

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**O COMPLEXO NUCLEAR VESTIBULAR DO SAGUI (*Callithrix jacchus*):
CARACTERIZAÇÃO CITOARQUITETÔNICA E NEUROQUÍMICA.**

ADRIANA JUSSARA DE OLIVEIRA BRANDÃO

Natal/RN

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**O COMPLEXO NUCLEAR VESTIBULAR DO SAGUI (*Callithrix jacchus*):
CARACTERIZAÇÃO CITOARQUITETÔNICA E NEUROQUÍMICA.**

ADRIANA JUSSARA DE OLIVEIRA BRANDÃO

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Programa de pós-graduação em Fisioterapia, para a obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.
Orientadora: Prof.^a Miriam Stela Maris de Oliveira Costa

Natal/RN

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Coordenador do Programa de pós-graduação em Fisioterapia:
Prof. Ricardo Oliveira Guerra.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**O COMPLEXO NUCLEAR VESTIBULAR DO SAGUI (*Callithrix jacchus*):
CARACTERIZAÇÃO CITOARQUITETÔNICA E NEUROQUÍMICA.**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Miriam Stela Maris de Oliveira Costa – Presidente - UFRN

Prof. Dr. Judney Cley Cavalcante – UFRN

Prof. Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes – UFPE

Aprovada em ____/____/____

Agradecimentos

À professora Miriam, por todo o conhecimento transmitido.

Aos colegas do laboratório de Neuranatomia, pela ajuda e amizade, em especial à Twyla pela disponibilidade constante.

Aos funcionários do Núcleo de Primatologia, pela importante colaboração.

Ao Departamento de Morfologia, na pessoa do seu chefe, professor Celcimar Alves Câmara, pela manutenção da infra-estrutura do laboratório, indispensável ao desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas e professores do Departamento de Fisioterapia da UFRN, por contribuírem para o crescimento científico da profissão.

A Capes pelo apoio financeiro.

À minha família e amigos, pelo carinho que cada um, a sua maneira, me dispensa. Sem vocês, tudo teria sido muito mais difícil.

Deixo também registrado meu respeito e valorização à vida animal.

Sumário

| | Página |
|-------------------------------------------------|--------|
| Agradecimentos | v |
| Lista de figuras | vii |
| Resumo | viii |
| Abstract | ix |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 O sistema vestibular | 2 |
| 1.2 Os núcleos vestibulares | 4 |
| 1.3 Neurotransmissores dos núcleos vestibulares | 5 |
| 1.4 O sagui | 7 |
| 1.5 Justificativa | 10 |
| 1.6 Objetivos | 10 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS | 11 |
| 2.1 Sujeitos | 12 |
| 2.2 Procedimentos | 12 |
| 2.3 Análise dos resultados | 17 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 19 |
| Artigo submetido à Revista Brain Research | 20 |
| 4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS | 44 |
| 5 REFERÊNCIAS | 47 |
| 6 ANEXOS | 52 |
| Manuscrito em inglês | 53 |

Lista de figuras

| | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1. Saguis (<i>Callithrix jacchus</i>) no ambiente natural. | 8 |
| Figura 2. Encéfalo do sagui em vistas superior, lateral e inferior. | 13 |
| Figura 3. Microtomia do encéfalo | 14 |
| Figuras do artigo | |
| Figura 1. Fotomicrografias de secções coronais coradas pela técnica de Nissl em paralelo com secções imuno-coradas para NeuN, em nível pontobulbar, com a delimitação dos núcleos vestibulares. | 39 |
| Figura 2. Expressão imuno-histoquímica de Glutamato em pericários. | 40 |
| Figura 3. Expressão imuno-histoquímica de Substância P em terminais. | 41 |
| Figura 4. Expressão imuno-histoquímica de ChAT em pericários. | 42 |
| Figura 5. Expressão imuno-histoquímica de GAD em terminais. | 43 |

Resumo

Para os vertebrados, manter o equilíbrio corporal contra o campo gravitacional e ser capaz de orientar-se no ambiente são aspectos fundamentais para a sobrevivência, nos quais é essencial a participação do sistema vestibular. Como parte deste sistema, o complexo nuclear vestibular é a primeira estação central que, ao integrar várias informações (visual, proprioceptiva), além da vestibular, assume o papel principal na manutenção do equilíbrio. Neste estudo, o complexo nuclear vestibular do sagui foi avaliado com relação a sua citoarquitetura e conteúdo neuroquímico de células e terminais axônicos, através das técnicas de coloração de Nissl e imunohistoquímica para proteína neuronal nuclear específica (NeuN), glutamato (Glu), substância P (SP), colina acetiltransferase (ChAT) (enzima de síntese da acetilcolina-Ach), e descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) (enzima de síntese do ácido gama-amino-butírico-GABA). Foi utilizado como animal experimental o sagui (*Callithrix jacchus*), um pequeno primata nativo da Mata Atlântica do Nordeste Brasileiro. Como resultados, a técnica de Nissl, complementada pela imunohistoquímica para NeuN, permitiu delinear os núcleos vestibulares superior, lateral, medial e inferior (ou descendente) no encéfalo do sagui. Neurônios e terminais imunorreativos a Glu e ChAT e apenas terminais imunorreativos a SP e GAD foram vistos em todos os núcleos, embora em densidade variável. Este trabalho confirma a presença nos núcleos vestibulares do sagui, de Glu e SP em terminais, provavelmente provenientes dos neurônios de primeira ordem do gânglio vestibular, e de GABA em terminais, supostamente provenientes das células de Purkinge do cerebelo. Neurônios de segunda ordem dos núcleos vestibulares parecem usar Glu e Ach como neurotransmissores, a julgar pela sua expressiva presença em pericários destes núcleos no sagui, como relatado em outras espécies.

Palavras-chave: aparelho vestibular, neurotransmissores, neurofarmacologia, tronco encefálico, sagui, técnicas imuno-histoquímicas.

Abstract

To the vertebrates, maintain body balance against the gravitational field and be able to orient themselves in the environment are fundamental aspects for survival, in which the participation of vestibular system is essential. As part of this system, the vestibular nuclear complex is the first central station that, by integrating many information (visual, proprioceptive), and the vestibular, assumes the lead role in maintaining balance. In this study, the vestibular nuclear complex was evaluated in relation to its cytoarchitecture and neurochemical content of cells and axon terminals, through the techniques of Nissl staining and immunohistochemistry for neuronal specific nuclear protein (NeuN), glutamate (Glu), substance P (SP), choline acetyltransferase (ChAT) (enzyme that synthesizes acetylcholine-Ach) and glutamic acid decarboxylase (GAD) (enzyme that synthesizes gamma-amino butyric acid-GABA). The common marmoset (*Callithrix jacchus*) was used as experimental animal, which is a small primate native from the Atlantic Forest in the Brazilian Northeast. As results, the Nissl technique, complemented by immunohistochemistry for NeuN allowed to delineate the vestibular nucleus – superior, lateral, medial and inferior (or descending) in the brain of the common marmoset. Neurons and terminals immunoreactive to Glu and ChAT and only immunoreactive terminals to SP and GAD were seen in all nuclei, although in varying density. This study confirms the presence in the vestibular nuclei of the common marmoset, of Glu and SP in terminals, probably from the first order neurons of vestibular ganglion, and of GABA in terminals, presumably from Purkinje cells of the cerebellum. Second-order neurons of the vestibular nuclei seem to use Glu and Ach as neurotransmitters, judging by their expressive presence in the cell bodies of these nuclei in common marmosets, as reported in other species.

Keywords: vestibular system, neurotransmitters, neuropharmacology, brain stem, common marmoset, immunohistochemical techniques.

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 O sistema vestibular

Para os vertebrados, manter o equilíbrio corporal contra o campo gravitacional e ser capaz de orientar-se no ambiente são aspectos fundamentais para a sobrevivência. Estes aspectos implicam em permanente controle da posição da cabeça e do tronco no espaço e também controle da cabeça em relação ao corpo. Três modalidades sensoriais estão fortemente envolvidas nestes processos: visual, proprioceptiva e vestibular (GDOWSKI e McCREA, 1999; VIDAL e SANS, 2004; ANGELAKI e CULLEN, 2008).

O sistema vestibular é formado pelos órgãos do equilíbrio da orelha interna (ou labirinto) e suas projeções para o sistema nervoso central. É considerado o sexto sentido, informando-nos sobre a posição e o movimento da cabeça, assim provendo-nos do sentido do equilíbrio, auxiliando na coordenação dos movimentos da cabeça e dos olhos e nos ajustes da postura corporal. Existe um conjunto de órgãos vestibulares de cada lado da cabeça, dispostos como a imagem em espelho um do outro. Três canais semicirculares percebem os movimentos rotacionais e dois órgãos otolíticos (sáculo e utrículo) percebem acelerações lineares (força da gravidade) e as inclinações da cabeça. A combinação dos sinais destas estruturas é necessária para explorar e compreender a enorme gama de movimentos físicos experimentados no dia-a-dia (ANGELAKI e CULLEN, 2008).

Os canais semicirculares são as três estruturas em forma de arco do labirinto. Eles estão colocados em planos aproximadamente ortogonais entre si, o que significa que existe um ângulo de cerca de 90 graus entre cada dois destes arcos. O canal horizontal forma um ângulo de 30° com o plano horizontal, enquanto o anterior e o posterior estão no plano vertical. Cada canal semicircular é preferencialmente estimulado por acelerações agindo nos seus planos, mas como não são absolutamente ortogonais, movimentos angulares afetam mais ou menos também os outros canais (VIDAL e SANS, 2004).

O sistema vestibular é responsável pela habilidade de navegação (mover-se apropriadamente no meio) e orientação no ambiente, o que requer conhecimento não apenas do movimento inercial, mas também de quais componentes de ativação

vestibular resultam de movimentos ativos ou passivos (KAUFMAN, 2005; ANGELAKI e CULLEN, 2008).

A orientação espacial no controle postural é baseada na interpretação da informação sensorial convergente dos sistemas somato-sensorial, vestibular e visual. O equilíbrio postural envolve a coordenação de estratégias sensório-motoras para estabilizar o centro de massa corporal durante distúrbios na estabilidade postural desencadeados externamente ou auto-iniciados (HORAK, 2006; SADEGHI et al., 2007).

Os sensores do sistema vestibular podem ser ativados por sinais auto-gerados ou produzidos externamente. Os receptores vestibulares e as fibras aferentes registram informação sobre os movimentos próprios do indivíduo, bem como movimentos provenientes de mudanças no mundo externo (McCREA et al., 1999; ROY e CULLEN, 2004).

O sistema vestibular é considerado um sensor inercial que codifica o movimento da cabeça em relação ao ambiente. Ele difere dos outros sentidos em muitos aspectos. Mais notadamente, o processamento vestibular central é altamente convergente e fortemente multimodal. Por exemplo, as interações canais/otolíticas chegam ao tronco encefálico e ao cerebelo imediatamente na primeira sinapse. Além disso, as interações visual/vestibular e proprioceptiva/vestibular ocorrem através de vias vestibulares centrais e são vitais para o controle postural. Sinais de músculos, articulações, pele e olhos são continuamente integrados ao influxo vestibular. Em virtude da forte e extensiva convergência multimodal com outros sinais sensoriais e motores, a estimulação vestibular não permite separar ou distinguir sensação consciente com relação à procedência do estímulo nervoso, uma vez que sinais provenientes de vários sistemas são integrados para gerar a informação vestibular (SHAIKH et al., 2004; ANGELAKI e CULLEN, 2008).

Uma característica única do sistema vestibular é que muitos neurônios sensoriais de segunda ordem no tronco encefálico são também neurônios pré-motores, ou seja, os mesmos neurônios que recebem aferências enviam projeções diretas aos motoneurônios. Uma vantagem desta circuitaria organizada é que as respostas sensório-motoras vestibulares têm latências extraordinariamente baixas (ANGELAKI e CULLEN, 2008).

As disfunções do sistema vestibular trazem como principais sinais e sintomas sensações desagradáveis, tais como tontura, vertigem e perda de equilíbrio, os

quais têm um impacto negativo na habilidade de um indivíduo para executar rotinas cotidianas e viver independentemente (DELISA e GANS, 2002).

As suposições a respeito dos mecanismos de controle do equilíbrio determinam o modo como são avaliadas e tratadas as desordens do equilíbrio. Atualmente, o controle postural é considerado uma habilidade motora complexa decorrente da interação de múltiplos processos sensório-motores, o que requer um melhor conhecimento dos vários sistemas envolvidos e seus múltiplos mecanismos subjacentes (HORAK, 2006).

1.2 Os núcleos vestibulares

Em mamíferos, as fibras vestibulares primárias têm origem de neurônios bipolares situados no gânglio vestibular da orelha interna. Os processos periféricos das células bipolares conectam-se aos receptores vestibulares na periferia, enquanto os processos centrais, formando a porção vestibular do nervo vestibulococlear (VIII par), ou simplesmente nervo vestibular, chegam ao sistema nervoso central em um complexo nuclear, os chamados núcleos vestibulares. Além da informação vestibular, o complexo vestibular integra informações de outra natureza, como visual e proprioceptiva, permitindo caracterizar esses núcleos como uma estação importante, talvez a principal nos mecanismos de manutenção do equilíbrio, postura e controle do olhar (BARMACK, 2003; VIDAL e SANS, 2004).

O complexo vestibular fica situado na porção dorsal do bulbo e da ponte, lateralmente ao sulco limitante, estendendo-se do nível do pedúnculo cerebelar superior (braço conjuntivo) ao pedúnculo cerebelar inferior (corpo restiforme). É composto de 4 núcleos vestibulares: superior, lateral, medial e inferior (ou descendente, ou espinal), que serão descritos a seguir, de acordo com estudos realizados em ratos (BARMACK, 2003; VIDAL e SANS, 2004).

O núcleo vestibular superior estende-se do nível do núcleo motor do nervo trigêmeo à porção rostral do núcleo vestibular lateral. Considerando as aferências massivas das cristas ampulares e sua principal eferência para os núcleos motores oculares, o núcleo vestibular superior parece ter papel importante no controle dos movimentos dos olhos (VIDAL e SANS, 2004).

Rostralmente, o núcleo vestibular lateral é limitado pelo pólo caudal do núcleo vestibular superior; caudoventralmente pelo núcleo vestibular inferior; e medialmente

pelo núcleo vestibular medial. As principais projeções da mácula na parte ventral do núcleo vestibular lateral e as muitas fibras eferentes deixando este núcleo em direção à medula espinal indicam que o núcleo vestibular lateral é principalmente envolvido com o controle postural (VIDAL e SANS, 2004).

O núcleo vestibular medial é o mais próximo do assoalho do quarto ventrículo. Estende-se rostralmente acima da zona ventral posterior do núcleo vestibular superior, terminando caudalmente no nível do núcleo prepósito do hipoglosso, sendo limitado ventralmente pelo núcleo do trato solitário. Os núcleos vestibulares lateral e inferior estão lateralmente a ele. A convergência de aferências vindas dos receptores vestibulares e do pescoço, e as principais eferências, que vão para os núcleos motores oculares e medula cervical superior, indicam que o núcleo vestibular medial é um estabilizador do olhar e da postura no plano horizontal (VIDAL e SANS, 2004).

O núcleo vestibular descendente estende-se rostralmente do nível caudal do núcleo vestibular lateral até o nível do núcleo parassolitário caudalmente. Lateralmente é limitado pelo núcleo cuneiforme acessório e pedúnculo cerebelar inferior, e medialmente pelo núcleo vestibular medial. Ele parece estar envolvido principalmente na integração das mensagens espinais vestibulares e cerebelares, o que implica no controle da postura corporal (VIDAL e SANS, 2004).

As vias descendentes diretas vestibulo-autonômicas, originadas no núcleo vestibular medial caudal e no núcleo vestibular inferior, e projetadas para o núcleo do trato solitário e outras regiões autonômicas, tais como núcleo motor dorsal do vago, medula ventrolateral rostral e núcleo ambíguo, poderiam constituir a rota mais direta na evocação de respostas autonômicas durante o movimento e as mudanças posturais (CAI et al, 2007).

A natureza geométrica das entradas vestibulares, em particular - posição da cabeça, rotação e translação - bem como a mensuração fácil das respostas (movimentos dos olhos, dos músculos posturais do pescoço e tronco) tornam este sistema atrativo para estudos de circuitaria neural (KAUFMAN, 2005).

1.3 Neurotransmissores dos núcleos vestibulares

Os neurotransmissores envolvidos na neurotransmissão e neuromodulação dos neurônios vestibulares centrais são convencionalmente classificados em três

grupos, a saber: Os aminoácidos excitatórios – glutamato (Glu) e aspartato – e inibitórios – ácido gama-amino-butírico (GABA) e glicina, que mediam eventos sinápticos rápidos; as cinco monoaminas (histamina, dopamina, serotonina, noradrenalina e adrenalina) e a acetilcolina; e os peptídeos neuroativos, tais como a substância P (SP) e outras taquicininas (DE WAELE et al., 1995; BARMACK, 2003; VIDAL e SANS, 2004).

Os núcleos vestibulares contêm neurônios glutamatérgicos controlados por aferentes glutamatérgicos excitatórios do labirinto ipsilateral e por projeções glutamatérgicas comissurais que atuam em interneurônios inibitórios GABAérgicos. O GLU é considerado o principal neurotransmissor das fibras aferentes vestibulares, estando implicado na transmissão sináptica entre neurônios vestibulares de primeira e segunda ordem; neurônios vestibulares de segunda ordem e neurônios motores abducentes contralaterais; e neurônios vestibulares excitatórios de segunda ordem e alguns neurônios motores espinais (DE WAELE et al., 1995; KOZAKO et al., 2002; VIDAL e SANS, 2004).

GABA e glicina são os transmissores inibitórios mais abundantes no sistema nervoso central. A presença de GABA no complexo nuclear vestibular, tanto em pericários como em terminais axônicos, foi sugerida com base em dados eletrofisiológicos e bioquímicos, e demonstrada por técnicas imuno-histoquímicas, usando-se anticorpos diretamente contra o GABA ou sua enzima de síntese, a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) (HOLSTEIN et al., 1999; VIDAL e SANS, 2004).

Já o sistema colinérgico central, por sua vez, tem um papel importante no processamento da informação aferente sensorial nos núcleos vestibulares. Existem evidências comportamentais sobre o controle colinérgico da função vestibular central e estudos eletrofisiológicos também dão suporte a esses achados. Neurônios vestibulares laterais e mediais são excitados por aplicações sistêmicas ou microiontoforéticas de acetilcolina. Sabe-se que a transmissão sináptica entre os neurônios vestibulares primários e os de segunda ordem é facilitada por agonistas colinérgicos e dificultada por antagonistas colinérgicos (DE WAELE et al., 1995).

Fibras e terminais axonais imunorreativos a SP foram detectados nos núcleos vestibulares, predominantemente nos núcleos medial, porção caudal, e inferior, originários dos neurônios sensoriais de primeira ordem, e da formação reticular do

tronco encefálico, como evidenciado em algumas espécies de mamíferos (VIDAL e SANS, 2004).

1.4 O sagui

O modelo animal escolhido para esta pesquisa foi o sagui (*Callithrix jacchus*) (Fig. 1), um pequeno primata do Novo Mundo. Nativo das florestas equatoriais do Brasil, mais encontrado em regiões de Mata Atlântica, existe em abundância no Rio Grande do Norte. Trata-se de um animal de pequeno porte, medindo em média 20 cm de comprimento de corpo e aproximadamente 25 cm de cauda e peso corporal de menos de 500 g quando adultos. Uma marca característica da espécie é a presença de tufo de pêlos longos e brancos ao redor das orelhas e a cauda não preênsil marcada com anéis de pêlos brancos e pretos. São animais de hábitos diurnos (MENEZES et al., 1993; 1994; 1997; AZEVEDO et al., 1997) e no ambiente natural dispõem de 25 a 30% do tempo em atividades de forrageio, alimentando-se de insetos, aranhas, pequenos vertebrados, ovos de pássaros e exsudatos de árvores. Entretanto, são facilmente adaptáveis à vida em cativeiro, sendo de fácil manuseio e alimentando-se de frutas, legumes, cereais e eventualmente proteínas animais (EPPLE, 1970; O'BYRNE e MORRIS, 1988).



Figura 1. Saguís (*Callithrix jacchus*) no ambiente natural.

Atingem a maturidade sexual em torno dos 14 meses. Sua alta capacidade reprodutiva – 2 partos gemelares por ano – mesmo em cativeiro, o exclui da lista de espécies em extinção. A expectativa de vida no campo é de cerca de 10 anos, podendo atingir os 16 anos no cativeiro. Embora oriundo das florestas tropicais do Nordeste Brasileiro, o saguí é atualmente encontrado em colônias de diversas partes do mundo para onde foi levado, sendo utilizado como modelo para estudo nas mais diversas áreas (RYLANDS, 1996; NEWMAN et al., 2009).

O tamanho pequeno e a organização social em pequenas famílias permitem que os animais sejam capturados com facilidade. O encéfalo pequeno também facilita o processamento experimental. Além disso, o cérebro dos saguis tem muitas semelhanças anatômicas com o de outros primatas, inclusive humanos. Todos estes fatores contribuem para o crescente uso do saguí nas pesquisas em Neurociência (NEWMAN et al., 2009).

O Núcleo de Primatologia da UFRN, coordenado e mantido pelo Departamento de Fisiologia, é responsável há vários anos pela manutenção e

reprodução em cativeiro do sagui (Registro IBAMA no. 1/24/92/0039-0). Desde a criação do Núcleo de Primatologia, muitos trabalhos foram produzidos na UFRN, nas áreas de comportamento social, sexual e reprodutivo, ritmos biológicos e neuranatomia, dando suporte ao Programa de pós-graduação em Psicobiologia. Os estudos neuranatômicos iniciados a partir de 1992 com a instalação do Laboratório de Neuranatomia foram primeiramente voltados para a elucidação das bases circadianas dos ritmos biológicos e sistemas visuais (ver, por exemplo, COSTA e BRITTO, 1997; COSTA et al., 1998; 1999; CAVALCANTE et al., 2002; 2005; 2008; PINATO et al., 2007). Recentemente foi concluída uma tese de mestrado, em que foram caracterizados os centros auditivos rombencefálicos no sagui, com um trabalho submetido (SANTOS et al., 2009). Este trabalho pretende dar continuidade à expansão das linhas de pesquisas na direção de estudar os sistemas sensoriais, tendo como foco o sistema vestibular e utilizando o sagui como modelo experimental.

1.5 Justificativa

Defeitos no sistema vestibular causam muitos transtornos aos indivíduos, prejudicando a execução de atividades da vida diária e, conseqüentemente, a qualidade de vida, o que implica na necessidade de um amplo conhecimento deste sistema. Embora sejam registrados muitos trabalhos nessa área, em espécies variadas, ainda detectamos importantes lacunas, em especial em relação aos neurotransmissores envolvidos no processamento neural dos estímulos labirínticos.

Devido à proximidade na escala evolutiva, primatas não humanos são modelos lógicos para estudo dos processamentos neurais relevantes à condição humana. Sendo o sagui um primata de aquisição relativamente fácil em nosso meio, dada a existência do Núcleo de Primatologia da UFRN, é reconhecido como modelo experimental adequado para o estudo a que nos propomos.

Este estudo, além de contribuir para um melhor conhecimento da biologia, ao expandir as informações acerca da neuroquímica do sistema vestibular em um primata, contribuirá para o fornecimento de subsídios para proposição de novas intervenções terapêuticas em humanos.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo geral

Caracterizar, no tronco encefálico do sagui, o complexo nuclear vestibular.

1.6.2 Objetivos específicos

- Delimitar citoarquiteticamente e por imuno-histoquímica para NeuN, os núcleos vestibulares no sagui;
- Caracterizar neuroquimicamente os núcleos vestibulares, a partir da imunoreatividade a glutamato, substância P, acetilcolina e descarboxilase do ácido glutâmico (enzima de síntese de ácido gama-amino-butírico).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Sujeitos

Foram utilizados quatro saguis adultos, fêmeas, provenientes do Núcleo de Primatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Estimou-se a utilização de 04 animais, avaliado como o número mínimo possível para se obter os resultados esperados. Todos os cuidados foram tomados no sentido de evitar dor e sofrimento aos animais durante os procedimentos experimentais, seguindo estritamente as normas estabelecidas pelo National Research Council of the National Academy publicadas no livro “Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research”, conforme recomendação da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) , em cuja página uma versão em formato pdf está disponível gratuitamente – <http://www.sbnec.gov.br/links>. Além disso, o projeto foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA-UFRN), protocolo no. 004/2009.

2.2 Procedimentos

Os animais foram submetidos às etapas de perfusão, remoção do encéfalo, microtomia, colorações e reações imuno-histoquímicas.

a) Perfusão

Os animais foram anestesiados com Ketamina (100 mg/1 ml) e Xilazina (2,3 mg/0,1 ml), ambos por quilo de peso do animal, por via intramuscular, antes de se proceder à perfusão transcardíaca. Abrindo-se a cavidade torácica, através de uma agulha introduzida no ventrículo esquerdo e após promover uma secção no átrio direito, foram impulsionados 300 ml de solução salina a 0,9% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 com heparina (Parinex, Hipolabor, 2ml/1000ml de solução salina), a um fluxo de 100 ml por minuto, com o objetivo de lavar o sistema circulatório. Em seguida, foram impulsionados 700 ml de solução fixadora (paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4). Metade dessa solução fluiu a uma velocidade de 90 ml/min e a outra metade a uma velocidade de 25 ml/min aproximadamente, tendo

todo o fluxo de soluções durado em torno de 30 minutos. As soluções foram impulsionadas pelo leito vascular do animal com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Parmer, Niles, IL).

b) Remoção do encéfalo e microtomia

Em torno de duas horas após a perfusão, o encéfalo (Fig. 2) foi removido da cavidade craniana através da secção de tecidos moles e da osteotomia dos ossos da calota craniana e em seguida armazenado em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, a 4°C, até a realização da microtomia.

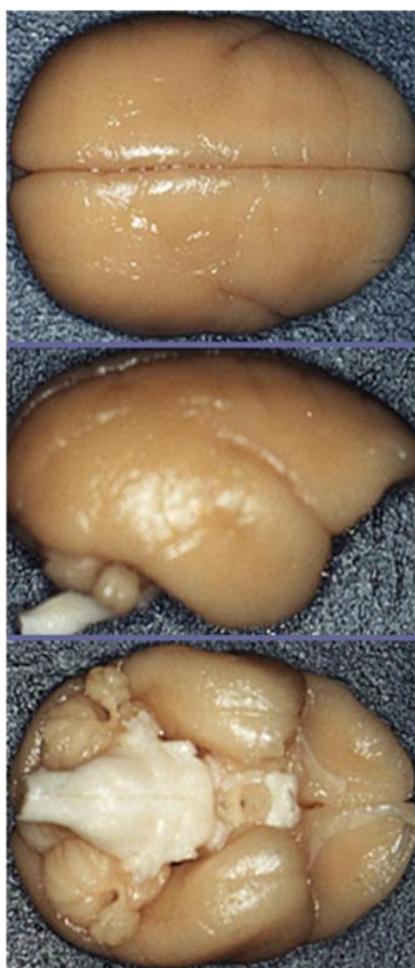


Figura 2. Encéfalo do sagui em vistas superior, lateral e inferior.

Para a microtomia (Fig. 3), o encéfalo foi congelado com gelo seco e seccionado em micrótomo de deslizamento, obtendo-se secções coronais de 30 μm , que foram coletadas em seis compartimentos com tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. A distância entre uma secção e a seguinte no mesmo compartimento era de

aproximadamente 180 μm . As secções foram conservadas em solução anticongelante a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem realizados os processamentos subseqüentes.

Foi feita a microtomia de todo o encéfalo. Neste estudo foram utilizados os cortes de tronco encefálico e os demais cortes serão utilizados em outros estudos desenvolvidos no laboratório.

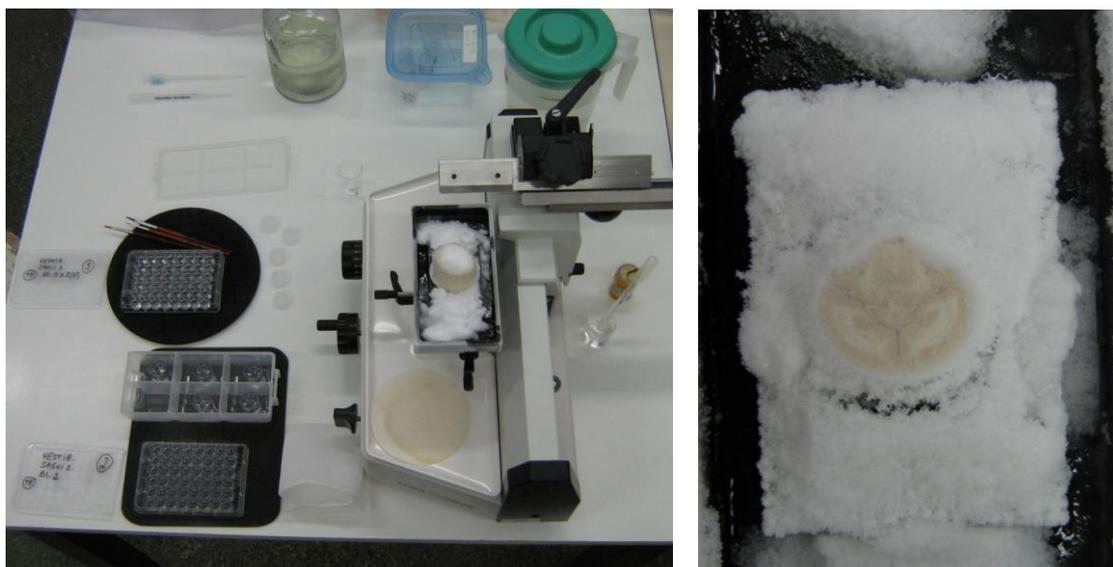


Figura 3. Microtomia do encéfalo do sagui

c) Coloração citoarquitetônica

Os cortes de uma das séries de cada encéfalo foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas e corados pelo método de Nissl, utilizando o corante thionina. Esta técnica tem como finalidade delimitar os grupamentos neuronais e é feita em duas baterias, que serão descritas a seguir.

- Quadro 1 - 1ª bateria (Desidratação e Diafanização):

| ETAPAS | SUBSTÂNCIAS | TEMPO |
|--------|---------------|----------------------------------|
| 01 | Álcool 70 | De 1 hora até no máximo 18 horas |
| 02 | Álcool 95 I | 3 minutos |
| 03 | Álcool 95 II | 3 minutos |
| 04 | Álcool 100 I | 3 minutos |
| 05 | Álcool 100 II | 3 minutos |
| 06 | Xilol I | 3 minutos |
| 07 | Xilol II | 30 minutos |

- Rehidratação (Mesma bateria no sentido inverso):

| ETAPAS | SUBSTÂNCIAS | TEMPO |
|--------|----------------|-----------|
| 01 | Xilol I | 2 minutos |
| 02 | Álcool 100 II | 2 minutos |
| 03 | Álcool 100 I | 2 minutos |
| 04 | Álcool 95 II | 2 minutos |
| 05 | Álcool 95 I | 2 minutos |
| 06 | Álcool 70 | 2 minutos |
| 07 | Álcool 50 | 2 minutos |
| 08 | Água destilada | 2 minutos |

- Coloração Thionina: 20 segundos ou 40 segundos.

- Quadro 2 - 2ª bateria (Desidratação):

| ETAPAS | SUBSTÂNCIAS | TEMPO |
|--------|------------------------------|----------------|
| 01 | Água destilada | 5 segundos |
| 02 | Água destilada | 10 segundos |
| 03 | Álcool 50 | 2 minutos |
| 04 | Álcool 70 | 2 minutos |
| 05 | Álcool 95 I | 2 minutos |
| 06 | Álcool 95 II | 2 minutos |
| 07 | Álcool 95 e ácido acético 1% | 3 a 4 segundos |
| 08 | Álcool 100 I | 2 minutos |
| 09 | Álcool 100 II | 2 minutos |
| 10 | Álcool 100 III | 2 minutos |
| 11 | Xilol I | 2 minutos |
| 12 | Xilol II | 4 minutos |

d) Imuno-histoquímica

As demais séries foram submetidas a técnicas imuno-histoquímica para as seguintes substâncias: (1) Proteína nuclear neuronal específica (NeuN), (2)

Glutamato (Glu), (3) Substância P, (4) Colina acetiltransferase (ChAT) e (5) Descarboxilase do ácido glutâmico (GAD).

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas com os cortes em solução e foram utilizados os anticorpos contra cada uma das substâncias investigadas, utilizando-se o protocolo ABC, conforme descrição a seguir:

1. Os cortes foram submetidos a seis lavagens de 5 minutos cada, em solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, em agitador orbital.

2. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para eliminar as peroxidases endógenas: As secções foram colocadas em solução de H₂O₂ a 0,03% durante 20 minutos, seguido de 4 lavagens em solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, em agitador orbital.

3. As secções foram colocadas em contato com o anticorpo primário diluído em Triton X-100 a 0,4% acrescido de soro normal do animal em que foi obtido o anticorpo secundário, durante 18 a 24 horas, à temperatura ambiente, em rotor.

4. Seguiram-se seis lavagens em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, de 5 minutos cada.

5. Os cortes entraram em contato com a solução contendo o anticorpo secundário diluído (1:1000) em Triton X-100 a 0,4%, durante 90 minutos, à temperatura ambiente, em rotor.

6. Ao final deste período, ocorreram mais seis lavagens de 5 minutos cada, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4.

7. As secções foram colocadas em contato com o complexo avidina-biotina-peroxidase a uma diluição 1:100 em Triton X-100 a 0,4% contendo NaCl, durante 90 minutos.

8. Seguiram-se seis lavagens em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, de 5 minutos cada.

9. Os cortes foram colocados em um meio contendo o cromógeno 3,3', 4,4'- tetrahidrocloreto-diaminobenzidina (DAB-Sigma), acrescido de sulfato de amônia e níquel na concentração de 0,05%.

10. Em seguida foi adicionado ao meio H₂O₂ a 0,03% como substrato para peroxidase.

11. Logo após, seguiram-se novamente seis lavagens, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, de 5 minutos cada.

12. Os cortes foram montados em lâmina de vidro previamente gelatinizadas.

13. Após a secagem, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em solução de tetróxido de ósmio a 0,05% para intensificação da reação. Seguiu-se uma bateria de alcoóis de graduação crescente até o absoluto (desidratação) e depois xilol (diafanização). Então foram montadas as lamínulas sobre os cortes nas lâminas, para serem examinadas ao microscópio óptico, onde foram obtidas imagens digitais das mesmas.

Os anticorpos utilizados com as respectivas diluições e fabricantes são expostos na tabela 1.

Tabela 1 – Anticorpos e soro normal, com nomes dos fabricantes e respectivas diluições, utilizados nas reações imuno-histoquímicas.

| Substância | Anticorpo primário | Anticorpo secundário | Soro normal |
|-------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|
| NeuN | Anti-NeuN obtido em camundongo, Chemicon, 1:1000 | Anti-camundongo obtido em asno, Jackson Labs, 1:1000 | Asno, UFPE, 2% |
| Glu | Anti-Glu obtido em coelho, Sigma, 1:1.000 | Anti-coelho obtido em cabra, Jackson Labs, 1:1.000 | Cabra, UFPE, 2% |
| SP | Anti_SP obtido em cobaia, Peninsula, 1:1.000 | Anti-cobaia obtido em cabra, Jackson Labs, 1:1000 | Cabra, UFPE, 2% |
| ChAT | Anti-ChAT obtido em cobaia, Chemicon, 1:150 | Anti-cobaia obtido em cabra, Jackson Labs, 1:1000 | Cabra, UFPE, 2% |
| GABA/GAD | Anti-GAD obtido em camundongo, Santa Cruz, 1:1.000 | Anti-camundongo obtido em asno, Jackson Labs, 1:1.000 | Asno, UFPE, 2% |

2.3 Análise dos resultados

As lâminas histológicas foram examinadas ao microscópio óptico de campo claro (Olimpus BX41) utilizando as objetivas 2X, 10X e 40X. Imagens digitais de

secções representativas foram capturadas nos aumentos citados através de uma vídeo-câmara digital (Nikon DXM1200) acoplada ao microscópio.

As imagens foram minimamente processadas para brilho e contraste usando Adobe Photoshop 7.0 e organizadas no programa Powerpoint.

Os núcleos vestibulares foram examinados quanto à sua citoarquitetura e quanto ao seu conteúdo em substâncias neuroativas descritas anteriormente e foi feita uma análise qualitativa.

Os resultados foram documentados através de fotomicrografias digitais e esquemas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA BRAIN RESEARCH

**OS NÚCLEOS VESTIBULARES DO SAGUI (*Callithrix jacchus*):
CARACTERIZAÇÃO CITOARQUITETÔNICA E NEUROQUÍMICA.**

Adriana Jussara de Oliveira Brandão^{1,2*}; Twyla Barros de Sousa²; Francimar Araújo dos Santos²; Joacil Germano Soares²; Ruthnaldo Rodrigues Melo de Lima²; André Luiz Bezerra de Pontes²; Jeferson de Souza Cavalcante²; Judney Cley Cavalcante²; Expedito Silva do Nascimento Júnior²; Miriam Stela Maris de Oliveira Costa².

1Professora da Faculdade Natalense para o Desenvolvimento do Rio Grande do Norte (FARN); Aluna do curso de pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

2Laboratório de Neuranatomia, Departamento de Morfologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

*Autor para correspondência: Fone: 55 84 3215 3431

e-mail: adrianajbrandao@bol.com.br

Resumo

A técnica de Nissl, complementada pela imuno-histoquímica para NeuN, permitiu delinear os núcleos vestibulares superior, lateral, medial e inferior (ou descendente) no encéfalo do sagui (*Callithrix jacchus*). Neurônios e terminais imunorreativos a Glutamato e colina acetiltransferase e apenas terminais imunorreativos a substância P e descarboxilase do ácido glutâmico foram vistos em todos os núcleos, embora em densidade variável. Este trabalho confirma a presença nos núcleos vestibulares do sagui, de glutamato e substância P em terminais, provavelmente provenientes dos neurônios de primeira ordem do gânglio vestibular, e de GABA em terminais provavelmente provenientes das células de Purkinge do cerebelo. Neurônios de segunda ordem dos núcleos vestibulares parecem usar glutamato e acetilcolina como neurotransmissores, a julgar pela sua expressiva presença em pericários destes núcleos no sagui, como relatado em outras espécies.

Section: 5. Sensory and motor systems

Palavras-chave: aparelho vestibular, neurotransmissores, neurofarmacologia, tronco encefálico, sagüi, técnicas imuno-histoquímicas.

Agradecimentos: Este estudo teve o suporte financeiro proveniente de Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

1. Introdução

Para os vertebrados, manter o equilíbrio corporal contra o campo gravitacional e ser capaz de orientar-se no ambiente são aspectos fundamentais para a sobrevivência. Isto implica em permanente controle da posição da cabeça e do tronco no espaço, bem como da cabeça em relação ao corpo. Três modalidades sensoriais estão fortemente envolvidas nestes processos: visual, proprioceptiva e vestibular (Gdowski e McCrea, 1999; Vidal e Sans, 2004; Angelaki e Cullen, 2008).

O sistema vestibular é formado pelos órgãos do equilíbrio da orelha interna (ou labirinto) e suas projeções para o sistema nervoso central. Os órgãos vestibulares são dispostos como a imagem em espelho um do outro, de cada lado da cabeça. Três canais semicirculares percebem os movimentos rotacionais e dois órgãos otolíticos (sáculo e utrículo) percebem acelerações lineares (força da gravidade) e as inclinações da cabeça, contribuindo assim para o sentido do equilíbrio (Angelaki e Cullen, 2008). As fibras vestibulares primárias têm origem de neurônios bipolares situados no gânglio vestibular da orelha interna. Os processos periféricos das células bipolares conectam-se aos receptores vestibulares na periferia, enquanto os processos centrais, formando a porção vestibular do nervo vestibulo-coclear (VIII par), ou simplesmente nervo vestibular, chegam ao sistema nervoso central em um complexo nuclear, os chamados núcleos vestibulares (Barmack, 2003; Vidal e Sans, 2004). O complexo vestibular fica situado na porção dorsal do bulbo e da ponte, lateralmente ao sulco limitante, estendendo-se do nível do pedúnculo cerebelar superior (braço conjuntivo) ao pedúnculo cerebelar inferior (corpo restiforme). É composto de 4 núcleos vestibulares: superior, lateral, medial e inferior (ou descendente, ou espinal) (Barmack, 2003; Vidal e Sans, 2004).

Os neurotransmissores envolvidos na neurotransmissão e neuromodulação dos neurônios vestibulares centrais são convencionalmente classificados em três grupos, a saber: Os aminoácidos excitatórios – glutamato (Glu) e aspartato – e inibitórios – ácido gama-amino-butírico (GABA) e glicina, mediadores de eventos sinápticos rápidos; as cinco monoaminas (histamina, dopamina, serotonina, noradrenalina e adrenalina) e a acetilcolina (Ach); e os peptídeos neuroativos, tais como a substância P (SP) e outras taquicinininas (de Waele et al., 1995; Barmack, 2003; Vidal e Sans, 2004).

As disfunções do sistema vestibular acarretam sensações desagradáveis, tais como tontura, vertigem e perda de equilíbrio, as quais causam impacto negativo na habilidade de um indivíduo para executar rotinas cotidianas e viver independentemente (Delisa e Gans, 2002). No estudo do sistema vestibular, além de considerar as propriedades de membrana intrínsecas dos neurônios, é importante reconhecer a natureza dos diferentes neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos nas suas circuitarias, que podem estar na base destes problemas. É inegável que um conhecimento crescente da neuroquímica do sistema vestibular fornecerá melhores subsídios para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas adequadas no futuro. Assim é que este trabalho foi empreendido com o objetivo de estabelecer a caracterização citoarquitetônica e neuroquímica dos núcleos vestibulares em um pequeno primata do Novo Mundo, o sagui (*Callithrix jacchus*). O sagui é nativo das florestas equatoriais do Brasil, mais encontrado em regiões de Mata Atlântica, existindo em abundância no Rio Grande do Norte. Trata-se de um animal de pequeno porte, medindo em média 20 cm de comprimento de corpo e aproximadamente 25 cm de cauda e peso corporal de menos de 500 g quando adultos (Rylands, 1996), sendo animais de hábitos diurnos (Menezes et al., 1997; Azevedo et al., 1997).

2. Resultados

Neste estudo, os núcleos vestibulares foram analisados em secções coronais do encéfalo do sagui, em três níveis – rostral, médio e caudal. Deste complexo serão descritas em sequência, a citoarquitetura e a caracterização imuno-histoquímica para Glu, SP, ChAT e GAD.

Citoarquitetura

Em secções coronais do encéfalo do sagui coradas pelo método de Nissl ou imunocoradas para NeuN, os núcleos vestibulares foram visualizados em secções desde o nível médio da ponte até o bulbo na porção aberta. Citoarquiteticamente foi possível delimitar 4 núcleos, analisando-se os níveis rostral, médio e caudal. Rostralmente, o núcleo vestibular superior (VS) é o primeiro a aparecer, ventralmente à porção caudal do núcleo parabraquial medial (não mostrado). Em seguida, aparece novamente o VS, ventralmente ao pedúnculo cerebelar superior e,

ventralmente a este, o núcleo vestibular lateral (VL), caracterizado por um aglomerado de células grandes e o núcleo vestibular medial (VM), situado medialmente, tendo medialmente a ele o núcleo do nervo abducente (Fig. 1 A e B). No nível médio, os 4 núcleos vestibulares estão presentes, quando surge o núcleo vestibular descendente (VD), ventralmente ao VL (Fig. 1 C e D). No nível caudal, bulbar, apenas o VD e o VM estão presentes, situados no contorno dorsal do bulbo, tendo ventromedialmente ao VM o núcleo do trato solitário, e ventrolateralmente ao VD o núcleo cuneiforme acessório (Fig. 1 E e F).

Glutamato (Glu)

Pericários e terminais imunorreativos a Glu foram visualizados nos 4 núcleos vestibulares, sendo mais intensa no VL (Fig. 2 C e D), seguido do VS (Fig. 2 A e B) e VD (Fig. 2 E e F), e menos acentuada no VM (não mostrado).

Substância P (SP)

A imuno-histoquímica para SP evidenciou apenas fibras e terminais densamente marcados no VS (Fig. 3 A e B), seguido do VD (Fig. 3 E e F) e VL (Fig. 3 C e D) e apenas fracamente marcados em VM (não mostrado).

Colina acetil transferase (ChAT)

A imuno-histoquímica para ChAT evidenciou principalmente corpos de neurônios muito bem marcados em todos os núcleos – VS, VL, VM e VD, com maior intensidade no VM (Fig. 4 A e B), seguido do VD (Fig. 4 E e F) e VL (Fig. 4 C e D). O VS continha comparativamente menor quantidade de neurônios marcados (não mostrado). Varicosidades indicativas de terminais marcados estavam também presentes em todos os núcleos.

Descarboxilase do ácido glutâmico (GAD)

Terminais imunorreativos a GAD foram identificados em todos os núcleos vestibulares – VS, VL, VM e VD, sendo marcados em ordem decrescente de intensidade o VS (Fig. 5 A e B), o VD (Fig. 5 E e F) e VL (Fig. 5 C e B). O VM também exibia escassos terminais marcados (não mostrado).

3. Discussão

Neste trabalho, a imuno-histoquímica para NeuN foi utilizada em conjunto com o método de Nissl, a fim de auxiliar a visualização e delimitação dos núcleos do sistema vestibular.

A proteína nuclear neurônio-específica (NeuN) é expressa na maioria dos núcleos de neurônios maduros do sistema nervoso central e periférico de vertebrados. A imunorreatividade a NeuN não funciona como marcador em algumas células, tais como células de Purkinge do cerebelo, células mitrais do bulbo olfatório e fotorreceptores da retina (Mullen et al., 1992) e substância negra pars reticulata (Kumar e Buckmaster, 2007) e não é fidedigna para contagem de células dopaminérgicas na substância negra pars compacta (Cannon e Greenamyre, 2009). Apesar disso, vem sendo utilizada como complemento às técnicas citoarquitetônicas, às vezes considerada superior às técnicas de Nissl pelo fato de que todas as células gliais são negativas para NeuN (Mullen et al., 1992; Gittins et al., 2004). Assim, a combinação das técnicas permitiu delimitar os 4 núcleos vestibulares do sagüi – VS, VL, VM e VD. Os núcleos vestibulares no sagüi são apontados em atlas estereotáticos (Stephan et al., 1980; Newman et al., 2009), no entanto, no nosso trabalho acrescentamos uma delimitação mais precisa, com o auxílio da imunocoloração por NeuN.

A presença de 4 núcleos – vestibular superior, vestibular lateral, vestibular medial e vestibular descendente – constituindo o complexo vestibular, localizado na porção dorsal da ponte e porção aberta do bulbo, em relação com o assoalho do quarto ventrículo, é uma constante em mamíferos (Barmack, 2003). No rato, o complexo vestibular é limitado rostralmente pelo pedúnculo cerebelar superior, lateralmente pelo pedúnculo cerebelar inferior, ventralmente pelo núcleo e trato espinal do nervo trigêmeo, e medialmente pelo quarto ventrículo e formação reticular (Vidal e Sans, 2004; Paxinos e Watson, 2007).

Os limites dos núcleos vestibulares individuais são difíceis de distinguir baseado em características citológicas. No entanto, há algumas particularidades. As células gigantes do VL estão concentradas em sua parte dorso-caudal e tornam mais fácil sua subdivisão. A parte rostro-ventral do VL é composta por células de tamanho intermediário. Os limites do VS são difíceis de reconhecer citologicamente, mas ele apresenta uma distribuição mais uniforme de células de tamanho médio. Os limites

dos outros núcleos vestibulares são ainda menos distintos. O VM contém uma grande variedade de tipos celulares e é, em volume total e número de células, o maior núcleo vestibular. O VM é frequentemente subdividido em parvocelular (agrupamento dorsal de neurônios pequenos) e magnocelular (agrupamento ventral de neurônios maiores). O VD é atravessado por feixes de fibras longitudinais que dão ao núcleo a aparência de ser menos densamente povoado por neurônios (Barmack, 2003).

O papel dos neurônios vestibulares centrais é relativamente bem conhecido. Eles elaboram uma representação tridimensional dos movimentos da cabeça no espaço, baseada na percepção de movimento auto-gerado pelo indivíduo e na representação interna das sinergias motoras que estabilizam o olhar e a postura (De Waele et al., 1995). As patologias vestibulares, como por exemplo, a vertigem, a Síndrome de Meniere e as doenças causadas pelo movimento (por transporte aéreo, marítimo ou terrestre), são problemas frequentes. É também muito provável, que pelo menos em alguns casos, as alterações do sistema vestibular sejam a causa de quedas em idosos, o que frequentemente tem conseqüências catastróficas (Horak, 2006). Ainda há muitas lacunas a respeito desta área de estudo e o aumento do conhecimento da neuroquímica do sistema vestibular promoverá oportunidades de intervenções terapêuticas mais efetivas no futuro.

A seguir, discutiremos os nossos resultados, em relação com o que se conhece da literatura a respeito dos principais neurotransmissores envolvidos na circuitaria neural do sistema vestibular.

Uma série de evidências indica que Glu atua como neurotransmissor dos neurônios do gânglio vestibular. Assim, neurônios ganglionares são marcados por anticorpos contra Glu ou enzimas envolvidas no seu metabolismo. Além disso, sítios ligantes de Glu foram identificados em todos os neurônios dos núcleos vestibulares, mais densamente em VM e VD (De Waele et al., 1994). Um estudo por microdiálise in vivo no gato confirma a liberação de Glu no VM após estimulação do nervo vestibular (Yamanaka et al., 1997). Outro estudo em rato mostrou que neurônios do VM respondem à estimulação otolítica por inclinação lateral da cabeça e que essa resposta é mediada por Glu e Ach (Takeshita et al., 1999). Glu parece ser também o neurotransmissor liberado por outras fontes de aferências aos núcleos vestibulares, incluindo as fibras espinais e vias comissurais (Vidal e Sans, 2004). Por outro lado, estudos farmacológicos identificam Glu como neurotransmissor de neurônios dos

núcleos vestibulares nas vias vestibulo-oculares e vestibulo-espinais (De Waele et al., 1995; Vidal e Sans, 2004). Coerente com isso, pericários e terminais imunorreativos a Glu foram visualizados nos 4 núcleos vestibulares no sagui, sendo mais intensa no VL e menos acentuada no VM, diferindo do padrão de outras espécies.

Grande número de fibras e terminais imunorreativos a SP foram identificados nos núcleos vestibulares, particularmente na parte caudal do VM e no VD no rato, gato e macaco (de Waele et al., 1995). Nossos dados no sagui diferem quanto à localização, visto que fibras e terminais positivos para SP foram encontrados no VS, seguido do VD e VL e apenas escassamente em VM. Estudos imuno-histoquímicos em coelho, cobaia, gato e macaco de cheiro mostraram que parte dos aferentes vestibulares primários, é imunorreativa à SP (Ylikoski et al., 1984; Usami et al., 1991; Carpenter et al., 1990), sugerindo que a SP está colocalizada com Glu no gânglio vestibular. O significado funcional tanto do Glu isolado quanto colocalizado com a SP, nos neurônios vestibulares de primeira ordem, necessita esclarecimentos. Em cobaia, foi visto que a SP despolariza neurônios do VM por ativação de receptores pós-sinápticos atípicos (Vibert et al., 1996).

Terminais acetilcolinesterase (AChE) positivos, bem como receptores muscarínicos, distribuídos difusamente em todo complexo nuclear vestibular, além de poucos neurônios marcados para AChE e colina acetil transferase (ChAT) restritos ao VM, foram relatados no rato (Zanni et al., 1995). No gato a distribuição de Ach, identificada por imunoreatividade a ChAT foi encontrada em neurônios e terminais, principalmente na parte caudal do VM e no VD e em menor extensão na parte medial do VS (Tighilet and Lacour, 1998). Muitos desses neurônios colinérgicos projetam-se bilateralmente para o nóculo-úvula cerebelar, onde terminam como fibras musgosas (Barmack et al., 1992; Barmack, 2003). Células imunorreativas a ChAT foram detectadas em porções caudais do VM e dorsais do VD em macaco de cheiro, em quantidade comparativamente maior do que o encontrado em rato (Carpenter et al., 1987). Concordando com o estudo acima, no presente estudo em sagui, todos os núcleos vestibulares exibiram pericários fortemente imuno-corados para ChAT, indicando a presença de Ach, principalmente em VM e VD. Escassos terminais imunorreativos a ChAT também estavam presentes em todos os núcleos. Embora Ach tenha sido descartada como neurotransmissor dos aferentes vestibulares primários para os neurônios dos núcleos vestibulares (Raymond et al.,

1988), posteriormente esta substância foi relacionada, juntamente com o Glu à transmissão de informação otolítica para os neurônios do VM em rato (Takeshita et al., 1999). Também se admite que o sistema colinérgico central desempenhe um papel crucial no processamento da informação aferente sensorial nos núcleos vestibulares. Além disso, esse sistema tem sido relacionado aos sintomas vestibulares das doenças causadas pelo movimento em humanos (Kohl et al., 1983; Yates et al., 1998; Shupak e Gordon, 2006). Existem evidências comportamentais, com suporte de estudos eletrofisiológicos, do controle colinérgico sobre a função vestibular central. Neurônios do VL e do VM são excitados por aplicação sistêmica ou microinjetada de Ach e são inibidos por AchE. Há indicações de que a transmissão sináptica entre os neurônios vestibulares primários e os de segunda ordem é facilitada por agonistas colinérgicos e dificultada por antagonistas colinérgicos (De Waele et al., 1995). Em vários estudos, também foi mensurada a atividade de ChAT nos núcleos vestibulares e observou-se que todos os núcleos vestibulares apresentam atividade significativa desta enzima, com altos níveis no VM (De Waele et al., 1995).

Fibras e terminais, além de pericários, contendo GABA em todos os núcleos vestibulares foi demonstrada com técnicas imuno-histoquímicas ou hibridização *in situ*, para GABA ou GAD, em várias espécies, como rato (Nomura et al., 1984; De Waele et al., 1994; Zanni et al., 1995), cobaia (Kumoi et al., 1987), coelho (Blessing et al., 1987) e gato (Walberg et al., 1990; Tighilet e Lacour, 2001).

VM, VS e VD recebem projeções do flóculo, nóculo e úvula cerebelares (Büttner-Enever, 1985), muito provavelmente de natureza GABAérgica, considerando que as células de Purkinge do cerebelo usam GABA como seu principal neuromediador (Sato e Kawasaki, 1991; de Zeeuw e Berrebi, 1996). O complexo olivar inferior também se projeta para neurônios vestibulares, principalmente do VL (Matsuoka et al., 1983). Além disso, uma via comissural liga os dois núcleos vestibulares em mamíferos, através de interneurônios tipo II, de natureza GABAérgica ou glicinérgica (Precht et al., 1973; Furuya et al., 1991).

Neste trabalho, foram visualizados terminais imunorreativos a GAD, portanto indicativos de serem GABAérgicos, em todos os núcleos vestibulares do sagui, mais acentuadamente em VS e VD, entretanto não foram visualizados pericários imunocorados em nenhum núcleo. As diferenças podem refletir variações individuais, relacionadas à postura do animal, ou serem decorrentes de diferenças

metodológicas nos trabalhos. É provável que seja necessário o uso de citotóxicos para permitir a visualização de neurônios GABA ou GAD positivos.

Este trabalho representa um ponto de partida para estudos funcionais do sistema vestibular em um primata, na direção de fornecer subsídios para a elucidação dos problemas que afetam com grande frequência este sistema e embasar o desenvolvimento de terapêuticas específicas.

4. Procedimentos experimentais

Foram utilizados quatro saguis adultos, fêmeas, pesando entre 295 g e 427 g, provenientes do Núcleo de Primatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Todos os cuidados foram tomados no sentido de evitar dor e sofrimento aos animais durante os procedimentos experimentais, seguindo estritamente as normas estabelecidas pelo National Research Council of the National Academy publicadas no livro “Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research”, conforme recomendação da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), em cuja página uma versão em formato pdf está disponível gratuitamente – <http://www.sbnec.gov.br/links>. Além disso, o projeto foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA-UFRN), protocolo no. 004/2009.

Os animais foram anestesiados com Ketamina (100 mg/1 ml) e Xilazina (2,3 mg/0,1 ml), ambos por quilo de peso do animal, por via intramuscular e submetidos a perfusão transcardíaca. Foram impulsionados 300 ml de solução salina a 0,9% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 com heparina (Parinex, Hipolabor, 2ml/1000ml de solução salina), seguido de 700 ml de solução fixadora (paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4), com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Parmer, Niles, IL).

O encéfalo foi removido da cavidade craniana e em seguida armazenado em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, a 4°C, até a realização da microtomia. O encéfalo foi congelado com gelo seco e seccionado em micrótomo de deslizamento, obtendo-se secções coronais de 30 µm, que foram distribuídas em 6 séries. As secções foram conservadas em solução anticongelante a -20 °C até serem realizados os processamentos subseqüentes.

Foi feita a microtomia de todo o encéfalo. Neste estudo foram utilizados os cortes de tronco encefálico e os demais cortes serão utilizados em outros estudos desenvolvidos no laboratório.

Os cortes de uma das séries de cada encéfalo foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas e corados pelo método de Nissl, utilizando o corante thionina, tendo como finalidade delimitar os grupamentos neuronais. Os cortes de uma outra série foram submetidos a reação imuno-histoquímica para a proteína nuclear neuronal específica (NeuN), para ser usado como auxiliar na demarcação das estruturas. As secções das demais séries foram submetidas à imuno-histoquímica para evidenciar a expressão das seguintes substâncias neuroativas: Glutamato (Glu), Ácido gama-amino-butírico (GABA), Substância P (SP), e Colina acetiltransferase (ChAT).

Todos os procedimentos imuno-histoquímicos foram realizados com as secções em solução à temperatura ambiente. As secções foram incubadas no anticorpo primário e diluídas em Triton X-100 a 0,4% em solução de tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 (PBS), às seguintes diluições: anti-NeuN obtido em camundongo (Chemicon, 1:1000), anti-Glu obtido em coelho (Sigma, 1:1000), anti-GAD obtido em camundongo (Santa Cruz, 1:1000), anti-SP obtido em cobaia (Peninsula, 1:1000), anti-ChAT obtido em cobaia (Chemicon, 1:150), com a adição de soro normal a 2% do animal no qual o anticorpo secundário foi obtido, por 18 a 24 horas. As secções foram colocadas em contato com o anticorpo secundário correspondente (todos do Jackson Lab) à diluição de 1:1000, durante 90 minutos. As secções foram subsequentemente incubadas com solução de avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite kit, Vector Labs., Burlingame, CA, USA) por 90 minutos. Em seguida foram submetidas à reação de atividade da peroxidase em uma solução de diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB, Sigma, St Louis, MO, USA) e peróxido de hidrogênio 0,03% em PBS. As secções foram lavadas com PBS (5 x 5 min) entre uma etapa e outra e ao final do procedimento. Os cortes foram montados em lâmina de vidro previamente gelatinizadas. Após a secagem, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em solução de tetróxido de ósmio a 0,05% para intensificação da reação. Seguiu-se uma bateria de álcoois de graduação crescente até o absoluto (desidratação) e depois xilol (diafanização). Então foram montadas as lamínulas sobre os cortes nas lâminas, para serem examinadas ao microscópio óptico. As lâminas histológicas foram examinadas ao microscópio óptico de campo claro (Olympus BX41). Imagens digitais de secções representativas foram capturadas

através de uma vídeo-câmera digital (Nikon DXM1200) acoplada ao microscópio. As imagens foram minimamente processadas para brilho e contraste usando Adobe Photoshop 7.0.

Os núcleos vestibulares foram examinados quanto à sua citoarquitetura e quanto ao seu conteúdo em substâncias neuroativas e foi feita uma análise qualitativa.

Referências

- Angelaki, D. E., Cullen, K. E., 2008. Vestibular system: The many facets of a multimodal sense. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 125–150.
- Azevedo, C. V. M., Menezes, A. A. L., Queiroz, J.W., Moreira, L. F. S., 1997. Circadian and ultradian periodicities of grooming behavior in family groups of common marmosets (*Callithrix jacchus*) in captivity. *Biol. Rhythm Res.* 27, 374-385.
- Barmack, N. H., 2003. Central vestibular system: vestibular nuclei and posterior cerebellum. *Brain Res. Bull.* 60, 511–541.
- Barmack, N. H., Baughman R. W., Eckenstein, F. P. Shojaku, H., 1992. Secondary vestibular cholinergic projection to the cerebellum of rabbit and rat as revealed by choline acetyltransferase immunohistochemistry, retrograde and orthograde tracers. *J. Comp. Neurol.* 317, 250-270.
- Blessing, W. W., Heger, S. C., Oertel, W. H., 1987. Vestibular pathway in rabbit includes GABA-synthesizing neurons. *Neurosci. Lett.* 80, 158-162.
- Büttner-Ennever, J. A., Patterns of connectivity in the vestibular nuclei. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 363-378.
- Cannon, J. R., Greenamyre, J. T., 2009. NeuN is not a reliable marker of dopamine neurons in rat substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 464, 14-17.
- Carpenter, M. B., Chang, L., Pereira, A. B., Hersh, L. B., 1987. Comparisons of the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in the vestibular nuclei of the monkey and rat. *Brain Res.* 418, 403-408.
- Carpenter, M. B., Huang, Y., Pereira, A. B., Hersh, L. B., 1990. Immunocytochemical features of the vestibular nuclei in the monkey and cat. *J. Hirnforsch.* 31, 583-599.
- Delisa, J. A., Gans, B. M., 2002, *Tratado de Medicina de Reabilitação*. Manole, São Paulo.
- De Waele, C., Abitbol, M., Chat, M., Menini, C., Mallet, J., Vidal, P. P., 1994. Distribution of glutamatergic receptors and GAD mRNA-containing neurons in the vestibular nuclei of normal and hemilabyrinthectomized rats. *Eur. J. Neurosci.* 6, 565-576.
- De Waele, C., Mühlethaler, M., Vidal, P. P., 1995. Neurochemistry of the central vestibular pathways. *Brain Res.* 20, 24-46.
- De Zeew, C. I., Berrebi, A. S., 1996. Individual Purkinje cell axons terminate on both inhibitory and excitatory neurons in the cerebellar and vestibular nuclei. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 781, 607-610.

Furuya, N., Yabe, T., Koizumi, T., 1991. Neurotransmitters regulating vestibular commissural inhibition in the cat. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 481, 205-208.

Gdowski, G. T., McCrea, R. A., 1999. Integration of vestibular and head movement signals in the vestibular nuclei during whole-body rotation. *J. Neurophysiol.* 82, 436-446.

Gittins, R., Harrison, P. J., 2004. Neuronal density, size and shape in the human anterior cingulate cortex: a comparison of Nissl and NeuN staining. *Brain Res. Bull.* 63, 155-160.

Horak, F. B., 2006. Postural orientation and equilibrium: what do we need to know about neural control of balance to prevent falls? *Age and Ageing* 35-S2, ii7-ii11.

Kohl, R. L., Homick, J. L., 1983. Motion sickness, a modulatory role of the central cholinergic nervous system. *Neurosci. Behav. Rev.* 7, 73-85.

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

Kumoi, K., Saito, N., Tanaka, C., 1987. Immunohistochemical localization of gamma-aminobutyric acid and aspartate-containing neurons in the guinea pig vestibular nuclei. *Brain Res.* 416, 22-33.

Matsuoka, I., Ito, J., Sasa, M., Takaori, S., 1983. Possible neurotransmitter involved in excitatory and inhibitory effects from inferior olive to contralateral lateral vestibular nucleus. *Adv. Otorhinolaryngol.* 30, 58-63.

Menezes, A. A. L., Moreira, L.F.S., Menna-Barreto, L. S., 1997. Ontogeny of the locomotor activity rhythm in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Biol. Rhythm Res.* 27, 319-328.

Mullen, R. J., Buck, C. R., Smith, A. M., 1992. NeuN, a neuronal specific protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211.

Newman, J. D., Kenkel, W. M., Aronoff, E. C., Bock, N. A., Zametkin, M. R., Silva, A. C., 2009. A combined histological and MRI brain atlas of the common marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *Brain Res. Rev.* 62, 1-18.

Nomura, I., Senba, E., Kubo, T., Shiraishi, T., Matsunaga, T., Tohyama, M., Shiotani, Y., Wu, J. Y., 1984. *Brain Res.* 311, 109-118.

Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Elsevier, Amsterdam.

Precht, W., Schwindt, P. C., Baker, R., 1973. Removal of vestibular commissural inhibition by antagonists of GABA and glycine. *Brain Res.* 62, 222-226.

- Raymond, J., Dememes, D., Nieoullon, A., 1988. Neurotransmitters in vestibular pathways. In Vestibulospinal control of posture and locomotion. Progress in Brain Research, vol. 76, O. Pompeiano and J. H. J. Allum, ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 29-
- Rylands, A. B., 1996. Habitat and the evolution of social and reproductive behavior in Callitrichidae. Am. J. Primatol. 38, 5-18.
- Sato, T., Kawasaki, T., 1991. Identification of the Purkinje cell/climbing fiber zone and its target neurons responsible for eye movement control by the cerebellar flocculus. Brain Res. Rev. 16, 39-64.
- Shupak, A., Gordon, C. R., 2006. Motion sickness: Advances in pathogenesis, prediction, prevention, and treatment. Aviat. Space Environ. Med. 77, 1213-1223.
- Stephan, H., Baron, G., Schwerdtfeger, W. K., 1980. The Brain of the Common Marmoset (*Callithrix jacchus jacchus*). Springer-Verlag, Berlin.
- Takehita, S. T., Sasa, M., Ishihara, K., Matsubayashi, H., Yajin, K., Okada, M., Izumi, R., Arita, K., Kkurusu, K., 1999. Cholinergic and glutamatergic transmission in medial vestibular nucleus neurons responding to lateral roll tilt in rats. Brain Res. 840, 99-105.
- Tighilet, B., Lacour, M., 1998. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the vestibular nuclei of normal and unilateral vestibular neurectomized cats. Eur. J. Neurosci. 10, 3115-3126.
- Tighilet, B., Lacour, M., 2001. Gamma amino butyric acid (GABA) immunoreactivity in the vestibular nuclei of normal and unilateral vestibular neurectomized cats. Eur. J. Neurosci. 13, 2255-2267.
- Usami, S. I., Hozawa, J., Tazawa, M., Jin, H., Matsubara, A., Fujita, S., 1991. Localization of substance P-like immunoreactivity in guinea pig vestibular endorgans and the vestibular ganglion. Brain Res. 555, 153-158.
- Vibert, N., Serafin, M., Vidal, P. -P., Mühlethaler, M., 1996. Effects of substance P on medial vestibular nucleus neurons guinea-pig brainstem slices. Eur. J. Neurosci. 8, 1030-1036.
- Vidal, P.-P., Sans, A., 2004. Vestibular system. In The rat nervous system, G. Paxinos, ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 965-996.
- Walberg, F., Ottersen, O. P., Rinvik, E., 1990. GABA, glycine, aspartate, glutamate and taurine in the vestibular nuclei an immunocytochemical investigation in the cat. Exp. Brain Res. 79, 547-563.

Yamanaka, T., Sasa, M., Matsunaga, T., 1997. Glutamate as a primary afferent neurotransmitter in the medial vestibular nucleus as detected by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 762, 243-246.

Yates, B. J., Miller, A. D., Lucot, J. B. 1998. Physiological basis and pharmacology of motion sickness: An update. *Brain Res. Bull.* 47, 395-406.

Ylikoski, J., Eränkö, L., Paivarinta, H., 1984. Substance P-like immunoreactivity in the rabbit inner ear. *J. Laryngol. Otol.* 98, 759-765.

Zanni, M., Giardino, L., Toschi, L., Galetti, G., Calzà, L., 1995. Distribution of neurotransmitters, neuropeptides, and receptors in the vestibular nuclei. *Brain Res. Bull.* 36, 443-452.

Legendas das figuras

Figura 1. Fotomicrografias de secções coronais coradas pela técnica de Nissl em paralelo com secções imuno-coradas para NeuN, em nível pontobulbar, com a delimitação dos núcleos vestibulares. VM = Núcleo vestibular medial, VS = núcleo vestibular superior, VL = Núcleo vestibular lateral, VD = Núcleo vestibular descendente, VI = Núcleo do nervo abducente, Pr = Núcleo prepósito, SpV = Núcleo espinal trigeminal, tsV = Trato espinal do nervo trigêmeo, A = Núcleo ambíguo, C = Núcleos cocleares, p = Pirâmide, Sol = Núcleo do trato solitário, X = Núcleo motor dorsal do vago, XII = Núcleo do nervo hipoglosso, RL = Núcleo reticular lateral, RV = Núcleo reticular ventral. Barra: 1 mm para todas as secções.

Figura 2. Expressão imuno-histoquímica de Glutamato em pericários em (A) Núcleo vestibular superior, correspondendo ao nível da figura 1A; (B) Ampliação da caixa em A; (C) Núcleo vestibular lateral, correspondendo ao nível da figura 1A; (D) Ampliação da caixa em C; (E) Núcleo vestibular descendente, correspondendo ao nível da figura 1E; (F) Ampliação da caixa em E. Barra: 170 μm em A, C, E; 40 μm em B, D, F.

Figura 3. Expressão imuno-histoquímica de Substância P em terminais em (A) Núcleo vestibular superior, correspondendo ao nível da figura 1A; (B) Ampliação da caixa em A; (C) Núcleo vestibular lateral, correspondendo ao nível da figura 1A; (D) Ampliação da caixa em C; (E) Núcleo vestibular descendente, correspondendo ao nível da figura 1E; (F) Ampliação da caixa em E. Barra: 170 μm em A, C, E; 40 μm em B, D, F.

Figura 4. Expressão imuno-histoquímica de ChAT em pericários em (A) Núcleo vestibular medial, correspondendo ao nível da figura 1A; (B) Ampliação da caixa em A; (C) Núcleo vestibular lateral, correspondendo ao nível da figura 1C; (D) Ampliação da caixa em C; (E) Núcleo vestibular descendente, correspondendo ao nível da figura 1E; (F) Ampliação da caixa em E. Barra: 170 μm em A, C, E; 40 μm em B, D, F.

Figura 5. Expressão imuno-histoquímica de GAD em terminais em (A) Núcleo vestibular superior, correspondendo ao nível da figura 1A; (B) Ampliação da caixa em A; (C) Núcleo vestibular lateral, correspondendo ao nível da figura 1C; (D)

Ampliação da caixa em C; (E) Núcleo vestibular descendente, correspondendo ao nível da figura 1E. Barra: 170 μm em A, C, E; 40 μm em B, D, F.

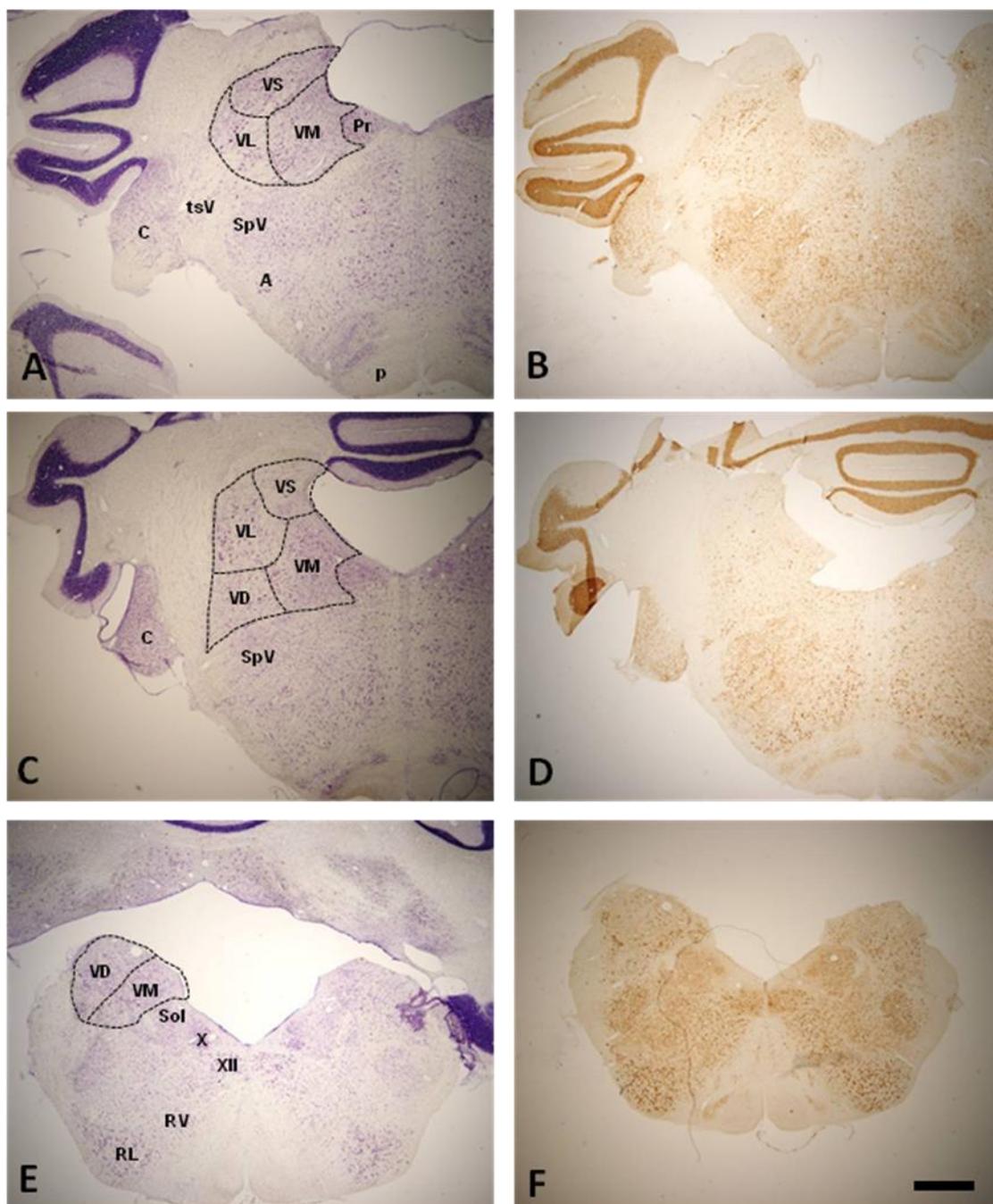


Figura 1. Fotomicrografias de secções coronais coradas pela técnica de Nissl em paralelo com secções imuno-coradas para NeuN, em nível pontobulbar, com a delimitação dos núcleos vestibulares. VM = Núcleo vestibular medial, VS = Núcleo vestibular superior, VL = Núcleo vestibular lateral, VD = Núcleo vestibular descendente, Pr = Núcleo prepósito, SpV = Núcleo espinal trigeminal, tsV = Trato espinal do nervo trigêmeo, A = Núcleo ambíguo, C = Núcleos cocleares, p = Pirâmide, Sol = Núcleo solitário, X = Núcleo dorsal motor do vago, XII = Núcleo do hipoglossos, RL = Núcleo reticular lateral, RV = Núcleo reticular ventral. Barra: 1 mm para todas as secções.

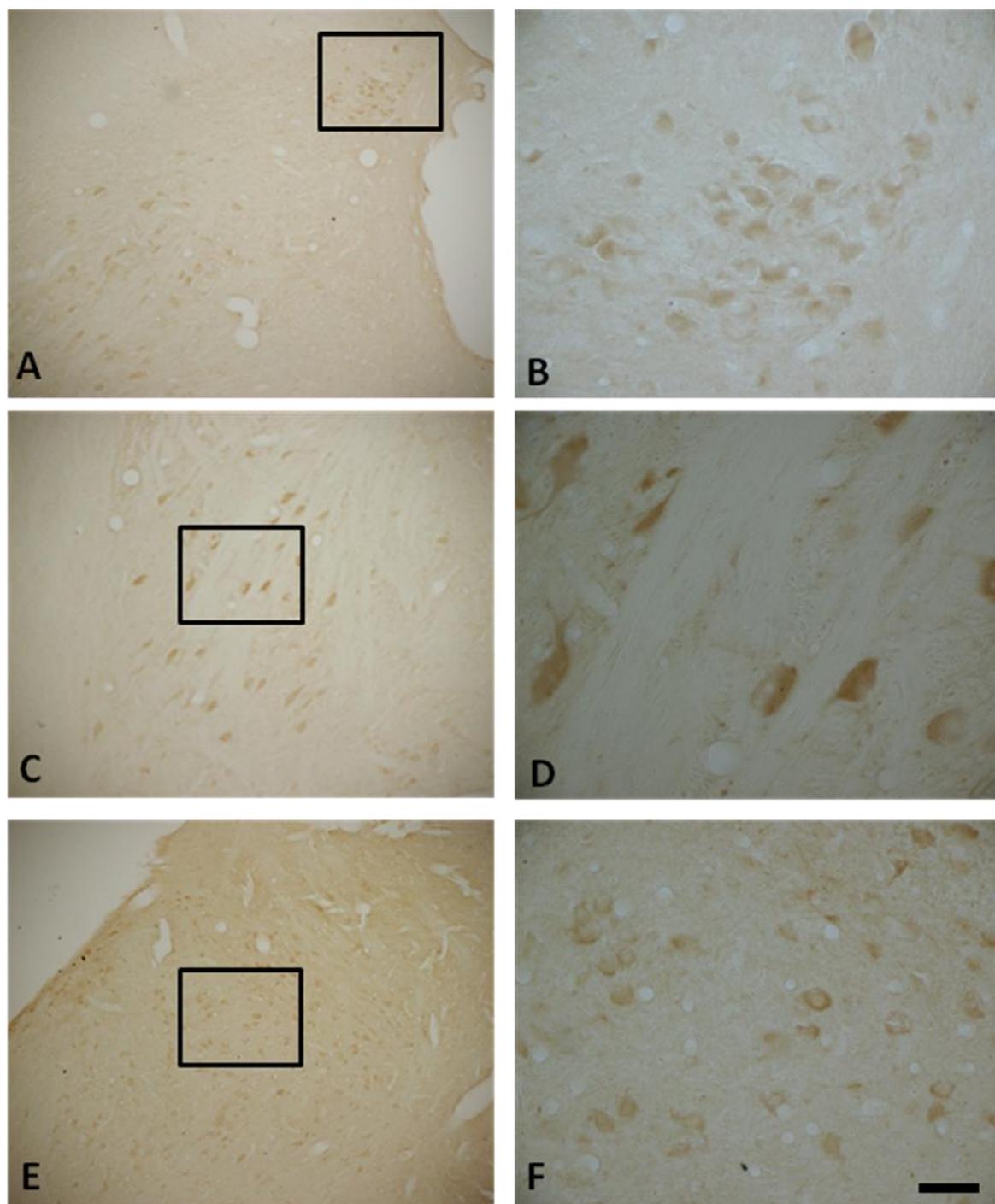


Figura 2. Expressão imuno-histoquímica de Glutamato em pericários em (A) Núcleo vestibular superior, correspondendo ao nível da figura 1A; (B) Ampliação da caixa em A; (C) Núcleo vestibular lateral, correspondendo ao nível da figura 1A; (D) Ampliação da caixa em C; (E) Núcleo vestibular descendente, correspondendo ao nível da figura 1E; (F) Ampliação da caixa em E. Barra: 170 μm em A, C, E; 40 μm em B, D, F.

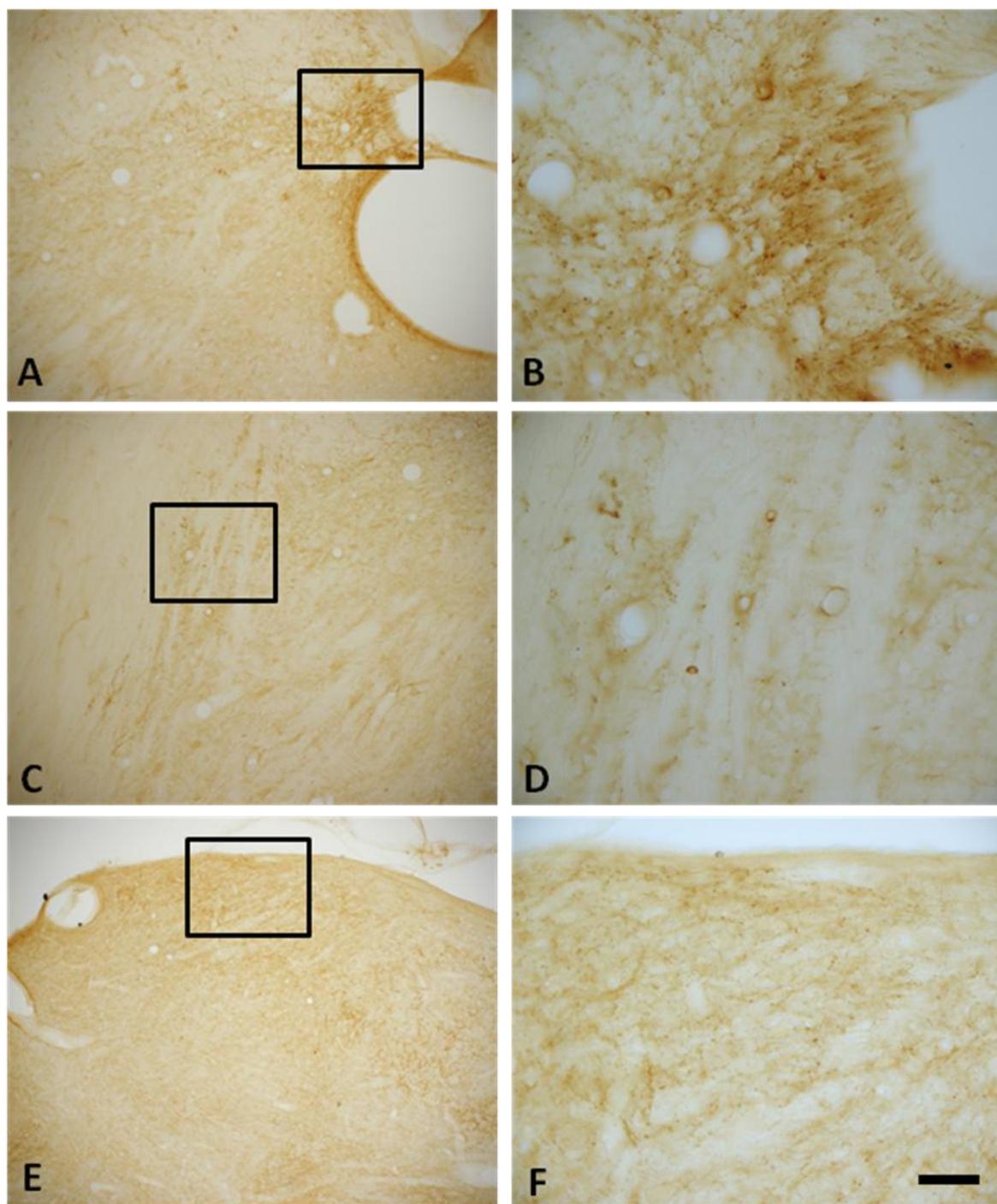


Figura 3. Expressão imuno-histoquímica de Substância P em terminais em (A) Núcleo vestibular superior, correspondendo ao nível da figura 1A; (B) Ampliação da caixa em A; (C) Núcleo vestibular lateral, correspondendo ao nível da figura 1A; (D) Ampliação da caixa em C; (E) Núcleo vestibular descendente, correspondendo ao nível da figura 1E; (F) Ampliação da caixa em E. Barra: 170 μ m em A, C, E; 40 μ m em B, D, F.

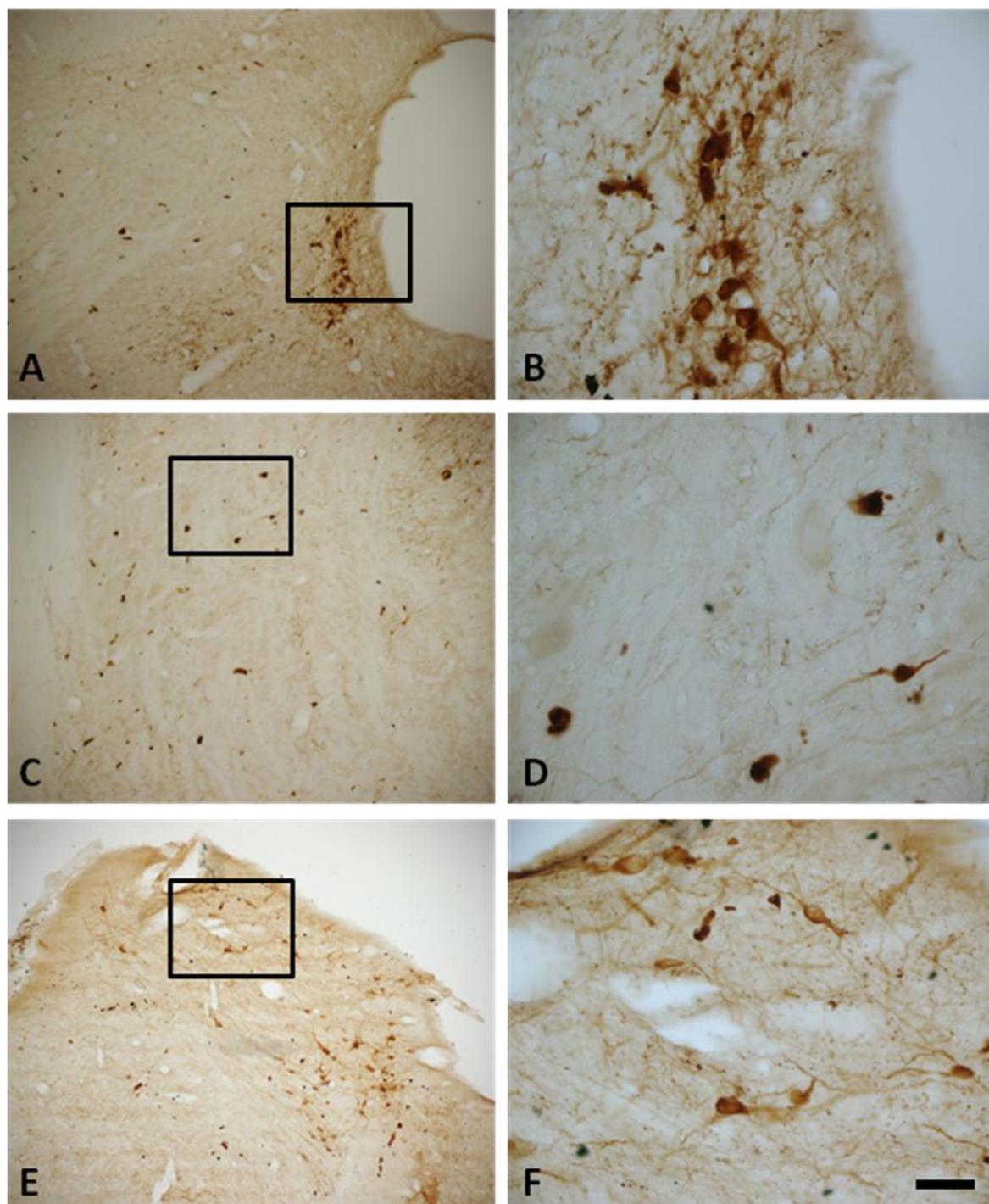


Figura 4. Expressão imuno-histoquímica de ChAT em pericários em (A) Núcleo vestibular medial, correspondendo ao nível da figura 1A; (B) Ampliação da caixa em A; (C) Núcleo vestibular lateral, correspondendo ao nível da figura 1C; (D) Ampliação da caixa em C; (E) Núcleo vestibular descendente, correspondendo ao nível da figura 1E; (F) Ampliação da caixa em E. Barra: 170 μm em A, C, E; 40 μm em B, D, F.

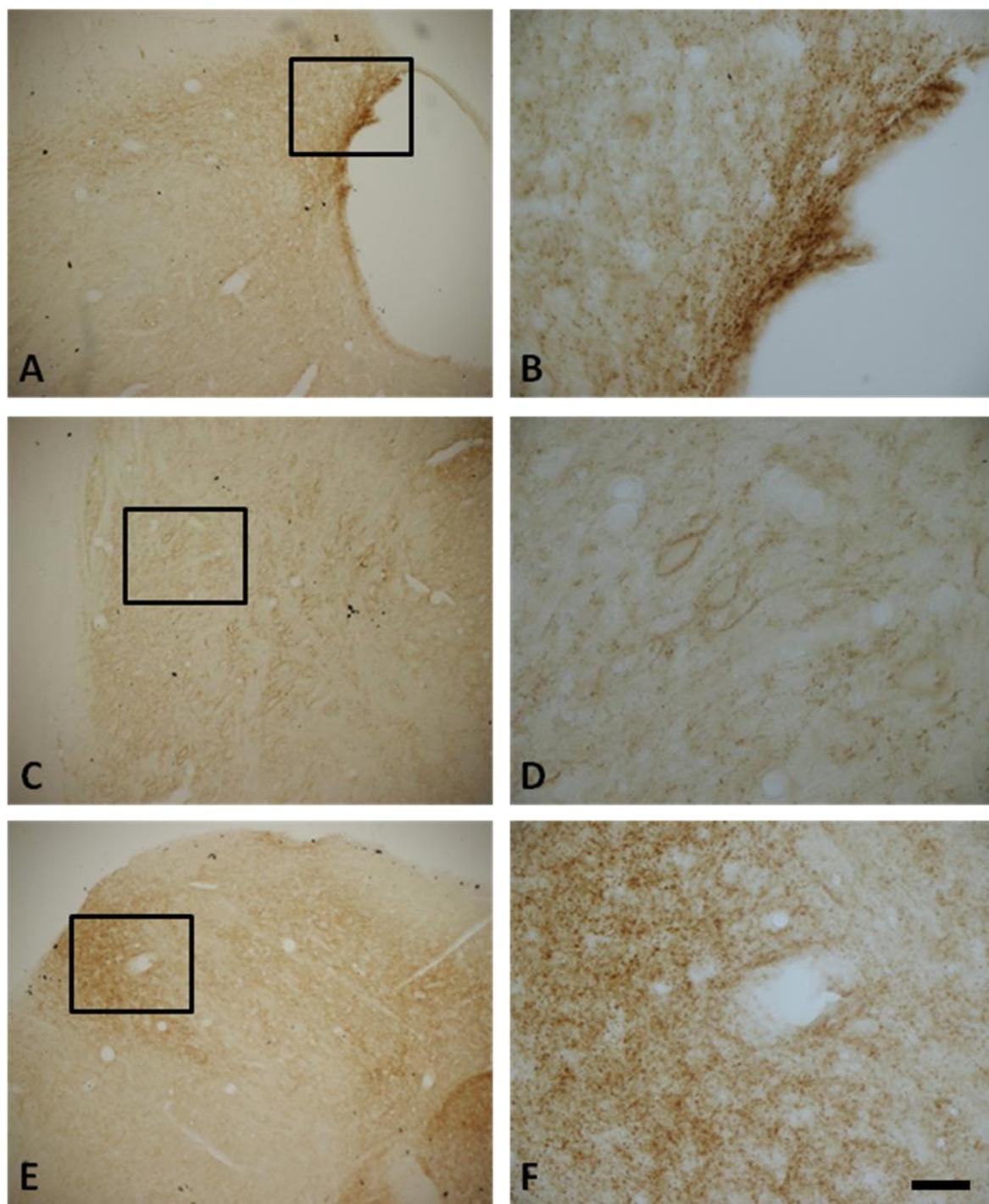


Figura 5. Expressão imuno-histoquímica de GAD em terminais em (A) Núcleo vestibular superior, correspondendo ao nível da figura 1A; (B) Ampliação da caixa em A; (C) Núcleo vestibular lateral, correspondendo ao nível da figura 1C; (D) Ampliação da caixa em C; (E) Núcleo vestibular descendente, correspondendo ao nível da figura 1E; (F) Ampliação da caixa em E. Barra: 170 μ m em A, C, E; 40 μ m em B, D, F.

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho, discutidos com resultados de trabalhos prévios, nos permitem chegar às seguintes conclusões sobre os núcleos vestibulares do sagui:

1. O complexo nuclear vestibular do sagui está situado no tronco encefálico em nível ponto-bulbar e é composto pelos núcleos vestibular superior, vestibular lateral, vestibular medial e vestibular inferior (ou descendente, ou espinal);
2. Todos os núcleos vestibulares contêm neurônios e terminais glutamatérgicos, mais visíveis no núcleo vestibular lateral, seguido do superior e do descendente, e muito rarefeitos no medial;
3. Todos os núcleos vestibulares contêm fibras e terminais que liberam substância P, mais visíveis no núcleo vestibular superior, seguido do vestibular descendente, depois do lateral, e muito raros no medial;
4. Todos os núcleos vestibulares exibem neurônios francamente colinérgicos, além de terminais, com intensidade na seguinte ordem decrescente: medial, descendente, lateral e superior;
5. Todos os núcleos vestibulares são dotados de terminais GABAérgicos, na seguinte ordem decrescente de intensidade: superior, descendente, lateral e medial.

Este trabalho representa um instrumento essencial para estabelecer o sagui como modelo experimental para pesquisas envolvendo o sistema vestibular. Além disso, embora não contemplando todas as possibilidades de caracterização neuroquímica, os resultados discutidos aqui oferecem uma possibilidade de compreender os aspectos funcionais e permitem inferências quanto a etiologias de patologias vestibulares, como decorrência de alterações no mecanismo funcional das substâncias estudadas entre as diversas espécies de mamíferos.

O presente estudo representa o início de uma linha de pesquisa voltada para o estudo dos centros de processamento vestibular no sagui e outras espécies, no sentido de contribuir para melhorar a compreensão dos mecanismos vestibulares e fornecer embasamento para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas.

Assim, a continuidade deste estudo deve ocorrer a partir das seguintes possibilidades:

1. Identificação funcional de outros centros subcorticais associados ao processamento vestibular no sagui, observando a expressão funcional de c-fos após estímulo vestibular adequado;
2. Identificação funcional das áreas corticais associadas ao processamento vestibular no sagui, observando a expressão funcional de c-fos após estímulo vestibular adequado;
3. Estudo do órgão vestibular do sagui;
4. Estudo hodológico dos centros vestibulares subcorticais do sagui;
5. Estudos comparativos, incluindo um roedor regional crepuscular, o mocó (*Kerodon rupestris*);
6. Estudo de desenvolvimento das estações vestibulares do sagui, utilizando animais de diferentes idades;
7. Contribuir com o “Projeto Atlas” do sagui, através do mapeamento de suas vias vestibulares centrais.

5 REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS*

- Angelaki, D. E., Cullen, K. E., 2008. Vestibular system: The many facets of a multimodal sense. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 125–150.
- Azevedo, C. V. M., Menezes, A. A. L., Queiroz, J.W., Moreira, L. F. S., 1997. Circadian and ultradian periodicities of grooming behavior in family groups of common marmosets (*Callithrix jacchus*) in captivity. *Biol. Rhythm Res.* 27, 374-385.
- Barmack, N. H., 2003. Central vestibular system: vestibular nuclei and posterior cerebellum. *Brain Res. Bull.* 60, 511–541.
- Cai, Y. -L., Ma, W. -L., Li, M., Guo, J. -S., Li, Y. -Q., Wang, L. -G., Wang, W. -Z., 2007. Glutamatergic vestibular neurons express Fos after vestibular stimulation and project to the NTS and the PBN in rats. *Neurosci. Lett.* 417, 132–137.
- Cavalcante, J. S., Alves, A. S., Costa, M. S. M. O., Britto, L. R. G., 2002. Differential distribution of afferents containing serotonin and neuropeptide Y within the marmoset suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 927, 200-203.
- Cavalcante, J. S., Costa, M. S. M. O., Santee, U. R., Britto, L. R. G., 2005. Retinal projections to the midline and intralaminar thalamic nuclei in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Brain Res.* 1043, 42-47.
- Cavalcante, J. S., Britto, L. R. G., Toledo, C. A. B., Nascimento Jr, E. S., Lima, R. R. M., Pontes, A. L. B., Costa, M. S. M. O., 2008. Calcium-binding proteins in the circadian centers of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the rock cavy (*Kerodon rupestris*). *Brain Res. Bull.* 76, 354-360.
- Costa, M. S. M. O., Britto, L. R., 1997. Calbindin immunoreactivity delineates the circadian visual centers of the brain of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Brain Res. Bull.* 43, 369-373.

*De acordo com as Normas do periódico Brain Research, para o qual o artigo foi submetido.

- Costa, M. S. M. O., Moreira, L. F., Alones, V., Lu, J., Santee, U. R., Cavalcante, J. S., Moraes, P. R. A., Britto, L. R. G., Menaker, M., 1998. Characterization of the circadian system in a Brazilian species of monkey (*Callithrix jacchus*): Immunohistochemical analysis and retinal projections. *Biol. Rhythm Res.* 29, 510-520.
- Costa, M. S. M. O., Santee, U. R., Cavalcante, J. S., Moraes, P. R. A., Santos, N. P., Britto, L. R. G., 1999. Retinohypothalamic projections in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): a study using cholera toxin subunit B. *J. Comp. Neurol.* 415, 393-403.
- Delisa, J. A., Gans, B. M., 2002, *Tratado de Medicina de Reabilitação*. Manole, São Paulo.
- De Waele, C., Mühlethaler, M., Vidal, P. P., 1995. Neurochemistry of the central vestibular pathways. *Brain Res.* 20, 24-46.
- Epple, G., 1970. Maintenance, breeding, and development of marmoset monkeys (*Callithricidae*) captivity. *Folia Primatol.* 12, 56-76.
- Gdowski, G. T., McCrea, R. A., 1999. Integration of vestibular and head movement signals in the vestibular nuclei during whole-body rotation. *J. Neurophysiol.* 82, 436-449.
- Horak, F. B., 2006. Postural orientation and equilibrium: what do we need to know about neural control of balance to prevent falls? *Age and Ageing* 35-S2, ii7–ii11.
- Holstein, G. R., Martinelli, G. P., Cohen, B., 1999. The ultrastructure of gaba-immunoreactive vestibular commissural neurons related to velocity storage in the monkey. *Neuroscience* 93, 171-181.
- Kaufman, G. D., 2005. Fos expression in the vestibular brainstem: What one marker can tell us about the network. *Brain Res. Rev.* 200-211.
- Kozako, T., Kawachi, A., Cheng, S. -B., Kuchiiwa, S., Motoya, T., Nagakawa, S., Yamada, K., 2002. Role of the vestibular nuclei in endothelin-1-induced barrel rotation in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 454, 199-207.
- McCrea, R. A., Gdowski, G. T., Boyle, R., Belton, T., 1999. Firing behavior of vestibular neurons during active and passive head movements: vestibulo-spinal and other non-eye-movement related neurons. *J. Neurophysiol.* 82, 416-428.
- Menezes, A. A. L., Moreira, L. F. S., Azevedo, C. V. M., Costa, S. F., Castro, C. S. S., 1993. Behavioral rhythms in the captive common marmoset (*Callithrix jacchus*) under natural environmental conditions. *Braz. J. M. Biol. Res.* 26, 741-745.

- Menezes, A. A. L., Moreira, L.F.S., Queiroz, J. W., Menna-Barreto, L. S., Benedito-Silva, A. A., 1994. Diurnal variation and distribution of grooming behavior in captive common marmoset families (*Callithrix jacchus*). *Braz. J. M. Biol. Res.* 27, 61-65.
- Menezes, A. A. L., Moreira, L.F.S., Menna-Barreto, L. S., 1997. Ontogeny of the locomotor activity rhythm in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Biol. Rhythm Res.* 27, 319-328.
- Newman, J. D., Kenkel, W. M., Aronoff, E. C., Bock, N. A., Zametkin, M. R., Silva, A. C., 2009. A combined histological and MRI brain atlas of the common marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *Brain Res. Rev.* 62, 1-18.
- O'Byrne, K. T., Morris, K. D., 1988. A restraint system for the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Laboratory Animals* 22, 148-150.
- Pinato, L., Allemandi, W., Abe, L. K., Frazão, R., Rizzolo, R. J. C., Cavalcante, J. S., Costa, M. S. M. O., Nogueira, M. I., 2007. A comparative study of cytoarchitecture and serotonergic afferents in the suprachiasmatic nucleus of primates (*Cebus apella* and *Callithrix jacchus*) and rats (Wistar and Long Evans strains). *Brain Res.* 1149, 101-110.
- Roy, J. E., Cullen, K. E., 2004. Dissociating self-generated from passively applied head motion: neural mechanisms in the vestibular nuclei. *J. Neurosci.* 24, 2102–2111.
- Rylands, A. B., 1996. Habitat and the evolution of social and reproductive behavior in Callitrichidae. *Am. J. Primatol.* 38, 5-18.
- Sadeghi, S. G., Chacron, M. J., Taylor, M. C., Cullen, K. E., 2007. Neural variability, detection thresholds, and information transmission in the vestibular system. *J. Neurosci.* 27, 771–781.
- Santos, F. A., Duarte, R. B., Sousa, T. B., Albuquerque, T. D. R., Cavalcante, J. S., Costa, M. S. M. O., 2009. Cochlear nuclei of the common marmoset (*Callithrix jacchus*): Cytoarchitectonic characterization and distribution of calcium-binding proteins. *Hear. Res.* (submitted).
- Shaikh, A. G., Meng, H., Angelaki, D. E., 2004. Multiple reference frames for motion in the primate cerebellum. *J. Neurosci.* 24, 4491–4497.
- Vidal, P.-P., Sans, A., 2004. Vestibular system. In *The rat nervous system*, G. Paxinos, ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 965-996.

6 ANEXOS

VESTIBULAR NUCLEI OF THE COMMON MARMOSSET (*Callithrix jacchus*): CYTOARCHITECTONIC AND NEUROCHEMICAL CHARACTERIZATION

Adriana Jussara de Oliveira Brandão^{1,2*}; Ruthnaldo Rodrigues Melo de Lima²;
Francimar Araújo dos Santos²; Twyla Barros de Sousa²; André Luiz Bezerra de
Pontes²; Joacil Germano Soares²; Jeferson de Souza Cavalcante²; Judney Cley
Cavalcante²; Expedito Silva do Nascimento Júnior²; Miriam Stela Maris de Oliveira
Costa².

¹Professor, Faculdade Natalense para o Desenvolvimento do Rio Grande do Norte
(FARN); student in the Postgraduate Physiotherapy Program of the Federal
University of Rio Grande do Norte.

² Neuroanatomy Laboratory, Department of Morphology, Bioscience Center, Federal
University of Rio Grande do Norte.

*Corresponding author: Tel: 55 84 3215 3431

e-mail: adrianajbrandao@bol.com.br

Abstract

The Nissl staining technique, complemented by NeuN immunohistochemistry, allowed us to delineate the superior, lateral, medial and inferior (or descending) vestibular nuclei in the encephalon of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). Glutamate and choline acetyltransferase immunoreactive neurons as well as substance P and glutamic acid decarboxylase immunoreactive terminals were observed in varying intensity in all the nuclei. This study confirms the presence of glutamate and substance P in the terminals of the vestibular nuclei of common marmosets, likely originating in the first-order neurons of the vestibular ganglion, and of gamma aminobutyric acid (GABA) in terminals, likely originating in cerebellar Purkinje cells. Second-order neurons in the vestibular nuclei seem to use glutamate and acetylcholine as neurotransmitters, judging by their significant presence in the perikarya of these nuclei in common marmosets, as reported in other species.

Section: 5. Sensory and motor systems

Keywords: vestibular apparatus, neurotransmitters, neuropharmacology, brainstem, common marmoset, immunohistochemistry.

Acknowledgements: CNPq, CAPES.

1. Introduction

Maintaining body balance within the gravitational field and being able to orientate themselves in the environment are fundamental aspects for vertebrate survival. This requires permanent control of head and trunk position in space, as well as of the head in relation to the body. Three sensory modalities are strongly involved in these processes: visual, proprioceptive and vestibular (Gdowski and McCrea, 1999; Vidal and Sans, 2004; Angelaki and Cullen, 2008).

The vestibular system is the apparatus of the inner ear involved in balance. It consists of two structures of the bony labyrinth, the vestibule and the semicircular canals, and the structures of the membranous labyrinth contained within them. A set of vestibular organs resides on each side of the head, and they are mirror images of each other. Three semicircular canals respond to rotations and two otolithic organs (sacculle and utricle) sense linear accelerations (force of gravity) and head rotations, thereby contributing to the sense of balance (Angelaki and Cullen, 2008). The primary vestibular fibers originate in bipolar neurons in the vestibular ganglion of the inner ear. The peripheral processes of bipolar cells connect to the vestibular receptors on the periphery, while the central processes, forming the vestibular portion of the vestibulocochlear nerve (CN-VIII), or simply the vestibular nerve, reach the central nervous system in a nuclear complex, the so-called vestibular nuclei (Barmack, 2003; Vidal and Sans, 2004). The vestibular complex is located in the dorsolateral portion of the rostral medulla and caudal pons, lateral to the limiting sulcus, extending from the superior cerebellar peduncle (brachium conjunctivum) to the inferior cerebellar peduncle (restiform body). It consists of four main nuclei, the medial vestibular nucleus (MVN), the superior vestibular nucleus (SVN), the lateral vestibular nucleus (LVN), and the inferior (or descending) vestibular nucleus (IVN) (Barmack, 2003; Vidal and Sans, 2004).

The neurotransmitters involved in the neurotransmission and neuromodulation of central vestibular neurons are classified into three groups, as follows: Excitatory amino acids – glutamate (Glu) and aspartate; inhibitory amino acids – gamma-aminobutyric acid (GABA) and glycine, mediators of rapid synaptic events; the five mono-amino acids (histamine, dopamine, serotonin, noradrenaline and adrenaline) and acetylcholine (Ach); and the neuroactive peptides, such as substance P (SP) and other tachykinins (de Waele et al., 1995; Barmack, 2003; Vidal and Sans, 2004).

The dysfunctions of the vestibular system cause unpleasant sensations, such as dizziness, vertigo and loss of balance, which have a negative impact on the ability of an individual to execute daily routines and live independently (Delisa and Gans, 2002). When studying the vestibular system, in addition to considering the intrinsic properties of the neuronal membrane, it is important to recognize the nature of different neurotransmitters and neuromodulators involved in their circuitries, which may be the source of these problems. Increased neurochemical knowledge of the vestibular system will undoubtedly enhance the future development of suitable therapeutic interventions. Accordingly, this work aimed to establish the cytoarchitectonic and neurochemical characterization of vestibular nuclei in a small New World primate, the common marmoset (*Callithrix jacchus*). This animal, which is native to the equatorial forests of Brazil, is found mainly in the Atlantic Forest regions and in great abundance in the state of Rio Grande do Norte. It is a small diurnal animal, with mean body length of 20 cm, tail length of around 25 cm and adult body weight under 500 g (Rylands, 1996; Menezes et al., 1997; Azevedo et al., 1997).

2. Results

In this study, the vestibular nuclei were analyzed in coronal sections of the marmoset encephalon, at three levels – rostral, middle and caudal. Cytoarchitecture and immunohistochemical characterization for Glu, SP, ChAT and GAD from this complex will be described.

Cytoarchitecture

The vestibular nuclei were visualized from the middle level of the pons to the bulb in the open portion. It was possible to cytoarchitectonically delimit four nuclei, analyzing the rostral, middle and caudal levels. The superior vestibular (SV) nucleus is the first to appear rostrally, ventrally to the caudal portion of the medial parabrachial nucleus (not shown).

The SV then appears once again, ventrally to the superior cerebellar peduncle, and ventrally to this, the lateral vestibular (LV) nucleus, characterized by a clustering of large cells, and the medial vestibular (MV) nucleus, located medially, and the abducens nerve nucleus located medially to the MV (Fig. 1 A and B).

The four vestibular nuclei are present at the middle level, when the descending vestibular (DV) nucleus emerges ventrally to the LV (Fig. 1 C and D). At the caudal and bulbar level, only the DV and MV are present on the dorsal contour of the medulla, while the solitary tract nucleus is located ventromedially to the MV and the accessory cuneiform nucleus ventrolaterally to the DV (Fig. 1 E and F).

Glutamate (Glu)

The perikarya and Glu-immunoreactive terminals visualized in the four vestibular nuclei were more intense in the LV (Fig. 2 C and D), followed by SV (Fig. 2 A and B) and DV (Fig. 2 E and F), and less markedly in the MV (not shown).

Substance P (SP)

Immunohistochemistry for SP showed only densely stained fibers and terminals in the SV (Fig. 3 A and B), followed by DV (Fig. 3 E and F) and LV (Fig. 3 C and D) and only weak staining in MV (not shown).

Choline acetyltransferase (ChAT)

Immunohistochemistry for ChAT mainly showed very well stained neuron bodies in all the nuclei – SV, LV, MV and DV, with greater intensity in the MV (Fig. 4 A and B), followed by the DV (Fig. 4 E and F) and LV (Fig 4 C and D). The SV contained a comparatively small amount of stained neurons (not shown). Varicosities indicative of stained terminals were also present in all the nuclei.

Glutamic acid decarboxylase (GAD)

GAD-immunoreactive terminals were identified in all the vestibular nuclei – SV, LV, MV and DV. In decreasing order of staining intensity were the SV (Fig. 5 A and B), the DV (Fig. 5 E and F) and LV (Fig. 5 C and B). The MV exhibited a scarcity of stained terminals (not shown).

3. Discussion

In this study, immunohistochemistry for NeuN was used in conjunction with Nissl method, in order to help visualize and delimit vestibular system nuclei.

The neuron-specific nuclear protein (NeuN) is expressed in most mature neuron nuclei of the central and peripheral nervous system of vertebrates. NeuN immunoreactivity does not function as a marker in some cells, such as cerebellar Purkinje cells, olfactory bulb mitral cells and retinal photoreceptors (Mullen et al., 1992) as well as substantia nigra pars reticulata (Kumar and Buckmaster, 2007). Furthermore, it is not reliable for counting dopaminergic cells in the substantia nigra pars compacta (Cannon and Greenamyre, 2009). Nevertheless, it has been used as a complement to cytoarchitectonic techniques, sometimes considered better than Nissl methods since all the glial cells are negative for NeuN (Mullen et al., 1992; Gittins et al., 2004). Thus, the combination of techniques allowed us to delimit the four vestibular nuclei of the marmoset – SV, LV, MV and DV. These are shown in the stereotaxic atlas (Stephan et al., 1980; Newman et al., 2009); however, in our work we added a more accurate delimitation, with the help of NeuN immunostaining.

The presence of four nuclei – superior vestibular, lateral vestibular, medial vestibular and descending vestibular, forming the vestibular complex located in the dorsal portion of the pons and the open portion of the medulla, in relation to the floor of the fourth ventricle, is a constant in mammals (Barmack, 2003). In rats, the vestibular complex is limited rostrally by the superior cerebellar peduncle, laterally by the inferior cerebellar peduncle, ventrally by the nucleus and spinal tract of the trigeminal nerve and medially by the fourth ventricle and reticular formation (Vidal and Sans, 2004; Paxinos and Watson, 2007).

The limits of individual vestibular nuclei are difficult to distinguish based on cytological traits. However, there are a number of particularities. The giant cells of the LV are concentrated in its dorsal-caudal portion, facilitating their subdivision. The rostral-ventral portion of the LV is composed of intermediate-size cells. The limits of the SV are difficult to recognize cytologically, but it shows a more uniform distribution of medium size cells. The limits of the other vestibular nuclei are even less distinct. The MV contains a wide variety of cell types and is the largest vestibular nucleus in terms of total volume and number of cells. The MV is often subdivided into parvocellular (dorsal cluster of small neurons) and magnocellular (ventral cluster of large neurons) sections. The DV is traversed by bands of longitudinal fibers that suggest they are less densely populated by neurons (Barmack, 2003).

The role of central vestibular neurons is relatively well known. They elaborate a three-dimensional representation of head movements in space, based on the

perception of self-generated movement by the individual and in the internal representation of motor synergies that stabilize gaze and posture (De Waele et al., 1995). Vestibular pathologies, such as Meniere's syndrome and motion sickness (during travel by air, sea or land), are frequent problems. It is also very likely, at least in some cases, that alterations in the vestibular system are the cause of falls in the elderly, often with catastrophic consequences (Horak, 2006).

There are still gaps in this area and increased neurochemical knowledge of the vestibular system will lead to more effective therapeutic interventions.

Next, we will discuss our results and compare them to what is known in the literature about the main transmitters involved in the neural circuitry of the vestibular system. Considerable evidence indicates that Glu acts as a neurotransmitter of vestibular ganglion neurons. Thus, ganglion neurons are stained with antibodies against Glu or enzymes involved in their metabolism. Moreover, Glu ligand sites were identified in all the vestibular nucleus neurons, more densely in MV and DV (De Waele et al., 1994). An *in vivo* microdialysis study in cats confirmed the release of Glu in the MV after vestibular nerve stimulation (Yamanaka et al., 1997). Another study in rats showed that MV neurons respond to otolithic stimulation by lateral head tilting and that this response is mediated by Glu and Ach (Takeshita et al., 1999). Glu also seems to be the neurotransmitter released by other afferent connections to the vestibular nuclei, including spinal fibers and commissural pathways (Vidal and Sans, 2004). On the other hand, pharmacological studies identified Glu as a neurotransmitter of vestibular nucleus neurons in the vestibulo-ocular and vestibulo-spinal pathways (De Waele et al., 1995; Vidal and Sans, 2004). Perikarya and Glu-immunoreactive terminals were visualized in the four vestibular nuclei of the common marmoset. These are more intense in the LV and less marked in the MV, in contrast to the pattern observed in other species.

A large number of SP-immunoreactive fibers and terminals were identified in the vestibular nuclei, particularly in the caudal portion of the MV and in the DV in rats, cats and monkeys (de Waele et al., 1995). Our data on the common marmoset differed in terms of location, given that SP-positive fibers and terminals were found in the SV, followed by the DV and LV and in only small amounts in the MV.

Immunohistochemical studies in rabbits, guinea pigs, cats and squirrel monkeys showed that some of the primary vestibular afferent connections are immunoreactive to SP (Ylikoski et al., 1984; Usami et al., 1991; Carpenter et al., 1990), suggesting

that SP is collocated with Glu in the vestibular ganglion. The functional significance of both isolated Glu and that collocated with SP, in first order vestibular neurons, needs to be clarified. In guinea pigs it was found that SP depolarizes MV neurons by activating atypical postsynaptic receptors (Vibert et al., 1996).

Positive acetylcholinesterase (AChE) terminals and muscarinic neurons diffusely distributed throughout the entire vestibular nuclear complex, in addition to a small number of neurons stained for AChE, as well as choline acetyltransferase (ChAT) restricted to the MV were found in rats (Zanni et al., 1995). ACh distribution in cats, identified by ChAT immunoreactivity was observed in neurons and terminals, mainly in the caudal portion of the MV and in the DV and to a lesser degree in the medial portion of the SV (Tighilet and Lacour, 1998). Many of these cholinergic neurons project bilaterally to the cerebellar nodule and uvula, where they end up as mossy fibers (Barmack et al., 1992; Barmack, 2003). ChAT-immunoreactive cells were detected in the caudal portion of the MV and dorsal of the DV in squirrel monkeys, in a comparatively higher amount than that found in rats (Carpenter et al., 1987). The present work on common marmosets corroborates the aforementioned study, since all the vestibular nuclei exhibited perikarya strongly immunostained for ChAT, indicating the presence of ACh, mainly in the MV and DV. A small number of ChAT-immunoreactive terminals were also present in all the nuclei.

Although ACh was ruled out as a neurotransmitter of primary vestibular afferent connections for vestibular nucleus neurons (Raymond et al., 1988), this substance, along with Glu, was later related to the transmission of otolithic information to MV neurons in rats (Takeshita et al., 1999). It is also recognized that the central cholinergic system plays a crucial role in processing sensory afferent information in the vestibular nuclei. In addition, this system has been related to vestibular symptoms of motion sickness in humans (Kohl et al., 1983; Yates et al., 1998; Shupak and Gordon, 2006). There is behavioral evidence, supported by electrophysiological studies, of cholinergic control over central vestibular function. Lateral and medial vestibular neurons are excited by the systemic or microinjection application of ACh and are inhibited by AChE. There are indications that synaptic transmission between primary vestibular and second order neurons is facilitated by cholinergic agonists and hindered by cholinergic antagonists (De Waele et al., 1995). ChAT activity in the vestibular nuclei was also measured in a number of studies and it was observed that

all the vestibular nuclei exhibited significant activity in this enzyme, with high levels in the MV (De Waele et al., 1995).

Fibers, terminals and perikarya containing GABA were found in all the vestibular nuclei using immunohistochemical techniques or in situ hybridization for GABA or GAD, in several species such as rats (Nomura et al., 1984; De Waele et al., 1994; Zanni et al., 1995), guinea pigs (Kumoi et al., 1987), rabbits (Blessing et al., 1987) and cats (Walberg et al., 1990; Tighilet and Lacour, 2001).

MV, SV and DV received projections from the cerebellar floccule, nodule and uvule (Büttner-Enever, 1985), very likely GABAergic, considering that cerebellar Purkinje cells use GABA as their main neuromediator (Sato and Kawasaki, 1991; de Zeeuw and Berrebi, 1996). The inferior olivary complex also projects to vestibular neurons, mainly those in the LV (Matsuoka et al., 1983). Furthermore, a commissural pathway links the two vestibular nuclei in mammals, via GABAergic or glycinergic type II interneurons (Precht et al., 1973; Furuya et al., 1991).

In this study putative GABAergic terminals, as judging by the presence of GAD-immunoreactive terminals were identified in all the vestibular nuclei of the common marmosets, more markedly in the SV and DV. However no immunostained perikarya were observed in any of the nuclei. The differences may reflect individual variations related to the animal's posture or methodological disparities among the studies. The use of cytotoxic agents is likely required to visualize GABA or GAD-positive neurons. This study represents a starting point for functional studies of the vestibular system in a primate, to help elucidate problems that often affect this system and serves as a base for the development of specific therapies.

4. Experimental procedures

We used four adult female common marmosets, weighing between 295 g and 427 g, obtained from the Primatology Center of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN) in Natal, Brazil. We took extreme care to avoid causing pain and suffering to the animals during the experimental procedures, adhering strictly to norms established by the National Research Council of the National Academy "Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research", and recommended by the Brazilian Society of Neurosciences and Behavior, whose website contains a free pdf version – <http://www.sbnec.gov.br/links>.

Additionally, the project was approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Norte (CEUA-UFRN), protocol no. 004/2009.

The animals were intramuscularly anesthetized with ketamine (100 mg/1 ml) and xylazine (2.3 mg/0.1 ml), both per kilogram of animal weight, and submitted to transcardiac perfusion. A total of 300 ml of 0.9% saline solution in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4, with heparin (Parinex, Hipolabor, 2 ml/1000 ml of saline solution), followed by 700 ml of fixative solution (4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4) were propelled by a peristaltic pump (Masterflex, Cole-Parmer, Niles, IL).

The encephalon was removed from the cranial cavity and stored in a solution of 30% sucrose in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4, at 4°C, until microtomy. The encephalon was frozen in dry ice and sectioned in a sliding microtome, obtaining 30 µm coronal sections, which were distributed into 6 series. The sections were conserved in antifreeze solution at -20 °C until processing.

Microtomy was performed on the entire encephalon. Brainstem sections were used in this study and the remaining ones were preserved for future investigations.

The sections from one of the series of each encephalon were mounted on gelatinized glass slides and stained by Nissl method, using thionine to delimit neuronal clusters. The sections from another series were submitted to immunohistochemical reaction for the specific neuronal nuclear protein (NeuN), to be used as an aid in structure demarcation. The sections from the remaining series were submitted to immunohistochemistry to demonstrate the expression of the following neuroactive substances: Glutamate (Glu), Glutamic Acide Decarboxilase (GAD), Substance P (SP), and choline acetyltransferase (ChAT).

All the immunohistochemical procedures were performed with the sections in solution at room temperature. The sections were incubated in the primary antibody and diluted in 0.4% Triton X-100 in 0.1M phosphate buffer solution, pH 7.4 (PBS), as follows: anti-NeuN obtained in mice (Chemicon, 1:1000), anti-Glu obtained in rabbits (Sigma, 1:1000), anti-GAD obtained in mice (Santa Cruz, 1:1000), anti-SP obtained in guinea pigs (Peninsula, 1:1000) and anti-ChAT obtained in guinea pigs (Chemicon, 1:150), with the addition of 2% normal serum from the animal in which the secondary antibody was raised, for 18 to 24 hours. The sections were placed in contact with the corresponding secondary antibody (all from the Jackson Lab) at a

dilution of 1:1000, for 90 minutes. The sections were subsequently incubated with an avidin-biotin-peroxidase (ABC Elite kit, Vector Labs., Burlingame, CA, USA) for 90 minutes. Next, they were submitted to a peroxidase activity reaction in a solution of diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma, St Louis, MO, USA) and 0.03% hydrogen peroxide in PBS. The sections were washed with PBS (5 x 5 min) between one stage and another and at the end of the procedure. The sections were mounted on previously gelatinized glass slides. After drying, the slides were rapidly immersed in 0.05% osmium tetroxide to intensify the reaction, and then dehydration and clearing were reached in a battery of increasingly concentrated alcohols until absolute alcohol and xylene. The coverslips were mounted on the sections for optical microscopic examination.

The histological slides were examined under a bright-field optical microscope (Olympus BX41). Digital images of the representative sections were captured using a digital video camera (Nikon DXM1200) coupled to the microscope. The images were minimally processed for brightness and contrast using Adobe Photoshop 7.0. The vestibular nuclei were examined for its cytoarchitecture and its content of neuroactive substances. Finally, qualitative analysis was carried out.

REFERENCES

- Angelaki, D. E., Cullen, K. E., 2008. Vestibular system: The many facets of a multimodal sense. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 125–150.
- Azevedo, C. V. M., Menezes, A. A. L., Queiroz, J.W., Moreira, L. F. S., 1997. Circadian and ultradian periodicities of grooming behavior in family groups of common marmosets (*Callithrix jacchus*) in captivity. *Biol. Rhythm Res.* 27, 374-385.
- Barmack, N. H., 2003. Central vestibular system: vestibular nuclei and posterior cerebellum. *Brain Res. Bull.* 60, 511–541.
- Barmack, N. H., Baughman R. W., Eckenstein, F. P. Shojaku, H., 1992. Secondary vestibular cholinergic projection to the cerebellum of rabbit and rat as revealed by choline acetyltransferase immunohistochemistry, retrograde and orthograde tracers. *J. Comp. Neurol.* 317, 250-270.
- Blessing, W. W., Heger, S. C., Oertel, W. H., 1987. Vestibular pathway in rabbit includes GABA-synthesizing neurons. *Neurosci. Lett.* 80, 158-162.
- Büttner-Ennever, J. A., Patterns of connectivity in the vestibular nuclei. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 363-378.
- Cannon, J. R., Greenamyre, J. T., 2009. NeuN is not a reliable marker of dopamine neurons in rat substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 464, 14-17.
- Carpenter, M. B., Chang, L., Pereira, A. B., Hersh, L. B., 1987. Comparisons of the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in the vestibular nuclei of the monkey and rat. *Brain Res.* 418, 403-408.
- Carpenter, M. B., Huang, Y., Pereira, A. B., Hersh, L. B., 1990. Immunocytochemical features of the vestibular nuclei in the monkey and cat. *J. Hirnforsch.* 31, 583-599.
- Delisa, J. A., Gans, B. M., 2002, *Tratado de Medicina de Reabilitação*. Manole, São Paulo.
- De Waele, C., Abitbol, M., Chat, M., Menini, C., Mallet, J., Vidal, P. P., 1994. Distribution of glutamatergic receptors and GAD mRNA-containing neurons in the vestibular nuclei of normal and hemilabyrinthectomized rats. *Eur. J. Neurosci.* 6, 565-576.
- De Waele, C., Mühlethaler, M., Vidal, P. P., 1995. Neurochemistry of the central vestibular pathways. *Brain Res.* 20, 24-46.
- De Zeew, C. I., Berrebi, A. S., 1996. Individual Purkinje cell axons terminate on both inhibitory and excitatory neurons in the cerebellar and vestibular nuclei. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 781, 607-610.
- Furuya, N., Yabe, T., Koizumi, T., 1991. Neurotransmitters regulating vestibular commissural inhibition in the cat. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 481, 205-208.
- Gdowski, G. T., McCrea, R. A., 1999. Integration of vestibular and head movement signals in the vestibular nuclei during whole-body rotation. *J. Neurophysiol.* 82, 436-446.
- Gittins, R., Harrison, P. J., 2004. Neuronal density, size and shape in the human anterior cingulate cortex: a comparison of Nissl and NeuN staining. *Brain Res. Bull.* 63, 155-160.

- Horak, F. B., 2006. Postural orientation and equilibrium: what do we need to know about neural control of balance to prevent falls? *Age and Ageing* 35-S2, ii7–ii11.
- Kohl, R. L., Homick, J. L., 1983. Motion sickness, a modulatory role of the central cholinergic nervous system. *Neurosci. Behav. Rev.* 7, 73-85.
- Kumar, S. S., Buckmaster, P. S., 2007. Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata. *Brain Res.* 1142, 54-60.
- Kumoi, K., Saito, N., Tanaka, C., 1987. Immunohistochemical localization of gamma-aminobutyric acid and aspartate-containing neurons in the guinea pig vestibular nuclei. *Brain Res.* 416, 22-33.
- Matsuoka, I., Ito, J., Sasa, M., Takaori, S., 1983. Possible neurotransmitter involved in excitatory and inhibitory effects from inferior olive to contralateral lateral vestibular nucleus. *Adv. Otorhinolaryngol.* 30, 58-63.
- Menezes, A. A. L., Moreira, L.F.S., Menna-Barreto, L. S., 1997. Ontogeny of the locomotor activity rhythm in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Biol. Rhythm Res.* 27, 319-328.
- Mullen, R. J., Buck, C. R., Smith, A. M., 1992. NeuN, a neuronal specific protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211.
- Newman, J. D., Kenkel, W. M., Aronoff, E. C., Bock, N. A., Zametkin, M. R., Silva, A. C., 2009. A combined histological and MRI brain atlas of the common marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *Brain Res. Rev.* 62, 1-18.
- Nomura, I., Senba, E., Kubo, T., Shiraishi, T., Matsunaga, T., Tohyama, M., Shiotani, Y., Wu, J. Y., 1984. *Brain Res.* 311, 109-118.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier, Amsterdam.
- Precht, W., Schwindt, P. C., Baker, R., 1973. Removal of vestibular commissural inhibition by antagonists of GABA and glycine. *Brain Res.* 62, 222-226.
- Raymond, J., Dememes, D., Nieoullon, A., 1988. Neurotransmitters in vestibular pathways. In *Vestibulospinal control of posture and locomotion*. Progress in Brain Research, vol. 76, O. Pompeiano and J. H. J. Allum, ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 29-
- Rylands, A. B., 1996. Habitat and the evolution of social and reproductive behavior in *Callitrichidae*. *Am. J. Primatol.* 38, 5-18.
- Sato, T., Kawasaki, T., 1991. Identification of the Purkinje cell/climbing fiber zone and its target neurons responsible for eye movement control by the cerebellar flocculus. *Brain Res. Rev.* 16, 39-64.
- Shupak, A., Gordon, C. R., 2006. Motion sickness: Advances in pathogenesis, prediction, prevention, and treatment. *Aviat. Space Environ. Med.* 77, 1213-1223.
- Stephan, H., Baron, G., Schwerdtfeger, W. K., 1980. *The Brain of the Common Marmoset (Callithrix jacchus jacchus)*. Springer-Verlag, Berlin.
- Takeshita, S. T., Sasa, M., Ishihara, K., Matsubayashi, H., Yajin, K., Okada, M., Izumi, R., Arita, K., Kkurusu, K., 1999. Cholinergic and glutamatergic transmission in medial vestibular nucleus neurons responding to lateral roll tilt in rats. *Brain Res.* 840, 99-105.

- Tighilet, B., Lacour, M., 1998. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the vestibular nuclei of normal and unilateral vestibular neurectomized cats. *Eur. J. Neurosci.* 10, 3115-3126.
- Tighilet, B., Lacour, M., 2001. Gamma amino butyric acid (GABA) immunoreactivity in the vestibular nuclei of normal and unilateral vestibular neurectomized cats. *Eur. J. Neurosci.* 13, 2255-2267.
- Usami, S. I., Hozawa, J., Tazawa, M., Jin, H., Matsubara, A., Fujita, S., 1991. Localization of substance P-like immunoreactivity in guinea pig vestibular endorgans and the vestibular ganglion. *Brain Res.* 555, 153-158.
- Vibert, N., Serafin, M., Vidal, P. -P., Mühlethaler, M., 1996. Effects of substance P on medial vestibular nucleus neurons guinea-pig brainstem slices. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1030-1036.
- Vidal, P.-P., Sans, A., 2004. Vestibular system. In *The rat nervous system*, G. Paxinos, ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 965-996.
- Walberg, F., Ottersen, O. P., Rinvik, E., 1990. GABA, glycine, aspartate, glutamate and taurine in the vestibular nuclei an immunocytochemical investigation in the cat. *Exp. Brain Res.* 79, 547-563.
- Yamanaka, T., Sasa, M., Matsunaga, T., 1997. Glutamate as a primary afferent neurotransmitter in the medial vestibular nucleus as detected by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 762, 243-246.
- Yates, B. J., Miller, A. D., Lucot, J. B. 1998. Physiological basis and pharmacology of motion sickness: An update. *Brain Res. Bull.* 47, 395-406.
- Ylikoski, J., Eränko, L., Paivarinta, H., 1984. Substance P-like immunoreactivity in the rabbit inner ear. *J. Laryngol. Otol.* 98, 759-765.
- Zanni, M., Giardino, L., Toschi, L., Galetti, G., Calzà, L., 1995. Distribution of neurotransmitters, neuropeptides, and receptors in the vestibular nuclei. *Brain Res. Bull.* 36, 443-452.

Figure legends

Figure 1. Photomicrographs of Nissl-stained coronal sections and sections immunostained for NeuN at the pontobulbar level, with the demarcation of vestibular nuclei. MV = Medial vestibular nucleus, SV = superior vestibular nucleus, LV = lateral vestibular nucleus, DV = Descending vestibular nucleus, VI = Abducens nerve nucleus, Pr = Prepositus nucleus, SpV = Spinal trigeminal nucleus, tsV = Spinal tract of the trigeminal nerve, A = Ambiguous nucleus, C = Cochlear nuclei, p = Pyramid, Sol = Solitary tract nucleus, X = Dorsal motor nucleus of the vagus, XII = Hypoglossal nerve nucleus, LR = Lateral reticular nucleus, VR = Ventral reticular nucleus. Bar: 1 mm for all the sections.

Figure 2. Immunohistochemical expression of perikaryal glutamate in (A) Superior vestibular nucleus, corresponding to the level in figure 1A; (B) Enlargement of the box in A; (C) Lateral vestibular nucleus, corresponding to the level in figure 1A; (D) Enlargement of the box in C; (E) Descending vestibular nucleus, corresponding to the level in figure 1E; (F) Enlargement of the box in E. Bar: 170 μm in A, C, E; 40 μm in B, D, F.

Figure 3. Immunohistochemical expression of substance P in terminals in (A) Superior vestibular nucleus, corresponding to the level in figure 1A ; (B) Enlargement of the box in A; (C) Lateral vestibular nucleus, corresponding to the level in figure 1A; (D) Enlargement of the box in C; (E) Descending vestibular nucleus, corresponding to the level in figure 1E ; (F) Enlargement of the box in E. Bar: 170 μm in A, C, E; 40 μm in B, D, F.

Figure 4. Immunohistochemical expression of perikaryal ChAT in (A) Medial vestibular nucleus, corresponding to the level in figure 1A; (B) Enlargement of the box in A; (C) Lateral vestibular nucleus, corresponding to the level in figure 1C; (D) Enlargement of the box in C; (E) Descending vestibular nucleus, corresponding to the level in figure 1E; (F) Enlargement of the box in E. Bar: 170 μm in A, C, E; 40 μm in B, D, F.

Figure 5. Immunohistochemical expression of GAD in terminals in (A) Superior vestibular nucleus, corresponding to the level in figure 1A ; (B) Enlargement of the box in A; (C) Lateral vestibular nucleus, corresponding to the level in figure 1C; (D) Enlargement of the box in C; (E) Descending vestibular nucleus, corresponding to

the level in figure 1E ; (F) Enlargement of the box in E. Bar: 170 μm in A, C, E; 40 μm in B, D, F.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)