

Universidade Federal do Rio de Janeiro Centro de Ciências da Saúde - ICB Departamento de Anatomia Programa de Ciências Morfológicas

Mauren Lopes de Carvalho

MATURAÇÃO PÓS-NATAL DAS CONEXÕES TÁLAMO-CORTICAIS VISUAIS NO RATO

Dissertação de Mestrado

Rio de Janeiro 2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

O trabalho apresentado aqui, cujo título é MATURAÇÃO PÓS-NATAL DAS CONEXÕES TÁLAMO-CORTICAIS VISUAIS NO RATO, foi realizado no Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas, sob a orientação dos professores Dr. Jean-Christophe Houzel e Dr. Roberto Lent e com a colaboração do pesquisador Dr. Danilo Arruda Furtado. Esta dissertação foi submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) visando a obtenção do grau de mestre em Ciências Morfológicas. Durante o primeiro ano de realização deste trabalho, a autora Mauren Lopes de Carvalho recebeu bolsa de mestrado pelo CNPq e no segundo ano, bolsa prêmio nota 10 pela FAPERJ. Neste período, o Laboratório de Neuroplasticidade, onde o trabalho foi realizado, recebeu financiamento do CNPq e do PRONEX. Esta dissertação apresenta-se em volume único, enquadra-se nas áreas da neurociência e neuroanatomia e foi entregue no ano de 2007.

CARVALHO, MAUREN LOPES

Maturação pós-natal das conexões tálamo-corticais visuais no rato

Rio de Janeiro: UFRJ / ICB/ PCM, 2007

xiv, 109p

Jean-Christophe Houzel

Roberto Lent

Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, PCM.

1. Desenvolvimento do sistema nervoso central 2. Projeções tálamo-

corticais 3. Exuberância e regressão 4. Carbocianinas 5. Dissertação

(Mestrado - UFRJ/PCM)

MATURAÇÃO PÓS-NATAL DAS CONEXÕES TÁLAMO-CORTICAIS VISUAIS NO RATO

Autora: Mauren Lopes de Carvalho

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Morfológicas.

Aprovada por:

Prof. Dr. Daniela Uziel Rozental

Prof. Dr. Silvana Allodi

Prof. Dr. João Guedes da Franca

Prof. Dr. Roberto Lent

Prof. Dr. Jean-Christophe Houzel

Prof. Dr. João Ricardo Lacerda Menezes (revisor)

Rio de Janeiro, 12 de Fevereiro de 2007

Dedico este trabalho a duas mulheres incríveis: **Mamãe** e vovó **Maria Amélia**. E também a dois homens fantásticos: **Fabinho** e **Jean-Christophe**. Nem o universo se compara à bela amizade. De amor de amigos, na simplicidade Construí o abrigo da sinceridade Com os seixos da humildade O alicerce na cumplicidade No chão da claridade Pedras da vontade Luz e bondade Com caridade Sem ver idade Na feliz cidade Da flor da eternidade Onde habita a felicidade De sempre contar com tua amizade.

Alexandre Costa Silva

Minha Família, obrigada de coração! Vocês todos fazem parte do que sou. Agradeço especialmente ao meu pai **Ricardo**, por manter o meu computador saudável e dinâmico enquanto eu redigia, à minha avó **Maria Amélia** e à **Walda**, que me alimentaram com tanto zelo por esses anos de laboratório e à minha irmã **Fernanda** que colaborou com uma sincera torcida para o meu sucesso.

Fabinho, fonte de amor e alegria, obrigada por me lembrar que a vida não é só trabalho! Te amo!

Família Monteiro Cavalieri Barbosa...Plácido, Esther, Maria de Lourdes e Adriane, obrigada pelo apoio infinito!

Professor Jean-Christophe Houzel. Obrigada por me ensinar tudo que eu achei que poderia aprender no laboratório e muito mais. Obrigada pela motivação e pela compreensão nas horas certas. Dedico-lhe esta dissertação, pois você me ofereceu algo que eu tanto queria: amplo conhecimento! Valeu mesmo Jean!!!

Professor Roberto Lent. Minha sincera admiração por sua extrema competência como chefe de laboratório, pesquisador e professor. Mais do que apenas isso, obrigada por suas qualidades pessoais, bom humor, paciência, inteligência e cultura extraordinária. Tudo isso torna o lab. NP um ambiente onde se tem vontade de estar, de aprender e de trabalhar. Obrigada pelo carinho e respeito. Finalmente obrigada pelo bom senso e pelas intervenções pragmáticas no desenvolvimento deste trabalho.

Professora Daniela Uziel Rozental. Obrigada por aquele grande favor que você e o Renato fizeram por mim e que foi fundamental para que eu pudesse desenvolver este manuscrito em casa, no laboratório, na praia ou na fila do banco. Obrigada **Renato**! Dani, fico feliz e grata por ter convivido durante esses anos com alguém como você, competente, inteligente, divertida e ainda com um coração enorme. Obrigada também pelas parcerias (escola Parque, monitorias, grupos de discussão) e pelas informações "developmentais".

Professores Cecília Hedin e **João Menezes e Ana Martinez,** obrigada pela proveitosa e indispensável colaboração intelectual.

Professor João Menezes, obrigada pela eficiente e meticulosa revisão da dissertação.

Professores Antônio Pereira e Leny Cavalcante, obrigada pelos difíceis artigos J.Comp.Neurol.

Pesquisadores afins. Obrigada a todos que contribuíram com uma das peças desse quebracabeça.

Amigas queridas do lab. NP. Fabiana, Patrícia, Marissol, Sabrina, Letícia, Carol e Michele. Essas mulheres são demais, vão conquistar o mundo! Lindas, inteligentes, competentes. Amo vocês! Todas tem um dedinho (ou uma mão inteira como a Fabi e a Sol) neste trabalho. Fabi, valeu demais a nossa colaboração, além de aprender sobre todos os assuntos (essa menina é um poço de cultura!) me diverti muito! Sol, as músicas da concentração foram fundamentais. Em especial, obrigada à Sabrina, Marissol e Michele pelo apoio emocional via MSN. E a todas agradeço o carinho que sempre me devotam.

Demais colegas do lab NP, os de hoje, de ontem e de sempre: **Adiel, Elizabeth, Antônia, Alexandra, Severina, Gabi, Bia, Lena, Ludmila, Danilo, Fred, Noboro, Carlomagno, Jean-Pierre.** Obrigada pelo carinho, a relação amiga, o aprendizado e os milhares de galhos quebrados! Agradecimento especial à Ludmila pela paciência de repintar milhares de bolinhas pretas e vermelhas.

Colegas do lab. LNC, Carlinha, Dudu, Anderson, José Airton, Liliane, Andressa, e os professores (as) Cecília Hedin, João Menezes, e Maíra Fróes. Obrigada pela amizade, pelas trocas, colaborações intelectuais, galhos quebrados e companhia alegre nos almoços, festinhas e afins.

As colegas da faculdade que sempre me apoiaram, de perto ou de longe: Simone Alves, Michelle Porto, Ana Ide e Ana Cecília. Obrigada meninas!

Colegas do Studio, obrigada pela compreensão e paciência em 2006. Obrigada especial para Lucinha, alma iluminada cuja simples presença já traz luz e alegria.

Luciana e Simone, as fisioterapeutas que cuidaram do meu corpinho em 2006, permitindo que eu chegasse até o fim com saúde e disposição.

Andréia Mello, minha irmã por opção, mulher maravilha. Obrigada pela força!

Família Nolasco, obrigada por me alugarem o ambiente mais inspirador que eu poderia ter para redigir, não apenas pela estrutura física e a vista maravilhosa, mas também pela relação respeitosa e amiga.

Rafael dos Reis, obrigada pelo incentivo na reta final!

Aos Astecas, obrigada por inventarem o chocolate, pois sem ele nada disso seria possível.

Animais experimentais, com respeito, obrigada.

Ao Dr. Danilo Arruda Furtado um agradecimento especial. Danilinho, muitíssimo obrigada é pouco para lhe dizer o quanto eu sou grata pela sua colaboração, por isso criei esta seção de agradecimento especial para você! Obrigada por suas idéias, seus ensinamentos e ajuda diária nos experimentos (especialmente naqueles dias que eu tomava *ponstan* e a mão tremia), sua orientação e discussão a respeito da literatura e seu olhar tão cuidadoso na leitura crítica deste material. Enfim, obrigada por se entregar de corpo, mente e alma a este projeto. Além disso, obrigada pela sua amizade criatura querida. Valeu mesmo!

"Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez".

(Jean Cocteau, autor francês)

O desenvolvimento pós-natal das conexões tálamo-corticais visuais no rato foi estudado com o emprego de uma nova abordagem metodológica que utiliza dois tipos de marcação retrógrada do rastreador DiI em um mesmo cérebro. Sabe-se que o desenvolvimento dos circuitos corticais obedece a um fenômeno de exuberância inicial seguida de uma regressão seletiva de seus constituintes, mas este fenômeno não foi descrito para as conexões tálamocorticais. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram (1) descrever e apurar a eficácia de uma nova metodologia para o estudo dos fenômenos regressivos durante o desenvolvimento do sistema nervoso e (2) investigar se tais fenômenos também ocorrem na vias tálamo-cortical visual do rato. Para tanto, inserimos, in vivo, cristais de DiI no córtex visual primário (V1) de ratos no primeiro dia de vida (P1). Durante a sobrevida, o corante é internalizado e transportado para o corpo celular dentro de vesículas que se tornam assim fluorescentes (conferindo uma marcação granular). Após intervalos de sobrevida de 2-3, 7-8, ou ~14 dias, os animais foram sacrificados e perfundidos com fixador, e seus cérebros foram processados e analisados imediatamente (grupo 1); ou armazenados em fixador por vários meses para permitir a difusão post mortem do corante pela membrana celular (conferindo uma marcação membranar, grupo 2). Os resultados foram documentados através de micrografias e desenhos obtidos com câmara clara. Nos grupos experimentais 1 e 2 encontramos células fluorescentes nas regiões dorsolateral e medial do tálamo. Nos cérebros do grupo 1 todas as células apresentavam marcação granular, mas nos cérebros do grupo 2 identificamos células com marcação membranar, indicando que, na idade da eutanásia, essas se conectavam com o local de inserção do cristal. No grupo 2, também foram vistas células com marcação granular, sugerindo que estas tenham retraído suas conexões antes do dia da eutanásia. Entre P2 e P14 ocorre uma diminuição gradativa e acentuada na proporção de células com marcação membranar no tálamo medial. No tálamo dorsolateral também são vistas células com marcação granular, porém, em menor proporção. Na idade da abertura dos olhos (~P14) os núcleos geniculado lateral dorsal (NGLd) e lateral posterior (LP) são os únicos que mantém uma projeção intensa para V1. No entanto, foram identificadas poucas células nos núcleos látero-dorsal (LD), central lateral (CL) e geniculado medial (GM) e ainda pouquíssimas células nos núcleos ventro-lateral (VL) e grupo nuclear posterior (Po) projetando para V1 nesta idade. Também demostramos que esta metodologia é eficaz para detectar a conhecida regressão das conexões calosas. Concluímos que a metodologia proposta permite o estudo da exuberância e regressão das conexões corticais, e que as aferências tálamo-corticais passam por um processo de exuberância inicial, envolvendo diversos núcleos talâmicos, inclusive alguns que não projetam mais para o córtex visual em adultos.

The postnatal development of visual thalamocortical connections was studied in rats using a novel methodology based on the ability of the lipophilic neuronal tracer DiI to produce two distincts forms of retrograde labelling in the same brain. It is well known that cortical circuits develop through a phase of initial exuberance followed by the selective regression of inapropriate elements. However, this phenomenon hasn't been described for thalamocortical connections. Thus, the objectives of this thesis were: (1) to describe and evaluate the efficiency of a new method for the study of regressive events during the development of the nervous system and (2) to examine whether this phenomenon also occurs along the visual thalamocortical pathway in the rat. Crystals of DiI were inserted into primary visual cortex (V1) of living rats on the first postnatal day (P1). During the survival period, the tracer was internalized and transported to the cellular bodies within vesicles (confering a granular labelling). After survival times of 2-3, 7-8 or 14 days, the animals were perfused and their brains were either immediately processed and analysed (group 1), or stored in fixative solution for several months to allow *post mortem* diffusion of the tracer within the cellular membrane (confering a membranar labelling, group 2). Results were documented by camera lucida drawings and photomicrographs. In both groups 1 and 2, we found labelled cells in dorsolateral and medial thalamic regions. In group 1 brains, all cells displayed a granular labelling, but in group 2 brains, we identified cells with membranar labelling, indicating that at the time of euthanasia, these cells were connected to the site of DiI insertion. In group 2 we also found cells with granular labelling, suggesting that they had retracted their connections with V1 before the time of euthanasia. Between P2 and P14, intense reduction in the proportion of cells with membranar labelling in the medial thalamus occurs gradually. In the dorsolateral thalamus, cells with granular labelling were also seen, but in a low proportion. At the time of eye opening (~P14), only the lateral geniculate (LGN) and the lateral posterior (LP) nuclei maintained a heavy projection to V1. However, a few cells in the laterodorsal (LD), central lateral (CL) and medial geniculate (MG) nuclei, and very few cells in the ventrolateral nucleus (VL) and in the posterior nuclear group (Po) projected to V1 at this age. Finally, we showed that the same approach was efficient to reveal the known regression of callosal connections. We concluded that our new methodological approach allows the study of exuberance and regression of cortical connections, and that thalamocortical afferences undergo an initial phase of profuse outgrowth to several thalamic nuclei, included some that

do not project to the visual cortex in adults.

AD núcleo ântero-dorsal AM núcleo ântero-medial AP eixo ântero-posterior APT núcleo pretectal Anterior AV núcleo ântero-ventral CD núcleo centrodorsal CL núcleo central lateral CM núcleo central medial CMA núcleo central medial anterior CMP núcleo central medial posterior CN crista neural CS colículo superior Dil perclorato de 1´,1-dioctadecil-3,3,3´,3´,tetrametilindo-carbocianina DV eixo dorso-ventral Enn - nésimo dia de vida embrionária Pnn - nésimo dia de vida pósnatal GM núcleo geniculado medial GMv núcleo geniculado medial ventral GMd núcleo geniculado medial dorsal IAM núcleo interanteromedial ILN grupo intralaminar IMD núcleo intermediodorsal LD núcleo látero-dorsal LMI lâmina medular interna LP núcleo lateral posterior LPi núcleo lateral posterior intermediário MD núcleo médio- dorsal NGF fator de crescimento neuronal NGL núcleo geniculado lateral NGLd núcleo geniculado lateral dorsal

NGLv núcleo geniculado lateral ventral NRT núcleo reticular talâmico PC núcleo paracentral PC placa cortical Pf núcleo parafascicular PLi núcleo posterior limitante PN placa neural Po grupo nuclear posterior PoT núcleo posterior triangular PP pré-placa PT núcleo paratenial PV núcleo paraventricular Re núcleo reuniens Rev núcleo reuniens ventral Rh núcleo rombóide S1 córtex somatossensorial primário S2 córtex somatossensorial secundário SNC sistema nervoso central SP subplaca TN tubo neural V1 córtex visual primário V2 córtex visual secundário VL núcleo ventro-lateral VM núcleo ventro-medial VP núcleo ventral posterior VPL núcleo ventral posterior lateral VPM núcleo ventral posterior medial ZI zona intermediária ZM zona marginal ZSV zona subventricular ZV zona ventricular

1 Introdução	15
1.1 Função do tálamo	15
1.2 Anatomia do tálamo e relações tálamo-corticais	19
1.3 Vias visuais	30
1.4 Desenvolvimento das conexões tálamo-corticais visuais no rato	35
1.4.1 Geração das células nervosas	37
1.4.2 Migração das células nervosas	38
1.4.3 Direcionamento axônico e estabelecimento das sinapses	42
1.4.4 Desenvolvimento dos aferentes tálamo-corticais	42
1.4.5 Fenômenos regressivos	43
1.4.6 Processo de mielinização dos neurônios do SNC do rato	47
1.5 As carbocianinas	47
2 Objetivos	54
2.1 Objetivos gerais	54
2.2 Objetivos específicos	54
3 Metodologia	55
3.1 Nova metodologia de marcação do DiI para o estudo do desenvolvimento	55
3.2 Inserção do rastreador	56
3.3 Eutanásia dos animais e processamento dos cérebros	59
3.4 Análise da distribuição das células talâmicas com projeção para o córtex visual	
primário	62
3.5 Experimentos controles	65
4 Resultados	67
4.1 Exuberância e regressão dos aferentes tálamo-corticais	67
4.1.2 Grupo P2/P3	67
4.1.3 Grupo P7/P8	72
4.1.4 Grupo ~P14	76
4.2 Validação do método: experimentos controles	80
4. 2.1 Dil inserido post mortem	80
4.2.2 Dupla marcação: Dil <i>in vivo</i> + DiA <i>post mortem</i>	85
4.2.3 Aplicação ao estudo das projeções calosas transitórias	85
4.2.4 Dil inserido post mortem na substância branca	86
5 Discussão	91
5.1 Considerações metodológicas	91
5.2 Fenômenos expansivos e regressivos no desenvolvimento das projeções tálamo-	
corticais	94
5.2.1 Porque se estabelecem as conexões transitórias?	97
5.2.2 Fatores que afetam os fenômenos regresssivos	99
5.3 Considerações finais e perspectivas	100
5.4 Conclusão	102
6 Referências Bibliográficas	102
v kvivi viivias diviivgi aitvas	103

1 Introdução

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) é extremamente complexo. Falhas nas etapas deste processo são responsáveis por diversas doenças e malformações (revisado por Francis *et al.*, 2006), por isso é importante o conhecimento dos processos que levam à maturação desta estrutura.

Na fase mais tardia do desenvolvimento, ocorre a eliminação de sinapses, de ramos axônicos e dendríticos ou mesmo de neurônios. Ou seja, conexões em excesso são estabelecidas inicialmente e depois muitas delas serão eliminadas através de um processo de refinamento. Esse princípio de construção por mecanismos aditivos seguidos de mecanismos subtrativos é fundamental para o funcionamento do cérebro, pois ele permite que circuitos sejam selecionados e outros eliminados de acordo com a própria atividade elétrica resultante. Este princípio da poli-inervação transitória foi demonstrado em sistemas tão diversos quanto a junção neuro-muscular (Changeux e Danchin, 1976), a via olivo-cerebelar (Crépel *et al.*, 1976), ou nos circuitos corticais responsáveis pela seletividade de orientação no córtex visual primário (Frégnac e Imbert, 1984).

Nesta tese abordamos a questão da existência de projeções transitoriamente exuberantes, e da sua eventual regressão no sistema visual. Investigamos se a maturação das conexões tálamo-corticais visuais passa ou não por uma fase de exuberância transitória. Para isso, propomos uma nova forma de utilização do rastreador bidirecional DiI como um novo método de estudo da exuberância das conexões do sistema nervoso. Esta pesquisa, além de contribuir para esclarecimento de como as conexões aferentes ao córtex sensorial se formam durante o desenvolvimento, fornece uma nova estratégia metodológica para o estudo dos fenômenos regressivos.

1.1 Função do tálamo

Com exceção dos estímulos olfativos, toda informação sensorial passa pelo tálamo antes de alcançar o córtex. Inicialmente, pensava-se que a função do tálamo era meramente transmitir ao córtex as informações provenientes da periferia. Mas essa explicação não é satisfatória, uma vez que não parece necessário ter uma estrutura no cérebro apenas para isso. Por que os estímulos provenientes dos órgãos sensoriais não poderiam alcançar o córtex por vias diretas? Qual a necessidade de uma "estação de transmissão"? Essas perguntas não se calaram. Até que nos últimos anos, baseados em diferentes estudos anatômicos e fisiológicos a respeito do tálamo (revisado por Casagrande *et al.*, 2005; Cruikshank *et al.*, 2005; Van Essen, 2005) os pesquisadores começaram a compreender que esta estrutura possui sim funções próprias. Os núcleos talâmicos são classificados como <u>relés de primeira ordem</u>, quando conduzem a informação da periferia para o córtex primário correspondente, como o núcleo geniculado lateral (NGL), ou <u>relés de ordem maior</u>, quando transferem informações entre áreas corticais, como o núcleo lateral posterior (LP).

O NGL é o núcleo talâmico de primeira ordem mais amplamente estudado e tem servido de modelo para o entendimento da função do tálamo. Ele é conhecido como o mais importante relé de transmissão da informação visual que chega da retina e é processada inicialmente no córtex visual primário (V1). Apenas 5 a 10% das aferências ao NGL têm origem na retina (Garey et al., 1991). O restante provém principalmente de aferentes inibitórios locais, fibras glutamatérgicas descendentes da camada 6 de V1 e aferentes colinérgicos ascendentes do tronco encefálico (Sefton e Dreher, 1985; Sherman, 2001a). O NGL possui camadas inervadas alternadamente por células ganglionares dos olhos esquerdo e direito. No gato (que é o modelo mais estudado), a camada A do NGL possui três diferentes tipos celulares: células relés X e Y, com características morfológicas diferentes; e interneurônios. Tanto as células X quanto às células Y possuem a capacidade de responder fisiologicamente aos aferentes excitatórios de dois modos diferentes: tônico ou em salva (para revisão ver Sherman, 2001b; Sherman e Guillery, 2002). Existem evidências de que a resposta fisiológica em salva aja como uma chamada de alerta. Por exemplo, se um animal se encontra desatento para um determinado espaço visual ou em um estado de sonolência e um novo estímulo visual aparece, uma salva talâmica indicará ao córtex que algo mudou. Por outro lado, uma resposta tônica se refere a um estímulo estável (para revisão ver Sherman, 2005). A característica do circuito aferente, a complexidade das células talâmicas e a diversidade de respostas fisiológicas das células talâmicas não deixam dúvidas de que a transmissão da informação visual através do tálamo é um processo ativo e modulado.

No modelo hierárquico do processamento sensorial, a informação proveniente da periferia chegaria ao núcleo talâmico de primeira ordem, o qual repassaria a informação para o córtex sensorial primário que a processaria e repassaria para áreas corticais de ordem maior, até que a informação processada chegasse ao córtex motor e este se encarregasse do comando correspondente quando fosse o caso (Figura 1A). Se fosse assim, qual seria o papel dos <u>núcleos talâmicos de ordem maior</u>? Sabemos que muitos axônios aferentes ao tálamo possuem ramificações para o mesencéfalo e medula espinhal. Isso ocorre tanto com os

axônios que trazem a informações da periferia para os núcleos de primeira ordem (Sherman e Guillery 2001, 2002; Guillery e Sherman, 2002), quanto com os axônios da camada 5 do córtex que alcançam núcleos de ordem maior no tálamo. Por exemplo, sabe-se que algumas células da camada 5 do córtex V1 enviam axônios para o colículo superior com ramificações para núcleos talâmicos de ordem maior na região do pulvinar (Bourassa e Deschênes, 1995; Rockland, 1998; Guillery et al. 2001). Os neurônios desta região talâmica por sua vez projetam para áreas corticais envolvidas com o processamento visual de alto nível. Dessa forma, essa passagem da informação visual de uma região cortical para outra através do tálamo não está apenas relacionada com o processo sensorial, mas com comandos do córtex para o colículo superior, que provavelmente estão relacionadas com instruções sobre a posição da cabeça e o movimento dos olhos. Incorporando esses novos dados sobre a divergência axônica, Guillery e Sherman (2002) criaram um novo modelo que coloca a alça córtico-tálamo-cortical como essencial no processamento cortical da informação sensorial (Figura 1B). Com isso, julga-se atualmente que os núcleos talâmicos de ordem maior podem participar ativamente do processamento perceptual e ao mesmo tempo, monitorar o comando motor.





Figura 1. Hipótese sobre a participação do tálamo no processamento sensóriomotor. De simples estação de retransmissão (A) para uma estrutura com papel ativo no processamento sensorial (B). Figura adaptada de Sherman, 2005.

1.2 Anatomia do tálamo e relações tálamo-corticais

Localizado no diencéfalo, o tálamo é formado por diversos agrupamentos de células que constituem os núcleos talâmicos.

As subdivisões do diencéfalo incluem o epitálamo, o tálamo dorsal, o tálamo ventral, o subtálamo e o hipotálamo (Figura 2). Ao utilizar o termo "tálamo", a maioria dos autores está se referindo ao <u>tálamo dorsal</u>, o qual envia a maior quantidade de eferentes para as estruturas telencefálicas, tanto estriatais quanto corticais.

Como já foi dito, quase todas as informações sensoriais que chegam ao córtex cerebral passam pelo tálamo, especificamente pelo tálamo dorsal, sendo o olfato a única modalidade sensorial que em parte alcança o córtex diretamente. Já o <u>tálamo ventral</u>, formado pelo <u>núcleo</u> <u>reticular talâmico</u> (NRT) e a parte ventral do <u>núcleo geniculado lateral (NGLv)</u>, não envia axônios para o córtex, embora, ao passar do tálamo dorsal para o telencéfalo, os axônios atravessem o tálamo ventral (Figura 2. Para revisão ver Sherman e Guillery, 2001).

Faull e Mehler publicaram em 1985 o capítulo "Thalamus" do livro "The Rat Nervous System", no qual, baseados principalmente nos estudos de Coggeshall (1964), Altman e Bayer (1979b) e Jones (1983), propuseram a reunião dos núcleos do tálamo dorsal em 7 grupos (Tabela 1). Segundo esses autores, a <u>lâmina medular interna</u> divide o tálamo em três compartimentos: anterior, medial e lateral. No primeiro localiza-se o <u>grupo anterior</u> de núcleos talâmicos; no segundo o <u>núcleo médio dorsal</u> (MD) e no compartimento lateral localizam-se os <u>grupos ventral</u>, <u>lateral</u> e <u>posterior</u>. Além desses, Faull e Mehler (1985) descrevem mais dois grupos de núcleos talâmicos: o <u>grupo intralaminar</u> e o <u>grupo da linha média</u>. A união desses núcleos em grupos foi feita através de critérios citoarquitetônicos e histoquímicos.



Figura 2. Principais subdivisões morfofuncionais do diencéfalo e suas relações anatômicas. Esquema de um corte parassagital do encéfalo de camundongo E14, mostrando a posição do tálamo dorsal, tálamo ventral, epitálamo e hipotálamo (DORSAL, VENTRAL, EPI e HIPO) no diencéfalo. Repare que para alcançar o telencéfalo, as fibras provenientes do tálamo dorsal precisam atravessar o tálamo ventral. QO, quiasma óptico; VL, ventrículo lateral. Figura retirada de Sherman e Guillery, 2001.

O grupo anterior reúne os núcleos: <u>ântero-ventral</u> (AV), <u>ântero-dorsal</u> (AD) e <u>ântero-medial</u> (AM, Figura 3A). Estes recebem aferências do hipocampo, córtex cingulado, e complexo mamilar do hipotálamo (Domesick, 1972). Os núcleos AV e AD projetam para o córtex granular retrosplenial (Beckstead, 1976; Domesick, 1972) e para o hipocampo (Wyss *et al.*, 1979). Já o núcleo AM recebe projeções ipsilaterais dos córtices prelímbico e orbital medial e projeções bilaterais dos córtices cingulado anterior e motor secundário (Shibata e Naito, 2005) e projeta para o córtex infrarradiado rostral e caudal, córtices polar frontal, orbital medial, agranular precentral, granular retrosplenial, entorrinal, pressubicular, perirrinal e cingulado anterior (Domesick, 1972; Van Groen *et al.*, 1999). Dessa forma, este grupo constitui um componente subcortical do sistema límbico e desempenha um importante papel no processamento da memória espacial e aprendizado (Aggleton *et al.*, 1996; Byatt, 1996; Warburton *et al.*, 1997).

O <u>núcleo médio dorsal</u> (MD, Figura 3B), único representante do grupo medial, conecta-se com o córtex insular agranular ventral (Gerfen e Clavier, 1979), lábio dorsal do sulco rinal e áreas 32 e 24 de Brodman (Leonard, 1969; Krettek e Price, 1977).

O grupo ventral (Figura 3B) constitui o maior complexo nuclear do tálamo dorsal. Nele estão contidos os núcleos: ventro-medial (VM), ventro-lateral (VL), e o complexo ventral posterior, que se divide em núcleo ventral posterior medial (VPM) e núcleo ventral posterior lateral (VPL). Os núcleos VM e VL recebem aferências da substância negra (Clavier et al., 1976), cerebelo (Faull e Carman, 1978), núcleo habenular lateral, formação reticular e colículo superior (Herkenham, 1979). Quanto às eferências, o núcleo VL projeta para o córtex motor primário (M1) com organização topográfica (Donoghue et al, 1979), enquanto o núcleo VM projeta de forma "difusa" para a camada 1 de quase todo o córtex (Herkenham, 1979). Por outro lado, os núcleos VPM e VPL recebem aferências das vias somatossensoriais da cabeça e pescoço (VPM), do corpo, membros e cauda (VPL). A maior parte do núcleo VPM, recebe aferências das vibrissas de forma absolutamente organizada (Davidson, 1965; Waite, 1973). Tanto VPM quanto VPL estão reciprocamente conectados com os córtices somatossensoriais primário (S1) e secundário (S2). E esta conexão também possui rígida organização topográfica (Wise e Jones, 1978). É interessante notar que, no rato, as regiões corticais S1 e M1 se sobrepõem parcialmente, principalmente na região dos membros posteriores (Donoghue e Wise, 1982) e é exatamente para esta região que convergem projeções dos núcleos VPM e VL, enquanto as regiões corticais, sensorial e motora de representação da face, onde não há sobreposição, são inervadas por projeções separadas, provenientes respectivamente dos núcleos VPM e VL (Donoghue *et al.* 1979).

O <u>grupo lateral</u> (Figura 3C) é formado pelos núcleos <u>lateral posterior</u> (LP) e <u>láterodorsal</u> (LD). O núcleo LP possui duas subdivisões; uma caudo-medial, que recebe aferentes bilaterais provenientes do colículo superior, e outra rostro-lateral, que recebe apenas conexões ipsilaterais dessa mesma origem (Perry, 1980). LP possui conexões recíprocas principalmente com o córtex visual secundário (V2) (Coleman e Clerici, 1980; Olavarria, 1979), mas também com V1 (Bullier *et al.*, 1984) e o córtex temporal (Mason e Groos, 1981). O núcleo LD, pela sua proximidade com o grupo anterior, é freqüentemente tratado como parte deste grupo (Horikawa *et al.*,1988). E de fato ele possui conexões semelhantes, uma vez que se comunica com o córtex retrosplenial e o complexo subicular (Shibata, 1998; 2000; Ishizuka, 2001), regiões corticais envolvidas com o processamento da memória espacial (Cooper *et al.*, 2001 e Liu *et al.*, 2001). LD conecta-se ainda com V1 (Négyessy *et al.*, 2000) e com os córtices cingulado anterior, prelímbico e motor secundário (Spiro *et al.*, 1988; Conde *et al.*, 1995). O córtex motor secundário está implicado com atenção visuo-espacial (Vargo *et al.*, 1988) e funções visuomotoras (Guandalini, 1998).

O <u>grupo posterior</u> (Po, Figura 3C) recebe aferências provenientes da medula e núcleo do nervo trigêmeo e possui conexões aferentes e eferentes com S1 (Shigenaga *et al.*,1979; Cropper e Eisenman,1986). Este participa do processamento da informação tátil e nociceptiva da face (para revisão ver Gauriau e Bernard, 2002).



lateral (VL), ventro-medial (VM), ventral posterior medial (VPM) e ventral posterior lateral (VPL). (C) Grupo lateral em roxo: núcleo lateral posterior (LP) e verde. Ântero-dorsal (AD), ântero-ventral (AV) e ântero-medial (AM). (B) Núcleo médio-dorsal (MD) em amarelo. Grupo ventral em rosa: núcleo ventro-Figura 3. Grupos de núcleos talâmicos segundo Faull e Mehler (1985) vistos em cortes coronais. (A) Grupo anterior de núcleos talâmicos representado em núcleo látero-dorsal (LD). Grupo posterior (Po) em vermelho.

Grupo nuclear	Componentes nucleares	Aferências	Eferências
Anterior	Ântero-ventral (AV)	Hipocampo, córtex	Córtex granular retrosplenial
	l l	cingulado, complexo	
	}	mamilar do hipotálamo	
	Antero-dorsal (AD)		
	Antero-medial (AM)	Córtices prelímbico, orbital	Córtex infrarradiado, polar
		medial, cingulado anterior e	frontal, orbital medial, agranular
		motor secundario	precentral, granular
			retrospieniai, entorrinai,
			pressubicular, perirrinal e
Núcleo módio	Núcleo módio dorsel (MD)	Cártay incular agranular	Córtax insular agranular vantral
dorsal	Nucleo medio-dorsar (ND)	ventral sulco ripal e áreas	sulco rinol e áreas 32 e 24 de
uorsai		32 e 24 de Brodmann	Brodmann
Ventral	Ventromedial (VM)	Substância negra cerebelo	Camada 1 do córtex
(children		núcleo habenular lateral.	
	}	formação reticular e	Córtex M1
	Ventrolateral (VL)	colículo superior	
		*	
	Ventral posterior medial (VPM)	nucelos gracil e cuneiforme	Córtex S1 e S2
	Ventral posterior lateral (VPL)	córtex SI e SII	
Lateral	Látero-dorsal (LD)	Córtex retrosplenial,	Córtex retrosplenial, complexo
		complexo subicular,	subicular, cingulado anterior,
		cingulado anterior,	prelímbico,
		prelimbico,	motor secundário e VI
		motor secundario e VI	
	Lateral posterior (LP)	Colículo superior	Córtay V1 V2 córtay tamporal
		Cortex V1 V2 cortex	conex v 1, v 2, conex temporar
		temporal	
Posterior	Grupo nuclear posterior (Po)	Medula	
1 00001101		Núcleo Trigêmeo	
		Córtex S1	córtex S1
Intralaminar	Central medial (CM)		
	Paracentral (PC)		
	Central lateral (CL)		
De linha média	Paraventricular (PV)		
	Paratenial (PT)		
	Interanteromedial (IAM)		
	Intermediodorsal (IMD)		
	Rombóide (Rh)		
	Reuniens (Re)		

Tabela 1. Distribuição dos núcleos talâmicos em grupos segundo Faull e Mehler (1985) e padrão de conexões em roedores.

Com relação aos grupos <u>intralaminar</u> e <u>de linha média</u>, Van der Werf *et al.* publicaram em 2002 uma importante revisão na qual propõem, baseados no padrão de conexões, uma nova divisão desses núcleos em quatro grupos: <u>dorsal, lateral, ventral</u> e <u>posterior</u>. A proposta é realmente substituir a antiga divisão (Cf. Tabela 1, Faul e Melher, 1985) na qual os núcleos <u>central medial</u> (CM), <u>paracentral</u> (PC) e <u>central lateral</u> (CL) compunham o grupo <u>intralaminar</u>, enquanto o <u>grupo da linha média</u> era representado pelos núcleos <u>paraventricular</u> (PV), paratenial (PT), interanteromedial (IAM), intermediodorsal (IMD), reuniens (Re) e rombóide (Rh).

Por essa nova divisão, o <u>grupo lateral</u> é formado pelos núcleos PC, CL e CM anterior que projetam para o corpo estriado dorsal e o córtex cingulado. Este grupo parece estar envolvido com o acesso flexível e dinâmico a memórias já formadas.

O grupo ventral, por sua vez, se constitui dos núcleos Re, Rh e CM posterior. Eles projetam principalmente para as camadas superficiais e profundas (1 e 6) da maioria das áreas corticais, incluindo regiões não-límbicas como os córtices gustatório, visceral, insular, auditivo e motor. Além disso, eles enviam poucas projeções para o corpo estriado. Van der Werf *et al.* (2002) propõem que as funções deste grupo não são de modular processos sensoriais e motores simples, mas sim de participar do processamento cognitivo, afetivo e polissensorial. Também há indícios de que o núcleo reuniens esteja relacionado com o processamento da memória. Veremos adiante que, segundo nossos resultados, os grupos lateral e ventral estão sujeitos ao fenômeno de regressão de conexões.

O grupo dorsal é formado pelos núcleos PV, PT e IMD. Ao contrário dos outros grupos, este possui projeções diretas para o núcleo acumbente medial e a amígdala. Possui conexões recíprocas com o córtex prefrontal medial. Esta última conexão existe com todos os quatro grupos, mas com o grupo dorsal é ainda mais forte. O grupo dorsal também projeta, como os outros grupos, para os córtices entorrinal e insular agranular. Este grupo está relacionado com funções víscero-límbicas.

Já o <u>grupo posterior</u> é formado pelos núcleos parafascicular (Pf) e centromediano, os quais são observados separadamente em primatas, mas não em roedores. O grupo posterior difere dos outros grupos pela intensidade e preferência das projeções para os núcleos da base e núcleos subtalâmicos. Este grupo está relacionado com a modulação de respostas motoras.

Ao descrever cada núcleo especificamente, esses autores mencionam que o núcleo PC recebe aferentes do colículo superior e do NGL e projeta para o córtex visual, exceto para V1. E o núcleo CL recebe do colículo superior e córtex visual, exceto V1 e V2, e projetando para o córtex ocipital. Apenas estes núcleos parecem estar relacionados diretamente com o sistema visual. Tomados em conjunto, todos esses núcleos intralaminares e de linha média estão relacionados com estados de alerta e vigília.

Grupo nuclear talâmico	Componentes nucleares	Aferências	Eferências
Grupo lateral	Central medial anterior (CMA)	Córtex prefrontal	Corpo estriado dorsal
		medial	Córtex cingulado.
	{		Córtex prefrontal medial
	Paracentral (PC)	Colículo superior	ſ
	Central lateral (CL)	Córtex visual	+ córtex visual
Grupo ventral	Reuniens (Re)	Córtex preforntal	Maioria das áreas corticais
	Rombóide (Rh)	medial	Corpo estriado dorsal e Córtex
	Central medial posterior (CMP)		prefrontal medial.
Grupo dorsal	Paraventricular (PV)	Córtex preforntal	Córtex preforntal medial
	Paratenial (PT)	medial	Córtex agranular insular e
	Intermediodorsal (IMD)		entorrinal
			Núcleo Acumbente Amígdala
Grupo posterior	Parafascicular (PF)	Córtex prefrontal	Córtex prefrontal medial
	Centromediano	medial	Núcleos da Base
			Núcleos Subtalâmicos

Tabela 2. Redistribuição dos núcleos intralaminares e de linha média, segundo Van der Werf *et al.*, 2002.

Ocorre que esta tentativa de reunir todos núcleos talâmicos em grupos até hoje é uma tarefa difícil e que de alguma forma sempre se mostra falha. As seguintes inconsistências servem como exemplos. Na divisão de Faull e Mehler (1985) falta, entre outros, o núcleo NGL. Já no capítulo seguinte do livro "The Rat Nervous System", que trata do sistema visual, Sefton e Dreher (1985) usam o termo "região dorsolateral" do tálamo para indicar a posição desse núcleo. Haveria então um grupo dorsolateral? Sobre esta questão até hoje não há um consenso na literatura.

Por outro lado, podemos identificar regras gerais na conectividade tálamo-cortical: os núcleos talâmicos podem ser classificados como <u>específicos</u>, que filtram dinamicamente as informações para as diversas modalidades sensório-motoras, ou <u>inespecíficos</u>, cujas projeções são mais difusas e relacionadas com a ativação cortical. O <u>núcleo reticular</u> modula a ação destes através de alças locais inibitórias (Pinault, 2004).

Os núcleos específicos projetam, então, para áreas corticais específicas, fenômeno conhecido como <u>especificidade inter-áreas</u> (Figura 4A). Além disso, dependendo da posição da célula dentro de cada núcleo talâmico, ela projeta para um sítio específico da área cortical em questão, fenômeno de <u>especificidade intra-área</u> (Figura 4B). De forma geral, as projeções tálamo-corticais seguem um padrão topográfico organizado ao longo do eixo rostro-caudal e

látero-medial. Ou seja, células pertencentes a núcleos mais rostrais projetam para áreas corticais rostro-mediais, enquanto que as células pertencentes aos núcleos caudais, projetam para áreas caudais no córtex. Da mesma forma, axônios originados em núcleos talâmicos laterais tendem a projetar caudalmente no córtex, enquanto os originados em núcleos mediais projetam mais rostralmente (Figura 5; para revisão ver Vanderhaeghen e Polleux, 2004). Entretanto esta regra topográfica vale apenas para os núcleos específicos, uma vez que os núcleos inespecíficos e reticular projetam de forma difusa (Jones, 2001).

Apesar disso, a idéia inicial de um núcleo específico transmitindo impulsos aferentes de determinado tipo (visual, auditivo, somatossensorial, cerebelar, etc.) e para uma única área do córtex com função correspondente já se mostra ultrapassada. Por exemplo, nas décadas de 1960 e 1970 ainda se discutia se o córtex visual primário (V1, área 17 de Brodman ou córtex estriado) recebia aferências de algum outro núcleo além do geniculado lateral dorsal (NGLd) (Benevento e Ebner, 1971) e inversamente, se o NGLd projetava para outro sítio cortical além de V1 (Garey e Powel, 1967). Hoje sabemos que muitas áreas corticais são inervadas por mais de um núcleo talâmico (Killackey e Ebner, 1973; Bullier, 1985; Manger e Rosa, 2005) e que muitos núcleos talâmicos, inclusive o NGLd, enviam axônios para mais de uma área cortical (Geisert, 1980; Bullier et al., 1984; Kennedy e Bullier, 1985). Neste caso a divergência das conexões pode ocorrer de duas maneiras: (1) populações distintas de células de um mesmo núcleo projetam para áreas corticais distintas ou (2) o axônio de uma única célula emite ramos colaterais, permitindo que ela inerve mais de uma área cortical (Bullier et al., 1984). Verificamos que conforme os métodos de investigação vão se tornando mais sensíveis e mais amplamente usados, revela-se mais complexa a forma de relação entre os núcleos talâmicos e o córtex.



Figura 4. Especificidades topográficas das conexões tálamo-corticais. (A) especificidade inter-áreas, cada núcleo projeta para uma área cortical específica. (B) especificidade intra-área, as projeções mantém as relações topográficas de representação sensorial da periferia. Neste exemplo, os axônios da parte lateral do núcleo VB (azul claro) projetam para a região medial do córtex S1 enquanto os axônios da região medial do tálamo projetam para a região lateral do córtex S1. M1, área motora primária; S1, área somatossensorial primária; V1, área visual primária; A1 área auditiva primária; VL, núcleo talâmico ventrolateral, VB, núcleo ventrobasal; LGN, núcleo geniculado lateral; MGN, núcleo geniculado medial. Figura adaptada de Vanderhaeghen e Polleux, 2004.



Figura 5. Organização topográfica das projeções tálamo-corticais ao longo dos eixos rostro-caudal e látero-medial. Células pertencentes a núcleos mais rostrais do tálamo, projetam para áreas corticais rostro-mediais, enquanto que as células pertencentes aos núcleos caudais, projetam para áreas caudais no córtex. Da mesma forma, axônios originados em núcleos talâmicos laterais tendem a projetar caudalmente no córtex, enquanto os originados em núcleos mediais projetam mais rostralmente. Figura adaptada de Vanderhaeghen e Polleux, 2004.

1.3 Vias visuais

As informações visuais, provenientes do mundo externo penetram na retina e desta são conduzidas, através das células ganglionares, principalmente para o NGLd, NGLv, tecto e pretecto. Duas grandes vias de axônios visuais chegam ao tálamo dorsal: (1) a via lemnotalâmica uma via de aferentes retinianos que inervam diretamente o diencéfalo no NGLd e (2) a via colotalâmica, formada por aferentes mesencefálicos do colículo superior, que por sua vez, recebe axônios diretamente da retina (Ebbesson, 1970, 1972; Butler, 1994) e projetam para o núcleo lateral posterior (LP). A via lemnotalâmica estaria mais comprometida com a veiculação direta para o diencéfalo, com a informação sobre as relações topográficas entre pontos claros e escuros no campo visual, isto é, com os detalhes das formas. Já a via colotalâmica estaria mais envolvida com a veiculação da informação sobre o movimento, uma vez que se origina no mesencéfalo, uma região integrativa polissensorial, responsável pela computação da informação sobre o movimento e o tamanho relativo de formas, relacionando estes parâmetros visuais com informações somatossensoriais para a tomada de decisão e a movimentação direcionada (Ewert et al., 1985). Existem evidências de conexões diretas entre o colículo superior e o NGLd em roedores (Robson e Hall, 1976; Reese, 1984), sugerindo uma convergência entre das duas vias (para revisão ver Furtado, 2005).

A via retino-geniculo-cortical alcança o córtex visual primário (área 17) principalmente na camada 4. Já a via retino-colículo-tálamo-cortical atinge principalmente as camadas 3 e 4 do <u>córtex extra-estriado</u> (áreas 18, 7, 20) além de algumas conexões para a área 17 (Hughes, 1977).

Uma vez que Martin (1986) estimou que apenas 37% das células ganglionares projetam para o NGL no rato, enquanto Linden e Perry (1983) mostraram que o colículo superior é inervado por pelo menos 90% das células ganglionares, se conclui que as células ganglionares projetam para ambos os alvos através de colaterais, como sugeriu Sefton antes que isso fosse demonstrado (1968).

Mesmo derivadas das mesmas células ganglionares há evidências a favor de uma segregação morfofuncional das duas vias. Há inclusive evidências de que células ganglionares de tamanhos de corpos diferentes projetam para alvos distintos no SNC. Por exemplo, Rapaport e Wilson (1983) separaram as células ganglionares em quatro grupos baseados no tamanho dos corpos celulares e, através de marcação retrógrada, verificaram que os quatro grupos de células projetam para o CS, enquanto apenas os três grupos de maior tamanho projetam para o NGL. Mais especificamente, Martin (1986) verificou que as células

ganglionares que projetam para a região ântero-ventral do NGL, possuem corpos celulares maiores do que as células que projetam para a região póstero-dorsal desse mesmo núcleo no rato.

Além disso, alguns poucos trabalhos em diferentes espécies mostraram indícios de que, além dos núcleos talâmicos classicamente conhecidos como integrantes do sistema visual (NGL, LP e pulvinar do gato, da raposa voadora, do tupaia e do macaco), outros núcleos talâmicos, inespecíficos, também poderiam estar relacionados com a área visual primária. Por exemplo, Herkenham (1978) encontrou ramificações terminais na área V1 após injeção de rastreador anterógrado (aminoácidos radiomarcados com trítio) no <u>núcleo reuniens</u> do rato (Figura 6). Do mesmo modo, Gould *et al.* (1978) encontraram degeneração axônica no córtex visual após ampla lesão na região da linha média do tálamo do insetívoro *Paraechinus hypomelas* (Figura 7). Essa região poderia corresponder à região intralaminar anterior do tálamo do gambá, a qual recebe projeções do colículo superior e do pretecto (Rafols e Matzke, 1970). No entanto, esses resultados são questionáveis devido aos métodos utilizados; injeções ou lesões extensas no tálamo podendo marcar/atingir indevidamente fibras de passagem.

Mais recentemente, usando rastreadores retrógrados mais sensíveis como o azul rápido (Fast Blue) e o amarelo diamidino (Diamidino Yellow), Kennedy e Bullier (1985) verificaram marcação no grupo <u>intralaminar</u> (ILN) após injeção na área V1 de macacos. Na revisão sobre as conexões aferentes e eferentes aos núcleos da linha média e intralaminares, Van der Werf *et a.l* (2002) mencionam, muito vagamente, que os núcleos PC e CL projetam para áreas corticais visuais, mas não indicam precisamente quais áreas visuais (Figuras 8 e 9). Quanto às aferências, eles mencionam que o núcleo PC recebe do CS e do NGL, enquanto o núcleo CL recebe do CS e do córtex visual exceto V1 e V2. No entanto, esses autores não discutem esse achado e, sobre o papel funcional dos núcleos da linha média e intralaminar, propõem que estão relacionados com o estado de alerta e atenção, sem mencionar um papel visual específico.

Na mesma linha, Cavalcante *et al.* (2005) mostraram pela primeira vez em vertebrados a existência de projeção da retina para os seguintes núcleos no sagüi: PV, Rh, IAM e Re (núcleos da linha média) e CM, CL, centrodorsal (CD) e parafascicular (Pf) (núcleos intralaminares). Apesar do sagüi ter um cérebro mais complexo e de ser um animal filogeneticamente distante do rato, esse é mais um indício de que núcleos posicionados medialmente no tálamo podem também estar relacionados com o sistema visual.



Figura 6. Projeções do núcleo reuniens para o córtex visual no rato adulto. (A) corte coronal mostrando a injeção de traçador anterógrado (aminoácidos radiomarcados) no núcleo reuniens. (B) corte coronal ao nível de V1 mostrando as fibras marcadas alcançando a camada I. As linhas pontilhadas ilustram fibras passando no plano de corte e os pontos indicam ramificações terminais. hl, região hipotalâmica lateral; prs, pré-subículo; rsag, área retroesplenial agranular; rsg, área retroesplenial granular. Figura adaptada de Herkenham, 1978.



Figura 7. Projeções da região medial do tálamo para a camada I do córtex V1 do insetívoro (*Paraechinus hypomelas*) mostrando a degeneração anterógrada, resultante de uma grande lesão no terço médio do tálamo do ouriço. Os pontos indicam a presença de terminais em degeneração. De A a D, hemiencéfalos em cortes coronais (rostral/caudal). Figura retirada de Gould *et al.*,1978.



Figura 8. Projeções do núcleo paracentral (PC) para o córtex de ratos adultos após injeção do traçador anterógrado leucoaglutinina do feijão (*Phaseolus vulgaris*) em corte coronal. Note a marcação no córtex visual. O quadro superior à direita representa a região medial do tálamo, mostrando de forma esquemática a posição do núcleo PC. CP, caudado putamen. Figura adaptada de Van der Werf *et al.*, 2002.



Figura 9. Projeções do núcleo central lateral (CL) para o córtex de ratos adultos após injeção do traçador anterógrado leucoaglutinina do feijão (*Phaseolus vulgaris*) em corte coronal. Note a marcação no córtex visual. O quadro superior à direita representa a região medial do tálamo, mostrando de forma esquemática a posição do núcleo CL. RSPv, córtex retroesplenial ventral. Figura adaptada de Van der Werf *et al.*, 2002.

Finalmente, Dreher *et al.* (1990), mostraram marcação retrógrada nos núcleos VM, RE e grupo ILN, além do NGL e do LP, após injeção de marcador fluorescente retrógrado na área 17 de ratos com 20 dias de vida pós-natal (P20). O grupo ILN e o Po foram marcados após injeção na borda 17/18 de animais da mesma idade. Já nos animais adultos, o único núcleo marcado além do NGL e do LP, foi o grupo ILN, mais especificamente os núcleos CM, PC e CL (Figura 10).

Esse conjunto de dados sugere que alguns núcleos talâmicos mediais podem ter – no adulto ou só durante o desenvolvimento – projeções para o córtex visual primário. A Figura 11 representa um resumo, baseado na literatura acima citada, mostrando quais os núcleos talâmicos que projetam para a área 17 no rato recém-nascido e no adulto.

1.4 Desenvolvimento das conexões tálamo-corticais visuais no rato

O tálamo e o córtex são estruturas pertencentes ao SNC o qual se origina a partir da <u>placa neural</u> do embrião que se constitui de um espessamento do <u>neuroectoderma</u> embrionário. As células da placa neural sofrem divisões e tornam-se prismáticas, causando um dobramento e que por fim se fecha, formando o <u>tubo neural</u>. A extremidade cranial do tubo neural apresenta a princípio três vesículas: o <u>prosencéfalo</u>, mais anterior; o <u>mesencéfalo</u>, no meio e o <u>rombencéfalo</u>, mais posterior. O <u>prosencéfalo</u> origina duas vesículas: o <u>telencéfalo</u> (que dá origem ao córtex cerebral, núcleos da base e hipocampo) e o <u>diencéfalo</u> (que dá origem ao tálamo, hipotálamo e epitálamo). O mesencéfalo, por sua vez, origina duas novas vesículas: o <u>metencéfalo</u> (cerebelo e ponte) e o <u>mielencéfalo</u> (bulbo). Todas estas estruturas, em conjunto, formarão o que chamamos de <u>encéfalo</u>. A continuação caudal do tubo neural é cilíndrica, chamada de <u>medula primitiva</u>, e originará a <u>medula espinhal</u>. As cavidades no interior das vesículas formarão os ventrículos cerebrais e os ductos de comunicação entre eles. Células periféricas na placa neural formam a <u>crista neural</u> a qual dá origem, entre outras estruturas, ao sistema nervoso periférico (para revisão ver Supèr *et al.*, 1998).



Figura 10. Núcleos talâmicos que projetam para o córtex V1 no rato jovem (P29). As células retrogradamente marcadas após injeção de fast blue em V1. (A) Diencéfalo rostral em corte coronal; marcação retrógrada nos núcleos reuniens (Re), central medial (CM), paracentral (PC), central lateral (CL) e complexo posterior (PO) além do geniculado lateral (LGN). (B) Diencéfalo caudal em corte coronal; intensa marcação retrógrada nos núcleos lateral posterior (LP), PO e LGN. CP pedúnculo cerebral; MG núcleo geniculado medial; NIII, núcleo oculomotor; OT, trato óptico; PT, pretectum; SC, colículo superior; SNc, substância negra compacta; SNr, substância negra retirada de Dreher *et al.*, 1990.



Figura 11. Núcleos talâmicos que projetam para o córtex visual primário de roedores desde o desenvolvimento até a idade adulta (vista coronal). Os núcleos geniculado lateral dorsal (NGLd) e lateral posterior (LP), em azul escuro, fornecem a maior quantidade de aferentes para o córtex visual primário (V1). Já os núcleos intralaminares: paracentral (PC), central lateral (CL) e central medial (CM), em azul intermediário, projetam em menor quantidade, tanto durante o desenvolvimento quanto no adulto. Os núcleos ventro-medial (VM), reuniens (Re), e complexo posterior (Po), em azul claro, projetam para V1 somente durante o desenvolvimento. Dados reunidos de Van der Werf *et al.*, 2002 e Dreher *et al.*, 1990.
Conforme já foi exposto, o tálamo e o córtex cerebral trabalham juntos no processamento sensorial e no comando das funções motoras do animal. Apesar disso, a organização citoarquitetônica dessas duas estruturas é bem diferente, sendo o tálamo formado por grupamentos de neurônios organizados em núcleos talâmicos e o córtex formado por camadas, ambos contendo neurônios de fenótipo e densidade diferente. Para estabelecer morfologias tão distintas, o córtex e o tálamo utilizam diferentes estratégias de desenvolvimento. Grande parte dos estudos sobre o desenvolvimento do encéfalo trata especificamente do desenvolvimento do córtex cerebral (revisões em: Campbell, 2003; Grove e Fukuchi-Shimogori, 2003; Rubenstein *et al.*, 1998), enquanto relativamente poucos trabalhos foram dedicados ao desenvolvimento do tálamo.

De maneira geral, podemos dividir a formação do encéfalo nos seguintes estágios: (1) geração das células nervosas, (2) migração das células nervosas, (3) diferenciação celular e estabelecimento das conexões, (4) fenômenos regressivos e (5) mielinização. Veremos que muitas vezes estas etapas se sobrepõem. Abordaremos com mais detalhes a etapa de fenômenos regressivos, uma vez que se trata do nosso objeto de estudo.

1.4.1 Geração das células nervosas

As células que constituem o tálamo e o córtex cerebral originam-se principalmente de uma camada germinativa próxima às paredes ventriculares chamada <u>zona ventricular</u> (Shimada e Langman, 1970; Caviness, 1982). Esta é uma zona proliferativa que faz parte de um epitélio pseudo-estratificado e que também tem, no início do desenvolvimento, uma zona marginal (Shimada e Langman, 1970). Em função da intensa proliferação celular que sofre, a zona ventricular aumenta sua espessura durante o desenvolvimento, mas no final da neurogênese ela sofre uma redução e se transforma em zona ependimária (Smart, 1973; Altman e Bayer, 1990). Há também uma segunda zona proliferativa, a <u>zona subventricular</u>, adjacente à zona ventricular. A zona subventricular possui menor densidade celular que a zona ventricular e células com características morfológicas distintas (Altman, 1969; Privat e Leblond, 1972; Altman e Bayer, 1990). Nela são gerados neurônios para as camadas mais externas do neocórtex (Tarabykin *et al.*, 2001), astrócitos para o córtex cerebral (Parnavelas, 1999) e interneurônios para o bulbo olfatório (Luskin, 1993).

1.4.2 Migração das células nervosas

Na fase de migração, observamos estratégias peculiares para o tálamo e o córtex. No entanto, em ambos os casos, a maior parte dos neurônios só começa a migrar após a interrupção do ciclo celular (Rakic, 1974; 1990).

Cada núcleo talâmico possui células com características morfofisiológicas próprias, expressando neurotransmissores específicos e estabelecendo conexões com diferentes áreas corticais. Por isso, para construir os circuitos neurais corretos, é necessário que as células pósmitóticas deixem a camada adjacente ao terceiro ventrículo com a informação correta do endereço do núcleo ao qual devem pertencer. Esse endereço nada mais é do que a posição em relação aos eixos ântero-posterior (AP) e dorsoventral (DV) do diencéfalo (revisão em Lim e Golden, 2006). Existe uma hipótese de que células progenitoras talâmicas são organizadas na ZV como um mosaico, onde cada grupamento daria origem aos neurônios de um determinado núcleo diencefálico (Altman e Bayer, 1988). Dessa forma, é provável que não apenas as células pós-mitóticas, mas mesmo as células progenitoras dos neurônios talâmicos já tenham determinado suas posições finais ao longo dos eixos ântero-posterior e dorsoventral. Jessell (2000) sugere que as células progenitoras da medula espinhal adquirem sua identidade regional através de códigos de expressão de fatores de transcrição, que são regulados por moléculas de sinalização. Hashimoto-Torii et al. (2003) sugerem um mecanismo similar para o diencéfalo. De qualquer modo, ao interromper o ciclo celular, as células pós-mitóticas diencefálicas migram pela zona do manto e se agrupam formando os núcleos.

Altman e Bayer (1979a, 1979b) demonstraram a origem exata de diversas estruturas diencefálicas no neuroepitélio do terceiro ventrículo do rato (Figura 12). Segundo este estudo, o tálamo dorsal tem origem no lóbulo neuroepitelial dorsal (uma região específica do terceiro ventrículo, Figura 12), enquanto a zona incerta e o núcleo reticular originam-se no lobo neuroepitelial ventral. Os núcleos Re, Rh, MD, AM, AD e AV, cuja origem embriológica é o lóbulo neuroepitelial superior, foram classificados como constituintes do tálamo medial.

McAllister e Das (1977) mostraram em ratos, que o pico da neurogênese para a maioria dos núcleos talâmicos dorsais, inclusive o NGL, ocorre em E15. No entanto, para Lund e Mustari (1977) o NGL se forma entre E12 e E14. Altman e Bayer (1979a) procuraram gradientes inter e intranucleares no desenvolvimento do diencéfalo do rato e verificaram um padrão de formação de fora para dentro (*outside-in*), uma vez que as células dos núcleos situados lateralmente são geradas antes das pertencentes aos núcleos mais mediais (Figura 13). Esses mesmos autores não encontraram um gradiente intranuclear para o NGL, embora

Lund e Mustari (1977) tenham verificado que as células situadas lateralmente no NGL são geradas antes daquelas situadas medialmente neste mesmo núcleo.

No córtex, as células se distribuem de forma laminar ao invés de se agrupar em núcleos. Dependendo da sua posição laminar, as células corticais também possuem características morfológicas e fisiológicas específicas, bem como um padrão próprio de conexões. Assim como descrevemos para o tálamo, parece que a especificação neural das células corticais - neste caso a determinação da sua posição laminar - também ocorre precocemente, ainda na zona germinativa (McConnell e Kaznowski, 1991).

A formação das camadas corticais (Figura 14) ocorre a partir de neurônios que migram da ZV em direção à pia, formando uma camada chamada pré-placa (PP) (Shimada e Langman, 1970). A PP se distancia da ZV com o aparecimento da zona intermediária (ZI), uma região formada por neurônios em migração, prolongamentos de glia radial e axônios em crescimento (Caviness, 1982). A PP, por sua vez, é o destino dos primeiros neurônios migratórios que vão formar as camadas corticais. Em razão deste acúmulo de neurônios, forma-se a placa cortical (PC) (Marín-Padilla, 1992; Meyer et al., 2000) e a PP é dividida em subplaca (SP) e zona marginal (ZM) (Bayer e Altman, 1990; Caviness, 1982). Essas primeiras células que se acumulam na SP formarão a camada 6 do córtex. As camadas 5, 4, 3 e 2 se formam nesta ordem, ou seja, os neurônios migram das camadas germinativas (ZV e ZSV) por entre as camadas pré-existentes e param quando encontram a ZM, a qual formará a camada 1. Dessa forma, verificamos que as camadas do córtex cerebral se formam de dentro para fora (inside - out). O substrato físico para esse tipo de migração que acabamos de descrever, a migração radial, são células gliais especializadas, chamadas "glia radial". Elas formam uma espécie de trilho sobre o qual os neurônios se deslocam (Rakic, 1972; revisão em Gadisseux et al., 1990). Além disso, as células da glia radial podem entrar em mitose durante a migração e gerar também neurônios (Noctor et al., 2001). Muitos neurônios corticais também se deslocam paralelamente à pia-máter, adotando um modo de deslocamento chamado migração tangencial (Rakic, 1990; 2000).



Figura 12. Origem embriológica das principais subdivisões do diencéfalo. Os hachurados correspondem à sua origem na zona ventricular. Abreviaturas: III, terceiro ventrículo; SL1, lóbulo neuroepitelial superior 1; SL2, lóbulo neuroepitelial superior 2; DL, lóbulo neuroepitelial dorsal; ML, lóbulo neuroepitelial medial; VL, lóbulo neuroepitelial ventral; IL, lóbulo neuroepitelial inferior; ET, epitálamo; MT, tálamo medial; DT, tálamo dorsal; VTa, tálamo ventral anterior; VTp, tálamo ventral posterior; HY-1,2, zona hipotalâmica lateral e intermediária; HY - 3 hipotálamo hipofisiotrópico. As abreviaturas no interior da figura referem-se aos nomes dos núcleos. Figura modificada de Altman e Bayer, 1979.



Figura 13. Gradiente espaço-temporal de neurogênese do diencéfalo do rato. As setas grossas indicam que o desenvolvimento dos núcleos talâmicos obedece uma sequência de fora para dentro (*outside-in*). As setas finas mostram a sequência de desenvolvimento dentro de um mesmo núcleo talâmico. À direita, subdivisões do epitálamo (ET), tálamo medial (MT), tálamo dorsal (DT) e tálamo ventral anterior e posterior (VTa, VTp). À esquerda, a indicação das datas do pico de neurogênese para cada região diencefálica. Veja que as estruturas mais próximas da linha média são as últimas a serem formadas. Figura retirada de Altman e Bayer, 1979.



Figura 14. Formação das camadas corticais. Inicialmente os neurônios migram da zona ventricular (ZV) em direção à pia, formando a pré-placa (PP). A PP se distancia da ZV com o aparecimento da zona intermediária (ZI), uma região preenchida por neurônios em migração, prolongamentos de glia radial e axônios em crescimento. A PP por sua vez, vai acumulando os neurônios que vão formar as camadas corticais. Em razão deste acúmulo de neurônios, forma-se a placa cortical (PC) e a PP é dividida em subplaca (SP) e zona Marginal (ZM). Essas primeiras células que se acumulam na PP formarão a camada VI do córtex. As camadas 5, 4, 3 e 2 se formam nesta ordem, ou seja, os neurônios migram das camadas germinativas (ZV e ZSV) por entre as camadas pré-existentes e param quando encontram a ZM, a qual formará a camada 1. Muitos neurônios corticais também se deslocam paralelamente à pia e a esse deslocamento denominaram migração tangencial. Figura retirada do livro "Cem bilhões de neurônios" de Roberto Lent.

Tanto no tálamo como no córtex, a especificação neural ocorre precocemente, no fim do ciclo celular e ainda na zona germinativa. A estratégia de migração gliofílica, ao longo de fibras de glia radial, também é comum às duas estruturas. Por outro lado, elas divergem quanto ao seu gradiente espaço-temporal de formação: enquanto os núcleos talâmicos se formam de fora para dentro (*outside- in*), as camadas do córtex cerebral se formam de dentro para fora (*inside-out*).

1.4.3 Direcionamento axônico e estabelecimento das sinapses

Quando um neurônio finalmente se diferencia, ele precisa formar conexões com seus alvos que podem estar muito distantes. Os axônios dos neurônios do NGL, por exemplo, atravessam diversas regiões diencefálicas e telencefálicas, guiados por moléculas de direcionamento (López-Bendito e Molnár, 2003; Vanderhaegen e Polleux, 2004). Em ratos, esses axônios invadem o telencéfalo no dia E16 e percorrem a zona intermédia abaixo da placa cortical, alcançando a área visual no dia E18 (Lund e Mustari, 1977). As primeiras conexões tálamo-corticais estarão estabelecidas próximo à data do nascimento (E22). De fato, estudos (Tessier-Lavigne e Goodman, 1996) vêm mostrando o papel de diferentes moléculas no direcionamento dos axônios para seus alvos. No entanto, uma vez que o axônio alcança a área alvo, ele ainda precisa reconhecer quais as células com quem estabelecerá contatos sinápticos (Scheiffele, 2003).

Por tudo isso, não é surpreendente que após formar cerca de trilhões de conexões sinápticas seja necessário um período de rearranjo e de refinamento destas conexões, o qual prossegue através de estabilização ou eliminação (poda) seletiva.

1.4.4 Desenvolvimento dos aferentes tálamo-corticais

Em 1998, Molnár *et al.* publicaram um trabalho detalhado a respeito dos mecanismos de estabelecimento das conexões tálamo-corticais no rato. As informações que seguem são baseadas nessa publicação.

Os axônios talâmicos crescem através do corpo estriado em desenvolvimento, alcançam a zona intermediária do córtex na idade E15,5 e a subplaca em E16. Ao mesmo tempo em que os axônios tálamo-corticais estão chegando no córtex, ocorre o pico de neurogênese dos neurônios da placa cortical nas zonas ventricular e subventricular.

Entre E16 e E19, a maior parte dos axônios oriundos do NGL acumula-se na zona intermediária e na subplaca. Neste período, os axônios aferentes desenvolvem ramificações

que se restringem à região da subplaca. A partir de E19-E20, ocorre a invasão cortical dos aferentes talâmicos. Os axônios mudam sua trajetória na substância branca, formando um ângulo de aproximadamente 90 graus parar invadir o córtex radialmente, em direção à pia.

No dia do nascimento (E22), alguns axônios talâmicos possuem ramificações na camada 6 da placa cortical e terminam nesta região, enquanto que a maioria se ramifica na camada 6 e emite ramos para as futuras camadas 5 e 4. Já nesta idade, alguns axônios arborizam tangencialmente na camada 1; estes axônios oriundos do núcleo lateral posterior são os primeiros a invadir o córtex visual.

A partir de P2, muitos axônios oriundos do NGL já formam ramificações dentro da camada 4 (revisão em Furtado, 2005).

1.4.5 Fenômenos regressivos

Dentro deste universo de milhões de possibilidades de comunicação entre os neurônios, a estratégia de formar conexões exuberantes para em seguida selecioná-las mostrou-se bastante eficaz ao longo da evolução. Desse modo, os eventos "regressivos", caracterizados pela remoção de neurônios e conexões, fazem parte do desenvolvimento normal do cérebro de muitas espécies de mamíferos.

Em sua revisão recente sobre o processo de exuberância no desenvolvimento dos circuitos corticais, Innocenti e Price (2005) definem como <u>exuberância microscópica</u> a superprodução de estruturas envolvidas com a comunicação entre neurônios dentro de um território cortical restrito, incluindo a formação de sinapses, espinhas e ramos dendríticos ou ramos axônicos transitórios em camadas ou colunas nas quais não estarão mais presentes no animal adulto. Por outro lado, a <u>exuberância macroscópica</u> refere-se à formação de projeções transitórias entre áreas ou regiões distintas do SNC. Isso inclui projeções transitórias aferentes e eferentes entre um sítio cortical e uma área cortical distinta, ou um núcleo subcortical, a medula espinhal ou o cerebelo. Os autores reconhecem que a distinção entre esses dois tipos de exuberância nem sempre é muito clara.

Inicialmente acreditava-se que a existência do alvo era o fator que determinava a sobrevivência de um neurônio. Isso foi demonstrado inicialmente por Hamburger em 1949 e confirmado com a descoberta do fator de crescimento neuronal (NGF) (Levi-Montalcini, 1952; Cohen e Levi-Montalcini, 1956). O NGF é uma substância neurotrófica liberada pelas células alvo. Alguns neurônios são estritamente dependentes do NGF e células jovens parecem inclusive competir pelas moléculas neurotróficas disponíveis nos alvos durante etapas críticas do desenvolvimento (Davies *et al*, 1987). Em seguida, outras moléculas

tróficas foram reveladas (revisão em Barde, 1989) e foram chamadas de "neurotrofinas". Hoje sabemos que não apenas o alvo é importante para a sobrevivência do neurônio aferente, mas o contrário também é verdadeiro: as aferências são essenciais para a sobrevivência do alvo (revisado por Linden, 1994). Nesta revisão, Linden propõe que os mecanismos envolvidos no controle da sobrevivência neuronal pelos axônios aferentes incluem interações celulares mediadas por contato, processos dependentes de atividade provocados por neuromoduladores e neurotransmissores e liberação de fatores tróficos pelos próprios axônios aferentes.

Há evidências de que o fenômeno de apoptose (morte celular programada), responsável pela eliminação das células em excesso, ocorre através de uma cascata metabólica disparada pela ativação de genes específicos (Ellis et al., 1991; Johnson e Deckwerth, 1993). Esse processo atinge não apenas os neurônios, mas também as células da glia e ocorre tanto no sistema nervoso central quanto no periférico (Barres et al., 1992). Spreafico et al. (1995) verificaram a ocorrência de apoptose em praticamente todos os núcleos talâmicos durante o desenvolvimento pós-natal do rato, apresentando um pico de morte celular em P5. Spreafico et al. (1955) comentam que apesar de identificar células apoptóticas espalhadas por todo o tálamo, não havia, no total, um número muito significativo destas. Por outro lado, Waite et al. (1992) verificaram a presença de 30 a 40% de núcleos picnóticos no complexo ventrobasal com pico de morte celular em P2. Para Spreafico esta divergência não tem outra explicação a não ser a diferença de estratégia metodológica utilizada em ambos os trabalhos. Este mesmo autor ressalta que, no córtex, o fenômeno de apoptose ocorre de forma bem mais expressiva. No córtex de ratos, o pico de morte celular ocorre na primeira semana pós-natal, especificamente entre P5 e P8, sendo mais pronunciado na camada 6b e substância branca subjacente, bem como na borda entre a placa cortical e camada 1.

Existe uma estimativa de que no total ocorra a morte de cerca de 70-80% dos neurônios durante o desenvolvimento dos vertebrados (Clarke, 1985). Embora essa estimativa não seja muito precisa, uma vez que o período de morte se sobrepõe ao período de multiplicação celular, já sugere uma perspectiva da dimensão e importância deste fenômeno para o desenvolvimento.

Outro fenômeno regressivo bastante conhecido é a "poda" ou retração de ramificações axônicas. Inicialmente, Wise e Jones (1976) e Innocenti *et al.* (1977) verificaram, após a injeção de rastreador retrógrado (peroxidase-HRP), respectivamente no córtex parietal do rato e no córtex visual do gato em desenvolvimento, a presença de neurônios calosos em regiões do córtex que no animal adulto são desprovidas destas células. A ausência destas células nos animais adultos poderia estar vinculada à morte seletiva das que estivessem posicionadas nos

locais inadequados. Havia também a possibilidade de que algumas fibras calosas fossem colaterais de neurônios de projeção, como indicavam os estudos de Ramón y Cajal (1894) e Lorente de Nó (1922). Neste caso, estas células poderiam estar simplesmente perdendo o seu ramo caloso durante o desenvolvimento. Esta segunda possibilidade foi comprovada por Innocenti (1981) e por O'Leary no mesmo ano (1981). Ambos utilizaram rastreadores fluorescentes retrógrados (microesferas de látex conjugadas com fluorocromos) que tinham por característica permanecer longos períodos dentro das células. Com essa ferramenta, verificou-se a presença de células marcadas por todo o córtex adulto, indicando que esses neurônios estavam vivos. Além disso, quando um segundo rastreador era injetado no animal adulto, a distribuição das células marcadas era compatível com o padrão maduro. Esses experimentos comprovaram que a grande redução do número de células calosas deve-se principalmente à "poda" de ramos axônicos de neurônios que ficam vivos e estabelecem conexões com outros alvos. Posteriormente, conexões calosas transitórias foram identificadas no córtex somatossensorial do rato, gato e macaco (para revisão ver Innocenti, 1991 e O'Leary, 1992) e também observadas no sistema visual de ratos (Elberger, 1994) e hamster (Lent et al., 1990).

Outros pesquisadores estudaram os fenômenos regressivos em nível ultra-estrutural e verificaram que a eliminação sináptica no córtex motor do macaco Rhesus afeta principalmente as sinapses assimétricas (Zecevic et al., 1989), as quais são em sua maioria excitatórias. Mais recentemente, De Felipe et al. (1997) mostraram em camundongos um dado bastante interessante: entre as idades P4 e P32 ocorre um aumento no número de sinapses. Embora neste período também ocorra a eliminação das mesmas, a produção supera a perda, mas a partir de P32 até a idade adulta ocorre uma importante redução do número de sinapses. Os autores comentam que esse decréscimo tardio da densidade sináptica está relacionada com o fenômeno de regressão de ramos axônicos, uma vez que a morte celular no córtex de roedores ocorre principalmente na primeira semana pós-natal (Ferrer et al., 1994; Spreafico et al., 1995). Além disso, essa perda tardia no camundongo também afeta principalmente as sinapses assimétricas e tal fenômeno ocorre principalmente nas camadas 2/3 e 5 e um pouco na camada 4, indicando uma regressão seletiva dos terminais excitatórios. Os estudos por microscopia eletrônica de Blue e Parnavelas (1983) e de Micheva e Beaulieu (1996) reforçaram a idéia da regressão de sinapses durante as primeiras semanas de vida em roedores.

Veremos agora um panorama dos fenômenos regressivos em diferentes regiões do sistema nervoso. Com relação às comunicações retino-talâmicas/retino-coliculares, Wong e

Hugles (1987) e Leventhal et al. (1988), mostraram que durante o desenvolvimento ocorre redução do número de células ganglionares na retina, enquanto Ng e Stone (1982) e Sachs et al. (1986), mostraram a redução de ramos axônicos destas mesmas células durante o desenvolvimento. E o cenário das comunicações tálamo-corticais também não é diferente. Naegele et al. (1988) mostraram, através da reconstrução de axônios isolados, a eliminação de ramos tálamo-corticais visuais durante a segunda semana de desenvolvimento pós-natal de hamsters. Mais recentemente, Herbin et al. (2000) mostram que o núcleo lateral posterior intermediário (LPi) e as camadas A e A1 do NGL do tálamo do gato projetam transitoriamente para o córtex durante idades precoces do animal. Herbin não analisou os núcleos talâmicos mediais, mas Dreher et al. (1990) verificaram projeções transitórias dos núcleos VM, RE e PO para as áreas 17 e borda 17/18b do córtex de ratos. Analisando no sentido inverso, Distel e Holländer (1980) e Stanfield et al. (1982), foram os primeiros a mencionar o fenômeno de exuberância e regressão das conexões córtico-fugais durante o desenvolvimento pós-natal do coelho e do rato respectivamente. Anos depois, Kato (1987), mostrou um decréscimo gradual de 50% do total do número de células na camada 5 da área 17 entre o nascimento e a oitava semana de vida do gato. A exuberância córtico-subcortical foi posteriormente comprovada no trato córtico-espinhal de diferentes espécies (no rato: Curfs et al., 1994; 1995; no macaco: Galea e Darian-Smith, 1995). Quanto às conexões córticocorticais exuberantes, além das conexões calosas já mencionadas, outros estudos revelaram que este fenômeno de regressão estende-se às conexões córtico-corticais ipsilaterais. Price e Blakemore (1985) mostraram, por exemplo, projeções transitórias entre áreas adjacentes do córtex visual de gatos. Mais recentemente, Webster et al. (1991) mostraram este fenômeno entre comunicações do córtex temporal com o sistema límbico do macaco e Assal e Innocenti (1993) revelaram projeções transitórias dentro de uma mesma área do córtex visual de gatos.

Até a década de 1980 acreditava-se que as vias tálamo-corticais já apresentavam desde idades precoces, um padrão de conexão semelhante à forma adulta, ou seja, que o desenvolvimento dessas conexões ocorria somente de forma progressiva, enquanto o princípio de desenvolvimento através de exuberância e regressão aparecia ser próprio das conexões córtico-corticais. Desde então, diversos trabalhos como os de Naegele *et al.* (1988), Dreher *et al.* (1990), e Herbin *et al.* (2000) vêm mostrando fenômenos regressivos durante o desenvolvimento pós-natal das conexões tálamo-corticais. No entanto, esta questão ainda não é consenso, uma vez que recentemente Agmon *et al.* (1993) e Catalano *et al.* (1996) reafirmam a natureza progressiva do desenvolvimento dos axônios tálamo-corticais somatossensoriais do camundongo e do rato respectivamente.

Dentro deste contexto, o **objetivo geral** deste estudo é **investigar até que ponto a maturação dos aferentes tálamo-corticais visuais passa por uma fase de exuberância transitória.** Neste trabalho, abordamos o processo de exuberância macroscópica, entre núcleos talâmicos e o córtex.

1.4.6 Processo de mielinização dos neurônios do SNC do rato

O processo de mielinização ocorre inicialmente na medula espinhal, em seguida no bulbo, ponte, mesencéfalo, diencéfalo e por último no telencéfalo. No cérebro, a mielinização dos tratos ocorre na seguinte seqüência: primeiro fibras de projeção, seguidas das fibras de associação, assim como primeiro o sistema sensorial, em seguida o motor, e por último o circuito do corpo caloso. Jacobson (1963) mostrou que a mielinização no tálamo do rato inicia-se em P10 na região lateral do núcleo ventral posterior (VP) e em P12 no restante dos núcleos ventrais, posteriores e laterais. Na idade P14, começam a aparecer as primeiras fibras mielinizadas nos núcleos anteriores e mediais. Os núcleos da linha média são os últimos a iniciarem o processo de mielinização, que ocorre na idade P17. Este processo só se completa 44 dias após o nascimento. Quanto às fibras tálamo-corticais, o processo inicia-se na idade P14 para o córtex parietal e P17 para as outras regiões corticais e se estende até pelo menos P60.

Do ponto de vista prático, as fibras tálamo-corticais não estão mielinizadas em ratos de até P14, o que permite a utilização de rastreadores lipofílicos *in vivo* e *post mortem*. Após esse período, o emprego de rastreadores lipofílicos promove uma marcação difusa, devido à grande quantidde de lipídios presentes na bainha de mielina.

1.5 As carbocianinas

O DiI (perclorato de 1',1-dioctadecil-3,3,3',3',-tetrametilindo-carbocianina), o DiA (iodeto de 4-(4-(di-hexadecilamino)estiril)-*N*-metilpiridínio) e o DiO (perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina), são rastreadores lipofílicos derivados de carbocianinas. Estes rastreadores possuem uma cabeça hidrofóbica e duas caudas de hidrocarboneto com 18 a 20 átomos de carbono (Figura 15A), que conferem o caráter lipofílico da molécula e permitem a difusão do rastreador pelo interior das bicamadas lipídicas das membranas celulares. Estas moléculas possuem anéis benzênicos em sua estrutura, conferindo-lhes propriedades fluorescentes, ou seja, fluorescem quando expostas a uma luz de determinado comprimento de

48

onda (Figura 15B). O DiI produz uma cor vermelho-alaranjada intensa quando observadas sob filtro de rodamina ou verde pálido sob filtro de fluoresceina (FITC).



Figura 15. Estrutura e propriedades espectrais das moléculas de carbocianinas DiI e DiA (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). (A) Diferentes representações da estrutura da molécula de DiI. A emissão da fluorescência ocorre quando há a passagem da luz de um comprimento de onda específico pelos anéis benzênicos da molécula. (B) Curvas espectrais de absorção (azul) e de emissão (vermelho) das moléculas de DiI e DiA.

Já o DiA e o DiO fluorescem na cor amarelo-esverdeada quando expostos ao filtro FITC.

As carbocianinas, quando utilizadas em experimentos *in vivo*, são endocitadas e transportadas rapidamente no citoplasma (Holmqvist *et al*, 1992) e sua marcação não é tóxica para as células. Além disso, todas possuem a propriedade de marcar células fixadas por difusão passiva intramembranosa. Contudo, o DiO não é muito eficaz *in vivo* (Honig e Hume, 1986) e é menos eficaz do que o DiI e o DiA em tecidos fixados (Vercelli *et al*, 2000). Por outro lado, o DiO produz bons resultados em células dissociadas ou em cultura (Honig e Hume, 1986). Comparando o DiA com o DiI, este último produz melhor qualidade de marcação tanto do corpo celular e dendritos quanto do axônio.

O Dil é transportado ativamente ou difunde passivamente, tanto no sentido anterógrado quanto retrógrado. Veja-se alguns exemplos da sua utilização: (1) para a identificação e estudo de diferentes tipos de neurônios vivos em cultura, uma vez que não é tóxico para as células (Martinou et al., 1989). Associando com outros rastreadores fluorescentes retrógrados cuja fluorescência possui um comprimento de onda distinto, também pode ser utilizado no estudo das conexões entre os neurônios (Honig e Hume, 1986; Honig e Hume, 1989; Hedin-Pereira et al., 1992); (2) para a identificação de diferentes trajetos axônicos em cultura. Se o foco do estudo for o desenvolvimento, o DiI possibilita a visualização detalhada da morfologia axônica, inclusive a arborização terminal e cones de crescimento (Harris et al., 1987; Wilkemeyer e Angelides, 1996); (3) para a identificação de trajetos axônicos e morfologia neuronal em tecidos fixados, uma vez que o rastreador é transportado passivamente tanto no sentido anterógrado quanto retrógrado (Honig e Hume, 1986; Friedman et al. 1991; Lent e Guimarães, 1991; Pires-Neto e Lent, 1993; Uziel et al., 2006). A possibilidade de marcar tecidos fixados permite ainda o estudo de cérebros de animais que não podem ser mortos para fins científicos, como por exemplo animais em extinção e até mesmo cérebros humanos (Friedman et al., 1991; DeAzevedo et al., 1997); (4) para marcação de células a serem utilizadas em experimentos de transplante, a fim de que possam ser detectadas no tecido hospedeiro (Heredia et al., 1991); (5) para a visualização e estudo da glia radial (Gray e Sanes, 1992; DeAzevedo et al., 2003).

O pesquisador Danilo Furtado mostrou em sua tese de doutorado (Furtado, 2005) evidências de que a marcação das células pelo DiI em tecidos fixados ocorre, essencialmente, devido à ruptura das membranas plasmáticas no processo de inserção do cristal, ou seja, a marcação ocorre apenas naquelas células que foram lesionadas, seja pela entrada do cristal no tecido, ou pela ação mecânica da pinça. Foi possível comprovar essa conclusão nos presentes experimentos observando que a marcação resultante relaciona-se mais à posição do cristal nas

camadas corticais do que ao halo de difusão do cristal, que normalmente se espalha por todas as camadas.

Outra evidência acerca do modo de marcação pelas carbocianinas foi obtida através de um experimento utilizando o microscópio confocal, no qual se verificou que nem todas as células dentro do halo de difusão do DiI mostram-se marcadas (Furtado, 2005). Furtado descreve ainda um experimento (não publicado) conduzido por José Aírton Alves, Maira Fróes e João Menezes, no laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular do Departamento de Anatomia da UFRJ, no qual um cristal de DiI era depositado na superfície cerebral. O objetivo era marcar os neurônios e as células da glia radial que faziam contato com o cristal, mas isso só ocorria nos casos em que as meninges eram dissecadas. Muitas vezes a marcação só ocorria quando se realizava, além da dissecação, uma raspagem da superfície cerebral, lesionando os podócitos das células de glia radial e algumas pontas distais dos ramos do dendrito apical dos neurônios piramidais. Resumindo, todas as evidências levam a crer que apenas o contato do cristal com as células não seja suficiente para que haja marcação das mesmas, sendo necessário para isso o rompimento da membrana plasmática. A importância disso é que devemos considerar, durante a análise dos resultados, a posição do cristal de DiI em relação às diferentes camadas corticais.

De qualquer forma, em tecidos fixados o mecanismo de deslocamento do DiI é através de difusão pela membrana plasmática (Godement, *et al.*, 1987; Qu *et al.*, 2005; Cooke e Simerly, 2005). Dessa forma, a marcação possui um aspecto **membranar**¹ (Figura 16A), marcando a célula completamente, inclusive os prolongamentos mais finos, possibilitando a visualização completa das suas árvores dendrítica e axônica. Já no tecido vivo, a célula é marcada tanto pela difusão através da membrana, quanto por incorporação das moléculas de DiI ao citoplasma dentro de vesículas de endocitose. Mas o aspecto da marcação *in vivo* é bem diferente, sendo principalmente citoplasmática, é **granular** (Figura 16B) (Honig e Hume, 1986; Honig e Hume, 1989).

Alguns trabalhos já demonstraram que o DiI pode trafegar transcelularmente (Fritzsch e Wilm, 1990; 1992). Isso pode ocorrer tanto através de junções comunicantes (Furtado, 2005) quanto através de sinapses imaturas (Bruce *et. al.*, 1997). Mas a característica da marcação é bastante singular, uma vez que a fluorescência aparece pálida. A Figura 17 mostra

¹ A denominação "membranar" é inferencial, porque como os cortes são espessos, não é possível identificar o perfil das membranas, pois se visualiza grande parte ou a totalidade do volume celular dentro do corte, e as células marcadas aparentam terem sido completamente preenchidas pelo corante.

o exemplo de neurônios marcados transcelularmente. Neste caso, o DiI foi introduzido em um nervo óptico e deixado para difusão por 19 dias. A foto mostra uma seção frontal no trato óptico onde aparecem células marcadas próximas ao quiasma. Segundo o autor, estas células devem ter captado o DiI a partir dos axônios ópticos (Godement *et al.*, 1987). Sendo a marcação transcelular diferente das marcações diretas - tanto membranar quanto granular - esta não representou um problema para nossos experimentos.



Figura 16. Tipos de marcação retrógrada observadas em nossos experimentos com Dil. (A) marcação membranar após período de difusão *post mortem* e (B) Marcação granular após transporte *in vivo*.



Figura 17. Exemplo de neurônio marcado por difusão transcelular. Neste caso, um cristal de DiI foi inserido em um nervo óptico de camundongo E13,5 e deixado por 19 dias para difusão *post mortem*. A foto mostra uma seção frontal do trato óptico onde aparecem células marcadas próximas ao quiasma, as quais, provavelmente captaram o DiI a partir dos axônios ópticos. A seta aponta uma célula pálida, com marcação tipicamente transcelular. Godement *et al.*, 1987.

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

- Investigar até que ponto a maturação dos aferentes tálamo-corticais visuais passa por uma fase de exuberância transitória e;
- Aplicar uma nova estratégia metodológica para este fim e avaliar a eficácia da mesma.

2.2 Objetivos específicos

• Definir quais os núcleos talâmicos que estabelecem projeções para a área visual primária (V1) no rato pós-natal, observando três etapas do desenvolvimento: o segundo ou terceiro dia pós-natal (P2/P3), sétimo ou oitavo dia pós-natal (P7/P8), e o dia da abertura dos olhos, por volta do décimo quarto dia pós-natal (P14);

• Verificar se existem células e/ou núcleos talâmicos que eliminam suas projeções para o córtex visual primário durante o desenvolvimento do rato. Em caso afirmativo, mostrar a localização dessas células no tálamo;

- Descrever e aplicar uma nova forma de utilização do rastreador bidirecional DiI para o estudo dos eventos de exuberância e regressão das conexões do sistema nervoso;
- Comprovar a eficácia deste novo método proposto.

3 Metodologia

Estudamos cérebros de animais em idades distintas: no segundo ou terceiro dia pósnatal (P2/P3; dia de nascimento = P1), no sétimo ou oitavo dia pós-natal (P7/P8), e na idade da abertura dos olhos (aproximadamente P14), sendo este o marco final da maturação do sistema visual independente de informação luminosa estruturada (Katz e Shatz, 1996). No total, incluindo os experimentos-controle, 35 ratos da espécie *ratus norvergicos* foram utilizados (Tabelas 3 e 5). Escolhemos o rato como modelo experimental porque, sendo este um mamífero largamente estudado, apresenta melhores referências para delimitar os núcleos talâmicos.

Para a marcação retrógrada das células talâmicas de projeção cortical, utilizamos o rastreador lipofílico bidirecional DiI (Molecular Probes), o qual tem sido amplamente utilizado em trabalhos do laboratório (Furtado, 2005; Garcez *et al.*, 2007; Braga-de-Souza e Lent, 2004). Descrevemos as propriedades do DiI na Introdução; a seguir será detalhada a nova abordagem metodológica aplicada no presente trabalho.

3.1 Nova metodologia de marcação com DiI para o estudo do desenvolvimento

Uma crítica aos trabalhos que estudam o desenvolvimento das projeções tálamo-corticais, é o fato de que os pesquisadores comparam resultados obtidos após injeções de marcador realizadas em cérebros de animais de idade diferente. Portanto, a comparação é feita entre animais distintos e/ou injeções distintas. Como sabemos, por mais que haja uma padronização do protocolo de injeção, sempre ocorre uma pequena diferença na precisa localização da injeção e na quantidade de marcador realmente introduzida no cérebro a cada experimento.

Para solucionar este problema, padronizamos um método proposto originalmente por Furtado (2005), pelo qual é possível comparar o padrão de projeção tálamo-cortical em duas idades distintas, porém com uma única injeção e em um mesmo animal.

Quando inserimos o cristal de DiI no córtex do animal *in vivo* (ver detalhes técnicos adiante), o animal é perfundido 24 horas depois, e o cérebro é analisado subseqüentemente, buscando células com a marcação granular no tálamo. Esta marcação retrograda ocorre por transporte axoplasmático vesicular, durante as 24 horas de sobrevida do animal, e indica que as células possuem um ramo axônico na região cortical onde o cristal de DiI foi inserido (Figura 18A). Mas, quando além desse período de 24h de transporte *in vivo* aguardamos um

tempo maior após a eutanásia do animal (cerca de 3 meses em fixador), para a difusão física do rastreador através da fase lipídica das membranas, diversas células aparecem marcadas com o aspecto membranar. Na verdade, muitas destas células possivelmente possuem dupla marcação, granular e membranar, sendo que a marcação membranar se sobrepõe à marcação granular, obscurecendo esta última. Neste caso, a marcação membranar ocorre porque no momento da morte do animal, muitas das células marcadas de forma granular ainda possuem projeções para o sítio de inserção do cristal (Figura 18B). A partir daí, criamos a seguinte estratégia: (1) inserir um cristal de DiI in vivo em uma idade bastante precoce do desenvolvimento pós-natal, P1 por exemplo; (2) deixar um tempo de sobrevida, que pode ser de 24 horas até duas semanas, para que ocorra o transporte axoplasmático; (3) perfundir o animal; e (4) e em alguns casos, aguardar o tempo de difusão post mortem do rastreador. Desta maneira, as células que projetavam inicialmente para o local de inserção do cristal de Dil, mas eliminaram o seu prolongamento axônico durante o período de sobrevida, aparecerão, nestes experimentos, com uma marcação granular, enquanto as células que no dia da morte ainda possuíam projeções para o local de inserção do rastreador aparecerão com uma marcação membranar. Neste caso, a marcação membranar nos dará a informação sobre a anatomia das conexões tálamo-corticais na idade que escolhemos para a morte do animal e a marcação granular nos mostrará nesse mesmo cérebro, quais eram as células que projetavam para o córtex no dia da inserção do cristal e que eliminaram este axônio em algum momento antes da morte (figura 18C). Este último paradigma é, portanto, o experimento que nos dá a informação anatômica de duas idades diferentes do desenvolvimento, com a vantagem ser em um mesmo animal e com um mesmo sítio de inserção do cristal.

3.2 Inserção do rastreador

Todos os animais receberam, no primeiro dia de vida (P1), um cristal de DiI no córtex visual primário (V1, área 17). Com os animais anestesiados por hipotermia durante 10 min, fizemos uma incisão no escalpo para expor o crânio. Em seguida abrimos com o bisturi uma pequena janela no crânio (ainda cartilaginoso, nessa idade) no local de interseção entre duas linhas imaginárias, uma com origem no encontro posterior entre os dois hemisférios cerebrais e outra com origem na borda lateral direita do cerebelo (veja o exemplo de um cérebro dissecado com cristal na Figura 19). Neste local inserimos o cristal com o cuidado para não atingir a substância branca. Em seguida fechamos a incisão cirúrgica, reaquecemos o animal e o recolocamos junto à mãe.



Figura 18. Tipos de marcação retrógrada obtidas a partir de diferentes desenhos experimentais que utilizam as carbocianinas como neurorastreadores.



Figura 19. Foto de encéfalos de rato P2, com um cristal de DiI inserido no córtex visual primário do hemisfério direito. A referência anatômica utilizada para a inserção do cristal de DiI é ponto de encontro entre as retas traçadas a partir dos pontos A e B.

3.3 Eutanásia dos animais e processamento dos cérebros

Para o estudo do desenvolvimento das projeções tálamo-corticais e calosas, alguns animais foram mortos em P2/P3, outros em P7/P8, e outros ainda no dia de abertura dos olhos (~ P14). Em todos os casos procuramos minimizar o sofrimento dos animais. Para isso os ratos foram anestesiados por inalação de éter, seus reflexos foram testados para garantir que o animal não apresentava sensibilidade e imediatamente foram perfundidos com solução salina a 0,9% seguida de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 M). Retirados da caixa craniana, os cérebros foram divididos em seis subgrupos e armazenados em paraformaldeído a 4% sob temperatura ambiente. Em três dos grupos, os cérebros foram analisados em um prazo máximo de três dias, enquanto que em outros três grupos, os cérebros foram estocados por alguns meses para permitir a difusão passiva, *post mortem*, do rastreador (Tabela 3). Além desses 22 animais, outros 13 foram usados para experimentos controles (Tabela 5)

Grupo etário	Paradígma	N de animais
P2/P3	sem difusão post mortem (SDPM)	3
P2/P3	com difusão post mortem (CDPM)	5
P7/P8	sem difusão post mortem	3
P7/P8	com difusão post mortem	4
~ P14	sem difusão post mortem	2
~ P14	com difusão post mortem	5
Total		22

Tabela 3. Número de animais usados para cada grupo experimental.

Os cérebros foram selecionados para análise da seguinte maneira: todos foram fotografados, na região dorsal, onde era possível visualizar o local de inserção do cristal; em seguida, utilizando o programa gráfico Canvas 10, as fotografias de cada grupo etário foram sobrepostas por transparência e assim foram descartados os cérebros cujos cristais não se sobrepunham.

Os cérebros foram fatiados no vibrátomo (modelo Pelco 1000) em cortes coronais de 200 µm de espessura, contra-corados com o fluoróforo nucleofílico DAPI (4',6-diamino 2-fenilindol), para permitir a delimitação arquitetônica das camadas corticais e dos núcleos talâmicos. Os cortes foram montados em lâminas de vidro utilizando paraformaldeído como

meio de montagem, e cobertos com lamínulas seladas com verniz de unha. A Figura 20 resume as principais etapas metodológicas.



in vivo do ratreador, que variou entre 1 e 15 dias dependendo do grupo experimental (P2/P3, P7/P8 ou ~P14) até o dia da eutanásia. Em cada idade, os cérebros foram separados em subgrupos os quais ficaram ou não armazenados em solução fixadora para permitir a difusão passiva, post mortem, do ratreador. Depois os cérebros foram cortados no vibrátomo em fatias coronais de 200µm, analizados ao microscópio óptico de fluorescência onde foram desenhados, sob câmera clara, o tálamo e a distribuição espacial das células retrogradamente marcadas.

3.4 Análise da distribuição das células talâmicas com projeção para o córtex visual primário

Desenhamos com câmara clara acoplada a um microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan todos os cortes coronais do tálamo contendo células retrogradamente marcadas (objetiva de x10; mais x5 da câmara clara). Com pontos feitos a caneta, indicamos o local exato dessas células no tálamo em cada corte coronal. Assim, documentamos a distribuição completa das células talâmicas com projeção para a região de inserção do cristal de DiI, em toda a extensão ântero-posterior do tálamo.

Com base em um atlas citoarquitetônico do cérebro do rato (Paxinos *et al.*, 1994) delimitamos os núcleos talâmicos visíveis com a marcação de DAPI. Por não haver um consenso na literatura a respeito da distribuição dos núcleos talâmicos em grupos, por julgarmos a divisão de Faull e Mehler (1985) incompleta e ao mesmo tempo complexa para a visualização dos nossos resultados, nós propomos uma distribuição alternativa e simplificada dos núcleos talâmicos em quatro grandes grupos (Tabela 4). Essa distribuição foi feita de maneira arbitrária com objetivos operacionais, baseada na posição anatômica dos núcleos dentro do tálamo e não se propõe a servir de base para outros estudos.

Após realizar os desenhos em câmara clara dos cortes coronais dos cérebros nos diferentes grupos experimentais, selecionamos cerca de 5 ou 6 desenhos por animal para representar cada experimento; sendo que esta seleção foi feita de forma que houvesse compatibilidade entre os desenhos escolhidos em cada experimento, ou seja, nos mesmos níveis ântero-posteriores do tálamo de cada idade. Esses desenhos foram escaneados e redesenhados de forma esquemática usando o programa gráfico Canvas 10 (ACD Systems). Com esse esquema pudemos preservar os dados originais e torná-los mais claros para a comparação entre as idades. A Figura 21 mostra as etapas para chegarmos aos desenhos finais.

Grupo Talâmico	Cor nas figura	Núcleos	
Dorsolateral	azul	Ântero-dorsal (AD)	
		Geniculado Lateral dorsal (NGLd)	
		Geniculado Lateral ventral (NGLv)	
		Geniculado Medial (GM)	
		Lateral Posterior (LP)	
		Látero-dorsal (LD)	
		Núcleo do Trato óptico (OT)	
Medial	verde	Ântero-medial (AM)	
		Ântero-ventral (AV)	
		Gelatinoso (G)	
		Grupo Nuclear Posterior (Po)	
		Gustatório (Gu)	
		Parafascicular (PF)	
		Posterior Limitante (PLi)	
		Posterior Triangular (PoT)	
		Pretectal Anterior (APT)	
		Ventral Posterior lateral (VPL)	
		Ventral Posterior medial (VPM)	
		Ventro-lateral (VL)	
		Ventro-medial (VM)	
Da Linha Média	cinza	Interanteromedial (IAM)	
		Intermediodorsal (IMD)	
		Médio-dorsal (MD)	
		Paraventricular (PV)	
		Reuniens (Re)	
		Reuniens Ventral (Rev)	
		Rombóide (Rh)	
Intralaminar	amarelo	Central Lateral (CL)	
		Central Medial (CM)	
		Paracentral (PC)	

Tabela 4. Identificação dos grupos de núcleos talâmicos, sua cor correspondente nas figuras subseqüentes, nome e abreviatura de cada núcleo componente.



Figura 21. Procedimento de representação dos resultados (C) a partir da combinação dos dados originais em câmara clara (A) com o(s) corte(s) coronal(is) correspondente(s) no atlas (Paxinos et al., 1994) do cérebro do rato (B), mostrando as delimitações dos núcleos talâmicos. As cores indicam os grupos de núcleos talâmicos de acordo com a tabela 4. CP, comissura posterior; POT, núcleo pretectal olivar; OSC, órgão subcomissural; csb, colículo núcleo gustatório; SPF, núcleo subparafascicular; VPM, núcleo ventral póstero-medial; VPL, núcleo ventral posterior lateral; rts, radiação talâmica superior; Im, lemnisco medial; pcs, pedúnculo cerebelar superior; 3V, terceiro ventrículo; HP, área hipotalâmica posterior; mt, trato mamilotalâmico; ZID, zona incerta dorsal; ZIV, zona incerta ventral; pto; núcleo pretectal olivar; pc, pedúnculo cerebral basal; núcleo subtalâmico; HL; área hipotalâmica lateral; DMC, núcleo hipotalâmico dorsomedial compacto; DMD, núcleo hipotalâmico dorsomedial difuso; núcleo hipotalâmico ventromedial; TuM, núcleo superior brachium; TO, núcleo do trato óptico; PV, núcleo paraventricular; PrC, núcleo pré comissural; Po, grupo nuclear talâmico posterior; PTA, núcleo pretectal anterior; GLD, núcleo genilulado lateral dorsal; fr, fascículo retroflexo; PF, núcleo parafascicular; LP, núcleo lateral posterior; Gu, uberal medial; CLh, núcleo hipotalâmico cilíndrico; núcleo hipotalâmico arqueado; EM, eminência medial; PoM, núcleo talâmico póstero-mediano; MD, núcleo talâmico médio-dorsal; CM, núcleo talâmico central medial; PCO, núcleo talâmico paracentral oval; f, fornix.

3.5 Experimentos controles

A fim de verificar a validade do método e consolidar os resultados acerca do desenvolvimento das conexões tálamo-corticais, realizamos os seguintes experimentos controles (Tabela 5):

1. Dil post mortem

Inserimos, *post mortem*, cristais de DiI em cérebros de animais perfundidos em P1/P2 (n=4), P8 (n=1) ou P14 (n=2) e aguardamos o tempo de difusão *post mortem* do DiI, para verificar se esta marcação membranar é semelhante àquela obtida nos casos com inserção de DiI *in vivo*. A semelhança na distribuição espacial das células retrogradamente marcadas concorre para a validação da metodologia proposta.

2. <u>Dupla marcação: Dil in vivo + DiA post mortem</u>

Em um animal P11, realizamos a inserção *post mortem* de um rastreador lipofílico de outra cor (DiA, verde) no mesmo local (V1) em que havia sido depositado *in vivo* o DiI (vermelho) no primeiro dia de vida. Aguardamos o tempo de difusão *post mortem* dos rastreadores para verificar se encontraríamos a mesma distribuição de células com marcação membranar no tálamo, e ainda células com marcação membranar apenas, localizadas nos mesmos núcleos talâmicos observados quando empregada a nova metodologia.

3. <u>Distribuição das células calosas</u>

Verificamos, em todos os 22 animais usados para análise das projeções tálamocorticais, e mais 2 animais, a distribuição das células calosas no córtex contralateral após a inserção de um cristal de DiI, *in vivo*, em V1 no primeiro dia de vida. Comparamos duas idades distintas do desenvolvimento pós-natal para confirmar se esta forma de utilização do DiI nos revelaria o já conhecido fenômeno de exuberância e regressão dos axônios calosos (O'Leary *et al.*, 1981). A observação do fenômeno regressivo no córtex contralateral atesta a validade da metodologia proposta. Observamos o padrão de marcação (membranar versus granular) e a distribuição espacial dessas células no córtex visual contralateral. Essas observações foram documentadas através de fotomicrografia em dois casos, um na idade P3 e outro na idade P7.

4. Dil in vivo e post mortem na substância branca

Em 3 animais, inserimos *in vivo* (P1) um cristal de DiI em V1, mas aprofundamos este cristal com a intenção de atingir a substância branca. O objetivo deste controle foi esclarecer se a marcação em novos núcleos talâmicos, encontrada em nossos experimentos, ocorria em

virtude da presença de fibras de passagem localizadas na substância branca subjacente ao local de inserção do cristal.

Experimento controle	Idade	Número de casos
DiI inserido post mortem	P1/P2	4
	P8	1
	P14	2
Dupla marcação: Dil in vivo em	P11*	1
P1 + DiA <i>post mortem</i> em P11.		
Distribuição das células calosas:	P3	9 (1)
DiI in vivo em P1; com ou sem	P7	8 (1)
difusão post mortem.	~P14	7
Dil post mortem na substância	P1/P2	2
branca	P14	1
Total		35

Tabela 5. Número de experimentos controles.

*Experimento realizado em duas idades diferentes, mas em um mesmo animal. (n) número de casos documentados.

4 Resultados

Analisamos o desenvolvimento das projeções tálamo-corticais durante as duas primeiras semanas pós-natal no rato, observando a distribuição dos corpos celulares retrogradamente marcados no tálamo, por rastreadores fluorescentes lipofílicos inseridos no córtex visual primário.

Com o uso apenas do DiI, pudemos identificar dois tipos bastante distintos de marcação: após transporte *in vivo* e observação imediata, encontramos corpos celulares marcados com aspecto granular (Figura 16B); após transporte *in vivo*, seguido por um período de difusão passiva *post mortem*, vimos tanto corpos celulares com aspecto granular quanto células com fluorescência mais uniforme, o que chamamos de marcação <u>membranar</u> (Figura 16A).

4.1 Exuberância e regressão dos aferentes tálamo-corticais

Para investigar se o fenômeno de exuberância e regressão também ocorre nas vias visuais tálamo-corticais e, em caso afirmativo, quais os núcleos talâmicos envolvidos neste processo, analisamos a distribuição e o tipo de marcação das células no tálamo, após a inserção de um cristal de DiI *in vivo* em V1 no primeiro dia de vida (P1). Após aguardar períodos distintos de sobrevida, as análises foram feitas em três grupos etários: P2/P3, P7/P8 e ~P14.

4.1.2 Grupo P2/P3

Quando colocamos um cristal de DiI em V1 do rato P1 vivo, perfundimos este animal um ou dois dias depois e analisamos este cérebro imediatamente após a eutanásia, verificamos a presença de muitas células com marcação granular tanto nos núcleos dorsolaterais, como também nos núcleos mediais, de linha média e intralaminares (Figura 22A).

Por outro lado, quando além deste período de 24 a 48h para o transporte *in vivo*, permitimos que o DiI fosse transportado passivamente pela membrana plasmática por dois meses, verificamos células distribuídas pelos mesmos núcleos talâmicos, porém a maioria delas apresentava marcação membranar (Figura 22B). Pouquíssimas células apresentavam marcação granular e estas estavam presentes nos núcleos da linha média.

No caso apresentado na Figura 22B, há visivelmente um número maior de células marcadas nos núcleos mediais, no entanto, atribuímos esta diferença à posição do cristal de DiI, que também pode ser observada no pequeno quadro superior à esquerda na mesma figura.

No caso mostrado na Figura 22A, o cristal encontra-se mais profundo no córtex, já no caso B o cristal encontra-se próximo da camada 4, local de chegada dos aferentes talâmicos. Por isso, provavelmente atingiu mais fibras e marcou maior número de células. Estes dois experimentos nos mostram que no primeiro e no segundo dia de vida do rato, não apenas os núcleos dorsolaterais, mas também alguns núcleos mediais, de linha média e intralaminares projetam para o córtex V1.

A fotomontagem da Figura 23 ilustra esta etapa do desenvolvimento, mostrando as células marcadas de forma membranar tanto nos núcleos dorsolaterais quanto nos mediais, de linha média e intralaminares. Neste caso também foi implementado um período de difusão *post mortem*.



Figura 22. (Página 69) Distribuição das células retrogradamente marcadas no diencéfalo do rato P2 em toda a extensão ântero-posterior do tálamo. À esquerda o corte mais anterior e à direita, o corte mais posterior. (A) Exemplo de um animal P2 que teve um cristal de DiI inserido in vivo em V1 no primeiro dia de vida, e cujo cérebro foi analisado imediatamente após a morte. Cada ponto vermelho representa uma célula retrogradamente marcada com aspecto granular. Há uma intensa marcação nos núcleos dorsolaterais e, em menor quantidade, dos outros grupos de núcleos talâmicos. (B) Outro animal P2 que teve um cristal de DiI inserido in vivo em V1 no primeiro dia de vida, mas cujo cérebro ficou armazenado para que houvesse a difusão post mortem do rastreador. Cada ponto preto representa uma célula retrogradamente marcada com aspecto membranar. Note que nos cortes escolhidos não há células com aspecto granular, apesar delas existirem nesta idade. Há muitas células marcadas com aspecto membranar nos núcleos dorsolaterais, mas também há, embora em menor quantidade, células em todos os outros grupos de núcleos talâmicos. O pequeno quadro superior à esquerda mostra o local de inserção do cristal e no detalhe a posição do mesmo em relação à camada 4 do córtex e à substância branca. Nos desenhos do diencéfalo, os grupos de núcleos talâmicos estão representados por cores: cinza, núcleos da linha média; amarelo, núcleos intralaminares; verde, núcleos mediais e azul, núcleos dorsolaterais. O asterisco indica o corte coronal onde se encontra o sítio de inserção.



Figura 23. Fotomicrografias de cortes coronais ilustrando a marcação nos diferentes grupos de núcleos talâmicos em um animal **P2 CDPM**. Células com marcação membranar nos grupos: dorsolateral **(A1 e A2)**; medial **(A3 e A4)**; intralaminar **(B1)**; e nos núcleos da linha média **(C1 e C2)**. A grande quantidade de fluorescência na foto do grupo dorsolateral (A1 e A2) impede a individualização das células marcadas. Os quadros de linhas pontilhadas correspondem às regiões com fotografias em maior aumento. A > C, posterior > anterior.

4.1.3 Grupo P7/P8

Quando realizamos o mesmo experimento citado acima, mas perfundimos o animal uma semana após a inserção do cristal de DiI e analisamos este cérebro imediatamente após a eutanásia, verificamos mais uma vez a presença de muitas células com marcação granular tanto nos núcleos dorsolaterais, como também nos núcleos mediais, de linha média e intralaminares (Figura 24A). Este era um resultado bastante previsível, uma vez que da mesma forma inserimos o cristal de DiI em P1 e permitimos apenas o transporte *in vivo*, pois analisamos o material imediatamente após a eutanásia.

Mas ao implementar o período de difusão *post mortem* do DiI, neste caso verificamos os dois tipos de marcação: nos núcleos dorsolaterais, mediais e intralaminares, células com marcação membranar; já nos núcleos da linha média, havia não apenas células com marcação membranar, mas também algumas poucas células com aspecto granular (Figura 24B), especialmente no núcleo Rh.

No caso do experimento com difusão *post mortem*, a marcação membranar ocorre naquelas células que tinham um axônio localizado na região de inserção do cristal no dia da inserção (P1), e que mantiveram esta projeção até o dia da eutanásia (P7). Por outro lado, a marcação granular representa as células que tinham um axônio projetando para a região de inserção do cristal no dia da inserção, mas que retraíram esta projeção em qualquer momento entre o dia de inserção (P1) e instantes antes da eutanásia (P7). Este experimento CDPM nos mostra que em P7, algumas células da linha média (as que aparecem em vermelho) que projetavam para o córtex V1 em P1 já retraíram esta projeção. Porém, nesta idade, o fenômeno regressivo ainda é incipiente.


Figura 24. (Página 73) Distribuição das células retrogradamente marcadas no diencéfalo de ratos P7/P8 em toda a extensão ântero-posterior do tálamo. Mesmas convenções do que na figura 22. (A) Exemplo de um animal P7 que teve um cristal de DiI inserido in vivo em V1 no primeiro dia de vida, cujo cérebro foi analisado imediatamente após a morte. Da mesma forma que no animal morto no dia P2, também aparece grande quantidade de células marcadas nos núcleos dorsolaterais e um notável número de células em todos os outros grupos de núcleos. (B) Animal P8 que teve um cristal de DiI inserido in vivo em V1 no primeiro dia de vida, cujo cérebro ficou armazenado para que houvesse a difusão post mortem do rastreador. Veja que nos núcleos dorsolaterais, mediais e intralaminares as células aparecem com marcação membranar, mas nos núcleos da linha média algumas células possuem o aspecto granular, indicando que nesta idade o processo de regressão está iniciando

Veja na Tabela 6 os núcleos que pudemos identificar, dentro dos grupos talâmicos, com projeção para V1 nas idades entre P1 e P8. Note que diversos núcleos fora do grupo dorsolateral estão projetando intensamente para V1 até a idade P8.

Grupo Talâmico	Cor nas	Núcleos que projetam para V1 nas
	figuras	idades de P1 a P8
Dorsolateral	azul	Geniculado Lateral Dorsal (NGLd) ***
		Geniculado Medial (GM) **
		Lateral Posterior (LP) ***
		Látero-dorsal (LD) **
Medial	verde	Ântero-ventral (AV) **
		Gelatinoso (G) *
		Grupo Nuclear Posterior (Po) ***
		Parafascicular (PF) **
		Posterior Limitante (PLi) **
		Reticular (Rt) *
		Ventral Posterior lateral (VPL) *
		Ventral Posterior medial (VPM) *
		Ventro-lateral (VL) ***
		Ventro-medial (VM)**
Da Linha Média	cinza	Interanteromedial (IAM) **
		Reuniens (Re) **
		Reuniens ventral (Rev) *
		Rombóide (Rh) **
Intralaminar	amarelo	Central Lateral (CL) ***
		Central Medial (CM) *

Tabela 6. Núcleos que projetam para V1 nas idades entre P1 e P8.

*** marcação intensa, ** pouca marcação, * pouquíssima marcação.

4.1.4 Grupo ~P14

Quando perfundimos o rato no dia da abertura dos olhos, aproximadamente duas semanas após o nascimento, e analisamos este cérebro imediatamente após a morte, verificamos, como nas outras idades, a presença de muitas células com marcação granular tanto nos núcleos dorsolaterais, como também nos núcleos mediais, de linha média e intralaminares (Figura 25A).

Contudo, quando analisamos os cérebros que ficaram armazenados para difusão *post mortem*, encontramos nos núcleos da linha média, todas as células marcadas de forma granular, nos núcleos mediais e intralaminares, muitas células com marcação granular e pouquíssimas células marcadas de forma membranar, enquanto nos núcleos dorsolaterais, ao contrário, encontramos muitas células com marcação membranar e poucas células com marcação granular (Figura 25B).

Novamente, no experimento com difusão *post mortem*, a marcação membranar representa as células que tinham um axônio projetando para a região de inserção do cristal no dia da inserção (P1) e que mantiveram esta projeção até o dia da morte (P14). Por outro lado, a marcação granular representa as células que tinham um axônio projetando para a região de inserção do cristal no dia da inserção (P1), mas que eliminaram esta projeção em qualquer momento entre o dia de inserção e instantes antes da morte (P14). Dessa forma, este experimento CDPM nos mostra que, na idade P14, já ocorreu um intenso fenômeno regressivo das projeções do tálamo para o córtex V1, principalmente nos núcleos mediais. Além disso, observamos que muitas células pertencentes aos próprios núcleos dorsolaterais também retraem seus axônios de projeção tálamo-cortical.

Outro exemplo de experimento CDPM na idade P14 está na Figura 26, que ilustra os resultados já comentados, através de fotomontagem.



Figura 25. (Página 77). Distribuição das células retrogradamente marcadas no diencéfalo de ratos ~P14 em toda a extensão ântero-posterior do tálamo. Mesmas convenções da figura 22. (A) Exemplo de um animal que teve um cristal de DiI inserido in vivo em V1 no primeiro dia de vida, foi morto no dia da abertura dos olhos e o cérebro analisado imediatamente após a morte. Como nos outros experimentos de análise imediata, apareceu grande quantidade de células marcadas nos núcleos dorsolaterais, mas também há um considerável número de células em todos os outros grupos de núcleos. (B) Animal P14 que teve um cristal de DiI inserido in vivo em V1 no primeiro dia de vida, cujo cérebro ficou armazenado para que houvesse a difusão post mortem do rastreador. Nesta condição experimental, apenas os núcleos dorsolaterais aparecem com marcação membranar, enquanto os outros núcleos apresentam intensa marcação granular. Observe também que nos núcleos dorsolaterais algumas células aparecem com marcação granular. Dessa forma, verificamos que na idade P14 já houve um intenso fenômeno regressivo, restando principalmente os núcleos dorsolaterais do tálamo com projeção para o córtex V1.



Figura 26. Fotomicrografias de cortes coronais ilustrando a marcação nos diferentes grupos de núcleos talâmicos em um animal **P14 CDPM**. Local de inserção do cristal de Dil (A). Nos núcleos dorsolaterais, diversas células marcadas de forma membranar (B1 e B2) e poucas marcadas de forma granular (B3, seta). Em núcleo intralaminar, células marcadas de forma granular (C1 e C2). Muitas células marcadas de forma granular em núcleos da linha média (D1), mostrando uma particularmente bem marcada em maior aumento (D2). Os quadros de linhas pontilhadas correspondem às regiões com fotografias em maior aumento. A > D, posterior > anterior.

Veja na Tabela 7 os núcleos que ainda projetam para V1 na idade da abertura dos olhos (~P14). Note que apenas os núcleos NGLd e LP continuam projetando intensamente para V1 nesta idade.

Grupo Talâmico	Cor nas	Núcleos que projetam para V1 na idade
	figuras	da abertura dos olhos (~ P14)
Dorsolateral	azul	Geniculado Lateral Dorsal (NGLd) ***
		Geniculado Medial (GM) **
		Lateral Posterior (LP) ***
		Látero-dorsal (LD) **
Medial	verde	Grupo Nuclear Posterior (Po) *
		Ventro-lateral (VL) *
Da Linha Média	cinza	
Intralaminar	amarelo	Central Lateral (CL) **

Tabela 7. Núcleos que projetam para V1 na idade da abertura dos olhos (~ P14).

*** marcação intensa, ** pouca marcação, * pouquíssima marcação.

4.2 Validação do método: experimentos controles

Uma vez que estamos propondo uma nova forma de utilização do rastreador DiI para o estudo de fenômenos regressivos no SNC, faz-se necessária a validação desta metodologia através da análise de quatro experimentos-controle:

4.2.1 Dil inserido post mortem

Usamos como primeiro controle, a inserção *post mortem* de um cristal de DiI no córtex V1 de ratos mortos nas mesmas idades dos nossos grupos experimentais: P2/P3, P7/P8 e ~P14. Este é um experimento-controle importante, do qual se espera encontrar um resultado semelhante ao que pudemos observar com a marcação membranar nos nossos grupos experimentais, com o cristal de DiI inserido *in vivo* e o cérebro armazenado para difusão *post mortem*. A diferença é que com a inserção *post mortem*, evidentemente não deveríamos observar a marcação granular, uma vez que esta ocorre devido ao transporte axoplasmático.

Os resultados indicaram uma diminuição da quantidade de células presentes nos núcleos mediais, de linha média e intralaminares ao longo do desenvolvimento. Nos animais mais jovens apareceram células marcadas retrogradamente no tálamo, tanto nos núcleos dorsolaterais, quanto nos mediais, de linha média e intralaminares, sendo que nesses dois últimos havia poucas células. Já nos animais de idade intermediária houve uma grande redução da quantidade de células retrogradamente marcadas, principalmente nos núcleos mediais e intralaminares. Além disso, não foram identificadas células nos núcleos da linha média nesta idade. Já nos animais mortos no dia da abertura dos olhos, observamos células marcadas apenas nos núcleos dorsolaterais. (Figura 27).

Ocorre que nos animais P14, diferente da marcação *in vivo*, a marcação *post mortem* se revelou borrada e mal-definida devido à presença de mielina nas fibras tálamo-corticais nesta idade. Por isso, colocamos também um cristal de DiI no cérebro (córtex V1) *post mortem* de ratos P11, uma idade próxima da abertura dos olhos mas com menor quantidade de mielina nos axônios. O resultado consistiu, assim como no grupo P14, em grande quantidade de células marcadas de forma membranar em núcleos dorsolaterais e nenhuma marcação nos outros grupos de núcleos (Figura 28). Neste caso a marcação estava nítida o suficiente para eliminar qualquer dúvida de interpretação e ainda permitiu constatar que nesta idade o fenômeno regressivo já ocorreu intensamente.



Figura 27. (Página 82). Experimento controle com inserção post mortem de um cristal de DiI no córtex V1 de ratos mortos nas mesmas idades dos nossos grupos experimentais: P2/P3, P7/P8 e ~ P14. Cada ponto preto representa uma célula retrogradamente marcada com aspecto membranar. Veja que ao longo do desenvolvimento ocorre uma diminuição da quantidade de células presentes nos núcleos mediais, de linha média e intralaminares. O pequeno quadro superior mostra o local de inserção do cristal e no detalhe, a posição do mesmo em ralação à camada 4 do córtex e à substância branca. Nos desenhos do diencéfalo os grupos de núcleos talâmicos estão representados por cores: cinza, núcleos da linha média; amarelo, núcleos intralaminares; verde, núcleos mediais e azul, núcleos dorsolaterais. De **a** para **d**, corte mais anterior para mais posterior.



Figura 28. Fotomicrografias de cortes coronais ilustrando a marcação nos núcleos talâmicos dorsolaterais no cérebro de um animal morto em **P11** e no qual foi inserido, *post mortem*, um cristal de DiI em V1. (A) Montagem de fotografias em campo claro do corte coronal no nível do cristal de DiI. (B) Montagem de fotografias em campo claro de um corte coronal mais anterior, no qual foram feitas as fotomicrografias abaixo. (1) Fotomicrografia do quadro em B, onde é possível visualizar a região dorsolateral com intensa marcação membranar e a região medial sem marcação alguma. (2, 3 e 4) Fotomigrografias da região dorsolateral em aumentos sucessivos. Os quadros de linhas pontilhadas correspondem às regiões com fotografias em maior aumento.

4.2.2 Dupla marcação: Dil in vivo + DiA post mortem

O experimento-controle de dupla marcação com DiI *in vivo* e DiA *post mortem* inseridos na mesma coluna cortical de V1 também demonstrou a validade do método proposto. Neste experimento-controle foi inserido, *post mortem*, um rastreador lipofílico de outra cor (DiA, verde) na idade da morte (P11), no mesmo local em que havia sido depositado *in vivo* (P1) um cristal de DiI (vermelho). Após aguardar a difusão passiva dos rastreadores, o resultado foi uma grande quantidade de células duplamente marcadas com o DiI e DiA na região dorsolateral do tálamo, com aspecto membranar, enquanto na região medial do mesmo havia células marcadas somente com DiI, com aspecto granular (Figura 29). Com este experimento comprovamos a eficácia da metodologia utilizada e confirmamos a existência do fenômeno de exuberância e regressão das células tálamo-corticais visuais.

4.2.3 Aplicação ao estudo das projeções calosas transitórias

Para validar a metodologia proposta, verificamos, também, se tal método seria eficaz na detecção do já conhecido fenômeno de exuberância e regressão das células calosas. Analisamos, portanto, a distribuição das células calosas no hemisfério contralateral à inserção do cristal de DiI. Assim como nos nossos grupos experimentais, inserimos o cristal in vivo em V1, no primeiro dia de vida (P1) e mortos em duas idades distintas, neste caso, no terceiro (P3) e no sétimo (P7) dia de vida. Observamos que em animais P3 com difusão post mortem do Dil, havia grande quantidade de células com marcação membranar espalhadas por todo o córtex visual contralateral à inserção do cristal. Tal marcação indica que no dia da morte essas células tinham um ramo axônico projetando para o hemisfério oposto (Figura 30 A, B e C). Ou seja, verificamos que no rato P3 existe grande quantidade de células calosas espalhadas por todo córtex visual. Além disso, havia raras células com marcação granular (Figura 30 C cabeça de seta). A marcação granular indica que no dia de inserção do DiI (no caso, P1), as células tinham um ramo axônico projetando para o hemisfério oposto, mas que não estava mais presente no dia da morte. Por outro lado, em animais P7 com difusão post mortem, a proporção de células granuladas versus células com marcação membranar estava bem diferente: desta vez havia células com marcação granular espalhadas por todo o córtex visual contralateral à inserção do cristal (Figura 30F, cabeças de seta) e poucas células com marcação membranar, localizadas nas bordas 17/18 (Figura 30E). Concluímos que entre as idades P3 e P7 houve uma redução importante do número de células com projeção calosa. Com esta nova forma de aplicação do DiI fomos capazes de detectar o já descrito fenômeno de exuberância e regressão das células calosas (Innocenti, 1981; O'Leary *et al.*, 1981; Lent *et al.*, 1990). Estes resultados confirmam a eficácia deste novo método de estudo.

4.2.4 Dil inserido post mortem na substância branca

Uma de nossas preocupações era a de que o cristal de DiI estivesse alcançando a substância branca e assim atingindo fibras de passagem nesta região. Se fosse este o caso, a marcação das células nos núcleos mediais, de linha média e intralaminares poderia ser apenas um artefato.

Para sanar esta dúvida inserimos cristais de DiI em cérebros *post mortem* de animais mortos em P1/P2 e ~P14, com a intenção de atingir a substância branca, e analisamos a marcação retrógrada no tálamo.

Nos animais mais jovens (P1/P2), observamos a presença de células retrogradamente marcadas nos núcleos dorsolaterais, mediais e intralaminares, mas não nos núcleos de linha média. Nos animais mais velhos (P14), observamos células retrogradamente marcadas apenas nos núcleos dorsolaterais (Figura 31).

O fato de haver relativamente pequena quantidade de células marcadas retrogradamente nos núcleos mediais e intralaminares e nenhuma marcação nos núcleos de linha média, quando inserimos o cristal na substância branca, levou-nos à conclusão de que a marcação medial encontrada nos animais dos nossos grupos experimentais mais jovens, P2/P3 e P7/P8, **não ocorre devido à lesão de fibras de passagem, mas reflete sim um momento de exuberância das células tálamo-corticais.**



Figura 29. Experimento controle que demostra que a técnica empregada é adequada para visualizar o fenômeno de regressão das conexões tálamo-corticais no rato. Em P1, um primeiro cristal de DiI (vermelho) foi inserido *in vivo*; em P11, o animal foi sacrificado e um segundo cristal de DiA (verde) foi inserido na mesma coluna cortical. (A) Sítios de inserção dos cristais no córtex (tripla exposição mostrando o DiI, DiA e o DAPI em azul). (B-G) Marcação no tálamo ipsilateral. A marcação em verde apresenta somente células com marcação membranar (setas). A marcação em vermelho apresenta dois padrões distintos: células com marcação membranar (setas) e células com marcação granular (cabeças de seta). As células com marcação granular possivelmente retraem seus axônios entre P1 e P11. Para visualizar o DiI foi utilizado o filtro de rodamina e para o DiA o filtro de fluoresceina. Barra de escala: A, B e C, 100µm; D e E, 50µm; F e G, 25µm.



Figura 30. Exuberância e regressão das conexões calosas visuais no rato. Esquerda, animal com cristal de Dil inserido em P1 e perfundido em P3. Direita, animal com cristal de Dil inserido em P1 e perfundido em P7. Ambos os cérebros foram armazenados para difusão *post mortem*. (A e D) Localização dos cristais de Dil na área V1. (A, B e C) Fotomicrografias de aumento sucessivo do hemisfério contralateral ao lado de inserção do cristal, mostrando numerosas células com marcação membranar nas áreas V1 e V2 em P3. Note, em C (cabeça de seta), uma rara célula com marcação granular. (E e F) Fotomicrografias do hemisfério contralateral ao lado de inserção do cristal, mostrando numerosas células com marcação granular. (E e F) Fotomicrografias do hemisfério contralateral ao lado de inserção do cristal, mostrando numerosas células com marcação granular. (E e F) Fotomicrografias do hemisfério contralateral ao lado de inserção do cristal, mostrando numerosas células com marcação membranar, localizadas nas bordas V1/V2 (setas).



Figura 31. (Página 89). Experimento controle com cristal de DiI localizado na substância branca. Mesmas convenções da figura 22. (A) Cérebro de um animal P1 com cristal de DiI inserido post mortem na substância branca. Somente células com marcação membranar foram encontradas, principalmente nos núcleos dorsolaterais, e também em alguns núcleos mediais como o Po, e o VL e o núcleo intralaminar CL. (B) Cérebro de um animal ~P14 com cristal de DiI inserido post mortem na substância branca. Veja que neste caso as células retrogradamente marcadas se limitam aos núcleos dorsolaterais.

5 Discussão

Este trabalho mostrou que durante o desenvolvimento pós-natal do rato, há um período inicial de exuberância das projeções tálamo-corticais visuais, e que, especialmente entre as idades P7 e P14, a maioria das células pertencentes a núcleos situados medialmente no tálamo retraem os axônios que inicialmente projetavam para a área V1 (Figura 32). O mesmo fenômeno também ocorre com algumas células pertencentes aos núcleos talâmicos dorsolaterais (NGLd e LP), o que corrobora a interpretação de que a via tálamo-cortical está passando por uma fase de regressão. Observamos que o processo regressivo obedece a um gradiente médio-lateral no tálamo, e que ele é deflagrado antes da abertura dos olhos, portanto parece que este refinamento é independente da visão de formas estruturadas.

Nossos experimentos também demonstraram que, com a abordagem metodológica aqui detalhada, é possível observar o histórico das projeções calosas e tálamo-corticais durante o desenvolvimento.

5.1 Considerações metodológicas

Diversos trabalhos já mostraram variadas possibilidades de utilização do DiI como rastreador neural bidirecional (Godement *et al.*, 1987; Qu *et al.*, 2005; Cooke e Simerly, 2005). A maioria desses trabalhos utiliza-se da marcação membranar do DiI. Entretanto Honig *et al.* (1986) mostraram uma forma de utilização do DiI em cultura, onde as células aparecem marcadas de forma granular.

Para avaliar a existência de fenômenos regressivos durante o desenvolvimento das conexões tálamo–corticais, propomos a utilização desses dois tipos de marcação em um mesmo cérebro. Esta abordagem metodológica é original e permite visualizar as projeções de uma determinada via em dois momentos distintos do seu desenvolvimento pós-natal (1) no momento da inserção do cristal e (2) no momento da eutanásia, com a certeza de que ambos os padrões resultam da mesma deposição de rastreador, o que não é possível com qualquer outro método (veja Figura 18).

Ao aplicar este novo método no desenvolvimento das conexões calosas, confirmamos o já conhecido fenômeno regressivo que ocorre na formação do corpo caloso (veja a Figura 30). Com isso, comprovamos que este é um método eficaz para a identificação desse fenômeno regressivo bem descrito no sistema caloso, que consiste na retração ou eliminação



Figura 32. Esquema do fenômeno de exuberância e regressão das projeções tálamocorticais no rato. **Azu**l: projeções permanentes; **vermelho**: projeções transitórias. Na idade P14 os dendritos dos neurônios talâmicos dorsolaterais encontram-se mais desenvolvidos, dando uma falsa impressão de que há um maior número de células quando compararmos com a idade P2. Desenhos fora de escala.

de alguns dos terminais axônicos de neurônios que permanecem vivos e projetando para outros locais (Innocenti, 1981).

O experimento-controle de inserção post mortem de Dil no córtex V1 revelou uma certa semelhança na distribuição espacial das células retrogradamente marcadas, quando comparados aos resultados obtidos com o uso da nova metodologia, o que corrobora para a validação desta. Contudo, ao compararmos a densidade de células marcadas retrogradamente no tálamo nos experimentos-controle com Dil post mortem com a densidade encontrada nos experimentos com inserção de DiI *in vivo*, encontramos uma diferença. Nos cérebros do grupo controle post mortem identificamos um número relativamente menor de células, sobretudo aquelas localizadas nos núcleos de linha média e nos núcleos intralaminares. Concluímos com isso que nos experimentos post mortem ocorre marcação de um número menor de células. Interpretamos essa diferença como conseqüência da maior densidade física do cérebro fixado em relação ao vivo, tornando menor o fluxo difusional do DiI no cérebro post mortem. Desse modo, nos experimentos *in vivo*, toda a coluna por onde o cristal passou se torna um foco de marcação. Por outro lado, quando o cristal é inserido no cérebro *post mortem*, apenas a camada onde o cristal é depositado é o foco de marcação. Assim, a probabilidade de atingir os axônios das células tálamo-corticais mediais é menor. Mesmo assim, este é mais um experimento que confirma a existência do fenômeno de exuberância e regressão.

Tivemos ainda outra comprovação da eficácia deste método ao realizarmos o experimento-controle com a dupla marcação das células talâmicas pelos rastreadores DiI e DiA inseridos na mesma coluna cortical em V1 (veja a Figura 29). Neste caso, o DiI inserido *in vivo* no primeiro dia de vida gerou uma marcação membranar nas células dos núcleos dorsolaterais e marcação granular em núcleos mais mediais. Já o DiA, inserido *post mortem*, gerou apenas marcação membranar nas células marcadas de forma membranar pelo DiI, ou seja, nos núcleos dorsolaterais.

Mais interessante ainda, nosso método permite ter a certeza de que os dois tipos de marcação provêm exatamente do mesmo sítio cortical, o que nunca é possível com injeções realizadas em momentos ou em animais diferentes. Assim, reduzimos as dúvidas relativas às variações anatômicas individuais, variações na quantidade de rastreador injetado e variações no local exato da injeção do mesmo. No experimento-controle citado acima (DiI+DiA), por exemplo, pudemos ter certeza de que ambos os cristais foram inseridos na mesma coluna ao analisar o corte coronal do sítio de injeção, no entanto, não há como negar que os cristais ocupam camadas corticais distintas e que a dimensão dos cristais também pode ter variado ligeiramente (veja a Figura 29).

Esta abordagem metodológica pode ser aplicada para o estudo do desenvolvimento de outras vias no SNC e não requer recursos tecnológicos avançados, podendo ser empregada com baixos custos financeiros.

Por outro lado, em virtude da mielinização dos tractos e vias de projeção, o DiI não produz uma boa marcação em cérebros adultos, Além disso, nos animais mais velhos, P14, por exemplo, é necessário aguardar um longo tempo de difusão *post mortem*, aproximadamente 4 meses, em virtude da longa extensão das vias axônicas estudadas.

5.2 Fenômenos expansivos e regressivos no desenvolvimento das projeções tálamo-corticais

Era de se esperar que os animais de todos os grupos <u>sem difusão *post mortem*</u>, tivessem células marcadas apenas de forma granular e foi exatamente o que verificamos. Todavia, foi curiosa a distribuição dessas células no tálamo, pois esperávamos encontrar grande quantidade de células nos núcleos dorsolaterais (NGLd e LP), como de fato ocorreu, mas poucas células em núcleos situados medialmente. No entanto, encontramos uma quantidade surpreendentemente grande de células marcadas em núcleos talâmicos mediais, de linha média e intralaminares (veja as Figuras 22A, 24A 25A).

O grupo <u>P2/P3 com difusão *post mortem*</u> confirmou a presença de grande quantidade de células nos núcleos talâmicos mediais, intralaminares e de linha média, bem como nos núcleos laterais, projetando axônios para o córtex V1, uma vez que havia células com marcação membranar tanto em regiões mediais, quanto dorsolaterais do tálamo. Por outro lado, a presença de algumas células marcadas apenas de forma granular revela que entre P1 e P2/P3 já há um incipiente processo regressivo.

O grupo <u>P7/P8 com difusão *post mortem*</u> revelou que nesta idade ainda há uma exuberância das projeções tálamo-corticais visuais (veja a Figura 24B). Por outro lado, comparando com o grupo P2/P3 com difusão *post mortem* (Figura 22B), verificamos que o processo regressivo já começa a se intensificar, uma vez que identificamos um número maior de células marcadas de forma granular, principalmente nos núcleos Rh e Re, pertencentes ao grupo da linha média.

Finalmente, no grupo <u>~P14 com difusão *post mortem*</u>, pudemos verificar que, ao contrário do que ocorreu com os grupos anteriores, a maioria das células presentes nos núcleos talâmicos mediais, de linha média e intralaminares, apareciam marcadas de forma granular (veja as Figuras 25B e 26). Nossa interpretação é que essas células projetavam para

V1 na idade P1 (dia da colocação do cristal) e que entre P1 e P14 os axônios que projetavam para V1 regrediram, por isso, essas células não tiveram suas membranas completamente preenchidas, mesmo após semanas de difusão *post mortem*. Ao contrário, as células situadas nos núcleos dorsolaterais estavam marcadas em sua maioria de forma membranar, indicando que estas células mantêm sua projeção para V1. A presença de algumas células granulares nesta região mostra que os núcleos dorsolaterais, que permanecem projetando para V1, também projetam de forma exuberante em idades precoces, e posteriormente eliminam alguns axônios.

A característica exuberante do grupo P7/P8 nos permite fechar ainda mais a janela temporal na qual ocorre o fenômeno regressivo que estamos estudando, ou seja, se nesta idade ainda há exuberância, é porque a regressão massiva ocorre entre P7 e P14. Por outro lado, as poucas células granulares presentes nos núcleos Rh e Re do grupo <u>P7/P8 com difusão *post mortem*</u> (veja a Figura 24B) indica que o fenômeno regressivo ocorre de forma gradativa e obedecendo a um gradiente médio-dorsal.

Sabe-se desde a década de 1970 que as conexões tálamo-corticais sofrem algum tipo de reorganização durante o desenvolvimento. Rakic (1977) e LeVay (1978) mostraram, respectivamente em macacos e gatos adultos, que os aferentes tálamo-corticais que representam cada um dos dois olhos são segregados no córtex visual, formando as "colunas de dominância ocular" e que essas colunas se sobrepõem em fases precoces do desenvolvimento. Mais interessante ainda é que o padrão disperso dos aferentes pode ser mantido caso o outro olho seja removido (enucleado) ou suturado antes de completar a segregação (Hubel *et al.*, 1977; Shatz e Stryker, 1978; Rakic, 1981).

No entanto, permanece a idéia de que os núcleos talâmicos que projetam para V1 já são estabelecidos desde o princípio do desenvolvimento e que não há um verdadeiro fenômeno de exuberância e regressão das projeções tálamo-corticais, mas somente um rearranjo de suas conexões. Esta é a hipótese do "caráter progressivo do desenvolvimento das conexões tálamo-corticais", como sugerem Hedin-Pereira (1989) e Killackey (1996). Mais recentemente, Herbin *et al.* (2000) mostrou em gatos que há uma diminuição do número total de células tálamo-corticais durante o desenvolvimento pós-natal e que, além disso, determinadas subdivisões dos núcleos LP e NGL projetam para o córtex visual no gato jovem, mas não o fazem no animal adulto. Apesar disso, curiosamente, este autor afirma no mesmo artigo que a via tálamo-cortical já está pronta e bem estabelecida na época do nascimento do animal.

Nossos experimentos demonstram que o fenômeno de exuberância e regressão da via tálamo-cortical possui uma amplitude considerável, uma vez que observamos a existência de numerosas células com projeção tálamo-cortical transitória para o córtex V1 em núcleos talâmicos que deixam de projetar para este alvo após alguns dias de desenvolvimento pósnatal. Assim, acreditamos que as conexões tálamo-corticais também se desenvolvem de maneira dinâmica (e possivelmente plástica) e não de forma simplesmente progressiva.

Da mesma forma, Frost (1984) mostrou que em hamsters recém natos normais o núcleo VB (somatossensorial) e o núcleo GM (auditivo) recebem projeções da retina que ao longo do desenvolvimento são completamente eliminadas. Este dado reforça a nossa interpretação de que a via tálamo-cortical é construída de forma progressiva e também regressiva.

O que ainda não sabemos é (1) se as projeções tálamo-corticais visuais exuberantes estabelecem contatos sinápticos com alvos corticais transitórios, nem se (2) tais contatos poderiam vir a se tornar permanentes. O trabalho de Frost (1986) oferece uma sugestão a esse respeito. Ele verificou que ao remover o CS e o NGL (principais alvos das vias retinianas) e ao mesmo tempo deaferentar os núcleos VB e GM, as conexões transitórias entre a retina e os núcleos VB e GM não regrediam. Isso leva a acreditar que, em situações especiais, as conexões tálamo-corticais exuberantes podem sim se tornar permanentes (revisão em Sur e Leamey, 2001).

Com relação à origem embriológica dos núcleos talâmicos, observamos que apenas núcleos com origem no lóbulo neuroepitelial dorsal (DL, Figura 12) podem continuar projetando para V1 no rato com 14 dias de vida. Já os núcleos com origem no lóbulo neuroepitelial 2 (SL2; Altman e Bayer, 1979a) projetam transitoriamente para V1, mas na idade da abertura dos olhos já não projetam mais; enquanto aqueles pertencentes ao lóbulo neuroepitelial 1 (SL1) nunca projetam para V1, nem durante o desenvolvimento (ver a Figura 12). Talvez essa diferença de origem embrionária defina atributos ontogenéticos distintos aos neurônios desses grupos nucleares, capazes de explicar o seu comportamento diferenciado quanto à emissão e retração de projeções exuberantes.

5.2.1 Por que se estabelecem as conexões transitórias?

a) Guias

Determinadas projeções transitórias parecem ter uma função clara no processo de construção do circuito permanente. Um exemplo disso é a existência de uma população de aferentes talâmicos que se origina no telencéfalo ventral, na região da cápsula interna, antes da formação da via tálamo-cortical, e que parece guiar os axônios tálamo-corticais no caminho entre o diencéfalo e o telencéfalo (Mólnar e Blakemore, 1998; Braisted e O'Leary, 1999). Essa hipótese foi confirmada em estudos que utilizaram camundongos mutantes e nos quais esta população transitória de células-guia não se forma. O resultado é a falha na chegada dos axônios tálamo-corticais no telencéfalo (Tuttle *et al.*, 1999; Pratt *et al.*, 2002).

Outro exemplo de população axônica transitória com função de guia é a subpopulação de células da subplaca cortical, que forma uma rede de conexões com células de outras camadas corticais, especialmente com neurônios da camada 4, com neurônios subcorticais e com axônios tálamo-corticais (Allendoerfer e Shatz, 1994), além de projetar ao outro hemisfério através do corpo caloso (DeAzevedo *et al.*, 1997). Neste caso, a falta desta população transitória implica na alteração da formação das colunas de dominância ocular (Ghosh e Shatz, 1992; Kanold *et al.*, 2003).

b) Seleção funcional de possíveis conjuntos neurais

As projeções exuberantes também oferecem a possibilidade de um ajuste progressivo de conexões mais precisas não só pela informação genética, mas também de acordo com a própria atividade funcional dos circuitos em formação. Isso confere ao sistema nervoso a capacidade de se adaptar às contingências do mundo físico no qual o organismo vive, bem como de adaptar-se a eventuais lesões ou distúrbios que possam ocorrer durante o desenvolvimento (Singer, 1995).

Seguindo a hipótese mais aceita sobre a codificação e a representação cortical, Singer (1995) distingue entre dois tipos de conexões: (1) as projeções proativas, como por exemplo entre áreas corticais de hierarquia crescente, ou as conexões tálamo-corticais; (2) as projeções horizontais e retroativas. As segundas, responsáveis pela formação dinâmica de conjuntos celulares cuja sincronização funcional seria o substrato das representações mentais, seriam caracterizadas por uma alta dinâmica, e por isso seriam selecionadas através de um processo aditivo/regressivo. As primeiras, ao contrário, teriam por papel essencial construir progressivamente os campos receptores característicos dos neurônios de cada estágio de processamento, e seriam essencialmente definidas por guias moleculares inatos, sendo pouco

sujeitas ao fenômeno de regressão em animais adultos. No entanto, durante fases precoces do desenvolvimento pós-natal, ambas as vias são suscetíveis à modificações dependentes da experiência. Esse processo parece obedecer a correlações de tipo Hebbiano, ou seja, os neurônios pré e pós-sinápticos que disparam potenciais de ação em contigüidade temporal têm suas sinapses fortalecidas. Dessa forma, através da seleção de conexões sincrônicas são estabelecidos os conjuntos neurais, ou seja, grupos de neurônios que respondem a um determinado estímulo de forma sincrônica.

c) Plasticidade inter-modal

Sabe-se que pessoas cegas possuem os outros sentidos mais aguçados, principalmente o tato e a audição. O córtex visual de cegos não fica inativo; Laemle *et al.* (2006) mostraram, por exemplo, que o córtex V1 de camundongos enucleados responde a estímulos auditivos. Eles demonstraram, nesses animais, a existência de uma conexão direta entre os núcleos subcorticais auditivos - o colículo inferior e núcleo geniculado medial (GM) – com o córtex V1. Observando esta questão por outro ângulo, Negyessy *et al.* (2000) mostraram uma redução das projeções provenientes do NGL que chegam em V1, e um incremento nas projeções provenientes do núcleo LP em ratos enucleados em P0. Ainda assim, essas projeções provenientes do NGL podem estar na verdade, trazendo informação de outras modalidades sensoriais, uma vez que Doron e Wollberg (1994) e também Izraeli *et al.* (2002) mostraram, respectivamente no rato e no hamster enucleados, a existência de uma conexão entre o colículo inferior e o NGL.

Todos esses achados, aliados ao fato de que no presente trabalho nós mostramos que até a idade de 14 dias o núcleo GM do rato ainda projeta para V1 (Figura 25), sugerem que animais em desenvolvimento possuem uma ampla capacidade de reorganizar, não apenas a circuitaria cortical, mas também subcortical, favorecendo a adaptação e a sobrevivência desses animais, mesmo que venham a sofrer alguma lesão estrutural ou alguma alteração ambiental importante.

d) Estratégia evolutiva

Considera-se também que os fenômenos regressivos têm um papel importante na evolução dos circuitos corticais, pois novas áreas morfofisiológicas podem ser definidas a partir da reorganização e da seleção de conexões inicialmente inespecíficas (Finlay *et al*, 1987). O fato de processos seletivos ocorrerem em estruturas homólogas de diferentes espécies, e o fato de ocorrerem em diferentes vias e em diferentes níveis estruturais, ou seja, o

fato de ser uma regra do desenvolvimento neural confirma que o processo de exuberância e regressão deve proporcionar a flexibilidade que é necessária para o ajuste das modificações genéticas que ocorrem durante a evolução (Innocenti, 1995; para revisão ver: Furtado, 2005). Por exemplo, o número significativamente maior de neurônios presentes na via retinogeniculada do gato selvagem (*Felis silvestris tartessia*), em comparação com o gato doméstico (*Felis catus*), foi atribuído à mudanças nas taxas de apoptose (Williams *et al.*, 1993).

Afinal, este fenômeno de exuberância seguida de regressão pode parecer redundante e implica um grande custo metabólico. No entanto, este mostra-se uma excelente estratégia para responder às exigências do desenvolvimento, do funcionamento dinâmico e provavelmente também da adaptação e da evolução dos circuitos responsáveis pela percepção dos estímulos externos. Kennedy (1989) verificou, por exemplo, através da análise dos fenômenos regressivos córtico-corticais ipsilaterais, que o processo de maturação dos circuitos corticais de primatas ocorre tardiamente comparando com outras espécies, e que isso pode estar relacionado com a complexidade do cérebro do primata.

Seria muito relevante investigar se, no outro sentido da alça, as projeções córticotalâmicas também se formam através de mecanismos regressivos, e se existe correpondência temporal e/ou espacial entre as estruturas talâmicas e corticais transitoriamente inervadas.

5.2.2 Fatores que afetam os fenômenos regressivos

Uma vez que os fenômenos regressivos existem como regra geral do desenvolvimento das conexões do sistema nervoso, qualquer distúrbio que comprometa a realização plena do mesmo poderá trazer graves conseqüências ao desenvolvimento e ao animal adulto. Por isso é importante conhecermos os fatores que afetam esta importante etapa do desenvolvimento.

Experimentos em ratos mostraram que o hipotireoidismo impede a eliminação de projeções calosas exuberantes nos córtices visual e auditivo (Gravel *et al.*, 1990 e Berbel *et al.*, 1993). Nessa mesma linha, Li *et al.* (1995) mostraram que o hipotireoidismo congênito inibe a regressão de projeções córtico-espinhais transitórias. Sendo assim, é possível que paciente com hipotireoidismo congênito sofram alterações sensoriais. O consumo de álcool durante a gravidez também foi avaliado em um estudo em macacas. Neste caso, seus filhotes desenvolveram um corpo caloso cuja metade anterior era mais espessa e continha um número maior de axônios (Miller *et al.*, 1999). Mas esses resultados diferem dos dados encontrados em humanos. Neste caso, a síndrome alcoólica fetal está relacionada com a disgenesia ou até

mesmo agenesia do corpo caloso e com a redução do tamanho do cérebro (Ramanathan *et al.*, 1996; Spohr *et al.*, 1993).

5.3 Considerações finais e perspectivas

Verificamos que até a idade da abertura dos olhos, os núcleos que projetam para V1 são: NGLd, LP, LD, CL VL, Po e GM. Sabemos, todavia, pela análise da literatura, que os núcleos NGLd, LP, LD e CL projetam para o córtex visual no rato adulto, e que em contrapartida, os núcleos VL e Po são específicos do sistema sensório-motor. Em P14, resta pouquíssima comunicação direta entre estes núcleos (VL e Po) e a área V1. Por este motivo, acreditamos que tais conexões serão desfeitas até a maturação completa do cérebro. A relação entre V1 e o núcleo GM, específico do sistema auditivo, na idade P14, já não é tão desprezível assim. E neste caso resta a dúvida: será que esta conexão se desfaz completamente com o amadurecimento?

Além disso, nossa metodologia nos permitiu verificar quais núcleos talâmicos projetam para V1 no rato até a idade de abertura dos olhos. Após este período o processo de mielinização – que acrescenta ao meio uma enorme quantidade de lipídeos - já começa a interferir na marcação pelas carbocianinas, tornando-a borrada e difusa. A conseqüência é a difícil identificação dos elementos marcados.

Para complementar nossos resultados, seria interessante aplicar em V1 de ratos adultos um rastreador retrógrado adequado para vias mielinizadas, como o fluorogold (Thanos *et al.*, 2000) ou microesferas de látex (Vercelli *et al.*, 2000). Neste caso, saberíamos se os núcleos VL, Po e GM mantêm suas fracas projeções para V1 ou se ainda há regressão entre o momento da abertura dos olhos e a idade adulta. Embora Negyessy *et al.* tenham publicado um trabalho semelhante em 2000, utilizando o HRP como rastreador retrógrado, e tenham verificado marcação retrógrada apenas nos núcleos NGLd, LP, LD e grupo intralaminar (dentre eles o CL), ainda seria importante a utilização de outro rastreador retrógrado e um olhar cuidadoso nos núcleos VL, Po e GM, para nos certificarmos se estes núcleos retraem completamente suas projeções para V1 até a idade adulta.

Outra questão ainda não totalmente respondida é se as conexões tálamo-corticais exuberantes são eliminadas por retração de terminais axônicos, por morte celular ou ambos. Acreditamos que se as células com projeção transitória morressem, elas seriam fagocitadas e não apareceriam marcadas de forma granular como observamos nos experimentos com inserção do cristal in vivo com difusão post mortem, especialmente no grupo da idade P14, cujo período de sobrevida é cerca de 12 dias. Mesmo assim, para eliminar a possibilidade da marcação granular estar se confundindo com um processo de degeneração do corpo celular, achamos que, seria interessante uma abordagem experimental como Innocenti e O'Leary et al. apresentaram em 1981 para estudar o fenômeno regressivo das células calosas. Neste caso, foi feito um experimento no qual um rastreador retrógrado, não metabolizável pelas células, foi inserido no córtex de ratos nos primeiros dias de vida. Esses animais tiveram um período de sobrevida de aproximadamente 17 dias e nesta data, um segundo rastreador retrógrado foi inserido aproximadamente no mesmo local do primeiro. O animal ainda permaneceu vivo por cerca de 8 horas após a cirurgia e em seguida foi perfundido. O resultado foi a presença de grande quantidade de células marcadas pelo primeiro rastreador em toda a extensão do córtex visual contralateral e um número menor de células duplamente marcadas somente nas bordas entre V1 e V2, onde as células visuais calosas se concentram no animal adulto. A presença das células marcadas com um único rastreador comprovou que as células com projeções calosas exuberantes não morrem, apenas retraem seus colaterais axônicos contralaterais.

Nossa proposta é a realização de um experimento com rastreadores retrógrados semelhantes, mas com o objetivo de estudar as projeções tálamo-corticais. Neste caso, injetaríamos, por exemplo, microesferas de látex verdes no córtex V1 de ratos na idade P2, aguardaríamos o animal chegar à idade P14 e injetaríamos microesferas vermelhas, no mesmo sítio onde foi injetado o primeiro rastreador. Caso seja correta a nossa hipótese de que as células que projetam transitoriamente não morrem, veríamos muitas células localizadas principalmente nos núcleos mais mediais, marcadas exclusivamente com as microesferas verdes.

No trabalho citado acima, O'Leary *et al.* (1981) discutem o fato de que nem todas as células dentro da região da borda V1/V2 estavam duplamente marcadas. Eles atribuem este resultado ao fato de que na prática é impossível realizar duas injeções exatamente no mesmo local. Mas algumas células da borda V1/V2 também pode ter eliminado seu ramo caloso, assim como no nosso trabalho mostramos que algumas células pertencentes ao núcleo NGLd retraem sua projeção para V1. No nosso trabalho, não temos dúvida de que esta regressão ocorre, pois a metodologia utilizada não contou com duas injeções, mas sim com duas marcações a partir de uma única injeção. E essa é uma das maiores vantagens desta metodologia aqui apresentada.

5.4 Conclusão

De acordo com os objetivos definidos,

• Descrevemos uma nova forma de utilização do DiI, baseada na sua capacidade de produzir dois tipos de marcação distintos em um mesmo cérebro, e demonstramos que ela é eficaz e vantajosa para o estudo da regressão de conexões neurais.

- Validamos este novo método através de diversos experimentos controles e concluímos que:
- Entre P1 e P8, os seguintes núcleos talâmicos projetam para a área V1 do rato :
- com projeção intensa: NGLd, LP, Po, VL, CL;
- com projeção moderada: GM, LD, AV, PF, PLi, VM, IAM, Re, Rh;
- com projeção fraca: G, Rt, VPL, VPM, Rev, CM.

Em P14, os seguintes núcleos talâmicos projetam para a área V1 do rato :

- com projeção intensa: NGLd, LP;
- com projeção moderada: GM, LD, CL;
- com projeção fraca: Po, VL.

• Portanto, existem vários núcleos talâmicos que projetam transitoriamente para o córtex visual primário no rato. São esses: AV, G, PF, PLi, Rt, VPL, VPM, VM, IAM, Re, Rev, Rh, CM.

- Além disso, nos núcleos talâmicos dorsolaterais **NGLd** e **LP**, o número de células que projetam para V1 diminui no período estudado.

- Estudos complementares são necessários para (1) verificar quais núcleos realmente projetam para V1 no rato adulto e (2) saber se as conexões transitórias são eliminadas por retração de terminais axônicos e/ou morte celular.

6 Referências Bibliográficas

AGGLETON, J.P., HUNT, P.R., NAGLE, S., NEAVE, N. 1996. The effects of selective lesions within the anterior thalamic nuclei on spatial memory in the rat. *Behav.Brain Res.*, **81**: 189-198.

AGMON, A., YANG, L.T., O'DOWD, D.K., JONES, E.G. 1993. Organized growth of thalamocortical axons from the deep tier of terminations into layer IV of developing mouse barrel cortex. *J.Neurosci.*, **13**: 5365-5382.

ALLENDOERFER, K.L., SHATZ, C.J. 1994. The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu.Rev.Neurosci.*, **17**: 185-218.

ALTMAN, J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J.Comp.Neurol.*, **137**: 433-457.

ALTMAN, J., BAYER, S.A. 1979a. Development of the diencephalon in the rat. V. Thymidine-radiographic observations on internuclear and intranuclear gradients in the thalamus. *J.Comp.Neurol.*, **188**: 473-499.

ALTMAN, J., BAYER, S.A. 1979b. Development of the diencephalon in the rat. VI. Reevaluation of the embryonic development of the thalamus on the basis of thymidineradiographic datings. *J.Comp.Neurol.*, **188**: 501-524.

ALTMAN, J., BAYER, S.A. 1988. Development of the rat thalamus: I. Mosaic organization of the thalamic neuroepithelium. *J.Comp.Neurol.*, **275**: 346-377.

ALTMAN, J., BAYER, S.A. 1990. Vertical compartmentation and cellular transformations in the germinal matrices of the embryonic rat cerebral cortex. *Exp.Neurol.*, **107**: 23-35.

ASSAL, F., INNOCENTI, G.M. 1993. Transient intra-areal axons in developing cat visual cortex. *Cereb.Cortex*, **3**: 290-303.

BARDE, Y.A. 1989. Trophic factors and neuronal survival. Neuron, 2: 1525-1534.

BARRES, B.A., HART, I.K., COLES, H.S., BURNE, J.F., VOYVODIC, J.T., RICHARDSON, W.D., RAFF, M.C. 1992. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, **70**: 31-46.

BAYER, S.A., ALTMAN, J. 1990. Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. *Exp.Neurol.*, **107** : 48-62.

BECKSTEAD, R.M. 1976. Convergent thalamic and mesencephalic projections to the anterior medial cortex in the rat. *J.Comp.Neurol.*, 166: 403-416.

BENEVENTO, L.A., EBNER, F.F. 1971. The contribution of the dorsal lateral geniculate nucleus to the total pattern of thalamic terminations in striate cortex of the Virginia opossum. *J.Comp.Neurol.*, 143: 243-260.

BERBEL, P., GUADANO-FERRAZ, A., MARTINEZ, M., QUILES, J.A., BALBOA, R., INNOCENTI, G.M. 1993. Organization of auditory callosal connections in hypothyroid adult rats. *Eur.J.Neurosci.*, **5**: 1465-1478.

BLUE, M.E., PARNAVELAS, J.G. 1983. The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis. *J.Neurocytol.*, **12**: 697-712.

BOURASSA, J., DESCHENES, M. 1995. Corticothalamic projections from the primary visual cortex in rats: a single fiber study using biocytin as an anterograde tracer. *Neuroscience*, **66**: 253-263.

BRAGA-DE-SOUZA, S., LENT, R. 2004. Temporal and spatial regulation of chondroitin sulfate, radial glial cells, growing commissural axons, and other hippocampal efferents in developing hamsters. *J.Comp.Neurol.*, **468**: 217-232.

BRAISTED, J.E., TUTTLE, R., O'LEARY, D.D.M. 1999. Thalamocortical axons are influenced by chemorepellent and chemoattractant activities localized to decision points along their path. *Dev.Biol.*, **208**: 430-440.

BRUCE, L.L., CHRISTENSEN, M.A., FRITZSCH, B. 1997. Electron microscopic differentiation of directly and transneuronally transported DiI and applications for studies of synaptogenesis. *J.Neurosci.Methods*, **73**: 107-112.

BULLIER, J., KENNEDY, H., SALINGER, W.L. 1984. Bifurcation of subcortical afferents to visual areas 17, 18 and 19 in the cat cortex. *J.Comp.Neurol.*, 228: 309-328.

BUTLER, A.B. 1994. The evolution of the dorsal thalamus of jawed vertebrates, including mammals: cladistic analysis and a new hypothesis. *Brain Res.Rev.*, **19**: 29-65.

BYATT, G., DALRYMPLE-ALFORD, J.C. 1996. Both anteromedial and anteroventral thalamic lesions impair radial-maze learning in rats. *Behav.Neurosci.*, **110**: 1335-1348.

CAMPBELL, K. 2003. Dorsal-ventral patterning in the mammalian telencephalon. *Curr.Opin.Neurobiol.*, **13**: 50-56.

CASAGRANDE, V.A., SÁRY, G., ROYAL, D., RUIZ, O. 2005. On the impact of attention and motor planning on the lateral geniculate nucleus. *Prog.Brain Res.*, 149: 11-29.

CATALANO, S.M., ROBERTSON, R.T., KILLACKEY, H.P. 1996. Individual axon morphology and thalamocortical topography in developing rat somatosensory cortex. *J.Comp.Neurol.*, **367**: 36-53.

CAVALCANTE, J.S., COSTA, M.S.M.O., SANTEE, U.R., BRITTO, L.R.G. 2005. Retinal projections to the midline and intralaminar thalamic nuclei in the common marmoset *(Callithrix jacchus)*. *Brain Res.*, **1043**: 42-47.

CAVINESS, V.S., Jr. 1982. Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon ^[3H]thymidine autoradiography. *Brain Res.*, 256: 293-302.

CHANGEUX, J.P., DANCHIN, A. 1976. Selective stabilization of developing synapses, a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature*, **264**: 705-712.

CLARKE, P.G. 1985. Neuronal death during development in the isthmo-optic nucleus of the chick: sustaining role of afferents from the tectum. *J.Comp.Neurol.*, **234**: 365-379.

CLAVIER, R.M., ATMADJA, S., FIBIGER, H.C. 1976. Nigrothalamic projections in the rat as demonstrated by orthograde and retrograde tracing echniques. *Brain Res.Bull.*, 1: 379-384.

Cohen, S., Levi-Montalcini R. 1956. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **42** (9): 571-574.

COGGESHALL, R.E. 1964. A study of diencephalic development in the albino rat. *J.Comp.Neurol.*, **122**: 241-269.

COLEMAN, J., CLERICI, W.J. 1980. Extrastriate projections from thalamus to posterior occipital-temporal cortex in rat. *Brain Res.*, **194**: 205-209.

CONDE, F., MAIRE-LEPOIVRE, E., AUDINAT, E., CRÉPEL, F. 1995. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *J.Comp.Neurol.*, **352**: 567-593.

COOKE, B.M., SIMERLY, R.B. 2005. Ontogeny of bidirectional connections between the medial nucleus of the amygdala and the principal bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *J.Comp.Neurol.*, **489**: 42-58.

COOPER, B.G., MANKA, T.F., MIZUMORI, S.J. 2001. Finding your way in the dark: the retrosplenial cortex contributes to spatial memory and navigation without visual cues. *Behav.Neurosci.*, **115**: 1012-1028.

CRÉPEL, F., MARIANI, J., DELHAYE-BOUCHAUD, N. 1976. Evidence for a multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the immature rat cerebellum. *J.Neurobiol.*, **7**: 567-578.

CROPPER, E.C., EISENMAN, J.S. 1986. Localization of responses in the somatosensory thalamus of the rat. *Brain Res.Bull.*, 16: 83-91.

CRUIKSHANK, S.J., LANDISMAN, C.E., MANCILLA, J.G., CONNORS, B.W. 2005. Connexon connexions in the thalamocortical system. *Prog.Brain Res.*, 149: 41-57.

CURFS, M.H., GRIBNAU, A.A., DEDEREN, P.J. 1994. Selective elimination of transient corticospinal projections in the rat cervical spinal cord gray matter. *Dev.Brain Res.*, **78**: 182-190.

CURFS, M.H., GRIBNAU, A.A., DEDEREN, P.J., BERGERVOET-VERNOOIJ, H.W. 1995. Transient functional connections between the developing corticospinal tract and cervical spinal interneurons as demonstrated by c-fos immunohistochemistry. *Dev.Brain Res.*, **87**: 214-219.

DAVIDSON, N. 1965. The projection of afferent pathways on the thalamus of the rat. *J.Comp.Neurol.*, **124**: 377-390.

DAVIES, A.M., BANDTLOW, C., HEUMANN, R., KORSCHING, S., ROHRER, H., THOENEN, H. 1987. Timing and site of nerve growth factor synthesis in developing skin in relation to innervation and expression of the receptor. *Nature*, **326**: 353-358.

DE FELIPE, J., MARCO, P., FAIREN, A., JONES, E.G. 1997. Inhibitory synaptogenesis in mouse somatosensory cortex. *Cereb.Cortex*, **7**: 619-634.

DEAZEVEDO, L.C., HEDIN-PEREIRA, C., LENT, R. 1997. Callosal neurons in the cingulate cortical plate and subplate of human fetuses. *J.Comp.Neurol.*, **386**: 60-70.

DEAZEVEDO, L.C., FALLET, C., MOURA-NETO, V., DAUMAS-DUPORT, C., HEDIN-PEREIRA, C., LENT, R. 2003. Cortical radial glial cells in human fetuses: depth-correlated transformation into astrocytes. *J.Neurobiol.*, **55**: 288-298.

DEHAY, C., SAVATIER, P., CORTAY, V., KENNEDY, H. 2001. Cell-cycle kinetics of neocortical precursors are influenced by embryonic thalamic axons. *J.Neurosci.*, **21**: 201-214.

DISTEL, H., HOLLANDER, H. 1980. Autoradiographic tracing of developing subcortical projections of the occipital region in fetal rabbits. *J.Comp.Neurol.*, **192**: 505-518.

DOMESICK, V.B. 1972. Thalamic relationships of the medial cortex in the rat. *Brain Behav.Evol.*, **6**: 457-483.

DONOGHUE, J.P., KERMAN, K.L., EBNER, F.F. 1979. Evidence for two organizational plans within the somatic sensory-motor cortex of the rat. *J.Comp.Neurol.*, 183: 647-663.

DONOGHUE, J.P., WISE, S.P. 1982. The motor cortex of the rat: cytoarchitecture and microstimulation mapping. *J.Comp.Neurol.*, 212: 76-88.

DORON, N., WOLLBERG, Z. 1994. Cross-modal neuroplasticity in the blind mole rat *Spalax ehrenbergi*: a WGA-HRP tracing study. *Neuroreport*, **5**: 2697-2701.

DREHER, B., DEHAY, C., BULLIER, J. 1990. Bihemispheric collateralization of the cortical and subcortical afferents to the rat's cisual cortex. *Eur.J.Neurosci.*, **2**: 317-331.

EBBESSON, S.O. 1970. On the organization of central visual pathways in vertebrates. *Brain Behav.Evol.*, **3**: 178-194.

EBBESSON, S.O. 1972. A proposal for a common nomenclature for some optic nuclei in vertebrates and the evidence for a common origin of two such cell groups. *Brain Behav.Evol.*, **6**: 75-91.

ELBERGER, A.J. 1994. Transitory corpus callosum axons projecting throughout developing rat visual cortex revealed by Dil. *Cereb.Cortex*, **4**: 279-299.

ELLIS, R.E., YUAN, J.Y., HORVITZ, H.R. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu.Rev.Cell Biol.*, **7**: 663-698.

EWERT, J.P., MATSUMOTO, N., SCHWIPPERT, W.W. 1985. Morphological identification of prey-selective neurons in the grass frog's optic tectum. *Naturwissenschaften*, **72**: 661-663.

FAULL, R.L.M. 1978. The cerebellofugal projections in the brachium conjunctivum of the rat. II. The ipsilateral and contralateral descending pathways. *J.Comp.Neurol.*, **178**: 495-517.

FAULL, R.L.M., MEHLER, W.R. 1985. Thalamus. *In:* **The rat nervous system.** PAXINOS, G. Editor, New York, Academic Press. pp: 129-168.

FERRER, I., TORTOSA, A., BLANCO, R., MARTIN, F., SERRANO, T., PLANAS, A., MACAYA, A. 1994. Naturally occurring cell death in the developing cerebral cortex of the rat. Evidence of apoptosis-associated internucleosomal DNA fragmentation. *Neurosci.Lett.*, **182**: 77-79.

FINLAY, B.L., WIKLER, K.C., SENGELAUB, D.R. 1987. Regressive events in brain development and scenarios for vertebrate brain evolution. *Brain Behav.Evol.*, **30**: 102-117.

FRANCIS, F., MEYER, G., FALLET-BIANCO, C., MORENO, S., KAPPELER, C., TUY, F.P., BELDJORD, C., CHELLY, J. 2006. Human disorders of cortical development: from past to present. *Eur. J. Neurosci.*, 23:877-893.

FRÉGNAC, Y., IMBERT, M. 1984. Development of neuronal selectivity in primary visual cortex of cat. *Physiol.Rev.*, 64: 325-434.

FRIEDMAN, D.I., JOHNSON, J.K., CHORSKY, R.L., STOPA, E.G. 1991. Labeling of human retinohypothalamic tract with the carbocyanine dye, Dil. *Brain Res.*, 560: 297-302.

FRITZSCH, B., WILM, C. 1990. Dextran amines in neuronal tracing. *Trends Neurosci.*, 13: 14.

FRITZSCH, B., WILM, C. 1992. The development of ipsilateral retinal projections into the tectum in the cichlid fish *Haplochromis burtoni*: a Dil study in fixed tissue. *J.Neurobiol.*, 23: 708-719.

FROST, D.O. 1984. Axonal growth and target selection during development: retinal projections to the ventrobasal complex and other "nonvisual" structures in neonatal Syrian hamsters. *J.Comp.Neurol.*, **230**: 576-592.

FROST, D.O. 1986. Development of anomalous retinal projections to nonvisual thalamic nuclei in Syrian hamsters: a quantitative study. *J.Comp.Neurol.*, **252**: 95-105.

FURTADO, D. 2005. *Evolução e morfogênese de circuitos do córtex cerebral de mamíferos*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

GADISSEUX, J.F., KADHIM, H.J., VAN DEN BOSCH DE AGUILAR, CAVINESS, V.S., EVRARD, P. 1990. Neuron migration within the radial glial fiber system of the developing murine cerebrum: an electron microscopic autoradiographic analysis. *Dev.Brain Res.*, **52**: 39-56.

GALEA, M.P., DARIAN-SMITH, I. 1995. Postnatal maturation of the direct corticospinal projections in the macaque monkey. *Cereb.Cortex*, **5**: 518-540.

GARCEZ, P., HENRIQUE, N.P., FURTADO, D., BOLZ, J., LENT, R., UZIEL, D. 2007. Axons of callosal neurons bifurcate transiently at the white matter before consolidating an interhemispheric projection. *Eur.J.Neurosci. In press.*

GAREY, L.J., POWELL, T.P.S. 1967. The projection of the lateral geniculate nucleus upon the cortex in the cat. *Proc.Roy.Soc.Biol.*, **169**: 107-126.

GAREY, L.J., DREHER, B., ROBINSON, S.R. 1991. The organization and the visual thalamus. *In: Neuroanatomy of the visual pathways and their development*, DREHER, B., ROBINSON, S.R. Editores, London, McMillan Press, pp: 176-234.

GAURIAN, C., BERNARD, J.F. 2002. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp. Physiol.*, **87**:251-258.

GEISERT, E.E., Jr. 1980. Cortical projections of the lateral geniculate nucleus in the cat. *J.Comp.Neurol.*, **190**: 793-812.

GERFEN, C.R., CLAVIER, R.M. 1979. Neural inputs to the prefrontal agranular insular cortex in the rat: horseradish peroxidase study. *Brain Res.Bull.*, **4**: 347-353.

GHOSH, A., SHATZ, C.J. 1992. Involvement of subplate neurons in the formation of ocular dominance columns. *Science*, **255**: 1441-1443.

GODEMENT, P., VANSELOW, J., THANOS, S., BONHOEFFER, F. 1987. A study in developping visual system with a new method of staining neurons and their processes in fixed tissue. *Development*, **101**: 697-713.

GOULD, H.J., III, HALL, W.C., EBNER, F.F. 1978. Connections of the visual cortex in the hedgehog (*Paraechinus hypomelas*). I. Thalamocortical projections. *J.Comp.Neurol.*, **177**: 445-472.

GRAVEL, C., SASSEVILLE, R., HAWKES, R. 1990. Maturation of the corpus callosum of the rat: II. Influence of thyroid hormones on the number and maturation of axons. *J.Comp.Neurol.*, **291**: 147-161.

GRAY, G.E., SANES, J.R. 1992. Lineage of radial glia in the chicken optic tectum. *Development*, **114**: 271-283.

GROVE, E.A., FUKUCHI-SHIMOGORI, T. 2003. Generating the cerebral cortical area map. *Annu.Rev.Neurosci.*, **26**: 355-380.

GUANDALINI, P. 1998. The corticocortical projections of the physiologically defined eye field in the rat medial frontal cortex. *Brain Res.Bull.*, 47: 377-385.

GUILLERY, R.W., FEIG, S.L., VAN LIESHOUT, D.P. 2001. Connections of higher order visual relays in the thalamus: a study of corticothalamic pathways in cats. *J.Comp.Neurol.*, **438**: 66-85.

GUILLERY, R.W., SHERMAN, S.M. 2002. The thalamus as a monitor of motor outputs. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, **357**: 1809-1821.

HAMBURGER, V., LEVI-MONTALCINI, R. 1949. Proliferation, differenciation and degereration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J.Exp.Zool.*, **111**: 457-501.

HARRIS, W.A., HOLT, C.E., BONHOEFFER, F. 1987. Retinal axons with and without their somata, growing to and arborizing in the tectum of Xenopus embryos: a time-lapse video study of single fibres in vivo. *Development*, **101**: 123-133.
HASHIMOTO-TORII, K., MOTOYAMA, J., HUI, C.C., KUROIWA, A., NAKAFUKU, M., SHIMAMURA, K. 2003. Differential activities of Sonic hedgehog mediated by Gli transcription factors define distinct neuronal subtypes in the dorsal thalamus. *Mech.Dev.*, **120**: 1097-1111.

HEDIN-PEREIRA, C. 1989. *Desenvolvimento das conexões calosas e córtico-corticais ipsolaterais no hamster*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro..

HEDIN-PEREIRA, C., UZIEL, D., LENT, R. 1992. Bicommissural neurones in the cerebral cortex of developing hamsters. *Neuroreport*, **3**: 873-876.

HEDIN-PEREIRA, C., LENT, R., JHAVERI, S. 1999. Morphogenesis of callosal arbors in the parietal cortex of hamsters. *Cereb.Cortex*, **9**: 50-64.

HERBIN, M., MICELI, D., REPERANT, J., MASSICOTTE, G., ROY, G. 2000. Postnatal development of thalamocortical projections upon striate and extrastriate visual cortical areas in the cat. *Anat.Embryol.(Berl)*, **202**: 431-442.

HEREDIA, M., SANTACANA, M., VALVERDE, F. 1991. A method using DiI to study the connectivity of cortical transplants. *J.Neurosci.Methods*, **36**: 17-25.

HERKENHAM, M. 1978. The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J.Comp.Neurol.*, **177**: 589-610.

HERKENHAM, M. 1979. The afferent and efferent connections of the ventromedial thalamic nucleus in the rat. *J.Comp.Neurol.*, 183: 487-517.

HOFFMANN, K.P. 1989. Control of the optokinetic reflex by the nucleus of the optic tract in primates. *Prog.Brain Res.*, 80: 173-182.

HOLMQVIST, B.I., OSTHOLM, T., EKSTROM, P. 1992. Dil tracing in combination with immunocytochemistry for analysis of connectivities and chemoarchitectonics of specific neural systems in a teleost, the Atlantic salmon. *J.Neurosci.Methods*, **42**: 45-63.

HONIG, M.G., HUME, R.I. 1986. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J.Cell Biol.*, **103**: 171-187.

HONIG, M.G., HUME, R.I. 1989. Dil and diO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends Neurosci.*, **12**: 333.

HORIKAWA, K., KINJO, N., STANLEY, L.C., POWELL, E.W. 1988. Topographic organization and collateralization of the projections of the anterior and laterodorsal thalamic nuclei to cingulate areas 24 and 29 in the rat. *Neurosci.Res.*, **6**: 31-44.

HOUZEL, J.C., CARVALHO, M.L., LENT, R. 2002. Interhemispheric connections between primary visual areas: beyond the midline rule. *Braz. J.Med.Biol.Res.*, **35**: 1441-1453.

HUBEL, D.H., WIESEL, T.N., LEVAY, S. 1977. Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex. *Philos.Trans.R.Soc.Lond. B Biol.Sci.*, **278**: 377-409.

HUGHES, H.C. 1977. Anatomical and neurobehavioral investigations concerning the thalamo-cortical organization of the rat's visual system. *J.Comp.Neurol.*, **175**: 311-336.

ILLING, R.B., WASSLE, H. 1981. The retinal projection to the thalamus in the cat: a quantitative investigation and a comparison with the retinotectal pathway. *J.Comp.Neurol.*, **202**: 265-285.

INNOCENTI, G.M., FIORE, L., CAMINITI, R. 1977. Exuberant projection into the corpus callosum from the visual cortex of newborn cats. *Neurosci.Lett.*, **4**: 237-242.

INNOCENTI, G.M., FROST, D.O. 1979. Effects of visual experience on the maturation of the efferent system to the corpus callosum. *Nature*, **280**: 231-234.

INNOCENTI, G.M. 1981. Growth and reshaping of axons in the establishment of visual callosal connections. *Science*, **212**: 824-827.

INNOCENTI, G.M. 1991. The development of projections from cerebral cortex. *Prog.Sens.Physiol.*, **12**: 65-114.

INNOCENTI, G.M. 1995. Exuberant development of connections, and its possible permissive role in cortical evolution. *Trends Neurosci.*, **18**: 397-402.

INNOCENTI, G.M., PRICE, D.J. 2005. Exuberance in the development of cortical networks. *Nat.Rev.Neurosci.*, **6**: 955-965.

ISHIZUKA, N. 2001. Laminar organization of the pyramidal cell layer of the subiculum in the rat. *J.Comp.Neurol.*, **435**: 89-110.

IZRAELI, R., KOAY, G., LAMISH, M., HEICKLEN-KLEIN, A.J., HEFFNER, H.E., HEFFNER, R.S., WOLLBERG, Z. 2002. Cross-modal neuroplasticity in neonatally enucleated hamsters: structure, electrophysiology and behaviour. *Eur.J.Neurosci.*, **15**: 693-712.

JACOBSON, S. 1963. Sequence of myelinization in the brain of the albino rat. A. Cerebral cortex, thalamus and related structures. *J.Comp.Neurol.*, **121**: 5-29.

JESSELL, T.M. 2000. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat.Rev.Genet.*, **1**: 20-29.

JOHNSON, E.M., Jr., DECKWERTH, T.L. 1993. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu.Rev.Neurosci.*, 16: 31-46.

JONES, E.G. 1983. The thalamus. *In:* Chemical neuroanatomy. EMSON, P.C. Editor, New York, Raven Press. pp: 258-293.

JONES, E.G. 2001. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci.*, **24**: 595-601.

KANOLD, P.O., KARA, P., REID, R.C., SHATZ, C.J. 2003. Role of subplate neurons in functional maturation of visual cortical columns. *Science*, **301**: 521-525.

KATZ, L.C., SHATZ, C.J. 1996. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*, **274**: 1133-1138.

KATO, N. 1987. Postnatal development of the striate cortical projection onto the extrageniculate visual thalamus in the cat: an HRP study. *Exp.Brain Res.*, 67: 119-126.

KENNEDY, H., BULLIER, J. 1985. A double-labeling investigation of the afferent connectivity to cortical areas V1 and V2 of the macaque monkey. *J.Neurosci.*, **5**: 2815-2830.

KILLACKEY, H.P., EBNER, F. 1973. Convergent projection of three separate thalamic nuclei on to a single cortical area. *Science*, **179**: 283-285.

KRETTEK, J.E., PRICE, J.L. 1977. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J.Comp.Neurol.*, **171**: 157-191.

LAEMLE, L.K., STROMINGER, N.L., CARPENTER, D.O. 2006. Cross-modal innervation of primary visual cortex by auditory fibers in congenitally anophthalmic mice. *Neurosci.Lett.*, **396**: 108-112.

LENT, R., HEDIN-PEREIRA, C., MENEZES, J.R., JHAVERI, S. 1990. Neurogenesis and development of callosal and intracortical connections in the hamster. *Neuroscience*, **38**: 21-37.

LENT, R., GUIMARAES, R.Z.P. 1991. Development of paleocortical projections through the anterior commissure of hamsters adopts progressive, not regressive, strategies. *J.Neurobiol.*, **22**: 475-498.

LENT, R. 2002. Cem bilhôes de neurônios. Rio de Janeiro, RJ, Atheneu. pp: 1-698.

LEONARD, C.M. 1969. The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. *Brain Res.*, **12**: 321-343.

LEVAY, S., STRYKER, M.P., SHATZ, C.J. 1978. Ocular dominance columns and their development in layer IV of the cat's visual cortex: a quantitative study. *J.Comp.Neurol.*, **179**: 223-244.

LEVENTHAL, A.G., SCHALL, J.D., AULT, S.J., PROVIS, J.M., VITEK, D.J. 1988. Classspecific cell death shapes the distribution and pattern of central projection of cat retinal ganglion cells. *J.Neurosci.*, **8**: 2011-2027.

LEVI-MONTALCINI, R. 1952. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann. N Y Acad. Sci.* 8; **55** (2): 330-344.

LI, C.P., OLAVARRIA, J.F., GREGER, B.E. 1995. Occipital cortico-pyramidal projection in hypothyroid rats. *Dev.Brain Res.*, **89**: 227-234.

LIM, Y., GOLDEN, J.A. 2006. Patterning the developing diencephalon. *Brain Res.Rev.*, **53**:17-26

LINDEN, R., PERRY, V.H. 1983. Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res.*, 272: 145-149.

LINDEN, R. 1994. The survival of developing neurons: a review of afferent control. *Neuroscience*, **58**: 671-682.

LIU, P., JARRARD, L.E., BILKEY, D.K. 2001. Excitotoxic lesions of the pre- and parasubiculum disrupt object recognition and spatial memory processes. *Behav.Neurosci.*, **115**: 112-124.

LOPEZ-BENDITO, G., MOLNAR, Z. 2003. Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat.Rev.Neurosci.*, **4**: 276-289.

LORENTE DE NÓ, R. 1922. La corteza cerebral del raton - Primera contribucion: La corteza acustica. *Trab.Lab.Invest.Biol.Univ.Madrid*, **20**: 41-78.

LUND, R.D., MUSTARI, M.J. 1977. Development of the geniculocortical pathway in rats. *J.Comp.Neurol.*, **173**: 289-306.

LUSKIN, M.B. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, **11**: 173-189.

MANGER, P.R., ROSA, M.G. 2005. Visual thalamocortical projections in the flying fox: parallel pathways to striate and extrastriate areas. *Neuroscience*, **130**: 497-511.

MARIN-PADILLA, M. 1992. Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: a unifying theory. *J.Comp.Neurol.*, **321**: 223-240.

MARTIN, P.R. 1986. The projection of different retinal ganglion cell classes to the dorsal lateral geniculate nucleus in the hooded rat. *Exp.Brain Res.*, **62**: 77-88.

MARTINOU, J.C., BIERER, F., LE VAN, T.A., WEBER, M.J. 1989. Influence of the culture substratum on the expression of choline acetyltransferase activity in purified motoneurons from rat embryos. *Dev.Brain Res.*, **47**: 251-262.

MASON, R., GROOS, G.A. 1981. Cortico-recipient and tecto-recipient visual zones in the rat's lateral posterior (pulvinar) nucleus: an anatomical study. *Neurosci.Lett.*, **25**: 107-112.

MCALLISTER, J.P., II, DAS, G.D. 1977. Neurogenesis in the epithalamus, dorsal thalamus and ventral thalamus of the rat: an autoradiographic and cytological study. *J.Comp.Neurol.*, **172**: 647-686.

MCCONNELL, S.K., KAZNOWSKI, C.E. 1991. Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science*, **254**: 282-285.

MEYER, G., SCHAAPS, J.P., MOREAU, L., GOFFINET, A.M. 2000. Embryonic and early fetal development of the human neocortex. *J.Neurosci.*, **20**: 1858-1868.

MICHEVA, K.D., BEAULIEU, C. 1996. Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry. *J.Comp.Neurol.*, **373**: 340-354.

MILLER, M.W., ASTLEY, S.J., CLARREN, S.K. 1999. Number of axons in the corpus callosum of the Mature macaca nemestrina: increases caused by prenatal exposure to ethanol. *J.Comp.Neurol.*, **412**: 123-131.

MOLNAR, Z., ADAMS, R., BLAKEMORE, C. 1998. Mechanisms underlying the early establishment of thalamocortical connections in the rat. *J.Neurosci.*, 18: 5723-5745.

NAEGELE, J.R., JHAVERI, S., SCHNEIDER, G.E. 1988. Sharpening of topographical projections and maturation of geniculocortical axon arbors in the hamster. *J.Comp.Neurol.*, **277**: 593-607.

NEGYESSY, L., GAL, V., FARKAS, T., TOLDI, J. 2000. Cross-modal plasticity of the corticothalamic circuits in rats enucleated on the first postnatal day. *Eur.J.Neurosci.*, **12**: 1654-1668.

NG, A.Y., STONE, J. 1982. The optic nerve of the cat: appearance and loss of axons during normal development. *Brain Res.*, 281: 263-271.

NOCTOR, S.C., FLINT, A.C., WEISSMAN, T.A., DAMMERMAN, R.S., KRIEGSTEIN, A.R. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, **409**: 714-720.

O'LEARY, D.D.M., STANFIELD, B.B., COWAN, W.M. 1981. Evidence that the early postnatal restriction of the cells of origin of the callosal projection is due to the elimination of axonal collaterals rather than to the death of neurons. *Brain Res.*, 227: 607-617.

O'LEARY, D.D.M. 1992. Development of connectional diversity and specificity in the mammalian brain by the pruning of collateral projections. *Curr.Opin.Neurobiol.*, **2**: 70-77.

OLAVARRIA, J.F., MONTERO, V.M. 1981. Reciprocal connections between the striate cortex and extrastriate cortical visual areas in the rat. *Brain Res.*, **217**: 358-363.

OLAVARRIA, J.F., VAN SLUYTERS, R.C. 1985. Organization and postnatal development of callosal connections in the visual cortex of the rat. *J.Comp.Neurol.*, 239: 1-26.

PARNAVELAS, J.G. 1999. Glial cell lineages in the rat cerebral cortex. *Exp.Neurol.*, 156: 418-429.

PAXINOS, G., ASHWELL, K.W., TÖRK, I. 1994. Atlas of the developing rat nervous system. San Diego, CA, Academic Press.

PERRY, V.H. 1980. A tectocortical visual pathway in the rat. *Neuroscience*, 5: 915-927.

PERRY, V.H., COWEY, A. 1984. Retinal ganglion cells that project to the superior colliculus and pretectum in the macaque monkey. *Neuroscience*, **12**: 1125-1137.

PINAULT, D. 2004. The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Res.Rev.*, **46**: 1-31.

PIRES-NETO, M.A., LENT, R. 1993. The prenatal development of the anterior commissure in hamsters: Pioneer fibers lead the way. *Dev.Brain Res.*, 72: 59-66.

PRATT, T., QUINN, J.C., SIMPSON, T.I., WEST, J.D., MASON, J.O., PRICE, D.J. 2002. Disruption of early events in thalamocortical tract formation in mice lacking the transcription factors *Pax6* or *Foxg1*. *J.Neurosci.*, 22: 8523-8531.

PRICE, D.J., BLAKEMORE, C. 1985. Regressive events in the postnatal development of association projections in the visual cortex. *Nature*, **316**: 721-724.

PRIVAT, A., LEBLOND, C.P. 1972. The subependymal layer and neighboring region in the brain of the young rat. *J.Comp.Neurol.*, 146: 277-302.

QU, J., ZHOU, X., ZHU, H., CHENG, G., ASHWELL, K.W., LU, F. 2005. Development of the human superior colliculus and the retinocollicular projection. *Exp.Eye Res.*, 82:300-310.

RAFOLS, J.A., MATZKE, H.A. 1970. Efferent projections of the superior colliculus in the opossum. *J.Comp.Neurol.*, **138**: 147-160.

RAKIC, P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J.Comp.Neurol.*, 145: 61-83.

RAKIC, P. 1974. Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science*, **183**: 425-427.

RAKIC, P. 1977. Prenatal development of the visual system in rhesus monkey. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, 278: 245-260.

RAKIC, P. 1981. Development of visual centers in the primate brain depends on binocular competition before birth. *Science*, **214**: 928-931.

RAKIC, P. 1990. Principles of neural cell migration. *Experientia*, 46: 882-891.

RAKIC, P. 2000. Illegal immigrations. Neuron, 27: 409-410.

RAMANATHAN, R., WILKEMEYER, M.F., MITTAL, B., PERIDES, G., CHARNESS, M.E. 1996. Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1. *J.Cell Biol.*, **133**: 381-390.

RAMÓN Y CAJAL, S. 1894. Les nouvelles idées sur la structure du système nerveux chez l'homme et chez les vertebrés. Paris, Reinwald.

RAPAPORT, D.H., WILSON, P.D. 1983. Retinal ganglion cell size groups projecting to the superior colliculus and the dorsal lateral geniculate nucleus in the North American opossum. *J.Comp.Neurol.*, **213**: 74-85.

REESE, B.E. 1984. The projection from the superior colliculus to the dorsal lateral geniculate nucleus in the rat. *Brain Res.*, **305**: 162-168.

ROBSON, J.A., HALL, W.C. 1976. Projections from the superior colliculus to the dorsal lateral geniculate nucleus of the grey squirrel (*Sciurus carolinensis*). *Brain Res.*, **113**: 379-385.

ROCKLAND, K.S. 1998. Convergence and branching patterns of round, type 2 corticopulvinar axons. *J.Comp.Neurol.*, **390**: 515-536.

RUBENSTEIN, J.L., SHIMAMURA, K., MARTINEZ, S., PUELLES, L. 1998. Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu.Rev.Neurosci.*, **21**: 445-477.

SACHS, G.M., JACOBSON, M., CAVINESS, V.S., Jr. 1986. Postnatal changes in arborization patterns of murine retinocollicular axons. *J.Comp.Neurol.*, 246: 395-408.

SCHEIFFELE, P. 2003. Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annu.Rev.Neurosci.*, **26**: 485-508.

SCHREYER, D.J., JONES, E.G. 1988. Axon elimination in the developing corticospinal tract of the rat. *Brain Res.*, **466**: 103-119.

SEFTON, A.J. 1968. The innervation of the lateral geniculate nucleus and anterior colliculus in the rat. *Vision Res.*, **8**: 867-881.

SEFTON, A.J., DREHER, B. 1985. Visual system. *In: The rat nervous system. Vol 1 Forebrain and midbrain*, PAXINOS, G. Editor, Sidney, Academic Press, pp: 169-221.

SHATZ, C.J., STRYKER, M.P. 1978. Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation. *J.Physiol.Lond.*, **281**: 267-283.

SHERMAN, S.M. 2001a. Thalamic relay functions. Prog. Brain Res., 134: 51-69.

SHERMAN, S.M. 2001b. Tonic and burst firing: dual modes of thalamocortical relay. *Trends Neurosci.*, 24: 122-126.

SHERMAN, S.M., GUILLERY, R.W. 2001. The afferent axons to the thalamus: Their structure and connections. *In:* **Exploring the thalamus and its role in cortical function.** SHERMAN, S.M., GUILLERY, R.W. Editores, San Diego, Academic Press. pp: 77-136.

SHERMAN, S.M., GUILLERY, R.W. 2002. The role of the thalamus in the flow of information to the cortex. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, **357**: 1695-1708.

SHERMAN, S.M. 2005. Thalamic relays and cortical functioning. *Prog.Brain Res.*, 149: 107-126.

SHIBATA, H. 1998. Organization of projections of rat retrosplenial cortex to the anterior thalamic nuclei. *Eur.J.Neurosci.*, **10**: 3210-3219.

SHIBATA, H. 2000. Organization of retrosplenial cortical projections to the laterodorsal thalamic nucleus in the rat. *Neurosci.Res.*, **38**: 303-311.

SHIBATA, H., NAITO, J. 2005. Organization of anterior cingulate and frontal cortical projections to the anterior and laterodorsal thalamic nuclei in the rat. *Brain Res.*, **1059**: 93-103.

SHIGENAGA, Y., TAKABATAKE, M., SUGIMOTO, T., SAKAI, A. 1979. Neurons in marginal layer of trigeminal nucleus caudalis projecting to ventrobasal complex (VG) and posterior nuclear group (PO) demonstrated by retrograde labeling with horseradish peroxidase. *Brain Res.*, **166**: 391-396.

SHIMADA, M., LANGMAN, J. 1970. Cell proliferation, migration and differentiation in the cerebral cortex of the golden hamster. *J.Comp.Neurol.*, **139**: 227-244.

SIMPSON, J.I., GIOLLI, R.A., BLANKS, R.H. 1988. The pretectal nuclear complex and the accessory optic system. *Rev.Oculomot.Res.*, 2: 335-364.

SINGER, W. 1995. Development and plasticity of cortical processing architectures. *Science*, **270**: 758-764.

SMART, I.H. 1973. Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *J.Anat.*, **116**: 67-91.

SPIRO, T., MASSOPUST, L.C., YOUNG, P.A. 1980. Efferent projections of the lateral dorsal nucleus in the rat. *Exp.Neurol.*, **68**: 171-184.

SPOHR, H.L., WILLMS, J., STEINHAUSEN, H.C. 1993. Prenatal alcohol exposure and long-term developmental consequences. *Lancet*, **341**: 907-910.

SPREAFICO, R., FRASSONI, C., ARCELLI, P., SELVAGGIO, M., DE BIASI, S. 1995. In situ labeling of apoptotic cell death in the cerebral cortex and thalamus of rats during development. *J.Comp.Neurol.*, **363**: 281-295.

STANFIELD, B.B., O'LEARY, D.D.M., FRICKS, C. 1982. Selective collateral elimination in early postnatal development restricts cortical distribution of rat pyramidal tract neurones. *Nature*, **298**: 371-373.

STANFIELD, B.B., O'LEARY, D.D.M. 1985. The transient corticospinal projection from the occipital cortex during the postnatal development of the rat. *J.Comp.Neurol.*, 238: 236-248.

SUPER, H., SORIANO, E., UYLINGS, H.B. 1998. The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res.Rev.*, 27: 40-64.

SUR, M., LEAMEY, C. A. 2001. Development and plasticity of cortical areas and networks. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2** :251-262, 2001.

TARABYKIN, V., STOYKOVA, A., USMAN, N., GRUSS, P. 2001. Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Development*, **128**: 1983-1993.

TEMPLE, S., QIAN, X. 1995. bFGF, neurotrophins, and the control or cortical neurogenesis. *Neuron*, **15**: 249-252.

TESSIER-LAVIGNE, M., GOODMAN, C.S. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science*, **274**: 1123-1133.

THANOS, S., FISCHER, D., PAVLIDIS, M, HEIDUSCHKA, P., BODEUTSCH, N. 2000. Glioanatomy assessed by cell-cell interactions and phagocytotic labelling. *J.Neurosci.Methods*, **103**:39-50.

TUTTLE, R., NAKAGAWA, Y., JOHNSON, J.E., O'LEARY, D.D.M. 1999. Defects in thalamocortical axon pathfinding correlate with altered cell domains in *Mash-1*-deficient mice. *Development*, **126**: 1903-1916.

UZIEL, D., MUHLFRIEDEL, S., ZARBALIS, K., WURST, W., LEVITT, P., BOLZ, J. 2002. Miswiring of limbic thalamocortical projections in the absence of ephrin-A5. *J.Neurosci.*, **22**: 9352-9357.

UZIEL, D., GARCEZ, P., LENT, R., PEUCKERT, C., NIEHAGE, R., WETH, F., BOLZ, J. 2006. Connecting thalamus and cortex: the role of ephrins. *Anat.Rec.A Discov.Mol.Cell Evol.Biol.*, **288**: 135-142.

VAN DER WERF, Y.D., WITTER, M.P., GROENEWEGEN, H.J. 2002. The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res.Rev.*, **39**: 107-140.

VAN ESSEN, D.C. 2005. Corticocortical and thalamocortical information flow in the primate visual system. *Prog.Brain Res.*, 149: 173-185.

VAN GROEN, T., KADISH, I., WYSS, J.M. 1999. Efferent connections of the anteromedial nucleus of the thalamus of the rat. *Brain Res.Rev.*, **30**: 1-26.

VANDERHAEGHEN, P., POLLEUX, F. 2004. Developmental mechanisms patterning thalamocortical projections: intrinsic, extrinsic and in between. *Trends Neurosci.*, 27: 384-391.

VARGO, J.M., CORWIN, J.V., KING, V., REEP, R.L. 1988. Hemispheric asymmetry in neglect produced by unilateral lesions of dorsomedial prefrontal cortex in rats. *Exp.Neurol.*, **102**: 199-209.

VERCELLI, A., REPICI, M., GARBOSSA, D., GRIMALDI, A. 2000. Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res.Bull.*, **51**: 11-25.

WAITE, P.M. 1973. Somatotopic organization of vibrissal responses in the ventro-basal complex of the rat thalamus. *J.Physiol.Lond.*, **228**: 527-540.

WAITE, P.M., LI, L., ASHWELL, K.W. 1992. Developmental and lesion induced cell death in the rat ventrobasal complex. *Neuroreport*, **3**: 485-488.

WARBURTON, E.C., BAIRD, A.L., AGGLETON, J.P. 1997. Assessing the magnitude of the allocentric spatial deficit associated with complete loss of the anterior thalamic nuclei in rats. *Behav.Brain Res.*, **87**: 223-232.

WEBSTER, M.J., UNGERLEIDER, L.G., BACHEVALIER, J. 1991. Connections of inferior temporal areas TE and TEO with medial temporal-lobe structures in infant and adult monkeys. *J.Neurosci.*, **11**: 1095-1116.

WILKEMEYER, M.F., ANGELIDES, K.J. 1996. Addition of tetrodotoxin alters the morphology of thalamocortical axons in organotypic cocultures. *J.Neurosci.Res.*, **43**: 707-718.

WILLIAMS, R.W., CAVADA, C., REINOSO-SUAREZ, F. 1993. Rapid evolution of the visual system: a cellular assay of the retina and dorsal lateral geniculate nucleus of the Spanish wildcat and the domestic cat. *J.Neurosci.*, **13**:208-228.

WISE, S.P., JONES, E.G. 1976. The organization and post-natal development of the commissural projection of the rat somatic sensory cortex. *J.Comp.Neurol.*, 168: 313-344.

WISE, S.P., JONES, E.G. 1978. Developmental studies of thalamocortical and commissural connections in the rat somatic sensory cortex. *J.Comp.Neurol.*, **178**: 187-208.

WONG, R.O., HUGHES, A. 1987. Role of cell death in the topogenesis of neuronal distributions in the developing cat retinal ganglion cell layer. *J.Comp.Neurol.*, 262: 496-511.

WYSS, J.M., SWANSON, L.W., COWAN, W.M. 1979. A study of subcortical afferents to the hippocampal formation in the rat. *Neuroscience*, **4**: 463-476.

ZECEVIC, N., BOURGEOIS, J.P., RAKIC, P. 1989. Changes in synaptic density in motor cortex of rhesus monkey during fetal and postnatal life. *Dev.Brain Res.*, **50**: 11-32.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo