

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO EM NEUROCIÊNCIAS**

**PADRÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO  
E RECEPTORES DE GLUTAMATO DO TIPO AMPA EM NÚCLEOS  
PRÉ-TECTAIS DE PINTOS (*Gallus domesticus*)**

**RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS**

**FLORIANÓPOLIS**

**2000**

**RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS**

**PADRÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO  
E RECEPTORES DE GLUTAMATO DO TIPO AMPA EM NÚCLEOS  
PRÉ-TECTAIS DE PINTOS (*Gallus domesticus*)**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Neurociências, sob a orientação do Prof. Dr. Cláudio Antônio Barbosa de Toledo.

**FLORIANÓPOLIS**

**2000**

**“ PADRÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO E RECEPTORES DE GLUTAMATO DO TIPO AMPA EM NÚCLEOS PRÉ-TECTAIS DE PINTOS (*Gallus*)”.**

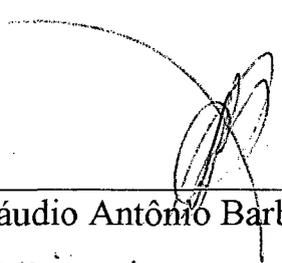
**RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS**

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

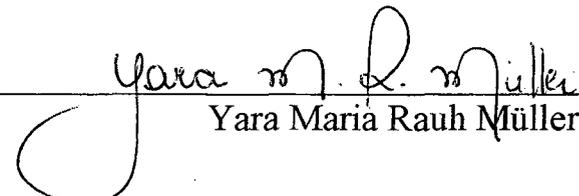
Orientador



---

Cláudio Antônio Barbosa de Toledo

Coordenadora do Curso



---

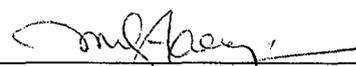
Yara Maria Rauh Müller

Banca Examinadora



---

Cláudio Antônio Barbosa de Toledo (Presidente)



---

Mariana Graciela Terenzi



---

Geraldo Morgado Fagundes

## FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Rita de Cássia dos.

Padrão da expressão de proteínas ligantes de cálcio e receptores de glutamato do tipo AMPA em núcleos pré-tectais de pintos (*Gallus domesticus*) / Rita de Cássia dos Santos – Florianópolis, 2000.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Toledo, Cláudio Antônio Barbosa de.

Descritores: 1. Área pré-tectal 2. Proteínas ligantes de cálcio 3. Receptores de glutamato do tipo AMPA 4. Imunohistoquímica 5. Pintos

## RESUMO

Uma das características da visão perfeita é a capacidade de fixar o olhar sobre o alvo desejado. Esta capacidade é influenciada pela região pré-tectal, que em aves fica na transição meso-diencefálica. Através de aferências direta da retina ou indireta (via núcleos associados aos gânglios basais), esta área integra-se ao substrato de vários reflexos oculares. Apesar de sua importância no controle visuo-motor fino, há grande desinformação sobre muitas das propriedades anatomofisiológicas deste sistema. Não existem dados, por exemplo, que indiquem como alguns destes núcleos conseguem manter uma elevada taxa de descarga neural. Sendo o glutamato um importante agente excitatório no sistema nervoso central, decidiu-se investigar a hipótese da participação desse neurotransmissor em núcleos do pré-tecto. Com esta finalidade foi estudada a presença e a distribuição das quatro subunidades que formam os receptores de glutamato do tipo AMPA (GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4), uma classe de receptores excitatórios ativados por glutamato, em três núcleos pré-tectais do cérebro de aves: o núcleo pré-tectal (PT), o núcleo espiriforme lateral (SpL) e o núcleo espiriforme medial (SpM). Foi utilizado o padrão de expressão de três proteínas ligantes de cálcio: a parvalbumina (PV), a calbindina (CB) e a calretinina (CR), como um guia histológico a fim de melhor identificar cada núcleo pré-tectal. Foram feitos cortes de cérebro da área pré-tectal de pintos de 10 a 15 dias (*Gallus domesticus*), os quais foram processados pela técnica de imuno-histoquímica. O material foi analisado em microscopia óptica convencional. O PT tem a forma elíptica, é composto por um núcleo e uma porção que o envolve e apresentou marcações PV+ e CR+, com fibras e corpos celulares bem marcados, porém sem a presença de imunomarcção para CB. No SpL, muitas células e processos PV+ e CB+ foram vistos, no entanto, apenas fibras CR+ foram encontradas dentro deste núcleo. O SpM pareceu conter imunorreatividade positiva somente para CR, com células e processos bem marcados. Os resultados utilizando os anticorpos contra as subunidades de receptores de glutamato do tipo AMPA indicaram que o PT pode conter receptores formados pelas subunidades GluR1 e GluR2. O SpL apresentou imunorreatividade para as subunidades GluR2, GluR3 e GluR4, enquanto o SpM pareceu conter GluR1, GluR2 e GluR3. Considerando que o significado funcional destes dados ainda necessita de estudos adicionais, os dados obtidos sugerem, até o presente momento, que estes três núcleos estão sob forte aferência excitatória glutamatérgica mediada por receptores do tipo AMPA. A presença das proteínas ligantes de cálcio sugere que elas podem ser uma ferramenta histológica útil para a identificação dos diferentes grupos celulares pré-tectais no cérebro de aves.

## ABSTRACT

A characteristic of perfect sight is the capacity of fixing the look on the desired target. This capacity is influenced by the pretectal region, which, in birds, is located in the mesodiencephalic transition. Through direct or indirect (via nuclei associated with basal ganglia) retina afferent impulses, such an area is integrated to the substratum of several ocular reflex actions. Despite its importance for the fine visual motor control, there is not much information on the anatomic and physiologic properties of this system. There are no data, for instance, indicating how some of such nuclei are able to maintain a high neural discharge rate. Since glutamate is an important excitant agent in the central nervous system, one decided to investigate the hypothesis of the participation of such a neurotransmitter in pretectal nuclei. Therefore, the presence and distribution of the four sub-units which form the glutamate receptors of type AMPA (GluR1, GluR2, GluR3 and GluR4) were studied. This is a class of excitant receptors activated by glutamate in three pretectal nuclei inside the brain of birds: the pretectal nucleus (PT), the lateral coiled nucleus (SpL) and the medial coiled nucleus (SpM). In order to better identify each pretectal nucleus, the expression pattern of three Calcium linking proteins—the parvalbumin (PV), the calbindine (CB), and the calretinene (CR)—was used as a histologic guide. Brain cuts were undertaken on the pretectal zone of young chicken, 10 to 15 days-old (*Gallus domesticus*), processed through an immune-histochemical technique. The material was analyzed through conventional optic microscopy. The PT has an elliptic form and is composed by a nucleus and a portion which involves it; it presented PV+ and CR+ markings, with well-marked fibers and cell bodies but with no immune-markings for CB. In the SpL, several PV+ and CB+ cells and processes were detected but only CR+ fibers were found inside this nucleus. The SpM seemed to contain positive immune-reactivity only for CR, with well-marked cells and processes. The results obtained when using antibodies against the sub-units of AMPA glutamate receptors indicated that the PT can contain receptors formed by GluR1 and GluR2 sub-units. The SpL presented immune-reactivity for GluR2, GluR3 and GluR4 sub-units, while the SpM apparently contained GluR1, GluR2 and GluR3. Taking into account that the functional meaning of these data still requires additional studies, one may affirm that, until the moment, the obtained data suggest that these three nuclei are under strong excitant glutamatergic afferent impulses mediated by AMPA receptors. The presence of Calcium linking proteins suggests that they may represent a useful histologic tool for the identification of different pretectal cellular groups in the brain of birds.

## ABREVIATURAS \*

- AL – Ansa lenticular
- ALP – Núcleo da ansa lenticular posterior (caudal)
- AP – Area pré-tectal
- CP – Comissura posterior
- GLd – Núcleo geniculado lateral
- LHy – area hipotalâmica lateral
- OM – Tracto occipitomesencefálico
- PST – Tracto pré-tecto–subpré-tectal
- PT – Núcleo pré-tectal
- QF – Tracto Quintofrontal
- SO – Núcleo subpré-tectal
- SpL – Núcleo espiriforme lateral
- SpM – Núcleo espiriforme medial
- TeO - Tecto Óptico
- TIO - Tracto Ístmo-óptico
- TrO – Tracto Óptico
- TSM – Tracto Septomesencefálico
- VL – Ventrículo lateral

\* Wayne J. Kuenzel & Manju Masson (1988). *A stereotaxic Atlas of the Brain of the Chick (Gallus domesticus)*. The Jonhs Hopkins University Press. Baltimore, Maryland.

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

ABREVIATURAS

1	INTRODUÇÃO .....	01
1.1	Considerações anatomofuncionais sobre a área pré-tectal .....	01
1.2	Neurotransmissores e neuromoduladores na área pré-tectal .....	04
1.3	Proteínas ligantes de cálcio como marcadores neurais .....	06
1.4	O Neurotransmissor Glutamato .....	07
2	OBJETIVOS .....	09
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	10
3.1	Procedimento imuno-histoquímico .....	11
3.2	Anticorpos utilizados .....	12
3.3	Análise dos dados .....	12
4	RESULTADOS .....	13
4.1	Considerações gerais – Colaboração de Giemsa .....	13
4.2	Imunohistoquímica para as proteínas ligantes de Ca .....	16
4.3	Imunohistoquímica para receptores de AMPA .....	21
5	DISCUSSÃO .....	32
6	CONCLUSÕES .....	39
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações anatomofuncionais sobre a área pré-tectal

O processamento da informação visual é um fenômeno complexo que depende da integração entre diversas áreas cerebrais. Esse trabalho envolve, portanto, um perfeito sinergismo entre múltiplos circuitos neurais responsáveis por diferentes aspectos dessa informação visual.

Uma das mais importantes estações de processamento visual é o *pretectum* ou região pré-tectal. Essa área recebe informações visuais diretas, através de aferências retinianas, através das células da camada ganglionar (Bordnarenko *et al.*, 1985), e também indiretas, provenientes do telencéfalo e do tecto óptico (TeO). A região pré-tectal encontra-se entre o tálamo dorsal e TeO numa zona de transição entre o diencéfalo e o mesencéfalo, e, embora outras respostas não visuais já tenham sido descritas como dependentes dessa estação neural, parece muito clara que essa área está particularmente envolvida na modulação do comportamento motor ocular em resposta aos estímulos visuais.

Diversos estudos têm mostrado ser a região pré-tectal o centro neural (cerne neurovegetativo) responsável pelo controle de muitos reflexos visuais. Cabe a esse território neural, por exemplo, modular o sistema eferente motor, por meio do controle fino da taxa de disparo dos núcleos motores cranianos (Gamlin e Clarke, 1996). Assim, neurônios motores pertencentes aos núcleos oculomotor (nIII), troclear (nIV) e facial (nVII), principalmente, têm frequência de disparo moduladas por aferências pré-tectais.

Se existe um consenso sobre o papel fundamental desta área cerebral na integração sensorio-motora requerida para os ajustes reflexos oculares, o mesmo não pode ser dito quando se buscam detalhes sobre como esse ajuste pode ser efetuado. Devido à

complexidade das estruturas anatômicas na região mesodiencefálica, uma das maiores dificuldades para o estudo anatomofuncional desta circuitaria reside no escasso conhecimento sobre a citoarquitetura dos núcleos pré-tectais, parecendo ser verdadeiro para toda a classe de vertebrados.

Em aves, um animal visual por excelência, um dos primeiros trabalhos envolvendo anatomia microscópica e análises comparativas funcional entre aves e diferentes classes de vertebrados foram publicados pelo grupo de Harvey Karten. Assim, historicamente, boa parte da pesquisa neuroanatômica envolvendo aves teve como guia o atlas do cérebro de pombos de Karten e Hodos, 1967. Como herança desse fato, tem-se então que a região pré-tectal anterior compreende vários grupos nucleares dos quais os mais conhecidos e estudados são: a área pré-tectal (AP), o núcleo pré-tectal (PT), o núcleo pré-tectal difuso (PD) o núcleo pré-tectal medial (PTM), o núcleo espiriforme medial (SpM), o núcleo espiriforme lateral (SpL), e o núcleo lentiforme mesencefálico (LM), de posição mais caudal.

Hoje, à luz de técnicas mais recentes, de maior resolução, boa parte desse conhecimento têm sido revisto; contudo, para as estruturas maiores e melhor caracterizadas, as descrições citoarquitetônicas originais ainda permanecem válidas. Desta forma, com a crescente utilização de outras espécies de aves como modelo experimental (Wallace, 1985, Cozzi *et al.*, 1991), boa parte da nomenclatura foi mantida para espécies filogeneticamente próximas (Kuenzel e Masson, 1988; Butler e Hodos, 1996).

Um dos núcleos estudados é o LM, que é considerado homólogo ao núcleo do tracto óptico (NOT) de mamíferos (Gioanni *et al.*, 1983), o qual tem um importante papel na geração e controle do nistágmo optocinético (Gioanni *et al.*, 1983; Baldo e Britto, 1990; Vargas *et al.*, 1998). Essa homologia, bastante discutida por McKenna e Wallman (1985), foi originalmente baseada em considerações embriológicas, similaridade de suas projeções (critérios anatômicos) e características neurofisiológicas (critérios funcionais). O LM e mais a área pré-tectal (AP), um outro território neural ainda não muito bem delimitado, recebem uma densa projeção da retina. Em muitas espécies, o LM, pode, ainda, ser subdividido em duas porções: a *pars lateralis* e *pars medialis*, que juntamente com a área pré-tectal formam o complexo pretectal. O LM de pássaros projeta-se para o cerebelo vestibular bem como para as folhas VI, VII e VIII modulando a atividade cerebelar através

das fibras trepadeiras por meio de uma projeção direta ou indireta, via núcleo pontino lateral e olivar inferior (Clarke, 1977; Gamlin, 1984).

Um outro núcleo pré-tectal, o PD encontra-se rostral à AP e também recebe projeções da retina, embora em menor quantidade. O núcleo subpretectal e o núcleo interstício-subpretectal encontram-se em posição ventral a esses e ambos projetam-se para o núcleo rotundus e tálamo dorsal (Butler e Hodos, 1996).

Estudos comparativos têm demonstrado uma ampla variação no número e configuração dos processos terminais oriundos da retina para o *pretectum* entre os não mamíferos. Em ciclóstomos (Kusunokoi e Amemya, 1983; Vesselkin *et al.*, 1982) e no peixe-pulmão (lungfish) da família *lepidosirenid* (Northcutt, 1977), a região pré-tectal recebe somente uma única projeção da retina. Já o *pretectum* da arraia *Skate* tem três zonas retino-recipientes (Northcutt e Wathey, 1980). Algumas espécies de teleósteos (Repérant *et al.*, 1976) têm três ou mais áreas pré-tectais retino-recipientes. Essa variação em número de áreas retino-recipientes é também encontrada entre os anfíbios. Os núcleos pré-tectais têm sido estudados em algumas espécies de répteis, e três ou quatro núcleos foram reconhecidos como alvo de projeção direta da retina (Butler e Northcutt, 1971; Repérant e Rio, 1976; Shroeder, 1981; Bass e Northcutt, 1981).

Os núcleos retino-recipientes da região pré-tectal possuem muitas projeções ascendentes e descendentes, entretanto, somente de 100 a 200 células da região pré-tectal parecem estar envolvidas no reflexo pupilar à luz (Gamlin e Cohen, 1988). Esse dado aliado ao fato da projeção retiniana ser extensa nessa área, originou a suspeita de que a região pré-tectal, além de modular a constrição pupilar, possa estar envolvida em diversas respostas motoras oculares (Gamlin e Cohen, 1988; Klooster e Vrensen, 1998).

A AP projeta-se para o núcleo de Darkschewitsch e o núcleo intersticial de Cajal e provavelmente estas projeções estão envolvidas com o movimento dos olhos e da cabeça (Gamlin e Cohen, 1988), integrando reflexos mais complexos. A AP também se projeta para o cerebelo, corroborando a sugestão de que o cerebelo também possa interferir na modulação dinâmica do reflexo pupilar à luz, resposta no qual um outro importante núcleo tem ativa participação, o núcleo pré-tectal (PT). Da inter-relação entre o PT e outras áreas, depende muito a eficácia da resposta pupilar à luz, assim como de outros ajustes

vegetativos oculares relativos a outras funções visuomotoras (Huntborn *et al.*, 1973). De qualquer forma, é importante a compreensão de como essa integração é possível.

## 1.2 Neurotransmissores e neuromoduladores na área pré-tectal

Em um recente artigo, Gamlin *et al.* (1996) demonstraram que o PT, inerva o tecto óptico (TeO) de pombos através de fibras contendo neuropeptídeo Y (NPY). Gamlin *et al.*, (1996) mostraram, através de injeções de traçadores retrógrados e anterógrados, que este núcleo se projeta bilateralmente para a camada 5B, o que sugere que essa projeção PT-TeO pode modular (no TeO) a informação visual que chega da retina. Estudos baseados na organização tectal de outros vertebrados (sapos) mostraram que NPY tem efeito inibitório na transmissão retino-tectal (Schwippert e Ewert, 1995) desse anfíbio, mas não existem evidências de que esse dado possa ser extrapolado para aves.

Estudos imuno-histoquímicos realizados por Boswell *et al.* (1998) que utilizaram anticorpos diretamente contra o RNAm de NPY no cérebro de aves revelaram a presença de neurônios supostamente neuropeptidérgicos nas seguintes áreas: tálamo lateral, hipocampo, no núcleo linear caudal (LC) e outros núcleos do tronco. Tais trabalhos revelaram uma distribuição de células NPY-positivas semelhante entre vertebrados mamíferos e não mamíferos como pássaros, peixes, anfíbios e répteis (Aste *et al.*, 1991).

A presença conservativa de substâncias neuroquímicas no SNC dos vertebrados enfatiza a importância funcional que certos sistemas neuronais têm e sugere um possível elo de ligação filogenética. Na verdade, não existem provas de que a simples presença do mesmo neurotransmissor/neuromodulador em um determinado sistema signifique que este ou aquele agente exerce funções fisiológicas semelhantes em mamíferos e outras classes de vertebrados. Uma rápida comparação no padrão de distribuição de neurônios monoaminérgicos no território do tronco cerebral de mamíferos revela uma certa semelhança entre essas duas classes de vertebrados (Dahlstrom e Fuxe, 1964; Steinbusch, 1981) e aves (Yamada e Sano, 1985; Yamada *et al.*, 1984; Sako *et al.*, 1986).

A modulação da informação visual proveniente da retina é exercida mediante agentes inibitórios e excitatórios. Assim diversos sistemas de neurotransmissores podem estar atuando neste controle, em ação conjunta com o NPY. O PT, por exemplo, recebe

aferências polissinápticas do gânglios basais através do núcleo posterior da ansa lenticular. Essa densa via parece ser serotonérgica, provavelmente originária da rafe (Gamlin *et al.*, 1996). Uma das primeiras evidências de neurônios contendo serotonina no cérebro de aves foi obtida por Fuxe e Ljunggren (1965), utilizando o método FIF (fluorescência induzida por formaldeído; Falck, 1962). Mais recentemente, através da utilização de técnicas de imuno-histoquímica em pintos (Yamada *et al.*, 1984; Wallace, 1985; Yamada e Sano, 1985; Sako *et al.*, 1986, Toledo e Britto, 1999), codornas (Cozzi *et al.*, 1991) e pombos (Toledo *et al.*, 1995), têm indicado uma vasta distribuição de corpos celulares e fibras imunorreativas a serotonina no cérebro de aves, sugerindo o extenso envolvimento desse neurotransmissor em funções motoras e sensoriais.

Neste pioneiro trabalho Fuxe e Ljunggren, (1965) demonstraram que, além da serotonina os cérebros de pombos também contêm quantidades significantes de noradrenalina e dopamina, mas quantidades não detectáveis de adrenalina. Hoje se sabe que esse fato não é mais verdade (Toledo, *et al.*, 1999) sendo esse resultado falso-negativo apenas resultado de técnicas de baixa resolução.

Desde a década passada (Yücel *et al.*, 1987) têm-se investigado a participação de neurosubstâncias como mediadoras do comportamento visuo-motor em estruturas visuais tectais e sub-TECTAIS. Na mediação dessa resposta em sapos, estão envolvidos diversos núcleos retino-recipientes localizados na junção mesodiencefálica, como o núcleo da raiz óptica basal e os núcleos pré-TECTAIS talâmico posterior, uncinato, lentiforme mesencefálico, e também os núcleos talâmicos póstero-central e póstero-lateral. Lesões destas estruturas (Bonaventure *et al.*, 1985) produzem ruptura do sincronismo entre o estímulo visual e a resposta motora, demonstrando seu envolvimento na mediação do reflexo optocinético.

Bugbee (1979) demonstrou que lesões combinadas do núcleo espiriforme lateral e do PT afetam a habilidade dos pássaros em bicar alvos móveis corroborando o aparente envolvimento do PT em alguns aspectos da integração visuo-motora em pássaros. A combinação de lesões pré-TECTAIS em sapos inibem os comportamentos de fuga e caça nesses animais (Ewert, 1970).

Klooster e Vrensen, (1997), utilizando várias técnicas neuroanatômicas, investigaram o papel do ácido gama-aminobutírico (GABA) em outro núcleo do pré-tecto

de ratos, o núcleo olivar pré-tectal (PON) e confirmaram a alta complexidade da organização sináptica e abundância de elementos inibitórios nessa região, sugerindo que o GABA no PON está fortemente envolvido com o processamento da informação visual e no reflexo pupilar à luz; dados que correspondem ao papel creditado ao PON em primatas (Gamlin *et al.*, 1996).

Ainda que escassas todas as informações até agora disponíveis convergem para a sugestão de que a região pré-tectal tem grande importância no processamento da informação visual, seja participando de reflexos diretos (como o pupilar), ou modulando o processamento do sinal no tecto óptico de anfíbios; o mesmo parecendo ocorrer em pássaros. Desta feita, a descrição anatômica e a natureza neuroquímica destas vias, que partem ou chegam à área pré-tectal é o primeiro passo para um melhor entendimento do processo visual. Sendo esta descrição anatômica o principal objetivo deste trabalho.

### **1.3 Proteínas ligantes de cálcio como marcadores neurais**

O íon cálcio é um dos mais importantes agentes citosólicos estando envolvido em muitas das ações celulares. Variações na concentração do cálcio intracelular induzem alterações no metabolismo neuronal, ativando ou inibindo respostas celulares (Heizmann e Braun, 1992). Assim, as etapas metabólicas são moduladas pela flutuação da concentração do cálcio livre e mecanismos de tamponamento desse íon se fazem necessários (Celio, 1989; Baimbridge *et al.*, 1992). Estes mecanismos podem envolver proteínas ligantes de cálcio (Braun, 1990; Baimbridge *et al.*, 1992) como a parvalbumina (PV), a calbindina (CB) e a calretinina (CR). Estas substâncias são parte de uma classe de proteínas que supostamente mantêm as concentrações intracelulares de cálcio em patamares fisiológicos (Braun, 1990; Baimbridge *et al.*, 1992). Entretanto, independente de seu papel funcional, essas proteínas têm sido utilizadas como eficiente marcador celular (Jones e Hendry, 1989; Baimbridge *et al.*, 1992; Andressen *et al.*, 1993), com especial destaque nas áreas visuais (Celio, 1990; Demeulemester *et al.*, 1991; Britto *et al.*, 1994).

A distribuição diferencial dessas proteínas é um poderoso meio de caracterização e delimitação nuclear (Andressen *et al.*, 1993; Toledo *et al.*, 1995), podendo tornar-se uma importante ferramenta no estudo da arquitetura neuroquímica do sistema nervoso.

## 1.4 O Neurotransmissor Glutamato

O aminoácido glutamato é o agente excitatório mais abundante do sistema nervoso central (Hollmann e Heinemann, 1994; Ozawa *et al.*, 1998). Este neurotransmissor age por meio de um grande número de receptores o que pode, em parte, explicar seu largo espectro de atividade funcional. Os receptores de glutamato podem se constituir de canais iônicos, ditos ionotrópicos (Barnard, 1997), ou atuar por meio da cascata metabólica desencadeada por proteínas G, ditos metabotrópicos (Conn e Pin, 1997). Ambos têm sido objeto de estudos constantes e, embora não se possa generalizar, sistemas mais dinâmicos como circuitos visuais, têm sido comumente descritos como constituídos por receptores do primeiro tipo (Ebling, 1996; Theiss *et al.*; 1998), enquanto que os metabotrópicos parecem estar mais relacionados com modulação do sinal (Conn e Pin, 1997) ou mesmo alterações estruturais (Kubo *et al.*, 1998).

Os receptores de glutamato (GluRs) que operam por meio de canais iônicos (Barnard, 1997) podem ser classificados em receptores do tipo ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazoleno propiônico (AMPA), ácido cáinico (KA) e N-metil-D-aspartato (NMDA). Os dois primeiros, devido à similaridade funcional que apresentam, também são conhecidos por receptores do tipo não-NMDA. De qualquer maneira, embora o NMDA apresente uma cinética mais lenta em comparação aos receptores do tipo AMPA e KA (Gasic e Hollmann, 1992), todos produzem potenciais excitatórios pós-sinápticos por permitirem fluxo catiônico trans-membrânico.

A composição dos GluRs ionotrópicos é variada já que depende de quais subunidades seriam as constituintes do receptor em si. Cada receptor seria formado por um complexo hetero-oligomérico composto por quatro subunidades (Rosenmund *et al.*, 1998). Apesar de uma alta homologia, cada subunidade deriva de uma seqüência de aminoácidos pré-determinada por um gene específico (Hollmann e Heinemann, 1994). Assim, até agora foram isoladas e descritas 4 subunidades diferentes para a família dos receptores do tipo AMPA (GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4); 5 subunidades diferentes para os receptores do tipo KA (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2), e 5 subunidades para os receptores do tipo NMDA (NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, NMDAR2C e NMDAR2D). Estas subunidades podem se combinar e, dentro de cada classe de receptor ionotrópico, compor o tetrâmero (pelo menos para o tipo AMPA) da estrutura do receptor.

Na região pré-tectal devem co-existir diversos sistemas neuroquímicos, é muito provável que o glutamato tenha um importante papel como substância neurotransmissora e parece ainda bastante racional prever que grande parte da resposta seria mediada por receptores ionotrópicos do tipo AMPA. E foi exatamente essa a proposição que procuramos investigar no presente trabalho.

## 2 OBJETIVOS

Diante da importância da região pré-tectal, como integradora de informações visuais e frente ao pouco conhecimento até agora existente em aves, foi nosso objetivo procurar melhor caracterizar a citoarquitetura de um núcleo dessa área, o núcleo pré-tectal (PT), e também de dois de seus vizinhos, o núcleo espiriforme medial (SpM) e o núcleo espiriforme lateral (SpL), em aves.

Como estratégia experimental, primeiro utilizamos o padrão de imunorreatividade diferencial de três proteínas ligantes de cálcio, a parvalbumina, a calbindina e a calretinina, como marcadoras de populações neuronais para, em seguida, estudar a presença e o padrão de expressão das subunidades GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4 dos receptores de glutamato do tipo AMPA na região pré-tectal de pintos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

No decorrer deste estudo utilizamos pintos de postura (*Gallus domesticus*) de 10 a 15 dias de nascimento, machos e fêmeas, provenientes de agropecuárias da grande Florianópolis (SC) e da grande São Paulo (SP). Até o procedimento experimental ser realizado, os animais eram mantidos em um ambiente com ciclo controlado de luz (12 h claro / 12 h escuro) com acesso irrestrito à água e alimentação. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal do COBEA (Colégio Brasileiro em Experimentação Animal) de Junho de 1991.

Para a análise histológica da região pré-tectal, as aves eram profundamente anestesiadas com ketamina (Ketalar, PARKE-DAVIS, 0,2 ml / 0,4 kg de peso corporal, i.m) e xilazina (Rompum, MILES LAB, 0,3 ml / 1 kg de peso corporal, i.m). Após abertura da cavidade visceral com exposição torácica, os animais eram perfundidos por via intracardíaca com salina tamponada (pH 7,4) seguida de solução de 4% paraformaldeído em tampão fosfato (PFA, pH 7,4) a 4°C. Os cérebros eram então removidos e, após 4 a 12 horas mantidos na mesma solução fixadora (PFA), os cérebros foram transportados para uma solução de sacarose a 30% em tampão fosfato pH 7,4, onde permaneceram por 24 horas, até serem cortados em micrótomo deslizante de congelamento (Leica, mod. 1400) com uma espessura de aproximadamente 35 µm.

Os cortes foram recolhidos em ordem seqüencial e colocados em 6 compartimentos semelhantes preenchidos com solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Neste primeiro momento, um dos compartimentos era selecionado e os cortes de tecido eram montados (em ordem de corte; caudal para rostral) em lâminas gelatinizadas em solução contendo potássio-cromo. Depois de secos, foram corados pelo método de Giemsa

(30-60 minutos em solução de Giemsa 1:20 em tampão metanol, pH 6,9 - Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) para servir de guia histológico da região pré-tectal. Os cortes dos compartimentos remanescentes eram mantidos a 4°C até serem utilizados para processamento imuno-histoquímico (IHC).

### **3.1 Procedimento Imuno-histoquímico (IHC)**

Uma vez selecionados para IHC, os cortes eram lavados por 10 minutos por três vezes, em temperatura ambiente, em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, e então incubados por 24 a 48 horas, com o anticorpo primário. As diluições eram sempre feitas em Triton-X-100 0,3% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Encerrada esta etapa, os cortes eram lavados novamente em tampão fosfato à temperatura ambiente e incubados por 1 hora com o anticorpo secundário (contra o animal em que foi feito o primário) marcado com a proteína biotina. Após uma nova série de três lavagens a temperatura ambiente, os cortes foram colocados por uma hora e meia numa nova solução de Triton-X-100 0,3% em tampão fosfato 0,1 M onde eram incluídos o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC ELITE kit, Vector lAbstract) e de cloreto de sódio (0.35M). Depois desta fase, os cortes eram novamente lavados e imersos em um meio contendo diaminobenzidina 0,05% em tampão fosfato 0,1 M por cerca de 15 minutos. A seguir eram acrescentados cerca de 800 ml de solução de peróxido de hidrogênio a 30%, sendo que os cortes eram mantidos neste banho até a reação ser evidenciada. Uma vez atingido o ponto ótimo de contraste entre a região marcada e o tecido não reativo, os cortes eram removidos desta solução e sucessivas lavagens em tampão fosfato 0,1 M eram aplicadas. Estas tinham por finalidade a remoção do excesso do reagente e antecederam à montagem dos cortes em lâminas tratadas com gelatina e alúmen cromo.

Os cortes eram montados em seqüência, mantido por três a quatro dias em placa quente a 35°C para secagem. Depois eram brevemente hidratados (mergulhados por um minuto em água destilada), banhados em solução de tetróxido de ósmio 0,1% por 15-30 segundos, desidratados por uma série de álcool em concentrações crescentes, clarificados com Hemo-De (Fisher) e cobertos com lamínulas tendo como meio de montagem o Permount (Sigma). Uma vez prontos, os cortes eram observados em microscopia de luz e, se fosse o caso, fotografados.

### **3.2 Anticorpos utilizados**

Na execução do presente trabalho, utilizamos os seguintes anticorpos primários contra as proteínas ligantes de cálcio: anti-parvalbumina e anti-calbindina (ambos da Chemicon, International, Inc., Temecula, CA) feitos em camundongo, e anti-calretinina (Sigma, Saint Louis), feito em coelho. Nos experimentos investigando a expressão das subunidades dos receptores de glutamato do tipo AMPA, utilizamos anticorpos contra as subunidades GluR1, GluR2/3, e GluR4 (feitos em coelho), além de um anticorpo específico contra GluR2 feito em camundongo, todos esses também procedentes da Chemicon International Inc. Utilizamos ainda, dois anticorpos diferentes, específicos contra a subunidade GluR3 (N-19, sc-7613 e C-20, sc-7612); ambos feitos em cabra a partir do GluR3 humano e obtidos da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). O primeiro (N-19) foi feito contra uma seqüência peptídica da porção amino terminal e o segundo (C-20), contra uma cadeia da porção carboxi terminal.

### **3.3 Análise dos dados**

Para os procedimentos de contagem e medição do tamanho dos corpos celulares, a área de interesse era visualizada, focada e a imagem capturada por uma câmera digital resfriada (Dage-MTI Inc., Michigan City, IN) acoplada ao microscópio. A seguir essa imagem era digitalizada, congelada e enviada a um computador da plataforma Macintosh (PowerMac, Apple Systems, Cupertino, CA) onde um programa de análise de imagens (Image System 1.53) disponibilizado pelos Institutos Nacionais de Saúde americanos (NIH) era utilizado.

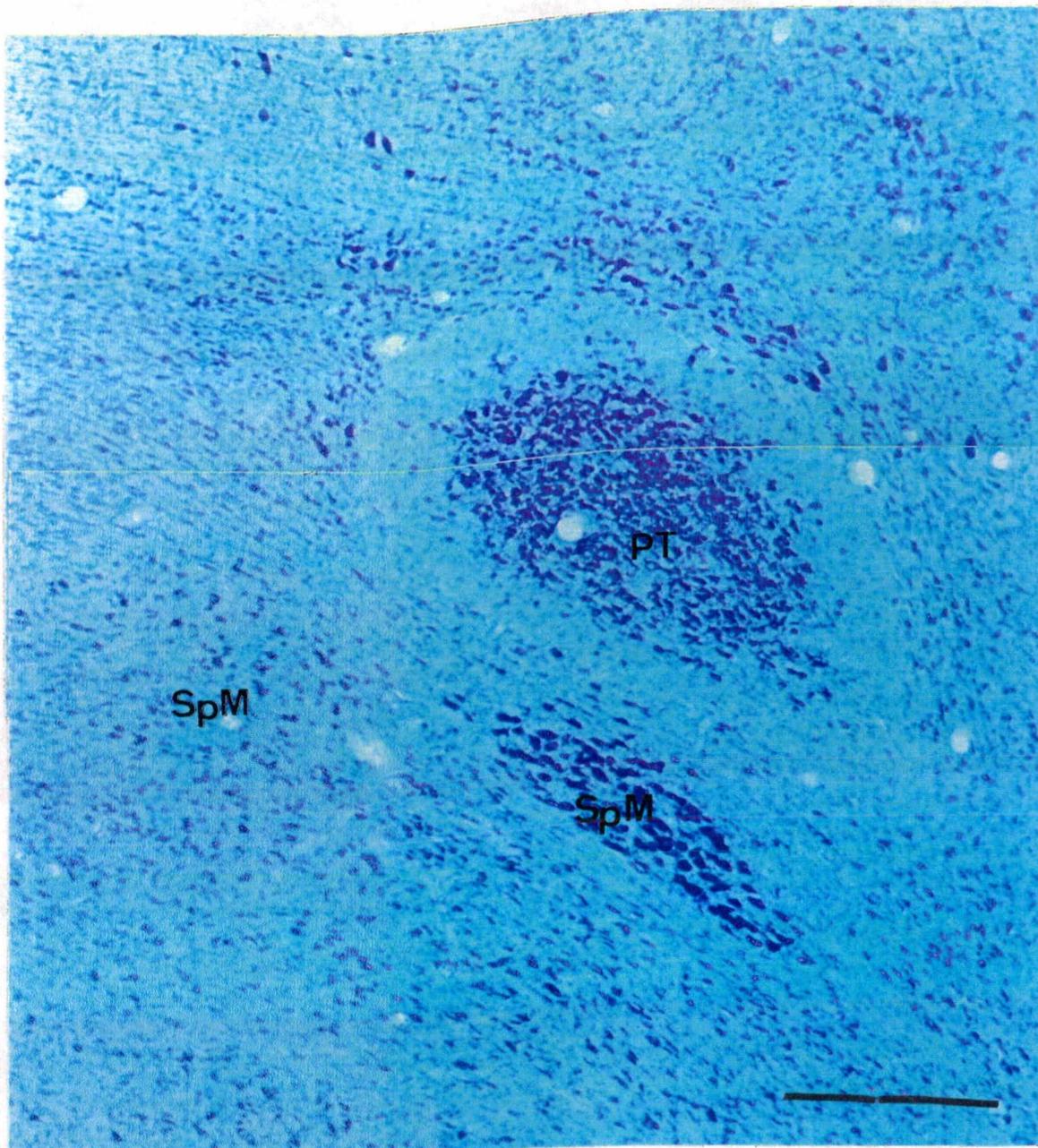
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Considerações gerais – Coloração de Giemsa

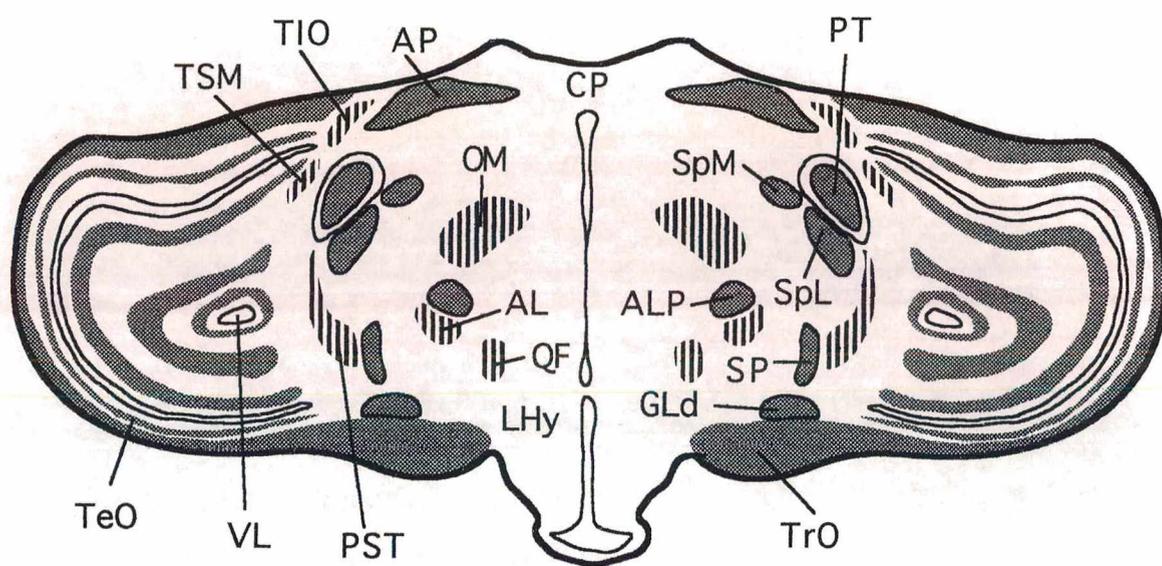
A utilização da técnica de Giemsa permitiu uma clara identificação dos principais grupos celulares situados na região pré-tectal do cérebro de pintos (figura 1). O mais inequívoco deles, o PT, mostrou-se facilmente identificável. Em pintos, esse núcleo apresenta-se formado por uma grande e compacta massa de células circundada por um espaço sem marcação distinta. A porção celular é representativa de um núcleo esférico, tendendo a ovóide, cuja forma pode ser comprovada mediante a análise feita através de cortes seriados.

Em posição ventral ao PT, os cortes corados com Giemsa também identificaram com perfeição uma outra massa de células formando o núcleo espiriforme lateral (SpL). Devido à intensidade de marcação dos corpos celulares, o SpL e o PT facilmente destacavam-se como duas unidades nucleares em meio ao tecido circundante no território pré-tectal (figura 1), tal qual referidos no atlas de pinto (figura 2) de Kuenzel e Masson (1988).

Uma breve análise visual mostrou que o SpL apresenta células maiores que o PT. Fazendo-se uma comparação do tamanho máximo e mínimo das células (medidas em seu maior eixo, com o auxílio do computador) presentes na porção central do PT (aproximadamente entre 12-28 $\mu$ m) com a variação no tamanho das células do SpL (variação entre 15 e 32 $\mu$ m), esta indica que ambos parecem conter populações de neurônios com tamanhos de corpos celulares equivalentes. Entretanto, observando-se agora o valor médio, percebe-se que o PT é constituído de fato, em sua maioria, por células



**Figura 1.** Fotomontagem de fotomicrografias de corte coronal do cérebro de pintos corado pela técnica de Giemsa. Nota-se que o núcleo pré-tectal (PT) parece constituir-se de uma porção mais central, uma compacta massa de células de forma elíptica, circundada por um envoltório ou capa onde poucos corpos celulares podem ser vistos. Na região central do PT, um grande vaso sanguíneo pode ser claramente visto. Ventral ao PT, observa-se outra grande massa celular em forma de disco: o núcleo espiriforme lateral (SpL). As células que compõem ambos núcleos mostraram-se bem coradas e definidas, contrastando com os corpos celulares menores e dispersos na circunvizinhança. Os limites do núcleo espiriforme medial (SpM) não puderam ser distinguidos com eficiência mediante essa técnica. Barra de escala: 250  $\mu$ m.



**Figura 2.** Adaptação de corte coronal do cérebro de pintos feito por KUENZEL e MASSON (1988). A região representa uma posição correspondente ao AP 5.0. Abreviaturas no anexo. Barra de escala: 250  $\mu$ m.

menores (cerca de 18,6  $\mu\text{m}$ ), enquanto que no SpL nota-se uma nítida preferência por células maiores (por volta de 27,5  $\mu\text{m}$ ).

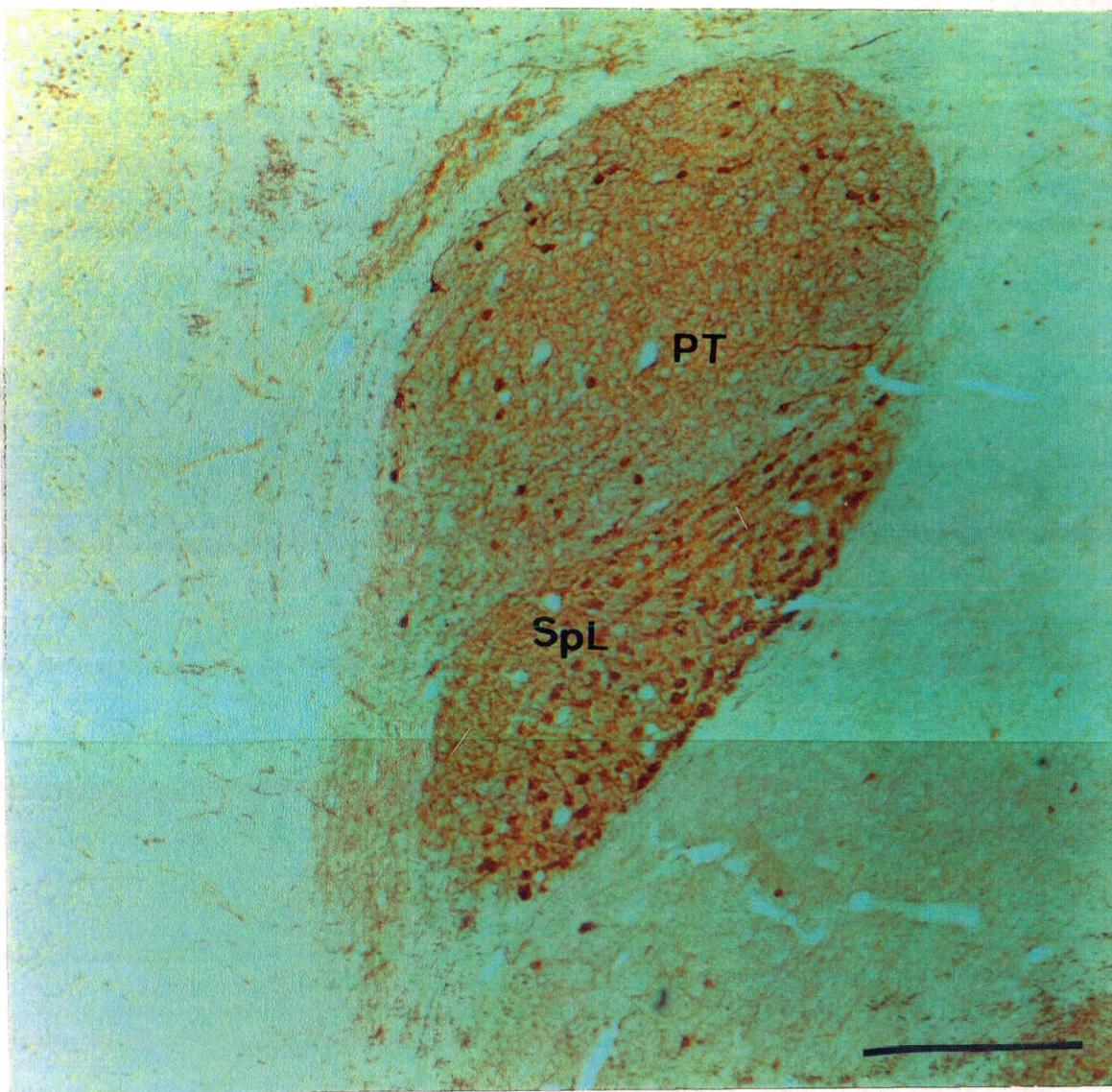
#### 4.2 Imunohistoquímica para as proteínas ligantes de Ca

A marcação imuno-histoquímica com os anticorpos contra proteínas ligantes de cálcio permitiu uma perfeita delimitação da extensão do PT e do SpL. A marcação contra parvalbumina (PV) (figura 3) mostrou forte imunorreatividade em ambos os núcleos.

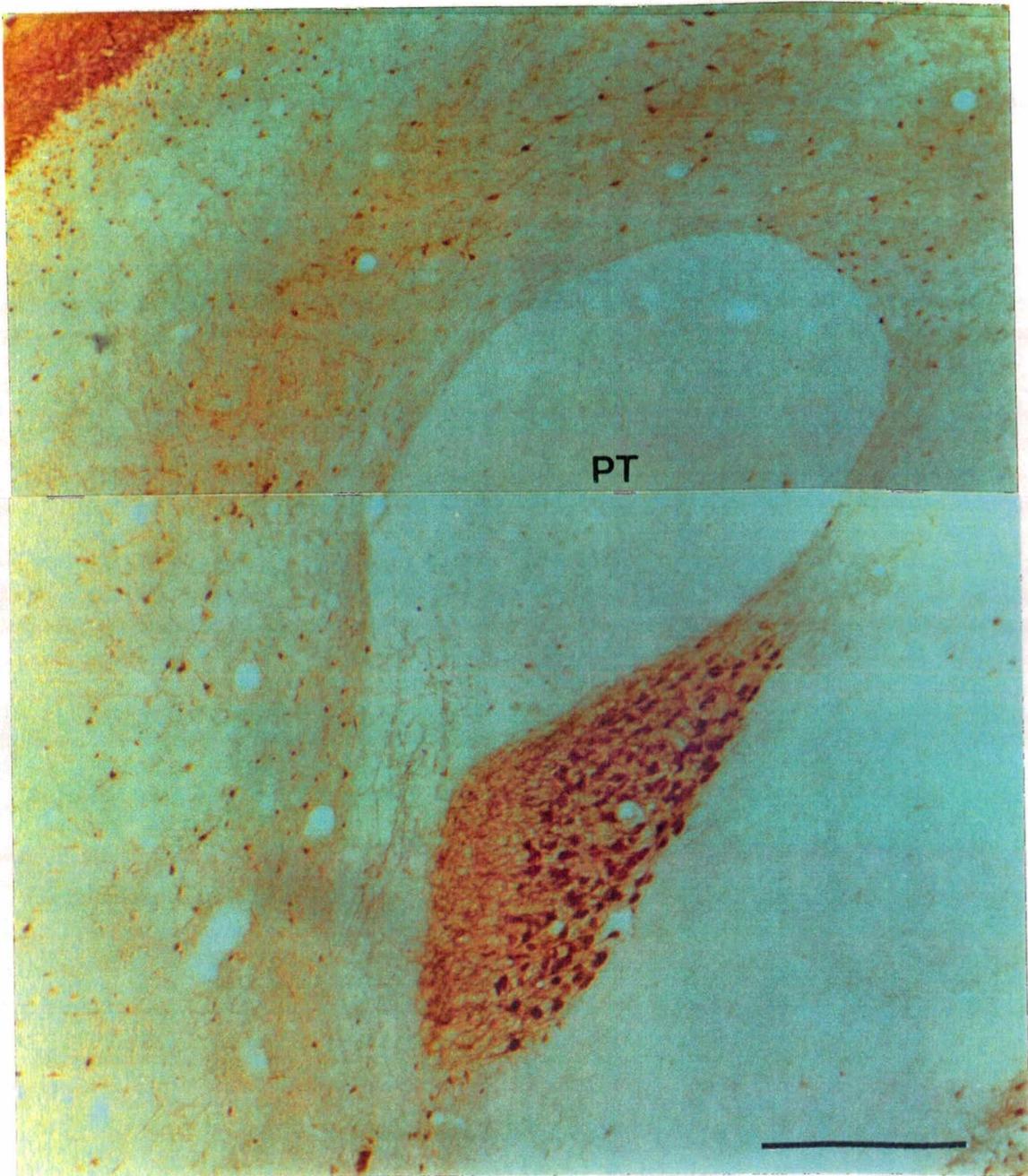
No PT, foram vistos evidentes e bem marcados corpos celulares positivos à PV, com exuberantes processos, na porção mais externa desse núcleo. A disposição das células sugere uma estrutura do tipo capa, envolvendo a porção central. Essa porção parece ser o centro do núcleo, local onde predominaram fibras PV+, com algumas poucas e escassas células. No SpL a grande maioria das células (cerca de 80%) foram imunorreativas ao anticorpo contra PV. É digno de nota relatar que esse tipo de marcação permitiu mostrar, com nitidez, a maciça quantidade de fibras partindo desse núcleo, diferenciando o SpL nuclear, mais medial, e a porção eferente do SpL, mais lateral. Nos estudos envolvendo PV (figura 3), o SpM não apresentou imunorreatividade digna de nota.

Nos cortes de tecido onde empregamos o anticorpo contra calbindina 28-kD, essa marcação serviu para confirmar os dados para o SpL obtidos com PV. Vê-se de maneira clara e inequívoca, as duas partes do SpL (figuras 4 e 5). Tal qual visto para PV, também por volta de 80% das células do SpL são CB+, com seus processos parecendo dirigir-se à parte lateral para formar o feixe emergente. O PT e o SpM não mostraram marcação alguma (figura 4), podendo o PT, inclusive, ser delimitado pelas poucas fibras CB+ vistas ao redor (mas não dentro) desse núcleo. O mesmo não pode ser dito com respeito ao SpM, que não apresentou indício de marcação.

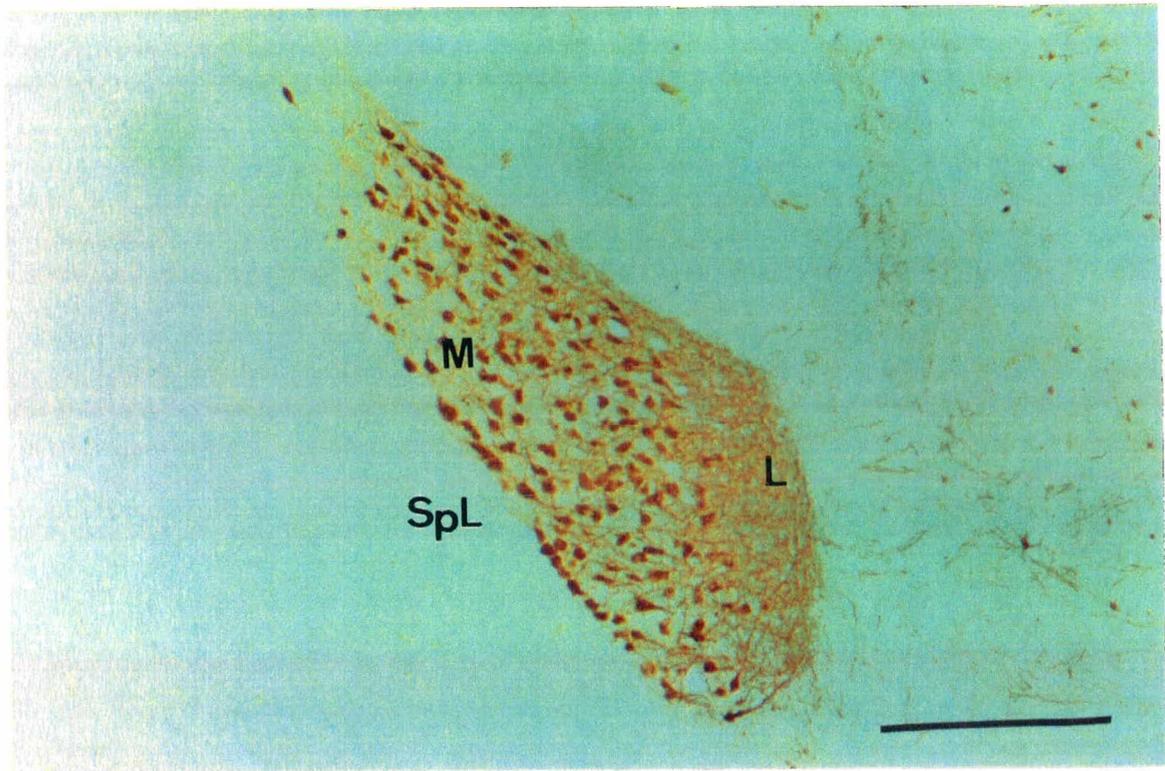
Os dados sobre a marcação contra calretinina (figura 6) também mostraram boa definição dos três núcleos pré-tectais estudados (PT, SpL e SpM). O PT pode ser identificado pelo tipo de fibras na porção central, diferindo no padrão e quantidade das fibras na porção periférica. A região central parece ser formada por um grande número de processos CR+ em uma disposição lembrando campos terminais (assim como no SpL). Essa região central mostrou-se encapsulada por fibras e células, em especial na faixa de



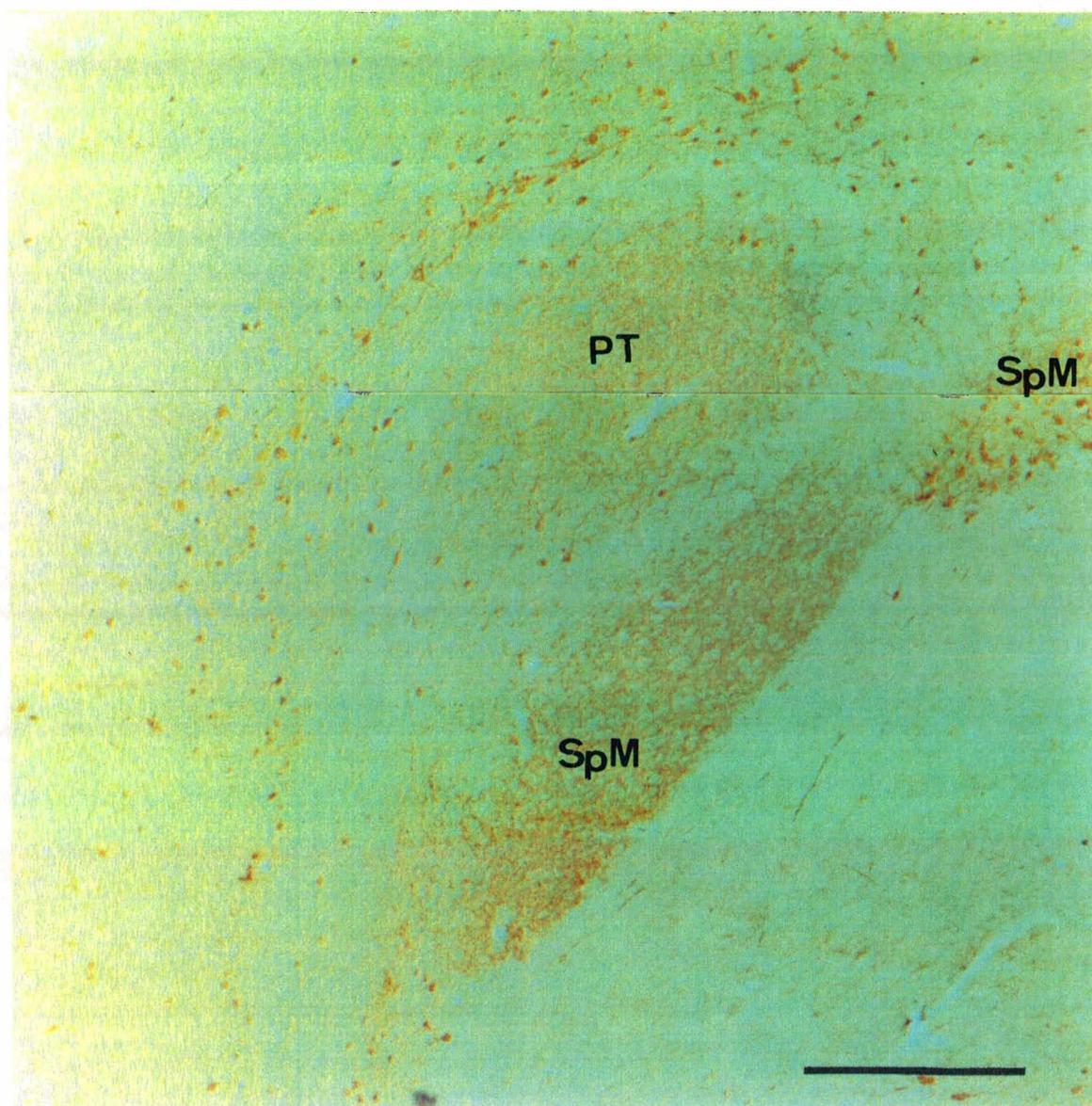
**Figura 3.** Fotomontagem de fotomicrografias de corte coronal do cérebro de pintos processado imuno-histoquimicamente com anticorpo contra parvalbumina (PV). Observamos que o PT apresenta muitos corpos celulares PV+ bem marcados. O SpL apresenta cerca de 80% de suas células PV+. Barra de escala: 250  $\mu$ m.



**Figura 4.** Fotomontagem de fotomicrografias de corte coronal do cérebro de pinto processado imuno-histoquimicamente com anticorpo contra calbindina (CB). Observamos que a grande maioria das células do SpL são CB+, sendo que o PT e o SpM não apresentaram marcação celular. No PT poucas fibras CB+ foram vistas ao seu redor. Barra de escala: 250  $\mu$ m.



**Figura 5.** Fotomicrografia de corte coronal do cérebro de pintos processado imunohistoquimicamente com anticorpo contra calbindina (CB). Observamos detalhes do SpL, onde o mesmo apresenta-se constituído de duas partes, o SpL nuclear, mais medial (M) e a porção dita eferente do SpL, mais lateral (L). Barra de escala: 250  $\mu$ m.



**Figura 6.** Fotomontagem de fotomicrografias de corte coronal do cérebro de pintos processado imuno-histoquimicamente com anticorpo contra calretinina (CR). Os três núcleos pré-tectais estudados (PT, SpL e SpM) apresentam marcação positiva para CR. Barra de escala: 250  $\mu$ m.

transição entre núcleo e periferia, conforme pode ser notada na figura 7 (A e B). Algumas bem marcadas, células CR<sup>+</sup> na área considerada o cerne do PT podem ser mais bem vistas no maior aumento (figura 7B). A presença das poucas fibras CR<sup>+</sup>, envolvendo a periferia do PT formam um claro que contrasta com a forte marcação das fibras e células envolvendo o PT como um todo (figura 7A); mas estas encontram-se claramente fora dos limites externos desse núcleo.

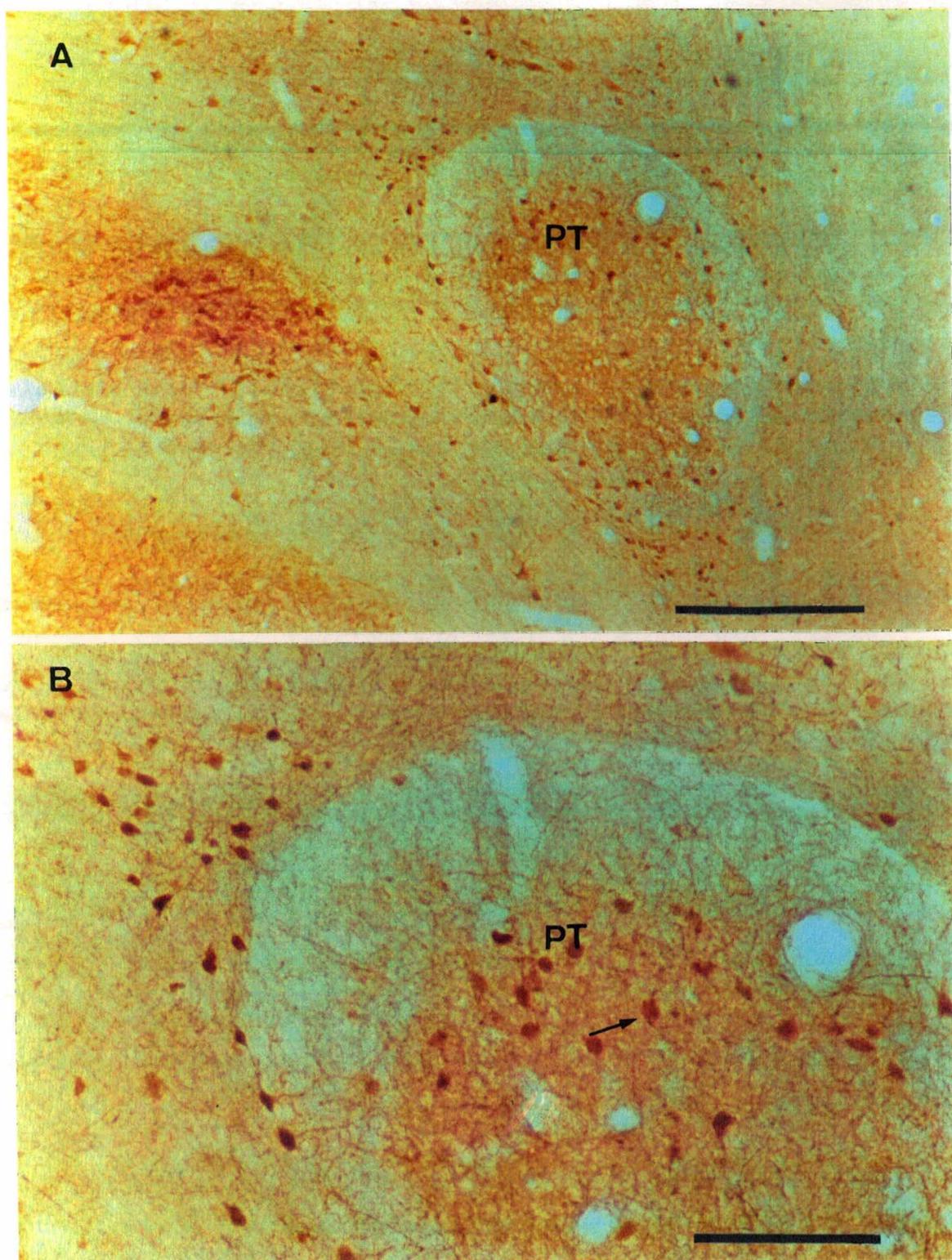
O SpL e o SpM mostram muitos processos CR<sup>+</sup> mas apenas o SpM apresentou células CR<sup>+</sup> (figura 8). A marcação de fibras no SpL tendeu a ser mais evidente nas áreas onde existem corpos celulares (figura 9) e um olhar cuidadoso revela que as fibras CR<sup>+</sup> parecem envolver as células. Já os dados relativos ao SpM indicam que boa parte (ao redor de 60%) dos neurônios desse núcleo são imunorreativos à CR. A marcação para CR revelou que o SpM resulta em um conglomerado nuclear esférico, parecido com a região central do PT, entretanto, o padrão de imunorreação visto para CR o torna inconfundível (figura 10). Em um plano mais caudal, onde o PT não pode mais ser visualizado, esse foi um importante fator diferenciador; inclusive, parte dos processos que emergem lateralmente das células do SpM podem compor parte do feixe de fibras que reveste externamente o PT.

### **4.3 Imunohistoquímica para receptores de AMPA**

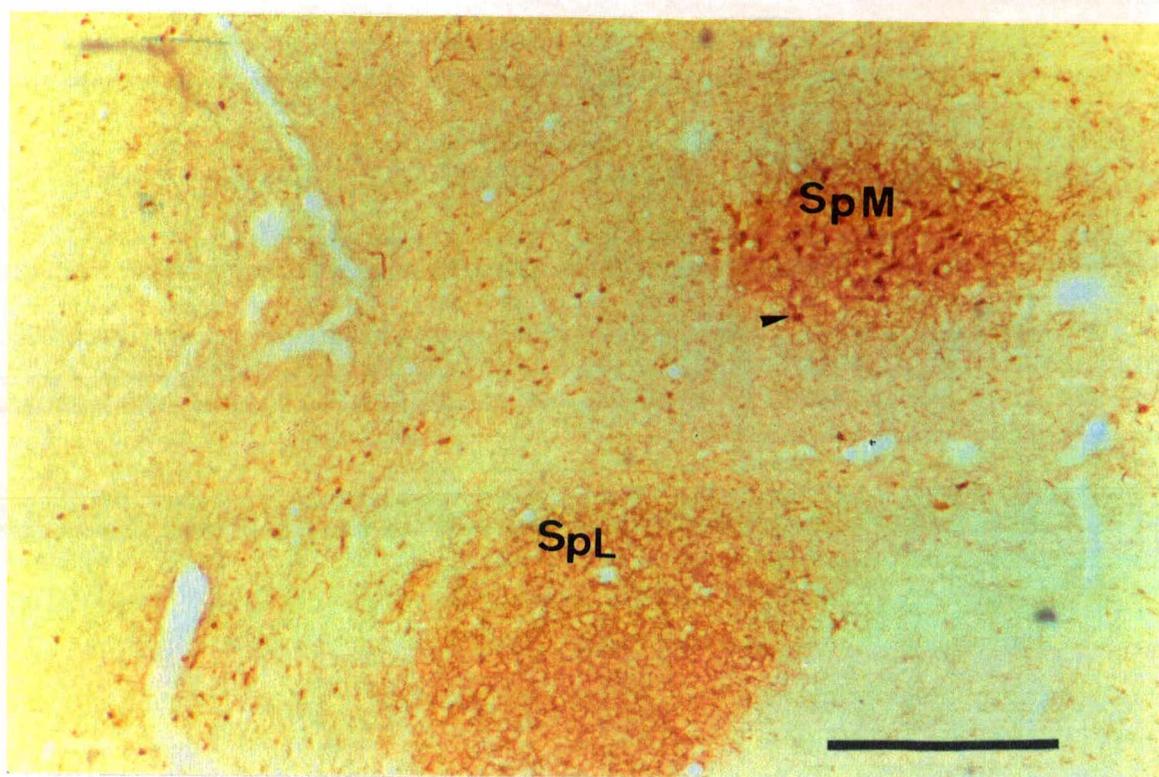
O PT, o SpL e o SpM também mostraram ser imunorreativos a alguns dos anticorpos contra subunidades de receptores de glutamato do tipo AMPA.

Os resultados com o anticorpo contra a subunidade GluR1 (figura 11) indicam uma forte marcação de processos na parte central do PT. Foram observadas ainda, muitas células no SpM mas não no SpL. Ainda no SpM, além das células mostrarem uma imunorreatividade bem evidente, pareceu que esse núcleo também contém muitos processos GluR1-positivos.

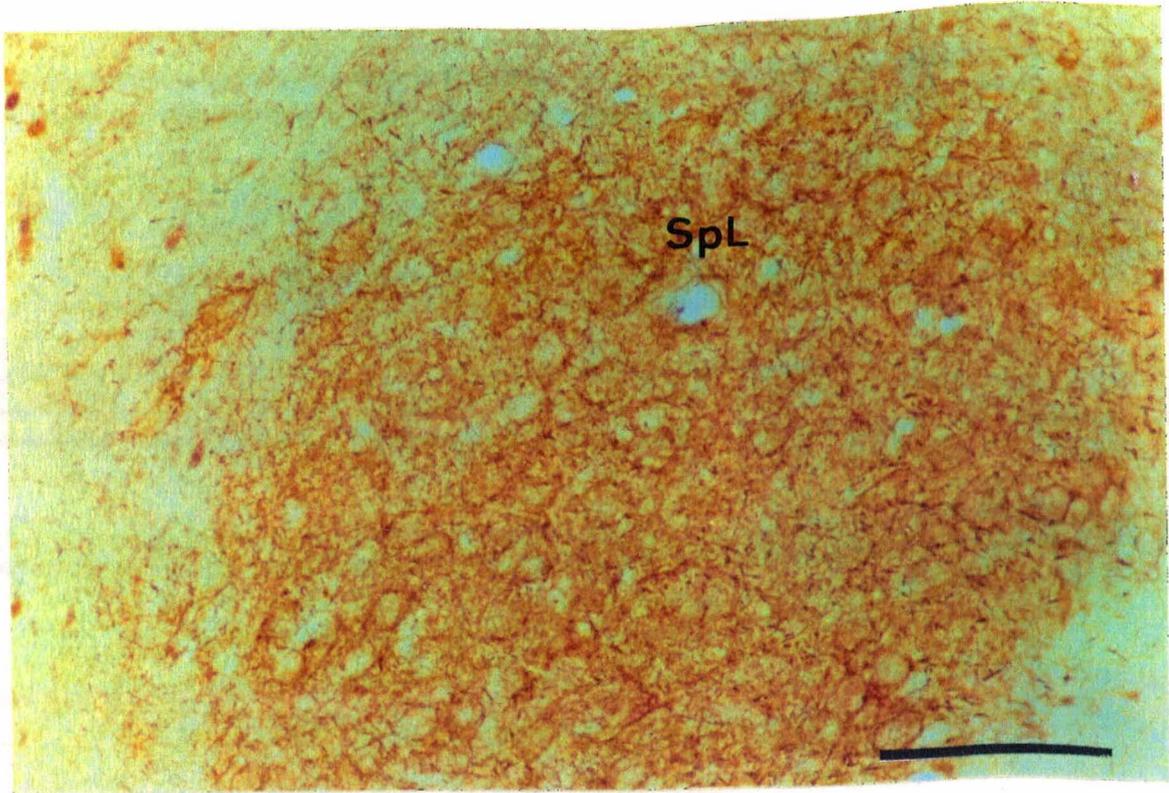
Nos experimentos usando o anticorpo contra a subunidade GluR2 (figura 12), o PT apresentou um padrão de marcação de processos similar ao visto para GluR1. Muitos corpos celulares foram encontrados na porção mais central desse núcleo. Um dado interessante é a grande quantidade (quase 100%) de células (mas não processos)



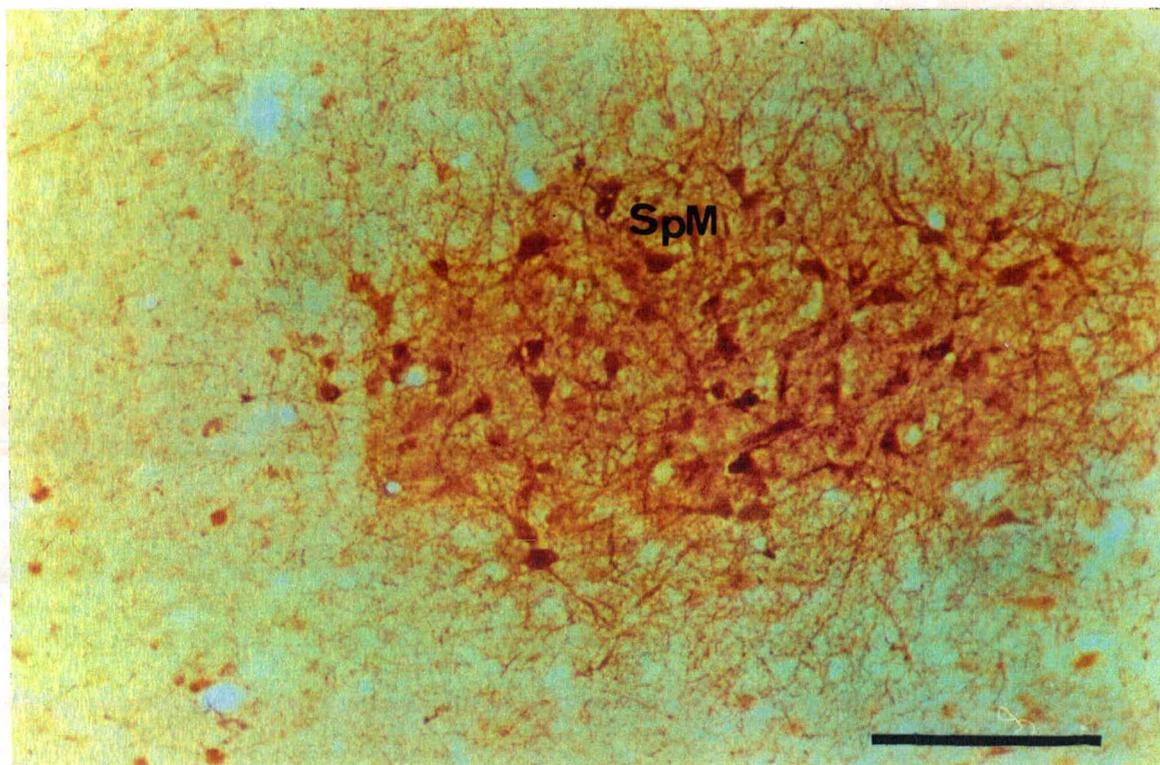
**Figuras 7 A e B.** Fotomicrografias de cortes coronais do cérebro de pinto processado imuno-histoquimicamente com anticorpo contra calretinina (CR). Em A a região central do PT parece ser formada por um grande número de processos CR<sup>+</sup> e a região periférica apresenta-se formada por fibras e células CR<sup>+</sup>. Observando-se em maior aumento (B), podemos perceber melhor o centro do PT evidenciado pelas células CR<sup>+</sup> e a presença de um número reduzido de fibras CR<sup>+</sup>, envolvendo a periferia do referido núcleo. Barras de escala: 250  $\mu$ m (A) e 100  $\mu$ m (B).



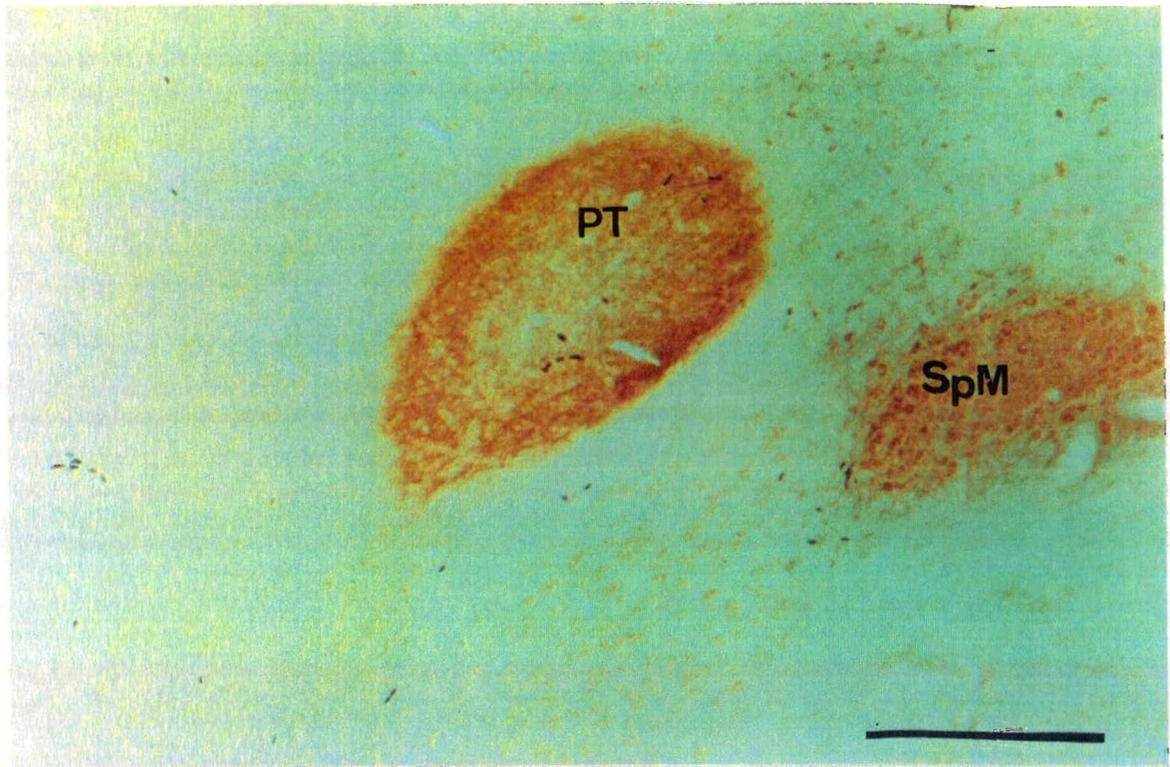
**Figura 8.** Fotomicrografia de corte coronal do cérebro de pinto processado imunohistoquimicamente com anticorpo contra calretinina (CR). Observamos que tanto o SpL quanto o SpM mostram muitos processos CR+, mas apenas o SpM apresenta células CR+. Barra de escala: 250  $\mu$ m.



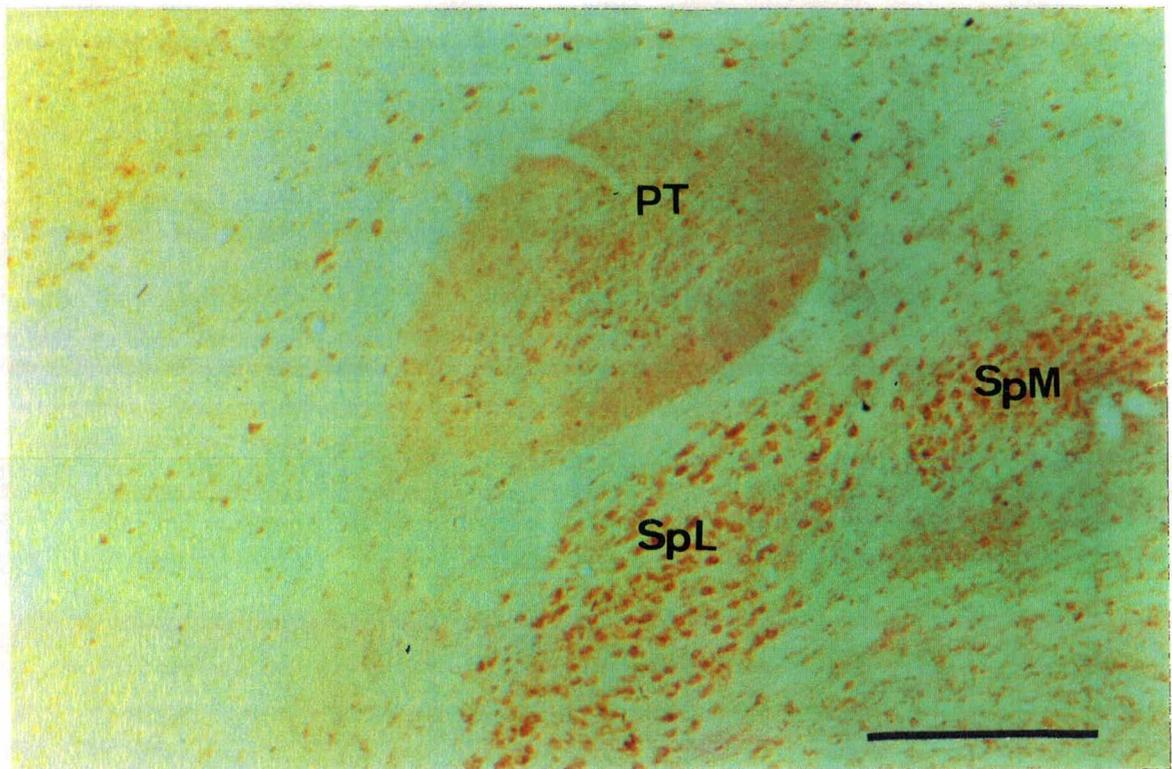
**Figura 9.** Detalhe da figura 8 evidenciando o SpL caudal. Observamos que a marcação de fibras no SpL é mais evidente nas áreas onde existem corpos celulares e parece que as fibras CR+ envolvem o vazio que pode corresponder as células não marcadas. Barra de escala: 100  $\mu$ m.



**Figura 10.** Detalhe da figura 8 evidenciando o SpM caudal. Observamos que cerca de metade dos neurônios deste núcleo parecem ser CR+. O padrão neuronal típico é irregular com muitos processos sem um direcionamento preferencial. Barra de escala 100 $\mu$ m.



**Figura 11.** Fotomicrografia de corte coronal de cérebro de pinto processado imunohistoquimicamente com anticorpo contra a subunidade GluR1 do receptor de glutamato do tipo AMPA. Observamos uma forte marcação de processos na parte central do PT e muitas células e processos no SpM considerados GluR1-positivos. Barra de escala: 250  $\mu$ m.

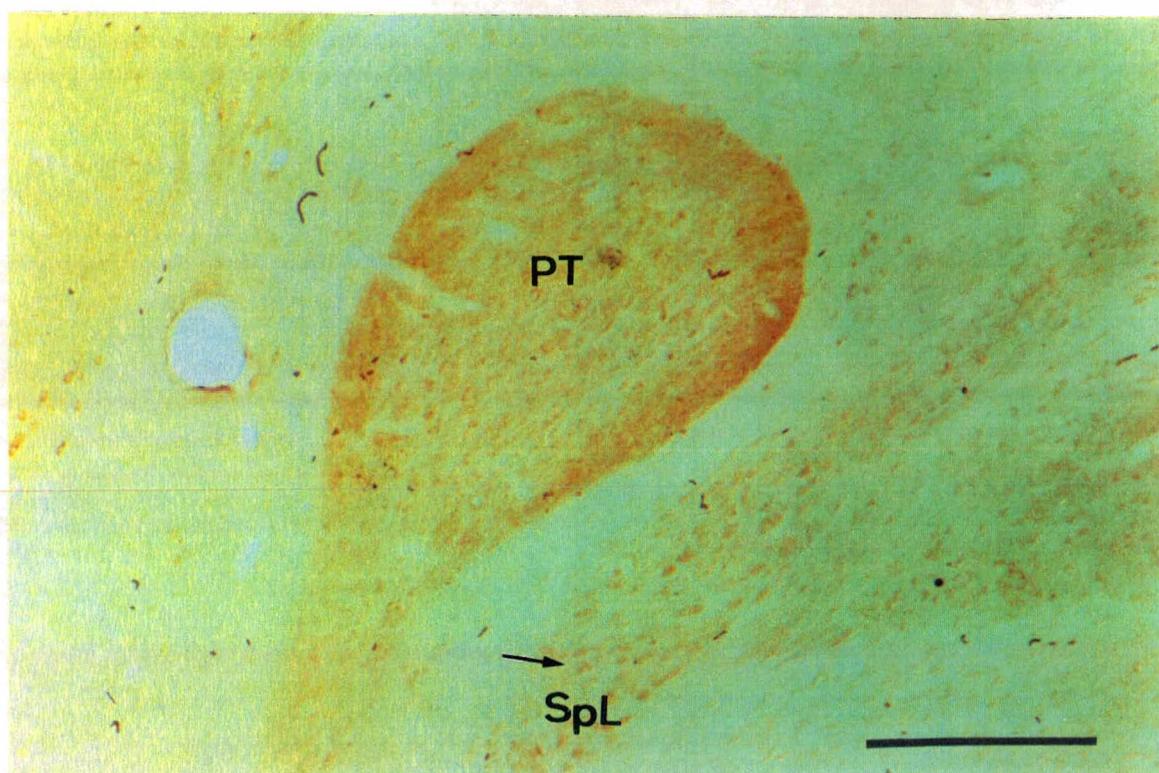


**Figura 12.** Fotomicrografia de corte coronal do cérebro de pinto processado imunohistoquimicamente com anticorpo contra a subunidade GluR2 do receptor de glutamato do tipo AMPA. Observamos a presença de muitos corpos celulares GluR2-positivos na parte central do PT. O SpL e o SpM apresentam quase 100% de suas células GluR2-positivas. Barra de escala: 250  $\mu$ m.

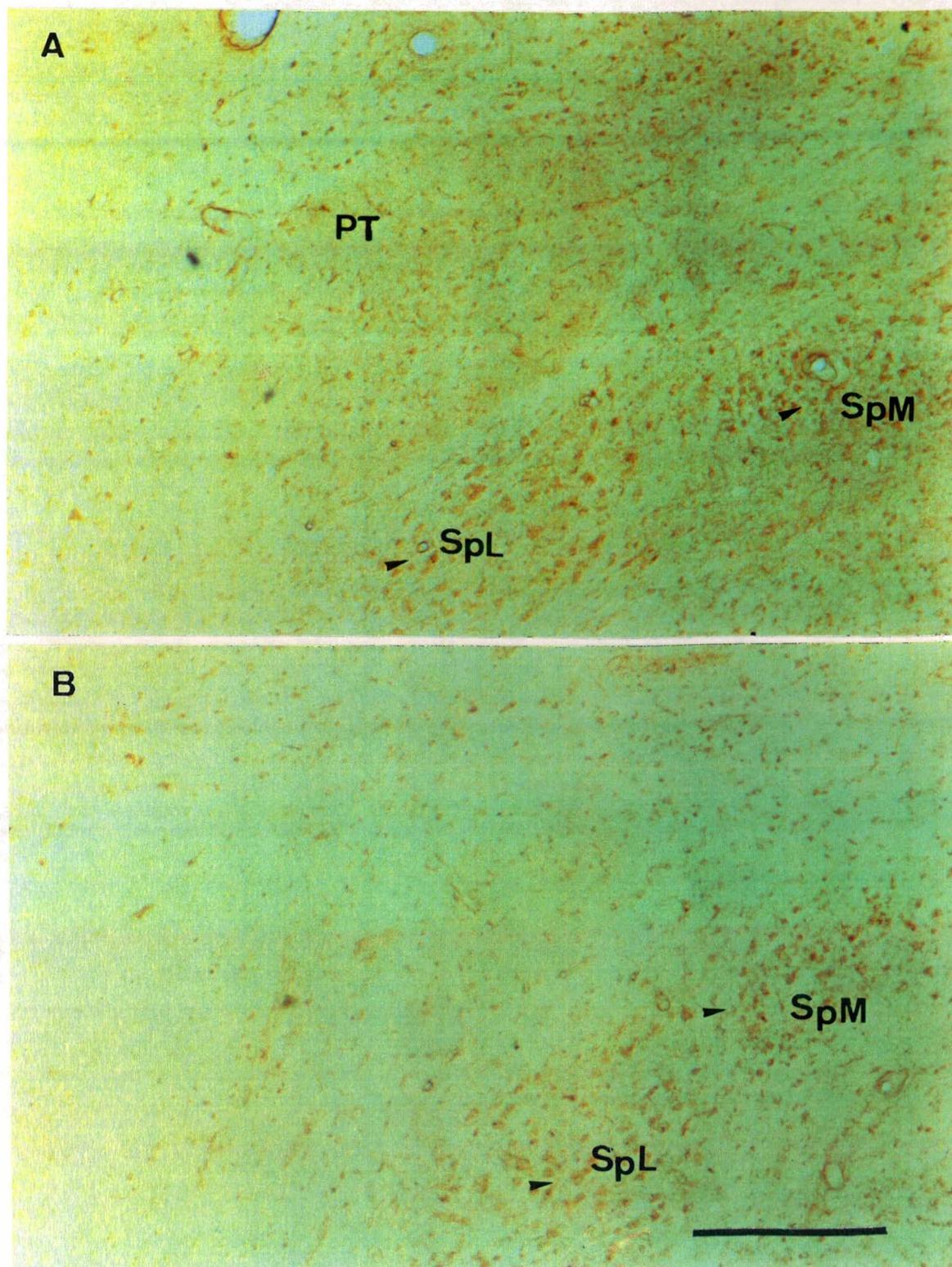
consideradas GluR2-positivas observadas tanto no SpL quanto no SpM. Utilizando um anticorpo dirigido contra uma mesma seqüência compartilhada pelas subunidades GluR2 e GluR3 (anti-GluR2/3), podemos perceber que o padrão de marcação (apesar de sempre ser mais fraco) não muda no PT, porém, células imunorreativas ao GluR2/3 foram encontradas somente no SpL mas não no SpM (figura 13).

O teste de dois novos anticorpos contra a subunidade GluR3 (figura 14) revelou resultados parecidos, mas nenhum deles mostrou especificidade suficiente para uma marcação capaz de ser considerada positiva em definitivo. Os resultados desses experimentos revelaram o PT sem nenhuma marcação digna de nota e indícios de corpos celulares no SpL e SpM.

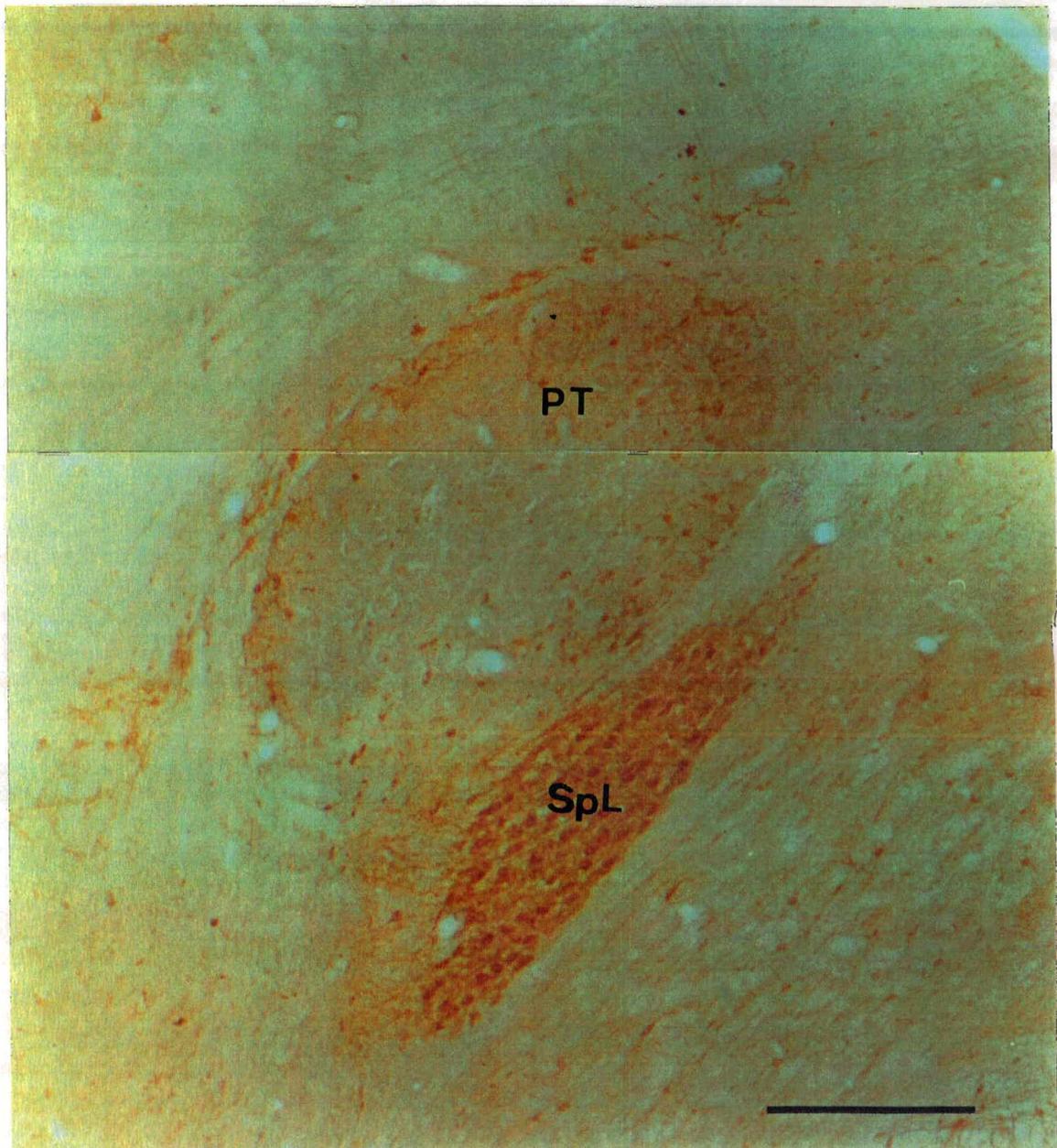
O anticorpo contra a subunidade GluR4 demonstrou forte marcação de processos e corpos celulares no SpL (figura 15), em um padrão similar ao visto para PV e CB, mas não CR. A região central do PT não apresentou imunoreatividade GluR4+ mas, de forma curiosa, a região marginal deste mostrou umas poucas células e processos tal qual as vistas nos experimentos com PV e CR, mas não CB.



**Figura 13.** Fotomicrografia de corte coronal do cérebro de pinto processado imunohistoquimicamente com anticorpo contra uma seqüência comum às subunidades GluR2 e GluR3 (anti-GluR2/3) do receptor de glutamato do tipo AMPA. Observamos que o padrão de marcação para o PT é o mesmo quando utilizamos os anticorpos contra GluR2. Não foram observadas células GluR2/3 no SpM, somente no SpL. Barra de escala: 250  $\mu$ m.



**Figura 14 A e B.** Corte coronal do cérebro de pinto processado com anticorpo contra a subunidade GluR3 do receptor de glutamato do tipo AMPA. Em A o anticorpo utilizado foi o N-19 e em B o tecido adjacente foi processado com o C-20. Embora ainda em testes, e sem uma marcação comprovadamente positiva, os resultados no SpL e SpM foram semelhantes, podendo ser vistas muitas células possivelmente GluR3-positivas nos dois núcleos em questão. O PT não mostrou imunorreatividade apenas um leve indício em A, onde o anticorpo foi N-19. Barra de escala: 250  $\mu$ m.



**Figura 15.** Fotomontagem de fotomicrografias de cortes coronais do cérebro de pinto processado imuno-histoquimicamente com anticorpo contra a subunidade GluR4 do receptor de glutamato do tipo AMPA. Observamos uma forte marcação de processos e corpos celulares GluR4-positivos no SpL. O PT apresentou imunorreatividade GluR-positiva em poucas células e processos na região que circunda o núcleo. Barra de escala: 250  $\mu$ m.

## 5 DISCUSSÃO

A determinação do padrão de imunorreatividade das proteínas ligantes de cálcio parvalbumina, calbindina e calretinina na região pré-tectal de pintos foi muito útil na identificação dos três núcleos de interesse no presente trabalho: o núcleo pré-tectal (PT), o núcleo espiriforme medial (SpM) e o núcleo espiriforme lateral (SpL). Este procedimento revelou que distintas populações neuronais participam da constituição de cada um deles, servindo como potencial marcador de tipos celulares intranucleares.

Mesmo ainda sendo especulativo o papel funcional da parvalbumina, da calbindina-D28k e da calretinina no sistema nervoso, (Braun, 1990; Baimbridge *et al.*, 1992), é conhecido que essas proteínas são ligantes de cálcio (Celio e Heizmann, 1981; Heizmann e Braun, 1992; Celio, 1990) e que têm distribuição não uniforme no sistema nervoso (Jones e Hendry, 1989; Braun, 1990; Baimbridge *et al.*, 1992). O desconhecimento sobre quais vias e/ou etapas metabólicas intracelulares dependem dessas proteínas não impede de inferir que células que desempenham funções equivalentes devem apresentar um metabolismo similar, e, portanto, uniformidade de marcação. Assim, pode-se supor que neurônios imunorreativos para uma determinada proteína em uma mesma região, podem compor uma única população celular. Seguindo o mesmo raciocínio, a distribuição diferencial pode significar diferenças funcionais, mesmo estando as células em um mesmo núcleo.

Até pouco tempo atrás, pensava-se que no PT o clássico envoltório não corado por corantes celulares (como Nissl, por exemplo) era formado apenas por fibras de passagem, que trafegavam informações de regiões ântero-dorsais em direção às porções ventro-caudais, possivelmente ramos do tracto pré-tecto sub-pré-tectal, oriundo de emergências de núcleos talâmicos, ou ainda fibras descendentes da comissura posterior.

Nossos dados revelaram uma insuspeitada população de células PV+ e CR+ formando uma rede, envolvendo o PT. Nessa mesma região, encontramos algumas células imunorreativas ao anticorpo contra GluR4, mas não foram detectados corpos celulares GluR4+ no interior do PT. Convergindo estes dois dados, podemos suspeitar da existência de um interessante circuito relê. O PT poderia funcionar segundo um sistema do tipo “núcleo-manto” onde, aferências glutamatérgicas, através de receptores do tipo AMPA, aportam na superfície do PT, modulando as células da porção interna desse núcleo. Dados não publicados, obtidos de cortes do cérebro de pombos em nosso laboratório, indicam similaridade nesse tipo de marcação. Sendo verdade, essa população de células no centro do PT seriam as responsáveis por suas projeções eferentes; mesmo não sendo ainda totalmente determinados quais seriam os alvos dessa projeção além da camada 5b do tecto óptico (TeO) de pombos (Gamlin, *et al.*, 1996). Regiões circunvizinhas ao PT, no território descrito como área pré-tectal (AP) em pombos, também já foram descritas como fonte de pesada inervação em direção ao núcleo de Edinger-Westphal, no complexo do nervo oculomotor (Reiner *et al.*, 1983; Gamlin *et al.*, 1984; Gamlin e Reiner, 1991). Porém, os dados do grupo de Gamlin foram obtidos utilizando-se injeções com um grande halo de dispersão o que não permitiu, de forma definitiva, excluir ou incluir o PT como parte dessa aferência ao EW. Estudos empregando o uso de traçadores neurais seletivos podem desvendar mais informações.

É provável, também, que a marcação diferenciada nos núcleos pré-tectais das proteínas ligantes de cálcio esteja relacionada com a atividade fisiológica destes núcleos. Sabe-se (Celio, 1984) que neurônios muito ativos requerem mecanismos outros de tamponamento de cálcio citosólico, como, por exemplo, as proteínas ligantes de cálcio, além das clássicas bombas de cálcio ATPásicas. Em várias regiões do sistema nervoso a imunoreatividade para parvalbumina coincide com o início da atividade fisiológica dessa mesma região, aumentando a possibilidade de que níveis de atividade afetam a expressão de parvalbumina (Fujiü e Lucaj, 1993).

A atividade fisiológica pode ser um dos determinantes na expressão de parvalbumina. Essas proteínas podem fazer parte (talvez como coadjuvantes) de sistemas maturacionais. Um outro dado interessante é que a imunoreatividade para parvalbumina declina após o nascimento em neurônios motores extraoculares apesar da atividade continuada (Fujiü e Lucaj, 1993), e também durante o envelhecimento (Toledo *et al.*, 1996). A ausência de imunomarcção para calbindina no PT e no SpM pode refletir um

declínio regulado pelo desenvolvimento visto que nossos dados foram colhidos em indivíduos considerados jovens (entre 10 e 15 dias), ou pode ser apenas que a calbindina seja totalmente ausente nestes núcleos. Para clarificar esse ponto, experimentos similares aos realizados no presente trabalho devem ser feitos em animais recém nascidos e maduros (adultos).

Dados recentes (Britto *et al.*, 1994) indicam que aferências da retina podem controlar a expressão de calbindina e parvalbumina nas camadas retino-recipientes do TeO de pombos. Esses autores reportam que lesões na retina em pombos podem produzir uma depleção na imunorreatividade do corpo celular e do neurópilo dos neurônios do TeO para ambas as proteínas. Existem evidências de que a retina de aves contém muitas células ganglionares CB+, mas poucas células PV+. Nossos dados mostram uma marcação nula para CB no PT o que sugere que as já descritas projeções retinianas a esse núcleo (Gamlin *et al.*, 1984) não parecem conter essa proteína.

Vários estudos têm avaliado os efeitos da privação visual sobre a distribuição da parvalbumina e calbindina em estruturas retino-recipientes centrais do cérebro de macacos, ratos e peixes. Nos macacos a privação visual produz uma depleção da imunorreatividade à parvalbumina e à calbindina no núcleo geniculado dorsal, mas não no colículo superior (Blümcke *et al.*, 1994; Mize e Luo, 1992; Mize *et al.*, 1992; Tigges e Tigges, 1991; Tigges e Tigges, 1993). Contudo, o padrão de expressão de imunorreatividade para parvalbumina no colículo superior de rato muda após lesões na retina (Schmitdt *et al.*, 1992). Assim, uma vez expressa, a parvalbumina no colículo superior de alguns mamíferos passa a depender de estímulos visuais continuados. Em peixes ciprinídeos, há uma depleção da imunorreatividade para calbindina no TeO seguida da enucleação dos olhos. As eventuais incongruências entre esses dados podem ser explicadas devido a possíveis diferenças interespecíficas na distribuição de proteínas ligantes de cálcio no cérebro desses animais. Essas diferenças, mesmo em áreas equivalentes, parecem ser muito frequentes no cérebro e retina de diferentes vertebrados (Andressen *et al.*, 1993; Braun, 1990; Ellis *et al.*, 1991; Hamano *et al.*, 1990; Pochet *et al.*, 1991; Sanna *et al.*, 1993; Toledo *et al.*, 1998).

Nos cortes incubados com o anticorpo contra calretinina, os três núcleos pré-tectais estudados em nosso trabalho, o PT, o SpL e o SpM, mostraram um padrão característico de imunorreatividade. O PT apresentou inúmeros processos CR+ no centro,

em uma disposição lembrando campos terminais. Esse centro pareceu estar encapsulado por um bem marcado contingente de fibras e células CR+. O SpL e o SpM mostram muitos processos CR+, mas apenas o SpM apresentou células CR+. Em todos os casos desconhecem-se as origens dessa bem delimitada inervação (em especial sobre as células do centro do PT) por fibras CR+.

Com relação aos dados sobre a população de corpos celulares CR+ observada no núcleo espiriforme medial (SpM), nossos resultados confirmaram a exuberante imunomarcagem reportada recentemente (De Castro *et al.*, 1998). Quase todas as células do SpM mostraram ser positivas para CR. Naquele trabalho, De Castro e colaboradores (1998) investigaram a distribuição de neurônios pré-tectais que se projetam para o cerebelo, e a compararam com as células que apresentam imunorreatividade para essa mesma proteína. A projeção dos núcleos retino-recipientes da região pré-tectal (o SpM dentre eles) para o cerebelo é um forte indício do envolvimento desta região no controle de vários ajustes reflexos visuais. Estes resultados permitiram verificar que as células CR+ do SpM se projetam para o córtex cerebelar. Muitas populações celulares pré-tectais emitem projeções para o cerebelo (De Castro *et al.*, 1998; Brecha e Karten, 1979; Gamlin e Cohen, 1988) e deste recebem aferências (Huntbor *et al.*, 1973) dada à importância dessa área como integradora sensorio-motora.

Existem evidências de que um outro núcleo pré-tectal, o SpL, possa ser uma estação adicional de processamento motor, relacionada aos gânglios da base em aves (Reiner *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1999). O SpL, inclusive, tem dentre seus inúmeros alvos de projeção, várias camadas tectais (Medina *et al.*, 1999).

Os núcleos da região pré-tectal recebem maciças aferências da retina mas, conforme anteriormente citado, apenas uma pequena população celular está envolvida no reflexo pupilar à luz (Gamlin *et al.*, 1996). Experimentos de marcação retrógrada e anterógrada tem demonstrado eferências de alguns núcleos pré-tectais para estruturas envolvidas no movimento ocular, movimentos da cabeça e controle postural (Gamlin *et al.*, 1996). Além desse envolvimento, parece que o SpL (Medina *et al.*, 1999) e o PT (Toledo e Reiner, dados não publicados) também enviam aferências para outras regiões que também estão envolvidas no papel visuomotor pré-tectal. É certo, porém, que o SpL recebe projeções de áreas estriatais (Medina e Reiner, 1997), o equivalente de aves ao córtex motor de mamíferos (Medina e Reiner, 2000), cujas aferências são glutamatérgicas

(Medina e Reiner, 1996), e que atuam em mamíferos, através de receptores do tipo AMPA (Paquet e Smith, 1996).

O glutamato é um dos mais importantes neurotransmissores do circuito visual primário (Hestrin, 1992) e parece estar envolvido na modulação da maior parte dos circuitos neurais, bem como na modulação sináptica durante o desenvolvimento e consolidação das próprias vias neurais (Collingridge e Bliss, 1987; McDonald e Johnson, 1990; Ozawa *et al.*, 1998).

Dentre os vários canais sensoriais presentes em vertebrados, o sistema visual é um dos que mais necessita de respostas rápidas no processamento; por isso não causa surpresa que um dos grandes candidatos em fazer a mediação entre circuitos reflexos visuais seja justamente o glutamato (Hestrin, 1992). O conhecimento da existência de receptores do tipo AMPA na região pré-tectal indica uma via imediata de processamento da informação, visto que essa classe de receptores apresenta uma cinética muito mais rápida que os do tipo NMDA (Gasic e Hollmann, 1992; Hestrin, 1993).

O receptor de glutamato do tipo AMPA é uma estrutura tetramérica (Rosenmund *et al.*, 1998), sendo esse tetrâmero uma combinação de quatro subunidades diferentes denominadas GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4. Desta forma, a composição dos receptores do tipo AMPA é bastante variada, dependendo de quais subunidades o receptor é formado (Verdoorn *et al.*, 1991; Bochet *et al.*, 1994, Ozawa *et al.*, 1998).

Em nossos experimentos, todos os núcleos pré-tectais estudados, o PT, o SpL e o SpM, mostraram algum tipo de imunorreatividade quando foram utilizados anticorpos contra cada uma das subunidades dos receptores do tipo AMPA, com variação de localização e graus de imunomarcção. A região central do PT apresentou imunorreatividade para as subunidades GluR1 e GluR2, sendo a marcação restrita a processos no caso de GluR1 e fibras e células no caso de GluR2. O anticorpo dirigido contra uma seqüência compartilhada por ambas subunidades GluR2 e GluR3 (GluR2/3), o padrão de marcação é o mesmo, porém mais fraco. Utilizando somente o anticorpo contra a subunidade GluR3 o PT não apresentou imunomarcção o que sugere que apenas a subunidade GluR2 (e não a GluR3) parece estar presente nesse núcleo. Conforme apresentado anteriormente, contra o anticorpo GluR4 o PT não apresentou imunorreatividade na parte central, somente na região marginal deste núcleo. Nessa porção

marginal do PT, poucas células e processos foram observadas, sugerindo uma similaridade entre a distribuição de GluR4 e a imunorreatividade positiva para PV e CR. Existe a forte impressão de que estas células GluR4+ podem co-localizar PV e/ou CR, mas esse ponto somente poderá ser devidamente esclarecido empregando-se procedimentos de dupla marcação.

O SpM apresentou imunorreatividade contra as subunidades GluR1 (com a marcação de células e processos), GluR2 (quase 100% das células marcadas) e GluR3 (indícios de corpos celulares), dados que corroboram o papel desse núcleo como parte de circuitos integrativos motores pré-cerebelares, sendo alvo potencial de projeções glutamatérgicas.

O SpL apresentou imunorreatividade contra as subunidades GluR2 (quase 100% das células marcadas), GluR2/3 (somente células), GluR3 (indícios de corpos celulares) e GluR4 com forte marcação de corpos celulares e processos em um padrão similar ao visto para PV e CB, mas não CR. Da mesma maneira que o SpM (mas aparentemente envolvido em outra classe de ajustes motores), o SpL parece ser componente acessório dos circuitos basais (Medina e Reiner, 1999) atuando sob forte descarga glutamatérgica, tal qual descrito em primatas (Paquet e Smith, 1996).

Esses resultados coletivamente sugerem que diferentes subpopulações de neurônios implicados em respostas visuais diretas (PT e, supostamente, o SpM) ou indiretas (SpL) podem expressar diferentes combinações de subunidades do tipo AMPA. Sendo assim, esses receptores podem gerar múltiplas respostas a partir da ativação derivada do glutamato liberados através de axônios provenientes das células ganglionares da retina (projeção direta) ou mesmo subservindo outros sistemas.

Algumas proteínas ligantes de cálcio como a parvalbumina, calbindina e a calretinina estão co-localizadas com o GABA em algumas regiões do sistema nervoso central (Célio, 1990; 1986; Jones e Hendry, 1989). Parece ser consenso de que a expressão das proteínas ligantes de cálcio não é determinada pelo tipo de neurotransmissor presente no circuito, mas sim pelo papel fisiológico desempenhado pela célula. Os modelos de distribuição sugerem que estas proteínas ligantes de cálcio não são essenciais para as propriedades básicas dos neurônios, mas podem ser essenciais para modular essas mesmas propriedades em determinados subtipos celulares.

Uma das primeiras hipóteses a respeito do papel da calbindina e parvalbumina sugere uma ligação existente entre a sua expressão e a excitabilidade das células nervosas. Essas duas proteínas ligam-se ao cálcio com alta afinidade tendo por consequência um efeito de tamponamento desse íon o que pode resultar em diferentes efeitos na célula visto que muitas etapas metabólicas são dependentes do valor da concentração do cálcio citosólico (Celio e Heizmann, 1981; Braun, 1990; Celio, 1990; Baimbridge *et al.*, 1992; Heizmann e Braun, 1992). Esses efeitos podem incluir: alteração da duração do potencial de ação, permissão do influxo de cálcio com total despolarização de membrana e/ou proteção da célula contra os efeitos danosos devido ao influxo de cálcio excessivo durante períodos prolongados de alta atividade celular (Celio, 1990; Baimbridge *et al.*, 1992).

Uma outra e interessante abordagem é procurar correlacionar eventuais imunomarcações entre GluRs e proteínas ligantes de cálcio (CaBPs). Neurônios que disparam de forma rápida e acentuada, tais como aqueles que recebem aferências glutamatérgicas respondendo através de receptores ionotrópicos do tipo AMPA (Hestrin, 1993), devem necessitar de um sistema adicional de tamponamento de cálcio citosólico, tal qual aquele proporcionado por proteínas como parvalbumina, calbindina e calretinina.

Uma outra questão que merece ser investigada é procurar saber se o padrão e forma de expressão das CaBPs e/ou dos GluRs podem ser alterados ao longo do período maturacional ou mesmo no envelhecimento.

De qualquer maneira, os resultados aqui obtidos são primeiro passo necessário e essencial em busca de uma melhor compreensão sobre o papel dos circuitos pré-tectais como centro integrador de informações visuais gerando ajustes reflexos sejam eles oculares diretos ou não; ou ainda outros comportamentos motores mas que dependem, de alguma forma, da informação visual.

## CONCLUSÕES

- Nossos resultados principais foram a confirmação da potencial utilização de proteínas ligantes de cálcio como marcadoras de populações neuronais no pré-tecto de aves.
- O glutamato pode participar do controle funcional nos três núcleos pré-tectais estudados, o PT, O SpL e o SpM; sendo que essa participação é feita através de receptores do tipo AMPA.
- Além disso, como resultados adicionais, podemos sugerir que citoaquiteticamente, o PT é uma estrutura singular; composta por um região central envolta por um grupamento neuronal em forma de rede.
- As células do SpM contêm, majoritariamente, CR.
- Quase a totalidade das células do SpL apresentam CB e PV, e sua imunomarcação característica permite identificar, com facilidade, a região celular da porção formada por fibras eferentes.
- A distribuição diferencial das subunidades de receptores do tipo AMPA indica que subpopulações celulares distintas reagem de maneira exclusiva à presença do glutamato; permitindo assim, diferentes níveis de resposta neuronal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRESSEN, C.; BLUMCKE, I. e CELIO, M. R. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. **Cell Tissue Research**, **271**: 181-208, 1993.
- ASTE, B.; VIGLIETTI-PANZICA, C.; FASOLO, A.; ANDREONE, C.; VAUDRY, H.; PELLETIER, G. e PANZICA, G. C. Localization of neuropeptide Y-immunoreactive cells and fibres in the brain of the *Japanese quail*. **Cell Tissue Research**, **265**: 219-230, 1991.
- BAIMBRIDGE, K. G.; CELIO, M. R. e ROGERS, J. H. Calcium-binding proteins in the nervous system. **Trends Neuroscience**, **15**: 303-308, 1992.
- BALDO, M. V. e BRITTO, L. R. . Accessory optic-pretectal interactions in the pigeon. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, **23**(10): 1037-40, 1990.
- BONAVENTURE, N., WIOLAND, N e JARDON, B. On gabaergic mechanisms in the optokinetic nystagmus of the frog: effects of bicuculline, allylglycine and SR 95103, a new GABA antagonist. **European Journal of Pharmacology**, **118**: 61-68, 1985.
- BASS, A. H e NORTHCUTT, R. G. Primary retinal targets in the Atlantic eoggerhead sea turtle *Caretta caretta*. **Cell Tissue Research** **218**: 253-264, 1981.
- BARNARD, E. Ionotropic glutamate receptors: new types and new concepts. **Trend Pharmacology Science**, **18**: 141-8, 1997.
- BLÜMCKE, I.; WERUAGA, E.; KASAS, S.; HENDRICKSON, A.E. e CELIO, M.R. Discrete reduction patterns of parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivity in the dorsal lateral geniculate nucleus and the striate cortex of adult macaque after monocular enucleation. **Visual Neuroscience**, **11**: 1-12, 1994.

- BOCHET, P.; AUDINAT, E.; LAMBOLEZ, B.; CREPEL, F.; ROSSIER, J.; IINO, M.; TSUZUKI, K. e OZAWA, S. Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron*, **12**: 383-388, 1994.
- BORDNARENKO, S. R.; MCKENNA, O. C. e LEVI, S. Identification of the retinal ganglion cells projecting to a pretectal nucleus, the lentiform nucleus of the mesencephalon (LM) in chicken. *Society Neuroscience Abstract* **11**: 1099, 1985.
- BOSWELLT, T.; MILLAM, J. R.; LI, Q. e DUNN, I. C. Cellular localization of neuropeptide Y mRNA and peptide in the brain of the *Japanese quail* and domestic chicken. *Cell Tissue Research*, **293**: 31-38, 1998.
- BRAUN, K. Calcium-binding proteins in avian and mammalian central nervous system: localization, development, and possible functions. *Program Histochemistry Cytochemistry*, **21**: 1-64, 1990.
- BRECHA, N. e KARTEN, H. J. Accessory optic projections upon oculomotor nuclei and vestibulo cerebellum. *Science*, **203**: 913-916, 1979.
- BRITTO, L. R. G; GOBERSZTEJN, F.; KARTEN, H. J. e COX, K. Depletion and recovery of calcium-binding proteins calbindin and parvalbumin in the pigeon optic tectum following retinal lesions. *Brain Research*, **661**: 289-292, 1994.
- BUGBEE, N. M. The basal ganglia tectal pathway: its role in visually-guided behavior in the pigeon (*Columba livia*) PhD dissertation, University of Maryland, College Park, MD, 1979.
- BUTLER, A. B. e HODOS, W. **Comparative Vertebrate Neuroanatomy - Evolution and Adaptation**. WILEY-LISS e SONS, Inc., Publication New York, 1996. P. 281-297.
- BUTLER, A. B. e NORTHCUTT, R. G. Retinal projections in *Iguana iguana* and *Anolis carolinensis*. *Brain Research*, **26**:1-13, 1971.
- CELIO, M. R. e HEIZMANN, C. W. Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. *Nature*, **293**: 300-302, 1981.
- CELIO, M. R.. Parvalbumin as a marker of fast firing neurons. *Neuroscience Letters*, **18**: 322, 1984.

- CELIO, M. R. Parvalbumin in most gama-aminobutiric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. **Science**, **231**: 995-997, 1986.
- CELIO, M. R. Calcium-binding proteins in the brain. **Archive Italian Anatomy Embriology**, **94**: 227-236, 1989.
- CELIO, M. R. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. **Neuroscience**, **35**: 373-475, 1990.
- CLARKE, P. G. H. Some visual and other connections to the cerebellum of pigeon. **Journal Compartment Neurology**, **174**: 535-552, 1977.
- COLLINGRIDGE, G. L e BLISS, T. V. P. NMDA Receptors, their roles in long-term potentiation. **TINS**, **10**: 288-293, 1987.
- CONN, P. J. e PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, **37**: 205-237, 1997.
- COZZI, B.; VIGLIETTI – PANZICA C.; ASTE, N.; e PANZICA, G. C. The serotonergic system in the brain of the *Japanese quail*. **Cell Tissue Research**, **263**: 271-284, 1991.
- DAHLSTROM, A. e FUXE, K. Evidence for the existence of monoaminergic-containing neurons in the central nervous system. **Acta Physiologyogy Scand**, **232**: 3-63, 1964.
- De CASTRO, F.; COBOS, I.; PUELLES, L. e MARTINEZ, S. Calretinin in pretecto-and olivocerebellar projections in the chick: immunohistochemical and experimental study. **Journal Compartment Neurology**, **397**(2): 149-162, 1998.
- DEMEULEMESTER, H.; ARCKENS, L.; VANDESANDE, F.; ORBAN, G. A.; HEIZMANN, C. W. e POCHE, R.. Calcium-binding protein as molecular markers for cat geniculate neurons. **Experimental Brain Research**, **83**: 513-520, 1991.
- EBLING, F. G. The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. **Program Neurobiology**, **50**: 109-32, 1996.
- ELLIS, J. H.; RICHARDS, D. E. e ROGERS, J. H. Caretinin and calbindin in the retina of the developing chick. **Cell Tissue Research**, **264**: 197-208, 1991.

- EWERT, J. P. Neural mechanisms of prey-catching and avoidance behavior in the toad (*Bufo bufo* L.). **Brain Behavior Evolution**, 74: 36-56, 1970.
- FALK, B. Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by a fluorescence method. **Acta Physiology Scand**, 56 [Suppl 197]:5-25,1962.
- FUJII, J. T e LUCAJ, Z. Calcium-binding proteins in the chick Edinger-Westphal nucleus. **Brain Research**, 605: 200-206, 1993.
- FUXE, K. e LJUNGGREN, L. Cellular localization of monoamines in the upper brain stem of the pigeon. **Journal Compartment Neurology**, 125: 355-382, 1965.
- GAMLIN, P. D. R.; REINER, A.; ERICHSEN, J. T.; KARTEN, H. J. e COHEN, D. H.. The neural substrate for the pupillary light reflex in the pigeon (*Columba livia*). **Journal Compartment Neurology**, 226: 523-543, 1984.
- GAMLIN, P. D. R. e COHEN, D. H. Projections of the Retinorecipient Pretectal nuclei in the Pigeon (*Columba livia*). **Journal Compartment Neurology**, 269: 18-46, 1988.
- GAMLIN, P. D. R. e REINER, A. The Edinger-Westphal nucleus: sources of input influencing accommodation, pupilloconstriction, and choroidal blood flow. **Journal Compartment Neurology**, 306: 425-438, 1991
- GAMLIN, P. D. R. e CLARKE, R. J. Dynamics of the pupillary light reflex in the alert *Rhesus monkey*. **Invertebrate Ophthalmology Visual Science**, 37(3): S691, 1996.
- GAMLIN, P. D. R.; REINER, A.; KEYSER, K. T.; BRECHA, N. e KARTEN, H. J. Projection of the nucleus pretectalis to a Retinorecipient Tectal Layer in the Pigeon (*Columba livia*). **Journal Compartment Neurology**, 368: 424-438, 1996.
- GIOANNI, H; VILLALOBOS J; REY J e DALBERA A. Optokinetic Nystagmus in the Pigeon (*Columba livia*) III. Role of the Nucleus Ectomamillaris (nEM): Interactions in the in the Accessory Optic System (AOS). **Experimental Brain Research**, 50: 248-258, 1983.
- GASIC, G. P. e HOLLMANN, M.. Molecular neurobiology of glutamate receptors. **Annual Review Physiology**, 54: 507-536, 1992.

HAMANO, K.; KIYAMA, H.; EMSON, P. C.; MANABE, R.; NAKAUCHI, M. e TOHYAMA, M. Localization of two calcium-binding proteins, calbindin (28kD) and parvalbumin (12kD), in the vertebrate retina. **Journal Compartment Neurology**, **302**: 417-424, 1990.

HEIZMANN, C. W. e BRAUN, K. Changes in Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in human neurodegenerative disorders. **Trends Neuroscience**, **15**: 259-264, 1992.

HENDRY, S. H. C. e JONES, E. G. GABA neuronal subpopulations in cat primary auditory cortex: co-localization with calcium binding proteins. **Brain Research**, **543**: 45-55, 1991.

HESTRIN, S. Activation and desensitization of glutamate-activated channels mediating fast excitatory synaptic currents in the visual cortex. **Neuron**, **9**: 991-999, 1992.

HESTRIN, S. Different glutamate receptor channels mediate fast excitatory synaptic currents in inhibitory and excitatory cortical neurons. **Neuron**, **11**: 1083-1091, 1993.

HOLLMANN, M. e HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annual Review Neuroscience**, **17**: 31-108, 1994.

HUNTBORN, H.; MORI, K. e TSUKAHARA, N. The neuronal pathway subserving the pupillary light reflex and its facilitation from cerebellar nuclei. **Brain Research**, **63**: 357-361, 1973.

JONES, E. G. e HENDRY, S. H. C. Differential calcium-binding protein immunoreactivity distinguishes classes of relay neurons in monkey thalamic nuclei. **European Journal Neuroscience**, **1**: 222-246, 1989.

KARTEN, H. J. e HODOS, W. A. **A stereotaxic Atlas of the Pigeon (*Columba livia*)**. Baltimore: Johns Hopkins Press, 1967.

KLOOSTER, J. e VRENSSEN, G. F. J. M.. New indirect pathways subserving the pupillary light reflex: projections of the accessory oculomotor nuclei and the periaqueductal gray to the Edinger-Westphal nucleus and the thoracic spinal cord in rats. **Anatomol Embriology**, **198**: 123-132, 1998.

- KLOOSTER, J. e VRENSEN, G. F. J. M. The ultrastructure of the olivary pretectal nucleus in rats. A tracing and GABA immunohistochemical study. **Experimental Brain Research**, **114**: 51-62, 1997.
- KUBO, Y.; MIYASHITA, T. e MURATA, Y. Structural basis for a Ca<sup>2+</sup>-sensing function of the metabotropic glutamate receptors. **Science**, **279**: 1722-1725, 1998.
- KUENZEL, W. J. e MASSON, M. **A stereotaxic atlas of the brain of the chick (*Gallus domesticus*)**. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, 1988.
- KUSONOKOI, T. e AMEMIYA, F. retinal projections in the hagfish *Eptatretus burgeri*. **Brain Research**, **262**: 295-298, 1983.
- McDONALD, J. W. e JOHNSON, M. V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. **Brain Research Reviews**, **15**: 41-70, 1990.
- McKENNA, O. C. e WALLMAN, J. Accessory optic system and pretectum of birds: comparisons with those of other vertebrates. **Brain Behavior Evolution**, **26**: 91-116, 1985.
- MEDINA, L. e REINER, A. Immunohistochemical characterization of the striatal input to neurons os the dorsal pallidum in pigeon, with particular emphasis on pallido-thalamic neurons. **Society Neuroscience Abstract**, **22**: 674, 1996.
- MEDINA, L. e REINER, A. The efferent projections of the dorsal and ventral pallidal parts of the pigeon basal ganglia, studied with biotinylated dextran amine. **Neuroscience**, **81**: 773-802, 1997.
- MEDINA, L.; JIAO, Y. e REINER, A. The function of the basal ganglia in birds. **European Journal Morphology**, **37**: 160-165, 1999.
- MEDINA, L. e REINER, A. Do birds possess homologues of mammalian primary visual, somatosensory and motor cortices? **Trends Neuroscience**, **23**: 1-12, 2000.
- MIZE, R. R. e LUO, Q. Visual deprivation fails to reduce calbindin 28kD or GABA immunoreactivity in the *Rhesus* monkey superior colliculus. **Visual Neuroscience**, **9**: 157-168, 1992.

- MIZE, R. R.; LUO, Q.; BUTTLER, G.; JEON, C.J. e NABORS, B. The calcium-binding proteins parvalbumin and calbindin-D 28k form complementary patterns in the cat superior colliculus. **Journal Compartment Neurology**, **320**: 243-256, 1992.
- NORTHCUTT, R. G. retinofugal projections in the *Lepidosirenid lungfishes*. **Journal Compartment Neurology**, **174**: 553-574, 1977.
- NORTHCUTT, R. G. e WATTHEY, J. C. Guitarfish possess ipsilateral as well as contralateral retinofugal projections. **Neuroscience Letters**, **20**: 237-242, 1980.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H. e TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, **54**:581-618. 1998.
- PAQUET, M. e SMITH, Y. Differential localization of AMPA glutamate receptor subunits in the two segments of the globus pallidus and the substantia nigra reticulata in the squirrel monkey. **European Journal Neuroscience**, **8**: 229-233, 1996.
- POCHET, R.; PASTEELS, B.; SETO-OSHIMA, A.; BASTIANELLI, E.; KITAJIMA, S. e VAN ELDIK, L. J. Calmodulin and calbindin localization in retina from six species. **Journal Compartment Neurology**, **14**: 750-762, 1991.
- REINER, A.; KARTEN, H. J.; GAMLIN, P. D. R. e ERICHSEN, J. T. Parasympathetic ocular control: functional subdivisions and circuitry of the avian nucleus of Edinger-Westphal. **Trends in Neuroscience**, **6**: 140-145, 1983.
- REINER, A.; MEDINA, L. e VEENMAN, C. L. Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. **Brain Research Review**, **28**: 235-284, 1998.
- REPÉRANT, J.; LEMIRE, M.; MICELLI, D. e PERYCHOUX, J. A. A radiographic study of the visual system in the fresh water teleosts following intraocular injection of tritiated fucose and proline. **Brain Research**, **118**: 123-131, 1976.
- REPÉRANT, J. e RIO, J. P. Retinal projections in *Vipera aspis*. A reinvestigation using light autoradiographic and electron microscopic degeneration techniques. **Brain Research**, **107**: 603-609, 1976.
- ROSENMUND, C.; STERN-BACH, Y. e STEVENS, C. F. The tetrameric structure of a glutamate receptor chanel. **Science**, **280**: 1596-1599, 1998.

SAKO, H.; KOJIMA, T. e OKADO, N. Immunohistochemical study on the development of serotonergic neurons in the chick. I: Distribution of cell bodies and fibers in the brain. **Journal Compartment Neurology**, **253**: 61-78, 1986.

SANNA, P. P.; KEYSER, K. T.; CELIO, M. R.; KARTEN, H. J. e BLOOM, F. E. Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the vertebrate retina. **Brain Research**, **600**: 141-150, 1993.

SCHMIDT-KASTNER, R.; MELLER, D. e EYSEL, U. T. Immunohistochemical changes of neuronal calcium-binding proteins parvalbumin and calbindin D-28k following unilateral deafferentation in the rat visual system. **Experimental Neurology**, **117**: 230-246, 1992.

SCHWIPPERT, W. W. e EWERT, J. P. Effect of Neuropeptide-Y on tectal field potentials in the toad. **Brain Research**, **669**: 150-152, 1995.

STEINBUSCH, H. W. M. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. **Neuroscience**, **4**: 557-618, 1981.

SCHROEDER, D. M. Retinal afferents of infrared sensitive snake, *Crotalus viridis*. **Journal Morphology**, **170**: 29-42, 1981.

THEISS, C.; HELLMANN, B. e GUNTURKUN, O. The differential distribution of AMPA-receptor subunits in the tectofugal system of the pigeon. **Brain Research**, **785**: 114-128, 1998.

TIGGES, M. e TIGGES, J. Parvalbumin immunoreactivity of the lateral geniculate nucleus in the adult *Rhesus* monkey after monocular eye enucleation. **Visual Neuroscience**, **6**: 375-382, 1991.

TIGGES, M. e TIGGES, J. Parvalbumin immunoreactivity in the lateral geniculate nucleus of the *Rhesus* monkeys raised under monocular and bilocular deprivation conditions. **Visual Neuroscience**, **10**: 1043-1053, 1993.

TOLEDO, C. A. B.; CANTERAS, N. S. e BRITTO, L. R. G. Calcium-binding Proteins in the Chick Accessory Optic Nucleus. **Society for Neuroscience Abstracts**, **21**: 653, 1995.

TOLEDO, C. A. B.; MEDEIROS S., e BRITTO, L. R. G. Age-related changes in calcium-binding proteins expression on chick accessory optic nucleus. **Society for Neuroscience Abstracts**, 22:639, Washington, DC - USA, 1996.

TOLEDO, C. A. B., PIRES, R. S.; BRITTO, L. R. G., VEENMAN, C. L. e REINER, A. AMPA-type glutamate receptors and parvalbumin expression in the avian nucleus of Edinger-Westphal. **Society for Neuroscience Abstracts**, 24:1395, Los Angeles, CA - USA, 1998.

TOLEDO, C. A. B. e BRITTO, L. R. G. The Serotonergic Innervation of the Avian Motor Cranial Nerve Nuclei. **Italian Journal of Anatomy and Embriology**, 104(01): 716, 1999.

TOLEDO, C. A. B.; METZGER, M. e BRITTO, L. R. G. Monoaminergic Innervation of the Chick Optic Tectum. **Society for Neuroscience Abstracts**, 25: 1940, 1999.

VARGAS, C. D.; SOUSA, A. O.; BITTERNCOU, F. L.; SANTOS, C. M.; PEREIRA JÚNIOR, A.; BERNARDES, R. F.; ROCHA-MIRANDA, C. E. e VOLCHAN, E. Cytochrome oxidase and NADPH-diaphorase on the afferent relay branch of the optokinetic reflex in the opossum. **Journal Compartment Neurology**, 398(2): 206-24, 1998.

VEERDORN, T. A.; BURNASHEV, V.; MONYER, H.; SEEBURG, P. H. e SAKMANN, B. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. **Science**, 252: 1715-1718, 1991.

VESSELKIN, N. P.; ERMAKOVA, T. V.; REPÉRANT, J. KOSAREVA, A. A. e KENIGFEST, V. B. The retinofugal and retinopetal systems in *Lampetra fluviatilis*. An experimental study using radiographic and HRP methods. **Brain Research**. 195: 453-460, 1982.

WALLACE, J. A. An Immunocytochemical study of the development of central serotoninerg neurons in the chick embryo. **Journal Compartment Neurology**, 263: 443-453, 1985.

YAMADA, H.; TAKEUCHI, Y. e SANO, Y. Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken *Gallus domesticus*. I. Distribution of the neuronal somata. **Biogenic Amines**, 1: 17-28, 1984.

YAMADA, H. e SANO, Y. Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken *Gallus domesticus*. II. Distribution of the nerve fibers. **Biogenic Amines**, 2: 21-36, 1985.

YÜCEL, Y. H. ; HINDELANG, C; STOECKEL, M. E. e BONAVENTURE, N. GAD immunoreactivity in the pretectal and accessory optic nuclei of the frog mesencephalon. **Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.** 5034-5037, 1987.