais dia/noite no padrão de expressão da proteína relógio Per2, conhecida e envolvida nos mecanismos oscilatórios encefálicos, na SN *pars compacta* do primata *Sapajus apella* pelo uso da técnica de imuno-histoquímica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

No presente estudo, foram utilizados cortes encefálicos de seis macacos-prego (*Sapajus apella*) adultos (proveniente de projetos anteriores), machos, pesando entre 2 e 3 Kg, provenientes do Núcleo de Procriação de Macacos-Prego da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, divididos em dois grupos, N=3, sendo um grupo representando um horário do dia, e um noite. Este também foi o local de experimentação e habitação dos animais para este estudo.

Os procedimentos que envolveram os animais estavam em conformidade com as “Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research (2003)” e todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética local (IACUC) para o uso animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, SP, Brasil (proc. Número 133). O projeto de pesquisa passou pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FFC Unesp/Marília, sob nr. 538/2019.

Os animais selecionados foram, inicialmente, criados em grupos, entretanto, durante os experimentos os macacos foram separados, e mantidos por 7 dias em gaiolas individuais com medições de 2 x 1,5 x 2 m feito de grades de aço inoxidável, o que permitiu o contato visual, auditivo e olfativo entre eles. Ficaram em gaiolas individuais para facilitar a manutenção e facilitar a sedação, especialmente em animais anestesiados no período com pouca luz.

4.2. Perfusão transcardíaca

A eutanásia dos animais foi realizada pela equipe do Centro de estudos e de procriação de macacos, *Sapajus*. Os animais foram mantidos sob luz natural e alimentados com uma dieta controlada consistindo de ovos, frutas, rações proteicas, milho seco e água fornecida *ad libitum*. O nascer do sol foi considerado as 06:00 h e foi considerado o tempo Zeitgeber 0 (ZT0) como um referencial; e o início do pôr

do sol as 18:00 h. Este ciclo de luz se assemelha à um ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro.

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (30 mg/kg, i.p.) e eutanasiados em dois períodos diferentes ZTs (ZT10 e ZT19, sendo n=3 por ZT). Em seguida foram perfundidos com 1L de solução salina (0,9%), acompanhado por 2 litros de paraformaldeído (4%) em tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 6,0; 4°C) e 2L de paraformaldeído (4%) em tampão de borato de sódio 0,1 M (pH 9,5; 4°C). Os cérebros foram colocados em um crioprotetor composto de tampão de borato (pH 9,0), e glicerol 10% (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) e dimetilsulfóxido 2% (DMSO, Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) por cinco dias, seguido de uma imersão em uma solução similar com 20% de glicerol. Após esse tempo os blocos cerebrais foram crio-seccionados em fatias de 30 µm de espessura usando um criostato (Leica CM 1850, Microsystems, AG, Alemanha) e armazenados em 10 series diferentes em soluções anti-congelamento de 240 ml de etileno glycol (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), 200 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), 200 mL de água e 120 g de sacarose (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) e estocados em freezer até o momento de realização da técnica de imuno-histoquímica e a coloração de Nissl.

4.3 Imuno-histoquímica

Os experimentos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Estudos em Neuroinflamação – UNESP/Marília. Para avaliar a expressão da proteína relógio Per2 foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica descrita em Campos et al., 2014. Onde, os cortes encefálicos foram separados, lavados e incubados com anticorpo primário Per2 anti mouse. Posteriormente, foi utilizado o anticorpo secundário fluorescente Cy3 (donkey anti mouse). Para auxílio da detecção da citoarquitetura os cortes foram corados com 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma Chemical, cod. D9542 Sigma, St. Louis MO, USA), assim como pela técnica de coloração em Nissl. As lâminas foram montadas com glicerol, e cobertas com uma lamínula para análise em microscópio.

O DAPI é um marcador fluorescente que se liga fortemente a regiões de DNA ricas em adenina-timina, e em geral é utilizado em associação a outros métodos, para melhores resultados de caracterização da citoarquitetura.

4.4. Análise Microscópica

Os cortes encefálicos foram analisados no microscópio Olympus BX50, e as imagens foram obtidas usando o software CellSens (USA). Os cortes corados com Nissl foram utilizados para auxílio da caracterização da citoarquitetura associado a utilização do atlas "A Stereotaxic Atlas of the Brain of Cebus Monkey (*Cebus apella*) e "The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates".

4.5. Análise morfológica

A presença de Per2 foi quantificada por contagem das populações neuronais na SN *pars compacta* com auxílio da ferramenta de quantificação Cell Counter do software Image J.

4.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm epm e analisados de acordo com os métodos estatísticos convenientes utilizando-se o programa de estatística *GraphPad Prism*.

5. RESULTADOS

5 RESULTADOS

A caracterização morfológica da área encefálica substância negra *pars compacta* foi realizada a partir do estudo da citoarquitetura neuronal utilizando como meio de análise o auxílio do atlas estereotaxico, e coloração em Nissl (Figura 1), e o marcador de DNA fluorescente (DAPI) (Figura 2).

Caracterização dos limites da substância negra *pars compacta* – Nissl.

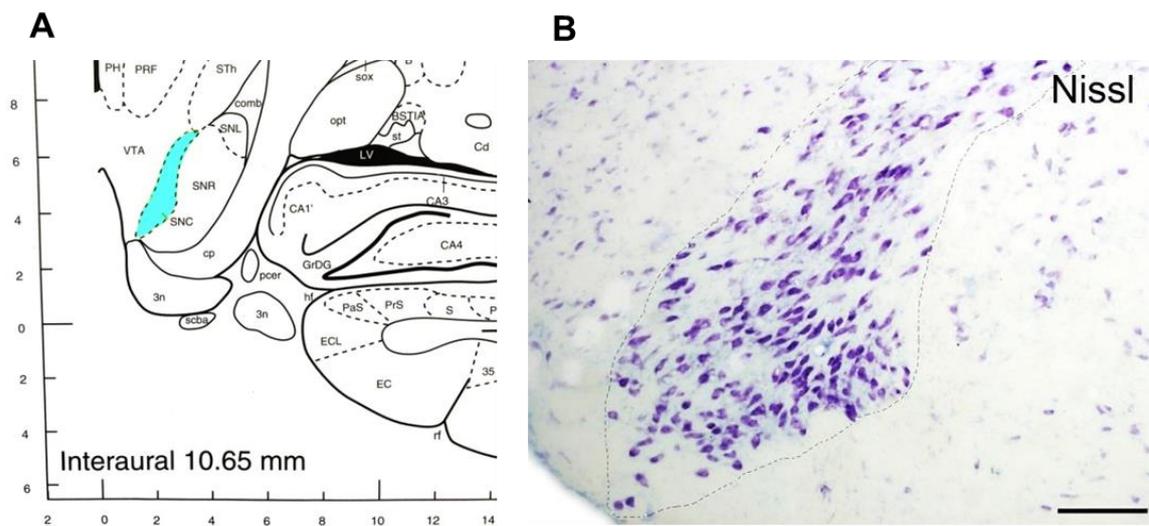


Figura 1 - Morfologia da área encefálica substância negra *pars compacta* (SNc) destacada em A e B. **A)** Representação da área encefálica substância negra *pars compacta* (SNc) em atlas estereotático. **B)** Fotomicrografia de coloração em Nissl da área encefálica substância negra *pars compacta* representada em secção frontal do encefalo do primata *Sapajus apella*. Barra = 100µm.

34 Resultados

Caracterização dos limites da substância negra *pars compacta* – DAPI.

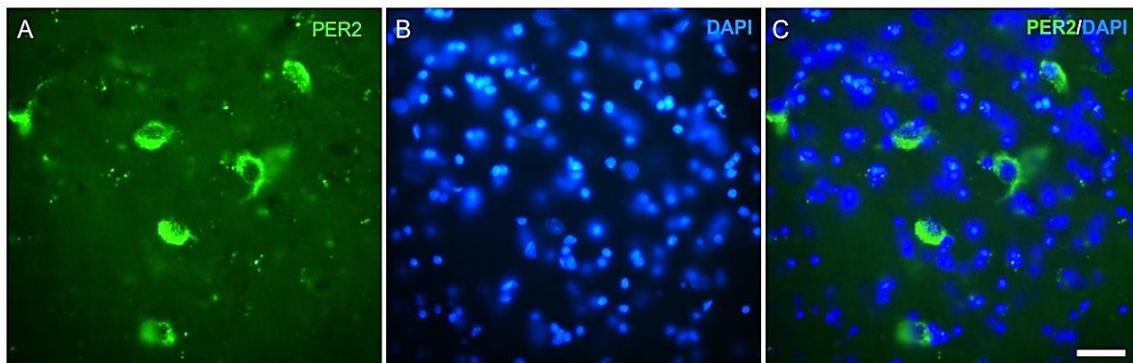


Figura 2 - Fotomicrografias de imunofluorescência de secções frontais do encefálo do primata *Sapajus apella* mostrando células marcadas com Per2-IR (verde) em A e C, DAPI em (azul) em B e C. Barra = 50µm.

Para o início da experimentação com a técnica de imunohistoquímica foram realizados testes preliminares para a padronização das diluições do anticorpo Per2. Entre as diferentes diluições testadas, a melhor marcação com maior especificidade para o antígeno foi observada na diluição de 1:1000 (Figura 3).

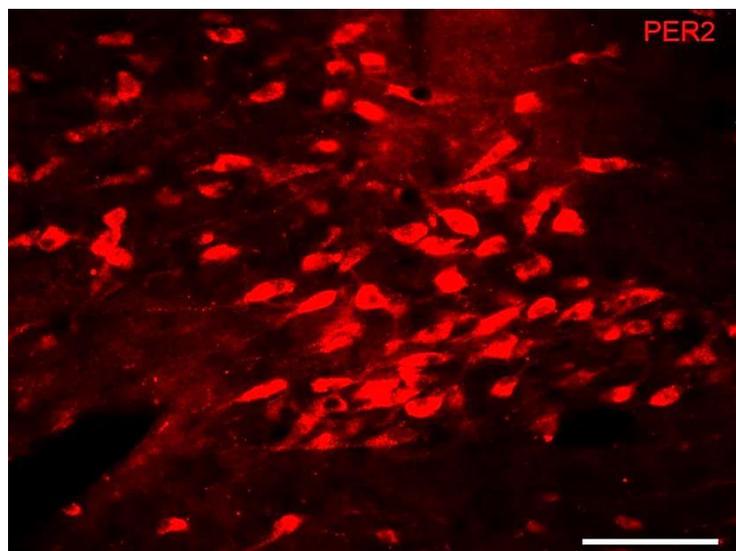


Figura 3 - Fotomicrografia de imunofluorescência de secção frontal do encefálo do primata *Sapajus apella* mostrando células marcadas com Per2-IR na substância negra *pars compacta*. Barra = 100µm.

A padronização de diluição do anticorpo mostrou-se específica com pouco background o que possibilitou o início da análise de contagens das células

comparando os períodos dia e noite. Dessa forma, foi dada continuidade nos experimentos com as reações com a técnica de imunohistoquímica fluorescente para a proteína relógio Per2.

Os resultados evidenciaram marcação expressiva do anticorpo Per2 nos neurônios da porção *pars compacta* nos dois períodos dia e noite (Figura 4). Esse resultado foi observado em todos os cortes encefálicos que apresentaram a substância negra. Foram observados neurônios magnocelulares com marcação da proteína relógio Per2-IR com predomínio na região citoplasmática dos neurônios, com ausência de marcação em dendritos e axônios.

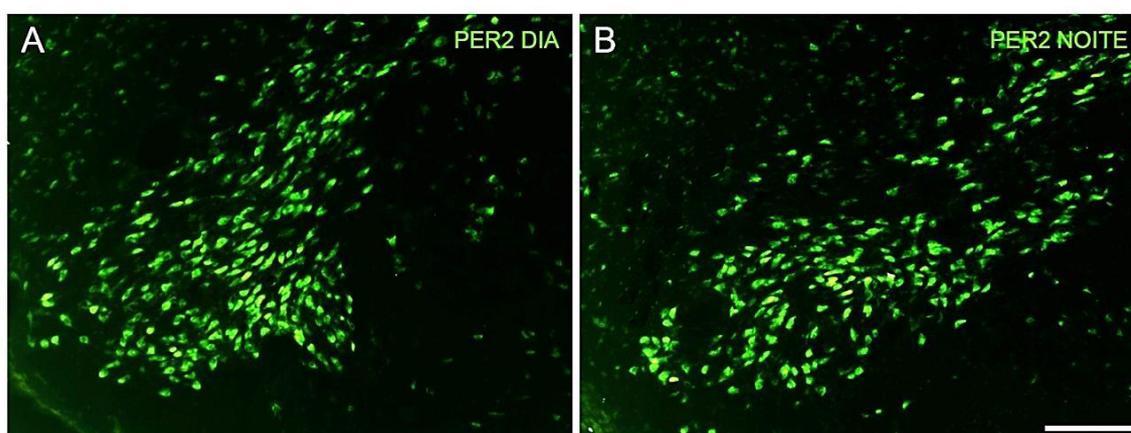


Figura 4 - Distribuição da proteína relógio Per2 na substância negra *pars compacta* do primata *Sapajus apella*. Fotomicrografias de imunofluorescência de secções frontais do encefalo do primata *Sapajus apella* mostrando células marcadas com Per2-IR em períodos dia e noite (A e B). Barra = 100µm.

Foram contadas as células imunorreativas a Per2 em todos os animais. As análises mostraram resultados similares na imunoexpressão entre os períodos dia e noite na SN.

36 Resultados

Número de células imunorreativas a Per2-IR

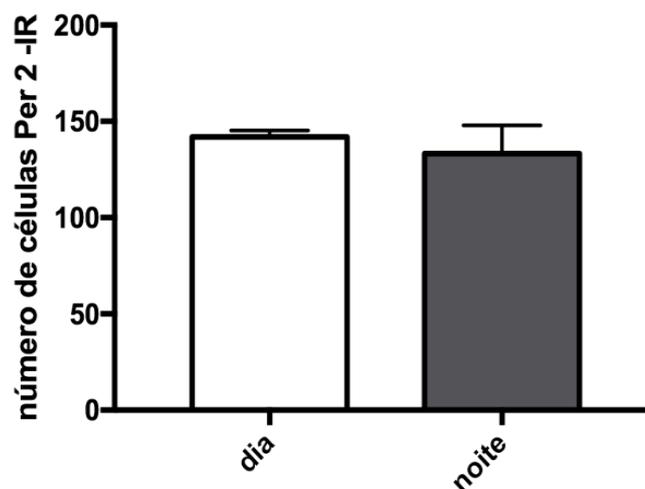


Figura 5 - Média \pm e.p.m do número de células imunorreativas a Per2-IR em cortes encefálicos representativos de toda extensão ântero-posterior da substância negra *pars compacta* do primata *Sapajus apella* (N=3 por horário) perfundidos em um horário do dia e da noite.

Os resultados destacaram um padrão semelhante de marcação, o que pode indicar uma característica funcional de adaptação independente dos períodos analisados.

6. DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O gene *Per2*, membro da família de genes *Period*, apresenta expressão tanto no Sistema Nervoso Central (SNC) quanto Periférico, e desempenha papel importante na ritmicidade circadiana (ALBRECHT et al., 2001; BAE et al., 2001; BAE; WEAVER, 2003; Lee et al., 2004). Apesar de ser expresso principalmente no NSQ do hipotálamo, *Per2* já foi encontrado em outras áreas do cérebro, incluindo o mesencéfalo e o prosencéfalo.

Além do *Sapajus apella*, como descrito nesse trabalho, a presença de *Per2* já foi descrita em outras espécies como, por exemplo, roedores e humanos (ALBRECHT et al., 2001; BAE et al., 2001; BAE; WEAVER, 2003; LEE et al., 2004; LAVEBRATT et al., 2010;). No entanto, o mecanismo e a específica função de *Per2* ainda não são claros.

Neste estudo foi realizada a caracterização da proteína relógio *Per2* nas populações neuronais da SN *pars compacta* do primata *Sapajus apella* usando a técnica de imuno-histoquímica fluorescente. Foi observada uma marcação específica de *Per2* nos neurônios dopaminérgicos pertencentes à porção *pars compacta* da SN com imunoexpressão nas diferentes divisões rostro caudais do núcleo. Além disso, observamos ausência de imunoexpressão nas células de áreas adjacentes localizadas nos mesmos níveis antero-posterior do núcleo, demonstrando uma especificidade de *Per2* nas populações neuronais da SNc.

Em particular, alguns estudos indicam que *Per2* pode influenciar de forma rítmica várias atividades neurobiológicas, como sono, depressão, comportamento motor (LAVEBRATT et al., 2010; SORIA et al., 2010; BREEN et al., 2014; CURIE et al., 2015; ZHANG et al., 2016;).

Embora não tenhamos encontrado uma nítida diferença na distribuição e número de *Per2* nos neurônios dopaminérgicos dentro dos diferentes níveis da SN *pars compacta* entre os períodos dia e noite, o resultado semelhante de marcação pode indicar a expressão de um padrão funcional independente dos períodos analisados, fundamental para a adaptação desta espécie em eventos e atividades relevantes para os respectivos períodos.

Evidências crescentes têm sugerido uma relação funcional entre o sistema dopaminérgico e Per2 (BESHARSE et al., 2004; HOOD et al., 2010; GRAVOTTA et al., 2011; SHUMAY et al., 2012). A liberação de dopamina (DA), o transportador de dopamina (DAT), receptores de DA como, por exemplo, D2 e D3, e tirosina hidroxilase (TH) parecem ser modulados por ritmos circadianos (AKHISAROGLU et al., 2005; MCCLUNG, 2007; SLEIPNESS et al., 2007; CHUNG et al., 2014). Em nosso trabalho a imunoexpressão de Per2 foi observado predominantemente em neurônios parvocelulares da substância negra, correspondentes à divisão *pars compacta*, composta exclusivamente por neurônios dopaminérgicos (DA CUNHA et al., 2002; NOLTE, 2008; STANDRING, 2008; MASSEY et al., 2017).

Outros estudos reforçaram a ideia de que Per2 desempenha papéis críticos sobre esse sistema, visto na modulação da responsividade do receptor DA, em *Drosophila* (ANDRETIC; HIRSH, 2000); na regulação dos níveis de DA no circuito mesolímbico, incluindo, no núcleo estriado através da modulação de atividade de TH e monoamina oxidase A (MAOa) (BUSSI et al., 2014; AGOSTINO; CHENG, 2016). Em estriado de camundongos, Per2 apresentou expressão associada aos níveis de DA (HAMPP et al., 2008). Na SN os níveis de Per2 foram elevados durante a noite na SN (BUSSI et al., 2014).

Nas áreas encefálicas, como, retina, bulbo olfatório, área tegmental ventral (VTA) e estriado foi destacada a regulação circadiana na síntese, liberação e sinalização da dopamina (DOYLE et al., 2002; CORTHELL et al., 2013; CHUNG et al., 2014; KIRILL et al., 2017). Em roedores, a expressão circadiana de genes relógio como Per, Clock e Bmal1 são encontrados em neurônios dopaminérgicos da VTA e SN, sugerindo regulação circadiana (MCCLUNG et al., 2005; HAMPP; ALBRECHT, 2008; HAMPP et al., 2008).

Neurônios dopaminérgicos VTA e SN são particularmente relevantes para a modificação comportamental, devido ao envolvimento na locomoção, recompensa (SCHULTZ, 1997; ROEPER, 2013). Adicionalmente, a expressão de genes do relógio circadiano, como Per, Clock e Bmal1, são encontrados em ambas as populações neuronais, sugerindo uma ligação molecular com a regulação circadiana (MCCLUNG et al., 2005; HAMPP; ALBRECHT, 2008; HAMPP et al., 2008).

A interação funcional entre neurônios dopaminérgicos e ritmos circadianos parece não ser dependente somente de condições fisiológicas, visto que em lesões da área VTA de ratos, por exemplo, com tratamento com 6-hidroxidopamina demonstrou alongar o período circadiano de corrida livre, alteração do comportamento de ingestão líquida, e diminuição dos ritmos da atividade de corrida em roda (ISOBE; NISHINO, 2001). Essas mudanças no comportamento circadiano após a alteração do sistema mesolímbico destacam ainda mais a interação significativa entre esses dois sistemas.

Em camundongos, o núcleo estriado, um local de projeção de neurônios dopaminérgicos da SN *pars compacta*, importante área para o aprendizado, recompensa e controle motor, demonstrou exibir a alteração na expressão do gene do relógio *Per1* após testes com uso de cocaína (BALLEINE et al., 2007; IMBESI et al., 2009).

A depleção da inervação de dopamina e a inibição farmacológica da sinalização do receptor dopaminérgico D2 interrompe o perfil de expressão de *Per2*, indicando um papel regulador circadiano em VTA (MCCLUNG et al., 2005; HOOD et al., 2010).

Outro indício é o fato de a maioria dos pacientes com DP sofrerem de respostas tempo-dependentes na estimulação por dopamina (BRUGUEROLLE; SIMON, 2002; HAYASHI et al., 2013). Demais sinais encontrados nesses pacientes incluem alterações em ritmos biológicos e fisiológicos controlados pelo ciclo circadiano, como a diminuição da temperatura corporal e aumento da síntese de cortisol (BRUGUEROLLE; SIMON, 2002; HARTMANN et al., 1997).

A compreensão da presença de *Per2* extra-NSQ, como visto nesse trabalho, pode reforçar o entendimento da relação bidirecional entre ritmos circadianos e sistema dopaminérgico, e mesmo ajudar na compreensão de como distúrbios neurogerativos como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington são capazes de interromper os ritmos circadianos (WITTING et al., 1990; WULFF et al., 2010).

A elucidação da relação recíproca entre o sistema dopaminérgico e a ritmicidade circadiana pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias cronoterapêuticas para transtornos psiquiátricos ou neurodegenerativos, ou mesmo para maior compreensão das condições fisiológicas.

7. CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- A caracterização de Per2 numa área encefálica como o caso SN *pars compacta*, envolvida no controle motor, entre outras funções, pode ser de grande importância e indicar um papel funcional de Per2 não só em condições fisiológicas como no sono, ansiedade, dor e ritmo circadiano, mas também uma participação em mecanismos de controle motor incluindo manifestações de motricidade, aprendizado, e recompensa vistos nas vias de conexão da SN *pars compacta*.
- A presença de marcação de Per2-IR nos neurônios da SN *pars compacta* pode reforçar o entendimento da relação bidirecional entre ritmos circadianos e sistema dopaminérgico
- Os resultados permitem sugerir que a presença de genes relógio em áreas classicamente não relacionadas ao controle circadiano, expande as formas tradicionais de se discutir as funções da substância negra *pars compacta* e nos leva a reconsiderar a importância fisiológica, comportamental e psicopatológica destes ritmos região-específicos em diferentes áreas encefálicas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGOSTINO, P.; AND CHENG, R. Contributions of dopaminergic signaling to timing accuracy and precision. **Curr. Opin. Behav. Sci.**, v. 8, p. 153-160, 2016.
- AKHISAROGLU, M.; KURTUNCU, M.; MANEV, H. AND UZ, T. Diurnal rhythms in quinpirole-induced locomotor behaviors and striatal D2/D3 receptor levels in mice, **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 80, p. 371-377, 2005.
- ALBRECHT, U. et al. Per1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock. **J. Biol. Rhythms**, v.16, p. 100-104, 2001.
- ANDRETIC, R.; AND HIRSH, J. Circadian modulation of dopamine receptor responsiveness in *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.**, v.97, p. 1873-1878, 2000.
- AREY, R. N. et al. An important role for cholecystokinin, a CLOCK target gene, in the development and treatment of manic-like behaviors. **Mol Psychiatry**, v.19, p. 342-50, 2014.
- BAE, K. et al. Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. **Neuron**, v. 30, p. 525-536, 2001.
- BAE, K.; AND WEAVER, D. R. Light-induced phase shifts in mice lacking mPER1 or mPER2. **J. Biol. Rhythms**, v. 18, p. 123-133, 2003.
- BALLEINE, B.W.; DELGADO, M.R.; HIKOSAKA, O. The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. **J Neurosci**, v 31, p. 8161–5, 2007.
- BARROT, M. The ventral tegmentum and dopamine: a new wave of diversity. **Neuroscience**, v. 282, p. 243-247, 2014.
- BESHARSE, J. C.; ZHUANG, M.; FREEMAN, K. AND FOGERTY, J. Regulation of photoreceptor Per1 and Per2 by light, dopamine and a circadian clock. **Eur. J. Neurosci**, v. 20, p. 167-174, 2004.
- BREEN, D. P. et al. Sleep and circadian rhythm regulation in early Parkinson disease. **JAMA Neurol**, v. 71, p. 589-595, 2014.
- BRUGUEROLLE, B.; & SIMON, N. Biologic rhythms and Parkinson's disease: A chronopharmacologic approach to considering fluctuations in function. **Clinical Neuropharmacology**, v. 4, p. 194–201, 2002.
- BUSSI, I. L.; LEVÍN, G.; GOLOMBEK, D. A.; AND AGOSTINO, P. V. Involvement of dopamine signaling in the circadian modulation of interval timing. **Eur. J. Neurosci**, v. 40, p. 2299-2310, 2014.

CASTANEDA, T. R.; DE PRADO, B. M.; PRIETO, D.; AND MORA, F. Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. **J Pineal Res**, v.36, p. 177-85, 2004.

CAVALCANTI, J. R. L. P. et al. Nuclear organization of the substantia nigra, ventral tegmental area and retrorubral field of the common marmoset (*Callithrix jacchus*): A cytoarchitectonic and TH-immunohistochemistry study. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 77, p. 100–109, 2016.

CHA, H.K. et al. Small Molecule Modulators of the Circadian Molecular Clock with Implications for Neuropsychiatric Diseases. **Front. Mol. Neurosci**, v. 11, p. 496, 2019.

CHUNG, S. et al. Impact of circadian nuclear receptor REV-ERB α on midbrain dopamine production and mood regulation. **Cell**, v.157, p. 858-868, 2014.

CORTHELL, J.T. et al. Olfactory bulb monoamine concentrations vary with time of day. **Neuroscience**, v. 247, p. 234-41, 2013.

CURIE, T.; MARET, S.; EMMENEGGER, Y.; AND FRANKEN, P. *In vivo* imaging of the central and peripheral effects of sleep deprivation and suprachiasmatic nuclei lesion on PERIOD-2 protein in mice. **Sleep**, v.38, p. 1381-1394, 2015.

DA CUNHA, C.; M. ANGELUCCI E. M. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 3, p. 227-237, 2002.

DIBNER, C.; SCHIBLER, U.; AND ALBRECHT, U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. **Annu. Rev. Physiol**, v. 72, p. 517–549, 2010.

DOYLE, S.E.; MCIVOR, W.E.; MENAKER, M. Circadian rhythmicity in dopamine content of mammalian retina: role of the photoreceptors. **J Neurochem**, v. 1, p.211-9, 2002.

DUNLAP, J.C. Molecular bases for circadian clocks. **Cell**, v. 96, p. 271-90, 1999.

GRAVOTTA, L.; GAVRILA, A. M.; HOOD, S.; AND AMIR, S. Global depletion of dopamine using intracerebroventricular 6-hydroxydopamine injection disrupts normal circadian wheel-running patterns and PERIOD2 expression in the rat forebrain. **J. Mol. Neurosci**. v. 45, p. 162-171, 2011.

GUISSONI CAMPOS, L.M.; CRUZ-RIZZOLO, ROELF J.; PINATO, L. The primate seahorse rhythm. **Brain Research** , v.1613, p.81 - 91, 2015.

GUISSONI CAMPOS, L.M. et al. Circadian Clock Proteins and Melatonin Receptors in Neurons and Glia of the *Sapajus apella* Cerebellum. **Front Physiol**, v. 9, p.5, 2018.

- HAMNETT, R.; CROSBY, P.; CHESHAM, J.E.; HASTINGS, M.H. Vasoactive intestinal peptide controls the suprachiasmatic circadian clock network via ERK1/2 and DUSP4 signalling. **Nat Commun.** v.1, p.542, 2019.
- HAMPP, G.; ALBRECHT, U. The circadian clock and mood-related behavior. **Commun Integr Biol**, v. 1, p. 1–3, 2008.
- HAMPP, G. et al. Regulation of monoamine oxidase A by circadian-clock components implies clock influence on mood. **Curr Biol**, v. 9, p. 678–83, 2008.
- HARTMANN, A. et al. Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: Ultradian secretory pulsatility and diurnal variation. **Neurobiology of Aging**, v. 3, p. 285–28, 1997.
- HAYASHI, A. et al. A Disruption Mechanism of the Molecular Clock in a MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. **NeuroMolecular Medicine**, v. 2, p. 238–251, 2013.
- HOOD, S. et al. Endogenous dopamine regulates the rhythm of expression of the clock protein PER2 in the rat dorsal striatum via daily activation of D2 dopamine receptors. **J Neurosci**, v. 42, p. 14046–58, 2010.
- IMBESI, M. et al. Dopamine receptor-mediated regulation of neuronal "clock" gene expression. **Neuroscience**, v.2, p. 537–44, 2009.
- INUTSUKA, A.; AND YAMANAKA, A. The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v.4, p. 18, 2013.
- ISOBE, Y.; NISHINO, H. Circadian rhythm of drinking and running-wheel activity in rats with 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area. **Brain Res**, v. 1-2, p. 187–92, 2001.
- JIN, L. et al. Combined View of Nigrosome-1 and Neuromelanin in Black Substance Using 3T MRI for Differential Diagnosis of Essential Tremor and New Parkinson's Disease. **Neurol Frontal**, Feb 12, 2019.
- KIM, J. et al. Implications of Circadian Rhythm in Dopamine and Mood Regulation. **Mol. Cells**, v.7, p. 450-456, 2017.
- KIRILL S.; KORSHUNOV, L.; BLAKEMORE, J.; TROMBLEY, P.L Q. Dopamine: A Modulator of Circadian Rhythms in the Central Nervous System. **Front Cell Neurosci**, v. 11, p. 91, 2017.
- KRIEBS, A. et al. Circadian repressors CRY1 and CRY2 broadly interact with nuclear receptors and modulate transcriptional activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 33, p. 8776-8781, 2017.

52 Referências

LAVEBRATT, C. et al. PER2 variantion is associated with depression vulnerability. **Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet**, 153B, p. 570-581, 2010.

LEE, C.; WEAVER, D. R.; AND REPERT, S. M. Direct association between mouse PERIOD and CKIε is critical for a functioning circadian clock. **Mol.Cell.Biol**, v. 24, p. 584-594, 2004.

MASSEY, L.A. et al. Microscopy of RM of 9.4of substantia nigra with pathological validation in controls and disease. **Neuroimaging Clin**, November 17, v. 13, p. 154-163. eCollection, 2017.

MCCLUNG, C.A. et al. Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the Clock gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 26, p. 9377–81, 2005.
MCCLUNG, C.A. Circadian rhythms, the mesolimbic dopaminergic circuit, and drug addiction. **Scientific World Journal**, v. 7, p. 194-202, 2007.

MCGLASHAN, E.M. et al. Imaging Individual Differences in the Response of the Human Suprachiasmatic Area to Light. **FrontNeurol**, v.9, p. 1022, 2018.

Moore-Ede, M.C. et al. The clocks that time us: physiology of the circadian timing system. **Harvard Univ Pr**, 1982.

NAGANO, M. et al. Slow shift of dead zone after an abrupt shift of the light-dark cycle. **Brain Research**, v. 1714, p.73-80, 2019.

NOLTE, J. The Human Brain: An Introduction to its Functional Anatomy. **Mosby**; 6th edition, July, 2008.

PANDA, S.; Hogenesch, J.B.; Kay, S.A. Circadian rhythms from flies to human. **Nature**, v. 417, p. 329-35, 2002.

PIN ARBOLEDAS, G. The sleep in children with neurodevelopmental disorders. **Medicina (B Aires)**, v. 1, p. 44-50, 2019.

RADWAN, B.; LIU, H.; & CHAUDHURY, D. The role of dopamine in mood disorders and the associated changes in circadian rhythms and sleep-wake cycle. **Brain Research**, v. 1713, p.42-51, 2018.

RALPH, M. R.; FOSTER, R. G.; DAVIS, F. C.; AND MENAKER, M. (). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. **Science**, v, 247, p. 975–978, 1990.

REPERT, S. M.; AND WEAVER, D. R.. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, p. 935–941, 2002.

ROEPER, J. Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. **Trends Neurosci**, v.6, p. 336–42, 2013.

SHUMAY, E. et al. Repeat variation in the human PER2 gene as a new genetic marker associated with cocaine addiction and brain dopamine D2 receptor availability. **Transl. Psychiatry**, v. 3, p. e86, 2012.

SCHULTZ, W. Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. **Curr Opin Neurobiol**, v.2, p. 191–7, 1997.

SIDOR, M. M.; AND C. A. MCCLUNG. Timing matters: using optogenetics to chronically manipulate neural circuitry and rhythms, **Front Behav Neurosci**, v.8, p. 41, 2014.

SINGH, K.; JHA, N. K.; & THAKUR, A. Spatiotemporal chromatin dynamics - A tell tale of circadian epigenetic gene regulation. **Life Sciences**, v. 221, p. 377-391, 2019.

SLEIPNESS, E. P., SORG, B. A. AND JANSEN, H. T. Diurnal differences in dopamine transporter and tyrosine hydroxylase levels in rat brain: dependence on the suprachiasmatic nucleus. **Brain Res**, v.1129, p. 34-42, 2007.

SON, G. H., CHUNG, S., AND KIM, K. The adrenal peripheral clock: glucocorticoid and the circadian timing system. *Front. Neuroendocrinol*, v 32, p. 451–465, 2011.

SORIA, V. et al. Differential association of circadian genes with mood disorders: CRY1 and NPAS2 are associated with unipolar major depression and CLOCK and VIP with bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 1279-1289, 2010.

STANDRING, S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. **Churchill Livingstone**; 40th edition, November 2008.

TAKEUCHI, Y. et al. Moonlight controls the dependence of the lunar phase and the regular oscillation of the clock gene expressions on a lunar-synchronized spawner fish, Goldlined spinefoot. **Sci Rep**. v. 1, p. 6208, 2018.

TOKUDA, I.T.; ONO, D.; HONMA, S.; HONMA, K.I.; HERZEL, H. The coherence of the circadian rhythms in NSQ is governed by the interaction of two coupling factors. **PLoS Comput Biol**, v.12, e1006607, 2018.

WITTING, W. et al. Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease. **Biol. Psychiatry**, v. 27, p. 563-572, 1990.

WULFF, K.; GATTI, S.; WETTSTEIN, J.G.; AND FOSTER, R.G. Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease. **Nat Rev Neurosci**. v.11, p. 589-599, 2010.

YUAN, X.S. et al. Whole-Brain Monosynaptic Afferent Projections to the Cholecystokinin Neurons of the Suprachiasmatic Nucleus. **Front Neurosci**, v.12, p. 807, 2018.

54 Referências

ZHANG, B. et al. Sleep deprivation influences circadian gene expression in the lateral habenula. **Behav. Neurol.**7919534, **2016**.

ZHAO, X. et al. Nuclear receptor rockaround the clock. **EMBO Rep**, v. 5, p. 518-28, 2014.

ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética da UNESP – Araçatuba



CERTIFICADO 002/2019

Certificamos que a proposta intitulada “INFLUÊNCIA CIRCADIANA EM NEURÔNIOS DA SUBSTÂNCIA NEGRA”, registrada sob o protocolo nº 538/2019, sob a responsabilidade de Leila Maria Guissoni Campos, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da FFC – UNESP do Campus de Marília, em reunião de 26/06/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De 06/2019 a 04/2022
Espécie/linhagem/raça	Primata não humano/ <i>Sapajus apella</i>
Nº de animais	06
Peso/Idade	2 a 3kg/12 anos
Sexo	M
Origem	Núcleo de Procriação de Macacos-prego da Faculdade de Odontologia da UNESP – Campus de Araçatuba.

Marília, 27 de junho de 2019.

Dra. Patrícia de Souza Rossignoli
 Presidente da CEUA-FFC da UNESP-
 Câmpus de Marília

CERTIFICADO 002/2019

Certificamos que a proposta intitulada "INFLUÊNCIA CIRCADIANA EM NEURÔNIOS DA SUBSTÂNCIA NEGRA", registrada sob o protocolo nº 538/2019, sob a responsabilidade de Leila Maria Guissoni Campos, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da FFC – UNESP do Campus de Marília, em reunião de 26/06/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De 06/2019 a 04/2022
Espécie/linhagem/raça	Primata não humano/ <i>Sapajus apella</i>
Nº de animais	06
Peso/Idade	2 a 3kg/12 anos
Sexo	M
Origem	Núcleo de Procriação de Macacos-prego da Faculdade de Odontologia da UNESP – Campus de Araçatuba.

Marília, 27 de junho de 2019.



Dra. Patrícia de Souza Rossignoli
Presidente da CEUA-FFC da UNESP-
Câmpus de Marília