

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA**

**AFERÊNCIA RETINIANA E CARACTERIZAÇÃO CITOARQUITETÔNICA
DO COMPLEXO PULVINAR DO SAGUI (*Callithrix jacchus*): UMA ANÁLISE
COMPARATIVA ENTRE ADULTOS E IDOSOS.**

RAYANE BARTIRA SILVA DO NASCIMENTO

Natal, 2019

RAYANE BARTIRA SILVA DO NASCIMENTO

**AFERÊNCIA RETINIANA E CARACTERIZAÇÃO CITOARQUITETÔNICA
DO COMPLEXO PULVINAR DO SAGUI (*Callithrix jacchus*): UMA ANÁLISE
COMPARATIVA ENTRE ADULTOS E IDOSOS.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Psicobiologia da Universidade Federal do Rio Grande
do Norte, como requisito para obtenção do título de
Doutor em Psicobiologia.**

Orientador: Prof. Dr. Jeferson de Souza Cavalcante

Natal, 2019

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Nascimento, Rayane Bartira Silva do.

Aferência retiniana e caracterização citoarquitetônica do complexo pulvinar do sagui (*Callithrix jacchus*): uma análise comparativa entre adultos e idosos / Rayane Bartira Silva do Nascimento. - Natal, 2019.

153 f.: il.

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

Orientador: Prof. Dr. Jeferson de Souza Cavalcante.

1. Projeção Retiniana - Tese. 2. CTb - Tese. 3. Imunoistoquímica - Tese. 4. Pulvinar - Tese. 5. *Callithrix jacchus* - Tese. I. Cavalcante, Jeferson de Souza. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 611.843

**TÍTULO: AFERÊNCIA RETINIANA E CARACTERIZAÇÃO
CITOARQUITETÔNICA DO COMPLEXO PULVINAR DO SAGUI
(*Callithrix jacchus*): UMA ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE ADULTOS E
IDOSOS.**

AUTORA: Rayane Bartira Silva do Nascimento

DATA DA DEFESA: 30/09/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jeferson de Souza Cavalcante
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) - Orientador

Prof. Dr. Francisco Gilberto Oliveira
Universidade Regional do Cariri (URCA) – Membro Externo

Prof. Dr. José Rodolfo Lopes de Paiva Cavalcanti
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN)

Prof. Dr. Sebastião Pacheco Duque Neto
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof. Dra. Rovena Clara Galvão Januário Engelberth
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus que tem me sustentado com sua poderosa mão e infinita misericórdia.

À minha Mãe Eliane Silva do Nascimento pelo amor incondicional, apoio e dedicação ao longo da minha vida.

Ao meu Esposo Expedito Mendonça pelo amor dedicado e pelo incentivo para que eu alcance meus objetivos.

À minha filha Júlia Hadassa que me fez descobrir através do seu olhar que eu nunca devo desistir.

Aos meus familiares e amigos que participaram indiretamente da construção deste trabalho, mas sempre estiveram ao meu lado.

Ao Professor Jeferson, meu orientador de toda trajetória acadêmica, que prontamente aceitou o desafio de mais uma orientação depositando confiança em mim.

Aos colegas do Lenq pela amizade e momentos de aprendizagem.

Ao Paulo Leonardo que sempre se disponibilizou para ajudar-me.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMO	13
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 – TÁLAMO	19
1.2 – O COMPLEXO PULVINAR	21
1.3 – MODELO EXPERIMENTAL: SAGUI (<i>Callithrix jacchus</i>)	25
1.4 – O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO	26
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 – ANIMAIS	30
4.2 – INJEÇÃO INTRAOCULAR DE TRAÇADOR	31
4.3 – PERFUSÃO	32
4.4 – REMOÇÃO DO ENCÉFALO E MICROTOMIA	32
4.5 – TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA	33
4.6 – MÉTODO DE NISSL	34
4.7 – ANÁLISE DOS RESULTADOS	35
5. RESULTADOS	35
5.1 – DELIMITAÇÃO DO COMPLEXO PULVINAR	35
5.2 – CITOARQUITETURA DO COMPLEXO PULVINAR	39
5.2.1 – MÉTODO DE NISSL	39
5.2.2 – PROTEÍNA NUCLEAR NEURONAL ESPECÍFICA (NEUN)	46
5.2.3 – CALBINDINA (CB)	53
5.2.4 – PROTEÍNA ACÍDICA FIBRILAR GLIAL (GFAP)	60
5.3 – PROJEÇÃO RETINIANA AO COMPLEXO PULVINAR	67
6. DISCUSSÃO	80
6.1 – CITOARQUITETURA PELO MÉTODO DE NISSL	80
6.2 – EXPRESSÃO DE NEUN	81
6.3 – IMUNORREATIVIDADE À CALBINDINA	83

6.4 – EXPRESSÃO DE GFAP	84
6.5 – FIBRAS/TERMINAIS IMUNORREATIVOS A CTB	85
7. CONCLUSÕES	88
8. REFERÊNCIAS	89
MANUSCRITO	107
ANEXOS	152

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via visual clássica ilustrando o núcleo geniculado lateral como um relé entre a retina e o córtex visual (Self e Roelfsema, 2019).

Figura 2: Diagrama esquemático das principais conexões na via visual não clássica (Møller, 2003).

Figura 3: Núcleos talâmicos (Netter, 2003).

Figura 4: Subdivisões do complexo pulvinar (Grieve *et al.*, 2000).

Figura 5: *Callithrix jacchus* em ambiente natural.

Figura 6: Delimitação do complexo pulvinar do tálamo em saguis adultos em secções coronais nos níveis rostral (A), médio (B) e caudal (C), a partir da utilização de técnicas de coloração. Em A1, B1 e C1 Nissl, A2, B2 e C2 e A3, B3 e C3 imunistoquímica para NeuN e CB, respectivamente. A4, B4 e C4 são os esquemas resultante do enquadramento das secções. *Ver lista de abreviações.* A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Barra de escala de 300µm.

Figura 7 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto e idoso mostrando a citoarquitetura do complexo pulvinar em níveis rostral (A e B), médio (C e D) e caudal (E e F) pelo método de Nissl. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões em cada nível mostradas em maior aumento em A1-3, B1-3, C1-3, D1-3, E1-3 e F1-3, respectivamente. *Ver lista de abreviações.* A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A, B, C, D e F barra de escala de 300µm; em A1-3, B1-3, C1-3, D1-3, E1-3 e F1-3, barra de escala de 50µm.

Figura 8: Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto e idoso mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à NeuN em níveis rostral (A e B), médio (C e D) e caudal (E e F), através de imunistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões em cada nível mostradas em maior aumento em A1-3, B1-3, C1-3, D1-3, E1-3 e F1-3, respectivamente. As cabeças de setas indicam a presença de células com morfologia diferenciadas e a linha evidencia a organização linear das células. *Ver lista de abreviações.* A distância caudal (+) ao bregma

(em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A, B, C, D e F barra de escala de 300 μ m; em A1-3, B1-3, C1-3, D1-3, E1-3 e F1-3, barra de escala de 50 μ m.

Figura 9: Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto e idoso mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à CB em níveis rostral (A e B), médio (C e D) e caudal (E e F), através de imunoistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões em cada nível mostradas em maior aumento em A1-3, B1-3, C1-3, D1-3, E1-3 e F1-3, respectivamente. As cabeças de setas indicam a presença de células com morfologia diferenciadas. Em A1-3, B1-3, C1-3, D1-3, E1-3 e F1-3, é possível observar a distribuição celular. *Ver lista de abreviações.* A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A, B, C, D e F barra de escala de 300 μ m; em A1-3, B1-3, C1-3, D1-3, E1-3 e F1-3, barra de escala de 50 μ m.

Figura 10: Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à GFAP em níveis rostral (A e B), médio (C e D) e caudal (E e F), através de imunoistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões em cada nível mostradas em maior aumento em A1-3, B1-3, C1-3, D1-3, E1-3 e F1-3, respectivamente. *Ver lista de abreviações.* A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A, B, C, D e F barra de escala de 300 μ m; em A1-3, B1-3, C1-3, D1-3, E1-3 e F1-3, barra de escala de 50 μ m.

Figura 11 – Fotomicrografia em campo claro de secção coronal do encéfalo do sagui adulto (A) e idoso (B) em nível médio. A área pontilhada representa seleção da subdivisão inferior medial, local da aferência retiniana. Em A1-4 (sagui adulto) e B1-5 (idoso) representam maior aumento (A1 e B1, 10X; A2 e B2, 20X; (A3 e B3, 40X). As áreas pontilhadas em A1 e B1 representam seleção da subdivisão inferior medial, local da aferência retiniana. Em A2 e B2 observamos a presença de fibras e botões imunorreativos a CTb. O tipo de fibra *en passant* é visualizado em A3 e B3. As áreas selecionadas em C estão representadas em C1. O desenho das fibras e botões estão ilustrados em C2 e B5 (animal adulto e idoso, respectivamente). Em A4 e B4, inversão de cores no Software Canvas X. Em A e B, barra de escala de 300 μ m. Em A1 e B1, barra de escala de 100 μ m. Em A2, B2 e C, barra de escala de 50 μ m. Em A3, B3, A4, B4, B5, C1 e C2, barra de escala de 20 μ m.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista dos animais utilizados.

Tabela 2: Lista das substâncias utilizadas com especificações.

LISTA DE ABREVIATURAS

- APul** – Núcleo pulvinar anterior
Aq – Aqueduto cerebral
bsc – Braço do colículo superior
CB – Calbindina
Chat – Colina acetiltransferase
CS – Colículo superior
CTb – Subunidade b da toxina colérica
DAB – Diaminobenzidina
eml – Lâmina medular externa
GABA – Ácido gama amino-butírico
GAD – Glutamato descarboxilase
GFAP – Proteína acídica fibrilar glial
GLD – Núcleo geniculado lateral dorsal
GM – Núcleo geniculado medial
Glu – Glutamato
IPul – Núcleo pulvinar inferior
IPulCM – Pulvinar inferior centromedial
IPulCL – Pulvinar inferior centrolateral
IPulM – Pulvinar inferior medial
IPulP – Pulvinar inferior posterior
LPul – Núcleo pulvinar lateral
MPul – Núcleo pulvinar medial
MT – Área temporal medial
NaCl – Cloreto de sódio
NeuN – Proteína nuclear neuronal específica
nNOS – Óxido nítrico sintetase
NSQ – Núcleo supraquiasmático
PI – Pulvinar inferior
PL – Pulvinar lateral
Pla – Núcleo pulvinar anterior
Pli – Núcleo pulvinar inferior

Plm – Núcleo pulvinar medial
PlI – Núcleo pulvinar lateral
PM – Pulvinar medial
PIP – Pulvinar inferior posterior
PIM – Pulvinar inferior medial
PIC – Pulvinar inferior central
PIL – Pulvinar inferior lateral
PILS – Pulvinar inferior lateral dorsal
PV – Parvalbumina
Rt – Núcleo reticular
3v – Terceiro ventrículo

RESUMO

O complexo pulvinar desempenha um papel fundamental no processamento e transmissão de informações entre áreas corticais. Este complexo recebe entradas de várias áreas dos principais sistemas sensoriais, assim como do córtex, e se projeta para áreas de associação do córtex cerebral sendo considerado dessa forma como um complexo associativo. Essa estrutura não é identificável em roedores ou em outros pequenos mamíferos. No entanto, em primatas o complexo pulvinar ocupa grande parte do tálamo e é um componente do sistema visual subcortical, visto que este recebe aferências da retina e colículo superior e apresenta conexões recíprocas para várias áreas do neocórtex. Classicamente, essa estrutura apresenta quatro subdivisões baseadas na densidade neuronal e distribuição de fibras: inferior, medial, lateral e anterior, sendo as três primeiras envolvidas no processamento visual. A senescência inclui alterações desenvolvidas no organismo de um ser vivo, diretamente relacionadas a sua evolução no tempo, sem nenhum mecanismo de doença reconhecido. Já a senilidade, pode ser definida como condições que afetam o indivíduo no decorrer da vida baseadas em mecanismos fisiopatológicos. Dessa forma, o envelhecimento pode ser caracterizado como um processo biológico de diminuição da função fisiológica que envolve alterações neurológicas associadas ao declínio cognitivo, podendo o indivíduo ser acometido de doenças neurodegenerativas durante o avanço da idade. O sagui (*Callithrix jacchus*) é um primata do Novo Mundo de hábito diurno e orientação visual que vem sendo utilizado em pesquisas biomédicas em virtude da sua proximidade filogenética com seres humanos. Nosso objetivo foi realizar uma caracterização citoarquitetônica do complexo pulvinar nesta espécie realizando uma análise comparativa entre dois grupos: animais adultos e animais idosos, evidenciando suas subdivisões e identificando a distribuição dos neurônios, terminais axônicos e células gliais nas subdivisões deste complexo. Para tanto foram utilizadas técnicas histoquímica e imunoistoquímica, além de injeção intraocular de traçador neuronal para exibir as subdivisões, distribuição neuronal, células gliais, além de fibras/terminais neste complexo. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFRN (CEUA-UFRN Nº 009.013/2017). Nossos resultados confirmam a presença de subdivisões no complexo pulvinar em núcleo pulvinar anterior (APul), núcleo pulvinar medial (MPul), núcleo pulvinar lateral (LPul) e núcleo pulvinar inferior (IPul) apresentando este último quatro subnúcleos: pulvinar inferior centrolateral (IPulCL), pulvinar inferior centromedial (IpulCM), pulvinar inferior medial (IPulM) e pulvinar inferior posterior (IPulP). O complexo pulvinar apresentou ao longo

da sua extensão rostrocaudal, neurônios imunorreativos à proteína nuclear neuronal específica (NeuN), à proteína ligante de cálcio calbindina (CB), além de células gliais imunorreativas à proteína acídica fibrilar glial (GFAP). Os dados em animais idosos diferem dos animais adultos, visto que os animais idosos apresentam uma menor intensidade de marcação celular à NeuN e à CB e menor intensidade de marcação à GFAP. A presença de fibras/terminais imunorreativos a subunidade b da toxina colérica (CTb) foi bem evidenciada no IPul apenas no subnúcleo medial, contralateral ao olho injetado, caracterizando a presença de projeção direta da retiniana à este núcleo. Nos animais idosos, a projeção retiniana mostra-se discreta quando comparada aos animais adultos. Apesar de ser um estudo de caráter qualitativo, nossos dados apontam diferenças entre animais adultos e idosos sugerindo que o complexo pulvinar pode sofrer uma perda significativa de caráter funcional quanto ao processamento da informação visual.

Palavras-chave: Projeção Retiniana, CTb, Imunoistoquímica, Pulvinar, *Callithrix jacchus*.

ABSTRACT

The pulvinar complex plays a key role in the processing and transmission of information between cortical areas. This nucleus receives inputs from various areas of major sensory systems, such as the cortex, and projects to areas of association of the cerebral cortex, and is thus considered as an associative nucleus. This structure is not identifiable in rodents or other small mammals. However, in primates or pulvinar complex it occupies much of the thalamus and is a component of the subcortical visual system as it receives afferences from the retina and superior colliculus and exhibits the necessary notifications for various areas of the neocortex. Classically, this structure has four subdivisions based on neuronal density and fiber distribution: inferior, medial, lateral and anterior, being the first three involved in visual processing. Senescence includes changes in the organism of a living being, directly related to its evolution in time, without any recognized disease mechanism. Senility, on the other hand, can be defined as conditions that affect the individual throughout his life based on pathophysiological mechanisms. Thus, aging can be characterized as a biological process of decreased physiological function that involves neurological changes associated with cognitive decline, and the individual may be affected by neurodegenerative diseases during advancing age. The marmoset (*Callithrix jacchus*) is one of the New World primates of daytime habit and visual guidance, which is used in biomedical research because of its phylogenetic proximity to humans. Our objective was to perform a cytoarchitectonic characterization of the pulvinar complex in this species by performing a comparative analysis between two groups: adult and elderly animals, showing their subdivisions and identifying a distribution of neurons, axonal terminals and glial cells and subdivisions of this complex. For this purpose, histochemical and immunohistochemical techniques were used, as well as intraocular injection of neuronal tracker to display as subdivisions, neuronal distribution, glial cells, and currently complex fibers/terminals. All experiments were approved by the Animal Use Ethics Committee of UFRN (CEUA-UFRN N°. 009.013/2017). Our results confirm the presence of subdivisions in the pulvinar complex in the anterior pulvinar nucleus (APul), medial pulvinar nucleus (MPul), lateral pulvinar nucleus (LPul) and inferior pulvinar nucleus (IPul) presenting the latter four subnuclei: inferior pulvinar centromedial (IpulCM), inferior medial pulvinar (IPulM) and posterior inferior pulvinar (IPulP). The pulvinar complex presents along its rostrocaudal extension, immunoreactive neurons to the specific neuronal nuclear protein (NeuN), the calcium binding protein calbindin (CB), besides glial cells immunoreactive to the glial fibrillar

acidic protein (GFAP). Data in elderly animals differ from adult animals, as older animals have a lower intensity of cell labeling in NeuN and CB and a lower intensity of labeling in GFAP. The presence of immunoreactive fibers/terminals in the subunit b of the cholera toxin (CTb) was well evidenced in the IPul only in the medial subnucleus, contralateral to the injected eye, characterizing the presence of direct retinal projection in this nucleus. In older animals, a retinal projection shows discrete when compared to adults animals. Despite being a qualitative study, our data indicate differences between adult and elderly animals, suggesting that the pulvinar complex may suffer a significant loss of functional character during the processing of visual information.

Keywords: Retinal Projection, CTb, Immunohistochemistry, Pulvinar, *Callithrix jacchus*.

1. INTRODUÇÃO

A visão é uma das cinco modalidades sensoriais que fornece à várias espécies de animais a capacidade de detecção de objetos. Isso ocorre através da interação de sinais luminosos oriundos do meio com receptores especializados situados em um órgão responsável pela captação da luz, o olho. Esse órgão apresenta várias estruturas que, em conjunto, proporcionam a captação dos raios de luz emitidos ou refletidos por objetos do ambiente e a focalização destes raios sobre a retina, para a formação de imagens. A retina apresenta uma organização laminar onde são encontrados diferentes tipos celulares estando estes organizados em camadas distintas que conferem a ela uma aparente simplicidade estrutural contrastando com sua grande complexidade funcional (Masland & Raviola, 2000). As células fotorreceptoras retinianas são os cones e os bastonetes. Ambas são encarregadas da transdução da informação fótica e estabelecem contatos sinápticos com as células bipolares e estas por sua vez com as células ganglionares cujos axônios convergem e emergem do olho formando o nervo óptico, o qual irá estabelecer a conexão da retina com o encéfalo (Connors et al., 2002; Lent, 2005; Field e Chichilnisky, 2007; Bao, 2008).

O sistema visual apresenta dois diferentes tipos de vias aferentes conhecidas como via clássica e via não clássica. A via clássica, ou via retino-geniculo-cortical, é a principal via visual em vertebrados superiores que transmite a informação da retina para o córtex visual primário utilizando o núcleo geniculado lateral do tálamo (GLD) como seu núcleo relé (Figura 1). A via não clássica tem pelo menos duas partes, uma que transmite a informação luminosa para o colículo superior (CS) e a outra que envolve o núcleo pré-tectal e o pulvinar do tálamo (Figura 2). O papel da via não clássica inclui análise visual de espaço, percepção da forma global, mediando vários reflexos visuais. Existe ainda uma terceira via que fornece aferências para o núcleo supraquiasmático no hipotálamo (NSQ), o qual está envolvido na manutenção do ritmo circadiano; e para outras áreas hipotalâmicas que entre outras funções, exerce controle endócrino (Møller, 2003).

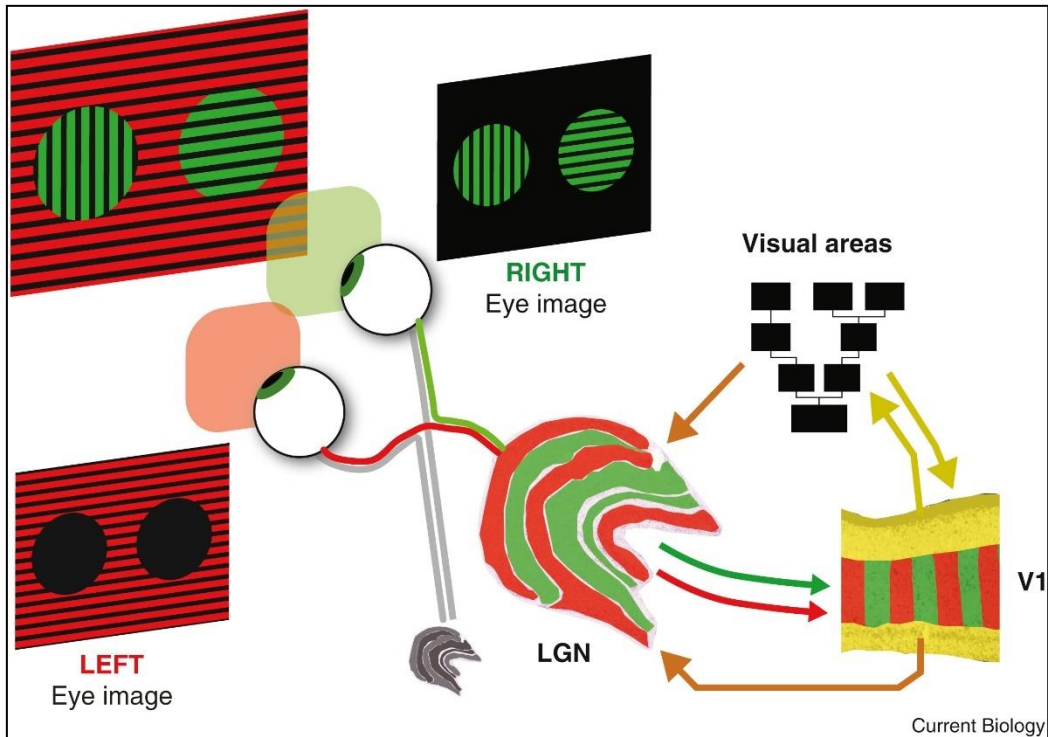


Figura 1: Via visual clássica ilustrando o núcleo geniculado lateral como um relé entre a retina e o córtex visual (Adaptado de Self & Roelfsema, 2019).

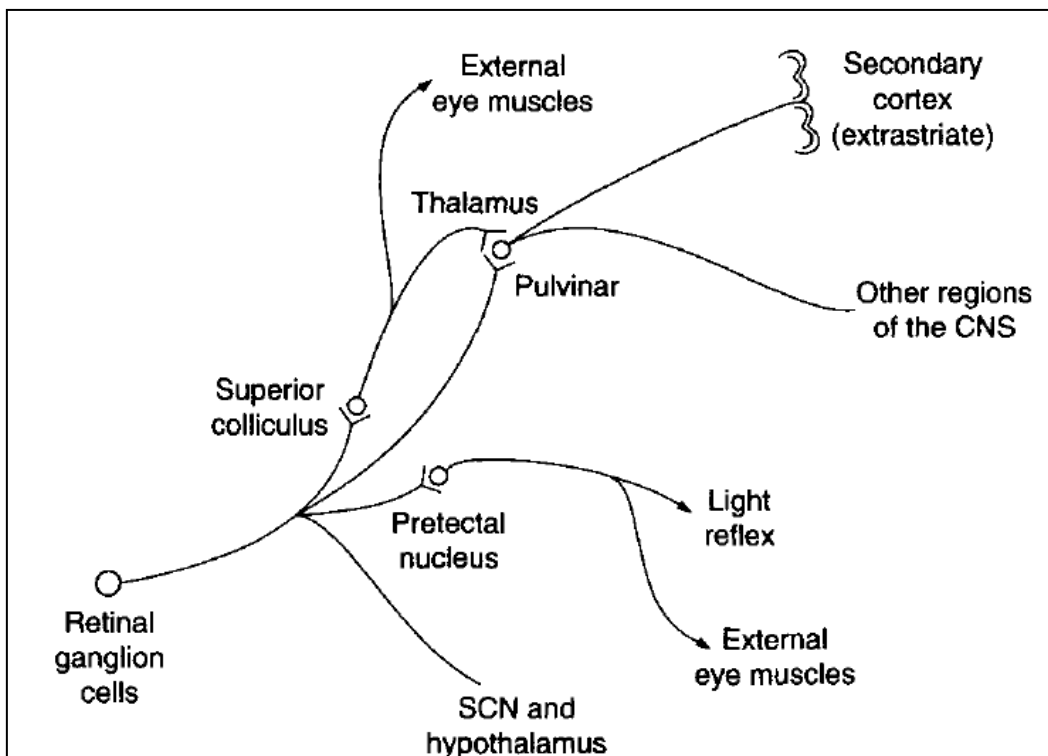


Figura 2: Diagrama esquemático das principais conexões na via visual não clássica (Adaptado de Møller, 2003).

1.1 TÁLAMO

A informação sensorial, com exceção da olfativa, proveniente dos receptores na periferia, bem como das vísceras, são direcionadas ao tálamo. Pensava-se que este atuava apenas como uma estação retransmissora da informação sensorial ao córtex cerebral, no entanto estudos apontam que o tálamo controla o fluxo de informação para o córtex, visto que há nesta estrutura uma organização especializada com vias inibitórias que contribuem para a seleção da informação que atravessa o tálamo em direção ao córtex cerebral (Basso et al., 2005; Sherman, 2007).

Embora esteja presente em todos os grupos de vertebrados, o tálamo é mais altamente desenvolvido em mamíferos, especialmente em primatas. Praticamente todos os sistemas sensoriais passam através do tálamo no seu trajeto ao córtex cerebral e, por sua vez, cada região do tálamo recebe projeções a partir da área cortical que este projetou. O tálamo representa a maior porção do diencefalo, que é um complexo nuclear localizado na extremidade rostral do tronco encefálico. Essa estrutura se estende a partir da região da comissura posterior para a região do forame interventricular. Este é delimitado lateralmente pela porção posterior da cápsula interna, a cauda do núcleo caudado e a estria terminal. O terceiro ventrículo separa o tálamo em duas metades simétricas exceto na região da aderência intertalâmica onde as superfícies mediais do tálamo estão em continuidade (Carpenter, 1995).

O diencefalo pode ser dividido com base em suas conectividades em epitálamo, tálamo dorsal e tálamo ventral. O epitálamo compreende os núcleos paraventricular anterior e posterior e o núcleo habenular. Este nem envia nem recebe fibras do córtex cerebral, embora haja relatos da presença de projeção cortical ao núcleo paraventricular. No entanto, essa estrutura tem afinidade com o hipotálamo. O tálamo ventral inclui o núcleo reticular, o núcleo geniculado lateral ventral e a zona incerta que recebe aferências a partir do córtex cerebral, mas não projeta para o córtex. Já o tálamo dorsal é a maior das divisões talâmicas. Este apresenta conexões recíprocas com o córtex cerebral e estriado (Carpenter, 1995; Jones, 2007).

Com base em dados morfológicos e funcionais o tálamo é subdividido em nove grupamentos nucleares: grupo nuclear anterior, grupo nuclear medial, grupo nuclear da linha média, grupo nuclear intralaminar, grupo nuclear lateral, grupo nuclear ventral, grupo nuclear posterior, grupo nuclear geniculado e núcleo reticular (Figura 3) (Carpenter, 1995).

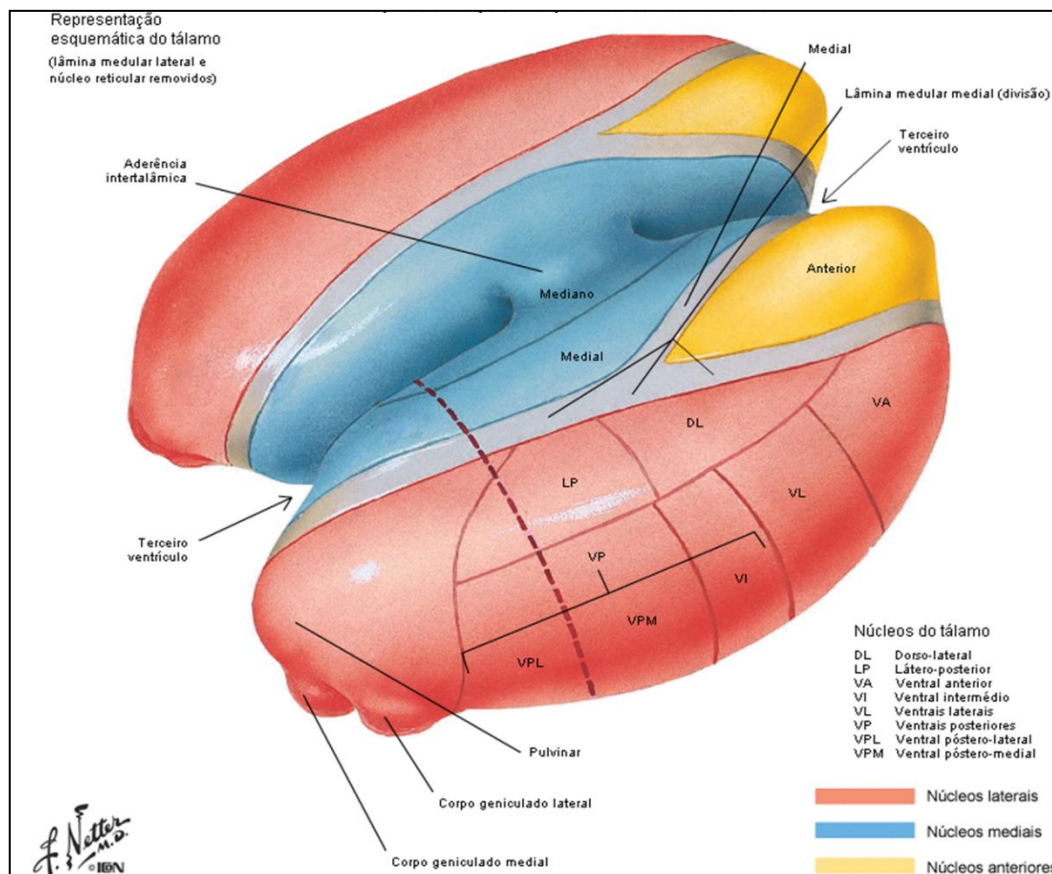


Figura 3: Núcleos talâmicos (Adaptado de Netter, 2003).

Os núcleos do grupo anterior recebem fibras dos núcleos mamilares do hipotálamo e do hipocampo e projetam fibras para o giro do cíngulo, estando seu papel relacionado com memória e comportamento emocional. Medialmente à lâmina medular interna, estão localizados os grupos medial e da linha média. O grupo medial consiste principalmente no núcleo mediodorsal ou dorsomedial. Este grande núcleo talâmico apresenta três subdivisões, cada qual conectada a uma porção específica do córtex frontal. O núcleo mediodorsal recebe aferências de partes dos núcleos da base, da amígdala, e do mesencéfalo estando seu papel relacionado à memória. Já o grupo nuclear da linha média encontra-se na substância cinzenta periventricular da metade dorsal da parede ventricular e na aderência intertalâmica. Este grupo apresenta conexões com o hipotálamo e, possivelmente relacionam-se com funções viscerais (Carpenter, 1995).

No interior da lâmina medular interna existem pequenas massas de substância cinzenta que constituem os núcleos intralaminares do tálamo, pertencentes aos núcleos talâmicos inespecíficos que recebem fibras da formação reticular exercendo um importante papel ativador sobre o córtex cerebral. Os núcleos do grupo lateral compreendem núcleos situados

lateralmente à lâmina medular interna, e consistem em três massas nucleares organizados na sequência rostrocaudal em núcleo lateral dorsal, núcleo lateral posterior e pulvinar. Esse último apresenta subdivisões e conexões com os córtices temporal, parietal e occipital, bem como, com o colículo superior e outros núcleos do tronco encefálico relacionados à visão (Grieve et al., 2000). O grupo nuclear ventral é composto pelos núcleos ventral anterior, ventral lateral e ventral posterior. Esse grupamento nuclear está envolvido com a retransmissão de impulsos sensoriais específicos para regiões corticais (Carpenter, 1995).

O grupamento nuclear posterior apresenta-se como uma zona diencefálica de transição com uma complexa e variada morfologia celular, situando-se caudal ao núcleo ventral posterolateral, medial a parte rostral do pulvinar e dorsal ao corpo geniculado medial. Este grupamento nuclear recebe fibras do lemnisco medial do trato espinotalâmico, e parece estar envolvido na nocicepção, além de receber projeções do córtex somatossensorial primário. O grupo nuclear geniculado compreende o núcleo geniculado medial, relé auditivo talâmico recebendo fibras do colículo inferior, e o núcleo geniculado lateral, principal relé do sistema visual. Constituído por uma fina lâmina de substância cinzenta, o núcleo reticular do tálamo não tem projeções para o córtex cerebral, no entanto é atravessado pela quase totalidade das fibras tálamo-corticais e córtico-talâmicas que ao atravessar o núcleo reticular emitem colaterais que nele estabelecem sinapses. Dessa forma, o núcleo reticular do tálamo estabelece suas conexões com os demais núcleos talâmicos exercendo uma ação moduladora sobre esses núcleos (Carpenter, 1995).

1.2 O COMPLEXO PULVINAR

O complexo pulvinar é um dos componentes dos núcleos específicos do tálamo estando relacionado com áreas de associação do córtex, envolvido em mecanismos integrativos superiores. Essa estrutura ocupa uma função no córtex visual extraestriado que é equivalente a função do núcleo geniculado lateral no sistema visual primário lidando com o processamento visuomotor e percepção visual (Stepniewska, 2004).

Em primatas, o pulvinar e o núcleo lateral posterior estão intimamente associados topograficamente e apresentam muitas semelhanças no que diz respeito à morfologia e conexões. Este último é um grupamento neuronal talâmico que se encontra dorsal ao núcleo ventral posterior e caudal ao núcleo lateral dorsal, localizado na superfície do tálamo e se estende ao longo da borda superior da lâmina medular interna (Jones, 2007).

Secções coradas pelo método de Nissl em humanos e *Macaca mulatta* apontam que este complexo apresenta quatro subdivisões (Figura 4): núcleo pulvinar medial (P_{med}), núcleo pulvinar lateral (P_{lat}), núcleo pulvinar inferior (P_{inf}) e núcleo pulvinar anterior (P_{ora}) (Olszewski, 1952; Hirai & Jones, 1989a; Grieve et al., 2000; Shipp, 2003).

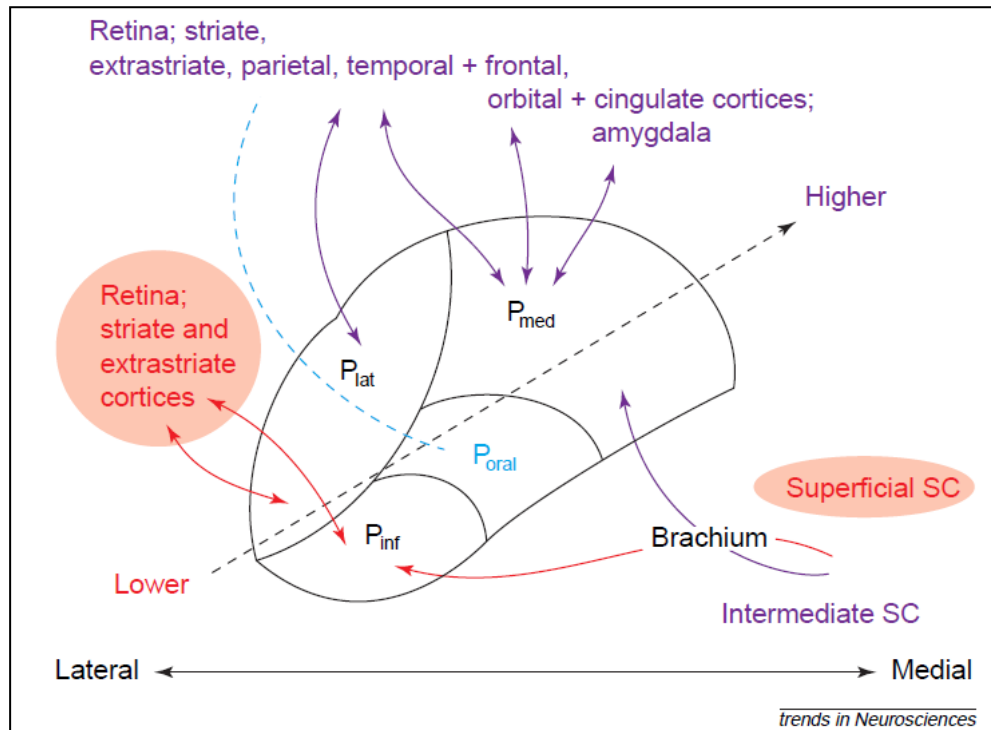


Figura 4: Subdivisões do complexo pulvinar (Adaptado de Grieve et al., 2000).

O núcleo pulvinar medial está situado dorsomedialmente intervindo nos limites do núcleo suprageniculado e a divisão medial da lâmina medular externa, se sobrepõe e se funde com a porção anterior do mesencéfalo. Suas células são relativamente pequenas, dispersas e com pálida marcação. Bos e Benevento (1975) mostram projeções do núcleo pulvinar medial ao córtex frontal em *Macaca mulatta*. Estudos utilizando traçadores demonstraram que o pulvinar medial recebe informações de várias áreas corticais, incluindo o córtex pré-frontal e temporal (Romanski et al., 1997). Algumas zonas dentro do pulvinar medial recebem informações do colículo superior (Benevento & Standage, 1983). A existência dessa projeção colículo-pulvinar medial, juntamente com as projeções conhecidas do pulvinar medial para a amígdala indicam que o pulvinar é um relé subcortical para certos tipos de informação visual para a amígdala (Jones & Burton, 1976).

O núcleo pulvinar lateral está situado dorsolateralmente, adjacente a divisão lateral da lâmina medular externa e posterior ao núcleo ventral posterior e ao núcleo lateral posterior.

Apresenta células semelhantes em tamanho às encontradas no núcleo pulvinar medial, no entanto estas revelam uma forte marcação estando divididas em conjuntos lineares pelos feixes de fibras do trato córtico-tectal que atravessam o núcleo (Jones, 2007). Experimentos recentes sugerem que as projeções do pulvinar lateral podem ter um forte papel na atividade reguladora no córtex, com consequências a jusante para o processamento visual e comportamento (Purushothaman, et al., 2012).

O núcleo pulvinar inferior estende-se da face ventral do núcleo pulvinar lateral, formando uma massa visível apenas lateralmente à parte posterior do complexo geniculado medial; e se insinua anteriormente entre os núcleos geniculado medial e lateral. Suas células apresentam forte marcação e estão mais agrupadas comparadas aos outros núcleos do complexo pulvinar. Embora a maioria seja relativamente pequena, entre elas existem células de tamanho grande e dispersas. Em torno da região onde o trato córtico-tectal e o braço do colículo superior se fundem, as células do núcleo pulvinar inferior são mais fortemente marcadas (Jones, 2007).

O núcleo pulvinar anterior estende-se desde o núcleo pulvinar medial e núcleo lateral posterior entre o centro mediano e o núcleo ventral posterior. Grande parte da sua extensão é separada do núcleo ventral posterior medial por uma fina lâmina de fibras. Suas células são as menores com pálida marcação e mais dispersas que as encontradas nos outros núcleos do pulvinar (Jones, 2007).

Todas as regiões do pulvinar recebem informações convergentes do córtex cerebral, além de contribuição de outras estruturas não-corticais (Benevento & Standage, 1983; Nakagawa & Tanaka, 1984).

Análise citoarquitetônica em *Cebus* indicam a presença de três subdivisões no complexo pulvinar: o pulvinar medial (PM) um núcleo grande e homogêneo, o pulvinar lateral (PL) contendo células que são separadas em aglomerados por muitas fibras que passam horizontalmente através deste núcleo e, o pulvinar inferior (PI) um núcleo compacto e com células fortemente marcadas, separado do restante do pulvinar pelo braço do colículo superior (Soares et al., 2001).

Dados anteriores em humanos apontam que pelo menos alguns dos neurônios do pulvinar tem origem telencefálica (Rakic & Sidman, 1969) estando essa estrutura intimamente ligada ao telencéfalo mais que outros núcleos talâmicos (Mathers, 1972 a,b). Um estudo recente de neuroimagem aponta que anormalidades no pulvinar possivelmente refletem a hiperexcitação epileptogênica de diferentes áreas corticais através de suas conexões com essa estrutura talâmica (Ohe et al., 2014).

O complexo pulvinar recebe terminais da retina, do colículo superior, do córtex visual e do complexo pré-tectal onde cada área se projeta para áreas particulares dessa estrutura (Berman & Jones, 1977). Estudos anteriores já indicavam a presença de terminais retinianos no pulvinar de primatas (Hassler, 1966). Um estudo prévio envolvendo lesões no pulvinar não revelou grandes déficits visuais (Chow, 1954), no entanto, porções do pulvinar estão claramente implicados nas funções visuais, uma vez que, este recebe projeções do colículo superior e projeta-se para áreas do córtex occipital, temporal e parietal (Chow, 1950; Allman et al., 1972; Rezac & Benevento, 1979). Petersen e colaboradores (1987) sugerem um papel do pulvinar na atenção visuo-espacial. Em humanos foi observada uma diminuição no tamanho do núcleo pulvinar inferior em indivíduos que apresentam anoftalmia, uma malformação congênita caracterizada pela ausência de um ou de ambos os olhos (Hassler, 1966). Em 1970 Campos-Ortega e colaboradores verificaram a presença de aferências diretas da retina para o núcleo pulvinar inferior em *Macaca mulatta* e babuínos (*Papio ursinus ursinus*). Itaya e Van Hoesen (1983) demonstraram a presença de projeções retinianas predominantemente contralateral no núcleo pulvinar medial e, bilateral no núcleo pulvinar inferior em *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis*. Dados neuroquímicos do complexo pulvinar em *Saimiri* e em *Macaca* usando calbindina, parvalbumina, e citocromo-oxidase (Cusick et al., 1993; Gutierrez et al., 1995; Gray et al., 1999) sugerem uma subdivisão do pulvinar inferior destas espécies em cinco porções: posterior (PIP), medial (PIM), central (PIC), lateral (PIL) e lateral dorsal (PILS) semelhante ao padrão visto posteriormente em *Cebus* (Soares et al., 2001).

Estudos prévios relatam que o pulvinar do gato provavelmente não recebe projeções diretas do trato óptico (Garey & Powell, 1968; Singleton & Peele, 1965) ou de qualquer outro sistema sensorial. No entanto, estudos posteriores apontam algumas células do núcleo lateral posterior/complexo pulvinar com ativação multissensorial responsivas a estímulos auditivos e somatossensoriais (Rauschecker & Friederichs, 1983) e a presença de aferências retinianas ao núcleo pulvinar bilateralmente sugerindo que o núcleo pulvinar do gato pode ser o equivalente do núcleo pulvinar inferior de primatas (Berman & Jones, 1977). Dados imunoistoquímicos relatam a expressão de óxido nítrico sintetase (nNOS) nas células, bem como, nos terminais axônicos do complexo pulvinar/núcleo lateral posterior em gatos durante o desenvolvimento, e isso pode contribuir para a estabilização de sinapses e o estabelecimento de conexões córtico-talâmicas (Carden et al., 2003). Além disso, foram identificados neurônios no complexo pulvinar/núcleo lateral posterior contendo glutamato (Glu) e ácido gama-aminobutírico

(GABA), bem como, a presença de calbindina (CB) e parvalbumina (PV) (Palestine et al., 1993).

O complexo pulvinar se projeta para importantes núcleos do sistema límbico incluindo a amígdala e o córtex cingulado, estando envolvido no processamento de estímulos com conteúdo emocional, visto que, os níveis de serotonina são elevados em regiões do pulvinar humano e lesões nessa estrutura promovem um déficit no reconhecimento da expressão facial de medo (Oke et al., 1997; Ward et al., 2005; Ward et al., 2007; Young et al., 2007). Um estudo recente aponta que neurônios do pulvinar podem mediar conexões intracorticais, assim como, uma via subcortical rápida para a amígdala evidenciando uma função do pulvinar no processamento de estímulos emocionais faciais (Maior et al., 2010). Villeneuve e colaboradores (2005) consideram o pulvinar humano como um componente necessário na integração do movimento complexo devido à sua grande relação funcional com áreas corticais e, estudos com pacientes esquizofrênicos relatam uma redução do volume do pulvinar, acompanhado por uma diminuição do número de neurônios o que representa défices na integração multimodal (Byne, 2002; Byne et al., 2007).

1.3 – O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO

O envelhecimento é um fenômeno complexo que afeta todos os sistemas orgânicos (Mattison & Vaughan, 2017). Esse processo biológico pode ser definido como o acúmulo sistêmico de moléculas disfuncionais que excedem a capacidade de reparo ou substituição, aumentando dessa forma a vulnerabilidade do indivíduo às patologias relacionadas com a idade (Bengtson & Serttersten Jr et al., 2016). Essas disfunções podem ser ocasionadas por estresse oxidativo (Muller et al., 2007) e disfunção mitocondrial (Bishop et al., 2010).

De acordo com o Fundo de População das Nações Unidas, o envelhecimento populacional é uma das tendências mais significativas do século XXI (UNFPA, 2012). Globalmente, a proporção de pessoas idosas está crescendo em uma taxa mais rápida do que a população em geral (NIH, NIA e GHA, 2011). Atualmente, uma em cada nove pessoas em todo o mundo, tem 60 anos de idade ou mais. Essa expansão do envelhecimento é um desafio considerável para os sistemas de saúde mostrando a necessidade urgente de investigação biomédica visando uma melhor compreensão do envelhecimento biológico, bem como a biologia e tratamento de doenças específicas relacionadas com a idade (Colman, 2018).

Estudos apontam que durante o processo de envelhecimento ocorrem alterações das funções cognitivas (Pace-Schott & Spencer, 2011), além de alterações morfológicas e neuroquímicas nos componentes centrais do sistema de temporização circadiano, tanto em roedores quanto em primatas não-humanos (Lupi et al., 2012; Engelbert et al., 2013; 2014; Fiuza et al., 2016). Essas modificações também ocorrem em outras áreas do sistema nervoso provocando alterações em neurotransmissores, atrofia da substância cinzenta total (Oh et al., 2014), mudanças no tamanho do soma e dendritos (Duan et al., 2003), promovendo dessa forma um desequilíbrio funcional (Waldvogel et al, 1991).

1.4 – MODELO EXPERIMENTAL: SAGUI (*Callithrix jacchus*)

Popularmente chamado de sagui, *Callithrix jacchus* é um membro do filo Chordata, classe Mammalia, ordem Primates, família Callithricidae. É um primata neotropical, frequentemente encontrado nos estados do Nordeste brasileiro (Vivo, 1991). Apresenta pequeno porte, medindo cerca de 30 cm de corpo e mais 17 cm de cauda, o que confere equilíbrio ao animal. O seu peso varia entre 230g a 420g. Como características diagnósticas da espécie, apresentam tufos circum-auriculares brancos, mancha branca mediana presente na frente (Figura 5); manto distinto estendendo-se até os ombros, terço posterior do dorso apresentando padrão estriado de coloração; ventre castanho escuro agrisalhado; cauda anelada, anéis cinza-claro estreitos e anéis negros-agrisalhados mais largos (Vivo, 1991). Esses animais alimentam-se de frutos, gomas, invertebrados e vertebrados pequenos (Castro & Araújo, 2007). Os saguis apresentam o hábito diurno, e como os outros primatas em geral, são animais de orientação essencialmente visual e extremamente vigilantes, passando grande parte do seu tempo examinando os arredores (Tardif et al., 2006). Esses animais adquirem maturidade sexual a partir dos 15 meses de idade e a partir dos dois anos de idade ele alcança a vida adulta que se estende até os 8 anos. Eles têm uma expectativa de vida até os 16 anos, no entanto, a partir dos 8 anos surgem as características que denotam a idade como envelhecimento da pele em torno da cabeça e da face e aumento de doenças inflamatórias intestinais (Abbot et al., 2003). Estudos nas últimas décadas têm designado semelhanças e diferenças no processo de envelhecimento do sagui quando comparados a primatas do Velho Mundo e humanos. As semelhanças incluem depósitos de placas senis no córtex cerebral semelhantes às verificadas na doença de Alzheimer (Geula et al., 2002), perda da proteína ligante de cálcio calbindina nos neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal (Iacopino et al., 1990; Wu et al., 2003), perda auditiva (Harada et al.,

1999) e envelhecimento das cartilagens (Berkovitz & Pacy, 2000). As diferenças no processo de envelhecimento envolvem manutenção das funções reprodutivas e manutenção óssea. Nesses animais, ocorre uma diminuição na neurogênese que precede a senilidade (Leuner et al., 2007).



Figura 5: *Callithrix jacchus* em ambiente natural.

2. JUSTIFICATIVA

O complexo pulvinar de várias espécies de primatas tem sido investigado por vários grupos, utilizando diferentes métodos de estudo. A neuroquímica do pulvinar em outros primatas como *Saimiri*, *Cebus* e *Macaca* contrastam com subdivisões diferentes baseadas na densidade neuronal e conectividade cortical (Cusick et al., 1993; Gutierrez et al., 1995; Gray et al., 1999, Soares et al., 2001). O sagui é um modelo experimental de primata não-humano já consolidado em nosso laboratório (Costa et al., 1998; Costa et al., 1999; Nascimento et al., 2010; Cavalcante et al., 2011; Lima et al., 2012; Souza et al., 2013; Engelberth et al., 2013, 2014; Cavalcanti et al., 2016; Duque-Neto, 2019). Nos últimos anos, este tem sido utilizado em pesquisas biomédicas e neurocientíficas em virtude da sua proximidade filogenética com seres humanos (Masnfield, 2003; Mitchell & Leopold, 2015; Riesche et al., 2018; Veyres et al., 2018). Pesquisas sobre o processo de envelhecimento biológico tem sido alvo de vários estudos nas últimas décadas, visto que, o envelhecimento modifica a morfologia e neuroquímica celular, acarretando alterações fisiológicas, resultando dessa forma em modificações na capacidade responsiva dos sistemas cerebrais (Leuner et al., 2007). No entanto, a grande maioria das pesquisas de envelhecimento ocorre em espécies não-primatas. Dessa forma, um estudo comparativo da citoarquitetura e morfologia dos neurônios do complexo pulvinar do tálamo em sagui entre animais adultos e idosos faz-se necessário para elucidar as características das subdivisões dessa estrutura nesta espécie primata, visto que a anatomia e fisiologia, desenvolve-se e envelhece similarmente à humana.

3. OBJETIVOS

- Caracterizar citoarquiteticamente o complexo pulvinar do tálamo em saguis adultos e idosos através da técnica de coloração pelo método de Nissl;
- Comparar a imunorreatividade dos neurônios à proteína nuclear neuronal específica (NeuN) e a calbindina (CB) entre os saguis adultos e idosos;
- Delimitar as subdivisões do complexo pulvinar em saguis adultos através da distribuição neuronal e do caráter morfológico celular por meio da técnica imunoistoquímica utilizando NeuN e CB, combinadas ao método de Nissl;
- Identificar a presença de células gliais nas subdivisões do complexo pulvinar de saguis adultos e idosos através da imunorreatividade a proteína acídica fibrilar glial (GFAP);
- Comparar o padrão marcação de terminais retinianos no complexo pulvinar através da injeção intraocular da Subunidade b da Toxina Colérica (CTb) entre animais adultos e idosos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados 3 saguis adultos (2 fêmeas e 1 macho) com idade entre 4-6 anos e 3 saguis idosos (2 fêmeas e 1 macho) com idade 9-11 anos, conforme tabela 1, provenientes do Núcleo de Primatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) (Licença do IBAMA Nº 1/24/92/0039-0). Neste local os animais foram mantidos em gaiolas de alvenaria e tela de arame, medindo 2,00 x 1,00 x 2,00m, estando expostos as condições de temperatura, umidade e iluminação naturais, com alimentação a base de frutas e água disponível continuamente em bebedouros. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFRN (CEUA-UFRN Nº 009.013/2017 – Anexo A). É importante registrar que muitos dados deste projeto foram obtidos de lâminas preparadas em projeto de doutorado do orientador que foi realizado no ano de 2002 na Universidade de São Paulo e de outro projeto de doutorado realizado na UFRN aprovado pelo CEUA-UFRN Nº 026/2010 (Anexo B). Essas lâminas estão disponíveis no nosso laboratório, desta forma, é justificado o baixo número de animais utilizado. Esses mesmos animais também serão utilizados em outros projetos de pesquisa. Todos os cuidados foram tomados durante o manuseio dos animais, buscando sempre seu bem-estar, bem como minimizar ao máximo qualquer possível estresse e/ou sofrimento. Os procedimentos experimentais seguiram 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”. Uma versão em pdf está disponível gratuitamente no site da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) – <http://www.sbneec.org.br/links>.

Animal Jovem		Animal Idoso	
Animal	Idade	Animal	Idade
Sagui 27 (Fêmea)	4 anos e 2 meses	Sagui Idoso 3 (Fêmea)	11 anos e 7 meses
Sagui CNQ6 (Macho)	4 anos	Sagui Idoso 6 (Macho)	10 anos e 1 mês
Sagui 2 (Fêmea)	6 anos e 3 meses	Sagui Idoso 7 (Fêmea)	9 anos e 11 meses

Tabela 1: Lista dos animais utilizados.

4.2 – INJEÇÃO INTRAOCULAR DE TRAÇADOR

Inicialmente realizamos a investigação das projeções retinianas às subdivisões do complexo pulvinar nesta espécie utilizando a subunidade b da toxina colérica (CTb). Esse traçador neuronal é captado pelo corpo do neurônio e transportado via fluxo axoplasmático aos terminais, não possuindo propriedade transsináptica. Os animais receberam como medicação pré-anestésica o sulfato de atropina na dose de 0,04 mg/kg, e 2mg/kg de tramadol ambos por via subcutânea. Após 15 minutos foi administrado como indutor da anestesia, por via intramuscular, ketamina e xilazina, misturadas na mesma seringa, na dose de 10mg/kg e 0,5mg/kg respectivamente e para manutenção da anestesia foi utilizado isoflurano através de máscara e oxigênio 100%. Realizamos uma injeção intraocular (olho esquerdo) de 80µl de uma solução aquosa de CTb (List Biological Laboratories, Inc., Campbell, CA) 1mg/ml em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo dimetilsulfóxido a 10% para aumentar a permeabilidade e captação dessa substância pelas células ganglionares da retina. A injeção foi realizada por meio da introdução de uma agulha (calibre 30) na junção esclera-corneal, atingindo o corpo vítreo a um ângulo de aproximadamente 45 graus. A solução foi injetada por pressão com o auxílio de uma micro-bomba propulsora em uma velocidade de 1µl por minuto. Ao fim da injeção, a agulha permaneceu no local por 15 a 30 minutos a fim de evitar o refluxo da solução. Após a retirada da agulha foi administrada uma pomada cicatrizante no olho do animal. Encerrado o procedimento da injeção intraocular, os animais foram conduzidos à gaiola de isolamento no Núcleo de Primatologia, permanecendo em observação pelo período de sobrevivência de 5 dias, tempo ideal para o transporte do traçador da retina para toda parte do sistema nervoso. Após o período de sobrevivência, os animais passaram pelos procedimentos de perfusão e microtomia.

4.3 – PERFUSÃO

Seguidos os mesmos padrões anestésicos descritos no item anterior (4.2), os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre uma grade em uma capela de perfusão com ponto de água. Após certificar que os animais estavam profundamente anestesiados, iniciamos os procedimentos cirúrgicos. Primeiramente, o processo xifóide do osso esterno foi pinçado com auxílio de uma pinça de Allis tracionando-o em direção à cabeça do animal, enquanto isso a pele foi seccionada, bem como suas partes moles e costelas, a fim de ter acesso ao coração dentro da cavidade torácica. Exposto o coração, uma agulha conectada a uma bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Parmer, Niles, IL) foi introduzida no ápice do ventrículo esquerdo em direção à aorta ascendente, e em seguida realizamos uma pequena incisão no átrio direito objetivando o escoamento do líquido do leito vascular. Inicialmente foram impulsionados 400 ml de solução salina a 0,9% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4, com Heparina (Hípolabor Laboratories, 5000UI/ml) na concentração de 2 ml/l de solução salina, em um fluxo de 100 ml por minuto em temperatura ambiente, objetivando lavar o leito vascular do animal, prevenir a formação de coágulos e uma melhor fixação dos tecidos. Posteriormente, foi impulsionado 700 ml de solução fixadora (paraformaldeído a 4% Vetec Química Fina, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) em duas velocidades. A metade da solução infundida em fluxo rápido (35 ml/min) e a outra metade em fluxo lento (17,5 ml/min), totalizando 30 minutos de infusão.

4.4 – REMOÇÃO DO ENCÉFALO E MICROTOMIA

Passada a perfusão, os encéfalos foram removidos da cavidade craniana através da secção dos tecidos moles e dos ossos da calota craniana. Em seguida os encéfalos foram armazenados em solução de sacarose a 30% (Nuclear-CAQ) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, a 4°C até a realização da microtomia.

Na microtomia os encéfalos foram congelados em gelo seco e seccionados através de um micrótomo de deslizamento. Obtivemos secções coronais de 30µm, coletadas seriadamente em seis compartimentos contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Cada compartimento contém um corte de cada sequência de seis, de modo que a distância entre uma secção e a seguinte no mesmo compartimento é de aproximadamente 180µm. As secções são conservadas na solução supracitada a 4°C para a realização dos procedimentos subsequentes, ou em solução

anticongelante à base de etileno-glicol e tampão fosfato e conservados a 4°C para as reações de imunistoquímica ou de coloração posteriormente.

4.5 – TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA

Os cortes foram submetidos as reações imunistoquímicas seguindo o protocolo ABC (Complexo Avidina-Biotina peroxidase), utilizando anticorpos específicos a fim de identificar substâncias neuroativas nas subdivisões do complexo pulvinar do tálamo em sagui, como a proteína nuclear neuronal específica (NeuN), calbindina (CB), proteína acídica fibrilar glial (GFAP) e a CTb injetada.

Inicialmente os cortes foram submetidos a quatro lavagens, com duração de 10 minutos cada, em solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Em seguida, as secções foram submetidas a um pré-tratamento, a fim de inativar a peroxidase endógena do tecido, colocadas em contato com peróxido de hidrogênio a 0,3% em tampão fosfato 1,0 M, pH 7,4 por 20 minutos. Logo, seguiram mais quatro lavagens com duração de 10 minutos cada, em solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Todos os procedimentos supracitados foram realizados em agitador orbital. Após as etapas já mencionadas, as secções foram colocadas em tubos de ensaio e entraram em contato com o anticorpo primário diluído em Triton X-100 a 0,4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, acrescido de soro normal a 2% (Sigma, St Louis, MO, USA) do animal correspondente à obtenção do anticorpo secundário. Em seguida os tubos contendo as secções foram postos em um rotor com velocidade lenta por um período de 18 a 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período as secções foram submetidas a quatro lavagens, com duração de 10 minutos cada, em agitador orbital e em seguida foram incubadas no anticorpo secundário diluído em Triton X-100 a 0,4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, permanecendo no rotor com velocidade lenta por duas horas em temperatura ambiente. Seguiram-se novamente quatro lavagens de 10 minutos em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e logo em seguida as secções foram colocadas em contato com o complexo avidina-biotina peroxidase (Kit ABC Elite, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) a uma diluição 1:100 µl em Triton X-100 a 0,4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo cloreto de sódio (NaCl) em rotor com velocidade lenta por duas horas em temperatura ambiente. Ao fim dessa etapa, as secções foram novamente submetidas a quatro lavagens de 10 minutos em solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Em seguida, as secções foram colocadas em contato com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St Louis, MO, USA) a 2,5% diluída em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Na reação final adicionamos uma

solução contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,003% como substrato, onde obtivemos na região marcada uma cor marrom resultante da oxidação da DAB. Esta última etapa foi realizada em uma capela de exaustão. Por fim, as seções foram submetidas novamente a quatro lavagens de 10 minutos com solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,4.

Após a realização da técnica imunistoquímica, as seções foram montadas em lâminas de vidro previamente gelatinizadas com gelatina-alúmen-cromo (Vetec Química Fina) e postas para secar em temperatura ambiente. Após a secagem, as seções foram submetidas à intensificação da reação em uma solução de tetróxido de ósmio a 0,05% por 30 segundos. Posteriormente as seções passaram por uma sequência crescente e decrescente de álcoois (Cromato Produtos Químicos) para desidratação e diafanização com xilol (Cromato Produtos Químicos). Após esse procedimento, as seções foram cobertas por lamínulas utilizando como meio de montagem DPX (Aldrich Milwaukee, WI).

Antígeno	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário	Soro Normal
NeuN	Camundongo [1:1000] (Chemicon)	Cabra [1:1000] (Jackson Labs)	Cabra 2%
CB	Camundongo [1:1000] (Sigma)	Cabra [1:200] (Vector Labs)	Cabra 2%
GFAP	Camundongo [1:1000] (chemicon)	Cabra [1:1000] (ImunoResearch)	Cabra 2%
CTb	Cabra [1:5000] (List Biological Labs)	Asno [1:1000] (Jackson Labs)	Asno 5%

Tabela 2: Lista das substâncias utilizadas com especificações.

4.6 – MÉTODO DE NISSL

Utilizamos um compartimento de cada encéfalo, para a coloração pelo método de Nissl usando a tionina como corante. Esse método possibilita a visualização de neurônios e diminutos corpos celulares de células gliais. As seções foram lavadas em solução de tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, posteriormente montadas em lâminas previamente gelatinizadas e postas para secar em temperatura ambiente por 48 horas. Após a secagem, as seções foram submetidas ao método de Nissl, que consiste na desidratação do tecido através da passagem deste em

concentrações crescentes de álcoois etílicos (70%, 95% e 100%), sendo posteriormente deslipidificados em xilol. Em seguida o tecido foi reidratado em concentrações decrescentes de álcoois e em água destilada e posteriormente submergido no corante Tionina a 0,25%. Após passar pelo corante as secções foram novamente desidratadas e deslipidificadas e em seguida cobertas com lamínulas utilizando como meio de montagem DPX (Aldrich Milwaukee, WI).

4.7 – ANÁLISE DOS RESULTADOS

As secções foram analisadas através de um microscópio óptico (Olympus, BX-41) em campo claro. As imagens digitais do complexo pulvinar do tálamo foram obtidas através de uma câmara (Nikon®, DXM-1200) acoplada ao microscópio e conectada a um computador, sendo posteriormente operacionalizadas para ajuste de brilho e contraste utilizando o programa Canvas X. Os desenhos presentes no trabalho foram realizados utilizando o mesmo programa.

5. RESULTADOS

Os experimentos realizados tiveram como finalidade a caracterização da citoarquitetura do complexo pulvinar do sagui. Analisamos qualitativamente a distribuição dos neurônios nas subdivisões desse complexo, assim como a presença de fibras/terminais retinianos na subdivisão inferior medial.

5.1 – DELIMITAÇÃO DO COMPLEXO PULVINAR

A delimitação do complexo pulvinar do tálamo do sagui foi realizada a partir da combinação de fotomicrografias de secções coronais dos níveis rostral, médio e caudal (Figura 6A-C), obtidas após procedimento histoquímico (Método de Nissl) e imunoistoquímica (NeuN e CB) e trabalhadas no Software Canvas X.

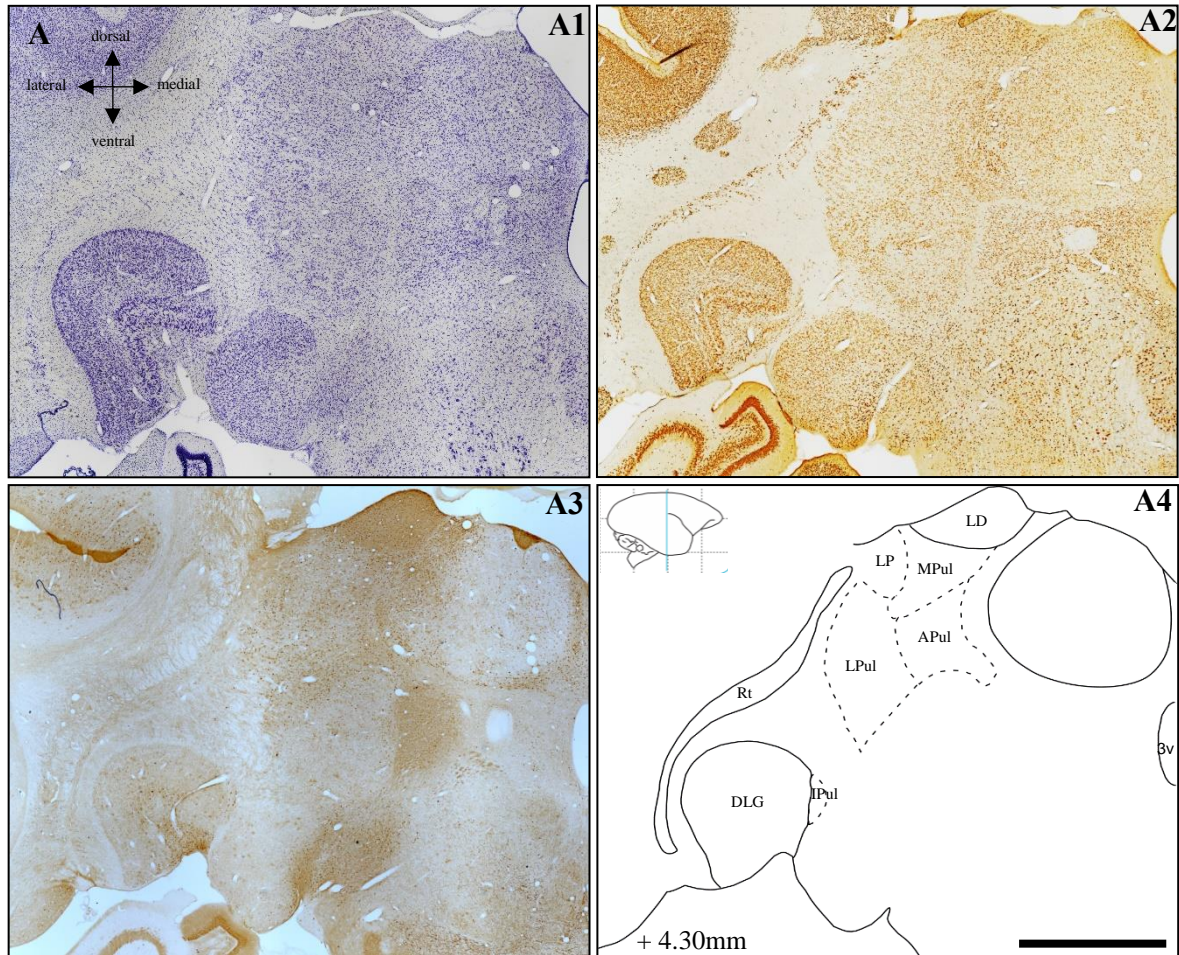
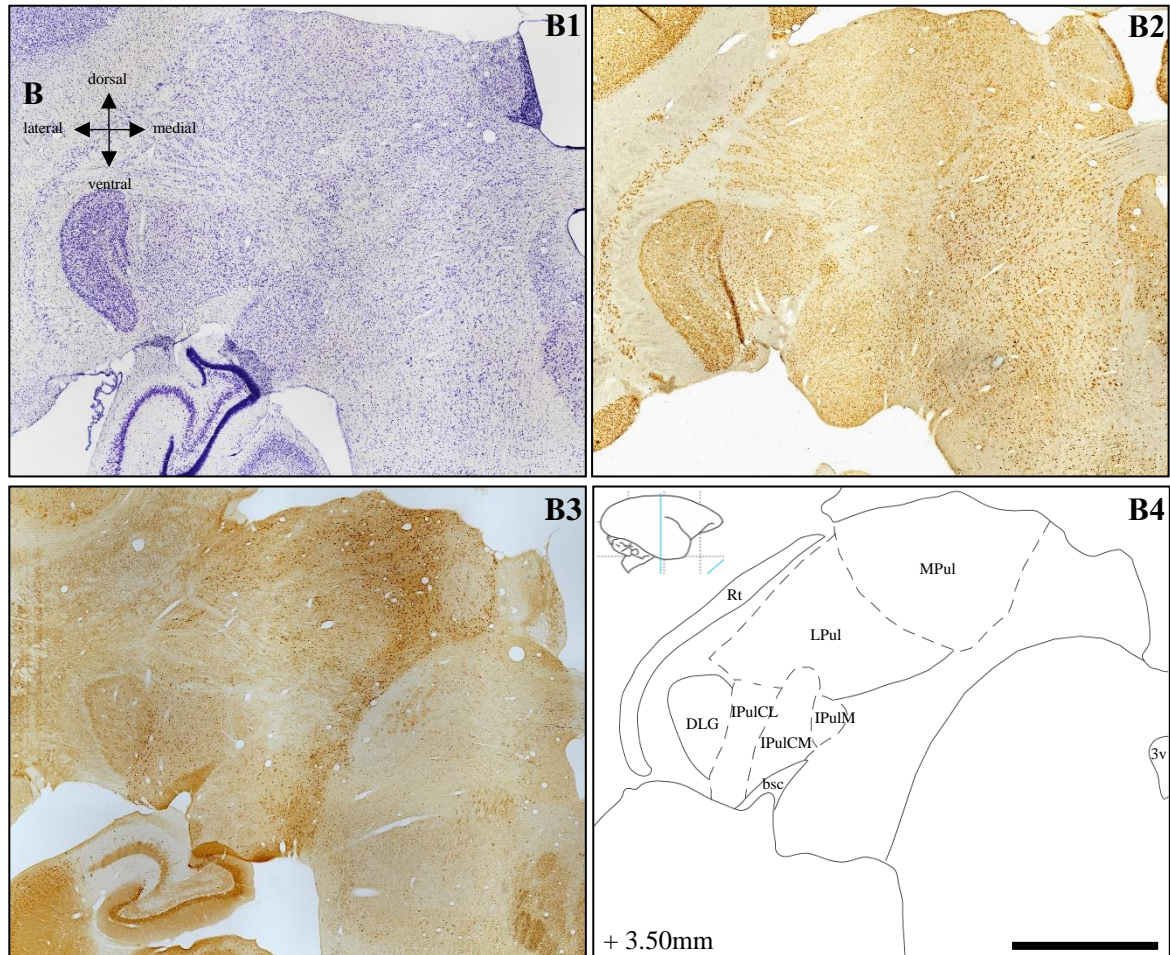
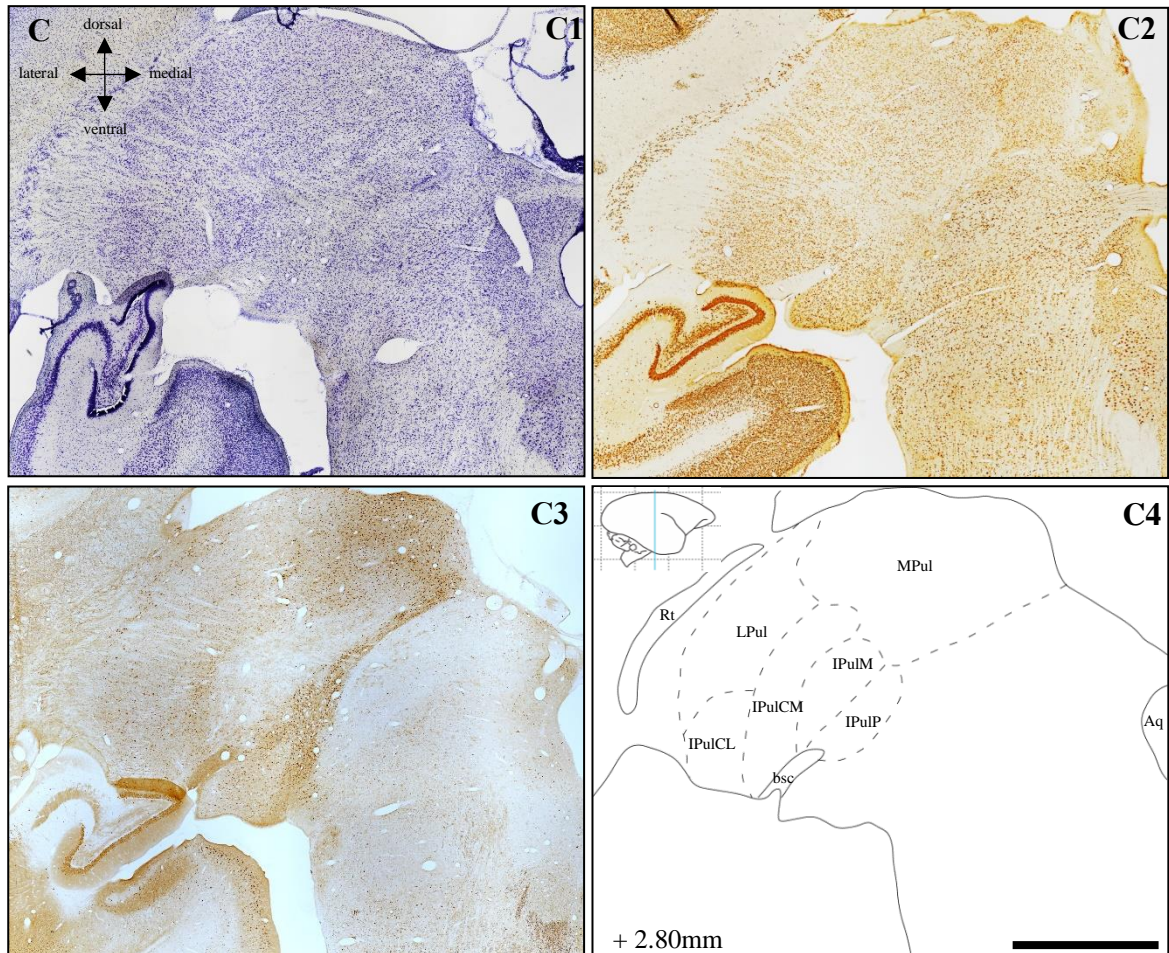


Figura 6 – Delimitação do complexo pulvinar do tálamo em saguis adultos em secções coronais no nível rostral a partir da utilização de técnicas de coloração. Em A1 Nissl, A2 e A3 imunoistoquímica para NeuN e CB, respectivamente. A4 é o esquema resultante do enquadramento das secções. LD, núcleo lateral dorsal; LP, núcleo lateral posterior; MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral; IPul, pulvinar inferior; Rt, núcleo reticular; DLG, núcleo geniculado lateral dorsal; 3v, terceiro ventrículo. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Barra de escala de 300 μ m.



Continuação da Figura 6 – Delimitação do complexo pulvinar do tálamo em saguís adultos em secções coronais no nível médio a partir da utilização de técnicas de coloração. Em B1 Nissl, B2 e B3 imunohistoquímica para NeuN e CB, respectivamente. B4 é o esquema resultante do enquadramento das secções. MPul, pulvinar medial; LPul, pulvinar lateral; IPulCL IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; Rt, núcleo reticular; DLG, núcleo geniculado lateral dorsal; bsc; braço do colículo superior; 3v; terceiro ventrículo. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Barra de escala de 300µm.



Continuação da Figura 6 – Delimitação do complexo pulvinar do tálamo em saguis adultos em secções coronais no nível caudal a partir da utilização de técnicas de coloração. Em C1 Nissl, C2 e C3 imunohistoquímica para NeuN e CB, respectivamente. C4 é o esquema resultante do enquadramento das secções. MPul, pulvinar medial; LPul, pulvinar lateral; IPulCL, IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior; Rt, núcleo reticular; bsc, braço do colículo superior; Aq, aqueduto cerebral. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Barra de escala de 300µm.

5.2 – CITOARQUITETURA DO COMPLEXO PULVINAR

5.2.1 MÉTODO DE NISSL

Verificamos em saguis adultos, através da coloração pelo método de Nissl, fotomicrografias do complexo pulvinar do tálamo, destacando-se por uma grande afinidade das suas células à tionina ilustradas em três níveis de secções coronais ao longo do eixo rostro-caudal (Figura 7A, C e E). Evidenciamos as subdivisões do complexo pulvinar em pulvinar anterior (Figura 7A), pulvinar medial, pulvinar lateral (Figura 7A e C) e pulvinar inferior mantendo a nomenclatura de Paxinos et al., 2012. O pulvinar inferior subdivide-se em pulvinar inferior centrolateral (Figura 7C), pulvinar inferior centromedial, pulvinar inferior medial e pulvinar inferior posterior (Figura 7E). A disposição celular das subdivisões do complexo pulvinar é evidenciada em maior aumento. O pulvinar medial (Figura 7A1 e C1) apresenta células intensamente marcadas, distribuídas uniformemente. O pulvinar anterior (Figura 7A2) apresenta células pequenas com forte marcação nos limites dessa subdivisão. Já o pulvinar lateral (Figura 7A3 e C2) revela células distribuídas em grupamentos lineares com menor intensidade de marcação. As subdivisões do pulvinar inferior apresentam células distribuídas de forma difusa com variação na intensidade de marcação de acordo com a subdivisão. No pulvinar inferior centrolateral (Figura 7C3) observamos células intensamente marcadas e distribuídas de forma densa com tamanhos diferentes. No pulvinar inferior centromedial (Figura 7E1) as células apresentam forte marcação e distribuição densa. No pulvinar inferior medial (Figura 7E2) as células convergem para a porção central do subnúcleo e apresentam pálida marcação. No pulvinar inferior posterior (Figura 7E3) as células distribuem-se de forma esparsa e apresentam-se aparentemente maiores quando comparadas as outras subdivisões do pulvinar inferior. Nos animais idosos, notamos diminuição na intensidade da marcação das células do complexo pulvinar do tálamo mostradas nas fotomicrografias nos três níveis de secções coronais ao longo do eixo rostro-caudal (Figura 7B, D e F) quando comparadas aos animais adultos. As células do pulvinar medial (Figura 7B1 e D1) bem como as células do pulvinar anterior (Figura 7B2) apresentam marcação mais intensa e distribuição uniforme quando comparadas a subdivisão lateral (Figura 7B3 e D2) a qual apresenta marcação esparsa com células distribuídas linearmente. No pulvinar inferior centrolateral (Figura 7D3), notamos uma marcação mais intensa com células distribuídas de forma densa. As células do Pulvinar centromedial e medial (Figura 7F1 e F2) apresentam-se dispersas com marcação esparsa. Já as células do pulvinar inferior posterior (Figura 7F3) mostram-se maiores e mais intensamente marcadas, quando comparadas as outras subdivisões do pulvinar inferior.

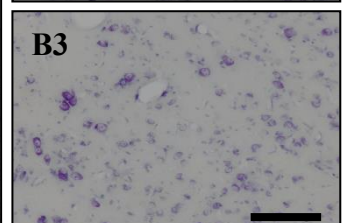
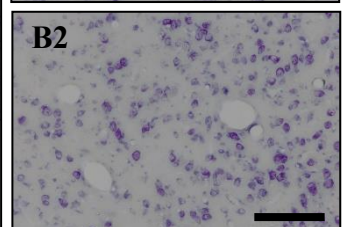
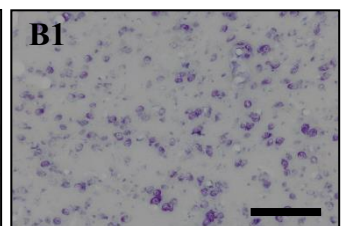
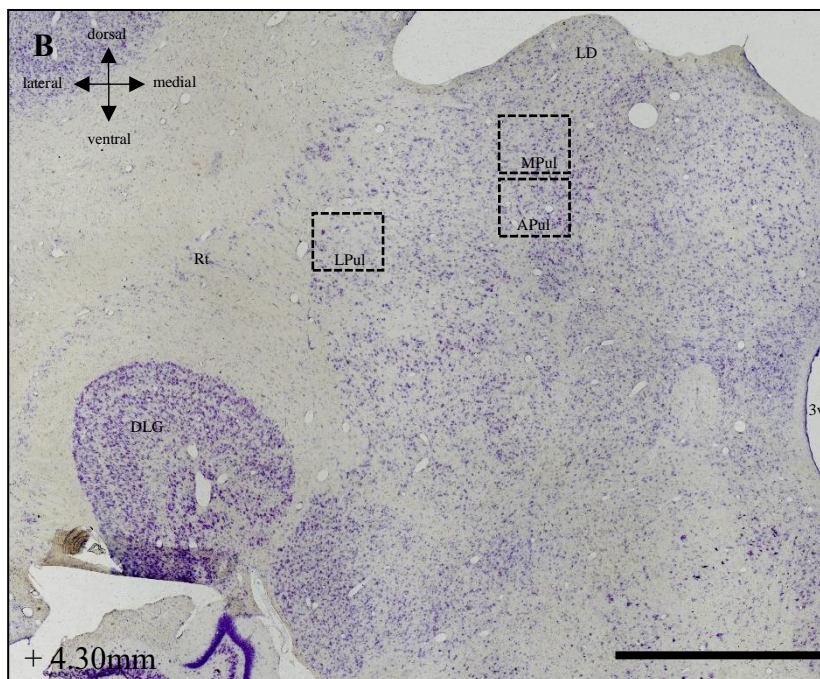
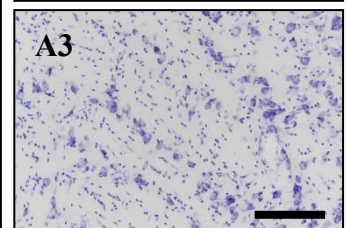
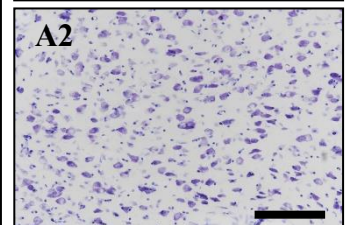
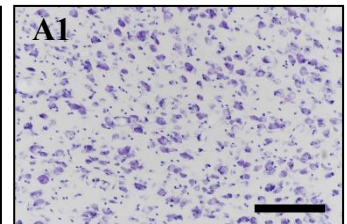
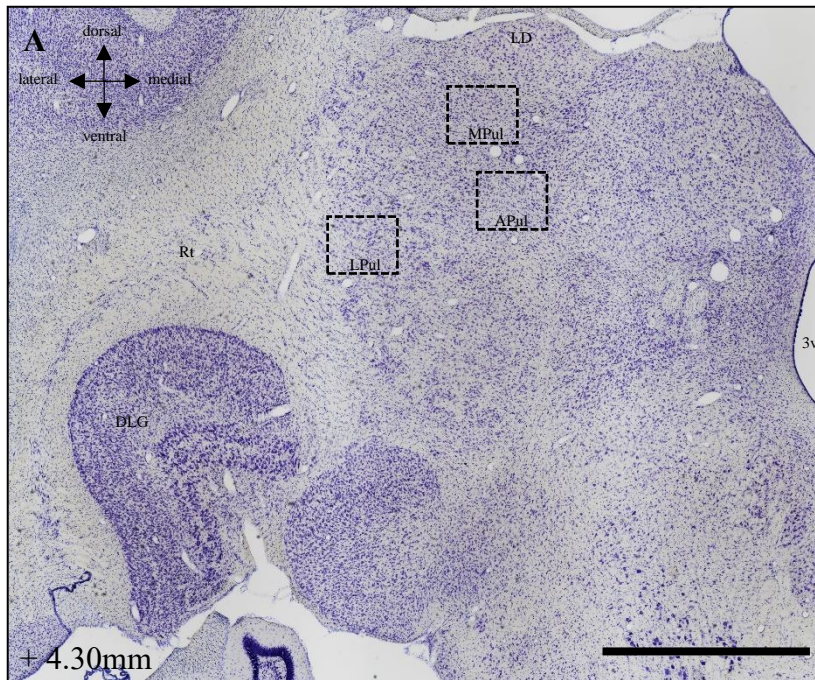
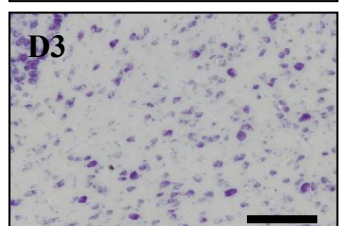
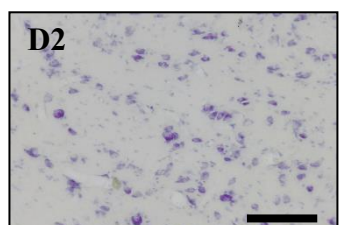
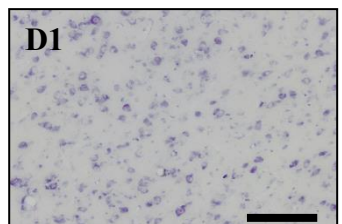
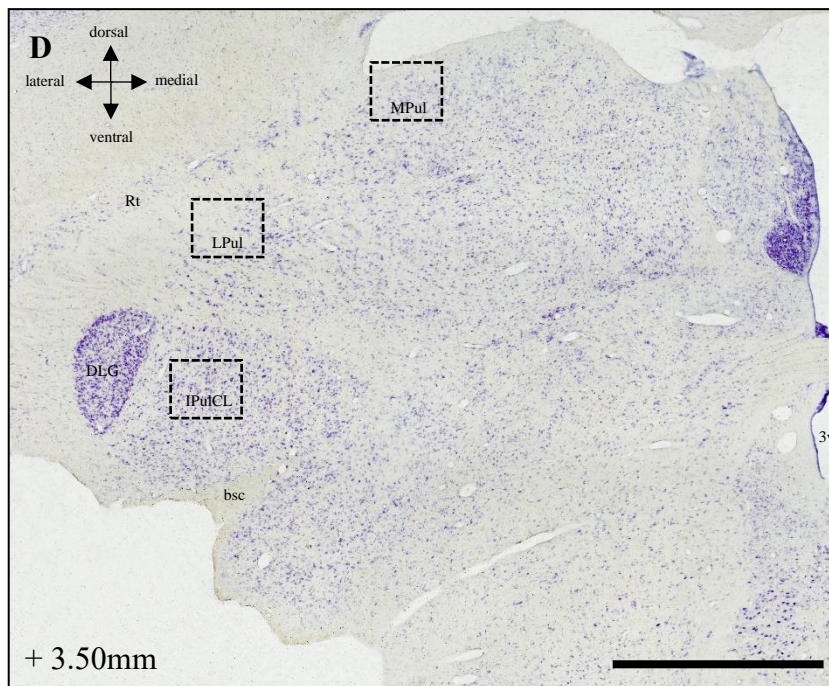
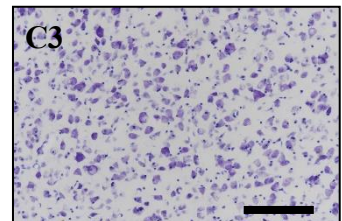
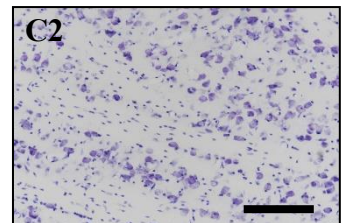
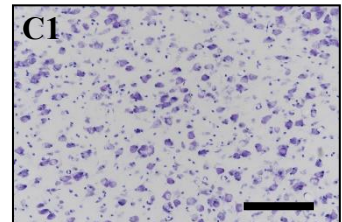
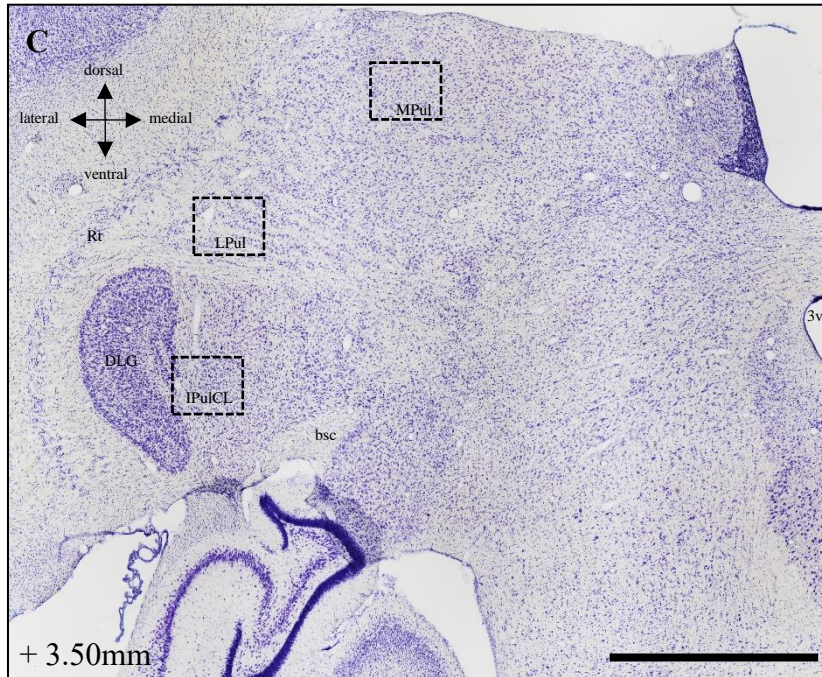
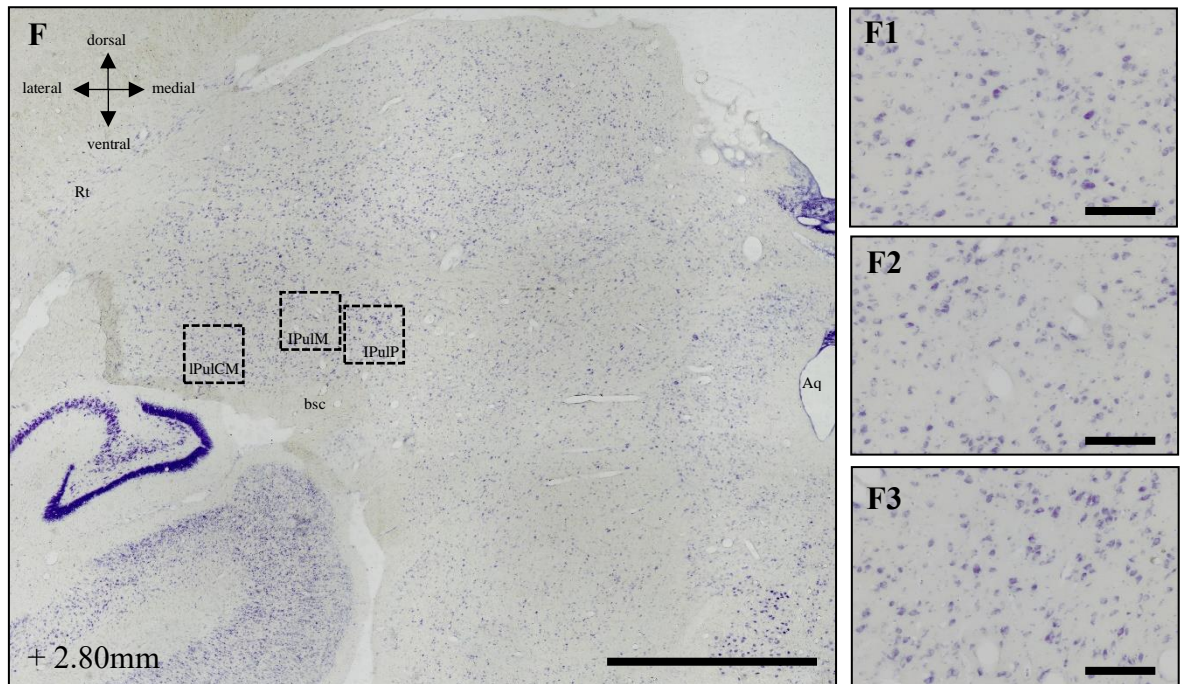
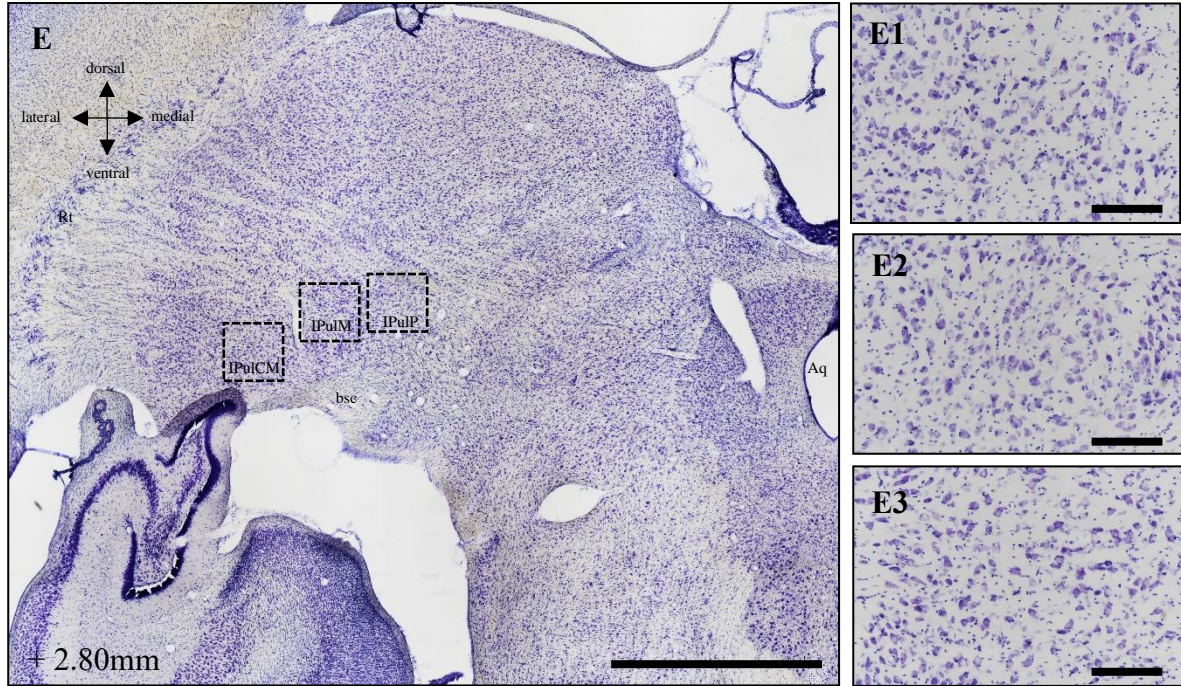


Figura 7 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto (A) e idoso (B) mostrando a citoarquitetura do complexo pulvinar em nível rostral, pelo método de Nissl. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões medial, anterior e lateral mostradas em maior aumento em A1-3 e B1-3, respectivamente. MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral; Rt, núcleo reticular; LD, núcleo lateral dorsal; DLG, núcleo geniculado lateral dorsal; 3v, terceiro ventrículo. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A e B, barra de escala de 300 μ m; em A1-3 e B1-3, barra de escala de 50 μ m.



Continuação da Figura 7 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto (C) e idoso (D) mostrando a citoarquitetura do complexo pulvinar em nível médio, pelo método de Nissl. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões medial, lateral e centrolateral mostradas em maior aumento em C1-3 e D1-3, respectivamente. MPul, pulvinar medial; LPul, pulvinar lateral; IPulCL, pulvinar inferior centrolateral; Rt, núcleo reticular; DLG, núcleo geniculado lateral dorsal; 3v, terceiro ventrículo; bsc, braço do colículo superior. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em C e D, barra de escala de 300 μ m; em C1-3 e D1-3, barra de escala de 50 μ m.



Continuação da Figura 7 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto (E) e idoso (F) mostrando a citoarquitetura do complexo pulvinar em nível caudal, pelo método de Nissl. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões inferior centromedial, inferior medial e inferior posterior mostradas em maior aumento em E1-3 e F1-3, respectivamente. IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior; Rt, núcleo reticular; bsc, braço do colículo superior; Aq, aqueduto cerebral. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em E e F, barra de escala de 300 μ m; em E1-3 e F1-3, barra de escala de 50 μ m.

5.2.2 PROTEÍNA NUCLEAR NEURONAL ESPECÍFICA (NEUN)

Observamos que a imunorreatividade a NeuN mostrou-se presente, em toda extensão, nas subdivisões do complexo pulvinar do tálamo tanto em animais adultos como em idosos (Figura 8). Nos animais adultos, as células apresentam intensa marcação ao longo do eixo rostro-caudal em todo o complexo pulvinar (Figura 8A, C e E). Células morfológicamente distintas foram visualizadas na subdivisão medial, centro lateral e posterior (Figura 8A1, C1, C3 e E3). Na subdivisão anterior, as células são em sua maioria esféricas de tamanhos aparentemente variáveis formando grupos (Figura 8A2). A subdivisão lateral é caracterizada pela presença de células esféricas dispostas linearmente (Figura 8A3 e C2). A subdivisão centromedial e medial são caracterizadas por células intensamente marcadas com formação de grupos de acordo com a morfologia (Figura 8E1 e E2).

Nos animais idosos foram evidenciadas células imunorreativas a proteína NeuN nos três níveis de secção do pulvinar. (Figura 8B, D e F). Apesar de notarmos uma diminuição na intensidade de marcação das células, pudemos observar que as células apresentam morfologias distintas em algumas subdivisões do pulvinar, como a medial (Figura 8B1) mas a predominância é do caráter morfológico esférico. (Figura 8B2, D1, D3 e F2). As células do pulvinar lateral apresentam uma distribuição linear esparsa (Figura 8B3). Na subdivisão centromedial e posterior evidenciamos células maiores e intensamente marcadas (Figura 8F1 e F3).

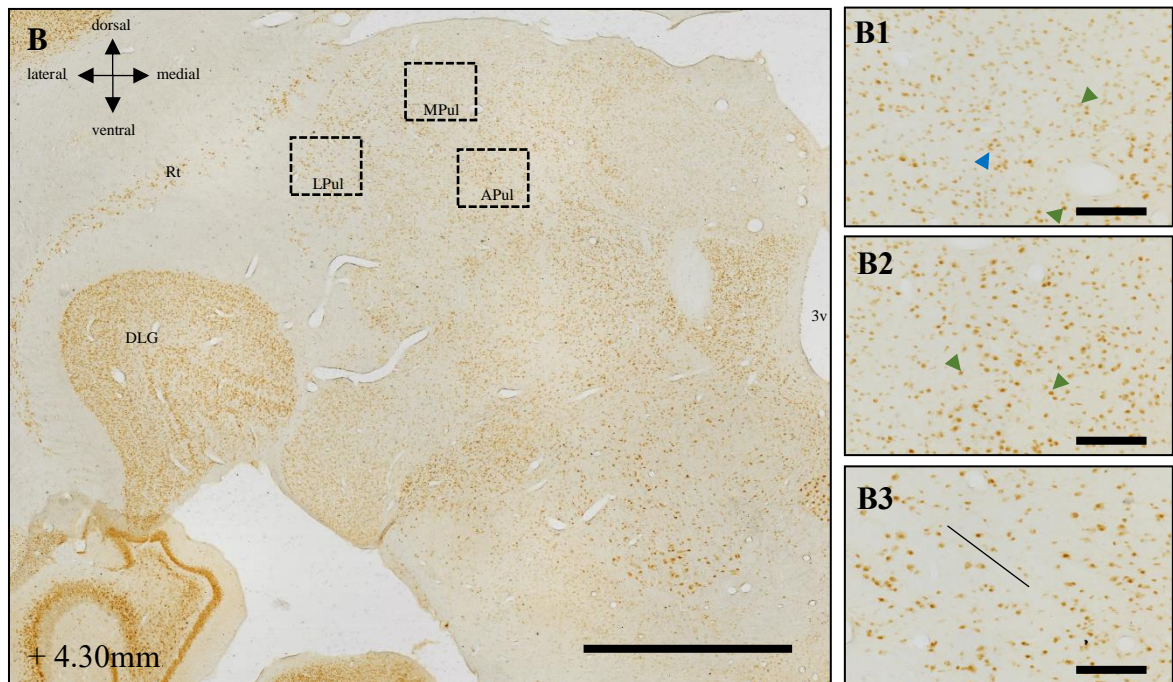
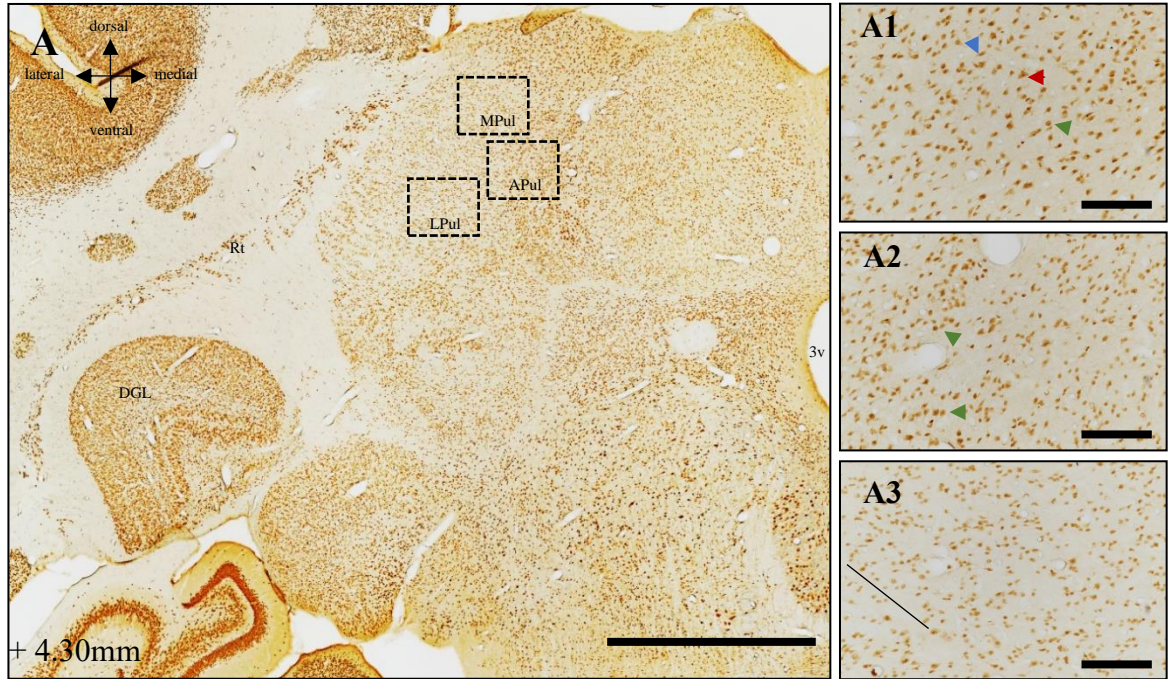
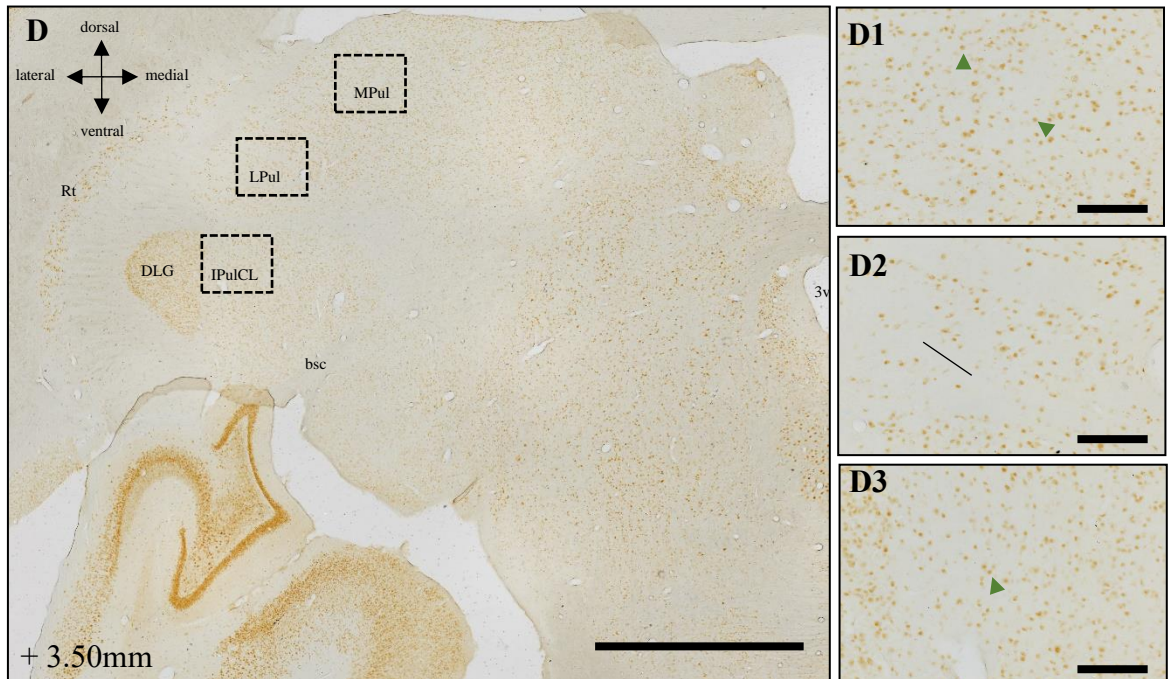
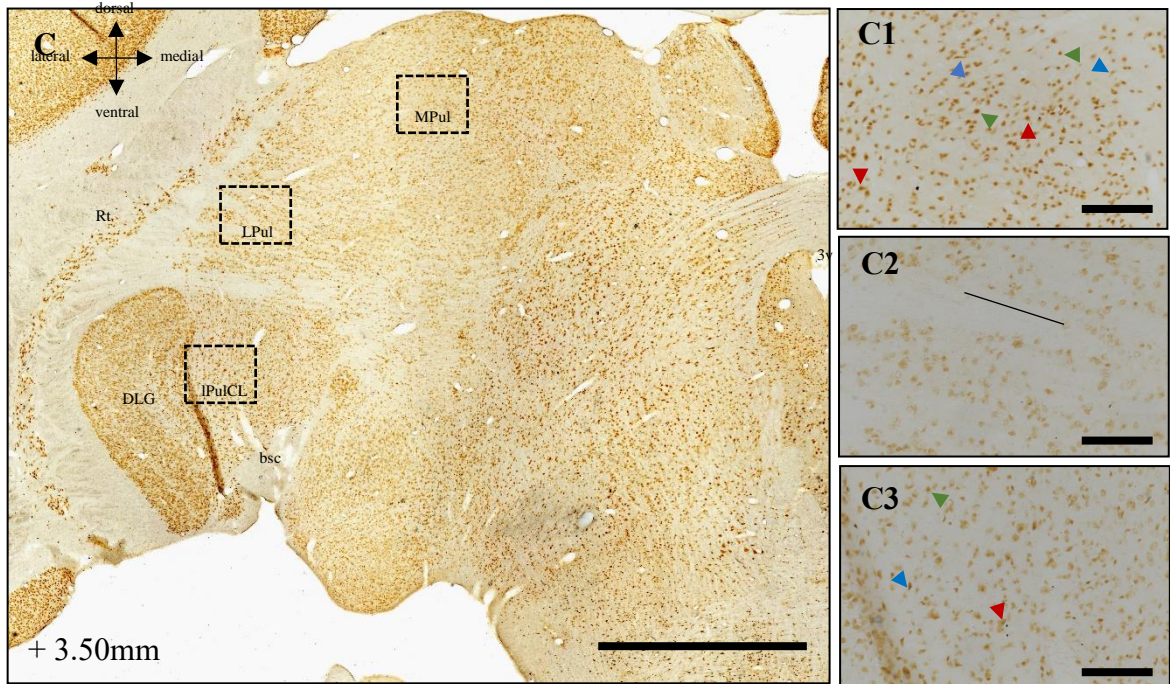
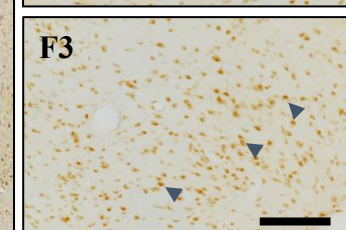
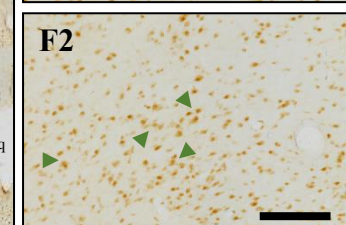
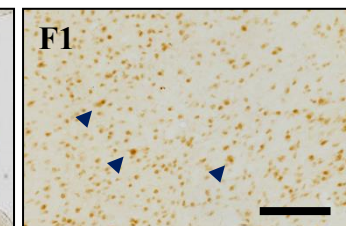
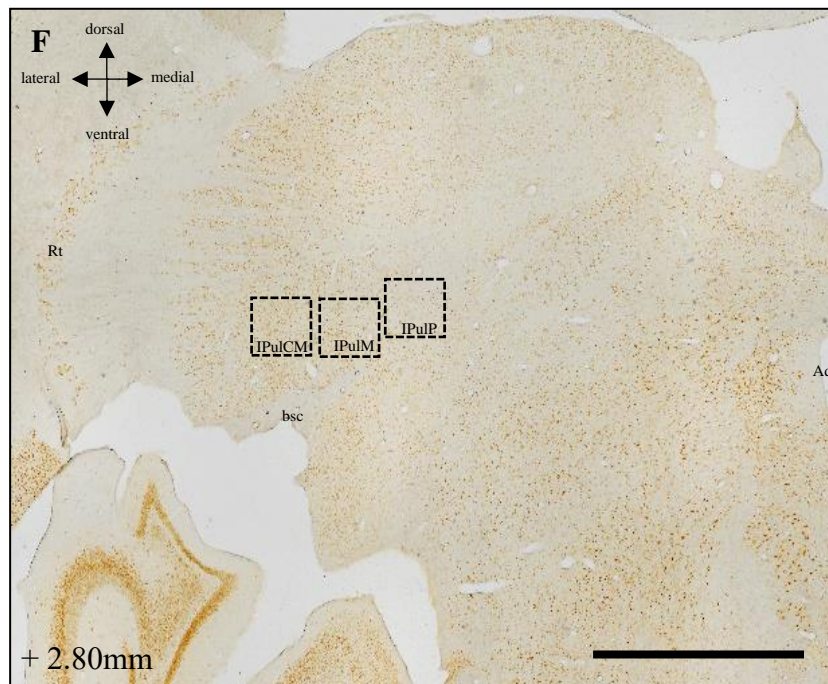
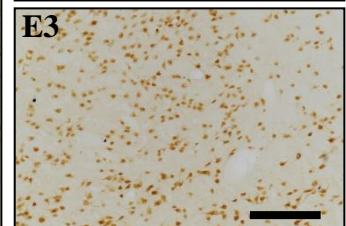
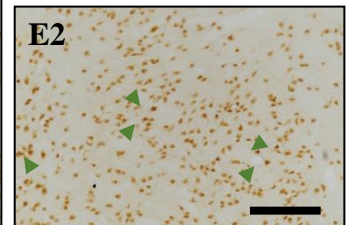
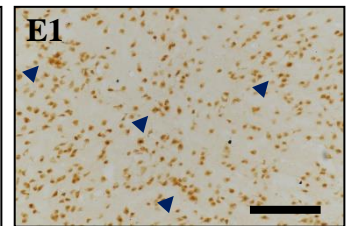


Figura 8 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto e idoso mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à NeuN em nível rostral, através de imunistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões medial, anterior e lateral mostradas em maior aumento em A1-3 e B1-3, respectivamente. As cabeças de setas em A1 e 2 e B1 e 2, indicam a presença de células com morfologia diferenciadas. Em A3 e B3 a linha evidencia a organização linear das células. MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral; Rt, núcleo reticular; DLG, núcleo geniculado lateral dorsal; 3v, terceiro ventrículo. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A e B, barra de escala de 300µm; em A1-3 e B1-3, barra de escala de 50µm.



Continuação da Figura 8 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto e idoso mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à NeuN em nível médio, através de imunistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões medial, lateral e inferior centrolateral mostradas em maior aumento em C1-3 e D1-3, respectivamente. As cabeças de setas em C1 e 3 e D1 e 3 indicam a presença de células com morfologia diferenciadas. Em C2 e D2, a linha evidencia a disposição linear das células. MPul, pulvinar medial; LPul, pulvinar lateral e IPulCL, pulvinar inferior centrolateral; Rt, núcleo reticular; DLG, núcleo geniculado lateral dorsal; 3v, terceiro ventrículo; bsc, braço do colículo superior. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em C e D, barra de escala de 300µm; em C1-3 e D1-3, barra de escala de 50µm.



Continuação da Figura 8 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto e idoso mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à NeuN em nível caudal, através de imunoistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões inferior centromedial, inferior medial e inferior posterior mostradas em maior aumento em E1-3 e F1-3, respectivamente. As cabeças de setas indicam a presença de células com morfologia diferenciadas nas subdivisões. No limite da subdivisão inferior posterior (E3), centromedial (F1) e posterior (F3) as células apresentam intensa marcação. IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior; Rt, núcleo reticular; bsc, braço do colículo superior; Aq, aqueduto cerebral. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em E e F, barra de escala de 300µm; em E1-3 e F1-3, barra de escala de 50µm.

5.2.3 CALBINDINA (CB)

Verificamos em saguis adultos, através da imunistoquímica para CB, fotomicrografias do complexo pulvinar do tálamo, ilustradas em três níveis de secções coronais ao longo do eixo rostro-caudal (Figura 9A, C e E). Neurônios imunorreativos com morfologia esférica, piramidal e fusiforme foram observados nas subdivisões medial, anterior e lateral do pulvinar (Figuras 9A1-3 e C1). A subdivisão lateral é evidenciada pela disposição linear das células entre os feixes de fibras córtico-tectal (Figura 9C2). A subdivisão inferior apresenta células diferentes em cada subnúcleo (Figura 9C3-E3). No pulvinar inferior centrolateral observamos a presença de células com morfologia piramidal distribuídas de forma esparsa (Figura 9C3). Já no pulvinar inferior centromedial, predominam células com morfologia esférica dispostas de forma mais agrupada quando comparadas as células esféricas de tamanho reduzido dispostas de forma esparsa na subdivisão inferior medial (Figura 9E1-2). Na Figura 9E3 as células apresentam intensa marcação a CB.

Em animais idosos a expressão de calbindina foi evidenciada nos três níveis de secção ao longo do eixo rostro-caudal (Figura 9B, D e F). No entanto, houve uma diminuição da imunoreatividade a CB que foi bem evidenciada no pulvinar inferior na subdivisão medial e posterior (Figura 9F2-3). Neurônios imunorreativos com morfologia esférica, piramidal e fusiforme foram observados nas subdivisões medial, anterior e lateral do pulvinar (Figuras 9B1-3 e D1). Na subdivisão lateral observamos células piramidais distribuídas entre as fibras do feixe cortico-tectal (Figura 9D2). A subdivisão inferior apresenta células aparentemente diferentes em cada subnúcleo (Figura 9D3-F3). No pulvinar inferior centrolateral observamos a presença de células com morfologia piramidal distribuídas de forma esparsa (Figura 9D3). Já no pulvinar inferior centromedial, predominam células com morfologia esférica dispostas de forma mais agrupada quando comparadas as células esféricas de tamanho reduzido dispostas de forma esparsa na subdivisão inferior medial (Figura 9F2).

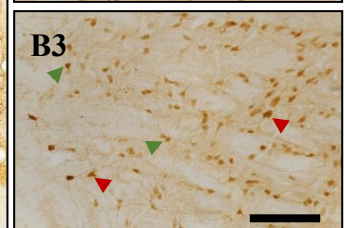
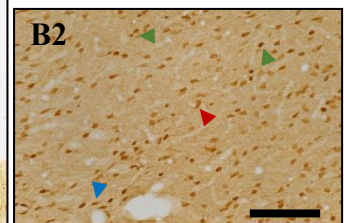
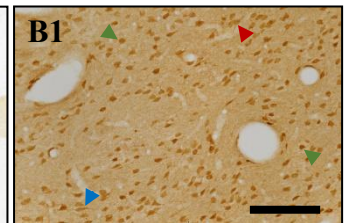
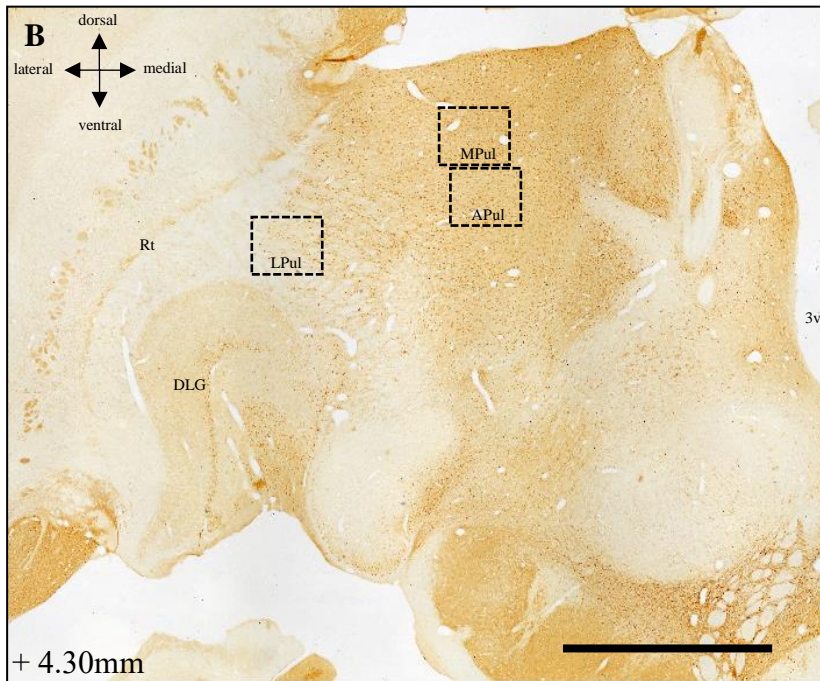
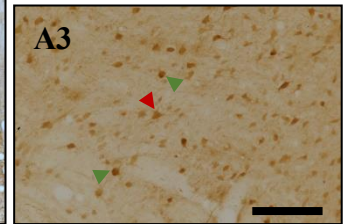
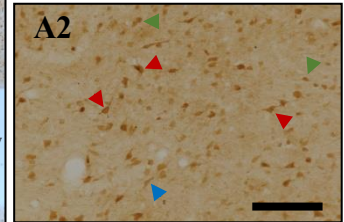
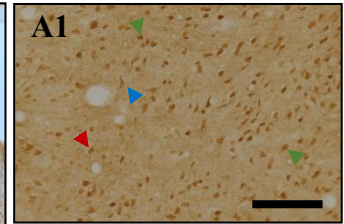
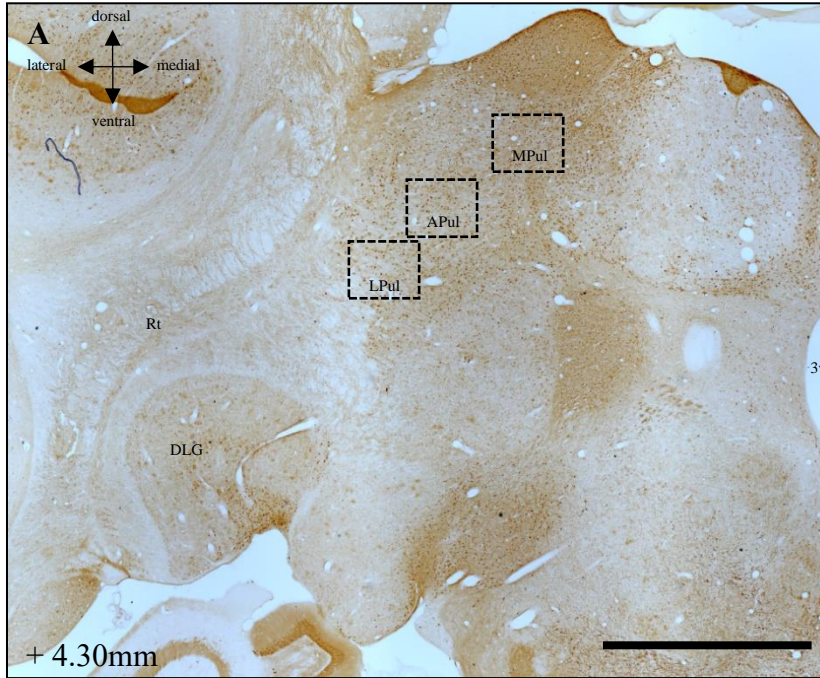
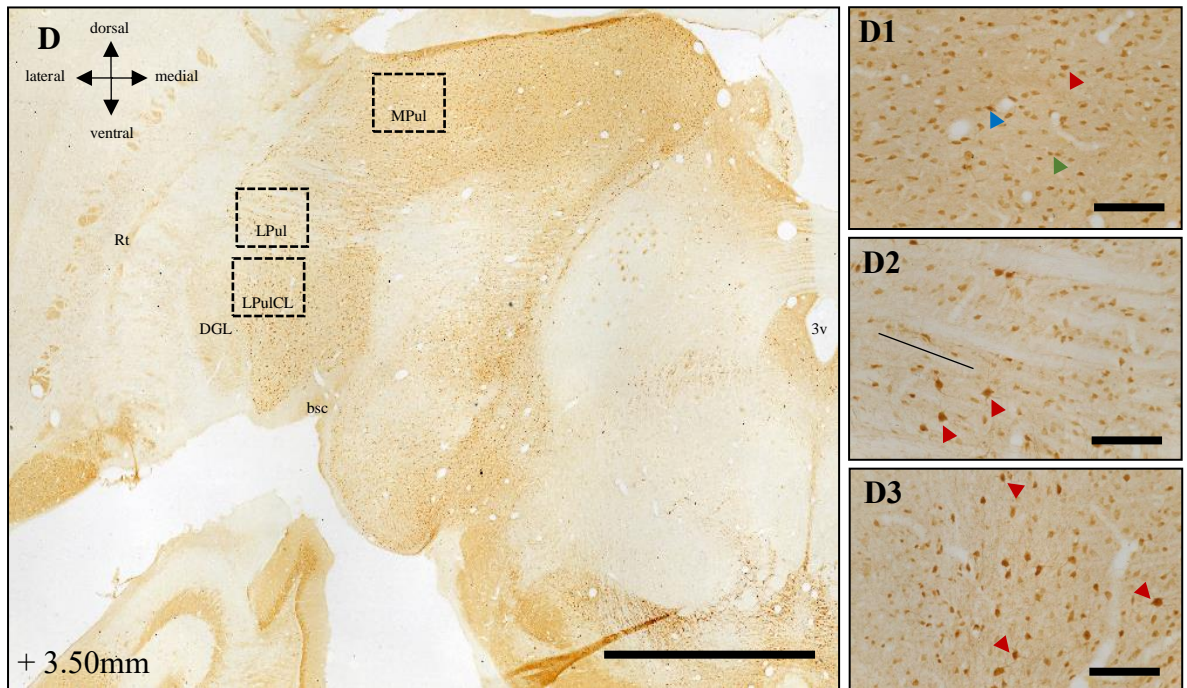
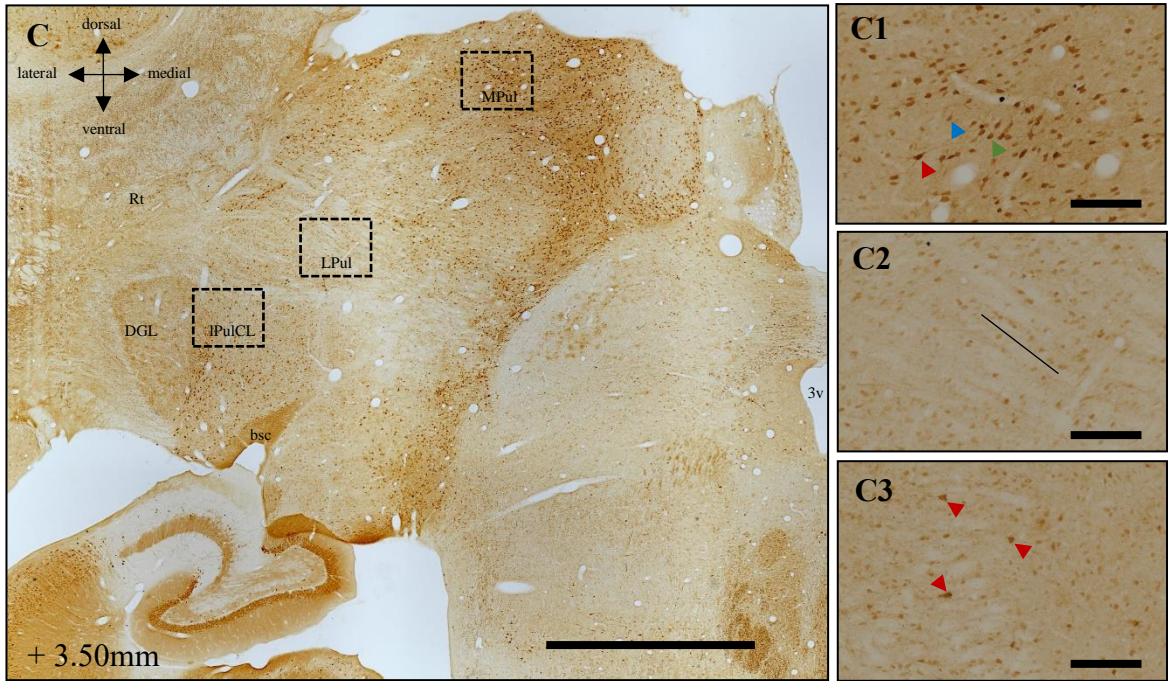
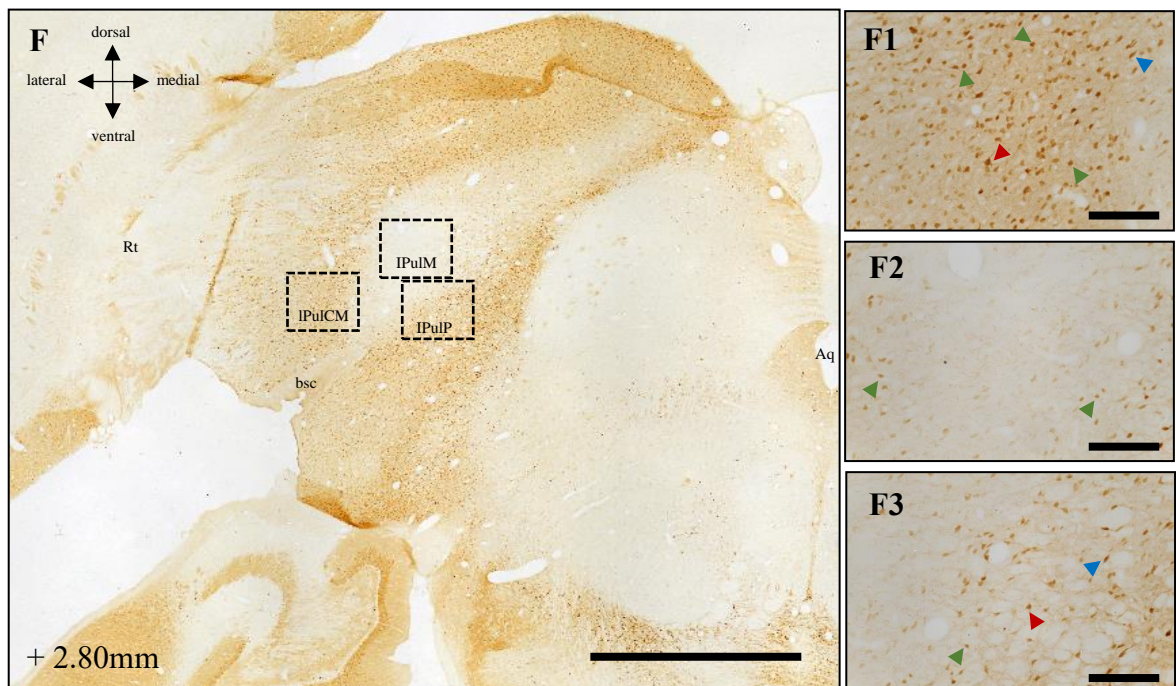
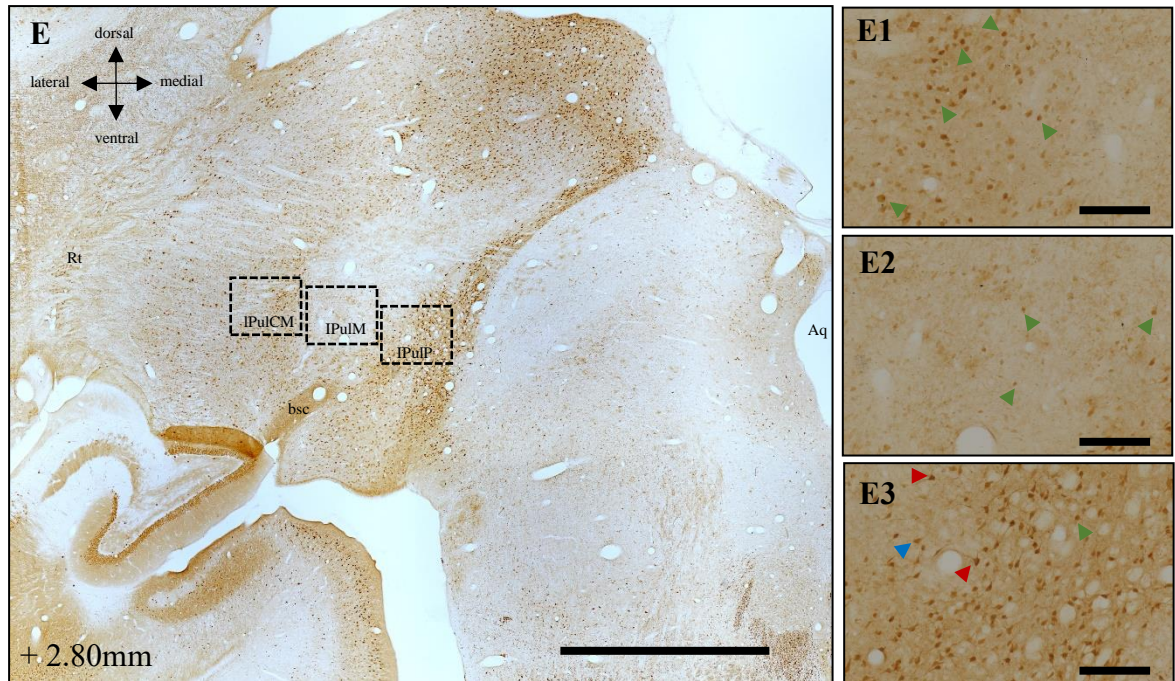


Figura 9 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto e idoso mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à CB em nível rostral, através de imunistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões medial, anterior e lateral mostradas em maior aumento em A1-3 e B1-3, respectivamente. As cabeças de setas indicam a presença de células com morfologia diferenciadas. Em A1 e B1 notamos a predominância de células esféricas (cabeça de seta verde) com outros tipos morfológicos (cabeças de seta vermelho e azul) distribuídos de forma esparsa na subdivisão medial. Em A2 e B2, observamos que as células estão distribuídas de forma dispersa com morfologia piramidal (cabeça de seta vermelho), fusiforme (cabeça de seta azul) e esféricas (cabeça de seta verde). A3 e B3 apresentam células em sua maioria com forma esférica. MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral; Rt, núcleo reticular; DLG, núcleo geniculado lateral dorsal; 3v, terceiro ventrículo. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A e B, barra de escala de 300µm; em A1-3 e B1-3, barra de escala de 50µm.



Continuação da Figura 9 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto e idoso mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à CB em nível médio, através de imunoistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões medial, lateral e inferior centrolateral mostradas em maior aumento em C1-3 e D1-3, respectivamente. As cabeças de setas em C1 e D1 indicam a presença de células com morfologia diferenciadas (piramidal (cabeça de seta vermelho), fusiforme (cabeça de seta azul) e esféricas (cabeça de seta verde)). Em C2 e D2 a linha evidencia a disposição linear das células. Em C3 e D3 células com morfologia piramidal (cabeças de seta vermelho) são destaques na subdivisão inferior centrolateral. MPul, pulvinar medial; LPul, pulvinar lateral e IPulCL, pulvinar inferior centrolateral; Rt, núcleo reticular; DLG, núcleo geniculado lateral dorsal; 3v, terceiro ventrículo; bsc, braço do colículo superior. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em C e D, barra de escala de 300µm; em C1-3 e D1-3, barra de escala de 50µm.



Continuação da Figura 9 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto e idoso mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à CB em nível caudal, através de imunoistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões inferior centromedial, inferior medial e inferior posterior mostradas em maior aumento em E1-3 e F1-3, respectivamente. As cabeças de setas em E1 e F1 indicam a predominância de células com morfologia esférica. Em E2 e F2 notamos um pequeno número de células esféricas esparsas. Em E3 e F3 células com morfologia piramidal, células esféricas e fusiformes (cabeças de seta vermelho, verde e azul) distribuem-se na subdivisão inferior posterior. IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior; Rt, núcleo reticular; bsc, braço do colículo superior; Aq, aqueduto cerebral. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em E e F, barra de escala de 300µm; em E1-3 e F1-3, barra de escala de 50µm.

5.2.4 PROTEÍNA ACÍDICA FIBRILAR GLIAL (GFAP)

As células gliais revelaram-se imunorreativas a GFAP em toda a extensão rostro-caudal do complexo pulvinar nos animais adultos (Figura 10A, C e E). A morfologia estrelada característica dos astrócitos denota a presença desse tipo celular em todo o complexo evidenciada em maior aumento (Figura 10A1-3, C1-3 e E1-3). Em animais idosos, podemos apontar uma menor intensidade de marcação a GFAP em todas as subdivisões do complexo pulvinar (Figura 10B, D e F) evidenciadas em maior aumento em (10B1-3, D1-3 e F1-3).

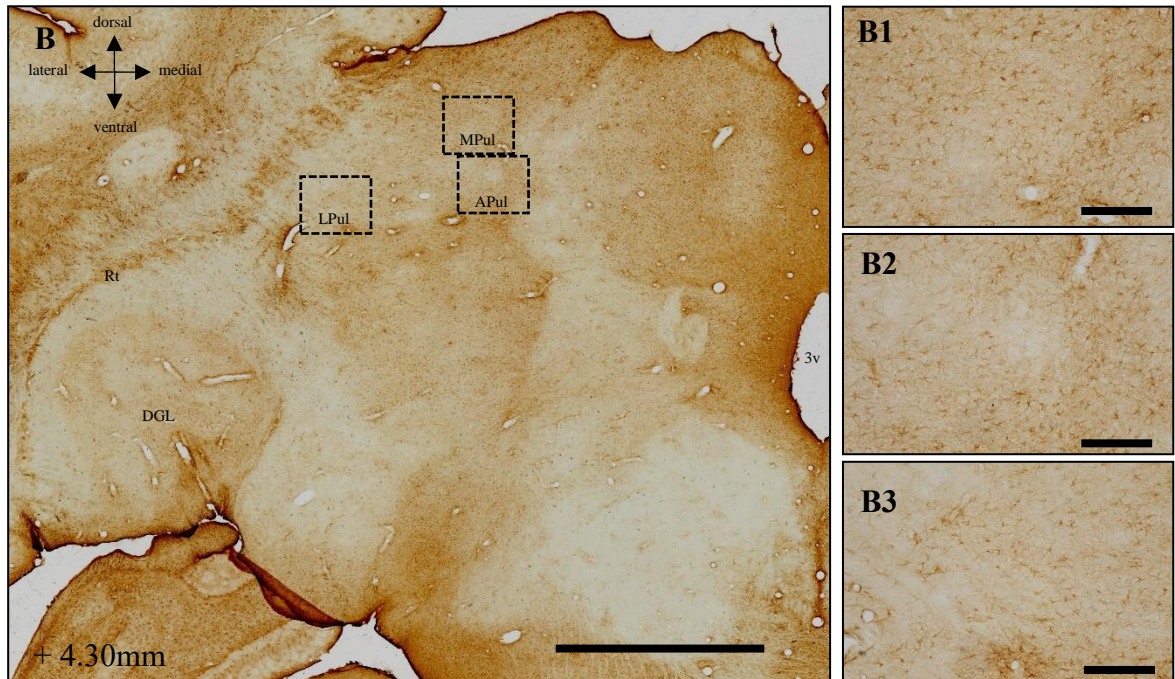
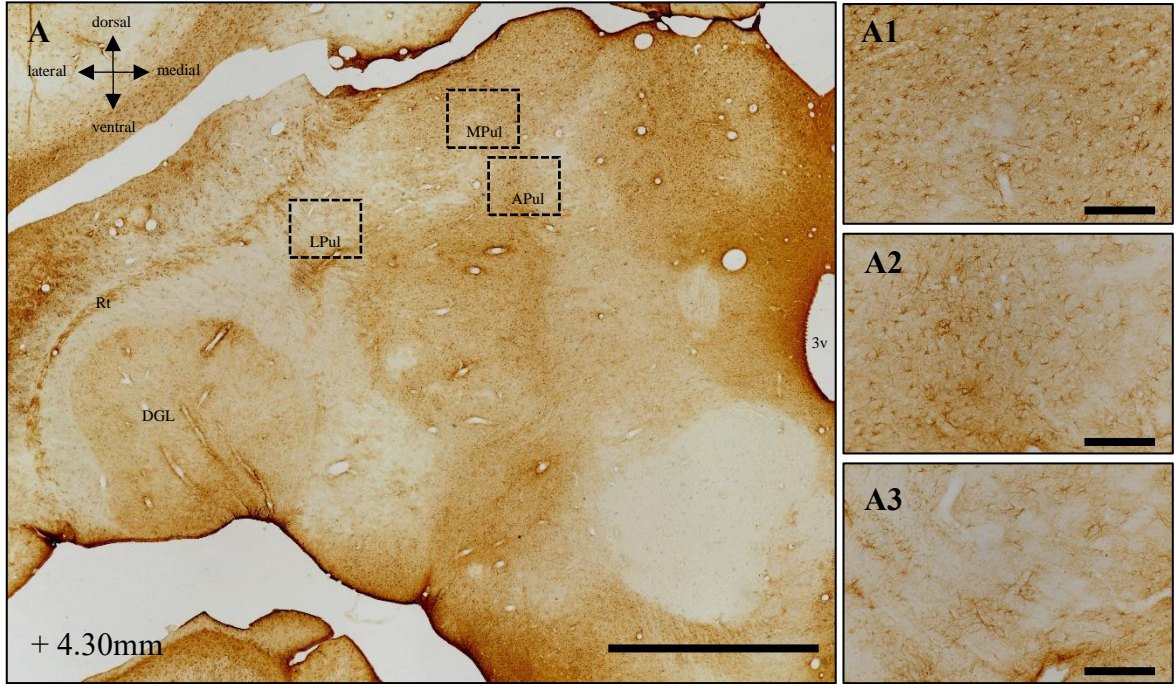
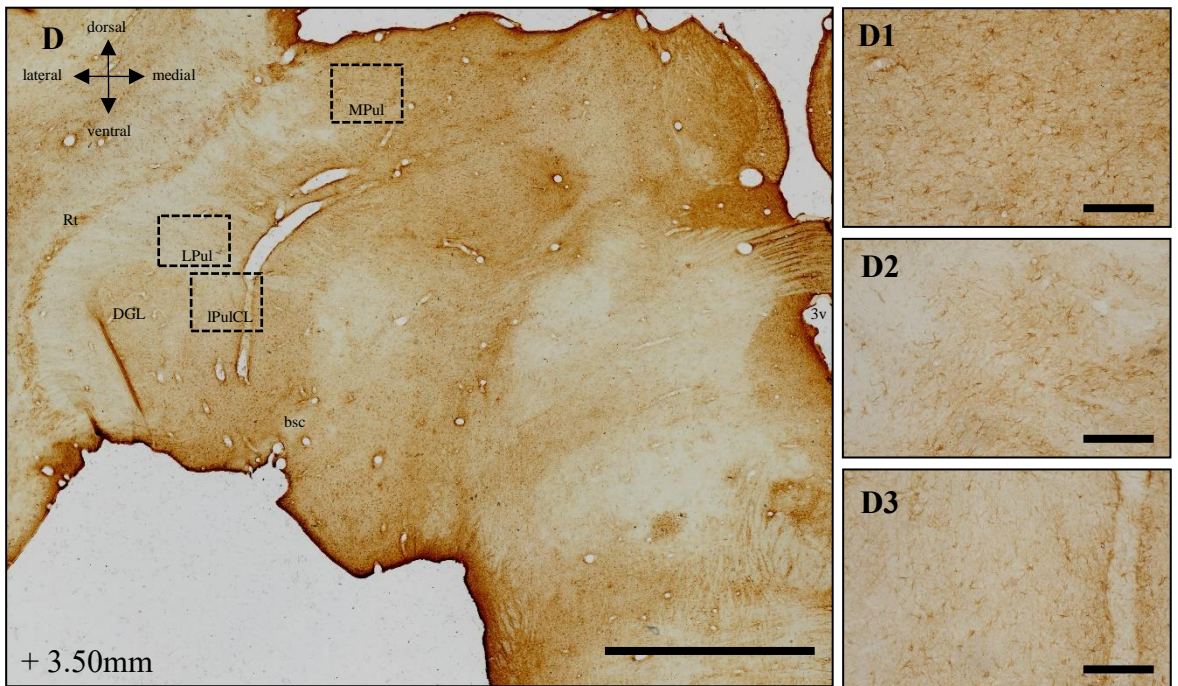
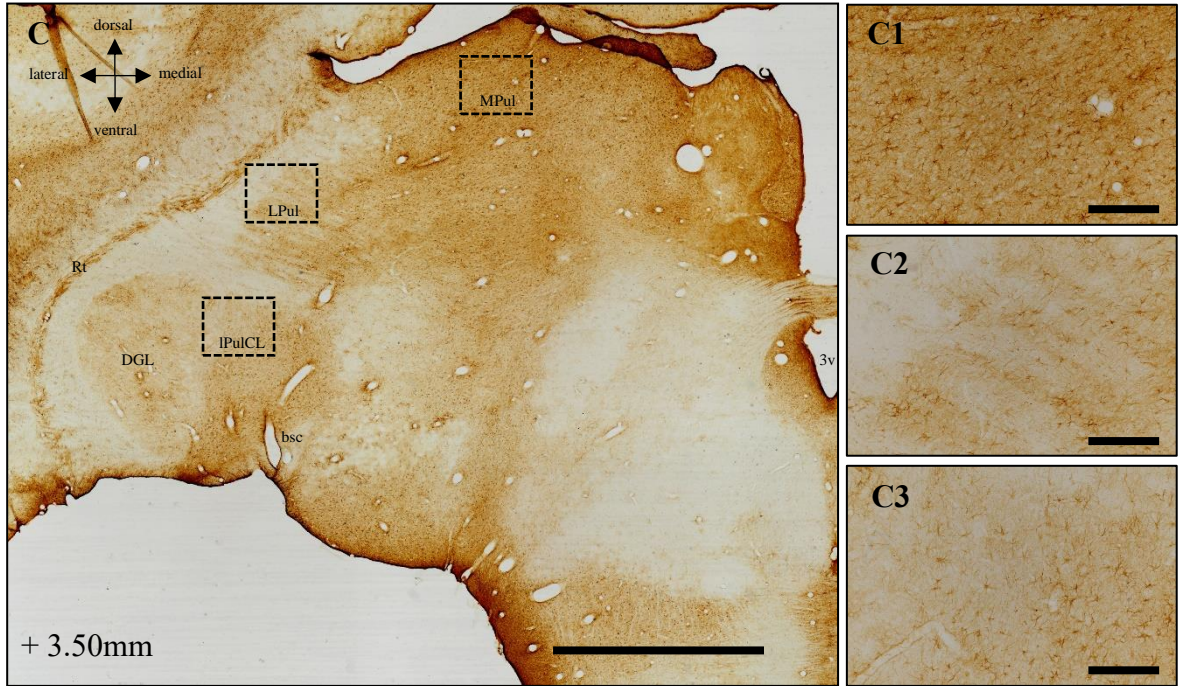
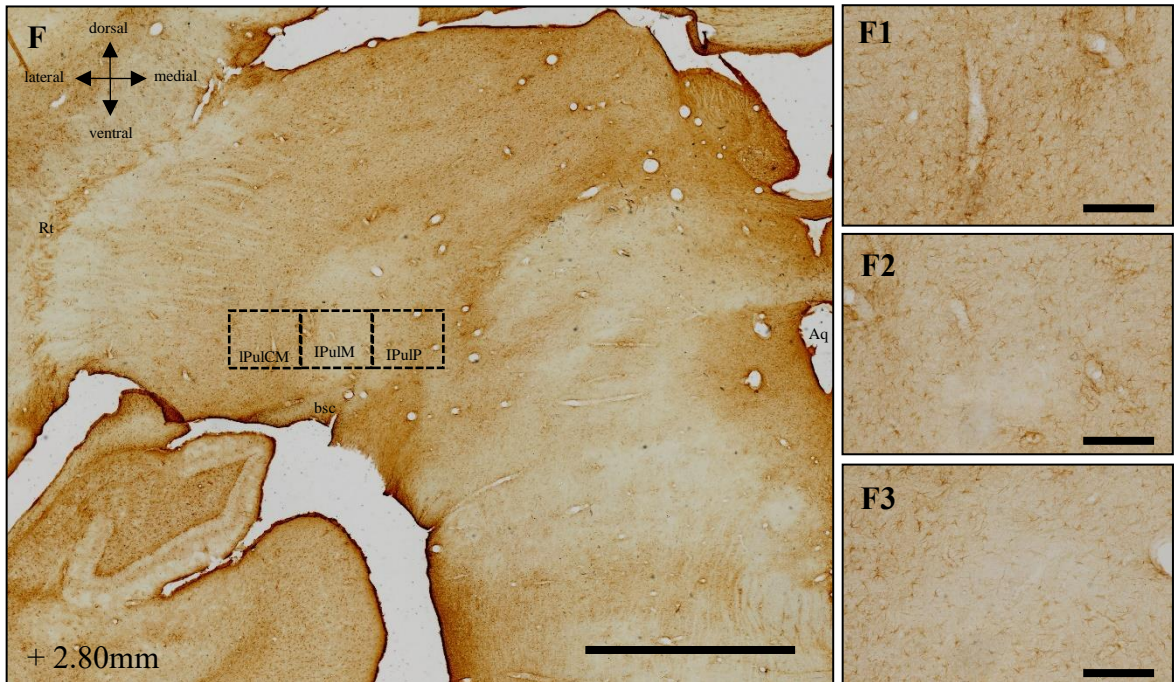
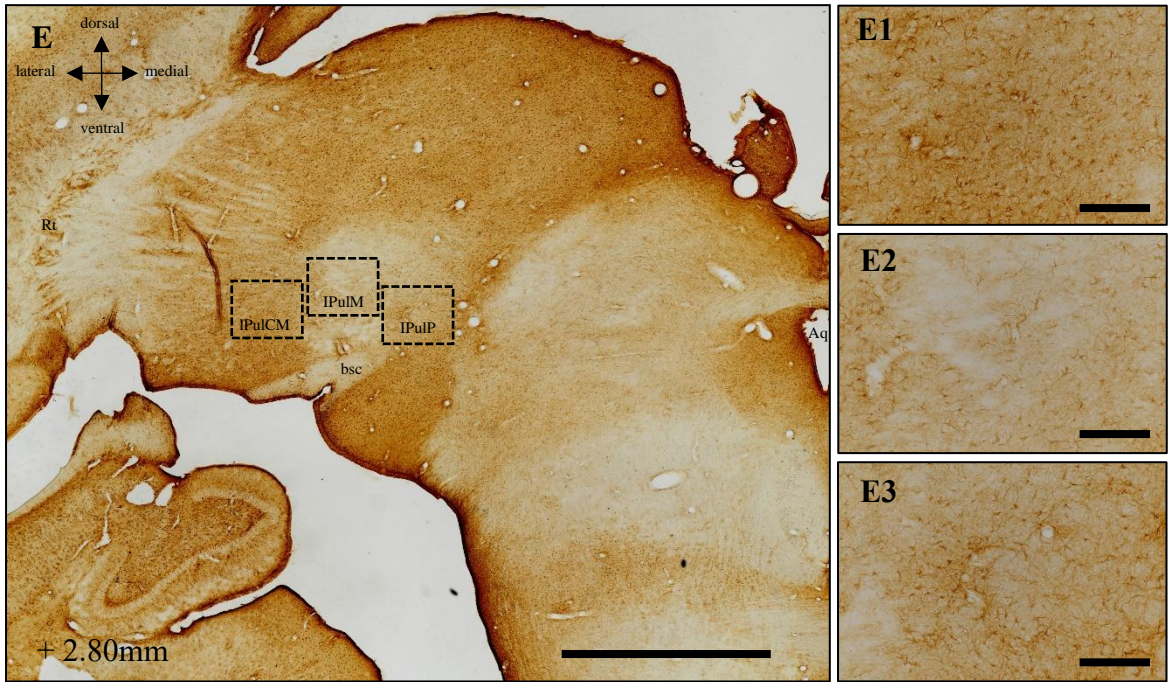


Figura 10 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto (A) e idoso (B) mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à GFAP em nível rostral, através de imunistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões medial, anterior e lateral mostradas em maior aumento em A1-3 e B1-3, respectivamente. MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral; Rt, núcleo reticular; DLG, núcleo geniculado lateral dorsal; 3v, terceiro ventrículo. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A e B, barra de escala de 300µm; em A1-3 e B1-3, barra de escala de 50µm.



Continuação da Figura 10 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto (C) e idoso (D) mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à GFAP em nível médio, através de imunistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões medial, lateral e inferior centrolateral mostradas em maior aumento em C1-3 e D1-3, respectivamente. MPul, pulvinar medial; LPul, pulvinar lateral e IPulCL, pulvinar inferior centrolateral; Rt, núcleo reticular; DLG, núcleo geniculado lateral dorsal; 3v, terceiro ventrículo; bsc, braço do colículo superior. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em C e D, barra de escala de 300 μ m; em C1-3 e D1-3, barra de escala de 50 μ m.



Continuação da Figura 10 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto (E) e idoso (F) mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à GFAP em nível caudal, através de imunoistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões inferior centromedial, inferior medial e inferior posterior mostradas em maior aumento em E1-3 e F1-3, respectivamente. IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior; Rt, núcleo reticular; bsc, braço do colículo superior; Aq, aqueduto cerebral. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em E e F, barra de escala de 300 μ m; em E1-3 e F1-3, barra de escala de 50 μ m.

5.3 – PROJEÇÃO RETINIANA AO COMPLEXO PULVINAR

A presença de fibras de projeção e botões imunorreativos a CTb foi observada tanto em animais adultos quanto em animais idosos evidenciando inervação proveniente da retina. Notamos que a projeção retiniana é exibida no nível médio de secção, apenas na subdivisão medial do pulvinar inferior contralateral ao olho que recebeu a injeção da CTb nos animais adultos e idosos (Figura 11A e B). As Figuras 11A1-A3 e B-B3 mostram as fibras de projeção e botões imunorreativos a CTb em animais adultos e idosos respectivamente. Visualizamos, nos animais adultos, em grande quantidade, axônios pouco ramificados com comprimento e espessura variáveis, varicosidades de diferentes tamanhos ao longo destes e terminação simples, sendo classificadas como simples (“*en passant*”) mostradas na figura C1-2. Nos animais idosos (Figura 11B1-5), notamos que a projeção retiniana é bem discreta quando comparada aos animais adultos, mantendo o mesmo tipo de classificação (Figura 11A4 e B4).

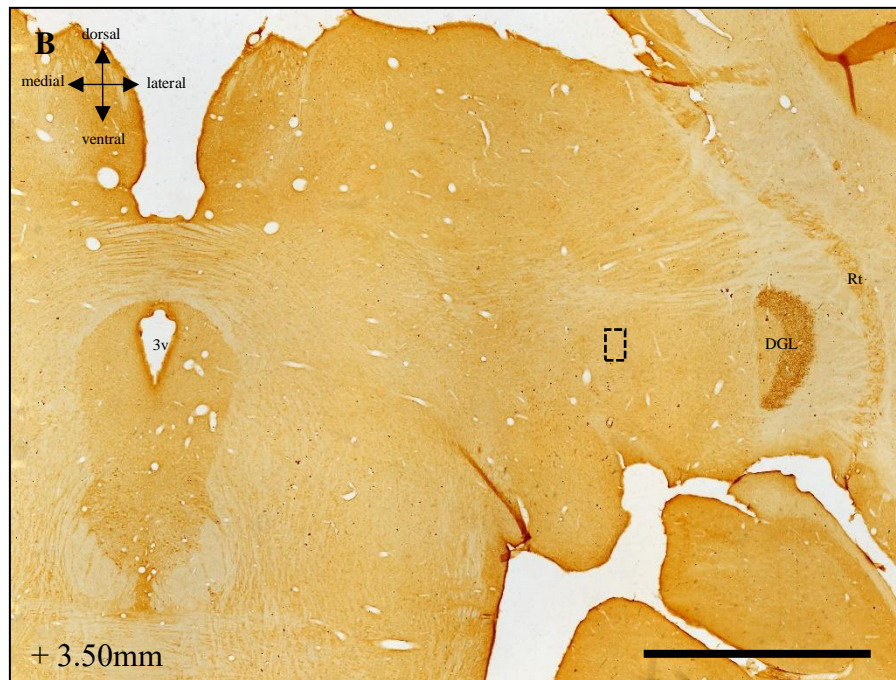
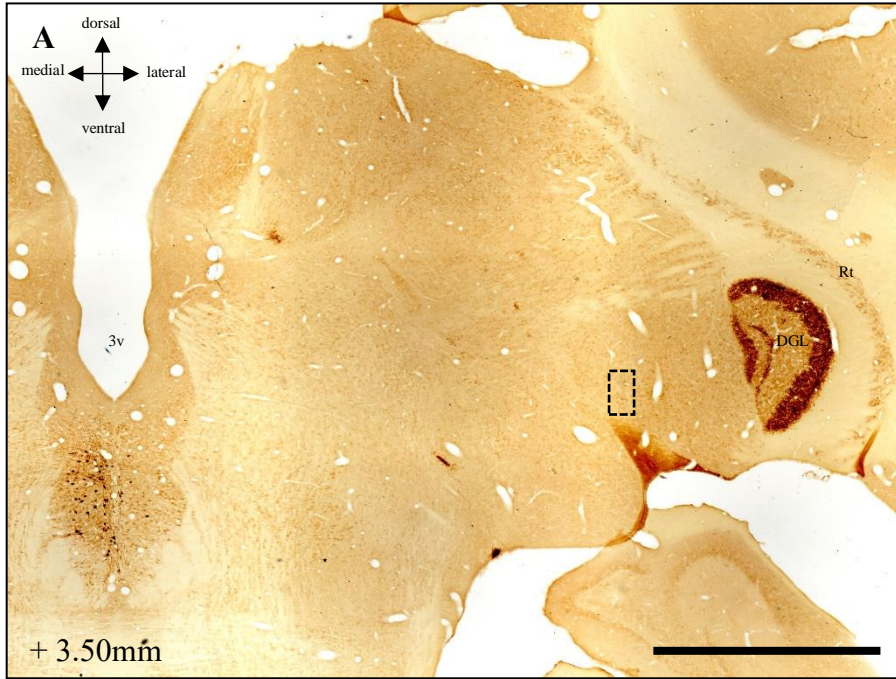
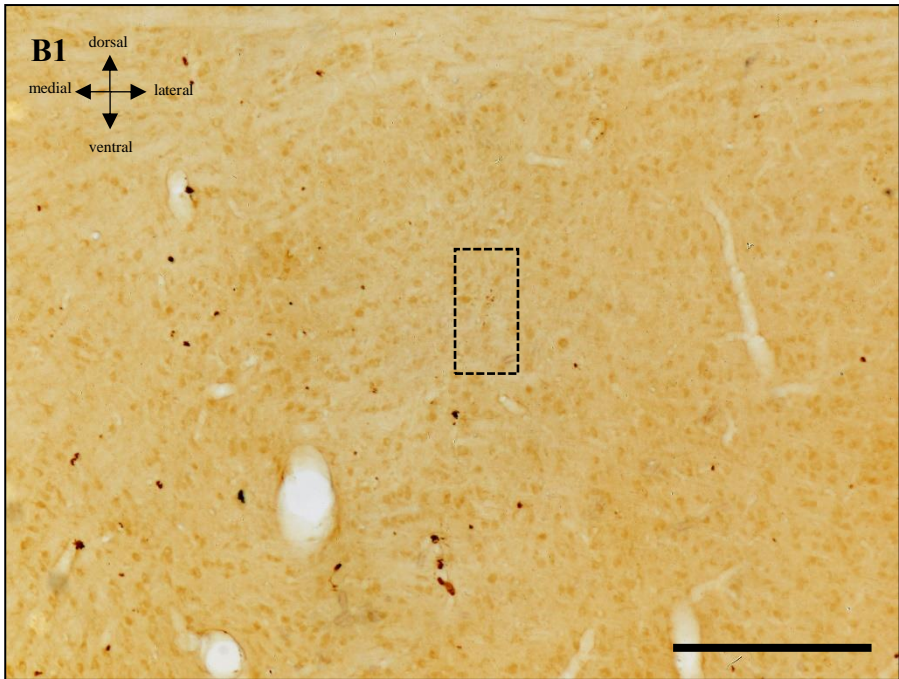
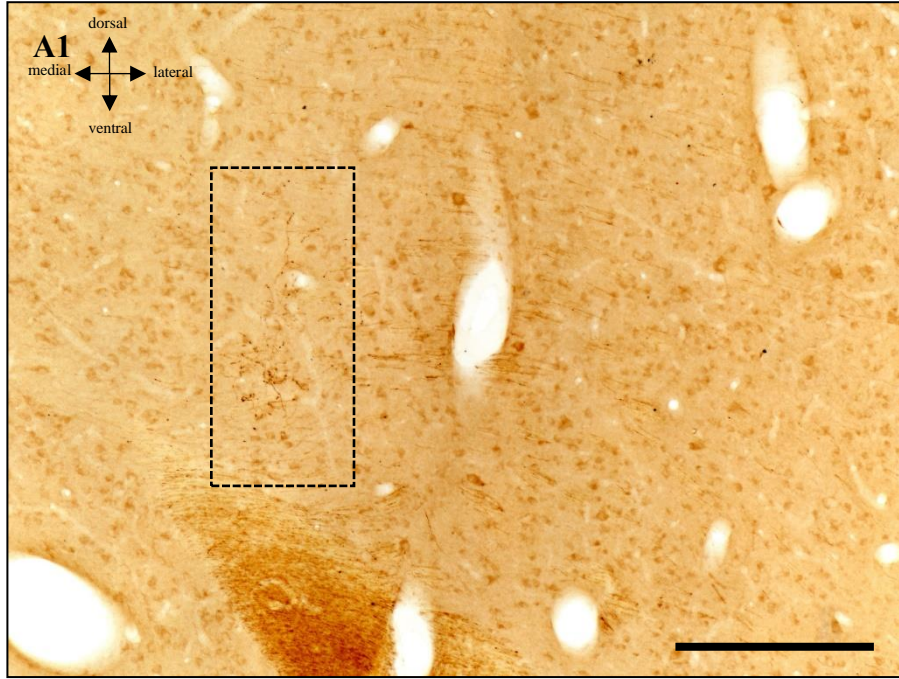
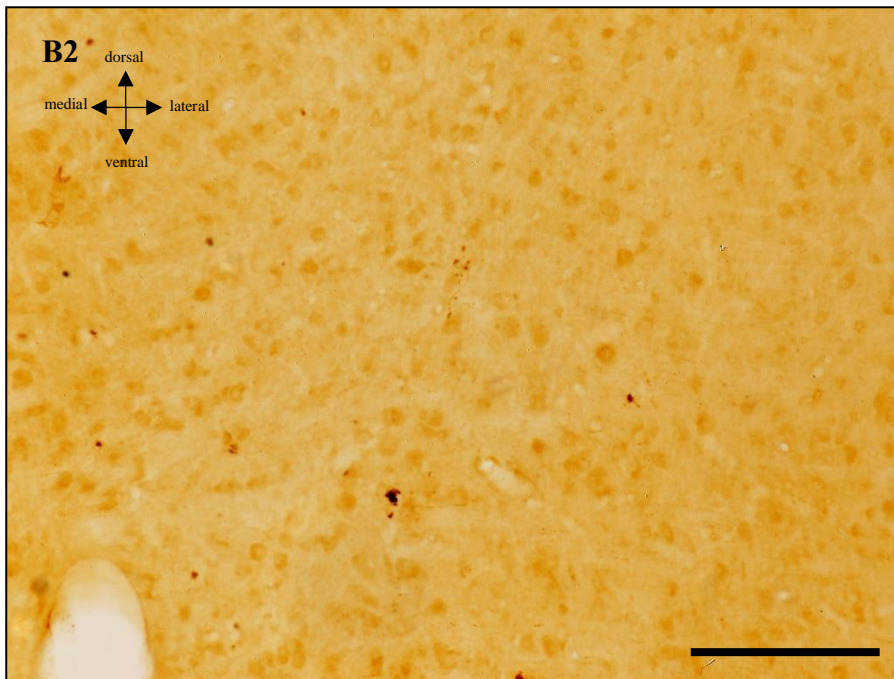
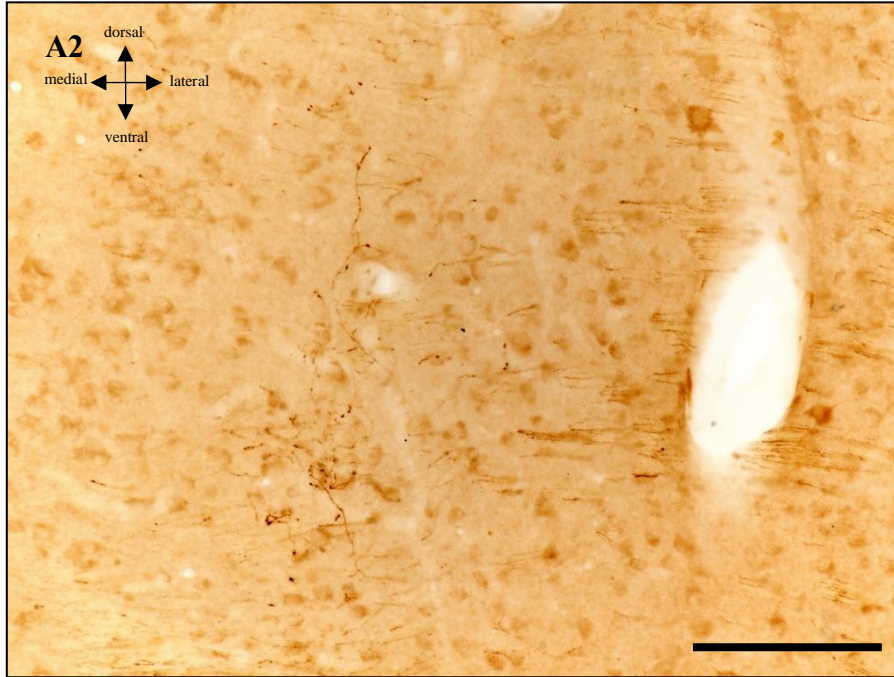


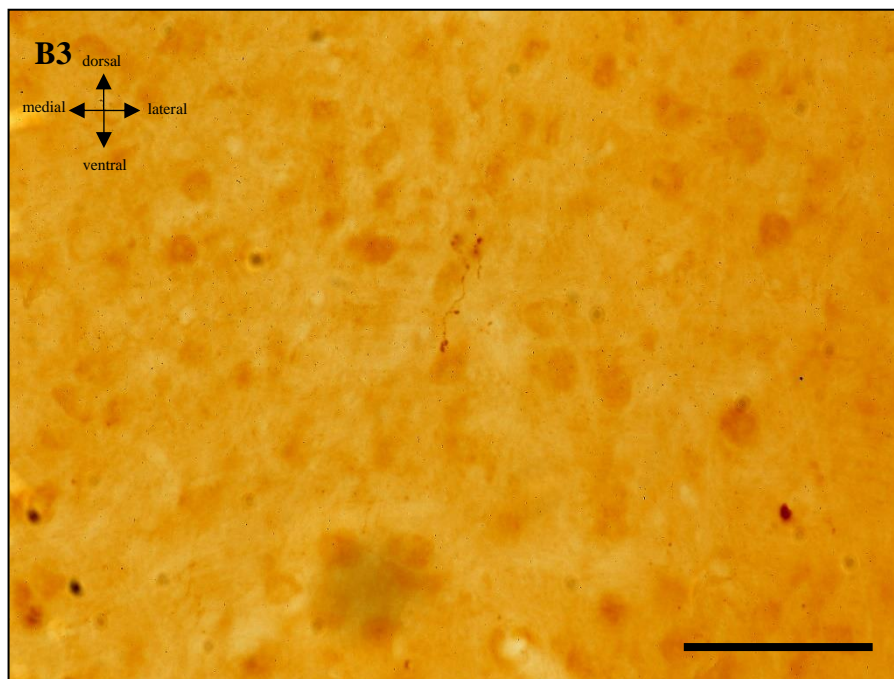
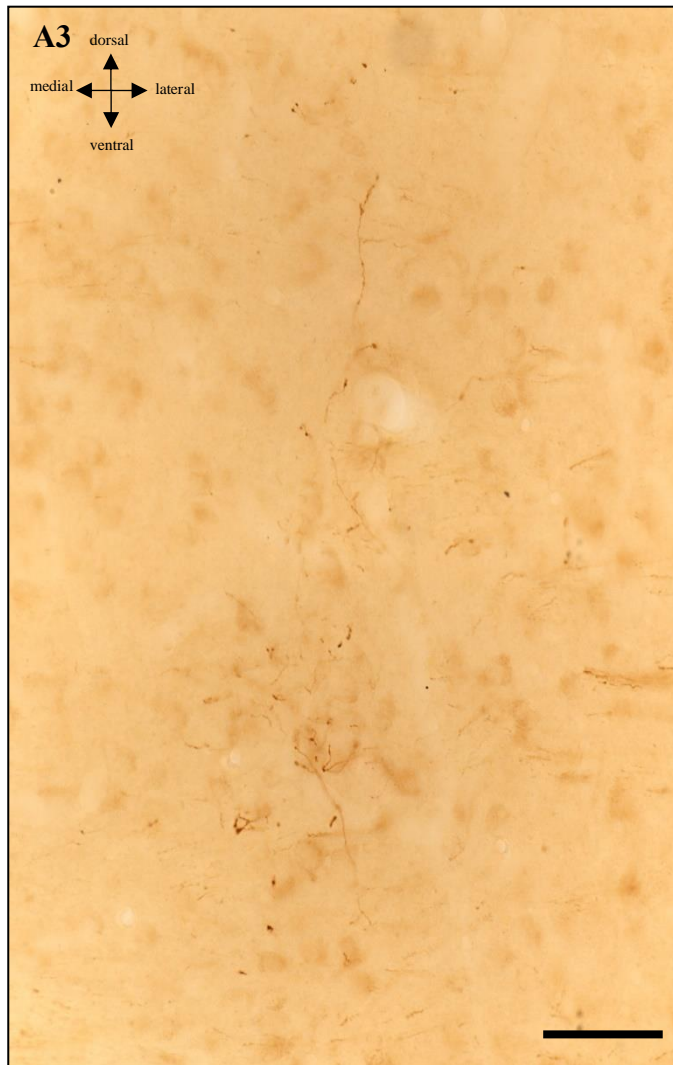
Figura 11 – Fotomicrografia em campo claro de secção coronal do encéfalo do sagui adulto (A) e idoso (B) em nível médio. A área pontilhada representa seleção da subdivisão inferior medial, local da aferência retiniana. Em A E B, barra de escala de 300µm.



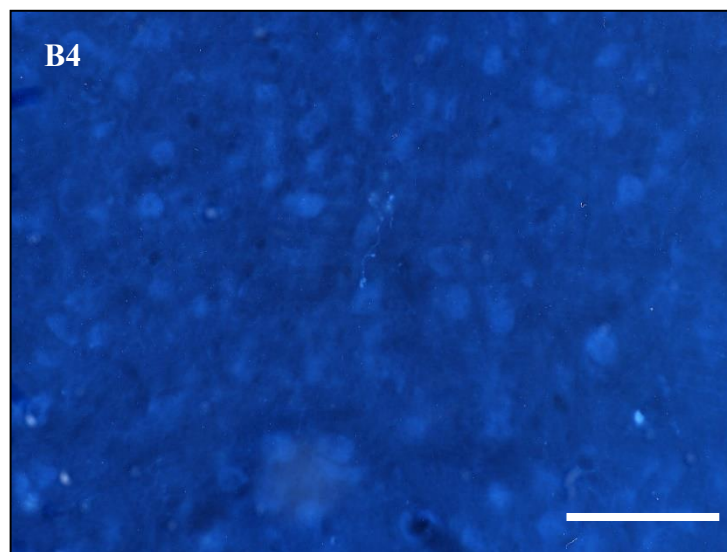
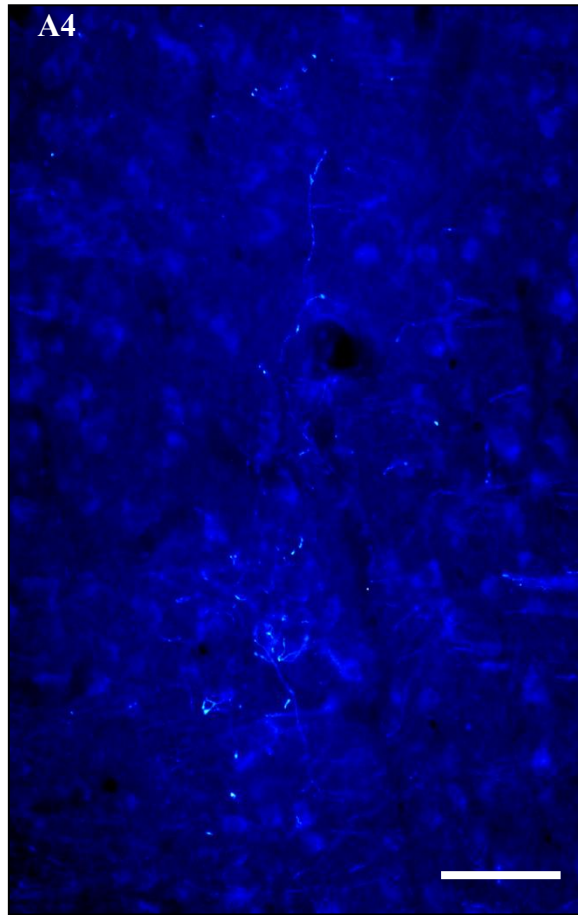
Continuação da Figura 11 – Fotomicrografia em campo claro de secção coronal do encéfalo do sagui adulto (A1) e idoso (B1) em nível médio em maior aumento (A1 e B1, 10X). As áreas pontilhadas em A1 e B1 representam seleção da subdivisão inferior medial, local da aferência retiniana. Em A1 e B1, barra de escala de 100 μ m.



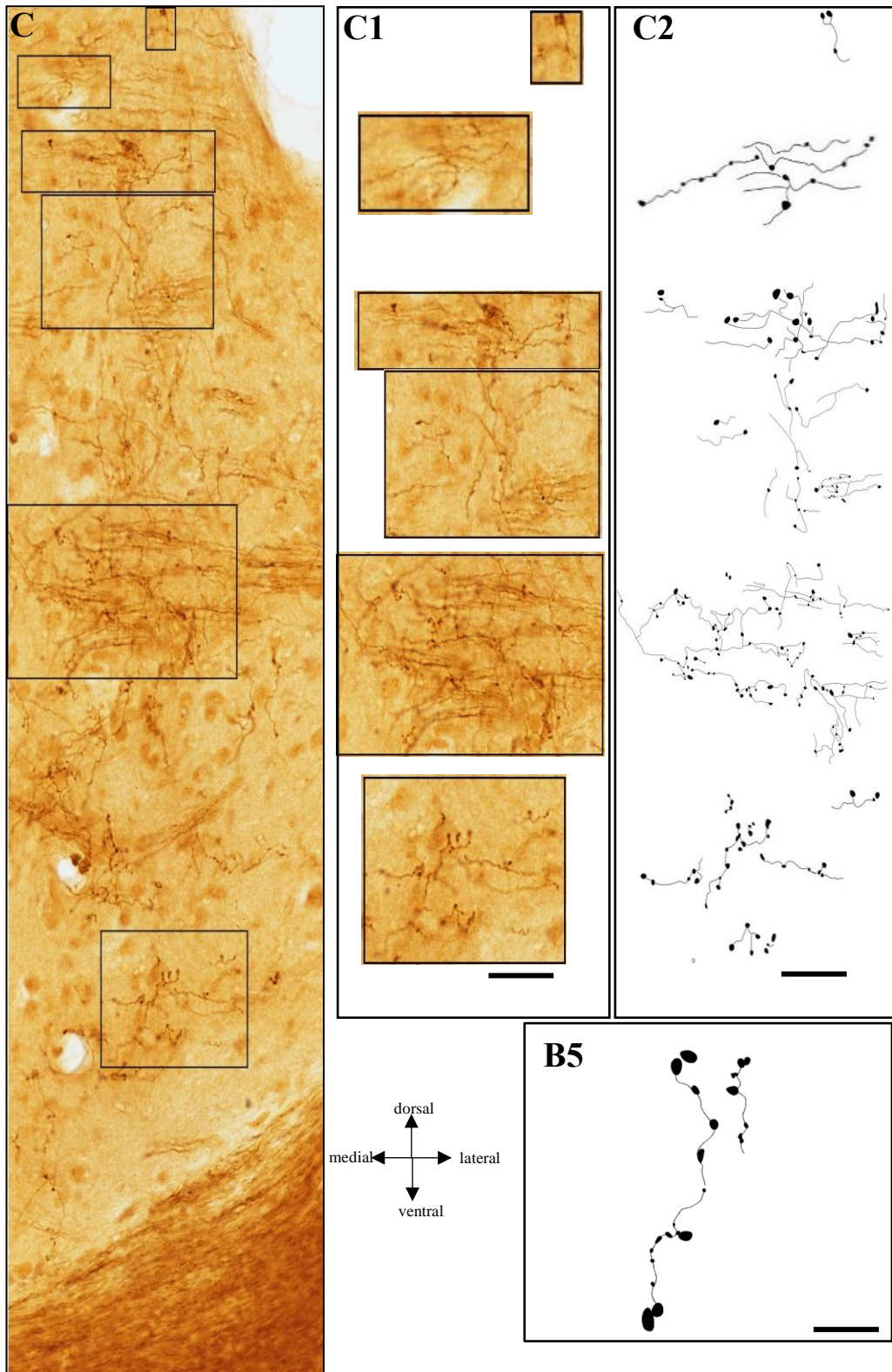
Continuação da Figura 11 – Fotomicrografia em campo claro de secção coronal do encéfalo do sagui adulto (A2) e idoso (B2) em nível médio em maior aumento (A2 e B2, 20X). Em A2 e B2 observamos a presença de fibras e botões imunorreativos a CTb. Em A2 e B2, barra de escala de 50 μ m.



Continuação da Figura 11 – Fotomicrografia em campo claro de secção coronal do encéfalo do sagui adulto (A3) e idoso (B3) em nível médio em maior aumento evidenciando o tipo de fibra *en passant* (A3 e B3, 40X). Em A3 e B3, barra de escala de 20µm.



Continuação da Figura 11 – Fotomicrografia em campo claro de secção coronal do encéfalo do sagui adulto (A) e idoso (B) em nível médio em maior aumento evidenciando o tipo de fibra *en passant* (40X). Inversão de cores no Software Canvas X. Em A e B, barra de escala de 20µm.



Continuação da Figura 11 – Fotomicrografia em campo claro de secção coronal do encéfalo do sagui adulto em nível médio em maior aumento evidenciando o tipo de fibra *en passant* (C, 20X, C1 40X). As áreas selecionadas em C estão representadas em C1. O desenho das fibras e botões estão ilustrados em C2. O desenho das fibras e botões no sagui idoso está representado em B5. Em B5, barra de escala de 20 μ m; em C, barra de escala de 50 μ m; em C1 e C2, barra de escala de 20 μ m.

6. DISCUSSÃO

6.1 CITOARQUITETURA PELO MÉTODO DE NISSL

As evidências atuais sustentam a visão de que o complexo pulvinar compreende o pulvinar inferior que inclui quatro núcleos: pulvinar inferior posterior (PIp), pulvinar inferior medial (PIm), pulvinar inferior centromedial (PIcm) e pulvinar inferior centrolateral (PIcl). Pelo menos o PIp, PIm e PIcm, não estão completamente dentro do pulvinar inferior, mas se estendem acima do braço do colículo superior até o território da subdivisão medial, o pulvinar medial. As outras duas subdivisões são o pulvinar lateral e o pulvinar anterior (Baldwin et al., 2017, Jones 2007). Nossos resultados corroboram com as evidências anteriores.

Nos nossos resultados, os aspectos citoarquitetônicos obtidos pelo método de Nissl apontam o complexo pulvinar como um conjunto de núcleos talâmicos com células intensamente marcadas, possibilitando a identificação de quatro núcleos. Nossos dados estão de acordo com dados obtidos em humanos e *Macaca* (Olszewski, 1952; Hirai & Jones, 1989a; Grieve et al., 2000; Munkle et al., 2000; Shipp, 2003) mas difere dos achados em *Cebus* onde foi demonstrado a presença de apenas três núcleos: pulvinar medial (PM), pulvinar lateral (PL) e pulvinar inferior (PI) (Soares et al., 2001). Nesse mesmo estudo, foi observado a presença de cinco subdivisões no núcleo pulvinar inferior: posterior (PIP), medial (PIM), central (PIC), lateral (PIL) e lateral dorsal (PILS) corroborando com dados anteriores em *Saimiri* e em *Macaca* usando calbindina, parvalbumina, e citocromo-oxidase (Cusick et al., 1993; Gutierrez et al., 1995; Gray et al., 1999).

Nossos dados com base na citoarquitetura diferem desses dados, visto que observamos apenas quatro subdivisões para o núcleo pulvinar inferior: pulvinar inferior centrolateral (IpulCL), pulvinar inferior centromedial (IpulCM), pulvinar inferior medial (IpulM) e pulvinar inferior posterior (IpulP) mas corroboram com os dados em macaco-esquilo onde foi observado quatro subdivisões no pulvinar inferior (Baldwin et al., 2017).

Dados em saguis idosos utilizando a coloração de Nissl, mostrou uma redução significativa no número de neurônios presentes no núcleo supraquiasmático destes animais (Engelberth et al., 2014). Um estudo recente em humanos idosos, evidenciou por ressonância magnética atrofia cortical posterior acarretando défices visuo-espaciais, no entanto a conectividade do pulvinar medial e pulvinar lateral aumentaram (Fredericks et al., 2019).

Apesar de não realizar uma análise quantitativa, notamos que o complexo pulvinar em saguis idosos pelo método de Nissl mostrou-se com um grau de marcação reduzido, seja pela redução no número de células, ou ainda pelas alterações intracelulares resultantes do processo de envelhecimento biológico.

6.2 EXPRESSÃO DE NEUN

NeuN é considerada uma proteína nuclear específica do sistema nervoso é expressa no núcleo e no citoplasma da maioria de suas células e tem sido usada em muitos estudos (Mullen et al., 1992; Gittins e Harrison, 2004; Preusser et al., 2006). A imunorreatividade à NeuN pode ser detectada em várias espécies de vertebrados, incluindo anfíbios, pássaros e mamíferos sugerindo uma considerável conservação desta proteína na escala filogenética (Lind et al., 2005).

Estudos realizados com camundongos neonatos e adultos apontam que NeuN aparece precocemente no desenvolvimento do sistema nervoso e persiste na idade adulta (Mullen et al., 1992). Além disso, NeuN tem sido estudada como um marcador da maturação neuronal no sistema nervoso fetal humano onde células imunorreativas a NeuN são vistas após o processo de migração neuronal (Sarnat et al., 1998), em estudos morfométricos como marcador neuronal de tecido cerebral humano pós-morte (Wolf et al., 1996; Gittins e Harrison, 2004), em diagnósticos de histopatologia é considerado um marcador da diferenciação neuronal em tumores cerebrais (Preusser et al., 2006; Soylemezoglu et al., 2003) e em estudos de desordens neuro-degenerativas (Falke et al., 2003; Kordower, et al., 2001). Estudos relatam que a imunorreatividade para NeuN diminui drasticamente após danos no sistema nervoso central (Bendel et al., 2005; Ajmo et al., 2006; Liu et al., 2009) e essa diminuição pode indicar uma mudança na antigenicidade da proteína NeuN em vez de morte celular, e alguns neurônios podem recuperar o seu padrão de marcação após o reparo (Unal-Cevik et al., 2004).

No complexo pulvinar os neurônios apresentam propriedades fisiológicas heterogêneas. A diversidade celular parece refletir o direcionamento das células cujas características de resposta retêm as características das células de entrada. Com isso, os diferentes tipos de aferências reflete escassez de interconectividade local com mínima mistura lateral de sinais dentro de uma mesma subdivisão do pulvinar (Berman & Wurtz, 2008; 2010; 2011). No nosso estudo observamos, através da imunorreatividade das células a NeuN, a presença de células com morfologia distinta e intensidade de marcação diferenciadas estando bem distribuídas nas

subdivisões deste complexo. Nossos dados podem representar possíveis particularidades morfofisiológicas dessas células quanto suas conectividades. É interessante considerar como diferentes tipos de aferências podem moldar a função no nível neuronal e comportamental. Por exemplo, as células do pulvinar que recebem informações do colículo superior podem ter uma função fundamentalmente diferente das que recebem informações do córtex como foi observado em estudos nos últimos anos (Berman & Wurtz, 2008; 2010; 2011) demonstrando assim que as populações locais de neurônios de projeção eram altamente heterogêneas em relação às suas fontes de entrada e aos tipos de sinais que eles transmitiam.

Embora NeuN tenha sido identificada em grande parte das células nervosas, existem neurônios NeuN negativos incluindo os neurônios Cajal-Retzius da camada 1 do córtex cerebral em desenvolvimento, o núcleo olivar inferior no bulbo, as células mitrais no bulbo olfatório, as células de Purkinje e o núcleo denteado no cerebelo (Sarnat et al., 1998; Kumar & Buckmaster, 2007). Além disso, NeuN não é expressa em células da glia (Mullen et al., 1992). Estudos em humanos levam a crer que a falta de imunorreatividade para NeuN por neurônios do núcleo olivar inferior e núcleo denteado cerebelar sugere uma origem embrionária comum com as células de Purkinje a partir do tubérculo cerebelar. Apesar disso, os neurônios pontinos basais que apresentam mesma origem embrionária dos grupamentos supracitados exibem forte imunorreatividade à NeuN durante o desenvolvimento e na idade adulta (Sarnat et al., 1998). Esta diferença sugere que talvez a expressão de NeuN não apresente tanta influência em relação a origem embrionária, mas sim em outros aspectos celulares. Estudos relatam que a imunorreatividade à NeuN é modulada por sinais fisiológicos e patológicos como despolarização crônica da célula e lesões em nervos e tratos (Weyer & Schilling, 2003; McPhail et al., 2004).

Um estudo a nível molecular, documenta que NeuN apresenta duas isoformas eletroforicamente distinguíveis de 46 KDa e 48KDa e ambas as isoformas podem ser encontradas no núcleo celular e citoplasma, porém a abundância nestes compartimentos é distinta podendo existir pelo menos sete diferentes formas fosforiladas da proteína NeuN, onde a imunorreatividade desta depende do estado de fosforilação visto que um grupamento fosfato é crítico para a adequada formação do epítopo a ser reconhecido pelo anticorpo (Lind et al., 2005).

Diante da proposta que a imunorreatividade à NeuN depende do estado de fosforilação da proteína (Lind et al., 2005), processo de envelhecimento poderia alterar os níveis de fosforilação, levando a perda de neurônios (Iqbal & Grundek-Iqbal, 2005). Estudos em sagui

idosos utilizando NeuN demonstra que o número de neurônios no núcleo supraquiasmático diminui significativamente (Engelbert et al., 2014). Nossos resultados apontam que nos animais idosos a intensidade de marcação a NeuN é reduzida no complexo pulvinar do sagui, podendo indicar diminuição no número de células ou alteração da antigenicidade das células presentes.

6.3 IMUNORREATIVIDADE À CALBINDINA

A Calbindina pertence a uma classe especial de proteínas que se ligam ao íon Ca^{2+} para regular a sua concentração intracelular.

Warner e colaboradores (2015) indica que a expressão das proteínas de ligantes de cálcio, parvalbumina e calbindina, fornece informações sobre o papel regulador das vias talâmicas. Estudos anteriores apontam que células imunorreativas a calbindina no pulvinar projetam principalmente para a camada 1 do córtex com função modulatória (Jones 1998, 2001; Shipp et al., 2003). Outros estudos demonstram que os neurônios de retransmissão pulvinar-MT expressam parvalbumina, sugerindo que eles são capazes de direcionar a aferência da retina para MT, enquanto os neurônios de retransmissão do GLD-MT expressam calbindina, o que é mais indicativo de um papel modulador (Sherman 2007, 2012).

Estudos em macacos-esquilo utilizaram calbindina (CB), para identificar o pulvinar inferior posterior (Ipulp) e o pulvinar inferior medial (IpulM), e subdividir o pulvinar inferior nas porções centrolateral (IPulCL) e centromedial (IPulCM). Os resultados revelaram que o IPulp e o IPulCM obtiveram intensa marcação para CB, enquanto o IPulCL obteve marcação menos intensa para CB. No pulvinar inferior medial (IPulM) houve pouca marcação de CB (Cusick et al., 1993; Gutierrez et al., 1995; Gray et al., 1999). Nossos dados em sagui adultos corroboram com os resultados descritos, visto que as células das subdivisões inferior posterior e inferior centrolateral apresentam forte imunorreatividade a CB, diferindo da subdivisão centromedial com menor intensidade de marcação. Na subdivisão inferior medial existe quase uma nulidade da marcação.

Nos animais idosos, a expressão de CB apresentou-se reduzida principalmente nas subdivisões do pulvinar inferior corroborando com Geng e colaboradores (2015) que sugerem uma redução da CB relacionada à idade e essa diminuição pode contribuir para os aumentos observados nos níveis de íons Ca^{2+} que por sua vez eleva o dano oxidativo.

6.4 EXPRESSÃO DE GFAP

Os astrócitos são elementos de sinalização dinâmica que integram entradas neuronais, exibem excitabilidade, podem modular neurônios vizinhos e participam em funções críticas e essenciais do sistema nervoso como plasticidade, aprendizagem e memória (Araque et al., 2001; Fields & Stevens-Graham, 2002; Hansson & Rönnbäck, 2003). Além disso, Os astrócitos são células que apresentam funções essenciais no sistema nervoso como a regulação das concentrações iônicas de cálcio e potássio, bem como a liberação de substâncias nos espaços extracelulares em resposta a neurotransmissores (Bowman & Kimelberg, 1984; Barbour, et al., 1989; Nowak, et al., 1987; Van den Pol, 1991; Zou et al., 2010). Os astrócitos podem regular a formação e remodelação de sinapses (Ullian et al., 2001), regular a diferenciação neuronal e induzir a neurogênese a partir de células-tronco neurais (Blondel et al., 2000; Song et al., 2002). Estudos mostram que os astrócitos apresentam um importante papel na regulação dos ritmos circadianos e que a comunicação intercelular entre neurônios e astrócitos é provavelmente efetuada através de junções comunicantes (Prosser et al., 1994; Tamada et al., 1998).

A proteína acídica fibrilar glial (GFAP) é um componente dos filamentos intermediários encontrada no citoplasma dos astrócitos e é comumente usada como um marcador específico para essas células (Eng et al., 1971; Lazarides, 1980). Esta proteína é detectada durante o desenvolvimento nas células da glia radial em resposta a danos (Bignami & Dahl, 1974) e também no cérebro em desenvolvimento normal de pintos (Tapscott et al., 1981) e primatas (Levitt & Rakic, 1980; Choi, 1986). A expressão de GFAP também pode ser detectada na vida pós-natal através de imunistoquímica e outras técnicas (McDermott & Lantos, 1989). Estudos mostram a presença de um ritmo endógeno na imunorreatividade para esta proteína no NSQ de hamsters e camundongos, modulado pelas aferências retinianas (Lavialle et al., 2001; Santos et al., 2005) e achados em ratos e hamsteres mostram que a GFAP está presente em toda extensão do NSQ e FIG desses animais (Morin et al., 1989).

Embora seja amplamente utilizado como marcador de astrócitos, a função de GFAP ainda é incerta (Middeldorp & Hol, 2011). Neste trabalho, observamos células imunorreativas a GFAP que comprova a presença de astrócitos em todos os níveis de secção do complexo pulvinar. Um estudo recente em humanos demonstra que a expressão dessa proteína está presente em todo o complexo em indivíduos saudáveis, sendo intensificada quando paciente apresentam acúmulo de proteínas anormais (corpos de Lewy) em todo o complexo pulvinar e doença de Alzheimer. O fato de o pulvinar apresentar um papel importante na atenção visual,

na seleção de alvos visuais e na percepção visual afetiva, pacientes com essas patologias apresentam comprometimento dessas funções tornando-os vulneráveis a alucinações visuais (Erskine et al., 2017). Um estudo em *Tupaia belangeri* aponta que o número de células gliais no pulvinar superam o número de neurônios imunorreativos a NeuN, em uma proporção de 2,5:1(Wei et al., 2011).

Apesar de estudos apontarem uma maior expressão de astrócitos em idosos (Cerbai et al., 2012; Engelbert et al., 2013), nossos dados diferem e sugerem uma redução da expressão de GFAP em toda a extensão do complexo pulvinar. Acredita-se que os astrócitos não são essenciais para o processamento de informações, mas fornecem suporte aos neurônios (Kandel et al., 2014). No nosso estudo, embora qualitativo, observamos uma redução neuronal e isso pode refletir na diminuição da expressão dessas células gliais, visto que as mesmas estabelecem íntima relação com os neurônios.

6.5 FIBRAS/TERMINAIS IMUNORREATIVOS A CTB

A informação fótica é transmitida ao cérebro por pelo menos 17 tipos distintos de células ganglionares definidas por suas características morfológicas, propriedades de resposta a luz e centros de projeção (Field & Chichilnisky, 2007). Perry e colaboradores em 1984 observaram em primata, projeções da retina para as camadas magnocelular e parvocelular do núcleo geniculado lateral indicando um papel dessas na percepção visual.

O pulvinar visual, que inclui as subdivisões inferior e lateral, apresentam funções visuais e são distintas de outras partes do tálamo que são tradicionalmente incluídas no pulvinar, como o pulvinar medial, que tem amplas conexões com partes não sensoriais ou de associação do córtex e o pulvinar anterior, uma parte importante, mas não estudada, do sistema somatossensorial (Jones, 2007).

A CTb tem sido amplamente utilizada como um traçador neuronal altamente sensível em diversos estudos (Mikkelsen, 1992; Schimizu et al., 1994; Nakagawa et al., 1998; Costa et al., 1998; 1999; Cavalcante et al., 2005; Engelberth et al., 2008; Nascimento Jr et al., 2010; Cavalcante et al., 2011; Morais et al., 2014; Fiuza et al., 2016).

O papel do pulvinar como um relé da informação retiniana ao córtex durante o desenvolvimento é crítico por apoiar o comportamento visual no recém-nascido e facilitar a maturação do córtex extra-estriado. Estudos recentes utilizando injeção de traçador anterógrado identificaram uma via transitória presente no início da vida que se projeta diretamente da retina

para o pulvinar, sem envolvimento do colículo superior, com terminais marcados na porção medial do núcleo pulvinar inferior (IPulm) cujos neurônios se projetam para a área temporal medial (MT) uma área cortical associada com a via visual dorsal, visto que o desenvolvimento da percepção de movimento antes da percepção de forma é essencial para a sobrevivência do animal (O'Brien et al., 2001; Kiorpes & Movshon, 2004; Warner et al., 2010; 2012; Kiorpes et al., 2012). Estudos envolvendo lesões no córtex visual primário em saguis neonatos apontam um fortalecimento da via retino-pulvinar-MT (Leopold, 2012; Bridge et al., 2017). No entanto, em primatas adultos esta via retino-pulvinar está presente, porém é muito mais esparsa pois durante o desenvolvimento normal, à medida que a via retino-geniculado-estriado amadurece e começa a dominar a entrada visual no córtex através das radiações ópticas, a via visual inicial através do pulvinar inferior medial regride (Nakagawa & Tanaka, 1984; Cowey et al., 1994; O'Brien et al., 2001; Warner et al., 2010; Bridge et al., 2017).

Nossos dados evidenciam a presença de numerosas fibras/terminais no núcleo pulvinar inferior medial dos animais adultos através da injeção intraocular de CTb. Os axônios podem ser classificados como simples (“*en passant*”) por serem pouco ramificados com comprimento e espessura variáveis com varicosidades de diferentes tamanhos ao longo destes e terminação simples (Sherman, 2012). Nossos dados corroboram com dados anteriores em sagui onde foi observada a presença de terminais retinianos no pulvinar inferior medial adjacente ao braço do colículo superior contralateral ao olho que recebeu a injeção de CTb (Warner et al., 2010). Nossos dados sugerem pela classificação simples das fibras que a projeção retiniana é direta ao pulvinar e parece não formar projeções colaterais, o que corrobora com dados anteriores que demonstra que a aferência retiniana ao pulvinar independe das projeções retinianas ao colículo superior e ao núcleo geniculado lateral (Kwan et al., 2019).

No entanto, observamos em nosso estudo que a projeção da retina para o pulvinar em sagui idoso é discreta quando comparada aos animais adultos, porém a classificação (“*en passant*”) é conservada. Estudos com ratos e saguis idosos utilizando CTb em áreas talâmicas e hipotalâmicas respectivamente, demonstram um declínio da aferência retiniana (Engelbert et al., 2014; Fiuza et al., 2016). Na retina, várias doenças degenerativas ocorrem como resultado de alterações em mecanismos celulares e moleculares, sendo a idade um contribuinte para o desenvolvimento de várias patologias. Um estudo realizado com camundongos jovens e idosos demonstra que o aumento da idade promove alterações nos genes que codificam proteínas envolvidas na ativação da resposta imune e da microglia presente na retina (Chen et al., 2010). Durante o processo de envelhecimento o número de células ganglionares decresce, assim como,

a população dos fotorreceptores sendo os do tipo bastonete mais afetada quando comparada com a dos fotorreceptores do tipo cone (Curcio & Druker, 1993; Curcio et al., 1993; Gao & Hollyfield, 1992). Essa redução da projeção observada em nosso trabalho pode ser resultante de alterações nas células ganglionares da retina que projetam para o IPulM.

Estudo de conexões observou que o tamanho das varicosidades é associado com uma maior eficiência sináptica. As varicosidades de maior tamanho (classe 1) exerce um grande efeito pós-sináptico (driver) enquanto as vias com botões de menor tamanho (classe 2) exercem efeito pós-sináptico menor, com função modulatória (modulator) (Sherman, 2012; Petrof & Sherman, 2013). Notamos em nosso estudo que as fibras/terminais que expressam CTb na subdivisão inferior medial em sagui parecem exercer um papel modulador, visto que os botões são pequenos e os axônios delgados característicos da classe 2. Kwan e colaboradores (2019) levantam a questão de que o pulvinar poderia conduzir ou modular a função visual.

Estudos demonstram que o pulvinar apresenta uma circuitaria local que interage intrinsecamente devido a presença de: axônios ramificados e altamente divergentes que podem atravessar e serem vistos em outras subdivisões (Rockland 1996, 1998); longos interneurônios inibitórios (Imura & Rockland 2006); “pontes” entre as subdivisões do pulvinar inferior que expressam calbindina e substância P (stepniewska, 2003); e aferências inibitórias do núcleo reticular o qual recebe ramificações excitatórias dos axônios tálamo-corticais e cortico-talâmicos (Sherman & Guillery, 2000).

Apesar de ser um estudo de caráter qualitativo, nossos dados apontam diferenças entre animais adultos e idosos sugerindo que o complexo pulvinar pode sofrer uma perda significativa de caráter funcional quanto ao processamento da informação visual.

7. CONCLUSÕES

Neste estudo podemos concluir através de análise qualitativa, que o complexo pulvinar do tálamo em saguis adultos e idosos apresenta-se composto por quatro porções: anterior, medial, lateral e inferior. O pulvinar inferior apresentou quatro subdivisões: centrolateral, centromedial, medial e posterior. Todas as subdivisões foram evidenciadas pelas colorações de Nissl, NeuN e CB que possibilitou a delimitação destes núcleos.

A distribuição e morfologia neuronais puderam ser visualizadas e caracterizadas através de imunohistoquímica contra NeuN e CB onde observamos neurônios morfologicamente distintos (esféricos, fusiformes e piramidais) nas subdivisões do complexo pulvinar do sagui. Nos animais idosos, o padrão de marcação celular a NeuN e a CB foi diminuído, com áreas de quase nulidade como o pulvinar inferior medial para CB. No entanto, o caráter morfológico distinto observado em nos animais adultos e idosos pode sugerir diferenças funcionais das subdivisões.

A imunorreatividade à CTb mostrou-se diminuída entre animais adultos e idosos. Nos animais adultos visualizamos que a projeção da retina ao pulvinar alcança a subdivisão inferior medial com uma maior densidade de fibras/terminais com axônios delgados, presença de varicosidades ao longo do axônio sem ramificações laterais. Nos animais idosos, a projeção retiniana é bem sutil, no entanto apresenta as mesmas características descritas nos animais adultos, sendo em ambos as fibras simples com papel modulatório.

A presença de astrócitos em todas as subdivisões do complexo pulvinar foi caracterizada pela imunorreatividade destes à GFAP. Nos animais idosos, observamos uma redução na expressão da proteína quando comparados aos animais adultos. Essa diferença pode ser aparentemente por uma diminuição da população celular.

Diferenças morfológicas foram observadas no nosso estudo, no entanto, análises quantitativas poderiam elevar a precisão dos dados.

8. REFERÊNCIAS¹

- Abbot, D. H., Barnett, D. K., Colman, R. J., Yamamoto, M. E., & Schultz-Darken, N. J. (2003). Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. *Comparative Medicine*, *53*(4), 339-350.
- Ajmo Jr, C. T., Vernon, D. O., Collier, L., Pennypacker, K. R., & Cuevas, J. (2006). Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 h after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Current Neurovascular Research* *3*, 89-98.
- Allman, J. M., Kaas, J. H., Lane, R. H., & Miezin, F. M. (1972). A representation of the visual field in the inferior nucleus of the pulvinar in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *Brain Research* *40*, 291-302. doi.org/10.1016/0006-8993(72)90135-7.
- Araque A, Carmignoto G, & Haydon PG. 2001. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annual Review Physiology* *63*, 795-813.
- Baldwin, M. K. L., Balaram, P., & Kass, J. H. (2017). The evolution and functions of nuclei of the visual pulvinar in primates. *The Journal of Comparative Neurology* *525*, 3207–3226. doi.org/10.1002/cne.24272.
- Bao, Z-Z. (2008). Intraretinal projection of retinal ganglion cell axons as a model system for studying axon navigation. *Brain Research* *1192*, 165-177. doi: 10.1016/j.brainres.2007.01.116.
- Barbour, B., Szatkowski, M., Ingledew, N., & Attwell, D. (1989). Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells. *Nature* *342*, 918-920.
- Basso, M. A., Uhlich, D., & Bickford, M. E. (2005). Cortical function: a view from the thalamus. *Neuron* *45*, 485-488. doi:10.1016/j.neuron.2005.01.035.
- Bendel, O., Alkass, K., Bueters, T., von Euler, M., & von Euler, G. (2005). Reproducible loss of CA1 neurons following carotid artery occlusion combined with halothane-induced hypotension. *Brain Research* *1033*, 135-42. doi.org/10.1016/j.brainres.2004.11.033.

¹Referências formatadas conforme as normas da Associação Americana de Psicologia (American Psychological Association – APA).

- Benevento, L. A., & Standage, G. P. (1983). The organization of projections of the retinorecipient and nonretinorecipient nuclei of the pretectal complex and layers of the superior colliculus to the lateral pulvinar and medial pulvinar in the macaque monkey. *The Journal of Comparative Neurology* 217, 307-336. <https://doi.org/10.1002/cne.902170307>.
- Berkovitz, B. K., & Pacy, J. (2000). Age changes in the cells of the intra-articular disc of the temporomandibular joints of rats and marmosets. *Archives of Oral Biology* 45, doi:987-995. 10.1016/s0003-9969(00)00067-4.
- Berman, N., & Jones, E. G. (1977). A retino-pulvinar projection in the cat. *Brain Research* 134:237-248. [doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)91070-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)91070-8).
- Berman, R. A., & Wurtz, R. H. (2008). Exploring the pulvinar path to visual cortex. *Progress in Brain Research* 171, 467–473. doi:10.1016/S0079-6123(08)00668-7.
- Berman, R. A., & Wurtz, R. H. (2010). Functional identification of a pulvinar path from superior colliculus to cortical area MT. *Journal of Neuroscience* 30, 6342–6354. doi:10.1523/JNEUROSCI.6176-09.2010.
- Berman, R. A., & Wurtz, R. H. (2011). Signals conveyed in the pulvinar pathway from superior colliculus to cortical area MT. *Journal of Neuroscience* 31, 373–384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4738-10.2011>.
- Bignami, A., & Dahl, D. (1974). Astrocyte-specific protein and radial glia in the cerebral cortex of newborn rat. *Nature* 252, 55-56.
- Blondel, O., Collin, C., McCarran, W. J., Zhu, S., Zamostiano, R., Gozes, I., ... McKay, R. D. G. (2000). A glial derived signal regulating neuronal differentiation. *The Journal of Neuroscience* 20, 8012-8020.
- Bos, J., & Benevento, L. A. (1975). Projections of the medial pulvinar to orbital cortex and frontal eye fields in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Experimental Neurology* 49, 487-496. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(75\)90103-X](https://doi.org/10.1016/0014-4886(75)90103-X).
- Bowman, C. L., & Kimelberg, H. K. (1984). Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primare culture. *Nature* 311, 656-659. doi:10.1038/311656a0.

- Bridge, H., Leopold, D. A., & Bourne, J. A. (2016). Adaptive pulvinar circuitry supports visual cognition. *Trends in Cognitive Sciences*, 20(2), 146–157. doi:10.1016/j.tics.2015.10.003.
- Byne, W., Buchsbaum, M. S., Mattiace, L. A., Hazlett, E. A., Kemether, E., Elhakem, S. L., ... Jones, L. (2002). Postmortem assessment of thalamic nuclear volumes in subjects with schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 159, 59-65. doi:10.1176/appi.ajp.159.1.59.
- Byne, W., Fernandes, J., Haroutunian, V., Huacon, D., Kidkardnee, S., Kim, J., ... Yiannoulos, G. (2007). Reduction of right medial pulvinar volume and neuron number in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 90, 71-75. doi:10.1016/j.schres.2006.10.006.
- Campos-Ortega, J. K., Hayhow, W. R., & Clüver, P. F. D. E. V. (1970). A note on the problem of retinal projections to the inferior nucleus of primates. *Brain Research* 22, 126-130. doi:10.1016/0006-8993(70)90408-7.
- Carden, W. B., Guido, W., Godwinc, D. W., & Bickford, M. E. (2003). Thalamocortical cells in the cat pulvinar nucleus transiently express nitric oxide synthase during development. *Neuroscience Letters* 351, 87-90. doi:10.1016/j.neulet.2003.07.006.
- Carpenter, M. B. (1995). *Human Neuroanatomy*. 9 ed. Canada. 663-695pp.
- Castro, C. S. S., & Araújo, A. (2007). Diet e feeding behavior of marmoset, *Callithrix jacchus*. *Revista Brasileira de Ecologia e Linguagem* 107, 14-19.
- Cavalcante, J. S., Costa, M. S. M. O., Santee, U. R., & Brito, L. R. G. (2005). Retinal projections to the midline and intralaminar thalamic nuclei in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Brain Research* 1043, 42-47. doi:10.1016/j.brainres.2005.02.035
- Cavalcante, J. S., Pontes, A. L., Engelberth, R. C., Cavalcante, J. C., Nascimento Jr., E. S., Borda, J. S., ... de Toledo, C. A. (2011). 5-HT(1B) receptor in the suprachiasmatic nucleus of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neuroscience Letters*, 488(1), 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.10.070>.
- Cavalcanti, J. R. L. P., Soares, J. G., Oliveira, F. G., Guzen, F. P., Pontes, A. L. B., Sousa, T. B., ... Costa, M. S. M. O. (2014). A cytoarchitectonic and TH-immunohistochemistry characterization of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area and

retrochiasmatic field in the rock cavy (*Kerodon rupestris*). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 55, 58-66. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.01.002>.

Cerbai, F., Lana, D., Nosi, D, Petkova-Kirova, P., Zecchi, S., Brothers H. M., ... Giovannini, M. G. (2012). The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. *PLOS one* 7(9), e45250. doi:10.1371/journal.pone.0045250.

Chen, M., Muckersie, E., John V., Forrester, J. V., & Xu, H. (2010). Immune activation in retinal aging: a gene expression study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51, 5888-5896. doi:10.1167/iovs.09-5103.

Choi, B. H. (1986). Glial fibrillary acidic protein in radial glia of early human fetal cerebrum: a light and electron microscopic immunoperoxidase study. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 45, 408-418. <https://doi.org/10.1097/00005072-198607000-00003>

Chow, K. L. (1950). A retrograde cell degeneration study of the cortical projection field of the pulvinar in the monkey. *The Journal of Comparative Neurology* 93, 313-340. <https://doi.org/10.1002/cne.900930302>

Chow, K. L. (1954). Lack of behavioral effects following destruction of some thalamic association nuclei in monkey. *Archives of Neurology and Psychiatry* 71, 762-771.

Colman, R. J. (2018). Non-human primates as a model for aging. *BBA - Molecular Basis of Disease* 1864, 2733–2741. doi:10.1016/j.bbadis.2017.07.008.

Connors, B. W., & Bear, M. F., Paradiso MA. 2002. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. 3ed. Porto Alegre: Artmed.

Costa, M. S. M. O., Moreira, L. F., Alones, V., Lu, J., & Santee, U. R. (1998). Characterization of the Circadian System in a Brazilian Species of Monkey (*Callithrix jacchus*): Immunohistochemical Analysis and Retinal Projections. *Biological Rhythm Research* 29(5), 510–520. <https://doi.org/10.1076/brhm.29.5.510.4829>.

Costa, M. S., Santee, U. R., Cavalcante, J. S., Moraes, P. R., Santos, N. P., & Britto, L. R. (1999). Retinohypothalamic projections in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): A study

using cholera toxin subunit B. *The Journal of Comparative Neurology* 415(3), 393–403. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19991220\)415:3<393::AID-CNE5>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19991220)415:3<393::AID-CNE5>3.0.CO;2-R).

Cowey, A., Stoerig, P., & Bannister, M. (1994). Retinal ganglion cells labelled from the pulvinar nucleus in macaque monkeys. *Neuroscience* 61, 691–705. doi:10.1016/0306-4522(94)90445-6.

Curcio, C. A. & Drucker, D. N. (1993). Retinal ganglion cells in Alzheimer's disease and aging. *Annals of Neurology* 33, 248-257. doi:10.1002/ana.410330305.

Curcio, C. A., Millican, C. L., Allen, K.A., & Kalina, R. E. (1993). Aging of the human photoreceptor mosaic: evidence for selective vulnerability of rods in central retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 34, 3278-3296.

Cusick C. G., Scriptor, J. L., Darenbourg, J. G., & Weber, J. T. (1993). Chemoarchitectonic subdivisions of the visual pulvinar in monkeys and their connectional relations with the middle temporal and rostral dorsolateral visual areas, MT and DLr. *The Journal of Comparative Neurology* 336, 1-30. doi:10.1002/cne.903360102.

Duan, H., Wearne, S. L., Rocher, A. B., Macedo, A., Morrison, J. H., Hof, P. R. (2003). Age related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cerebral Cortex* 13, 950-961. doi:10.1093/cercor/13.9.950.

Duque Neto, S. P., (2019). *Estudo neuroanatômico da zona subparaventricular (zspv) do sagui (callithrix jacchus): considerações sobre sua citoarquitetura, neuroquímica e projeções retinianas, bem como sua relação com o sistema de temporização circadiana expandido* (Tese de Doutorado). Acesso em: https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/27076/1/Estudoneuroanatômicozona_DuqueNeto_2019.pdf

Eng, L. F., Vanderhaeghen, J. J., Bignami, A., & Grestl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Research* 28, 351-354. doi:10.1016/0006-8993(71)90668-8.

Engelberth, R. C. G. J., Pontes, A. L. B., Nascimento, R. B. S., Lima, R. R., Lima, R. R. M., Toledo, C. A. B., ... Cavalcante, J. S. (2008). Discrete retinal input to the parabrachial complex of a new-world primate, the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neuroscience Letters* 443, 99-103. doi:10.1016/j.neulet.2008.07.065.

Engelberth, R. C. G. J., Pontes, A. L. B., Fiuza, F. P., Silva, K. D. A., Azevedo, C. V. M., Resende, N. S., ... Cavalcante, J. S. (2013). Changes in the suprachiasmatic nucleus during aging: implications for biological rhythms. *Psychology & Neuroscience* 6(3):287-297.

Engelberth, R. C. G. J., Silva, K. D. A., Azevedo, C. V. M., Gavioli, E. C., Santos, J. R., Soares, J. G., ... Cavalcante, J. S. (2014). Morphological changes in the suprachiasmatic nucleus of aging female marmosets (*Callithrix jacchus*). *BioMed Research International* 2014, 243825. <https://doi.org/10.1155/2014/243825>

Erskine, D., Thomas, A. J., Attems, J., Taylor, J-P., McKeith, I. G., Morris C. M., Khundakar, A. A. (2017). Specific patterns of neuronal loss in the pulvinar nucleus in dementia with lewy bodies. *Movement Disorders* 32(3), 414-422. doi:10.1002/mds.26887.

Falke, E., Nissanov, J., Mitchell, T. W., Bennett, D. A., Trojanowski, J. Q., Arnold, S. E. (2003). Subicular dendritic arborisation in Alzheimer's disease correlates with neurofibrillary tangle density. *The American Journal of Pathology* 163, 1615-1621. doi:10.1016/S0002-9440(10)63518-3.

Fields RD, Stevens-Graham B. (2002). New insights into neuron-glia communication. *Science* 298:556-562.

Field G. D., & Chichilnisky, E. J. (2007). Information processing in the primate retina: circuitry and coding. *Annual Review Neuroscience* 30, 1-30. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094252.

Fiuza, F. P., Silva, K. D. A., Pessoa, R. A., Pontes, A. L. B., Cavalcanti, R. L. P., Pires, R. S., ... Cavalcante, J. S. (2016). Age related changes in neurochemical components and retinal projections of rat intergeniculate leaflet. *Age* 38(1), 4. doi:10.1007/s11357-015-9867-9.

Gao, H. & Hollyfield, J. G. (1992). Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 33, 1-17.

Garey, L. J., & Powell, T. P. S. (1968). The projection of the retina in the cat. *Journal of Anatomy* 102, 189-222.

- Geng, Y., Lin, H-T., Chen, W., Liu, Z-C., Xiang, W., Chen, W-R. (2015). Age-related reduction in calbindin-D28K expression in the Sprague-Dawley rat lens. *Molecular Medicine Reports* 11, 422-426. doi:10.3892/mmr.2014.2672.
- Geula, C., Bu, J., Nagykerly, N., Scinto, L. F., Chan, J., Joseph, J., ... Wu, C-K. (2003). Loss of calbindin-D28k from aging human cholinergic basal forebrain: relation to neuronal loss. *The Journal of Comparative Neurology*, 455(2), 249-259. doi:10.1002/cne.10475.
- 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 Research Bulletin* 63, 155-160. doi:10.1016/j.brainresbull.2004.02.005.
- Gray D., Gutierrez C., & Cusick, C. G. (1999). Neurochemical organization of inferior pulvinar complex in squirrel monkeys and macaques revealed by acetylcholinesterase histochemistry, calbindin and Cat-301 immunostaining, and Wisteria floribunda agglutinin binding. *Journal of Comparative Neurology* 409, 452-468. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990705\)409:3<452::AID-CNE9>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990705)409:3<452::AID-CNE9>3.0.CO;2-I).
- Grieve, K. L., Acuña, C., & Cudeiro, J. (2000). The primate pulvinar nuclei: vision and action. *Trends in Neurosciences* 23, 35-39.
- Gutierrez, C., Yaun, A., & Cusick, C. G. (1995). Neurochemical subdivisions of the inferior pulvinar in macaque monkeys. *The Journal of Comparative Neurology* 363, 545-562. doi:10.1002/cne.903630404.
- Harada, T., Tokuriki, M., & Tanioka, Y. (1999). Age-related changes in the brainstem auditory evoked potentials of the marmoset. *Hearing Research* 128, 119-124. doi:10.1016/s0378-5955(98)00201-9.
- Hansson, E., & Rönnbäck, L. (2003). Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB Journal* 17, 341-348. doi:10.1096/fj.02-0429rev.
- Hassler, R. (1966). *Comparative anatomy in day and night active primates*. 1966. In: Hassler R, Stephan H, editors. Evolution of the Forebrain. Stuttgart: Thieme. 419-434.
- Hirai, T., & Jones E. G. (1989). A new parcellation of the human thalamus on the basis of histochemical staining. *Brain Research Reviews* 14, 1-34.

- Iacopino, A. M., & Christakos, S. (1990). Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 87: 4078-4082. doi:10.1073/pnas.87.11.4078
- Imura, K., & Rockland, K. (2006). Long-range interneurons within the medial pulvinar nucleus of macaque monkeys. *The Journal of Comparative Neurology* 498, 649-666. doi:10.1002/cne.21085.
- Iqbal, K., & Grundek-Iqbal, I. (2005). Metabolic/signaling transduction hypothesis of Alzheimer's disease and other tauopathies. *Acta Neuropathologica* 109, 25-31. doi:10.1007/s00401-004-0951-y.
- Itaya, K. S., & Van Hoesen, G. W. (1983). Retinal projections to the inferior and medial pulvinar nuclei in the Old-World monkey. *Brain Research* 269, 223-230. doi:10.1016/0006-8993(83)90131-2.
- Jones, E. G., & Burton, H. (1976). A projection from the medial pulvinar to the amygdala in primates. *Brain Research*. 104, 142-147. doi: 10.1016/0006-8993(76)90654-5.
- Jones, E. G. (1998). Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. *Neuroscience* 85, 331-345. doi:10.1016/s0306-4522(97)00581-2.
- Jones, E. G. (2001). The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends in Neuroscience*. 24, 595-601.
- Jones, E. G. (2007). *The Thalamus*. VII. Cambridge University Press. New York. 1679.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M., Siegelbaum, S. A., Hudspeth, A. J. (2014). *Princípios de Neurociências*. 5ed. Porto Alegre: AMGH.
- Kiorpes, L., & Movshon, J. A. (2004). Development of sensitivity to visual motion in macaque monkeys. *Visual Neuroscience* 21, 851–859. doi:10.1017/S0952523804216054.
- Kiorpes, L., Price, T., Hall-Haro, C., & Movshon, J. A. (2012). Development of sensitivity to global form and motion in macaque monkeys (*Macaca nemestrina*). *Vision Research* 63, 34–42. doi:10.1016/j.visres.2012.04.018.

Kordower, J. H., Chu, Y., Stebbins, G.T., DeKosky, S.T., Cochran, E.J., Bennett, D., Mufson, E. J. (2001). Loss e atrophy of layer II entorhinal cortex neurons in elderly people with mild cognitive impairment. *Annals of Neurology* 49, 202-213.

Kumar, S. S., & Buckmaster, P. S. (2007). Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata. *Brain Research* 1142, 54-60. doi:10.1016/j.brainres.2007.01.027.

Kwan W. C., Mundinano, I-C., Souza, M. J., Lee, S. C. S., Martin, P. R., Grünert, U., Bourne, J. A. (2019). Unravelling the subcortical and retinal circuitry of the primate inferior pulvinar. *The Journal of Comparative Neurology*, 527(3):558-576. doi:10.1002/cne.24387.

Lavialle, M., Bergue, A., Papillon, C., & Vilaplana, J. (2001). Modifications of retinal afferent activity induce changes in astroglial plasticity in the hamster circadian clock. *Glia* 34, 88-100.

Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283, 249-257. doi:10.1038/283249a0.

Lent, R. (2005). *Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência*. São Paulo: Atheneu. 197-200.

Leopold, D. A. (2012). Primary visual cortex: awareness and blindsight. *Annual Review of Neuroscience* 35, 91–109. doi:10.1146/annurev-neuro-062111-150356.

Leurner, B., Kozorovitskiy, Y., Gross, C. G., & Gould, E. (2007). Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precede old age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17169-17173. doi:10.1073/pnas.0708228104.

Levitt, P., & Rakic, P. (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *The Journal of Comparative Neurology* 193, 815-840. doi:10.1002/cne.901930316.

Lima, R. R. M. L., Pinato, L., Nascimento, R. B. S., Engelberth, R. C. G. J., Nascimento Jr, E. S., Cavalcante, J. C., ... J. S. (2012). Retinal projections and neurochemical characterization of the pregeniculate nucleus of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 44, 34-44. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2012.04.001>.

- Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J., & Schilling, K. (2005). Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *Journal of Neuroscience Research* 79, 295-302. doi:10.1002/jnr.20354.
- Liu, F., Schafer, D. P., & McCullough, L. D. (2009). TTC, Fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neuroscience Methods* 179, 1-8. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.12.028.
- Lupi, D., Semo, M., Foster, R. G. (2012). Impact of age and retinal degeneration on the light input to circadian brain structures. *Neurobiology of Aging* 33, 383-392. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.006.
- Maior, R. S., Horia, E., Tomaz, C., Ono, T., & Nishijo, H. (2010). The monkey pulvinar neurons differentially respond to emotional expressions of human faces. *Behavioural Brain Research* 215, 129–135. doi:10.1016/j.bbr.2010.07.009.
- Mansfield, K. (2003). Marmoset models commonly used in biomedical research. *Comparative Medicine* 53(4), 383-392.
- Masland, R. H., & Raviola, E. (2000). Confronting complexity: strategies for understanding the microcircuitry of the retina. *Annual Reviews Neuroscience* 23, 249-284. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.249.
- Mathers, L. H. (1972a). The synaptic organization of the cortical projection to the pulvinar of the squirrel monkey. *The Journal of Comparative Neurology* 146, 43-60. doi:10.1002/cne.901460104.
- Mathers, L. H. (1972b). Ultrastructure of the pulvinar of the squirrel monkey. *The Journal of Comparative Neurology* 146, 15-42. doi:10.1002/cne.901460103.
- Mattison, J. A., & Vaughan, K. L. (2017). An overview of nonhuman primates in aging research. *Experimental Gerontology* 94, 41-45. doi:10.1016/j.exger.2016.12.005.
- McDermott, K. W. G., & Lantos, P. L. (1989). The distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin in postnatal marmoset (*Callithrix jacchus*) brain. *Developmental Brain Research* 45, 169-177. doi:10.1016/0165-3806(89)90036-9.

- McPhail, L. T., McBride, C. B., McGraw, J., Steeves, J.D., & Tetzlaff, W. (2004). Axotomy abolishes NeuN expression in facial but not rubrospinal neurons. *Experimental Neurology* 185, 182-190. doi:10.1016/j.expneurol.2003.10.001.
- Middeldorp, J. & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology* 93, 421-443. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.
- Mikkelsen, J. D. (1992). Visualization of efferent retinal projections by immunohistochemical identification of cholera toxin subunit B. *Brain Research Bulletin* 28, 619-623. doi:10.1016/0361-9230(92)90112-b.
- Mitchell, J. F., Leopold, D. A. (2015). The marmoset monkey as a model for visual neuroscience. *Neuroscience Research* 93, 20–46. doi:10.1016/j.neures.2015.01.008.
- Møller, A. R. (2003). *Sensory system: anatomy and physiology*. Academic Press: Amsterdam.
- Morais, P. L. G., Santana, M. A. D., Cavalcante, J. C., Costa, M. S. M. O., Cavalcante, J. S., Nascimento Jr., E. S. (2014). Retinal projections into the Zona Incerta of the rock cavy (*Kerodon rupestris*): a CTb study. *Neuroscience Research* 89, 75-80.
- Morin, L. P., Johnson, R. F., & Moore, R. Y. (1989). Two brain nuclei controlling circadian rhythms are identified by GFAP immunoreactivity in hamsters and rats. *Neuroscience Letters* 99, 55-60. doi:10.1016/0304-3940(89)90264-4.
- Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211.
- Munkle, M. C., Waldvogel, H. J., & Faull, R. L. (2000). The distribution of calbindin, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the human thalamus. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 19(3), 155–173.
- Nakagawa, S., & Tanaka, S. (1984). Retinal projections to the pulvinar nucleus of the macaque monkey: a re-investigation using autoradiography. *Experimental Brain Research* 57, 151–157. doi:10.1007/bf00231141.
- Nascimento, R. B. S., Borda, J. S., Engelberth, R. C. G. J., Medeiros, R. O., Pinato, L., Pontes, A.L.B., ... Cavalcante, J. S. (2010). The presence of neuronal-specific nuclear protein (NeuN) in the circadian timing system of the capuchin monkey (*Cebus apella*). *Sleep Science* 3, 36-39.

Nascimento Jr, E. S., Souza, A. P. M., Duarte, R. B., Magalhães, M. A. F., Silva, S. F., Cavalcante, J. C., ... Costa, M. S. M. O. (2010). The suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet in the rock cavy (*Kerodon rupestris*): Retinal projections and immunohistochemical characterization. *Brain Research*, 1320, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.01.034>.

Netter, F. H. (2015). *Atlas de Anatomia Humana*. 6ed. Elsevier.

National Institutes of Health, National Institute on Aging, Global Health&Aging. <https://www.nia.nih.gov/research/publication/global-health-and-aging/healthand-work>, (2011). Acesso em 23.08.2019.

Nowak, L., Ascher, P., & Berwald-Netter, Y. (1987). Ionic channels in mouse astrocytes in culture. *The Journal of Neuroscience* 7, 101-109.

O'Brien, B. J., Abel, P. L., & Olavarria, J. F. (2001). The retinal input to calbindin–D28k defined subdivisions in macaque inferior pulvinar. *Neuroscience Letters* 312, 145–148. doi:10.1016/s0304-3940(01)02220-0.

Ohe, Y., Hayashia, T., Deguchi, I., Fukuoka, T., Horiuchi, Y., Maruyama, H., ... Tanahashi, N. (2014). MRI abnormality of the pulvinar in patients with status epilepticus. *Journal of Neuroradiology* 41, 220-226. doi:10.1016/j.neurad.2013.09.003.

Oke, A. F., Carver, L. A., Gouvion, C. M., & Adams, R. N. (1997). Three-dimensional mapping of norepinephrine and serotonin in human thalamus. *Brain Research* 763, 69-78. doi:10.1016/s0006-8993(97)00404-6.

Olszewski, J. (1952). *The thalamus of the Macaca mulatta: An atlas for use with the stereotaxic instrument*. Karger, Basel.

Pace-Schott E. F., & Spencer, R. M. C. (2011). Age-related changes in the cognitive function of sleep. *Progress in Brain Research* 191, 75-89. doi:10.1016/B978-0-444-53752-2.00012-6

Palestini, M., Guegan, M., Saavedra, H., Thomasset, M., & Batini, C. (1993). Glutamate, GABA, calbindin-D28k and parvalbumin immunoreactivity in the pulvinar-lateralis posterior complex of the cat: relation to the projection to the Clare-Bishop area. *Neuroscience Letters* 160, 89-92. doi:10.1016/0304-3940(93)90920-g.

Paxinos, G., Watson, C., Petrides, M., Rosa, M. G. P., & Tokuno, H. (2012). *The Marmoset Brain in Stereotaxic Coordinates*. 1st ed. Elsevier.

Perry, V. H., Oehler, R., & Cowey, A. (1984). Retinal ganglion cells that project to the dorsal lateral geniculate nucleus in the macaque monkey. *Neuroscience* 12, 1101-23. doi:10.1016/0306-4522(84)90006-x.

Petersen, S. E., Robinson, D. L., & Morris, J. D. (1987). Contributions of the pulvinar to visual spatial attention. *Neuropsychology* 25, 97-105. [https://doi.org/10.1016/0028-3932\(87\)90046-7](https://doi.org/10.1016/0028-3932(87)90046-7).

Petrof, I., & Sherman, S. M. (2013). Functional significance of synaptic terminal size in glutamatergic sensory pathways in thalamus and cortex. *The Journal of Physiology* 591, 31253131. doi:10.1113/jphysiol.2012.247619.

Preusser, M., Laggner, U., Haberler, C., Heinzl, H., Budka, H., Hainfellner, J. A. (2006). Comparative analysis of NeuN immunoreactivity in primary brain tumours: conclusions for rational use in diagnostic histopathology. *Histopathology* 48, 438-444. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02359.x.

Prosser, R. A., Edgar, D. M., Heller, H. C., & Miller, J. D. (1994). A possible glial role in the mammalian circadian clock. *Brain Research* 643, 296-301. doi:10.1016/0006-8993(94)90036-1.

Rakic, P., & Sidman, R. L. (1969). Telencephalic origin of pulvinar neurons in the fetal human brain. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgesch* 129:53-82.

Rauschecker, J. P., & Friederichs, A. (1983). Visual information processing in the cat's lp-pulvinar complex. *Behavioral Brain Research* 8, 268.

Rezak, M., & Benevento, L. A. (1979). A comparison of the organization of the projections of the dorsal lateral geniculate nucleus, the inferior pulvinar and adjacent lateral pulvinar to primary visual cortex (area 17) in the macaque monkey. *Brain Research* 167, 19-40. doi:10.1016/0006-8993(79)90260-9.

Riesche, L., Tardif, S. D., Ross, C. N., deMartelly, V. A., Ziegler, T., Rutherford, J. N. (2018). The common marmoset monkey: avenues for exploring the prenatal, placental, and postnatal mechanisms in developmental programming of pediatric obesity. *American Journal of*

Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 314, 684–692. doi:10.1152/ajpregu.00164.2017.

Rockland, K. (1996). Two types of corticopulvinar terminations: round (type 2) and elongate (type 1). *The Journal of Comparative Neurology* 368, 57-87. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960422)368:1<57::AID-CNE5>3.0.CO;2-J.

Rockland, K. (1998). Convergence and branching patterns of round, type 2 corticopulvinar axons. *The Journal of Comparative Neurology* 390, 515-536. doi:10.1002/(sici)1096-9861(19980126)390:4<515::aid-cne5>3.0.co;2-3.

Romanski, L. M., Giguere, M., Bates, J. F., & Goldman-Rakic, P. S. (1997). Topographic organization of medial pulvinar connections with the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *The Journal of Comparative Neurology* 379, 313–332.

Santos, J. W. Q., Araujo, J. F., Cunha, M. J. B., Costa, S. O. E., Barbosa, A. L. C., Mesquita, J. B., Costa, M. S. M. O. (2005). Circadian variation in GFAP immunoreactivity in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biological Rhythm Research* 36, 141-150. doi:10.1080/09291010400028906.

Sarnat, H. B., Nochlin, D., & Born, D. E. (1998). Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. *Brain & Development* 20, 88-94. doi:10.1016/s0387-7604(97)00111-3.

Schimizu, T., Cox, K., Karten, H., & Britto, L. R. G. (1994). Cholera toxin mapping of retinal projections in pigeons (*Columba livia*), with emphasis on retinohypothalamic connections. *Visual Neuroscience* 11, 441-446.

Self, M. W., & Roelfsema, P. R. (2019). Neuroscience: figured out by feedback to the thalamus. *Current Biology* 29, 574-577. doi:10.1016/j.cub.2019.05.022.

Sherman, S., & Guillery, R. (2000). Exploring the thalamus. New York:Academic Press.

Sherman, S. M. (2007). The thalamus is more than just a relay. *Current Opinon in Neurobiology* 17, 417-422. doi:10.1016/j.conb.2007.07.003.

Sherman, S. M. (2012). Thalamocortical interactions. *Current Opinion in Neurobiology* 22, 575-579. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.03.005>.

- Shipp, S. (2003). The functional logic of cortico-pulvinar connections. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 358, 1605-1624. doi:10.1098/rstb.2002.1213.
- Singleton, M. C., & Peele, T. L. (1965). Distribution of optic fibers in the cat. *The Journal of Comparative Neurology* 125, 303-328. <https://doi.org/10.1002/cne.901250303>.
- Soares, G. M. J., Gattass, R., Souza, A. P. B., Rosa, M. G. P., Fiorani Jr, M., Brandão, B. L. (2001). Connectional and neurochemical subdivisions of the pulvinar in *Cebus* monkeys. *Visual Neuroscience* 18, 25-41.
- Song, H., Stevens, C. F., & Gage, F. H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39-44. doi:10.1038/417039a.
- Sousa, T. B., Santana, M., Silva, A. M., Guzen, F. P., Oliveira, F. G., Cavalcante, J. C., ... Nascimento Jr, E. S. (2013). Mediodorsal thalamic nucleus receives a direct retinal input in marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): A subunit B cholera toxin study. *Annals of Anatomy* 195, 32–38. doi:10.1016/j.aanat.2012.04.005.
- Soylemezoglu, F., Onder, S., Tezel, G. G., & Beker, M. (2003). Neuronal nuclear antigen (NeuN): a new tool in the diagnosis of central neurocytoma. *Pathology, Research and Practice* 199, 463-468. doi:10.1078/0344-0338-00446.
- Stepniewska I. (2003). *The Pulvinar Complex*. En: Kaas JH, Collins CE, editores. The Primate Visual System. *Frontiers in Neuroscience*. Ilustrada. ed. CRC Press. doi:10.1201/9780203507599.ch3.
- Stepniewska I. (2004). *The Pulvinar Complex*. In: Kaas JH, Collins CE, editors. *The primate visual system*. Florida: CRC Press LLC.
- Tamada, Y., Tanaka, M., Munekawa, K., Hayashi, S., Okamura, H., Kubo, T., ... Ibata, Y. (1998). Neuron-Glia interaction in the suprachiasmatic nucleus: a double labeling light and electron microscopic immunocytochemical study in the rat. *Brain Research Bulletin* 45, 281-287. doi:10.1016/s0361-9230(97)00403-6.

- Tapscott, S. J., Bennett, G. S., Toyama, Y., Kleinbart, F., & Holtzer, H. (1981). Intermediate filament proteins in the developing chick spinal cord. *Developmental Biology* 86, 40-54. doi:10.1016/0012-1606(81)90313-4.
- Tardif, S., Balesk, K., Williams, L., Moeller, E. L., Abbott, D., Schultz-Darken, N., ... Ruiz, J. (2006). Preparing new world monkeys for laboratory research. *ILAR Journal* 47, 307-315. doi:10.1093/ilar.47.4.307.
- Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S., & Barres, B. A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science* 291, 657-661. doi:10.1126/science.291.5504.657.
- Unal-Cevik, I., Kilinc, M., Gursoy-Ozdemir, Y., Gurer, G., & Dalkara, T. (2004). Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Research* 1015, 169-74. doi:10.1016/j.brainres.2004.04.032.
- Ageing in the Twenty-first Century: A Celebration and a Challenge, United Nations Population Fund, New York, 2012.
- Van den Pol, A. N. (1991). Glutamate and aspartate immunoreactivity in hypothalamic presynaptic axons. *The Journal of Neuroscience* 11, 2087-2101.
- Veyres, N., Hamadjida, A., & Huot, P. (2018). Predictive Value of Parkinsonian Primates in Pharmacologic Studies: A Comparison between the Macaque, Marmoset, and Squirrel Monkey. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 365, 379-397. doi:10.1124/jpet.117.247171.
- Villeneuve, M. Y., Kupers, R., Gjedde, A., Ptito, M., & Casanova, C. (2005). Pattern–motion selectivity in the human pulvinar. *Neuroimage* 28, 474–480. doi:10.1016/j.neuroimage.2005.06.015.
- Vivo, M. 1991. *Taxonomia de Callithrix Erxleben, 1777 (Callitrichidae, Primates)*. Belo Horizonte. Fundação Biodiversitas.
- Waldvogel, H. J., Faull, R. L., Williams, M. N., & Dragunow, M. (1991). Differential sensitivity of calbindin and parvalbumin immunoreactive cells in the striatum to excitotoxins. *Brain Research* 546, 329-335. doi:10.1016/0006-8993(91)91497-o.

- Ward, R., Danziger, S., & Bamford, S. (2005). Response to visual threat following damage to the pulvinar. *Current Biology* 15, 571-573. doi:10.1016/j.cub.2005.01.056.
- Ward, R., Calder, A. J., Parker, M., & Arend, I. (2007). Emotion recognition following human pulvinar damage. *Neuropsychology* 45, 1973-1978. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2006.09.017.
- Warner, C. E., Goldshmit, Y., & Bourne, J. A. (2010). Retinal afferents synapse with relay cells targeting the middle temporal area in the pulvinar and lateral geniculate nuclei. *Frontiers in Neuroanatomy* 4(8):1-16. doi:10.3389/neuro.05.008.2010.
- Warner, C. E., Kwan, W. C., & Bourne, J. A. (2012). The early maturation of visual cortical area MT is dependent on input from the retinorecipient medial portion of the inferior pulvinar. *The Journal of Neuroscience* 32, 17073-1708. doi:10.1523/JNEUROSCI.3269-12.2012.
- Warner, C. E., Kwan, W. C., Wright, D., Johnston, L. A., Egan, G. F. & Bourne, J. A. (2015). Preservation of vision by the pulvinar following early-life primary visual cortex lesions. *Current Biology* 25, 424-434. doi:10.1016/j.cub.2014.12.028.
- Wei, H., Bonjean, M., Petry, H. M., Sejnowski, T. J., & Bickford, M. E. (2011). Thalamic Burst Firing Propensity: a Comparison of the Dorsal Lateral Geniculate and Pulvinar Nuclei in the Tree Shrew. *The Journal of Neuroscience* 31(47), 17287-17299. doi:10.1523/JNEUROSCI.6431-10.2011.
- Weyer, A., & Schilling, K. (2003). Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *Journal of Neuroscience Research* 73, 400-409. doi:10.1002/jnr.10655.
- Wolf, H. K., Buslei, R., Kastner, R. S., Kastner, P. K. S., Pietsch, T., Wiestler, O.D., Bluhmke, I. (1996). NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 44, 1167-1171. doi:10.1177/44.10.8813082.
- Wu, C. K., Nagykerly, N., Hersh, L. B., Scinto, L. F., Guela, C. (2003). Selective age-related loss of CALBINDIN-D(28k) from basal forebrain cholinergic neurons in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neuroscience* 120, 249-259. doi:10.1016/s0306-4522(03)00248-3.

Young, K. A., Holcomb, L. A., Bonkale, W. L., Hicks, P. B., Yazdani, U., German, D. C. (2007). 5HTTLPR polymorphism and enlargement of the pulvinar: unlocking the backdoor to the limbic system. *Biological Psychiatry* 61, 813-818. doi:10.1016/j.biopsych.2006.08.047.

Zou, J., Wang, Y. X., Dou, F. F., Lü, H. Z., Ma, Z. W., Lu, P., Xu, X. M. (2010). Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochemistry International* 56, 577-584. doi:10.1016/j.neuint.2009.12.021.

MANUSCRITO

A seguir, texto estruturado como manuscrito preliminar em português, contendo introdução, metodologia, resultados e discussão. A formatação segue as normas do periódico *Journal of Chemical Neuroanatomy*.

ANÁLISE CITOARQUITETÔNICA E AFERÊNCIA RETINIANA AO COMPLEXO PULVINAR DO SAGUI (*Callithrix jacchus*): UMA COMPARAÇÃO ENTRE ADULTOS E IDOSOS.

1. INTRODUÇÃO

A visão é uma das cinco modalidades sensoriais que fornece à várias espécies de animais a capacidade de detecção de objetos. O sistema visual apresenta dois diferentes tipos de vias aferentes conhecidas como via clássica e via não clássica. A via clássica, ou via retino-geniculocortical, é a principal via visual em vertebrados superiores que transmite a informação da retina para o córtex visual primário utilizando o núcleo geniculado lateral do tálamo (GLD) como seu núcleo relé. A via não clássica tem pelo menos duas partes, uma que transmite a informação luminosa para o colículo superior (CS) e a outra que envolve o núcleo pré-tectal e o pulvinar do tálamo. O papel da via não clássica inclui análise visual de espaço, percepção da forma global, mediando vários reflexos visuais. (Møller, 2003).

Embora esteja presente em todos os grupos de vertebrados, o tálamo é mais altamente desenvolvido em mamíferos, especialmente em primatas. Praticamente todos os sistemas sensoriais passam através do tálamo no seu trajeto ao córtex cerebral e por sua vez, cada região do tálamo recebe projeções a partir da área cortical que este projetou. (Carpenter, 1995). O complexo pulvinar é um dos componentes dos núcleos específicos do tálamo estando relacionado com áreas de associação do córtex, envolvido em mecanismos integrativos superiores. Essa estrutura ocupa uma função no córtex visual extraestriado que é equivalente a função do núcleo geniculado lateral no sistema visual primário lidando com o processamento visuomotor e percepção visual (Stepniewska, 2004). Análise citoarquitetônica em *Cebus* indicam a presença de três subdivisões no complexo pulvinar: o pulvinar medial (PM) um núcleo grande e homogêneo, o pulvinar lateral (PL) contendo células que são separadas em aglomerados por muitas fibras que passam horizontalmente através deste núcleo e, o pulvinar inferior (PI) um núcleo compacto e com células fortemente marcadas, separado do restante do pulvinar pelo braço do colículo superior (Soares et al., 2001). Secções coradas pelo método de

Nissl em humanos e *Macaca mulatta* apontam que este complexo apresenta quatro subdivisões: núcleo pulvinar medial (Plm), núcleo pulvinar lateral (Pll), núcleo pulvinar inferior (Pli) e núcleo pulvinar anterior (Pla) (Olszewski, 1952; Hirai e Jones, 1989a; Grieve et al., 2000; Shipp, 2003).

O complexo pulvinar recebe terminais da retina, do colículo superior, do córtex visual e do complexo pré-tectal onde cada área se projeta para áreas particulares dessa estrutura (Berman e Jones, 1977). Estudos anteriores já indicavam a presença de terminais retinianos no pulvinar de primatas (Hassler, 1966). Um estudo prévio envolvendo lesões no pulvinar não revelou grandes déficits visuais (Chow, 1954), no entanto, porções do pulvinar estão claramente implicados nas funções visuais, uma vez que, este recebe projeções do colículo superior e projeta-se para áreas do córtex occipital, temporal e parietal (Chow, 1950; Allman et al., 1972; Rezac e Benevento, 1979). Petersen e colaboradores (1987) sugerem um papel do pulvinar na atenção visuo-espacial. Em humanos foi observada uma diminuição no tamanho do núcleo pulvinar inferior em indivíduos que apresentam anoftalmia, uma malformação congênita caracterizada pela ausência de um ou de ambos os olhos (Hassler, 1966). Campos-Ortega e colaboradores (1970) verificaram a presença de aferências diretas da retina para o núcleo pulvinar inferior em *Macaca mulatta* e babuínos (*Papio ursinus ursinus*). Itaya e Van Hoesen (1983) demonstraram a presença de projeções retinianas predominantemente contralateral no núcleo pulvinar medial e, bilateral no núcleo pulvinar inferior em *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis*. Dados neuroquímicos do complexo pulvinar em *Saimiri* e em *Macaca* usando calbindina, parvalbumina, e citocromo-oxidase (Cusick et al., 1993; Gutierrez et al., 1995; Gray et al., 1999) sugerem uma subdivisão do pulvinar inferior destas espécies em cinco porções: posterior (PIP), medial (PIM), central (PIC), lateral (PIL) e lateral dorsal (PILS) semelhante ao padrão visto posteriormente em *Cebus* (Soares et al., 2001).

O envelhecimento é um fenômeno complexo que afeta todos os sistemas orgânicos (Mattison e Vaughan 2017). Esse processo biológico pode ser definido como o acúmulo sistêmico de moléculas disfuncionais que excedem a capacidade de reparo ou substituição, aumentando dessa forma a vulnerabilidade do indivíduo às patologias relacionadas com a idade (Bengtson e Serttersten Jr et al., 2016). Essas disfunções podem ser ocasionadas por estresse oxidativo (Muller et al., 2007) e disfunção mitocondrial (Bishop et al., 2010). Estudos apontam que durante o processo de envelhecimento ocorrem alterações das funções cognitivas (Pace-Schott e Spencer, 2011), além de alterações morfológicas e neuroquímicas nos componentes centrais do sistema de temporização circadiano, tanto em roedores quanto em primatas não-

humanos (Lupi et al., 2012; Engelbert et al., 2013; 2014; Fiuza et al., 2016). Essas modificações também ocorrem em outras áreas do sistema nervoso provocando alterações em neurotransmissores, atrofia da substância cinzenta total (Oh et al., 2014), mudanças no tamanho do soma e dendritos (Duan et al., 2003), promovendo dessa forma um desequilíbrio funcional (Waldvogel et al., 1991). O sagui é um modelo experimental de primata não-humano já consolidado em nosso laboratório (Costa et al., 1998; Costa et al., 1999; Nascimento et al., 2010; Cavalcante et al., 2011; Lima et al., 2012; Souza et al., 2013; Engelberth et al., 2013, 2014; Cavalcanti et al., 2016; Duque-Neto, 2019). Nos últimos anos, este tem sido utilizado em pesquisas biomédicas e neurocientíficas em virtude da sua proximidade filogenética com seres humanos (Masnfield, 2003; Mitchell e Leopold, 2015; Riesche et al., 2018; Veyres et al., 2018). Pesquisas sobre o processo de envelhecimento biológico tem se sido alvo de vários estudos nas últimas décadas, visto que, o envelhecimento modifica a morfologia e neuroquímica celular, acarretando alterações fisiológicas, resultando dessa forma em modificações na capacidade responsiva dos sistemas cerebrais (Leuner et al., 2007). No entanto, a grande maioria das pesquisas de envelhecimento ocorre em espécies não-primatas.

O objetivo desse estudo é caracterizar citoarquiteticamente o complexo pulvinar do tálamo em saguis adultos e idosos delimitando as subdivisões através da distribuição neuronal e do caráter morfológico celular por meio da técnica imunistoquímica utilizando NeuN e CB, combinadas ao método de Nissl, além de comparar o padrão marcação de terminais retinianos no complexo pulvinar através da injeção intraocular da Subunidade b da Toxina Colérica (CTb) entre animais adultos e idosos e a expressão de GFAP nestes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Neste estudo utilizamos 3 saguis adultos com idade entre 3-6 anos e 3 saguis idosos com idade 10-11 anos, provenientes do Núcleo de Primatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) (Licença do IBAMA Nº 1/24/92/0039-0). Neste local os animais foram mantidos em gaiolas de alvenaria e tela de arame, medindo 2,00 x 1,00 x 2,00m, estando expostos as condições de temperatura, umidade e iluminação naturais, com alimentação a base de frutas e água disponível continuamente em bebedouros. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFRN (CEUA-UFRN Nº 009.013/2017).

2.2 – INJEÇÃO INTRAOCULAR DE TRAÇADOR

Inicialmente realizamos a investigação das projeções retinianas às subdivisões do complexo pulvinar nesta espécie utilizando a subunidade b da toxina colérica (CTb). Esse traçador neuronal é captado pelo corpo do neurônio e transportado via fluxo axoplasmático aos terminais, não possuindo propriedade transináptica. Os animais receberam como medicação pré-anestésica o sulfato de atropina na dose de 0,04 mg/kg, e 2mg/kg de tramadol ambos por via subcutânea. Após 15 minutos foi administrado como indutor da anestesia, por via intramuscular, ketamina e xilazina, misturadas na mesma seringa, na dose de 10mg/kg e 0,5mg/kg respectivamente e para manutenção da anestesia foi utilizado isoflurano através de máscara e oxigênio 100%. Realizamos uma injeção intraocular (olho esquerdo) de 80µl de uma solução aquosa de CTb (List Biological Laboratories, Inc., Campbell, CA) 1mg/ml em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo dimetilsulfóxido a 10% para aumentar a permeabilidade e captação dessa substância pelas células ganglionares da retina. A injeção foi realizada por meio da introdução de uma agulha (calibre 30) na junção esclera-corneal, atingindo o corpo vítreo a um ângulo de aproximadamente 45 graus. A solução foi injetada por pressão com o auxílio de uma micro-bomba propulsora em uma velocidade de 1µl por minuto. Ao fim da injeção, a agulha permaneceu no local por 15 a 30 minutos a fim de evitar o refluxo da solução. Após a retirada da agulha foi administrada uma pomada cicatrizante no olho do animal. Encerrado o procedimento da injeção intraocular, os animais foram conduzidos à gaiola de isolamento no Núcleo de Primatologia, permanecendo em observação pelo período de sobrevivência de 5 dias, tempo ideal para o transporte do traçador da retina para toda parte do sistema nervoso. Após o período de sobrevivência, os animais passaram pelos procedimentos de perfusão e microtomia.

2.3 – PERFUSÃO

Seguidos os mesmos padrões anestésicos descritos no item anterior (2.2), os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre uma grade em uma capela de perfusão com ponto de água. Após certificar que os animais estavam profundamente anestesiados, iniciamos os procedimentos cirúrgicos. Primeiramente, o processo xifóide do osso esterno foi pinçado com auxílio de uma pinça de Allis tracionando-o em direção à cabeça do animal, enquanto isso a pele foi seccionada, bem como suas partes moles e costelas, a fim de ter acesso ao coração dentro da cavidade torácica. Exposto o coração, uma agulha conectada a uma bomba peristáltica

(Masterflex, Cole-Parmer, Niles, IL) foi introduzida no ápice do ventrículo esquerdo em direção à aorta ascendente, e em seguida realizamos uma pequena incisão no átrio direito objetivando o escoamento do líquido do leito vascular. Inicialmente foram impulsionados 400 ml de solução salina a 0,9% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4, com Heparina (Hípolabor Laboratories, 5000UI/ml) na concentração de 2 ml/l de solução salina, em um fluxo de 100 ml por minuto em temperatura ambiente, objetivando lavar o leito vascular do animal, prevenir a formação de coágulos e uma melhor fixação dos tecidos. Posteriormente, foi impulsionado 700 ml de solução fixadora (paraformaldeído a 4% Vetec Química Fina, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) em duas velocidades. A metade da solução infundida em fluxo rápido (35 ml/min) e a outra metade em fluxo lento (17,5 ml/min), totalizando 30 minutos de infusão.

2.4 – REMOÇÃO DO ENCÉFALO E MICROTOMIA

Passada a perfusão, os encéfalos foram removidos da cavidade craniana através da secção dos tecidos moles e dos ossos da calota craniana. Em seguida os encéfalos foram armazenados em solução de sacarose a 30% (Nuclear-CAQ) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, a 4°C até a realização da microtomia.

Na microtomia os encéfalos foram congelados em gelo seco e seccionados através de um micrótomo de deslizamento. Obtivemos secções coronais de 30µm, coletadas seriadamente em seis compartimentos contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Cada compartimento contém um corte de cada sequência de seis, de modo que a distância entre uma secção e a seguinte no mesmo compartimento é de aproximadamente 180µm. As secções são conservadas na solução supracitada a 4°C para a realização dos procedimentos subsequentes, ou em solução anticongelante à base de etileno-glicol e tampão fosfato e conservados a 4°C para as reações de imunistoquímica ou de coloração posteriormente.

2.5 – TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA

Os cortes foram submetidos as reações imunistoquímicas seguindo o protocolo ABC (Complexo Avidina-Biotina peroxidase), utilizando anticorpos específicos a fim de identificar substâncias neuroativas nas subdivisões do complexo pulvinar do tálamo em sagui, como a proteína nuclear neuronal específica (NeuN), calbindina (CB), proteína acídica fibrilar glial (GFAP) e a CTb injetada.

Inicialmente os cortes foram submetidos a quatro lavagens, com duração de 10 minutos cada, em solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Em seguida, as secções foram submetidas a um pré-tratamento, a fim de inativar a peroxidase endógena do tecido, colocadas em contato com peróxido de hidrogênio a 0,3% em tampão fosfato 1,0 M, pH 7,4 por 20 minutos. Logo, seguiram mais quatro lavagens com duração de 10 minutos cada, em solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Todos os procedimentos supracitados foram realizados em agitador orbital. Após as etapas já mencionadas, as secções foram colocadas em tubos de ensaio e entraram em contato com o anticorpo primário diluído em Triton X-100 a 0,4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, acrescido de soro normal a 2% (Sigma, St Louis, MO, USA) do animal correspondente à obtenção do anticorpo secundário. Em seguida os tubos contendo as secções foram postos em um rotor com velocidade lenta por um período de 18 a 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período as secções foram submetidas a quatro lavagens, com duração de 10 minutos cada, em agitador orbital e em seguida foram incubadas no anticorpo secundário diluído em Triton X-100 a 0,4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, permanecendo no rotor com velocidade lenta por duas horas em temperatura ambiente. Seguiram-se novamente quatro lavagens de 10 minutos em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e logo em seguida as secções foram colocadas em contato com o complexo avidina-biotina peroxidase (Kit ABC Elite, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) a uma diluição 1:100 µl em Triton X-100 a 0,4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo cloreto de sódio (NaCl) em rotor com velocidade lenta por duas horas em temperatura ambiente. Ao fim dessa etapa, as secções foram novamente submetidas a quatro lavagens de 10 minutos em solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Em seguida, as secções foram colocadas em contato com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St Louis, MO, USA) a 2,5% diluída em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Na reação final adicionamos uma solução contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,003% como substrato, onde obtivemos na região marcada uma cor marrom resultante da oxidação da DAB. Esta última etapa foi realizada em uma capela de exaustão. Por fim, as seções foram submetidas novamente a quatro lavagens de 10 minutos com solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,4.

Após a realização da técnica imunistoquímica, as secções foram montadas em lâminas de vidro previamente gelatinizadas com gelatina-alúmem-cromo (Vetec Química Fina) e postas para secar em temperatura ambiente. Após a secagem, as secções foram submetidas à intensificação da reação em uma solução de tetróxido de ósmio a 0,05% por 30 segundos. Posteriormente as secções passaram por uma sequência crescente e decrescente de álcoois (Cromato Produtos Químicos) para desidratação e diafanização com xilol (Cromato Produtos

Químicos). Após esse procedimento, as secções foram cobertas por lamínulas utilizando como meio de montagem DPX (Aldrich Milwaukee, WI).

2.6 – MÉTODO DE NISSL

Utilizamos um compartimento de cada encéfalo, para a coloração pelo método de Nissl usando a tionina como corante. Esse método possibilita a visualização de neurônios e diminutos corpos celulares de células gliais. As secções foram lavadas em solução de tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, posteriormente montadas em lâminas previamente gelatinizadas e postas para secar em temperatura ambiente por 48 horas. Após a secagem, as secções foram submetidas ao método de Nissl, que consiste na desidratação do tecido através da passagem deste em concentrações crescentes de álcoois etílicos (70%, 95% e 100%), sendo posteriormente deslipidificados em xilol. Em seguida o tecido foi reidratado em concentrações decrescentes de álcoois e em água destilada e posteriormente submergido no corante Tionina a 0,25%. Após passar pelo corante as secções foram novamente desidratadas e deslipidificadas e em seguida cobertas com lamínulas utilizando como meio de montagem DPX (Aldrich Milwaukee, WI).

3. ANÁLISE DOS RESULTADOS

As secções foram analisadas através de um microscópio óptico (Olympus, BX-41) em campo claro. As imagens digitais do complexo pulvinar do tálamo foram obtidas através de uma câmera (Nikon®, DXM-1200) acoplada ao microscópio e conectada a um computador, sendo posteriormente operacionalizadas para ajuste de brilho e contraste utilizando o programa Canvas X. Os desenhos presentes no trabalho foram realizados utilizando o mesmo programa.

4. RESULTADOS

4.1 – CITOARQUITETURA DO COMPLEXO PULVINAR

Verificamos em saguis adultos, através da coloração pelo método de Nissl, fotomicrografias do complexo pulvinar do tálamo, destacando-se por uma grande afinidade das suas células à tionina ilustradas em três níveis de secções coronais ao longo do eixo rostro-caudal (Figura 1A-C). Evidenciamos as subdivisões do complexo pulvinar em pulvinar anterior (Figura 1A), pulvinar medial, pulvinar lateral (Figura 1A e B) e pulvinar inferior mantendo a

nomenclatura de Paxinos et al., 2012. O pulvinar inferior subdivide-se em pulvinar inferior centrolateral (Figura 1B), pulvinar inferior centromedial, pulvinar inferior medial e pulvinar inferior posterior (Figura 1C). A disposição celular das subdivisões do complexo pulvinar é evidenciada em maior aumento. O pulvinar medial (Figura 1A1 e B1) apresenta células intensamente marcadas, distribuídas uniformemente. O pulvinar anterior (Figura 1A2) apresenta células pequenas com forte marcação nos limites dessa subdivisão. Já o pulvinar lateral (Figura 1A3 e 12) revela células distribuídas em grupamentos lineares com menor intensidade de marcação. As subdivisões do pulvinar inferior apresentam células distribuídas de forma difusa com variação na intensidade de marcação de acordo com a subdivisão. No pulvinar inferior centrolateral (Figura 1B3) observamos células intensamente marcadas e distribuídas de forma densa com tamanhos diferentes. No pulvinar inferior centromedial (Figura 1C1) as células apresentam forte marcação e distribuição densa. No pulvinar inferior medial (Figura 1C2) as células convergem para a porção central do subnúcleo e apresentam pálida marcação. No pulvinar inferior posterior (Figura 1C3) as células distribuem-se de forma esparsa e apresentam-se maior quando comparadas as outras subdivisões do pulvinar inferior. Nos animais idosos, notamos diminuição na intensidade da marcação das células do complexo pulvinar do tálamo mostradas nas fotomicrografias nos três níveis de secções coronais ao longo do eixo rostro-caudal (Figura 2A-C) quando comparadas aos animais adultos-jovens. As células do pulvinar medial (Figura 2A1 e B1) bem como as células do pulvinar anterior (Figura 2A2) apresentam marcação mais intensa e distribuição uniforme quando comparadas a subdivisão lateral (Figura 2A3 e B2) a qual apresenta marcação esparsa com células distribuídas linearmente. No pulvinar inferior centrolateral (Figura 2B3), notamos uma marcação mais intensa com células distribuídas de forma densa. As células do Pulvinar centromedial e medial (Figura 2C1 e C2) apresentam-se dispersas com marcação esparsa. Já as células do pulvinar inferior posterior (Figura 2C3) mostram-se maiores e mais intensamente marcadas, quando comparadas as outras subdivisões do pulvinar inferior.

4.1.2 PROTEÍNA NUCLEAR NEURONAL ESPECÍFICA (NEUN)

Observamos que a imunorreatividade a NeuN mostrou-se presente, em toda extensão, nas subdivisões do complexo pulvinar do tálamo tanto em animais adultos como em idosos (Figuras 3 e 4). Nos animais adultos, as células apresentam intensa marcação ao longo do eixo rostro-caudal em todo o complexo pulvinar (Figura 3A-C). Células morfológicamente distintas foram visualizadas na subdivisão medial, centro lateral e posterior (Figura 3A1, B1, B3 e C3).

Na subdivisão anterior, as células são em sua maioria esféricas de tamanhos variáveis formando grupos (Figura 3A2). A subdivisão lateral é caracterizada pela presença de células esféricas dispostas linearmente (Figura 3A3 e B2). A subdivisão centromedial e medial são caracterizadas por células intensamente marcadas com formação de grupos de acordo com a morfologia (Figura 3C1 e C2). Nos animais idosos foram evidenciadas células imunorreativas a proteína NeuN nos três níveis de secção do pulvinar. (Figura 4A-C). Apesar de notarmos uma diminuição na intensidade de marcação das células, pudemos observar que as células apresentam morfologias distintas em algumas subdivisões do pulvinar, como a medial (Figura A1) mas a predominância é do caráter morfológico esférico. (Figura 4A2, B1, B3 e C2). As células do pulvinar lateral apresentam uma distribuição linear esparsa (Figura 4A3). Na subdivisão centro-medial e posterior evidenciamos células maiores e intensamente marcadas (Figura 4C1 e C3).

4.1.3 CALBINDINA (CB)

Verificamos em saguis adultos, através da imunistoquímica para CB, fotomicrografias do complexo pulvinar do tálamo, ilustradas em três níveis de secções coronais ao longo do eixo rostro-caudal (Figura 5A-C). Neurônios imunorreativos com morfologia esférica, piramidal e fusiforme foi observado nas subdivisões medial, anterior e lateral do pulvinar (Figuras 5A1-3 e B1). A subdivisão lateral é evidenciada pela disposição linear das células entre os feixes de fibras córtico-tectal (Figura 5B2). A subdivisão inferior apresenta células diferentes em cada subnúcleo (Figura 5B3-C3). No pulvinar inferior centrolateral observamos a presença de células como morfologia estrelada distribuídas de forma esparsa (Figura 5B3). Já no pulvinar inferior centromedial, predominam células com morfologia esférica dispostos de forma mais agrupada quando comparadas as células esféricas de tamanho reduzido dispostas de forma esparsa na subdivisão inferior medial (Figura 5C1-C2). Na Figura 5C3 as células apresentam intensa marcação a CB. Em animais idosos a expressão de calbindina foi evidenciada nos três níveis de secção ao longo do eixo rostro-caudal (Figura 6A-C). No entanto, houve uma diminuição da imunoreatividade a CB que foi bem evidenciada no pulvinar inferior na subdivisão medial e posterior (Figura 6C2-3). Neurônios imunorreativos com morfologia esférica, piramidal e fusiforme foi observado nas subdivisões medial, anterior e lateral do pulvinar (Figuras 6A1-3 e B1). Na subdivisão lateral observamos células piramidais distribuídas entre as fibras do feixe cortico-tectal (Figura 6B2). A subdivisão inferior apresenta células diferentes em cada subnúcleo (Figura 6B3-C3). No pulvinar inferior centrolateral observamos a presença de células

como morfologia piramidal distribuídas de forma esparsa (Figura 6B3). Já no pulvinar inferior centromedial, predominam células com morfologia esférica dispostos de forma mais agrupada quando comparadas as células esféricas de tamanho reduzido dispostas de forma esparsa na subdivisão inferior medial (Figura 6C2).

4.1.4 DELIMITAÇÃO DO COMPLEXO PULVINAR

A delimitação do complexo pulvinar do tálamo do sagui foi realizada a partir da combinação de fotomicrografias de secções coronais dos níveis rostral, médio e caudal (Figuras 7, 8 e 9), obtidas após procedimento histoquímico (Método de Nissl) e imunoistoquímica (NeuN e CB) e trabalhadas no Software Canvas X.

4.1.5 PROTEÍNA ACÍDICA FIBRILAR GLIAL (GFAP)

As células gliais revelaram-se imunorreativas a GFAP em toda a extensão rostro-caudal do complexo pulvinar nos animais adultos (Figura 10A-C). A morfologia estrelada característica dos astrócitos denota a presença desse tipo celular em todo o complexo evidenciada em maior aumento (Figura 10A1-C3). Em animais idosos, podemos apontar uma menor intensidade de marcação dessas células em todas as subdivisões do complexo pulvinar (Figura 11A1-C3).

4.2 – PROJEÇÃO RETINIANA AO COMPLEXO PULVINAR

A presença de fibras de projeção e botões imunorreativos a CTb foi observada tanto em animais adultos quanto em animais idosos evidenciando inervação proveniente da retina. Notamos que a projeção retiniana é exibida no nível médio de secção, apenas na subdivisão medial do pulvinar inferior contralateral ao olho que recebeu a injeção da CTb (Figuras 12A e 14A). As Figuras 12A1-A3 e 13A-A3 mostram as fibras de projeção e botões imunorreativos a CTb em animais adultos. Visualizamos, em grande quantidade, axônios pouco ramificados com comprimento e espessura variáveis, varicosidades de diferentes tamanhos ao longo destes e terminação simples, sendo classificadas como simples (“*en passant*”). Nos animais idosos (Figura 14A1-A3), notamos que a projeção retiniana é bem discreta quando comparada aos animais adultos, mantendo o mesmo tipo de classificação.

5. DISCUSSÃO

As evidências atuais sustentam a visão de que o complexo pulvinar compreende o pulvinar inferior que inclui quatro núcleos: pulvinar inferior posterior (PIp), pulvinar inferior medial (PIIm), pulvinar inferior centromedial (PIcm) e pulvinar inferior centrolateral (PIcl). Pelo menos o PIp, PIIm e PIcm, não estão completamente dentro do pulvinar inferior, mas se estendem acima do braço do colículo superior até o território da subdivisão medial, o pulvinar medial. As outras duas subdivisões são o pulvinar lateral e o pulvinar anterior (Baldwin et al., 2017, Jones, 2007). Nossos resultados corroboram com as evidências anteriores.

Nos nossos resultados, os aspectos citoarquitetônicos obtidos pelo método de Nissl apontam o complexo pulvinar como um conjunto de núcleos talâmicos com células intensamente marcadas, possibilitando a identificação de quatro núcleos. Nossos dados estão de acordo com dados obtidos em humanos e *Macaca* (Olszewski, 1952; Hirai e Jones, 1989a; Grieve et al., 2000; Munkle et al., 2000; Shipp, 2003) mas difere dos achados em *Cebus* onde foi demonstrado a presença de apenas três núcleos: pulvinar medial (PM), pulvinar lateral (PL) e pulvinar inferior (PI) (Soares et al., 2001). Nesse mesmo estudo, foi observado a presença de cinco subdivisões no núcleo pulvinar inferior: posterior (PIP), medial (PIM), central (PIC), lateral (PIL) e lateral dorsal (PILS) corroborando com dados anteriores em *Saimiri* e em *Macaca* usando calbindina, parvalbumina, e citocromo-oxidase (Cusick et al., 1993; Gutierrez et al., 1995; Gray et al., 1999).

Nossos dados com base na citoarquitetura diferem desses dados, visto que observamos apenas quatro subdivisões para o núcleo pulvinar inferior: pulvinar inferior centrolateral (IpulCL), pulvinar inferior centromedial (IpulCM), pulvinar inferior medial (IpulM) e pulvinar inferior posterior (IpulP) mas corroboram com os dados em macaco-esquilo onde foi observado quatro subdivisões no pulvinar inferior (Baldwin et al., 2017).

Dados em saguis idosos utilizando a coloração de Nissl, mostrou uma redução significativa de neurônios presentes no núcleo supraquiasmático destes animais (Engelberth et al., 2014). Um estudo recente em humanos idosos, evidenciou por ressonância magnética atrofia cortical posterior acarretando défices visuo-espaciais, no entanto a conectividade do pulvinar medial e pulvinar lateral aumentaram (Fredericks et al., 2019).

Apesar de não realizar uma análise quantitativa, notamos que o complexo pulvinar em saguis idosos pelo método de Nissl mostrou-se com um grau de marcação reduzido, seja pela

redução no número de células, ou ainda pelas alterações intracelulares resultantes do processo de envelhecimento biológico.

NeuN é considerada uma proteína nuclear específica do sistema nervoso é expressa no núcleo e no citoplasma da maioria de suas células e tem sido usada em muitos estudos (Mullen et al., 1992; Gittins e Harrison, 2004; Preusser et al., 2006). A imunorreatividade à NeuN pode ser detectada em várias espécies de vertebrados, incluindo anfíbios, pássaros e mamíferos sugerindo uma considerável conservação desta proteína na escala filogenética (Lind et al., 2005).

Estudos realizados com camundongos neonatos e adultos apontam que NeuN aparece precocemente no desenvolvimento do sistema nervoso e persiste na idade adulta (Mullen et al., 1992). Além disso, NeuN tem sido estudada como um marcador da maturação neuronal no sistema nervoso fetal humano onde células imunorreativas a NeuN são vistas após o processo de migração neuronal (Sarnat et al., 1998), em estudos morfométricos como marcador neuronal de tecido cerebral humano pós-morte (Wolf et al., 1996; Gittins e Harrison, 2004), em diagnósticos de histopatologia é considerado um marcador da diferenciação neuronal em tumores cerebrais (Preusser et al., 2006; Soylemezoglu et al., 2003) e em estudos de distúrbios neuro-degenerativos (Falke et al., 2003; Kordower, et al., 2001). Estudos relatam que a imunorreatividade para NeuN diminui drasticamente após danos no sistema nervoso central (Bendel et al., 2005; Ajmo et al., 2006; Liu et al., 2009) e essa diminuição pode indicar uma mudança na antigenicidade da proteína NeuN em vez de morte celular, e alguns neurônios podem recuperar o seu padrão de marcação após o reparo (Unal-Cevik et al., 2004).

No complexo pulvinar os neurônios apresentam propriedades fisiológicas heterogêneas. A diversidade celular parece refletir o direcionamento das células cujas características de resposta retêm as características das células de entrada. Com isso, os diferentes tipos de aferências refletem escassez de interconectividade local com mínima mistura lateral de sinais dentro de uma mesma subdivisão do pulvinar (Berman e Wurtz, 2008; 2010; 2011). No nosso estudo observamos, através da imunorreatividade das células a NeuN, a presença de células com morfologia distinta e intensidade de marcação diferenciadas estando bem distribuídas nas subdivisões deste complexo. Nossos dados podem representar possíveis particularidades morfofisiológicas dessas células quanto suas conectividades. É interessante considerar como diferentes tipos de aferências podem moldar a função no nível neuronal e comportamental. Por exemplo, as células do pulvinar que recebem informações do colículo superior podem ter uma função fundamentalmente diferente das que recebem informações do córtex como foi

observado em estudos nos últimos anos (Berman e Wurtz, 2008; 2010; 2011) demonstrando assim que as populações locais de neurônios de projeção eram altamente heterogêneas em relação às suas fontes de entrada e aos tipos de sinais que eles transmitiam.

Embora NeuN tenha sido identificada em grande parte das células nervosas, existem neurônios NeuN negativos incluindo os neurônios Cajal-Retzius da camada 1 do córtex cerebral em desenvolvimento, o núcleo olivar inferior no bulbo, as células mitrais no bulbo olfatório, as células de Purkinje e o núcleo denteado no cerebelo (Sarnat et al., 1998; Kumar & Buckmaster, 2007). Além disso, NeuN não é expressa em células da glia (Mullen et al., 1992). Estudos em humanos levam a crer que a falta de imunorreatividade para NeuN por neurônios do núcleo olivar inferior e núcleo denteado cerebelar sugere uma origem embrionária comum com as células de Purkinje a partir do tubérculo cerebelar. Apesar disso, os neurônios pontinos basais que apresentam mesma origem embrionária dos grupamentos supracitados exibem forte imunorreatividade à NeuN durante o desenvolvimento e na idade adulta (Sarnat et al., 1998). Esta diferença sugere que talvez a expressão de NeuN não apresente tanta influência em relação a origem embrionária, mas sim em outros aspectos celulares. Estudos relatam que a imunorreatividade à NeuN é modulada por sinais fisiológicos e patológicos como despolarização crônica da célula e lesões em nervos e tratos (Weyer e Schilling, 2003; McPhail et al., 2004).

Um estudo a nível molecular, documenta que NeuN apresenta duas isoformas eletroforicamente distinguíveis de 46 KDa e 48KDa e ambas as isoformas podem ser encontradas no núcleo celular e citoplasma, porém a abundância nestes compartimentos é distinta podendo existir pelo menos sete diferentes formas fosforiladas da proteína NeuN, onde a imunorreatividade desta depende do estado de fosforilação visto que um grupamento fosfato é crítico para a adequada formação do epítipo a ser reconhecido pelo anticorpo (Lind et al., 2005).

Diante da proposta que a imunorreatividade à NeuN depende do estado de fosforilação da proteína (Lind et al., 2005), processo de envelhecimento poderia alterar os níveis de fosforilação, levando a perda de neurônios (Iqbal e Grundek-Iqbal, 2005). Estudos em sagui idosos utilizando NeuN demonstra que o número de neurônios no núcleo supraquiasmático diminui significativamente (Engelbert et al., 2014). Nossos resultados apontam que nos animais idosos a intensidade de marcação a NeuN é reduzida no complexo pulvinar do sagui, podendo indicar diminuição no número de células ou alteração da antigenicidade das células presentes.

A Calbindina pertence a uma classe especial de proteínas que se ligam ao íon Ca^{2+} para regular a sua concentração intracelular.

Warner e colaboradores (2015) sugerem que a expressão das proteínas de ligantes de cálcio, parvalbumina e calbindina, fornece informações sobre o papel regulador das vias talâmicas. Estudos anteriores apontam que células imunorreativas a calbindina no pulvinar projetam principalmente para a camada 1 do córtex com função modulatória (Jones 1998, 2001; Shipp et al., 2003). Outros estudos demonstram que os neurônios de retransmissão pulvinar-MT expressam parvalbumina, sugerindo que eles são capazes de direcionar a aferência da retina para MT, enquanto os neurônios de retransmissão do GLD-MT expressam calbindina, o que é mais indicativo de um papel modulador (Sherman 2007, 2012).

Estudos em macacos-esquilo utilizaram calbindina (CB), para identificar o pulvinar inferior posterior (Ipulp) e o pulvinar inferior medial (IpulM), e subdividir o pulvinar inferior nas porções centrolateral (IPulCL) e centromedial (IPulCM). Os resultados revelaram que o IPulp e o IPulCM obtiveram intensa marcação para CB, enquanto o IPulCL obteve marcação menos intensa para CB. No pulvinar inferior medial (IPulM) houve pouca marcação de CB (Cusick et al., 1993; Gutierrez et al., 1995; Gray et al., 1999). Nossos dados em sagui adultos corroboram com os resultados descritos, visto que as células das subdivisões inferior posterior e inferior centrolateral apresentam forte imunorreatividade a CB, diferindo da subdivisão centromedial com menor intensidade de marcação. Na subdivisão inferior medial existe quase uma nulidade da marcação.

Nos animais idosos, a expressão de CB apresentou-se reduzida principalmente nas subdivisões do pulvinar inferior corroborando com Geng e colaboradores (2015) que sugerem uma redução da CB relacionada à idade e essa diminuição pode contribuir para os aumentos observados nos níveis de íons Ca^{2+} que por sua vez eleva o dano oxidativo.

Os astrócitos são elementos de sinalização dinâmica que integram entradas neuronais, exibem excitabilidade, podem modular neurônios vizinhos e participam em funções críticas e essenciais do sistema nervoso como plasticidade, aprendizagem e memória (Araque et al., 2001; Fields & Stevens-Graham, 2002; Hansson & Rönnbäck, 2003). Além disso, Os astrócitos são células que apresentam funções essenciais no sistema nervoso como a regulação das concentrações iônicas de cálcio e potássio, bem como a liberação de substâncias nos espaços extracelulares em resposta a neurotransmissores (Bowman & Kimelberg, 1984; Barbour, et al., 1989; Nowak, et al., 1987; Van den Pol, 1991; Zou et al., 2010). Os astrócitos podem regular a formação e remodelação de sinapses (Ullian et al., 2001), regular a diferenciação neuronal e

induzir a neurogênese a partir de células-tronco neurais (Blondel et al., 2000; Song et al., 2002). Estudos mostram que os astrócitos apresentam um importante papel na regulação dos ritmos circadianos e que a comunicação intercelular entre neurônios e astrócitos é provavelmente efetuada através de junções comunicantes (Prosser et al., 1994; Tamada et al., 1998).

A proteína acídica fibrilar glial (GFAP) é um componente dos filamentos intermediários encontrada no citoplasma dos astrócitos e é comumente usada como um marcador específico para essas células (Eng et al., 1971; Lazarides, 1980). Esta proteína é detectada durante o desenvolvimento nas células da glia radial em resposta a danos (Bignami & Dahl, 1974) e no cérebro em desenvolvimento normal de pintos (Tapscott et al., 1981) e primatas (Levitt & Rakic, 1980; Choi, 1986). A expressão de GFAP também pode ser detectada na vida pós-natal através de imunistoquímica e outras técnicas (McDermott & Lantos, 1989). Estudos mostram a presença de um ritmo endógeno na imunorreatividade para esta proteína no NSQ de hamsters e camundongos, modulado pelas aferências retinianas (Lavialle et al., 2001; Santos et al., 2005) e achados em ratos e hamsteres mostram que a GFAP está presente em toda extensão do NSQ e FIG desses animais (Morin et al., 1989).

Embora seja amplamente utilizado como marcador de astrócitos, a função de GFAP ainda é incerta (Middeldorp e Hol, 2011). Neste trabalho, observamos células imunorreativas a GFAP que comprova a presença de astrócitos em todos os níveis de secção do complexo pulvinar. Um estudo recente em humanos demonstra que a expressão dessa proteína está presente em todo o complexo em indivíduos saudáveis, sendo intensificada quando paciente apresentam acúmulo de proteínas anormais (corpos de Lewy) em todo o complexo pulvinar e doença de Alzheimer. O fato de o pulvinar apresentar um papel importante na atenção visual, na seleção de alvos visuais e na percepção visual afetiva, pacientes com essas patologias apresentam comprometimento dessas funções tornando-os vulneráveis a alucinações visuais (Erskine et al., 2017). Um estudo em *Tupaia belangeri* aponta que o número de células gliais no pulvinar superam o número de neurônios imunorreativos a NeuN, em uma proporção de 2,5:1 (Wei et al., 2011).

Apesar de estudos apontarem uma maior expressão de astrócitos em idosos (Cerbai et al., 2012; Engelbert et al., 2013), nossos dados diferem e apontam uma redução da expressão de GFAP em toda a extensão do complexo pulvinar. Acredita-se que os astrócitos não são essenciais para o processamento de informações, mas fornecem suporte aos neurônios (Kandel et al., 2014). No nosso estudo, embora qualitativo, observamos uma redução neuronal e isso

pode refletir na diminuição da expressão dessas células gliais, visto que as mesmas estabelecem íntima relação com os neurônios.

O pulvinar visual, que inclui as subdivisões inferior e lateral, apresentam funções visuais e são distintas de outras partes do tálamo que são tradicionalmente incluídas no pulvinar, como o pulvinar medial, que tem amplas conexões com partes não sensoriais ou de associação do córtex e o pulvinar anterior, uma parte importante, mas não estudada, do sistema somatossensorial (Jones, 2007).

A CTb tem sido amplamente utilizada como um traçador neuronal altamente sensível em diversos estudos (Mikkelsen, 1992; Schimizu et al., 1994; Nakagawa et al., 1998; Costa et al., 1998; 1999; Cavalcante et al., 2005; Engelberth et al., 2008; Nascimento Jr et al., 2010; Cavalcante et al., 2011; Morais et al., 2014; Fiuza et al., 2016).

O papel do pulvinar como um relé da informação retiniana ao córtex durante o desenvolvimento é crítico por apoiar o comportamento visual no recém-nascido e facilitar a maturação do córtex extra-estriado. Estudos recentes utilizando injeção de traçador anterógrado identificaram uma via transitória presente no início da vida que se projeta diretamente da retina para o pulvinar, sem envolvimento do colículo superior, com terminais marcados na porção medial do núcleo pulvinar inferior (IPulm) cujos neurônios se projetam para a área temporal medial (MT) uma área cortical associada com a via visual dorsal, visto que o desenvolvimento da percepção de movimento antes da percepção de forma é essencial para a sobrevivência do animal (O'Brien et al., 2001; Kiorpes e Movshon, 2004; Warner et al., 2010; 2012; Kiorpes et al., 2012). Estudos envolvendo lesões no córtex visual primário em saguis neonatos apontam um fortalecimento da via retino-pulvinar-MT (Leopold, 2012; Bridge et al., 2017). No entanto, em primatas adultos esta via retino-pulvinar está presente, porém é muito mais esparsa pois durante o desenvolvimento normal, à medida que a via retino-genículo-estriado amadurece e começa a dominar a entrada visual no córtex através das radiações ópticas, a via visual inicial através do pulvinar inferior medial regride (Nakagawa e Tanaka, 1984; Cowey et al., 1994; O'Brien et al., 2001; Warner et al., 2010; Bridge et al., 2017).

Nossos dados evidenciam a presença de numerosas fibras/terminais no núcleo pulvinar inferior medial dos animais adultos através da injeção intraocular de CTb. Os axônios podem ser classificados como simples (“*en passant*”) por serem pouco ramificados com comprimento e espessura variáveis com varicosidades de diferentes tamanhos ao longo destes e terminação simples (Sherman, 2012). Nossos dados corroboram com dados anteriores em sagui onde foi observada a presença de terminais retinianos no pulvinar inferior medial adjacente ao braço do

colículo superior contralateral ao olho que recebeu a injeção de CTb (Warner et al., 2010). Nossos dados sugerem pela classificação simples das fibras que a projeção retiniana é direta ao pulvinar e parece não formar projeções colaterais, o que corrobora com dados anteriores que demonstra que a aferência retiniana ao pulvinar independe das projeções retinianas ao colículo superior e ao núcleo geniculado lateral (Kwan et al., 2019).

No entanto, observamos em nosso estudo que a projeção da retina para o pulvinar em sagui idoso é discreta quando comparada aos animais adultos, porém a classificação (“*en passant*”) é conservada. Estudos com ratos e saguis idosos utilizando CTb em áreas talâmicas e hipotalâmicas respectivamente, demonstram um declínio da aferência retiniana (Engelbert et al., 2014; Fiuza et al., 2016). Na retina, várias doenças degenerativas ocorrem como resultado de alterações em mecanismos celulares e moleculares, sendo a idade um contribuinte para o desenvolvimento de várias patologias. Um estudo realizado com camundongos jovens e idosos demonstra que o aumento da idade promove alterações nos genes que codificam proteínas envolvidas na ativação da resposta imune e da microglia presente na retina (Chen et al., 2010). Durante o processo de envelhecimento o número de células ganglionares decresce, assim como, a população dos fotorreceptores sendo os do tipo bastonete mais afetada quando comparada com a dos fotorreceptores do tipo cone (Curcio e Druker, 1993; Curcio et al., 1993; Gao e Hollyfield, 1992). Essa redução da projeção observada em nosso trabalho pode ser resultante de alterações nas células ganglionares da retina que projetam para o IPulM.

Estudo de conexões observou que o tamanho das varicosidades é associado com uma maior eficiência sináptica. As varicosidades de maior tamanho (classe 1) exerce um grande efeito pós-sináptico (driver), enquanto as vias com botões de menor tamanho (classe 2) exercem efeito pós-sináptico menor, com função modulatória (modulator) (Sherman, 2012; Petrof e Sherman, 2013). Notamos em nosso estudo que as fibras/terminais que expressam CTb na subdivisão inferior medial em sagui parecem exercer um papel modulador, visto que os botões são pequenos e os axônios delgados característicos da classe 2. Kwan e colaboradores (2019) levantam a questão de que o pulvinar poderia conduzir ou modular a função visual.

Estudos demonstram que o pulvinar apresenta uma circuitaria local que interage intrinsecamente devido a presença de: axônios ramificados e altamente divergentes que podem atravessar e serem vistos em outras subdivisões (Rockland 1996, 1998); longos interneurônios inibitórios (Imura e Rockland 2006); “pontes” entre as subdivisões do pulvinar inferior que expressam calbindina e substância P (stepniewska, 2003); e aferências inibitórias do núcleo

reticular o qual recebe ramificações excitatórias dos axônios tálamo-corticais e córtico-talâmicos (Sherman e Guillery, 2000).

Apesar de ser um estudo de caráter qualitativo, nossos dados apontam diferenças entre animais adultos e idosos sugerindo que o complexo pulvinar pode sofrer uma perda significativa de caráter funcional quanto ao processamento da informação visual.

FIGURAS

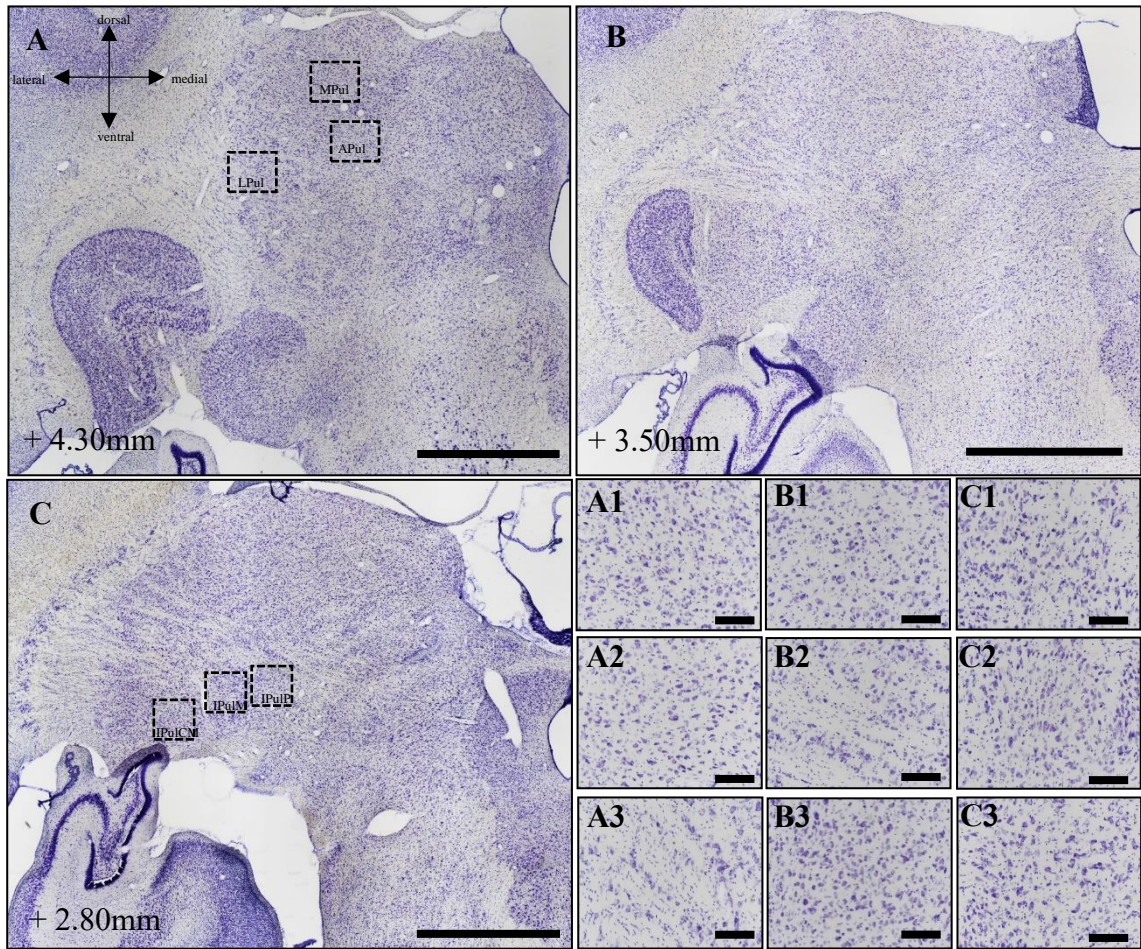


Figura 1 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto mostrando a citoarquitetura do complexo pulvinar em nível rostral (A), médio (B) e Caudal (C) pelo método de Nissl. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões mostradas em maior aumento (A1-3, B1-3 e C1-3). MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral, IPulCL, pulvinar inferior centrolateral, IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A, B e C barra de escala de 300µm; em (A1-3, B1-3 e C1-3), barra de escala de 50µm.

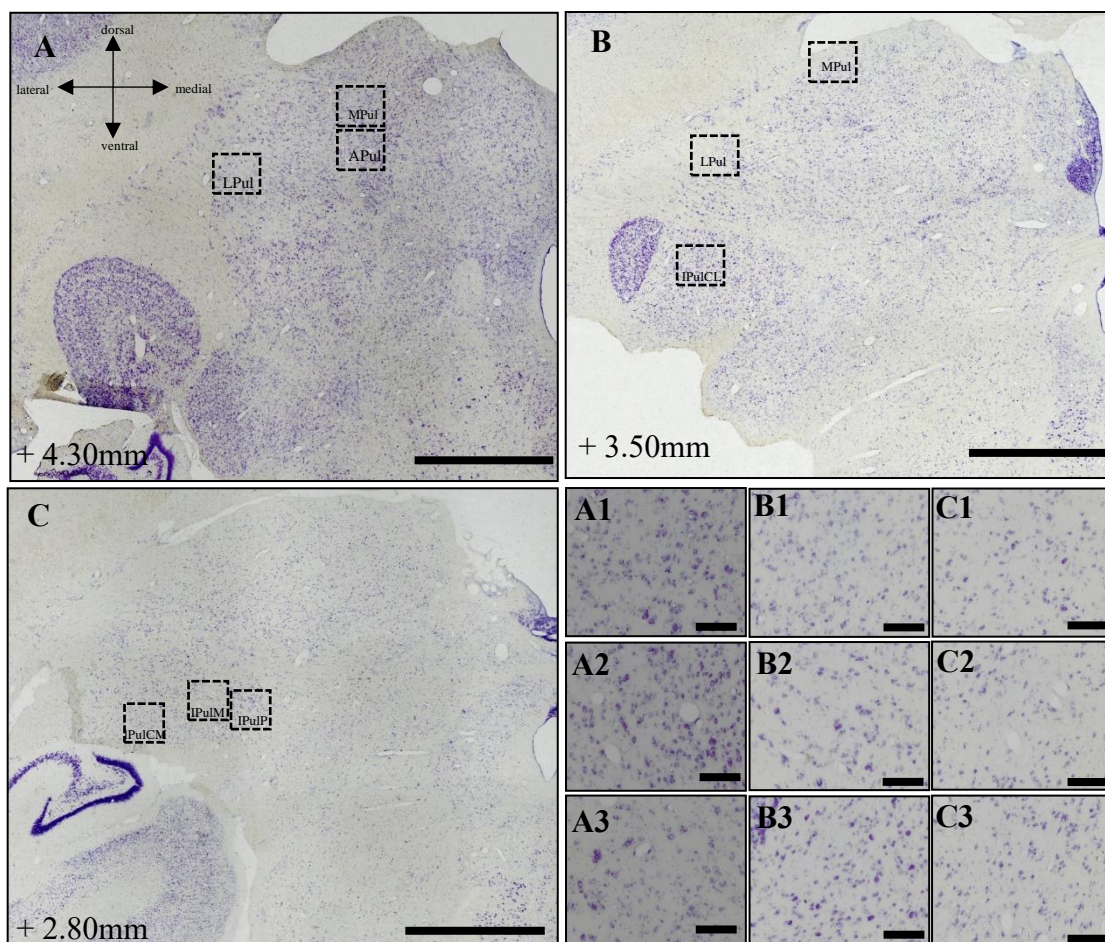


Figura 2 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui idoso mostrando a citoarquitetura do complexo pulvinar em nível rostral (A), médio (B) e caudal (C) pelo método de Nissl. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões mostradas em maior aumento (A1-3, B1-3 e C1-3). MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral, IPulCL, pulvinar inferior centrolateral, IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A, B e C barra de escala de 300µm; em (A1-3, B1-3 e C1-3), barra de escala de 50µm.

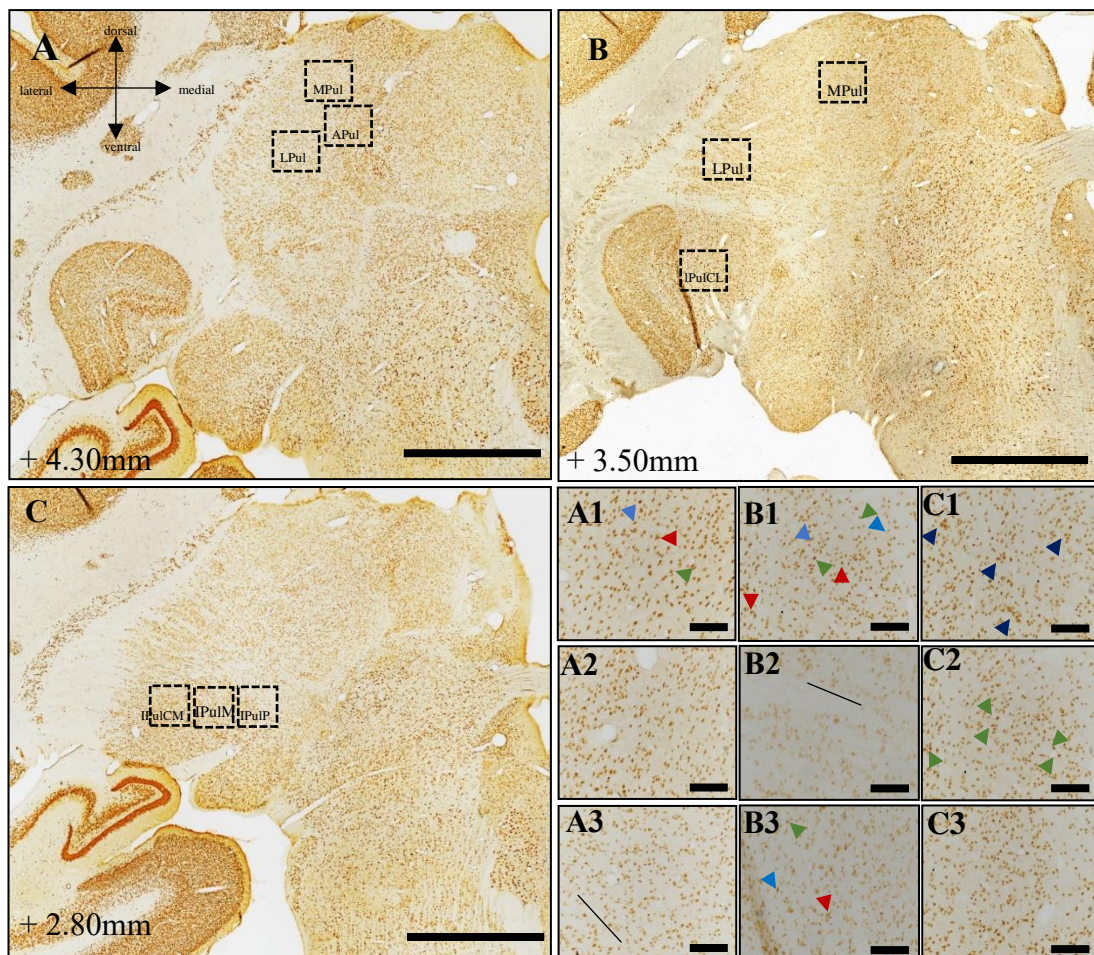


Figura 3 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui adulto mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à NeuN em nível rostral (A), médio (B) e caudal (C) através de imunoistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões mostradas em maior aumento em A1-3, B1-3, C1-3. As cabeças de setas indicam a presença de células com morfologia diferenciadas. A linha evidencia a organização linear das células. No limite da subdivisão inferior posterior as células apresentam intensa marcação. MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral, IPulCL, pulvinar inferior centrolateral, IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A, B e C barra de escala de 300 μ m; em (A1-3, B1-3 e C1-3), barra de escala de 50 μ m.

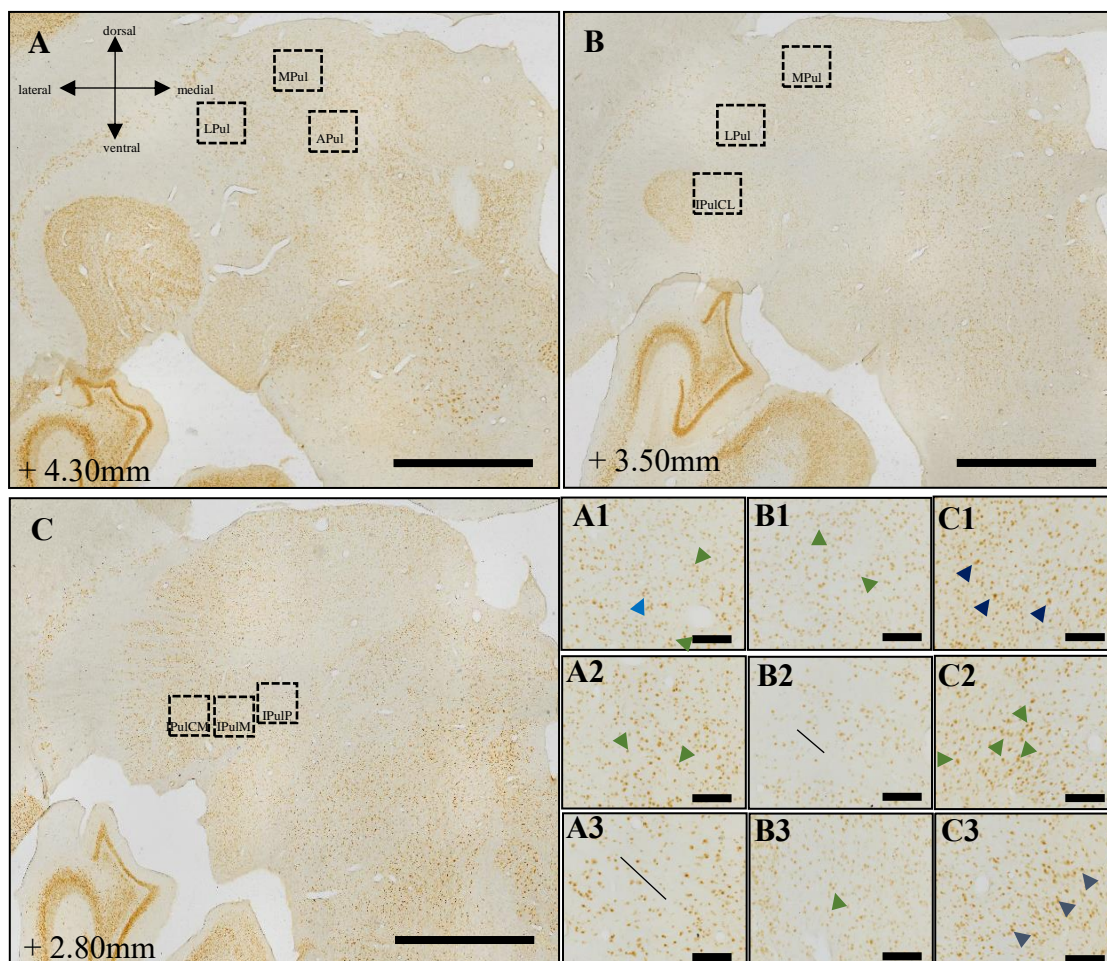


Figura 4 – Fotomicrografias em campo claro de seções coronais do encéfalo do sagui idoso mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à NeuN em nível rostral (A), médio (B) e caudal (C) através de imunoistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões mostradas em maior aumento em A1-3, B1-3, C1-3. As cabeças de setas indicam a presença de células com morfologia diferenciadas. A linha evidencia a organização linear das células. No limite da subdivisão inferior centromedial e posterior as células apresentam intensa marcação. MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral, IPulCL, pulvinar inferior centrolateral, IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A, B e C barra de escala de 300 μ m; em (A1-3, B1-3 e C1-3), barra de escala de 50 μ m.

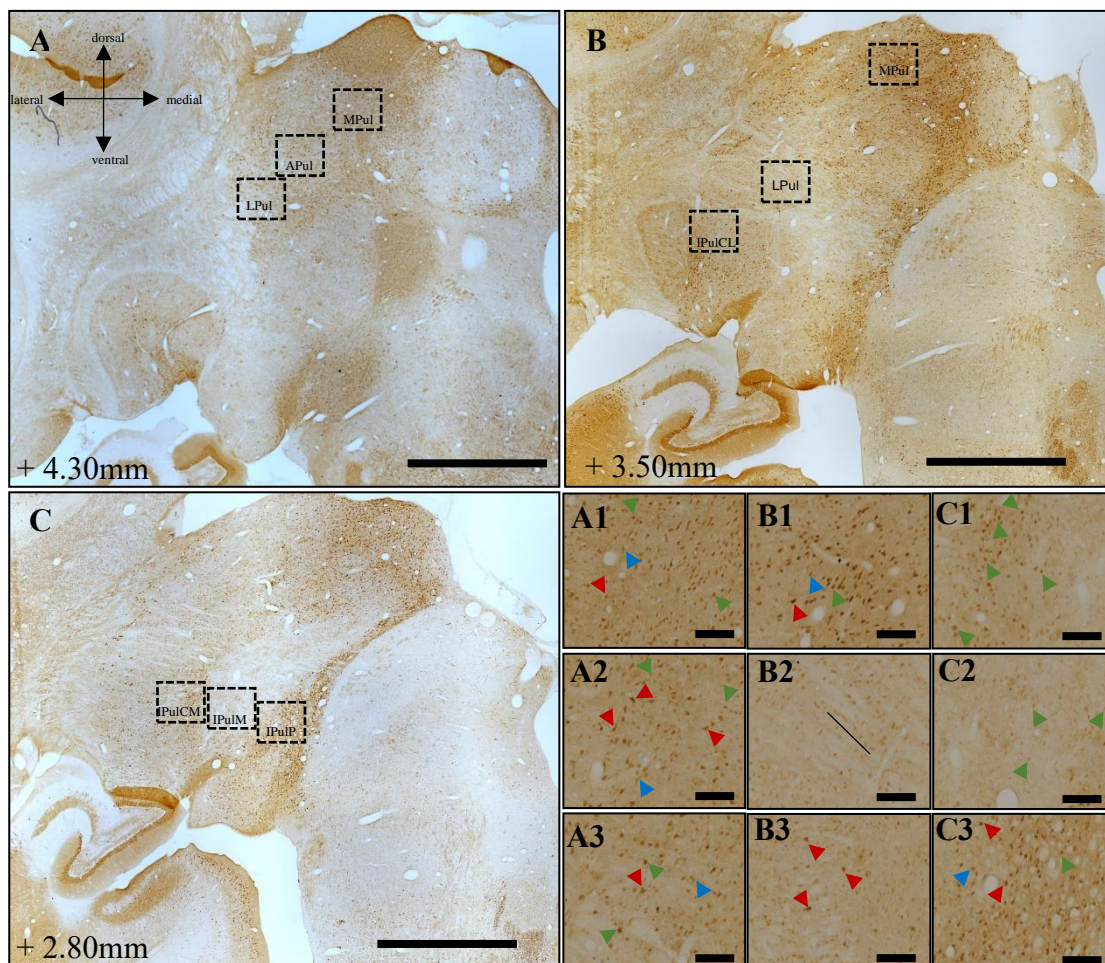


Figura 5 – Fotomicrografias em campo claro de seções coronais do encéfalo do sagui adulto mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à CB em nível rostral (A), médio (B) e caudal (C) através de imunoistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões mostradas em maior aumento em A1-3, B1-3, C1-3. As cabeças de setas indicam a presença de células com morfologia diferenciadas. Notamos a predominância de células esféricas (cabeça de seta verde) com outros tipos morfológicos (cabeças de seta vermelho e azul) distribuídos de forma esparsa na subdivisão medial. Na subdivisão anterior, observamos que as células estão distribuídas de forma dispersa com morfologia piramidal (cabeça de seta vermelho), fusiforme (cabeça de seta azul) e esféricas (cabeça de seta verde). MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral, IPulCL, pulvinar inferior centrolateral, IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A, B e C barra de escala de 300µm; em (A1-3, B1-3 e C1-3), barra de escala de 50µm.

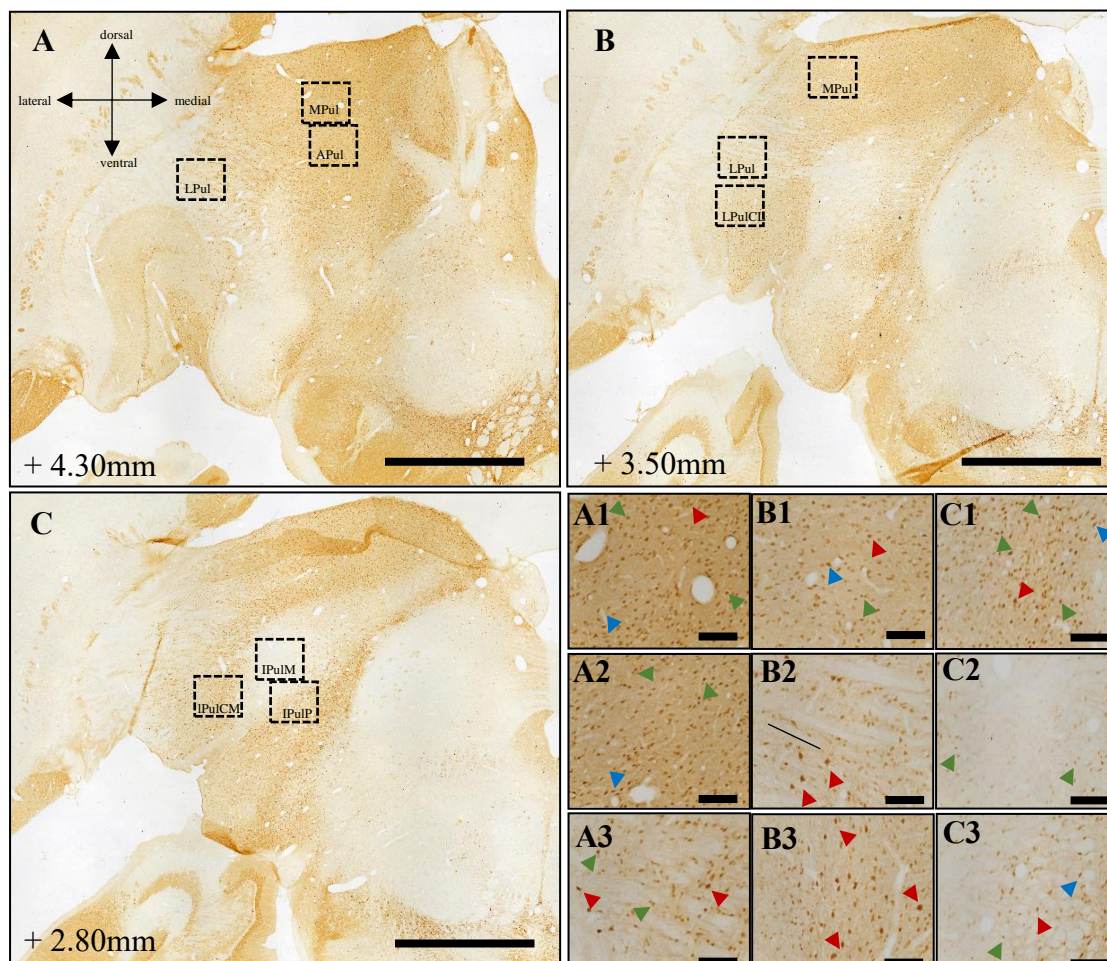


Figura 6 – Fotomicrografias em campo claro de secções coronais do encéfalo do sagui idoso mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à CB em nível rostral (A), médio (B) e caudal (C), através de imunistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões mostradas em maior aumento em A1-3, B1-3, C1-3. As cabeças de setas indicam a presença de células com morfologia diferenciadas. Notamos a predominância de células esféricas (cabeça de seta verde) com outros tipos morfológicos (cabeças de seta vermelho e azul) distribuídos de forma esparsa na subdivisão medial. Na subdivisão anterior, observamos que as células estão distribuídas de forma dispersa com morfologia fusiforme (cabeça de seta azul) e esférica (cabeça de seta verde). A subdivisão lateral apresenta células com forma esférica (cabeça de seta verde) com piramidal (cabeça de seta vermelho). A linha evidencia a disposição linear das células. Na subdivisão inferior a marcação é menos intensa. MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral, IPulCL, pulvinar inferior centrolateral, IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A, B e C barra de escala de 300µm; em (A1-3, B1-3 e C1-3), barra de escala de 50µm.

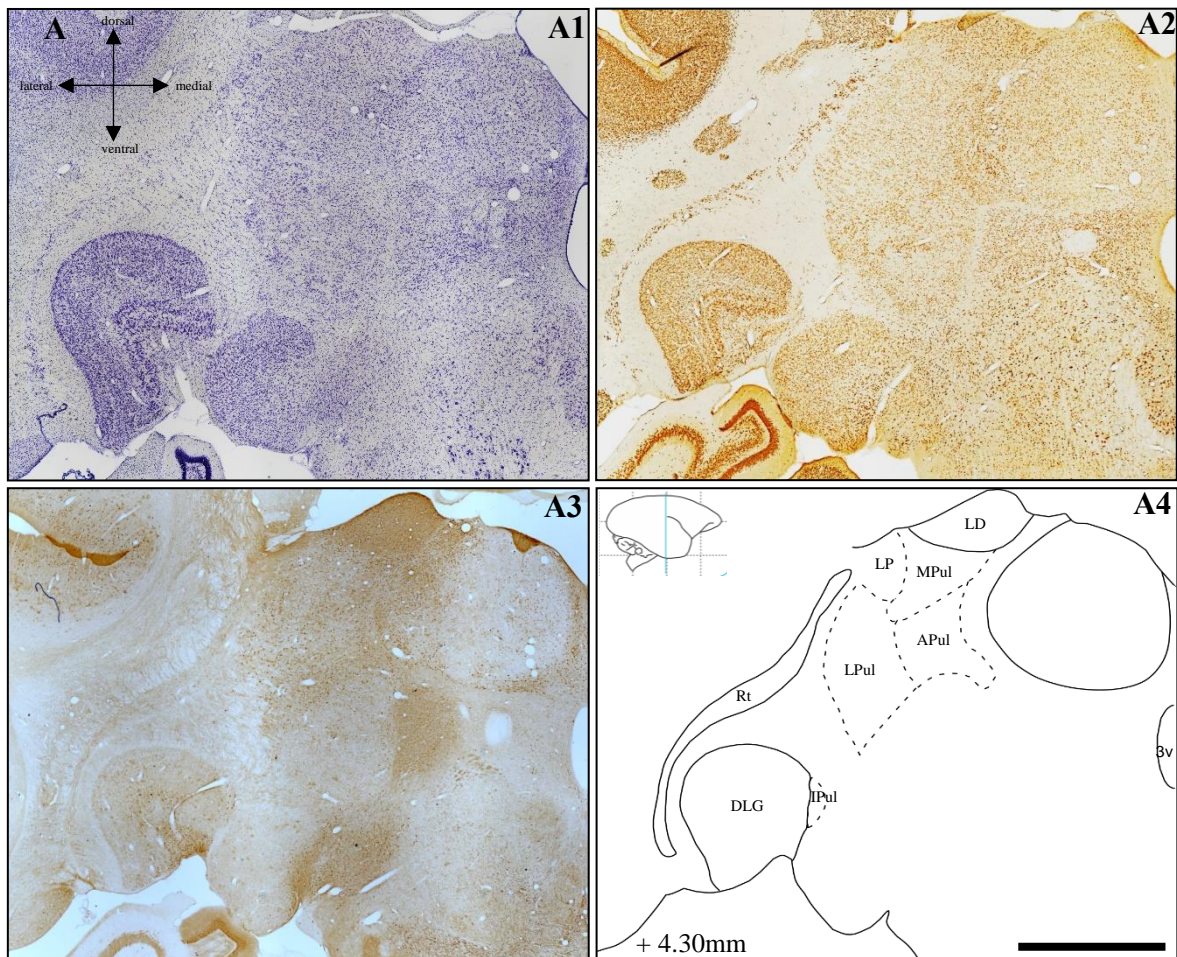
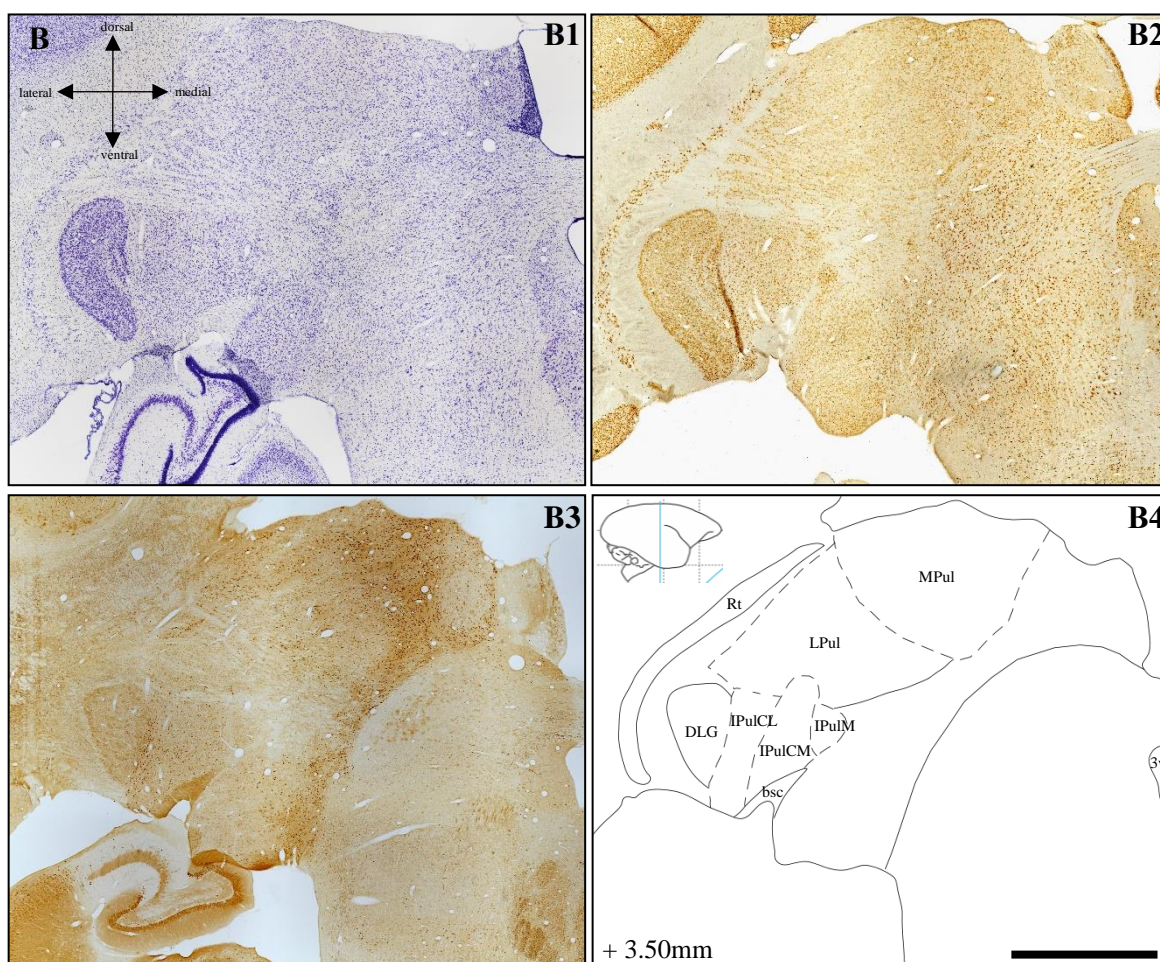
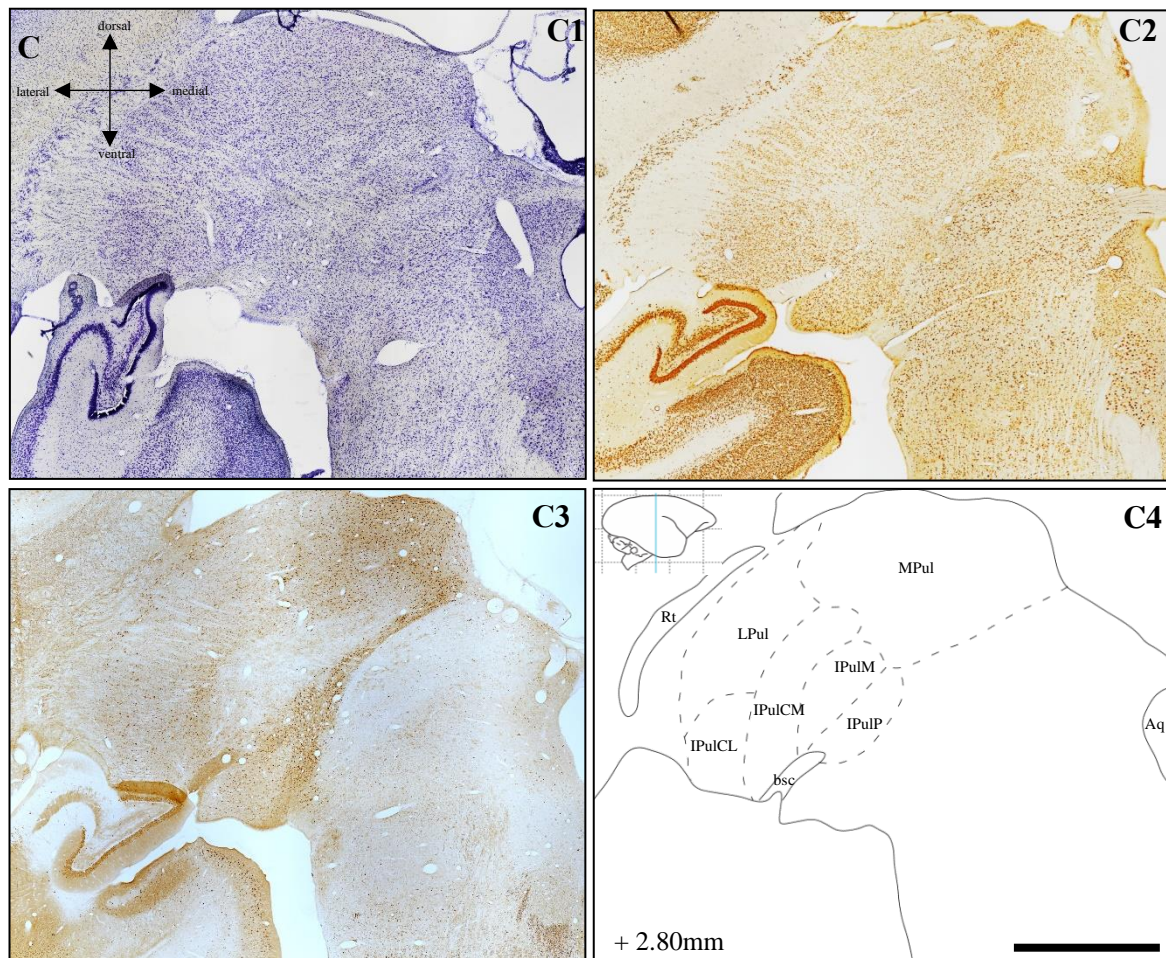


Figura 7 – Delimitação do complexo pulvinar do tálamo em saguis adultos em secções coronais no nível rostral a partir da utilização de técnicas de coloração. Em A1 Nissl, A2 e A3 imunoistoquímica para NeuN e CB, respectivamente. A4 é o esquema resultante do enquadramento das secções. LD, núcleo lateral dorsal; LP, núcleo lateral posterior; MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral; IPul, pulvinar inferior; Rt, núcleo reticular; DLG, núcleo geniculado lateral dorsal; 3v, terceiro ventrículo. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Barra de escala de 300 μ m.



Continuação da Figura 8 – Delimitação do complexo pulvinar do tálamo em saguis adultos em secções coronais no nível médio a partir da utilização de técnicas de coloração. Em B1 Nissl, B2 e B3 imunistoquímica para NeuN e CB, respectivamente. B4 é o esquema resultante do enquadramento das secções. MPul, pulvinar medial; LPul, pulvinar lateral; IPulCL IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; Rt, núcleo reticular; DLG, núcleo geniculado lateral dorsal; bsc; braço do colículo superior; 3v; terceiro ventrículo. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Barra de escala de 300 μ m.



Continuação da Figura 9 – Delimitação do complexo pulvinar do tálamo em saguis adultos em secções coronais no nível caudal a partir da utilização de técnicas de coloração. Em C1 Nissl, C2 e C3 imunohistoquímica para NeuN e CB, respectivamente. C4 é o esquema resultante do enquadramento das secções. MPul, pulvinar medial; LPul, pulvinar lateral; IPulCL IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior; Rt, núcleo reticular; bsc; braço do colículo superior; Aq; aqueduto cerebral. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Barra de escala de 300µm.

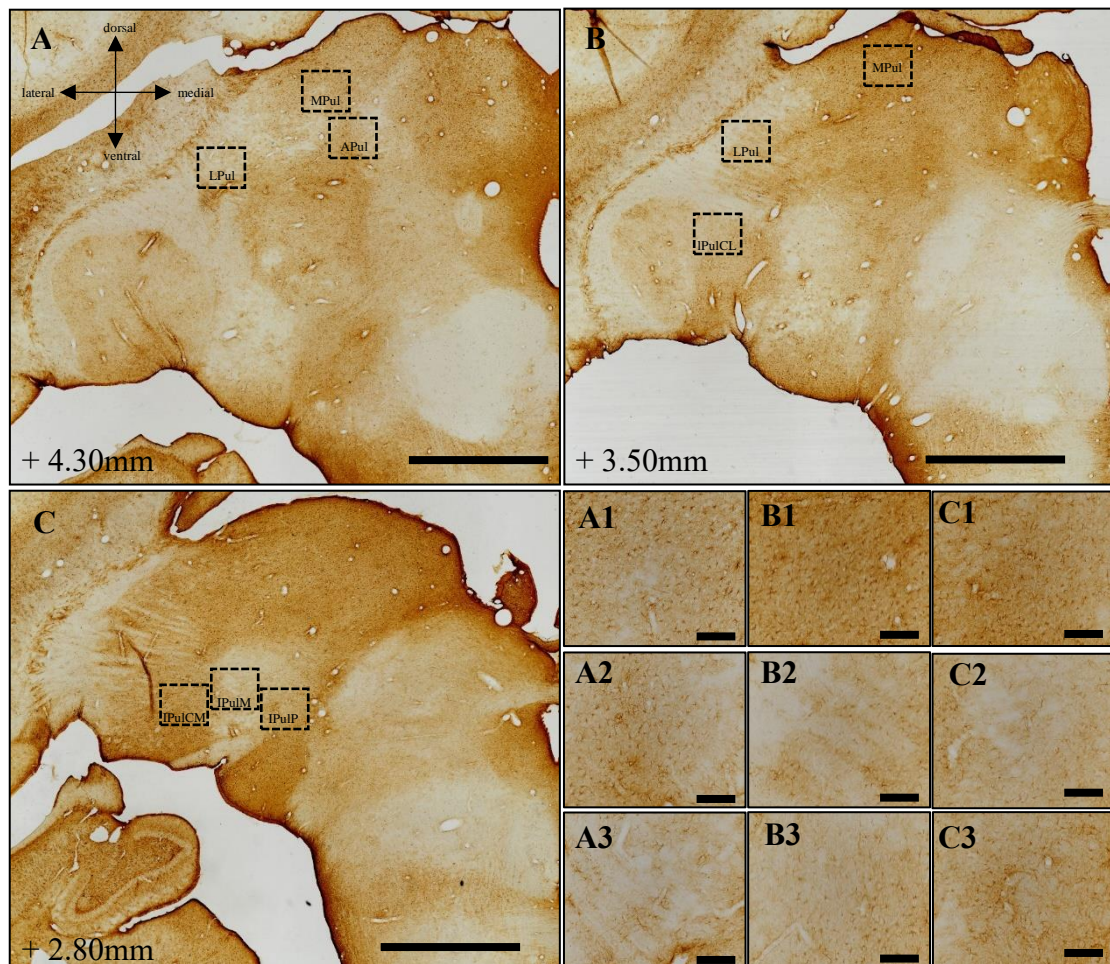


Figura 10 – Fotomicrografias em campo claro de seções coronais do encéfalo do sagui adulto mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à GFAP em nível rostral (A), médio (B) e caudal (C), através de imunohistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões mostradas em maior aumento em A1-3, B1-3 e C1-3 evidenciando a distribuição e morfologia dos astrócitos. MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral, IPulCL, pulvinar inferior centrolateral, IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A, B e C barra de escala de 300µm; em (A1-3, B1-3 e C1-3), barra de escala de 50µm.

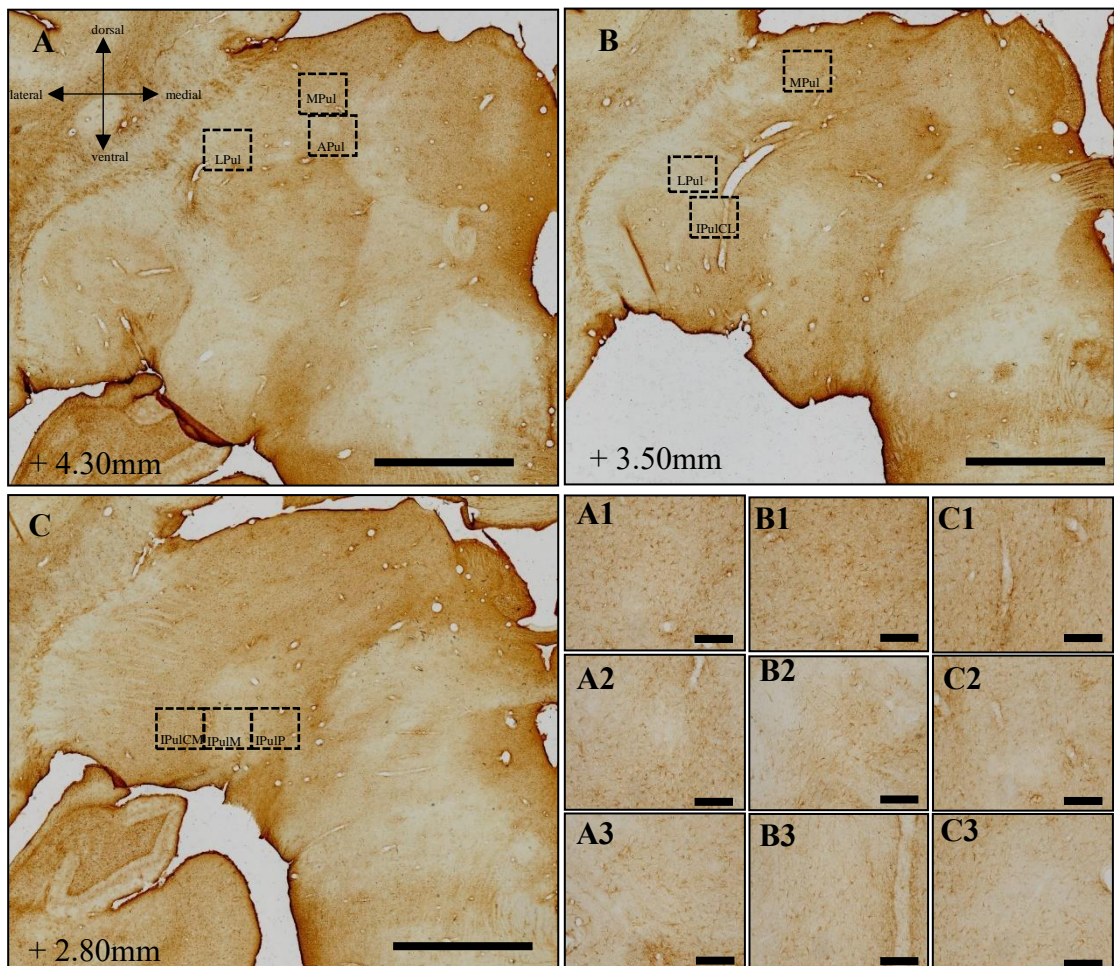


Figura 11 – Fotomicrografias em campo claro de seções coronais do encéfalo do sagui idoso mostrando a imunorreatividade das células do complexo pulvinar à GFAP em nível rostral (A), médio (B) e caudal (C), através de imunoistoquímica. As áreas pontilhadas representam seleção das subdivisões medial, anterior e lateral mostradas em maior aumento em A1-3, B1-3 e C1-3 evidenciando a distribuição e morfologia dos astrócitos. MPul, pulvinar medial; APul, pulvinar anterior; LPul, pulvinar lateral, IPulCL, pulvinar inferior centrolateral, IPulCM, pulvinar inferior centromedial; IPulM, pulvinar inferior medial; IPulP, pulvinar inferior posterior. A distância caudal (+) ao bregma (em mm) é indicada no canto inferior esquerdo. Em A, B e C barra de escala de 300µm; em (A1-3, B1-3 e C1-3), barra de escala de 50µm.

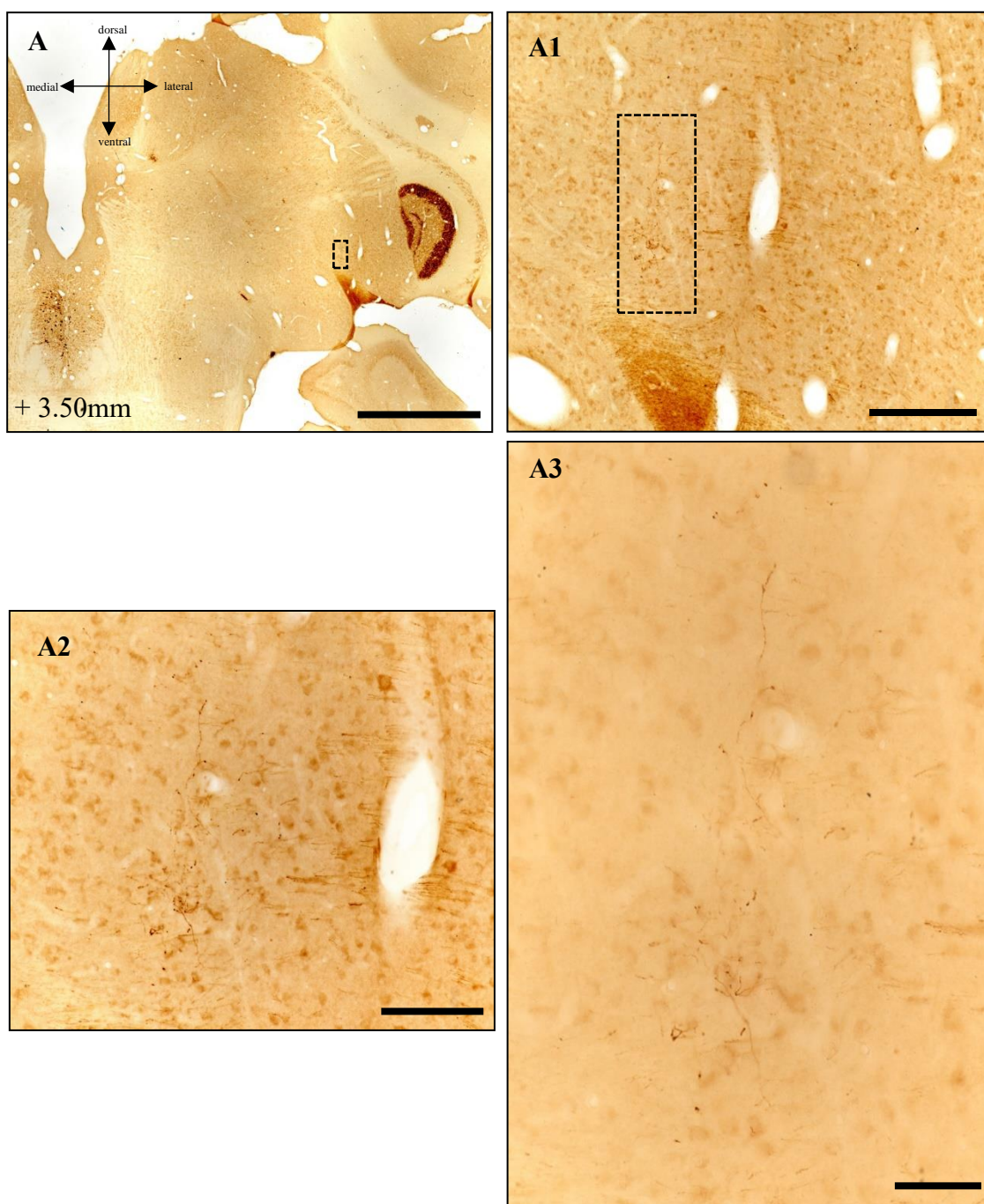


Figura 12 – Fotomicrografia em campo claro de secção coronal do encéfalo do sagui adulto em nível médio (A). As áreas pontilhadas representam seleção da subdivisão inferior medial, local da aferência retiniana. Observamos a presença de fibras e botões imunorreativos a CTb. A3 mostra o tipo de fibra *en passant*. Em A, barra de escala de 300 μ m. Em A1, barra de escala de 100 μ m. Em A2, barra de escala de 50 μ m. Em A3, barra de escala de 20 μ m.

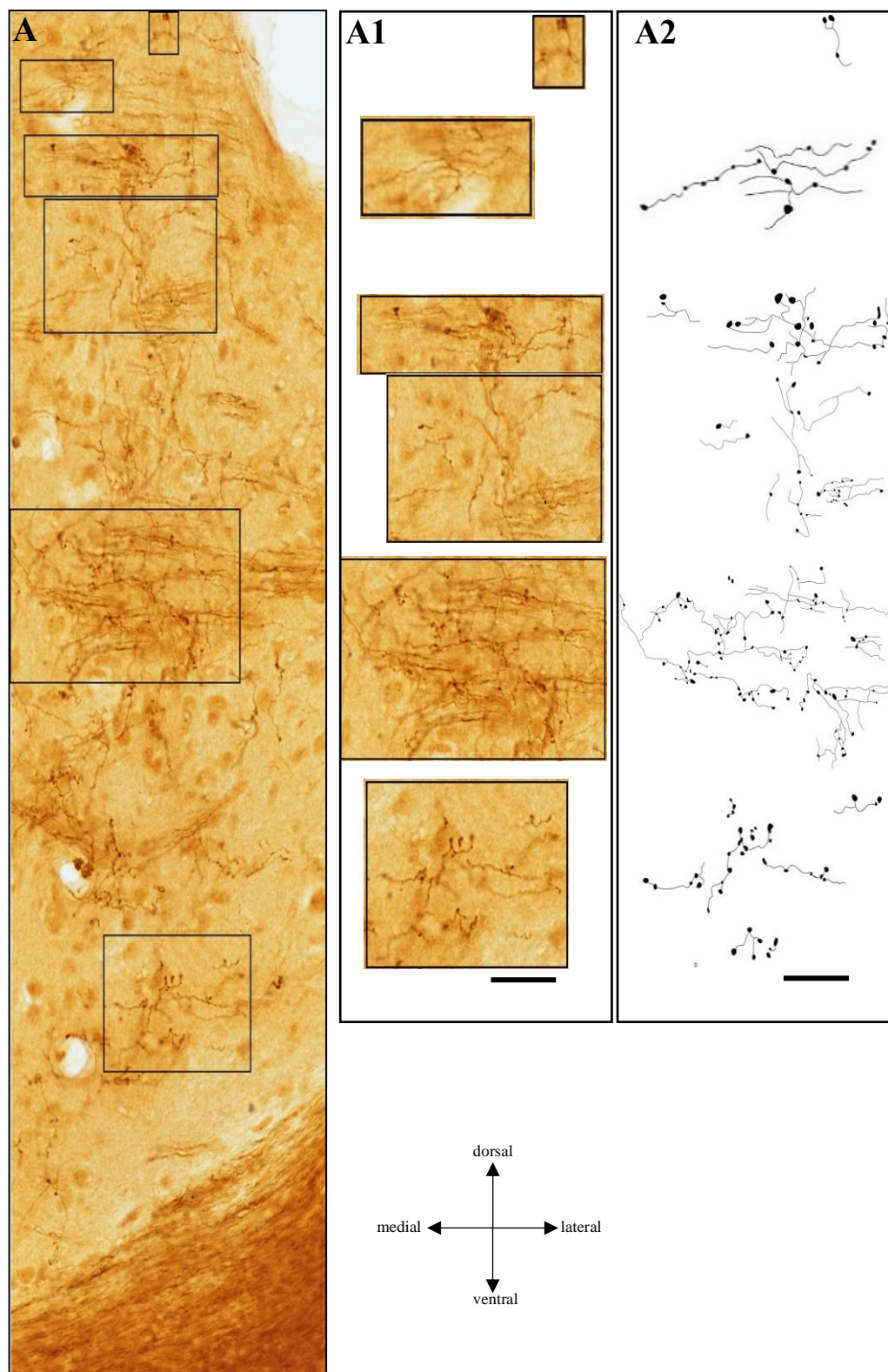


Figura 13 – Fotomicrografia em campo claro de secção coronal do encéfalo do sagui adulto em nível médio em maior aumento evidenciando o tipo de fibra *en passant*. As áreas selecionadas em A estão representadas em A1. O desenho das fibras e botões estão ilustrados em A2. Em A, barra de escala de 50µm; em A1 e A2, barra de escala de 20µm.

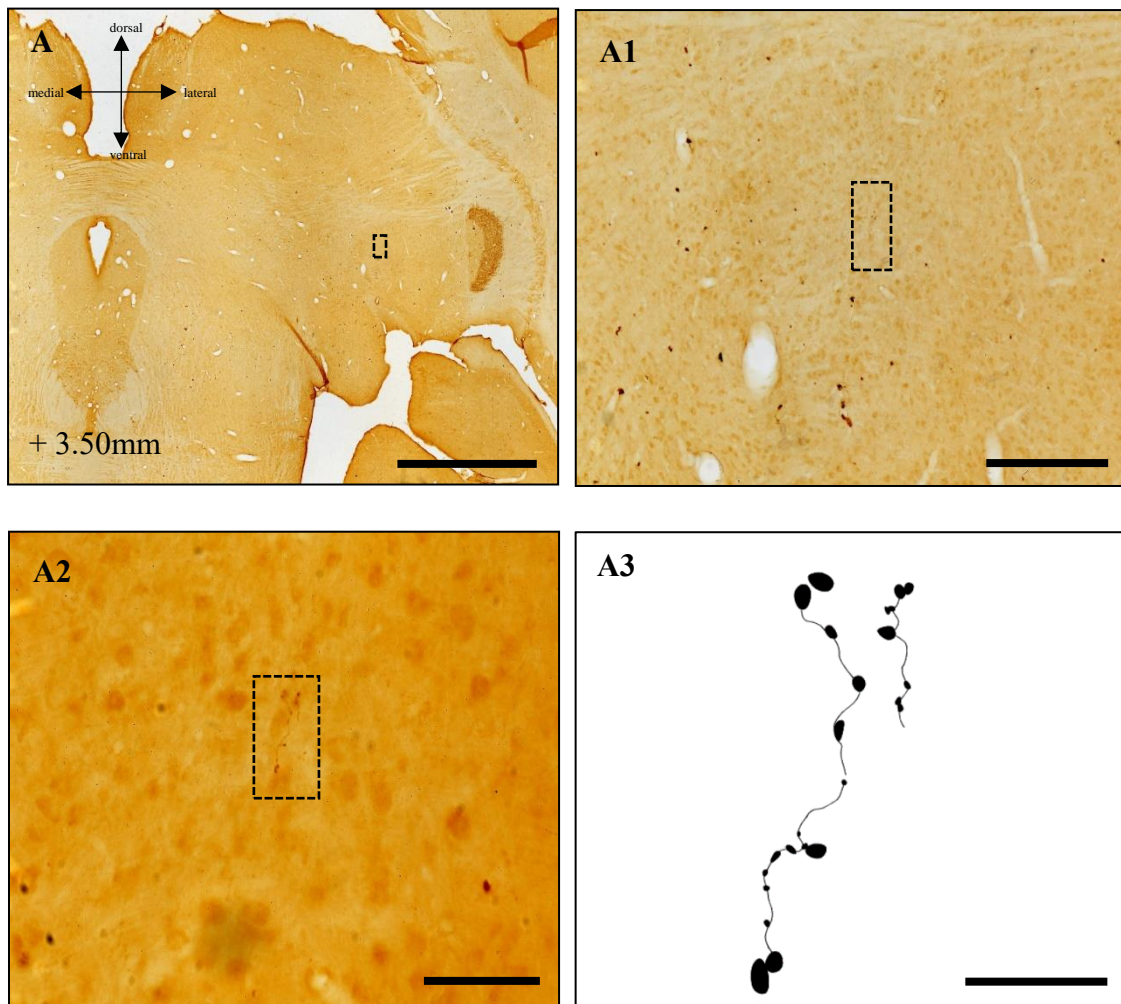


Figura 14 – Fotomicrografia em campo claro de secção coronal do encéfalo do sagui idoso em nível médio (A). A área pontilhada em A1 representa seleção da subdivisão inferior medial, local da aferência retiniana. Em A2 observamos uma discreta projeção retiniana evidenciando o tipo de fibra *en passant* evidenciadas no desenho das fibras e botões em A3. Em A, barra de escala de 300 μ m. Em A1, barra de escala de 100 μ m. Em A2, barra de escala de 20 μ m e em A3, barra de escala de 30 μ m.

6. REFERÊNCIAS

- Abbot, D.H., Barnett, D.K., Colman, R.J., Yamamoto, M.E., Schultz-Darken, N.J., 2003. Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. *Comparative Med*, 53(4), 339-350.
- Ajmo Jr, C.T., Vernon, D.O., Collier, L., Pennypacker, K.R., Cuevas, J., 2006. Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 h after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Curr Neurovasc Res* 3, 89-98.
- Allman, J.M., Kaas, J.H., Lane, R.H., Miezin, F.M., 1972. A representation of the visual field in the inferior nucleus of the pulvinar in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *Brain Res* 40, 291-302. doi.org/10.1016/0006-8993(72)90135-7.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon P.G., 2001. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* 63, 795-813.
- Baldwin, M.K.L., Balaram, P., Kass, J.H., 2017. The evolution and functions of nuclei of the visual pulvinar in primates. *The J Comp Neurol* 525, 3207-3226. doi.org/10.1002/cne.24272.
- Barbour, B., Szatkowski, M., Ingledew, N., Attwell, D., 1989. Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells. *Nature* 342, 918-920.
- Bendel, O., Alkass, K., Bueters, T., von Euler, M., von Euler, G., 2005. Reproducible loss of CA1 neurons following carotid artery occlusion combined with halothane-induced hypotension. *Brain Res* 1033, 135-42. doi.org/10.1016/j.brainres.2004.11.033.
- Berman, N., Jones, E.G., 1977. A retino-pulvinar projection in the cat. *Brain Res* 134:237-248. doi.org/10.1016/0006-8993(77)91070-8.
- Berman, R.A., Wurtz, R.H., 2008. Exploring the pulvinar path to visual cortex. *Progress in Brain Res* 171, 467-473. doi:10.1016/S0079-6123(08)00668-7.
- Berman, R.A., Wurtz, R.H., 2010. Functional identification of a pulvinar path from superior colliculus to cortical area MT. *J Neurosci* 30, 6342-6354. doi:10.1523/JNEUROSCI.6176-09.2010.

Berman, R.A., Wurtz, R.H., 2011. Signals conveyed in the pulvinar pathway from superior colliculus to cortical area MT. *J Neurosci* 31, 373–384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4738-10.2011>.

Bignami, A., Dahl, D., 1974. Astrocyte-specific protein and radial glia in the cerebral cortex of newborn rat. *Nature* 252, 55-56.

Blondel, O., Collin, C., McCarran, W.J., Zhu, S., Zamostiano, R., Gozes, I., Brenneman D.E., McKay, R.D.G., 2000. A glial derived signal regulating neuronal differentiation. *J Neurosci* 20, 8012-8020.

Bowman, C.L., Kimelberg, H.K., 1984. Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primare culture. *Nature* 311, 656-659. doi:10.1038/311656a0.

Bridge, H., Leopold, D.A., Bourne, J.A., 2016. Adaptive pulvinar circuitry supports visual cognition. *Trends in Cogn Sci*, 20(2), 146–157. doi:10.1016/j.tics.2015.10.003.

Campos-Ortega, J.K., Hayhow, W.R., Clüver, P.F.D.E.V., 1970. A note on the problem of retinal projections to the inferior nucleus of primates. *Brain Res* 22, 126-130. doi:10.1016/0006-8993(70)90408-7.

Carpenter, M.B., 1995. *Hum Neuroanat*. 9 ed. Canada. 663-695pp.

Cavalcante, J. S., Costa, M. S. M. O., Santee, U. R., & Brito, L. R. G. (2005). Retinal projections to the midline and intralaminar thalamic nuclei in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Brain Res* 1043, 42-47. doi:10.1016/j.brainres.2005.02.035

Cavalcante, J.S., Pontes, A.L., Engelberth, R.C., J.C., Nascimento Jr., E.S., Borda, J.S., Pinato, L., Costa, M.S., de Toledo, C.A., 2011. 5-HT(1B) receptor in the suprachiasmatic nucleus of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neurosci Lett*, 488(1), 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.10.070>.

Cavalcanti, J.R.L.P., Soares, J.G., Oliveira, F.G., Guzen, F.P., Pontes, A.L.B., Sousa, T.B., Cavalcante J.S., Nascimento Jr, E.S., Cavalcante, J.C., Costa, M.S.M.O. 2014. A cytoarchitectonic and TH-immunohistochemistry characterization of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area and retrorubral field in the rock cavy (*Kerodon*

rupestris). Journal of Chemical Neuroanatomy, 55, 58-66.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.01.002>.

Cerbai, F., Lana, D., Nosi, D., Petkova-Kirova, P., Zecchi, S., Brothers, H.M., Wenk, G.L., Giovannini, M.G., 2012. The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. Plos one 7(9), e45250. doi:10.1371/journal.pone.0045250.

Chen, M., Muckersie, E., John V., Forrester, J.V., Xu, H., 2010. Immune activation in retinal aging: a gene expression study. Invest Ophth Vis Sci 51, 5888-5896. doi:10.1167/iovs.09-5103.

Choi, B.H., 1986. Glial fibrillary acidic protein in radial glia of early human fetal cerebrum: a light and electron microscopic immunoperoxidase study. J Neuropath Exp Neuro 45, 408-418. <https://doi.org/10.1097/00005072-198607000-00003>

Chow, K.L., 1950. A retrograde cell degeneration study of the cortical projection field of the pulvinar in the monkey. J Comp Neurol 93, 313-340. <https://doi.org/10.1002/cne.900930302>

Chow, K.L., 1954. Lack of behavioral effects following destruction of some thalamic association nuclei in monkey. Arch Neurolo Psychiatr 71, 762-771.

Costa, M.S.M.O., Moreira, L.F., Alones, V., Lu, J., Santee, U.R., 1998. Characterization of the Circadian System in a Brazilian Species of Monkey (*Callithrix jacchus*): Immunohistochemical Analysis and Retinal Projections. Biol Rhythm Res 29(5), 510-520. <https://doi.org/10.1076/brhm.29.5.510.4829>.

Costa, M.S., Santee, U.R., Cavalcante, J.S., Moraes, P.R., Santos, N.P., Britto, L.R., 1999. Retinohypothalamic projections in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): A study using cholera toxin subunit B. J Comparative Neurol 415(3), 393-403. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19991220\)415:3<393::AID-CNE5>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19991220)415:3<393::AID-CNE5>3.0.CO;2-R).

Cowey, A., Stoerig, P., Bannister, M., 1994. Retinal ganglion cells labelled from the pulvinar nucleus in macaque monkeys. Neurosci 61, 691-705. doi:10.1016/0306-4522(94)90445-6.

Curcio, C.A., Drucker, D.N., 1993. Retinal ganglion cells in Alzheimer's disease and aging. Ann Neurol 33, 248-257. doi:10.1002/ana.410330305.

- Curcio, C.A., Millican, C.L., Allen, K.A., Kalina, R.E., 1993. Aging of the human photoreceptor mosaic: evidence for selective vulnerability of rods in central retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 3278-3296.
- Cusick C.G., Scriptor, J.L., Darensbourg, J.G., Weber, J.T., 1993. Chemoarchitectonic subdivisions of the visual pulvinar in monkeys and their connectional relations with the middle temporal and rostral dorsolateral visual areas, MT and DLr. *J Comp Neurol* 336, 1-30. doi:10.1002/cne.903360102.
- Duan, H., Wearne, S.L., Rocher, A.B., Macedo, A., Morrison, J.H., Hof, P.R., 2003. Age related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cereb Cortex* 13, 950-961. doi:10.1093/cercor/13.9.950.
- Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A., Grestl, B., 1971. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28, 351-354. doi:10.1016/0006-8993(71)90668-8.
- Engelberth, R.C.G.J., Pontes, A.L.B., Nascimento, R.B.S., Lima, R.R., Lima, R.R.M., Toledo, C.A.B., Costa, M.S.M.O., Britto, L.R., Cavalcante, J.S., 2008. Discrete retinal input to the parabrachial complex of a new-world primate, the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neurosci Lett* 443, 99-103. doi:10.1016/j.neulet.2008.07.065.
- Engelberth, R.C.G.J., Pontes, A.L.B., Fiuza, F.P., Silva, K.D.A., Azevedo, C.V.M., Resende, N. S., Azevedo, C.V.M., Costa, M.S.M.O., Cavalcante, J.C., Nascimento Jr, E.S., Gavioli, E.C., Cavalcante, J.S., 2013. Changes in the suprachiasmatic nucleus during aging: implications for biological rhythms. *Psychol Neurosci* 6(3):287-297.
- Engelberth, R.C.G.J., Silva, K.D.A., Azevedo, C.V.M., Gavioli, E.C., Santos, J.R., Soares, J. G., Nascimento Jr, E.S., Cavalcante, J.C., Costa, M.S.M.O., Cavalcante, J.S., 2014. Morphological changes in the suprachiasmatic nucleus of aging female marmosets (*Callithrix jacchus*). *BioMed Res Int* 2014, 243825. <https://doi.org/10.1155/2014/243825>
- Erskine, D., Thomas, A.J., Attems, J., Taylor, J-P., McKeith, I.G., Morris C.M., Khundakar, A.A., 2017. Specific patterns of neuronal loss in the pulvinar nucleus in dementia with lewy bodies. *Movement Disord* 32(3), 414-422. doi:10.1002/mds.26887.

- Falke, E., Nissanov, J., Mitchell, T.W., Bennett, D.A., Trojanowski, J.Q., Arnold, S.E., 2003. Subicular dendritic arborisation in Alzheimer's disease correlates with neurofibrillary tangle density. *Am J Pathol* 163, 1615-1621. doi:10.1016/S0002-9440(10)63518-3.
- Fields RD, Stevens-Graham B., 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science* 298:556-562.
- Field G.D., Chichilnisky, E.J., 2007. Information processing in the primate retina: circuitry and coding. *Annu Rev Neurosci* 30, 1-30. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094252.
- Fiuza, F.P., Silva, K.D.A., Pessoa, R.A., Pontes, A.L.B., Cavalcanti, R.L.P., Pires, R.S., Soares, J.G., Nascimento Jr, E.S., Costa, M.S.M.O., Engelberth, R.C.G.J., Cavalcante, J.S. 2016. Age related changes in neurochemical components and retinal projections of rat intergeniculate leaflet. *Age* 38(1), 4. doi:10.1007/s11357-015-9867-9.
- Gao, H. Hollyfield, J.G., 1992. Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophth Vis Sci* 33, 1-17.
- Geng, Y., Lin, H-T., Chen, W., Liu, Z-C., Xiang, W., Chen, W-R., 2015. Age-related reduction in calbindin-D28K expression in the Sprague-Dawley rat lens. *Mol Med Rep* 11, 422-426. doi:10.3892/mmr.2014.2672.
- 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. doi:10.1016/j.brainresbull.2004.02.005.
- Gray D., Gutierrez C., Cusick, C.G., 1999. Neurochemical organization of inferior pulvinar complex in squirrel monkeys and macaques revealed by acetylcholinesterase histochemistry, calbindin and Cat-301 immunostaining, and Wisteria floribunda agglutinin binding. *J Comp Neurol* 409, 452-468. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990705\)409:3<452::AID-CNE9>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990705)409:3<452::AID-CNE9>3.0.CO;2-I).
- Grieve, K.L., Acuña, C., Cudeiro, J., 2000. The primate pulvinar nuclei: vision and action. *Trends Neurosci* 23, 35-39.
- Gutierrez, C., Yaun, A., Cusick, C.G., 1995. Neurochemical subdivisions of the inferior pulvinar in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 363, 545-562. doi:10.1002/cne.903630404.

- Hansson, E., Rönnbäck, L., 2003. Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB J* 17, 341-348. doi:10.1096/fj.02-0429rev.
- Hassler, R. 1966. Comparative anatomy in day and night active primates. 1966. In: Hassler R, Stephan H, editors. *Evolution of the Forebrain*. Stuttgart: Thieme. 419-434.
- Hirai, T., Jones E.G., 1989. A new parcellation of the human thalamus on the basis of histochemical staining. *Brain Res Rev* 14, 1-34.
- Imura, K., Rockland, K., 2006. Long-range interneurons within the medial pulvinar nucleus of macaque monkeys. *J Comp Neurol* 498, 649-666. doi:10.1002/cne.21085.
- Iqbal, K., Grundek-Iqbal, I., 2005. Metabolic/signal transduction hypothesis of Alzheimer's disease and other tauopathies. *Acta Neuropathol* 109, 25-31. doi:10.1007/s00401-004-0951-y.
- Itaya, K.S., Van Hoesen, G.W., 1983. Retinal projections to the inferior and medial pulvinar nuclei in the Old-World monkey. *Brain Res* 269, 223-230. doi:10.1016/0006-8993(83)90131-2.
- Jones, E.G., 1998. Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. *Neuroscience* 85, 331-345. doi:10.1016/s0306-4522(97)00581-2.
- Jones, E.G., 2001. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci.* 24, 595-601.
- Jones, E.G., 2007. *The Thalamus. VII*. Cambridge University Press. New York. 1679.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J., 2014. *Princípios de Neurociências*. 5ed. Porto Alegre: AMGH.
- Kiorpes, L., Movshon, J.A., 2004. Development of sensitivity to visual motion in macaque monkeys. *Visual Neurosci* 21, 851–859. doi:10.1017/S0952523804216054.
- Kiorpes, L., Price, T., Hall-Haro, C., Movshon, J.A., 2012. Development of sensitivity to global form and motion in macaque monkeys (*Macaca nemestrina*). *Vision Res* 63, 34–42. doi:10.1016/j.visres.2012.04.018.

Kordower, J.H., Chu, Y., Stebbins, G.T., DeKosky, S.T., Cochran, E.J., Bennett, D., Mufson, E.J., 2001. Loss e atrophy of layer II entorhinal cortex neurons in elderly people with mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 49, 202-213.

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. doi:10.1016/j.brainres.2007.01.027.

Kwan W.C., Mundinano, I-C., Souza, M.J., Lee, S.C.S., Martin, P.R., Grünert, U., Bourne, J. A., 2019. Unravelling the subcortical and retinal circuitry of the primate inferior pulvinar. *J of Comp Neurol*, 527(3):558-576. doi:10.1002/cne.24387.

Lavialle, M., Bergue, A., Papillon, C., Vilaplana, J., 2001. Modifications of retinal afferent activity induce changes in astroglial plasticity in the hamster circadian clock. *Glia* 34, 88-100.

Lazarides, E., 1980. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283, 249-257. doi:10.1038/283249a0.

Lent, R. 2005. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: Atheneu, pp. 197-200.

Leopold, D.A., 2012. Primary visual cortex: awareness and blindsight. *Annu Rev Neurosci* 35, 91–109. doi:10.1146/annurev-neuro-062111-150356.

Levitt, P., Rakic, P. 1980. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* 193, 815-840. doi:10.1002/cne.901930316.

Lima, R.R.M.L., Pinato, L., Nascimento, R.B.S., Engelberth, R.C.G.J., Nascimento Jr, E.S., Cavalcante, J. C., Britto, L.G., Costa, M.S.M.O., Cavalcante, J.S., 2012. Retinal projections and neurochemical characterization of the pregeniculate nucleus of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Chem Neuroanat*, 44, 34-44. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2012.04.001>.

Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J., Schilling, K., 2005. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res* 79, 295-302. doi:10.1002/jnr.20354.

- Liu, F., Schafer, D.P., McCullough, L.D., 2009. TTC, Fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Meth* 179, 1-8. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.12.028.
- Lupi, D., Semo, M., Foster, R.G., 2012. Impact of age and retinal degeneration on the light input to circadian brain structures. *Neurobiol Aging* 33, 383-392. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.006.
- Mattison, J.A., Vaughan, K.L., 2017. An overview of nonhuman primates in aging research. *Exp Gerontol* 94, 41-45. doi:10.1016/j.exger.2016.12.005.
- McDermott, K.W.G., Lantos, P.L., 1989. The distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin in postnatal marmoset (*Callithrix jacchus*) brain. *Dev Brain Res* 45, 169-177. doi:10.1016/0165-3806(89)90036-9.
- McPhail, L.T., McBride, C.B., McGraw, J., Steeves, J.D., Tetzlaff, W., 2004. Axotomy abolishes NeuN expression in facial but not rubrospinal neurons. *Exp Neurol* 185, 182-190. doi:10.1016/j.expneurol.2003.10.001.
- Middeldorp, J., Hol, E.M., 2011. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93, 421-443. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.
- Mikkelsen, J.D., 1992. Visualization of efferent retinal projections by immunohistochemical identification of cholera toxin subunit B. *Brain Res Bull* 28, 619-623. doi:10.1016/0361-9230(92)90112-b.
- Mitchell, J.F., Leopold, D.A. 2015. The marmoset monkey as a model for visual neuroscience. *Neurosci Res* 93, 20–46. doi:10.1016/j.neures.2015.01.008.
- Møller A.R., 2003. *Sensory system: anatomy and physiology*. Academic Press: Amsterdam.
- Morais, P.L.G., Santana, M.A.D., Cavalcante, J.C., Costa, M.S.M.O., Cavalcante, J.S., Nascimento Jr., E.S., 2014. Retinal projections into the Zona Incerta of the rock cavy (*Kerodon rupestris*): a CTb study. *Neurosci Res* 89, 75-80.
- Morin, L.P., Johnson, R.F., Moore, R.Y., 1989. Two brain nuclei controlling circadian rhythms are identified by GFAP immunoreactivity in hamsters and rats. *Neurosci Lett* 99, 55-60. doi:10.1016/0304-3940(89)90264-4.

- Mullen, R.J., Buck, C.R., Smith, A.M., 1992. NeuN, a neuronal specific protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211.
- Munkle, M.C., Waldvogel, H.J., Faull, R.L., 2000. The distribution of calbindin, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the human thalamus. *J Chem Neuroanat* 19(3), 155–173.
- Nakagawa, S., Tanaka, S., 1984. Retinal projections to the pulvinar nucleus of the macaque monkey: a re-investigation using autoradiography. *Exp Brain Res* 57, 151–157. doi:10.1007/bf00231141.
- Nascimento, R.B.S., Borda, J.S., Engelberth, R.C.G.J., Medeiros, R.O., Pinato, L., Pontes, A.L.B., Nascimento Jr, E.S., Nogueira, M.I., Cruz-Rizzolo, R.J., Costa, M.S.M.O., Cavalcante, J.S., 2010. The presence of neuronal-specific nuclear protein (NeuN) in the circadian timing system of the capuchin monkey (*Cebus apella*). *Sleep Science* 3, 36-39.
- Nascimento Jr, E.S., Souza, A.P.M., Duarte, R.B., Magalhães, M.A.F., Silva, S.F., Cavalcante, J.C., Cavalcante, J.S., Costa, M.S.M.O., 2010. The suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet in the rock cavy (*Kerodon rupestris*): Retinal projections and immunohistochemical characterization. *Brain Res*, 1320, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.01.034>.
- Duque Neto, S. P., 2019. Estudo neuroanatômico da zona subparaventricular (zspv) do sagui (callithrix jacchus): considerações sobre sua citoarquitetura, neuroquímica e projeções retinianas, bem como sua relação com o sistema de temporização circadiana expandido (Tese de Doutorado). Acesso em: https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/27076/1/Estudoneuroanatômicozona_DuqueNeto_2019.pdf
- Nowak, L., Ascher, P., Berwald-Netter, Y., 1987. Ionic channels in mouse astrocytes in culture. *J Neurosci* 7, 101-109.
- O'Brien, B.J., Abel, P.L., Olavarria, J.F., 2001. The retinal input to calbindin–D28k defined subdivisions in macaque inferior pulvinar. *Neurosci Lett* 312, 145–148. doi:10.1016/s0304-3940(01)02220-0.
- Olszewski, J., 1952. The thalamus of the *Macaca mulatta*: An atlas for use with the stereotaxic instrument. Karger, Basel.

- Pace-Schott, E.F., Spencer, R.M.C., 2011. Age-related changes in the cognitive function of sleep. *Prog in Brain Res* 191, 75-89. doi:10.1016/B978-0-444-53752-2.00012-6
- Paxinos, G., Watson, C., Petrides, M., Rosa, M. G. P., Tokuno, H., 2012. *The Marmoset Brain in Stereotaxic Coordinates*. 1st ed. Elsevier.
- Petersen, S.E., Robinson, D.L., Morris, J.D., 1987. Contributions of the pulvinar to visual spatial attention. *Neuropsychology* 25, 97-105. [https://doi.org/10.1016/0028-3932\(87\)90046-7](https://doi.org/10.1016/0028-3932(87)90046-7).
- Petrof, I., Sherman, S.M., 2013. Functional significance of synaptic terminal size in glutamatergic sensory pathways in thalamus and cortex. *J Physiol* 591, 31253131. doi:10.1113/jphysiol.2012.247619.
- Preusser, M., Laggner, U., Haberler, C., Heinzl, H., Budka, H., Hainfellner, J.A., 2006. Comparative analysis of NeuN immunoreactivity in primary brain tumours: conclusions for rational use in diagnostic histopathology. *Histopathology* 48, 438-444. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02359.x.
- Prosser, R.A., Edgar, D.M., Heller, H.C., Miller, J.D., 1994. A possible glial role in the mammalian circadian clock. *Brain Res* 643, 296-301. doi:10.1016/0006-8993(94)90036-1.
- Purushothaman, G., Marion, R., Li, K., Casagrande V.A., 2012. Gating and control of primary visual cortex by pulvinar. *Nature Neurosci* 15(6), 905-912. doi: 10.1038/nn.3106.
- Rakic, P., Sidman, R.L., 1969. Telencephalic origin of pulvinar neurons in the fetal human brain. *Zeitschrift fur Anatomie und Entwicklungsgesch* 129:53-82.
- Riesche, L., Tardif, S.D., Ross, C.N., deMartelly, V.A., Ziegler, T., Rutherford, J.N., 2018. The common marmoset monkey: avenues for exploring the prenatal, placental, and postnatal mechanisms in developmental programming of pediatric obesity. *Am J Physiol-Reg I*, 684-692. doi:10.1152/ajpregu.00164.2017.
- Rockland, K., 1996. Two types of corticopulvinar terminations: round (type 2) and elongate (type 1). *J Comp Neurol* 368, 57-87. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960422)368:1<57::AID-CNE5>3.0.CO;2-J.

- Rockland, K., 1998. Convergence and branching patterns of round, type 2 corticopulvinar axons. *J Comp Neurol* 390, 515-536. doi:10.1002/(sici)1096-9861(19980126)390:4<515::aid-cne5>3.0.co;2-3.
- Santos, J.W.Q., Araujo, J.F., Cunha, M.J.B., Costa, S.O.E., Barbosa, A.L.C., Mesquita, J.B., Costa, M.S.M.O., 2005. Circadian variation in GFAP immunoreactivity in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biol Rhythm Res* 36, 141-150. doi:10.1080/09291010400028906.
- Sarnat, H.B., Nochlin, D., Born, D.E., 1998. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. *Brain Dev-JPN* 20, 88-94. doi:10.1016/s0387-7604(97)00111-3.
- Schimizu, T., Cox, K., Karten, H., Britto, L.R.G., 1994. Cholera toxin mapping of retinal projections in pigeons (*Columba livia*), with emphasis on retinohypothalamic connections. *Visual Neurosci* 11, 441-446.
- Sherman, S.M., Guillery, R.W., 2000. *Exploring the thalamus*. New York:Academic Press.
- Sherman, S.M., 2007. The thalamus is more than just a relay. *Current Opinon in Neurobiology* 17, 417-422. doi:10.1016/j.conb.2007.07.003.
- Sherman, S.M., 2012. Thalamocortical interactions. *Curr Opin Neurobiol* 22, 575-579. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.03.005>.
- Shipp, S., 2003. The functional logic of cortico-pulvinar connections. *Philos T Roy Soc B* 358, 1605-1624. doi:10.1098/rstb.2002.1213.
- Soares, G.M.J., Gattass, R., Souza, A.P.B., Rosa, M.G.P., Fiorani Jr, M., Brandão, B.L. 2001. Connectional and neurochemical subdivisions of the pulvinar in *Cebus* monkeys. *Visual Neurosci* 18, 25-41.
- Song, H., Stevens, C.F., Gage, F.H., 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39-44. doi:10.1038/417039a.
- Soylemezoglu, F., Onder, S., Tezel, G.G., Beker, M., 2003. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a new tool in the diagnosis of central neurocytoma. *Pathol Res Pract* 199, 463-468. doi:10.1078/0344-0338-00446.

Stepniewska I., 2003. The Pulvinar Complex. En: Kaas JH, Collins CE, editores. The Primate Visual System. Front Neurosci-Switz. Ilustrada. ed. CRC Press. doi:10.1201/9780203507599.ch3.

Stepniewska I., 2004. The Pulvinar Complex. In: Kaas JH, Collins CE, editors. The primate visual system. Florida: CRC Press LLC.

Tamada, Y., Tanaka, M., Munekawa, K., Hayashi, S., Okamura, H., Kubo, T., Hisa, Y., Ibata, Y. 1998. Neuron-Glia interaction in the suprachiasmatic nucleus: a double labeling light and electron microscopic immunocytochemical study in the rat. Brain Res Bull 45, 281-287. doi:10.1016/s0361-9230(97)00403-6.

Tapscott, S.J., Bennett, G.S., Toyama, Y., Kleinbart, F., Holtzer, H., 1981. Intermediate filament proteins in the developing chick spinal cord. Dev Biol 86, 40-54. doi:10.1016/0012-1606(81)90313-4.

Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., Barres, B.A., 2001. Control of synapse number by glia. Science 291, 657-661. doi:10.1126/science.291.5504.657.

Unal-Cevik, I., Kilinc, M., Gursoy-Ozdemir, Y., Gurer, G., Dalkara, T., 2004. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. Brain Res 1015, 169-74. doi:10.1016/j.brainres.2004.04.032.

Van den Pol, A.N., 1991. Glutamate and aspartate immunoreactivity in hypothalamic presynaptic axons. J Neurosci 11, 2087-2101.

Veyres, N., Hamadjida, A., Huot, P., 2018. Predictive Value of Parkinsonian Primates in Pharmacologic Studies: A Comparison between the Macaque, Marmoset, and Squirrel Monkey. J Pharmacol Exp Ther 365, 379-397. doi:10.1124/jpet.117.247171.

Waldvogel, H.J., Faull, R.L., Williams, M.N., Dragunow, M., 1991. Differential sensitivity of calbindin and parvalbumin immunoreactive cells in the striatum to excitotoxins. Brain Res 546, 329-335. doi:10.1016/0006-8993(91)91497-o.

Warner, C.E., Goldshmit, Y., Bourne, J.A., 2010. Retinal afferents synapse with relay cells targeting the middle temporal area in the pulvinar and lateral geniculate nuclei. Front Neuroanat 4(8):1-16. doi:10.3389/neuro.05.008.2010.

Warner, C.E., Kwan, W.C., Bourne, J.A., 2012. The early maturation of visual cortical area MT is dependent on input from the retinorecipient medial portion of the inferior pulvinar. *The J Neurosci* 32, 17073-1708. doi:10.1523/JNEUROSCI.3269-12.2012.

Warner, C.E., Kwan, W.C., Wright, D., Johnston, L.A., Egan, G.F., Bourne, J.A., 2015. Preservation of vision by the pulvinar following early-life primary visual cortex lesions. *Curr Biol* 25, 424-434. doi:10.1016/j.cub.2014.12.028.

Wei, H., Bonjean, M., Petry, H.M., Sejnowski, T.J., Bickford, M.E., 2011. Thalamic Burst Firing Propensity: a Comparison of the Dorsal Lateral Geniculate and Pulvinar Nuclei in the Tree Shrew. *J Neurosci* 31(47), 17287-17299. doi:10.1523/JNEUROSCI.6431-10.2011.

Weyer, A., Schilling, K., 2003. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res* 73, 400-409. doi:10.1002/jnr.10655.

Wolf, H.K., Buslei, R., Kastner, R.S., Kastner, P.K.S., Pietsch, T., Wiestler, O.D., Bluhmke, I., 1996. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* 44, 1167-1171. doi:10.1177/44.10.8813082.

Zou, J., Wang, Y.X., Dou, F.F., Lü, H.Z., Ma, Z.W., Lu, P., Xu, X.M., 2010. Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochem Int* 56, 577-584. doi:10.1016/j.neuint.2009.12.021.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA
Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
Fone: (84) 9229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br



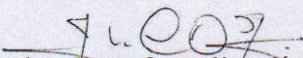
CERTIFICADO

Natal (RN), 09 de maio de 2017.

Certificamos que a proposta intitulada “**Aferência retiniana, caracterização citoarquitônica e neuroquímica do complexo pulvinar do tálamo em sagui**”, **PARECER nº 009.013/2017**, sob a responsabilidade de **Jeferson de Souza Cavalcante**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN.

Vigência do Projeto	DEZEMBRO 2019
Espécie/Linhagem	Saguis / Callitrichidae
Número de Animais	2
Idade/Peso	4 anos / 298g
Sexo	Machos
Origem	Núcleo de Primatologia da UFRN
Manutenção	Núcleo de Primatologia da UFRN

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13, do Regimento Interno desta CEUA, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa for concluída.


José de Castro Souza Neto Júnior
Coordenador da CEUA-UFRN



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PROTOCOLO N.º 026/2010

Professor/Pesquisador: *JEFERSON DE SOUZA CAVALCANTE*

Natal (RN), 13 de setembro de 2010.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que o projeto "EFEITOS DA SENESCÊNCIA NO SISTEMA DE TEMPORIZAÇÃO CIRCADIANA DO SAGUI (*Callithrix jacchus*): PLASTICIDADE MORFOLÓGICA, NEUROQUÍMICA E FUNCIONAL", protocolo nº 026/2010, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório Final: **Agosto de 2013** (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,

Elaine C. Gavioli
Presidente da CEUA