



Universidade de Brasília

Instituto de Biologia – Departamento de Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Co-localização de entradas tectais nos
neurônios pulvinares projetados para a
amígdala em micosestrela (*Callithrix jacchus*)**

João Victor Montenegro Luzardo Bicca

Orientador: Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior

Brasília

2025



Universidade de Brasília

Instituto de Biologia – Departamento de Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Co-localização de entradas tectais nos neurônios pulvinares
projetados para a amígdala em micosestrela (*Callithrix jacchus*)**

João Victor Montenegro Luzardo Bicca

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior

Brasília

2025

**Co-localização de entradas tectais nos neurônios pulvinares projetados para a
amígdala em micosestrela (*Callithrix jacchus*)**

João Victor Montenegro Luzardo Bicca

Orientador: Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Aprovada em 30/01/2026 por:

Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior (Orientador / Presidente) – UnB

Prof.^a Dra. Luana Camargo – UnB

Prof. Dr. Jeferson Cavalcante – UFRN

Prof. Dr. Gabriel Campos Avohay – UnB

Brasília

2025

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MB583c Montenegro Luzardo Bicca, João Victor
Co-localização de entradas tectais nos neurônios
pulvinares projetados para a amígdala em micosestrela
(*Callithrix jacchus*) / João Victor Montenegro Luzardo Bicca;
orientador Rafael Plakoudi Souto Maior. Brasília, 2026.
89 p.

Tese (Mestrado em Biologia Animal) Universidade de
Brasília, 2026.

1. Traçamento Neural. 2. Neuroanatomia. 3. Primatas do
Novo Mundo. 4. Sistema Visual. I. Plakoudi Souto Maior,
Rafael, orient. II. Título.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Sir Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e estiveram presentes ao longo da minha trajetória, eu não estaria aqui sem vocês.

À minha família, pelo suporte inabalável. À minha mãe, Michelle Montenegro e ao meu pai, Victor Bicca Neto, por sempre terem me incentivado e apoiado e ser o melhor que posso ser. À minha irmã, Camille Montenegro, por ter me inspirado em vários momentos da minha vida. Aos meus avós, Alfredo Luzardo e Lúcia Luzardo, pelo apoio constante e por serem base fundamental em minha jornada.

À minha namorada, Camilla Bizarria, por todo o companheirismo, paciência e ajuda em momentos de desespero. Sua presença tornou os desafios deste mestrado muito mais leves.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior, pelas conversas, pelos ensinamentos e pela confiança depositada na realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, pela parceria e trocas diárias, em especial a Beatriz Monferrari e Maria Camila Acero, que vivenciaram de perto os desafios desta pesquisa.

A todos que ajudaram diretamente na execução do projeto, com menção especial ao Anderson De Lima, pelo auxílio fundamental na histologia, e ao Prof. Dr. Daniel Graziani, pelo apoio técnico e expertise na microscopia.

Aos professores do departamento e do instituto, pelas conversas, ensinamentos e pelos indispensáveis "cafézinhos" que enriqueceram o ambiente acadêmico, em especial aos professores Prof. Dr. Jair Trapé Goulart, Profa. Dra. Veronica Slobodian, Profa. Dra. Julia Klaczko e Profa. Dra. Márcia Mortari.

À equipe do Centro de Primatologia, cujo apoio foi essencial para o desenvolvimento deste estudo. Agradeço aos veterinários Antonizete dos Reis Souza e Juliana Vieira Flores Sales, e aos cuidadores Lindionor, Juan e Juracir, pelo zelo e suporte técnico.

Aos meus amigos de infância, em especial a Artur Godoy, João Vitor Szerwinsk, André Delgado, Felipe Wanderley e Matheus Pelanda, Felipe de Pina, Matheus Lodi, Lucca Salerno, Bruno Borela, Vítor Pestana e Guilherme Takahashi por estarem ao meu lado desde sempre e por serem o porto seguro fora do ambiente acadêmico.

Ao pessoal do Laboratório de Fauna e Unidade de Conservação (LAFUC), pelo apoio e pelas conversas, em especial a Fernanda Passaglia, Pedro Paulo de Queiroz, Luís Felipe de Lima, Afonso Santiago Meneses e Isabella Parreira.

Aos laboratórios parceiros que abriram suas portas e viabilizaram as análises deste trabalho: o Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM/UnB), o Laboratório de Anatomia Comparada de Vertebrados (LACV), o Laboratório de Neurofarmacologia (Neuropharma) e o Laboratório Multiusuário de Avaliação de Moléculas, Células e Tecidos (LABCEL/UFG).

À Universidade de Brasília, por todas as experiências e oportunidades que me proporcionou ao longo da minha jornada acadêmica, e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, pelo suporte logístico e burocrático.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado (Processo nº 88887.914352/2023-00).

À Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UnB), pela aprovação do projeto (nº 23106.137976/2023-59).

RESUMO

A rápida detecção e reação a ameaças é muito importante para a sobrevivência de um indivíduo. Os primatas possuem sistemas visuais altamente complexos, que foram selecionados ao longo de sua história evolutiva. A Teoria de Detecção de Serpentes (Isbell, 2006) postula que a principal pressão evolutiva seria a coexistência com serpentes peçonhentas. Uma das hipóteses centrais de Isbell é que *platyrrhini* teriam sistemas visuais mais variados quando comparados aos *catarrhini*, devido a um hiatus em sua coexistência com serpentes. Inspirado no artigo de Elorette *et al.* (2018), analisamos o movimento de traçadores neuronais pelo cérebro de indivíduos de *Callithrix jacchus* (n=3), infundindo um traçador retrógrado na amígdala e um anterógrado no colículo superior, e observando se eles se encontravam no pulvinar, com o intuito de elucidar a presença da “via baixa” de processamento visual emocional. Os tecidos foram processados por meio de imunofluorescência e observados em microscópios de epifluorescência e microscópios confocais à laser. Ambos os traçadores foram observados no pulvinar, assim como a justaposição deles. Isso sugere a preservação da via subcortical Colículo Superior -> Pulvinar -> Amígdala, indicando que, apesar das particularidades evolutivas dos *platyrrhini*, esse circuito de processamento rápido de estímulos visuais aversivos permanece conservado em *C. jacchus*.

Palavras-chave: Colículo Superior, Pulvinar, Amígdala, Traçamento neural, Primatas do Novo Mundo, Circuitos Neurais.

ABSTRACT

Rapid threat detection and reaction are crucial for an individual's survival. Primates possess highly complex visual systems selected throughout their evolutionary history. The Snake Detection Theory (Isbell, 2006) postulates that the primary evolutionary pressure was the coexistence with venomous snakes. One of Isbell's core hypotheses is that platyrrhines would have more varied visual systems compared to catarrhines due to a hiatus in their coexistence with snakes. Inspired by the study by Elorette *et al.* (2018), we analyzed the movement of neural tracers through the brains of *Callithrix jacchus* individuals (n=3), infusing a retrograde tracer into the amygdala and an anterograde tracer into the superior colliculus to observe if they converged in the pulvinar, aiming to elucidate the presence of the "low road" of emotional visual processing. Tissues were processed with immunofluorescence and observed using epifluorescence and laser scanning confocal microscopy. Both tracers were observed in the pulvinar, as well as their juxtaposition. This suggests the preservation of the Superior Colliculus -> Pulvinar -> Amygdala subcortical pathway, indicating that, despite the evolutionary particularities of platyrrhines, this rapid processing circuit for aversive visual stimuli remains preserved in *C. jacchus*.

Keywords: Superior Colliculus, Pulvinar, Amygdala, Neural tracing, New World primates, Neural Circuits.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Distribuição global de primatas. Fonte: Arizona State University. | 20 |
| Figura 2: Diagrama esquemático das duas principais vias neurais do sistema visual em primatas: a via retinogeniculada (Em vermelho) e a via retinotectal (Em azul). Fonte: Yu, 2021. | 24 |
| Figura 3: Estrutura laminada do núcleo geniculado lateral do tálamo, com as células que compõem cada camada. Fonte: Adamék et al., 2022. | 25 |
| Figura 4: Nomenclatura de traçadores com base em sua direção de movimento e transposição sináptica. Produzido pelo autor no Biorender, adaptado de Saleeba et al. (2019). | 36 |
| Figura 5: Imagem representativa das regiões-alvo das infusões e da área de perfusão estimada para o volume do traçador. A) Amígdala, A-P: +8,3; Vermelho: CTB B) Colículo Superior, A-P: +1,3; Verde: FE. Adaptado de: Paxinos et al. (2012). | 42 |
| Figura 6: Mosaicos de fotos de microscópia de luz da coloração de Nissl. A) Pulvinar; A-P: +3,55 B) Colículo Superior; A-P:+1,50. | 46 |
| Figura 7: Locais de infusão do indivíduo C2; A) Colículo Superior; A-P: +1,00 ;Verde: Limites do colículo superior; B) Núcleo lateral da amígdala; A-P: +8,00; Vermelho: Limites do núcleo lateral da amígdala. | 48 |
| Figura 8: Mosaico de imagens do pulvinar do indivíduo C3; A-P: +3,55; Verde: FE. | 49 |
| Figura 9: Z-stack do indivíduo C2, com a análise ortogonal do encontro dos traçadores, indicado pela seta. Azul: DAPI; Verde: FE; Vermelho: CTB. | 49 |
| Figura 10: Representação dos traçadores em um corte do pulvinar do indivíduo C3. Verde: FE; Vermelho: CTB. A) Subregiões do pulvinar com os traçadores derivado de mosaico feito em microscópio confocal. B) Plot do CTB nas subregiões. C) Plot do FE nas subregiões do pulvinar. D) Plot de ambos os traçadores no pulvinar; A-P: +4,00. | 50 |
| Figura 11: Z-stacks do pulvinar do indivíduo C3. Azul: DAPI; Verde: FE; Magenta: CTB. As setas indicam o encontro dos traçadores. | 51 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Coordenadas dos alvos e traçador correspondente..... | 41 |
| Tabela 2: Anticorpos utilizados para procedimento de imunofluorescência. | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAVs - Vírus Adeno-Associados

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CO - Citocromo Oxidase

CS - Colículo Superior

CT - Toxina da Cólera (Cholera Toxin)

CTB - Subunidade B da Toxina da Cólera

DAB - Diaminobenzidina

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole (marcador nuclear)

DTI - Imagem por Ressonância Magnética com Tensor de Difusão

FAL - Fazenda Água Limpa

FE - Fluoro-Emerald

FEF - Frontal Eye Field

FITC - Fluoresceína

GFP - Green Fluorescent Protein

HARDI - High Angular Resolution Diffusion Imaging

HRP - Horseradish Peroxidase

HSV - Herpes Simplex Virus

i.p. - Intraperitoneal

I.V. - Intravenosa

K - Koniocelulares (células ganglionares)

LA - Núcleo Lateral da Amígdala

LP - Núcleo Lateral Posterior

M - Magnocelulares (células ganglionares Parasols)

MT - Middle Temporal (Área visual temporal média)

NGL - Núcleo Genuculado Lateral

P - Parvocelulares (células ganglionares Midget)

PBS - Tampão Fosfato-Salino

PI - Pulvinar Inferior

PIcl - Pulvinar Inferior centrolateral

PIcm - Pulvinar Inferior centromedial

Pim - Pulvinar Inferior medial

PIp - Pulvinar Inferior posterior

PM - Pulvinar Medial

PO - Pulvinar Oral (ou Anterior)

SAI - Stratum Album Intermedium

SAP - Stratum Album Profundum

SIG - Stratum Griseum Intermedium

SGP - Stratum Griseum Profundum

SGS - Stratum Griseum Superficiale

SNr - Substantia Nigra pars reticulata

SO - Stratum Opticum

SZ - Stratum Zonale

UnB - Universidade de Brasília

V1 - Área Cortical Visual 1 (Córtex visual primário)

V2 - Área Cortical Visual 2

WGA - Wheat Germ Agglutinin

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução..... | 16 |
| 1.1. Primatas | 16 |
| 1.1.1. <i>Características gerais</i> | 16 |
| 1.1.2. <i>Hipóteses evolutivas do sistema visual de primatas</i> | 17 |
| 1.2. Sistema Visual dos primatas | 21 |
| 1.2.1. <i>Visão Geral</i> | 21 |
| 1.2.2. <i>Via retinogeniculada</i> | 24 |
| 1.2.3. <i>Via retinotectal</i> | 25 |
| 1.2.4. <i>Via colículo-pulvinar</i> | 27 |
| 1.2.5. <i>Via baixa de processamento de estímulos emocionais</i> | 29 |
| 1.3. Calitriquídeos..... | 32 |
| 1.4. Traçamento neural..... | 34 |
| 1.4.1. <i>A Importância da Conectividade Anatômica</i> | 34 |
| 1.4.2. <i>História do Traçamento Neural</i> | 35 |
| 1.4.3. <i>Características e Estratégias de Visualização de Traçadores</i> | 36 |
| 1.5. Enquadramento da pergunta experimental | 39 |
| 2. Objetivos..... | 39 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 39 |
| 2.2. Objetivos específicos | 40 |
| 3. Materiais e Métodos | 40 |
| 3.1. Sujeitos experimentais | 40 |
| 3.2. Cirurgia estereotáxica | 40 |
| 3.3. Preparação do tecido | 42 |
| 3.4. Procedimentos histológicos | 42 |
| 3.5. Imunofluorescência..... | 43 |
| 3.6. Análise microscópica | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Resultados | 44 |
| 4.1. Padronização Cirúrgica e Preservação Tecidual..... | 44 |
| 4.2. Seccionamento e Armazenamento | 45 |
| 4.3. Histoquímica (Nissl) | 46 |
| 4.4. Padronização da Imunofluorescência | 47 |
| 4.5. Observação do local de infusão | 47 |
| 4.6. Observação do Pulvinar..... | 48 |
| 5. Discussão | 52 |
| 5.1. Limitações..... | 54 |
| 6. Conclusão | 55 |
| 7. Referências Bibliográficas | 56 |
| Apêndice A – Protocolo Cirurgia Infusão dos Traçadores em Mico | 69 |
| Apêndice B – Protocolo Eutanásia e Preparo do Tecido para Histologia | 73 |
| Apêndice C – Protocolo de Imunofluorescência | 78 |
| Apêndice D – Protocolo de Histoquímica | 82 |
| Apêndice E – Redução de Autofluorescência | 87 |
| Anexo A – Declaração de Aprovação do CEUA - UnB | 89 |

1. Introdução

1.1. Primatas

1.1.1. Características gerais

Os primatas diferenciam-se dos demais mamíferos por um conjunto de especializações morfológicas e sensoriais em seus sistemas visuais, com a contrapartida de dependerem menos de seu sistema olfatório (Barton *et al.*, 1995; Kaas, 2013). Essas adaptações incluem, dentre outras, a fóvea profunda e vascularizada, aumentando a resolução no centro da visão, a convergência orbital, que permite uma maior sobreposição dos campos visuais e, conseqüentemente, um aumento da capacidade de percepção de profundidade (estereopsia), além de um alto grau de encefalização, com grande expansão do córtex visual estriado e extra-estriado, do tálamo, em especial do complexo pulvinar e do núcleo geniculado lateral, e também de outras estruturas do sistema visual, como o colículo superior (Kremers *et al.*, 2005; Jacobs, 2008; Chi, 2025).

Concomitantemente a esse refinamento visual, observa-se na linhagem uma redução progressiva das estruturas olfativas, como o bulbo olfatório e o tamanho do nariz, sugerindo um *trade-off* evolutivo entre essas modalidades sensoriais (Barton *et al.*, 1995; Jacobs, 2008). Além disso, estes animais desenvolveram extremidades preênseis, com substituição de garras por unhas planas na maioria das espécies (algumas espécies re-evoluíram garras a partir de unhas), permitindo uma integração e coordenação sensório-motora de olho-mão, necessária para a manipulação mais fina de objetos e locomoção em substratos complexos (Rasmussen, 2002; Schettino, 2006).

Entretanto, a extensão dessas adaptações varia consideravelmente dentro da ordem, sendo a alta especialização visual uma característica principalmente da linhagem dos *haplorrhini*, enquanto os *strepsirrhini* permanecem mais dependentes do olfato e retêm traços mais basais dos mamíferos. Essa distinção reflete as diferentes histórias evolutivas das duas subordens. Os *strepsirrhini* (lêmures, lóris e gálagos) se separaram em torno de 60 milhões de anos atrás do resto dos primatas, se isolando em Madagascar (Horvath *et al.*, 2008). Eles preservam características consideradas ancestrais, como o *tapetum lucidum* (camada refletiva na retina que aumenta a captação de luz, ajudando em momentos de baixa luminosidade, porém

limita a acuidade visual) e o rinário úmido, embora já possuam uma convergência orbital maior, indicando uma adaptação primária a nichos noturnos mas com uma dependência olfativa ainda significativa, com os comportamentos sociais de marcação de território e de seleção sexuais sendo baseados em feromônios, por exemplo (Kirk, 2004; Barton, 2006).

Em contraste, os *haplorrhini*, clado que agrupa os *tarsiiformes*, os *platyrrhini* (Macacos do Novo Mundo) e os *catarrhini* (Macacos do Velho Mundo e humanos), passaram por uma transição drástica para nichos diurnos. Esta mudança foi acompanhada por uma especialização visual única dentre os mamíferos: a evolução de uma fóvea retiniana (área central da retina dos *haplorrhini* com extrema densidade de cones) para alta acuidade visual e, em muitas linhagens, a visão tricromática, que é útil, por exemplo, na detecção de frutos maduros ou folhas jovens, permitindo uma alimentação mais nutritiva (Ross & Wall, 2000; Kirk, 2004; Isbell, 2009). Nos *platyrrhini*, grupo ao qual pertence o *Callithrix jacchus*, a visão de cores apresenta um polimorfismo ligado ao cromossomo X (exceto no gênero *Alouatta*), resultando em fêmeas heterozigóticas tricromatas, fêmeas homozigóticas dicromatas e machos dicromatas, uma variação que gera questionamentos sobre as pressões seletivas durante a colonização do neotrópico que levaram a esse dimorfismo sexual (Jacobs, 2008).

A existência de um sistema visual tão complexo e energeticamente custoso, especialmente nos primatas antropoides, levanta discussões sobre quais pressões ecológicas específicas teriam sido fortes o suficiente para direcionar essa trajetória evolutiva. A alta especialização neuroanatômica observada nestes animais não é apenas um subproduto aleatório, mas sim uma resposta a desafios de sobrevivência críticos enfrentados ao longo de sua história evolutiva.

1.1.2. Hipóteses evolutivas do sistema visual de primatas

Diversas hipóteses foram desenvolvidas para tentar explicar qual seria a pressão evolutiva responsável pela alta especialização do sistema visual dos primatas e suas outras adaptações, baseadas principalmente na dieta e no substrato que esses animais viviam (Isbell, 2009). A primeira hipótese, desenvolvida por Smith & Jones no início do século XX e depois revisada por Le Gros Clark, propunha que os membros

primitivos da ordem dos primatas eram animais arborícolas e que esse estilo de vida no topo das árvores seria responsável pelo grande desenvolvimento visual dos primatas. A necessidade de se movimentar sem cair na copa das árvores teria selecionado características favoráveis a esse estilo de vida, como um grau aumentado de convergência orbital, permitindo uma maior capacidade de julgar a distância entre galhos, e a capacidade de coordenar o movimento das mãos e dos olhos, garantindo a manobrabilidade desses indivíduos (Elliot Smith, 1912; Jones, 1916; Le Gros Clark, 1959).

Em 1972, Cartmill refutou essa hipótese ao observar que outros mamíferos com estilo de vida arborícola possuem órbitas oculares mais laterais e que mamíferos terrestres também podem apresentar olhos frontais. Devido a isso, ele propôs a hipótese da predação visual, na qual a principal pressão evolutiva para as adaptações dos primatas teria sido a dieta insetívora deles. A necessidade de perseguir e capturar insetos em galhos de árvores teria levado ao aumento da convergência orbital, característica que Cartmill acreditava ser exclusiva de predadores visuais. Ele argumenta que a dieta original dos primatas seria insetívora devido a muitos dos pequenos mamíferos atuais, assim como a maioria dos *strepsirrhini*, o grupo mais basal dos primatas, serem insetívoros (Cartmill, 1972, 1974). Contudo, existem vários predadores que possuem órbitas mais laterais em seus crânios, o que fez com que Cartmill atualizasse sua hipótese em 1992 para a hipótese da predação visual noturna, explicando que os antepassados dos primatas teriam hábitos noturnos, e que predadores noturnos possuem órbitas mais convergentes que indivíduos diurnos do mesmo clado (Cartmill, 1992).

Porém, Sussman percebeu que os pequenos primatas se alimentavam muito mais, proporcionalmente, de material vegetal, do que de insetos. Também apontou que os *strepsirrhini* noturnos dependiam mais de seus sentidos de audição e de olfato para localizar insetos do que da visão. Além disso, ele observou que os morcegos frugívoros do Velho Mundo possuem os sistemas visuais mais parecidos com os dos primatas dentre os mamíferos. Ele sugere, então, que os primeiros primatas teriam sido onívoros, se alimentando primariamente de frutas e outras partes de plantas, e que teriam um estilo de vida arborícola, no qual um sistema visual mais desenvolvido teria ajudado esses animais a serem mais bem sucedidos em adquirir alimento e se locomover pelo ambiente (Sussman, 1991).

Robin Crompton também foi contra a hipótese da predação visual, argumentando que a convergência orbital não seria essencial para percepção de profundidade para capturar insetos, que outras dicas ambientais como sombra e perspectiva são suficientes para o animal conseguir perceber profundidade (Crompton, 1995). Então, Lynne Isbell publicou em 2006 sua teoria de detecção de serpentes, onde ela agrupou diversas evidências que estabeleceriam a predação/competição com serpentes como a principal pressão evolutiva para o desenvolvimento do sistema visual de primatas.

Em sua teoria, Isbell (2006) sugere, por meio de diversos dados paleontológicos e moleculares, que a predação por serpentes foi um fator seletivo para o aprimoramento dos sistemas visuais de detecção e identificação rápida em mamíferos. Este efeito teria sido especialmente influente entre primatas, gerando uma expansão de estruturas neurais corticais e subcorticais, além de maior binocularidade, aumento de acuidade visual e tricromacia. A teoria de detecção de serpentes sofreu muitas críticas desde sua primeira concepção, porém estudos subsequentes têm gerado muitas evidências que corroboram suas hipóteses (Kawai, 2019).

Uma das principais predições desta teoria seria que quanto mais longo o período histórico de coexistência entre serpentes e determinado grupo de primatas, maior seria a complexidade do sistema visual desses indivíduos. No histórico filogenético, os primatas do Velho Mundo (África e Ásia) (Figura 1) mantiveram “contato” ininterrupto com serpentes peçonhentas e, devido a isso, apresentam sistemas visuais com alta complexidade e conservado entre as espécies (Sumner & Mollon., 2000, Nei *et al.*, 1997; Jacobs, 2008, Isbell, 2006; 2009). Os *strepsirrhini* se separaram do *crown group* dos primatas em torno de 60 milhões de anos atrás (Horvath *et al.*, 2008), se estabelecendo em Madagascar, onde não existem serpentes peçonhentas (Glaw & Vences, 1994). Estes primatas possuem o sistema visual menos desenvolvido quando comparado com os antropóides, dependendo mais de seus sistemas auditivos e olfativos (Isbell, 2009).

Os primatas do Novo Mundo (América do Sul e Central), que junto dos primatas do Velho Mundo formam o grupo dos antropóides, por sua vez, chegaram ao continente americano a aproximadamente 35 milhões de anos (Schrager, 2007), ao passo que as serpentes peçonhentas chegaram por volta de 3 a 10 milhões de anos atrás (Zamudio & Greene, 1997, Greene, 1997). Esse hiato na convivência com as

serpentes teria, portanto, gerado uma grande variedade nas adaptações dos sistemas visuais dos primatas do Novo Mundo, devido a perda dessa pressão seletiva (Sumner & Mollon, 2000, Isbell, 2006; 2009).

Neste sentido, outra das hipóteses centrais da teoria de Isbell é a de que os

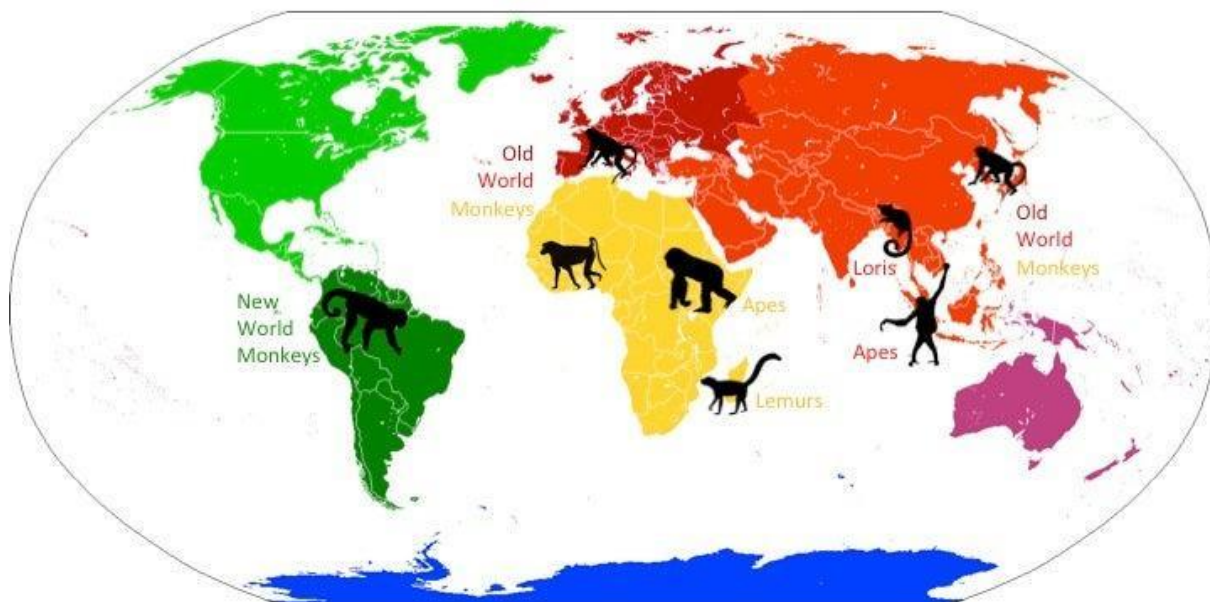


Figura 1: Distribuição global de primatas. Fonte: Arizona State University.

platyrrhini (Primatas do Novo Mundo) teriam uma maior variação em seus sistemas em relação aos catarinos (Primatas do Velho Mundo) (Isbell, 2006; 2009). Isso por ser observado, por exemplo, com a visão de cores. Catarinos tipicamente exibem tricromacia, devido a possuírem dois ou mais genes de fotopigmento no cromossomo X, além de um gene autossômico, ao passo que *platyrrhini* demonstram um polimorfismo na sua visão de cores, pois possuem apenas um gene de fotopigmento no cromossomo X, o que gera várias formas de dicromacia e, em fêmeas heterozigóticas, formas variadas de tricromacia (Jacobs, 1996; Hunt, 1998). Os *Alouatta* são o único gênero dos primatas do Novo Mundo que possuem tricromacia como a norma dentre seus indivíduos (Jacobs, 1996; Araújo, 2008).

Além disso, a complexidade de algumas estruturas do sistema visual dos *platyrrhini*, como as camadas superficiais do núcleo geniculado lateral, são menos complexas e mais variáveis quando comparadas com a de *catarrhini* (Kaas & Huerta, 1988). Marcações de citocromo oxidase (CO), enzima relacionada ao metabolismo energético das células, revelam diferenças de atividade cerebral entre os dois grupos

de antropoides (Wong-Riley, 1994). Nesse procedimento histológico manchas mais escuras indicam maior atividade neural devido a atividade excitatória do neurotransmissor glutamato nas sinapses daqueles neurônios (Allman & Zucker, 1990; Nie & Wong-Riley, 1995; 1996). Na área cortical visual 1 (V1) dos primatas, e em mamíferos com olhos direcionados para frente, é possível observar *blobs* escuros de alta atividade energética, porém apenas primatas possuem estrias escuras de CO na área cortical visual 2 (V2) (Livingstone & Hubel, 1982; Lachica *et al.*, 1993; Preuss & Kaas, 1996; Preuss, 2007).

Existem diferenças de marcação de CO, também, dentre os primatas. Os *catarrhini* possuem marcações homogêneas dentre suas espécies, enquanto as espécies de *platyrrhini* apresentam uma grande variação no padrão de atividade no V1 e no V2 quando comparadas entre si e com os primatas do Velho Mundo (Isbell, 2009). Por exemplo, colunas de dominância ocular são homogêneas e facilmente observadas no V1 de *catarrhini*, com os *blobs* sendo consistentes em relação às colunas de dominância (Florence & Kaas, 1992). Em *platyrrhini* um gênero possui *blobs* parecidos com os de *catarrhini*, os *Cebus*, ao passo que os *Saimiri* possuem *blobs* espalhados sem relação com a localização das colunas (Hess & Edwards, 1987; Horton & Hocking, 1996). A intensidade e a largura das estrias de CO no V2 também variam entre as espécies de *platyrrhini* (Wong-Riley, 1994). Os *Callithrix* possuem linhas mais claras de mesma grossura, enquanto os *Saimiri* e os *Aotus* possuem alternância entre linhas grossas e finas, com coloração constante (Tootell *et al.*, 1983; Kaas & Huerta, 1988; Krubitzer & Kaas, 1990).

1.2. Sistema Visual dos primatas

1.2.1. Visão Geral

O sistema visual de todos os vertebrados têm seu início na retina, onde os circuitos de neurônios ganglionares realizam o processamento inicial de informações visuais fundamentais, tais como luminância, contraste local, frequência temporal e espacial, movimento e direção (Baden *et al.*, 2016; Seabrook *et al.*, 2017). Anatomicamente, a retina apresenta uma organização laminar clássica, composta por três camadas nucleares (externa, interna e de células ganglionares) intercaladas por

duas camadas plexiformes (interna e externa), onde ocorrem as conexões sinápticas (Dowling, 2012).

Em primatas, os neurônios ganglionares dividem-se em três classes principais, fundamentais para a segregação de vias paralelas: os neurônios *midget* (Parvocelulares - P), os neurônios *parasols* (Magnocelulares - M) e os neurônios koniocelulares (K) (Baden *et al.*, 2016).

Os neurônios *midget* concentram-se principalmente no centro da visão (na fóvea) e se projetam para as camadas parvocelulares do Núcleo Geniculado Lateral (NGL), compreendendo aproximadamente 80% da população total de neurônios retiniais projetados para esta estrutura. Na fóvea, estes neurônios estabelecem uma conexão exclusiva, recebendo *input* de células bipolares que, por sua vez, recebem *inputs* de apenas um cone, criando uma “via privada” de transmissão entre o cone e o neurônio P. Devido ao seu campo receptivo pequeno, resposta do tipo tônica (sustentada) e sua alta densidade, são responsáveis pela alta acuidade visual e também atuam na detecção de oponência cromática vermelho-verde (cones L e M). Apresentam, porém, baixa sensibilidade ao contraste de luminância (Kaplan, 2003; Preuss, 2007).

Os neurônios *parasols* são maiores que os *midget* e se projetam para as duas camadas magnocelulares ventrais do NGL, que constituem cerca de 10% das projeções retiniais-geniculares. Caracterizam-se por receber *inputs* de múltiplas células bipolares difusas, integrando sinais de diversos cones, o que resulta em campos receptivos maiores e ausência de oponência cromática espectral (são acromáticos). Estes neurônios exibem respostas fásicas (transientes) e possuem alto ganho de contraste, atuando nas detecções de movimentos e de estímulos de baixa luminância (Kaplan, 2003; Preuss, 2007).

As células K formam um grupo heterogêneo de neurônios ganglionares que se projetam para as camadas intercaladas (koniocelulares) do NGL e representam os 10% restantes das células projetadas da retina. Eles possuem grandes campos receptivos, recebendo *inputs* de várias células bipolares diferentes, a depender do tipo de célula K. Possuem funções variadas, com parte desta população (as células bistratificadas *Blue-ON*) carregando sinais exclusivos dos cones S (azul), estabelecendo a via de oponência azul-amarelo. Ao contrário das vias P e M, os

neurônios que saem das camadas intercaladas projetam-se diretamente para as regiões ricas em citocromo oxidase (*blobs*) nas camadas 2 e 3 do córtex visual primário (V1) (Kaplan, 2003; Preuss, 2007).

A partir da retina, o sistema visual se divide em duas vias principais (Figura 2): a via retinogeniculada, que passa pelo NGL em direção ao córtex visual primário (V1), e a via retinotectal, que projeta para o Colículo Superior (CS) e, subsequentemente, para o Pulvinar (estas estruturas são também chamadas em não primatas de, respectivamente, *tectum óptico* e núcleo posterior talâmico) (Kaas & Huerta, 1988; Henry & Vidyasagar, 1991). Embora todos os vertebrados possuam essa arquitetura básica, a proporção de fibras varia drasticamente (Knudsen, 2020). Em anfíbios, répteis e pássaros a via retinotectal é o principal circuito de processamento visual, com a maioria dos axônios dos neurônios ganglionares se direcionando por ela. Em mamíferos não primatas a via retinogeniculada se torna mais proeminente, aumentando a proporção de aferências, porém ainda sendo menos desenvolvida que a retinotectal (Knudsen, 2020).

Em primatas, a via retinogeniculada tornou-se a via dominante, com o NGL dos *haplorrhini* recebendo cerca de 90% das fibras do nervo óptico, o que reflete a especialização deste grupo para uma visão foveal de alta resolução e para o processamento detalhado de informações visuais, com reconhecimento detalhado de objetos, outros indivíduos ou ameaças, por exemplo (Perry & Cowey, 1984; Preuss, 2007; Knudsen, 2020). No entanto, as estruturas subcorticais da via retinotectal, apesar de receberem proporcionalmente menos projeções diretas da retina comparadas a roedores, também passaram por uma expansão volumétrica e funcional significativa na evolução dos primatas (Barton, 2000; Isbell, 2009).

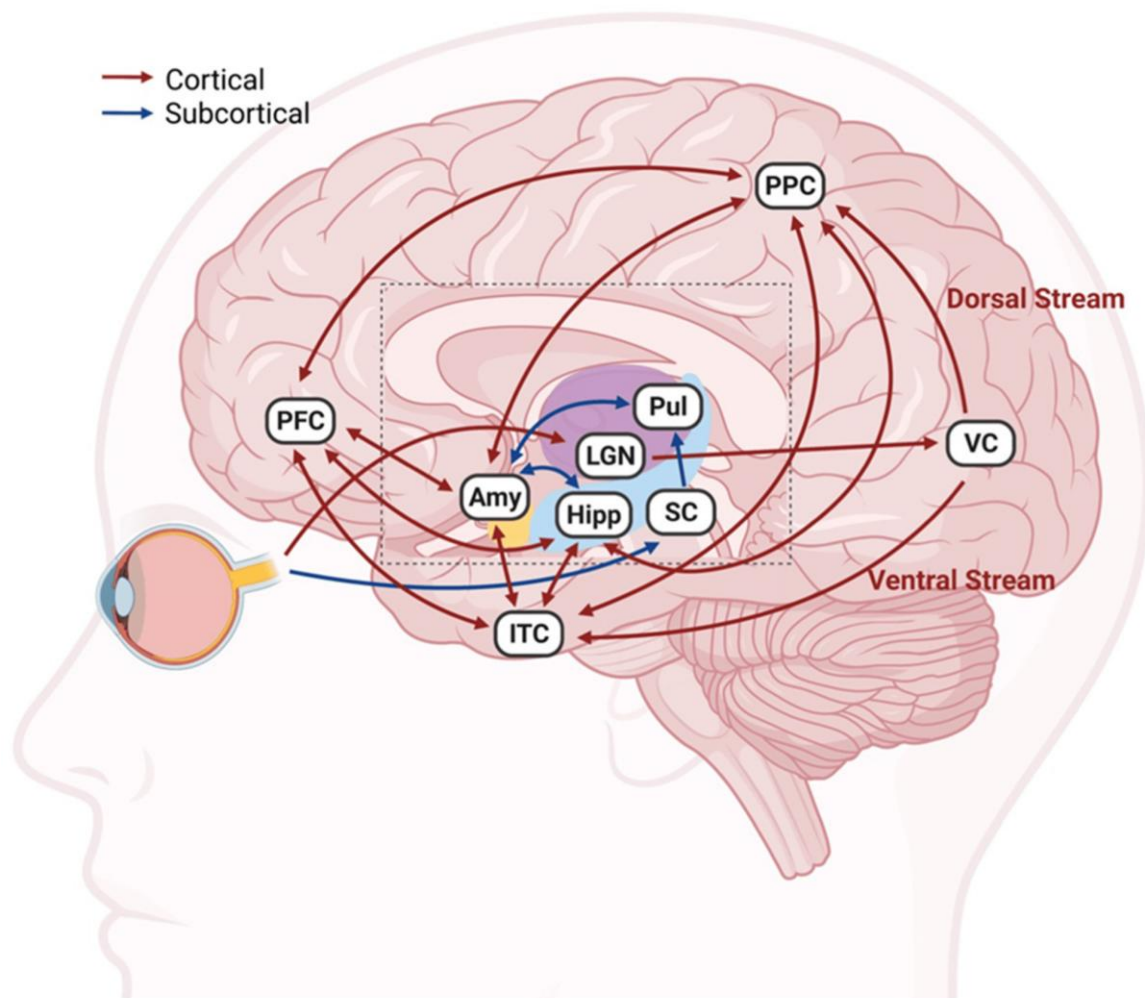


Figura 2: Diagrama esquemático das duas principais vias neurais do sistema visual em primatas: a via retinogênica (Em vermelho) e a via retinotectal (Em azul). Fonte: Yu, 2021.

1.2.2. Via retinogênica

O núcleo geniculado lateral é um núcleo talâmico essencial para o processamento visual. Historicamente considerado apenas um repetidor de sinais, pesquisas subsequentes sugerem uma função mais complexa do NGL, incluindo a modulação atencional e facilitação ou supressão binocular via modulação de ganho monocular (Covington *et al.*, 2023).

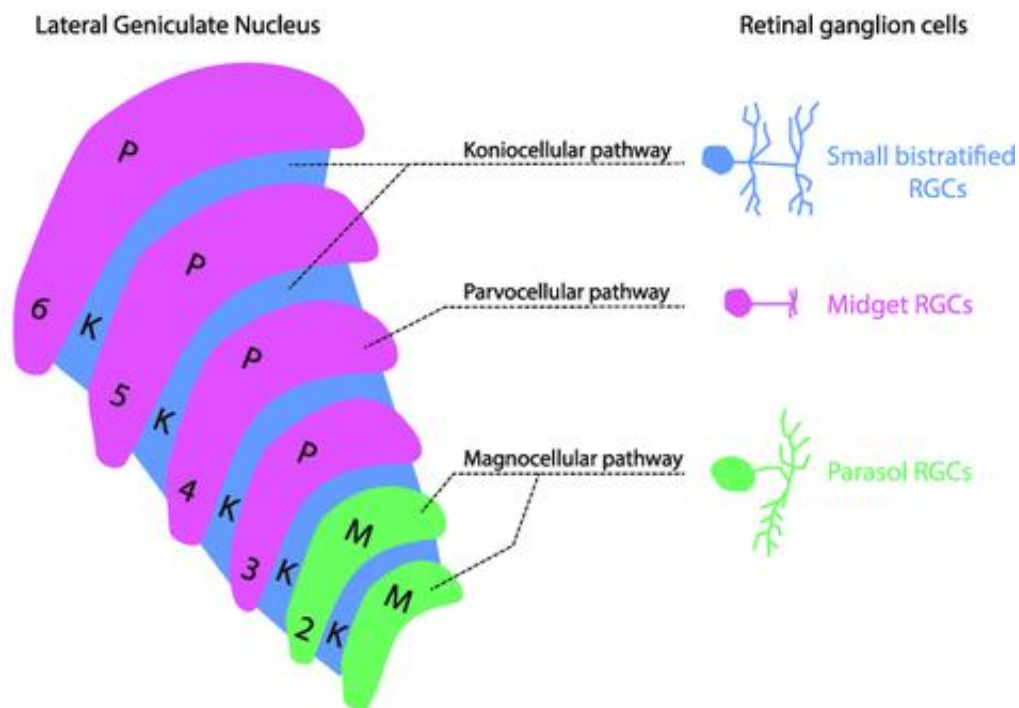


Figura 3: Estrutura laminada do núcleo geniculado lateral do tálamo, com as células que compõem cada camada. Fonte: Adamék et al., 2022.

Nos primatas, ele recebe a maior parte dos axônios da retina, com as células P e M organizadas em seis camadas (4 P e 2 M) intercaladas por células K (Figura 3) (Adamék et al., 2022).

O NGL vai enviar seus axônios principalmente para o córtex visual V1, onde ocorrerá o processamento de estímulos visuais simples, como orientação, cor e movimento (Isbell, 2006). Do córtex V1 a informação visual vai se dividir em duas correntes de informação, a dorsal, responsável por processar o “onde” e “como” do estímulo, e a ventral, responsável por processar o “o que” é o estímulo (Goodale & Milner, 1992). A via retinogeniculada é também chamada de via canônica ou via cortical do processamento visual.

1.2.3. Via retinotectal

O Colículo Superior (CS) é uma estrutura mesencefálica laminada, filogeneticamente conservada, chamado de *tectum óptico* em vertebrados não-

mamíferos. Em mamíferos, o CS atua como um centro fundamental de integração sensorio-motora e orientação da atenção (May, 2006; Isa et al., 2021). O padrão anatômico do CS é bem parecido entre todos os mamíferos já estudados, sendo composto por sete ou oito camadas alternadas de corpos celulares e fibras mielinizadas (Basso & May, 2017; Liu, 2022). Fisiologicamente, no entanto, essas camadas são agrupadas em duas divisões funcionais principais: as camadas superficiais, que são visuais, e as camadas profundas, que são multimodais e motoras (May, 2006; Isa et al., 2021; Veale & Takahashi, 2024).

As camadas superficiais compreendem o *stratum zonale* (SZ), o *stratum griseum superficiale* (SGS) e o *stratum opticum* (SO). O SGS contém a maioria dos *inputs* sensoriais da retina e dos córtices estriado e extra-estriado, incluindo especificamente as áreas visuais V1, V2, V3, V4 e V5 (Henry & Vidyasagar, 1991; Liu, 2022), porém o SO também recebe aferências dessas regiões em menor quantidades (Cerkevich *et al.*, 2014; Veale & Takahashi, 2024). Enquanto em roedores o CS é proporcionalmente o principal alvo das projeções retiniais, recebendo cerca de 70-90% das aferências da retina, em primatas houve uma redução significativa em favor do NGL, com os primatas antropóides e do Novo Mundo recebendo apenas cerca de 10% dessas projeções (Perry & Cowey, 1984; Veale & Takahashi, 2024). Essas aferências são principalmente de células retiniais ganglionares *parasols* e *koniocelulares* (tipo M e K), formando um mapa retinotópico de resposta visual (Hafed & Chen, 2016). Ainda não se sabe exatamente a função dessas diferentes vias no comportamento visual, apenas as células M foram relacionadas a alta seletividade de neurônios do CS para detecção de movimento (Basso & May, 2017; Santana *et al.*, 2023). Quanto às suas projeções de saída, os neurônios das camadas superficiais projetam-se principalmente para o pulvinar e para o NGL (Veale & Takahashi, 2024).

As camadas profundas agrupam o *stratum griseum intermedium* (SGI), *stratum album intermedium* (SAI), *stratum griseum profundum* (SGP) e *stratum album profundum* (SAP). Estas camadas recebem poucas aferências retiniais diretas, porém recebem *inputs* da maioria das regiões do cérebro. Elas integram informações auditivas, somatossensoriais, do cerebelo e do gânglio basal (Fries, 1984; Lynch *et al.*, 1985; Borra et al., 2014; Distler & Hoffman, 2015; Lee, et al.; 2020), além de sinais *top-down* de áreas corticais, como da *substantia nigra pars reticulata* (SNr), do *frontal*

eye field (FEF) e do córtex parietal posterior (Basso & May, 2017; Veale & Takahashi, 2024). Adicionalmente, as camadas profundas recebem axônios excitatórios das camadas superficiais do próprio CS (Doubell *et al.*, 2003; Ghitani *et al.*, 2014).

O colículo superior é sensível a luz, a movimentos, está relacionado à geração dos movimentos sacádicos dos olhos (Wurtz & Goldberg, 1989; Snyder *et al.*, 2002) e também é responsável por enviar comandos de movimentos da cabeça, do pescoço e dos olhos (Isa, 2002; Sooksawate *et al.*, 2011; Veale & Takahashi, 2024), em especial para direcionar a atenção a objetos novos no campo visual (Krauzlis *et al.*, 2013; Basso *et al.*, 2021).

1.2.4. Via colículo-pulvinar

O pulvinar, chamado de núcleo lateral posterior (LP) nos demais mamíferos, é uma estrutura dorsal do tálamo, sendo relativamente pequeno em todos os mamíferos, exceto nos primatas, ordem na qual ele é o maior núcleo talâmico (Preuss, 2007; Benarroch, 2015). Sua grande expansão em primatas acompanhou o crescimento do neocórtex nesses animais (Chalfin *et al.*, 2007; Isbell, 2006). Ele pode ser dividido em quatro subdivisões: a inferior, a lateral (que pode ser dividida em dorsal e ventral), a medial e a anterior (ou oral) (Olszewski, 1952; Stepniewska & Kaas, 1997; Gutierrez *et al.*, 1995; Kwan *et al.*, 2019). O pulvinar inferior (PI) apresenta uma organização anatômica especialmente complexa, sendo subdividido em núcleo posterior (PIp), medial (PIm), centromedial (PIcm) e centrolateral (PIcl) com base na arquitetura e conexões (Stepniewska & Kaas, 1997).

O pulvinar é um núcleo de associação multissensorial, as regiões inferior e a lateral são áreas visuais, a região medial é multissensorial e a região anterior é somatossensorial (Isbell, 2009). As áreas inferior e lateral ventral são o principal alvo das aferências da retina, do V1 e das camadas superficiais do CS (Stepniewska, 2004; Preuss, 2007), e elas enviam seus neurônios para diversas áreas corticais, como V1 e V2. As áreas alvo em V2 irão aparecer mais escuras em testes de CO, demonstrando o alto fluxo de informação transmitido pelo pulvinar (Wong-Riley, 1994; Stepniewska, 2004). É importante notar que o PIp e o PIcm recebem as projeções

mais fortes do CS, formando a via colículo-pulvinar clássica (Stepniewska *et al.*, 2000; Berman & Wurtz, 2010).

De importância visual também são as áreas medial e lateral dorsal, que estão envolvidas em várias funções do CS, como controle de movimentos sacádicos e direcionamento da atenção a estímulos visuais salientes (Robinson & Petersen, 1992; Preuss, 2007). A área medial é a única região do pulvinar que recebe aferências das camadas profundas do CS (Stepniewska, 2004), além de ser altamente conectada com várias áreas corticais (Preuss, 2007), incluindo conexões recíprocas com o córtex pré-frontal, giro do cíngulo e córtex parietal posterior (Romanski *et al.*, 1997; Benevento & Standage, 1983).

Essa região também envia muitas conexões para a amígdala, estrutura muito importante em reações emocionais a ameaças e a comportamentos de defesa (Aggleton & Saunders, 2000; Benarroch, 2015). Elorette e colegas (2018) recentemente demonstraram por meio de técnicas de rastreamento neural que projeções do CS para o pulvinar se encontram com neurônios pulvinares que projetam para a amígdala, especialmente nas porções mediais do pulvinar (PM) e pulvinar oral (PO), fornecendo a base anatômica para uma via subcortical rápida de processamento emocional (Elorette *et al.*, 2018). Além disso, a integridade da conectividade estrutural nesta via (pulvinar-amígdala) está correlacionada com a capacidade de reconhecimento de expressões faciais de medo em humanos, sugerindo um atalho funcional que ignora o córtex visual (McFadyen, 2019).

Então, é possível perceber que a via CS-Pulv é responsável por guiar a atenção visual para estímulos novos e salientes no campo visual (Strenger, 1978; Kaas & Huerta, 1988; Robinson & Petersen, 1992; Isbell, 2006; 2009). Na natureza, esses estímulos muitas vezes são ameaças, como predadores, demonstrado por Maior *et al.*, que comparou primatas sadios com primatas com lesões no CS em um teste com comida e uma cobra de borracha. Os animais com danos no CS não hesitaram em pegar a banana que estava embaixo do modelo de cobra, enquanto os animais sadios não tentaram alcançar a comida em nenhum momento ao longo do teste (Maior *et al.*, 2011).

1.2.5. Via baixa de processamento de estímulos emocionais

A amígdala é uma estrutura localizada no lobo temporal composta por aproximadamente 13 núcleos diferentes, que realiza conexões com diversas áreas corticais e subcorticais (Amaral et al., 1992; AbuHasan et al., 2023). Esses núcleos podem ser divididos em cinco grandes grupos: os núcleos basolateral, os núcleos centrais, os núcleos *cortical-like*, outros núcleos amigdalóides e a amígdala estendida (Rajmohan & Mohandas, 2007). O núcleo basolateral é a região que recebe a maior parte dos *inputs* corticais e subcorticais da amígdala, incluindo do pulvinar (Amaral et al., 1992; Wei et al., 2015). Em primatas, especificamente o Núcleo Lateral (LA) atua como a principal porta de entrada sensorial, integrando *inputs* visuais altamente processados provenientes do córtex temporal inferior através das vias ventrais (Amaral et al., 1992; LeDoux, 2000). A amígdala é uma estrutura muito importante para o processamento emocional, sendo relacionada à expressão de comportamentos defensivos, à detecção de ameaças, ao reconhecimento de expressões faciais de medo e raiva, à memória espacial e à modulação do armazenamento de memórias, especialmente as emocionalmente salientes (Amaral et al., 1992; Sah, 2003; LeDoux, 2000; Kalin et al., 2004).

Indivíduos com danos no córtex visual, mas cuja circuitaria retinal e subcortical continua funcional, podem desenvolver um quadro clínico de cegueira cortical, o *blindsight* (Celeghein, 2015). Esses pacientes são cegos, porém possuem a capacidade não-consciente de responder a estímulos visuais emocionalmente salientes em seus campos de visão, como, por exemplo, discriminar entre expressões faciais (de Gelder et al., 1999; Celeghein, 2015). Fenômenos como este, onde pacientes com lesões em V1 ainda exibem respostas fisiológicas e ativação da amígdala diante de faces de medo apesar de negarem ver o estímulo, reforçam a hipótese de rotas alternativas (Weiskrantz, 1996; Morris et al., 1999; Tamietto et al., 2012). Também já foi observada, através de ressonância magnética funcional, atividade neural na amígdala em pacientes de *blindsight* durante experimentos de discriminação de expressões faciais (Vuilleumier et al., 2002). Muitos estudos discutiam, então, a existência de uma via alternativa de processamento emocional de informação visual independente da via cortical, para explicar as reações a estímulos visuais e a ativação da amígdala que acontecem no *blindsight* (McFadyen et al., 2019).

O módulo do medo é um conjunto de estruturas neurais que, segundo LeDoux (1996), estariam envolvidas na geração desse sentimento. A amígdala seria uma estrutura neural essencial para a detecção de saliência emocional e para a aquisição de memórias de medo. Para explicar a rapidez com que respostas de defesa são iniciadas, LeDoux (1996; 2000) propôs a existência de duas rotas paralelas de processamento do medo: a "Via Alta" e a "Via Baixa", com relação especialmente aos sentidos de visão e de audição. Essas "vias baixas" fariam, então, a informação emocional saliente chegar de maneira mais rápida na amígdala através de um relay talâmico. A "via alta" seria cortical, mais lenta e detalhada, com a do sistema visual sendo a projeção da retina para o NGL do tálamo, seguindo para o córtex visual primário (V1) e áreas de associação antes de alcançar a amígdala. Esta rota permite o processamento consciente e refinado do estímulo, essencial para a identificação precisa do objeto.

Em contraste, a "via baixa" (ou via subcortical) seria uma rota rápida, grosseira e suja, que transmite informações visuais diretamente ao complexo amigdalóide sem passar pelo córtex visual primário. Esta via putativa conecta a retina ao CS, que por sua vez projeta para o pulvinar e, finalmente, para a amígdala. Ela atua como um sistema de "primeiro alerta", permitindo que o organismo inicie respostas defensivas automáticas antes mesmo que a ameaça seja conscientemente percebida (Ledoux 1996; 2000; 2003).

Ele propôs que a via CS-Pulv (que ele denominou de "Via baixa de processamento de estímulos visuais") teria a função de enviar sinais de ameaças para a amígdala, evitando o processamento cortical e, assim, diminuindo a latência de resposta (LeDoux, 1996). Essa rota subcortical rápida (Retina -> Colículo Superior -> Pulvinar -> Amígdala) permitiria o processamento grosseiro e inconsciente de ameaças antes que a "Via Alta" cortical completasse sua análise detalhada. Öhman e Mineka, em 2003, propuseram uma origem evolutiva para esse módulo do medo nos mamíferos, especialmente nos primatas, observando que serpentes são um estímulo fortemente associado com o sentimento de medo e com comportamentos defensivos nesses animais (Öhman & Mineka, 2003).

Baseado nisso, Isbell (2006) propôs na "Teoria da Detecção de Serpentes" (*Snake Detection Theory*) que o módulo do medo se modificou e expandiu nos

mamíferos do Cretáceo para o Paleoceno, devido à pressão predatória exercida inicialmente por serpentes constritoras e, posteriormente, por serpentes venenosas (Isbell, 2006; 2009). Estudos eletrofisiológicos em macacos (*Macaca fuscata*) fornecem suporte a essa teoria, demonstrando que neurônios no pulvinar medial respondem mais rápida e vigorosamente a imagens de serpentes do que a faces de macacos ou formas geométricas (Le et al., 2013; Almeida et al., 2015).

Apesar de tais evidências, a existência funcional de uma "Via Baixa" exclusiva em primatas tem sido debatida. Pessoa e Adolphs (2010) propuseram o modelo dos "Muitos Caminhos" (*Many Roads*), argumentando que o processamento cortical visual em primatas é suficientemente rápido (latências < 100ms) para gerar respostas de medo sem a necessidade obrigatória de um atalho subcortical, e que a conexão interna entre o pulvinar inferior (visual) e o medial (conectado à amígdala) poderia não ser robusta o suficiente. Entretanto, evidências anatômicas recentes desafiam essa crítica. Elorette e colegas (2018) demonstraram, por meio de técnicas de rastreamento neural em primatas, que projeções do Colículo Superior se encontram com neurônios pulvinares que projetam diretamente para a amígdala, especialmente nas porções mediais (PM) e orais (PO) do pulvinar, fornecendo a base anatômica para essa via rápida (Elorette et al., 2018). Além disso, a integridade estrutural desta via (pulvinar-amígdala) correlaciona-se com a capacidade de reconhecimento de medo em humanos, sugerindo um atalho funcional relevante (McFadyen et al., 2019).

Dessa forma, é possível perceber que a via CS-Pulv atua como um sistema de "Detector Rápido/Primeiro Respondente" (*Fast Detector/First Responder*), essencial para guiar a atenção visual para estímulos novos e salientes, como ameaças, quando a sobrevivência exige ação imediata (Strengé, 1978; Robinson & Petersen, 1992; Isbell, 2009; Soares et al., 2017). A relevância funcional deste circuito é confirmada no fenômeno de *blindsight*, onde a inativação seletiva da via CS-Pulvinar prejudica movimentos guiados visualmente na ausência de V1, ratificando seu papel crítico na visão residual e no processamento emocional inconsciente (Kinoshita et al., 2019).

1.3. Calitriquídeos

O gênero *Callithrix* pertence à família Callitrichidae, compreendendo um grupo de primatas do Novo Mundo. Dentre as espécies deste gênero, o *Callithrix jacchus*, popularmente conhecido como sagui-do-tufo-branco, é um modelo animal de primata não humano de crescente uso e relevância em pesquisas científicas (Mitchell & Leopold, 2015; Inoue *et al.*, 2024). Originalmente endêmico da região nordeste do Brasil, o *C. jacchus* é encontrado na natureza principalmente em dois biomas contrastantes, as florestas secas da Caatinga, caracterizada por um ambiente semiárido e vegetação xerófila, e a Mata Atlântica, uma floresta tropical úmida (Schiel & Souto, 2017; Benavides *et al.*, 2022). Historicamente, o comércio ilegal e o uso dessas espécies como animais de estimação resultaram na introdução de populações de *Callithrix* em regiões não nativas do Sudeste, como São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Schiel & Souto, 2017; Leal do Amaral *et al.*, 2023; Bergqvist, 2024). O estabelecimento dessas populações invasoras nessas áreas foi facilitado por sua grande plasticidade ecológica, que lhes permite adaptar-se a dietas variadas em ambientes altamente antropizados ou fragmentados (Schiel & Souto, 2017).

Estes animais são onívoros, mas ocupam um nicho ecológico especializado como exsudatívoros e insetívoros. A resina de árvores (exsudatos) constitui um recurso alimentar muito importante, especialmente durante períodos de escassez de frutas, permitindo a sobrevivência em áreas onde recursos sazonais são limitados (Schiel & Souto, 2017). Ao longo de sua história evolutiva o gênero passou por um processo de nanismo filético, resultando em um pequeno porte que facilita a ocupação de nichos arbóreos em terminais de galhos finos, inacessíveis a primatas maiores. Adaptações morfológicas específicas acompanharam essa evolução, destacando-se a presença de estruturas similares a garras, chamadas de tégulas, em todos os dedos, exceto no hálux, em substituição às unhas planas típicas da ordem. Essas garras permitem a fixação vertical em troncos de árvores para a extração de exsudatos. Adicionalmente, possuem incisivos inferiores alongados que atuam como ferramentas para perfurar a casca das árvores e permitir acesso a resina (Solomon & Rosa, 2014; Schiel & Souto, 2017).

No âmbito da neuroanatomia, uma das características mais significativas do cérebro de *Callithrix* para a neurociência quando comparado com o do modelo primata mais comum, os animais do gênero *Macaca*, é o alto grau de lissencefalia (Mitchell & Leopold, 2015). Diferentemente dos macacos do Velho Mundo e humanos, o córtex cerebral do sagui é quase desprovido de sulcos e giros, apresentando uma superfície lisa, com exceção do sulco lateral e do sulco calcarino (Sawada et al., 2014). Essa característica, contudo, não significa uma simplicidade funcional, o cérebro do sagui preserva a organização topográfica e as áreas corticais complexas observadas em primatas girencefálicos (Solomon & Rosa, 2014), mas em um cérebro menor e sem as dificuldades causadas pelo dobramento cortical, o que facilita várias técnicas de eletrofisiologia ou de mapeamento de conexões neurais (Mitchell & Leopold, 2015). O sistema visual destes animais é altamente desenvolvido e compartilha muitas homologias com o sistema visual humano, incluindo a presença de olhos frontais e uma fóvea muito similar ao dos *catarrhini*, o que garante alta acuidade visual (Mitchell & Leopold, 2015).

A arquitetura do sistema visual do sagui apresenta especificidades notáveis nas estruturas subcorticais, particularmente no Colículo Superior (CS) e no pulvinar. O CS desempenha um papel crucial na orientação visual e na detecção de estímulos salientes. Estudos com traçadores neurais demonstram que o CS recebe projeções densas e diretas da retina, terminando principalmente nas camadas superficiais, o que constitui uma via retinotectal robusta para o processamento visual rápido e inconsciente. Esta estrutura integra informações multissensoriais e motoras para guiar movimentos oculares sacádicos antes do processamento cortical detalhado (Santana et al., 2023). O pulvinar, por sua vez, atua como um "hub" regulatório no tálamo. Existe uma forte conexão ascendente do CS para o pulvinar inferior e lateral, formando uma via tecto-pulvinar que contorna o núcleo geniculado lateral. Evidências indicam que esta via amadurece precocemente no desenvolvimento, sugerindo que o pulvinar pode orientar a maturação de áreas corticais visuais, como a área MT (Middle Temporal), essencial para a percepção de movimento (Solomon & Rosa, 2014; Mitchell & Leopold, 2015). Além das vias visuais, a amígdala ocupa uma posição central no processamento emocional e social do *C. jacchus*. Atlas recentes baseados em ressonância magnética e histologia confirmam a conservação estrutural da amígdala no sagui em comparação a outros primatas. Esta estrutura mantém

conexões recíprocas com o polo frontal (área 10) e o córtex orbitofrontal, integrando informações sensoriais visuais com a avaliação de valência emocional, o que é vital para a regulação de comportamentos sociais complexos e respostas a ameaças (Burman et al., 2011; Saleem et al., 2024).

1.4. Traçamento neural

1.4.1. A Importância da Conectividade Anatômica

O cérebro de vertebrados é caracterizado por uma complexidade estrutural extrema, composta por redes neuronais intrincadas que sustentam desde funções fisiológicas básicas até processos cognitivos superiores. A compreensão da função neural é, portanto, indissociável do conhecimento de sua estrutura anatômica. Nos últimos anos, o campo da neurociência tem voltado seus esforços para o desenvolvimento de conectomas, mapa completo das conexões neurais de um organismo, buscando a base física do comportamento e da cognição (Sporns et al., 2005).

Embora o mapeamento completo em nível sináptico tenha sido alcançado em modelos invertebrados com sistemas nervosos mais simples por meio de microscopia eletrônica, como o de *Caenorhabditis elegans* (White et al., 1986), com 302 neurônios, e de *Drosophila melanogaster* (Dorkenwald et al., 2024), com ~140000 neurônios, o cérebro de vertebrados apresenta uma magnitude de complexidade exponencialmente maior, com apenas o córtex de camundongos tendo ~14 milhões, o de rato ~31 milhões e o de humanos ~16 bilhões de neurônios (Herculano-Houzel et al., 2006; 2009), sendo atualmente inviável a utilização das mesmas técnicas de microscopia eletrônica para o mapeamento deles. Métodos utilizando neuroimagem macroscópica, como a Imagem por Ressonância Magnética com Tensor de Difusão (DTI) e a *High Angular Resolution Diffusion Imaging* (HARDI), permitiram um maior insight sobre as conexões do cérebro de humanos e outros primatas (Alexander et al., 2007; Boukadi et al., 2019). Essas técnicas, embora valiosas, carecem de resolução para definir a direção da propagação do sinal ou a identidade sináptica das conexões, além de oferecerem apenas estimativas probabilísticas de grandes tratos de substância branca (Lanciego & Wouterlood, 2011).

Diante dessa limitação, o traçamento de tratos neurais (*tract-tracing*) permanece como o padrão-ouro para a elucidação de circuitos em vertebrados (Thomas et al., 2014). Ao contrário da neuroimagem, técnicas de traçamento invasivas permitem a visualização direta de projeções axonais com resolução celular e sináptica, sendo fundamentais para determinar a arquitetura dos circuitos que permitem, por exemplo, a detecção rápida de ameaças.

1.4.2. História do Traçamento Neural

A história do traçamento neural acompanha a história da neuroanatomia. Inicialmente, o estudo de tratos mielinizados se baseava em lesionar fibras nervosas ou em outros métodos de degeneração (Waller, 1851). Após isso, Santiago Ramón y Cajal, considerado por muitos o fundador da neurociência moderna, criou uma versão melhorada da técnica de impregnação de prata de Golgi (Golgi, 1873) e assim conseguiu fazer as primeiras visualizações de células individuais no cérebro e de suas projeções, criando a Doutrina do Neurônio (Cajal, 1884), o princípio de que o cérebro era composto de várias células individuais e distintas, diferente da crença da época de que o cérebro e os nervos eram uma rede única e contínua (Raviola & Mazzarello, 2011). Novos métodos foram criados, como a técnica de impregnação de prata específica de Nauta (Nauta, 1954), onde lesões eram feitas no tecido e a degeneração axonal subsequente era impregnada com prata. Embora revolucionários para a época, esses métodos eram ainda muito inespecíficos, lesivos as fibras de passagem, não geravam marcações consistentes e só podiam ser realizados em indivíduos post mortem (Lanciego & Wouterlood, 2011).

A grande revolução ocorreu na década de 1970 com a descoberta de que é possível utilizar mecanismos intrínsecos de transporte axonal para movimentar, de maneira retrógrada, moléculas traçadoras ao longo de um neurônio vivo, que marcam o local de infusão, a trajetória e a terminação desses neurônios (Kristensson & Olsson, 1971a). A introdução da enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP) permitiu, pela primeira vez, o traçamento retrógrado de tratos neurais in vivo visualizado por reações histoquímicas (Kristensson & Olsson, 1971; Mesulam, 1982). Nas décadas seguintes, o arsenal expandiu-se para incluir lectinas (como WGA), toxinas bacterianas e dextranos fluorescentes, oferecendo maior sensibilidade e a possibilidade da

combinação desses (Schwab et al., 1978; Trojanowski et al. 1981;1982; Glover et al., 1986). Mais recentemente, a incorporação de ferramentas de virologia molecular gerou ainda mais opções para utilização em experimentos, como o uso do vírus da raiva, permitindo transporte retrógrado e transsináptico, e de vírus adeno-associados (AAVs), que permitem diversas aplicações variadas (Ugolini, 1995; Chamberlin et al., 1998; Lanciego & Wouterlood, 2020).

1.4.3. Características e Estratégias de Visualização de Traçadores

A elucidação dos circuitos neurais através da utilização de moléculas traçadoras (chamados de traçadores convencionais) depende da escolha adequada de compostos que exploram as propriedades fisiológicas do transporte axonal e que se encaixem ao desenho experimental proposto. Estas técnicas podem ser categorizadas pela direção do transporte e pela capacidade de transposição sináptica (Figura 4) (Lanciego & Wouterlood, 2011; Saleeba et al., 2019). Quanto à direção do transporte os traçadores podem ser anterógrados, onde eles são captados pelo soma e pelos dendritos do neurônio e se propagam ao longo do axônio em direção aos terminais sinápticos, ou retrógrados, onde os traçadores entram no neurônio pelos terminais axonais e são transportados no sentido contrário da propagação do potencial de ação, se direcionando ao soma e aos dendritos (Figura 4) (Saleeba et al., 2019). Em relação a capacidade de atravessar sinapses os traçadores podem ser estáticos, onde eles se mantêm apenas no neurônio onde ele inicialmente foi captado, ou transsinápticos, os quais são capazes de transpor a fenda sináptica, podendo esses serem limitados a apenas uma sinapse (monossinápticos) ou a múltiplas sinapses (polissinápticos) (Saleeba et al., 2019).

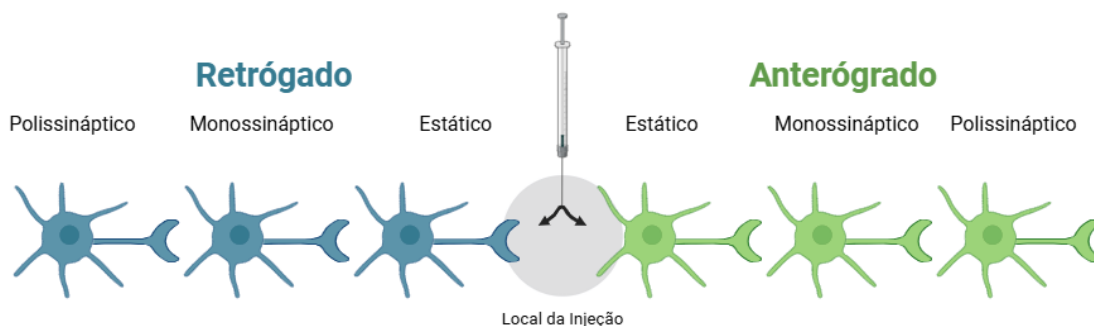


Figura 4: Nomenclatura de traçadores com base em sua direção de movimento e transposição sináptica. Produzido pelo autor no Biorender, adaptado de Saleeba et al. (2019).

A eficácia destas técnicas é dependente do método de detecção, e a depender do objetivo do experimento e da metodologia de traçamento utilizada existem estratégias de visualização diferentes (Köbber et al., 2000). Métodos clássicos utilizam reações enzimáticas (como a reação DAB-peroxidase) para criar precipitados escuros e permanentes, para análise citoarquitetônica em microscopia de luz (Mesulam, 1982). A utilização de traçadores e/ou anticorpos conjugados a fluoróforos revolucionou a área ao permitir a detecção de múltiplos traçadores simultaneamente (multiplexagem), por meio do uso de fluoróforos de espectros de emissão e excitação diferentes (Köbber et al., 2000). O uso de fluorescência permite também a observação dos cortes histológicos usando microscopia confocal, onde é possível realizar *Z-stacks*, o que possibilita a análise ortogonal e a verificação de proximidade física entre terminais axonais marcados por traçadores anterógrados e dendritos marcados por traçadores retrógrados, fornecendo evidências anatômicas robustas de putativos contatos sinápticos (Lanciego & Wouterlood, 2011).

Para superar algumas limitações dos traçadores convencionais e aumentar a reprodutibilidade dos experimentos, a neuroanatomia incorporou ferramentas de virologia molecular em técnicas de traçamento neural. Por exemplo, vírus neurotrópicos, como variantes modificadas do vírus da Raiva (Rabies, ΔG) e do Herpes Simplex (HSV), possuem a capacidade de realizar traçamento transináptico controlado, saltando entre neurônios conectados para mapear circuitos funcionais estendidos. Adicionalmente, vetores como os baseados em AAVs permitem a expressão anterógrada ou retrógrada de proteínas fluorescentes (ex: GFP, mCherry) com especificidade para tipos neuronais específicos (ex: excitatórios ou inibitórios). (Saleeba et al., 2019).

Abaixo, detalham-se dois traçadores convencionais de maior relevância para este estudo.

1.4.3.1. Dextranas

As Aminas Dextranas conjugadas com diferentes fluoróforos foram introduzidas em meados da década de 1980 por Glover et al. (1986) no estudo de ratos como moléculas traçadoras eficientes, inspirando a utilização de outras dextranas de pesos e conjugações variadas, expandindo a gama de aplicação desses

compostos (Nance & Burns, 1990; Schmued et al., 1990; Fritsch & Wilm, 1990; Chang, 1991) O Fluoro-Emerald (FE) é uma dextrana de alto peso molecular (10kDA MW, Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR) conjugada com fluoresceína (FITC). Devido ao seu tamanho e hidrofiliçidade, o FE tende a permanecer retido dentro da membrana neuronal, não difundindo para fora da célula nem atravessando sinapses. Ele é predominantemente utilizado como traçador anterógrado, preenchendo detalhadamente axônios e botões terminais ("marcação tipo Golgi"). Sua visualização pode ser direta por microscopia de fluorescência (comprimento de onda de excitação ~490 nm e emissão ~520 nm) ou através de métodos de visualização utilizando anticorpos anti-FITC.

1.4.3.2. Subunidade B da Toxina da Cólera (CTB)

A Toxina da Cólera (CT) é uma proteína composta por seis subunidades, sendo uma subunidade A com ação enzimática e cinco subunidades B não-tóxicas receptor-ligantes, produzida pela bactéria *Vibrio cholerae* (Safa et al., 2020). A CTB se liga ao gangliosídeo GM1 na membrana celular, sendo internalizada por endocitose e depois transportada retrogradamente até o retículo endoplasmático (Bharati & Ganguly, 2011). O tecido nervoso é rico em gangliosídeos GM1, especialmente nos terminais sinápticos (van Heyningen, 1974), onde a CTB é captada e depois é levada ao soma e aos dendritos. Devido a isso, a subunidade B estabeleceu-se como um traçador retrógrado diferente de traçadores que dependem de difusão passiva, este mecanismo lhe confere uma marcação de alta sensibilidade, uma dispersão mais restrita no local de infusão, marcação estática (não ultrapassa a sinapse) e sem produzir mudanças morfológicas nos neurônios (Trojanowski et al., 1982; Luppi et al., 1990, Conte et al., 2009). A CTB preenche o citoplasma e os dendritos proximais, produzindo uma marcação muito sensível, facilitando a identificação morfológica do neurônio, e é frequentemente utilizada conjugada a fluoróforos para estudos de múltiplas marcações (Conte et al., 2009).

Entretanto, diferentemente do que é a crença convencional, o CTB não é um traçador exclusivamente retrógrado e nem estático. Pode se observar transporte anterógrado (em menor quantidade que o retrógrado) e transporte transsináptico

(especialmente quando há uma lesão nas fibras da área de infusão) (Lai et al., 2015; Saleeba et al., 2019)

1.5. Enquadramento da pergunta experimental

A partir do embasamento apresentado acima, é possível afirmar que não há evidências de uma conexão sináptica direta entre o CS e a amígdala. Há, entretanto, evidências da existência do circuito visual bissináptico CS-Pulv-Amígdala em primatas do Velho Mundo, probabilisticamente demonstrada em um trabalho de neuroimagem (Rafal *et al.*, 2015) e posteriormente confirmada por meio de traçamento neural (Elorette *et al.*, 2018). Essa via também foi demonstrada imunohistoquimicamente em musaranhos (Day-Brown *et al.*, 2010) e em ratos (Linke *et al.*, 1999), e foi descrita em camundongos (Wei *et al.*, 2015). Alguns trabalhos exploraram esse circuito nos primatas do Novo Mundo, como Maior *et al.* (2011), Barros *et al.* (2002), Emile & Barros (2009) e Cagni *et al.* (2011), porém nenhum deles fez uma verificação anatômica dessa via, havendo então uma lacuna de conhecimento se ela está presente em *platyrrhini*.

O presente estudo tem como objetivo principal adaptar e implementar um protocolo de traçamento neural anterógrado e retrógrado, inspirado no de Elorette *et al.* (2018), com o objetivo de investigar a via Colículo Superior -> Pulvinar -> Amígdala em *C. jacchus*. Desta maneira estaremos testando uma das hipóteses centrais de Isbell (2006), a de que os *platyrrhini* possuem maior variedade em seus sistemas visuais quando comparados com os *catarrhini*, de maneira a auxiliar na reconstrução da história evolutiva dos primatas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo do presente projeto é avaliar a existência do circuito neural colículo superior-pulvinar-amígdala em indivíduos da espécie *Callithrix spp.* de primatas do Novo Mundo.

2.2. Objetivos específicos

- Implementar, testar e adaptar o protocolo de colocação de *inputs* tectais e neurônios pulvinares projetados para a amígdala em primatas não humanos no Laboratório de Neurociências, Metabolismo e Comportamento da UnB.
- Analisar os cortes histológicos do cérebro dos saguis tratados;
- Avaliar a trajetória dos traçadores infundidos no cérebro de saguis;
- Comparar os resultados com os adquiridos pelo experimento realizado por Elorette et al. (2018).

3. Materiais e Métodos

A metodologia a seguir representa a padronização final após etapas de otimização, tanto cirúrgica, quanto histológica. Os parâmetros foram adaptados a partir do trabalho em *Macaca* de Elorette et al. (2018), sendo ajustados às especificidades de *Callithrix jacchus*.

3.1. Sujeitos experimentais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília, nº 23106.137976/2023-59. Foram utilizados 4 indivíduos da espécie *Callithrix jacchus*, que estavam alocados no Centro de Primatologia da Fazenda Água Limpa (FAL) da Universidade de Brasília (UnB) em viveiros padrões, onde foram mantidos com uma dieta baseada em frutas, legumes, verduras e proteína ao longo de todo projeto. Água e ração para primatas estavam disponíveis *ad libitum*. Esses indivíduos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão de Fluoro-Emerald (Invitrogen #C34777), traçador anterógrado, e da CTB-AlexaFluor594 (Invitrogen #D1820), traçador retrógrado. Quatorze dias após o procedimento os animais foram eutanasiados.

3.2. Cirurgia estereotáxica

Todos os indivíduos foram submetidos ao procedimento cirúrgico, que foi realizado em condições assépticas no Centro de Primatologia da Fazenda Água

Limpa e acompanhadas por um veterinário. O procedimento envolve a utilização de um aparelho estereotáxico feito para *Callithrix* (SR-5C-HT, Narishige Group, Japão). As coordenadas referenciais intra auriculares foram registradas no aparelho estereotáxico, o animal foi então capturado com um auxílio de um puçá e anestesiado com uma solução de Cetamina (15 mg/kg, i.p.) e Dexmedetomidina (0,01 mg/kg), seus sinais vitais (frequência cardíaca e respiratória, temperatura corporal e saturação de oxigênio) foram monitorados ao longo da cirurgia e, para manter a hidratação, foi administrada solução salina. Lidocaína (gel, 2%) foi passada nas barras auriculares e os animais anestesiados foram posicionados no aparelho.

Então, realizamos a tricotomia e a desinfecção da área de incisão, e administramos um anestésico local (Lidocaína, 25%) subcutaneamente. A incisão no escalpo permitiu a craniotomia unilateral nas regiões acima do colículo superior e da amígdala, e a segunda incisão foi feita na dura-máter. As coordenadas dos alvos cerebrais foram determinadas pelo atlas específico de saguis (Figura 5) (Paxinos et al., 2012). Por meio de uma bomba de infusão (Narishige, Japão) e uma seringa Hamilton 10µL, o volume de 0,5 µL de cada um dos traçadores foi injetado a 0,004 µL/segundo nas áreas correspondentes (Tabela 1).

Tabela 1: Coordenadas dos alvos e traçador correspondente.

| Alvo | Traçador | CAS# | A-P | M-L | D-V |
|----------------------------|------------------------|-----------------------|------|------|-----|
| Colículo Superior | 5% Fluoro Emerald (FE) | Invitrogen #C34777 | +1,3 | +2,4 | -10 |
| Núcleo Lateral da Amígdala | 1% CTB-AlexaFluor594 | Invitrogen #D1820 | +8,3 | +6,5 | -4 |

As agulhas ficaram no ponto de injeção por cerca de 5 minutos após as injeções para garantir total difusão dos traçadores, assim como impedir refluxo para dentro da agulha durante a sua retração. A região foi suturada, limpa com clorexidina 2% e foi passado um antibiótico em pomada nos pontos. Os animais foram então acompanhados durante o pós-operatório e receberam analgésicos, antibióticos e anti-inflamatórios.

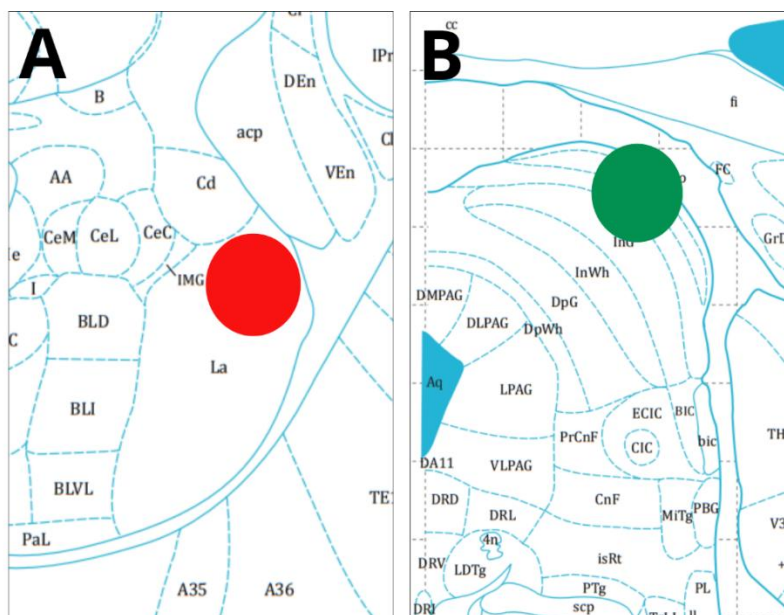


Figura 5: Imagem representativa das regiões-alvo das infusões e da área de perfusão estimada para o volume do traçador. A) Amígdala, A-P: +8,3; Vermelho: CTB B) Colículo Superior, A-P: +1,3; Verde: FE. Adaptado de: Paxinos et al. (2012)

3.3. Preparação do tecido

Após 14 dias os animais foram eutanasiados com Tiopental sódico (500 mg/kg, I.V.) e em seguida perfundidos transcardiacamente com tampão fosfato-salino (PBS) seguido de 4% paraformaldeído. Os cérebros foram removidos dos crânios e colocados para pós-fixar por 24 horas em paraformaldeído a 4%. Após a pós-fixação, os cérebros foram crioprotetidos em uma série de soluções de sacarose em PBS (10%→20%→30%), trocando de solução quando o cérebro afundava (~24-72 h), indicando saturação do tecido. Após a etapa de crioproteção, os cérebros foram então congelados rapidamente utilizando isopentano a -80°C e armazenados a -80°C até o corte. O tecido foi seccionado coronalmente em seções de 40 µm de espessura se utilizando de um criostato (HC-4000 semi automatic, Histoline, Itália) e armazenando eles em *free-floating* em placas com *antifreezing*, a -20°C.

3.4. Procedimentos histológicos

Para visualizar os traçadores CTB e FE, uma série de cortes através do pulvinar serão feitas e processadas para imunofluorescência. Cortes adjacentes aos preparados para observação dos traçadores foram montados em lâminas e deixados para secar. Essas seções montadas foram processadas através de uma série de soluções de etanol, desengorduradas, coradas com cresil violeta e cobertas com meio

de montagem verniz. Elas foram utilizadas para visualizar as subdivisões dos núcleos talâmicos, da amígdala e do CS.

3.5. Imunofluorescência

Os cortes foram lavados três vezes em PBS contendo 0,3% de Triton X-100 por 5 minutos e colocados em solução bloqueadora com agitação por uma hora e meia (90min/10 rpm). A solução bloqueadora consiste de 10% soro normal de burro e 0,3% de TX-100, em PBS. Os anticorpos primários (anti-CTB e anti-FE) foram adicionados à solução de bloqueio e o tecido foi incubado por 48 horas a 4°C (Para diluição de anticorpos ver Tabela 2). Os cortes foram lavados cinco vezes por 5 minutos em PBS e depois colocados na solução de bloqueio com os anticorpos secundários. Os cortes foram incubados nessa solução por 90 minutos com agitação (10 rpm) em temperatura ambiente. Após a incubação dos anticorpos secundários, as secções foram lavadas com PBS cinco vezes por 5 minutos cada e depois marcadas com DAPI por 15 minutos. Então, os cortes foram lavados em PBS cinco vezes por 5 minutos e então montados em lâminas, deixados para secar e então cobertos com meio de montagem (glicerol 9:1 PBS) e a lamínula. Depois disso foram levadas para análise microscópica.

Tabela 2: Anticorpos utilizados para procedimento de imunofluorescência.

| Anticorpo | CAS# | Tipo | Hospedeiro | Alvo | Diluição |
|---------------------------------------|-----------------------|------------|------------|--------|----------|
| Anti-FE | Invitrogen #PA1-26793 | Policlonal | Bode | FITC | 1:1000 |
| Anti-CTB | Invitrogen #BS-12862R | Policlonal | Coelho | CTB | 1:500 |
| Anti-Goat Alexa Fluor 488 conjugate | Invitrogen #A-11055 | H+L | Asno | Bode | 1:2000 |
| Anti-Rabbit Alexa Fluor 594 conjugate | Invitrogen #A-21207 | H+L | Asno | Coelho | 1:1500 |

3.6. Análise microscópica

As áreas cerebrais, e seus respectivos subnúcleos, foram delimitadas segundo atlas da espécie (Paxinos et al., 2012). Imagens de Z-stack foram capturadas por um microscópio confocal (Leica SP5) e imagens das subdivisões serão observadas em microscópio de luz (Zeiss Axioplan). Análises ortogonais das microfotografias foram utilizadas para visualização da sobreposição dos traçadores anterógrados e retrógrados no pulvinar utilizando o programa ImageJ. Paralelamente, os sítios de infusão dos traçadores na amígdala e colículo superior serão avaliados para verificação dos limites de dispersão gerada pelo volume infundido. Todas as imagens foram pós-processadas nos programas das empresas dos microscópios (Zeiss Zen, Leica LasX), ou pelo próprio ImageJ, por meio de edição de níveis, e para montagem das pranchas de publicação.

4. Resultados

O presente estudo demonstra, pela primeira vez em *Callithrix jacchus*, a convergência anatômica entre terminais provenientes do colículo superior e neurônios do pulvinar que se projetam para a amígdala. Nossos resultados indicam a existência de uma via subcortical conservada em primatas do Novo Mundo, corroborando a hipótese de um circuito neural rápido para detecção de ameaças ('via baixa'), conforme proposto pela Teoria de Detecção de Serpentes (Isbell, 2006; 2009). Apesar das variações metodológicas observadas, a topografia das projeções é consistente com o descrito em catarrinos e outros mamíferos, sugerindo uma homologia do circuito na ordem dos primatas.

4.1. Padronização Cirúrgica e Preservação Tecidual

Foram realizadas quatro cirurgias. O primeiro indivíduo (C1) veio a óbito após a cirurgia devido ao protocolo anestésico inicial, impossibilitando o tempo necessário para o transporte dos traçadores. Além disso, intercorrências na perfusão

transcardíaca comprometeram a fixação, impedindo a obtenção de cortes histológicos viáveis no criostato para análise dos locais de infusão.

Para os procedimentos subsequentes (n=3; indivíduos C2, C3 e C4), o protocolo anestésico foi reformulado e ficou sob supervisão de uma anestesista veterinária especializada em primatas. O novo regime resultou na estabilização dos parâmetros vitais durante todo o período cirúrgico estereotáxico e na recuperação pós-operatória completa, permitindo o período de sobrevivência de 14 dias necessário para o transporte neural.

Houve também um refinamento no protocolo de fixação e processamento tecidual. Inicialmente utilizou-se formalina tamponada a 10% (equivalente a 4% formaldeído), porém a literatura descreve que a presença de solventes estabilizantes (como metanol) poderia interferir no brilho e longevidade dos fluoróforos. Nos animais subsequentes, a solução fixadora foi substituída por paraformaldeído (PFA) a 4% recém-preparado, e o volume de perfusão do PBS e do fixador foi aumentado. As etapas subsequentes de pós-fixação e crioproteção em gradiente de sacarose foram concluídas com êxito, assim como o *flash-freezing* com isopentano a -80°C , garantindo a integridade estrutural para o seccionamento no criostato.

Inicialmente a concentração de CTB utilizada foi de 0,1%, porém o sinal de CTB encontrado estava muito tênue e inconclusivo. Foi necessário a aquisição de novo lote do produto e a concentração das duas cirurgias seguintes foi ajustada para 1%.

Adicionalmente, no último cérebro processado, introduziu-se uma etapa experimental de banho em solução de Glicina (0,3M) por 1 hora antes da criopreservação, visando o *quenching* de grupos aldeídos livres, provenientes do PFA, que poderiam contribuir para a autofluorescência. Entretanto, a comparação qualitativa com os espécimes anteriores não revelou redução perceptível no ruído de fundo. O protocolo cirúrgico e o de fixação padronizado encontram-se detalhados no Apêndice A e no Apêndice B.

4.2. Seccionamento e Armazenamento

O protocolo de crioproteção e congelamento permitiu o seccionamento da maior parte do encéfalo. No entanto, o rendimento da amostragem na região do CS foi baixa na maioria dos indivíduos, e a da amígdala foi parcial no indivíduo C4, devido à perda focal de tecido durante o corte no criostato. O armazenamento dos tecidos em *free floating* nas placas de poços com *antifreezing* se mostrou efetivo em preservar a qualidade estrutural do tecido.

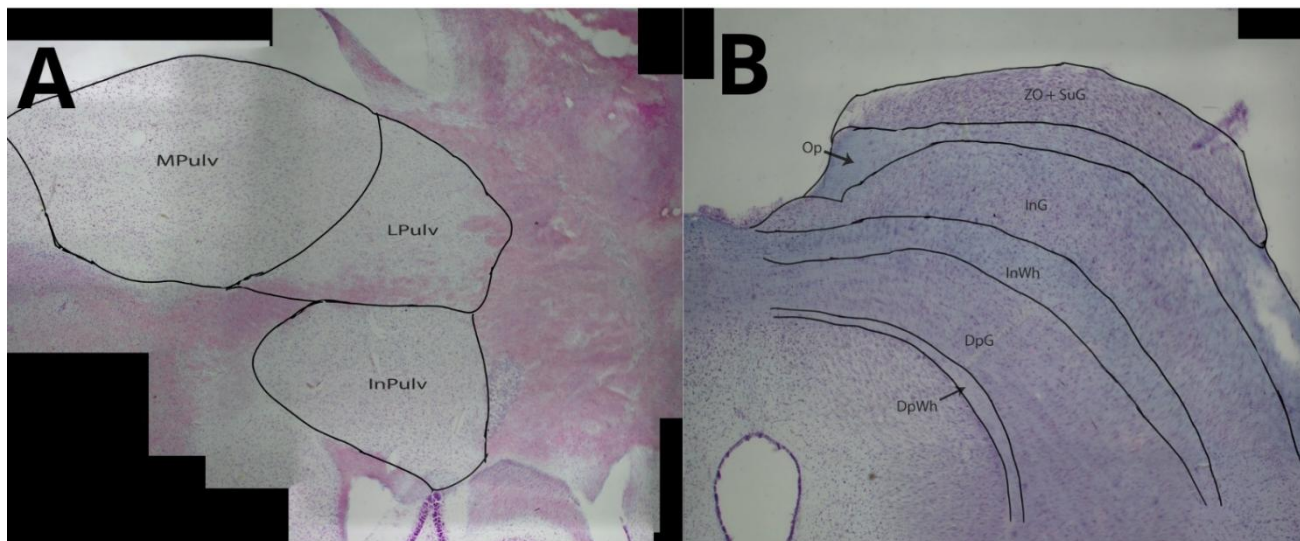


Figura 6: Mosaicos de fotos de microscopia de luz da coloração de Nissl. A) Pulvinar; A-P: +3,55 B) Colículo Superior; A-P: +1,50.

4.3. Histoquímica (Nissl)

Devido à ausência de um protocolo de coloração de Nissl para cortes de primatas no laboratório, foi necessário a padronização desse procedimento histoquímico. Tentativas iniciais foram baseadas no método mencionado no artigo de Elorette et al. (2018), utilizando tionina, porém não foi possível conseguir contraste satisfatório e reproduzível.

Mudamos a metodologia para a utilização de Cresil Violeta para a realização da marcação de Nissl. Após testes de tempo de diferenciação e pH, além da inclusão de uma etapa de desengorduramento prévia, padronizou-se um protocolo utilizando Cresil Violeta, que permitiu a visualização da citoarquitetura nuclear e de subdivisões neuroanatômicas (Figura 6).

4.4. Padronização da Imunofluorescência

A otimização da imunofluorescência envolveu o ajuste de múltiplos parâmetros para tentar amplificar o sinal e maximizar a relação sinal-ruído nos tecidos analisados, visando a visualização apenas dos traçadores (Apêndice D).

A ausência de um controle positivo prévio dificultou a titulação da concentração dos anticorpos, porém foram testadas algumas concentrações diferentes para os anticorpos, se baseando na literatura. A concentração escolhida para o protocolo final foi a que gerou menor *background* e ligação inespecífica nas amostras.

Foram também testados métodos para reduzir a autofluorescência do tecido. O tratamento com Sudan Black B para a redução de autofluorescência proveniente da lipofucsina se mostrou efetivo, porém resultou em alta degradação da integridade tecidual (fragilidade e rigidez) devido a utilização de etanol, e foi descontinuado. O banho do cérebro inteiro em glicina (0,3M) ou de cortes já seccionados não resultou em redução perceptível do ruído de fundo, indicando que a autofluorescência basal é principalmente derivada da lipofucsina.

4.5. Observação do local de infusão

No indivíduo C2 foi possível a captura de imagens dos locais de infusão, mostrando o local de infusão na amígdala e no colículo superior (Figura 7).

No indivíduo C3 foi observado o local de infusão no colículo superior e foi observado mas não fotografado o sítio de infusão do CTB na região da amígdala.

No indivíduo C4 foi possível observar o local de infusão no colículo superior, mas não foi possível observar o local de infusão na região da amígdala.

As infusões no colículo superior se concentraram nas camadas superiores.

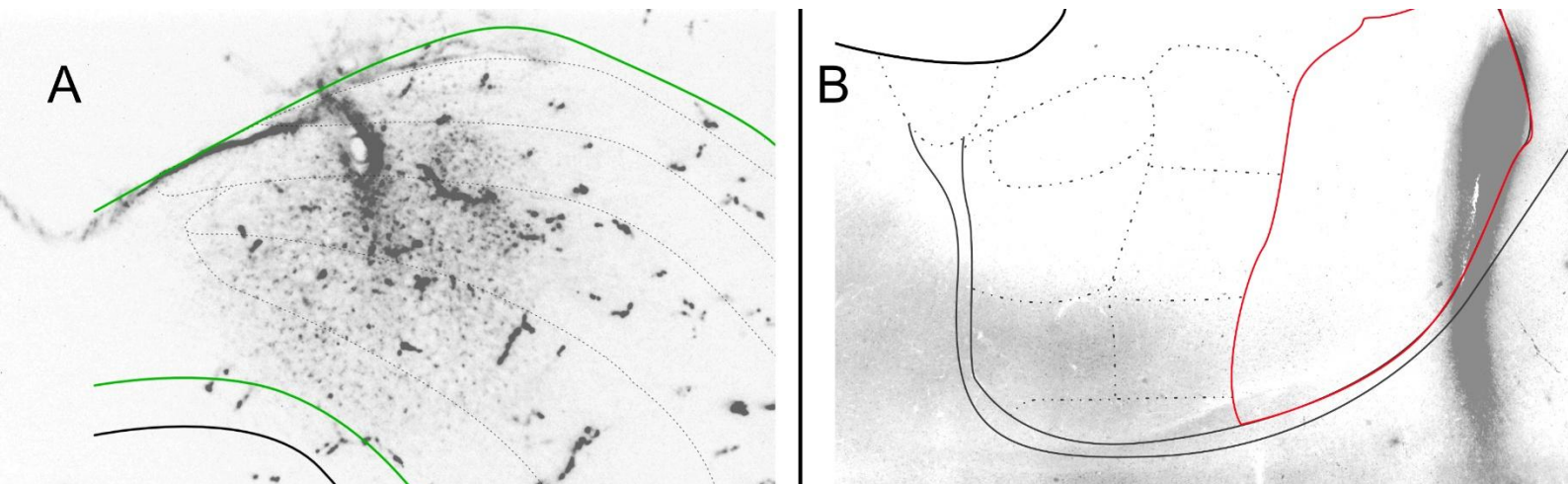


Figura 7: Locais de infusão do indivíduo C2; A) Colículo Superior; A-P: +1,00 ;Verde: Limites do colículo superior; B) Núcleo lateral da amígdala; A-P: +8,00; Vermelho: Limites do núcleo lateral da amígdala.

4.6. Observação do Pulvinar

Em todos os casos analisados foi possível observar na região do pulvinar a presença de estruturas fluorescentes condizentes com o espectro emissão de ambos os traçadores.

A marcação do FE é mais presente e intensa, condizente com a via CS->Pulv, além de estar presente em todos os indivíduos em todas as subregiões do pulvinar observadas (Figura 8 e 10). Através dessa marcação foi possível observar várias fibras axonais, com as fibras mais proeminentes sendo as observadas no MPulv, subregião mais próxima do local de infusão. Observou-se um padrão de marcação do CTB fraco, predominantemente granular, com o traçador estando presente em acúmulos que ficam próximos de núcleos celulares. O traçador também foi observado em todas as subregiões do pulvinar, porém com densidade menor do que o FE (Figura 10).

As imagens de microscopia confocal mostraram a justaposição de marcações no pulvinar, incluindo no pulvinar medial, no pulvinar inferior e no pulvinar lateral (Figuras 9 e 11), com a análise ortogonal indicando uma grande proximidade física entre os traçadores (Figura 9).

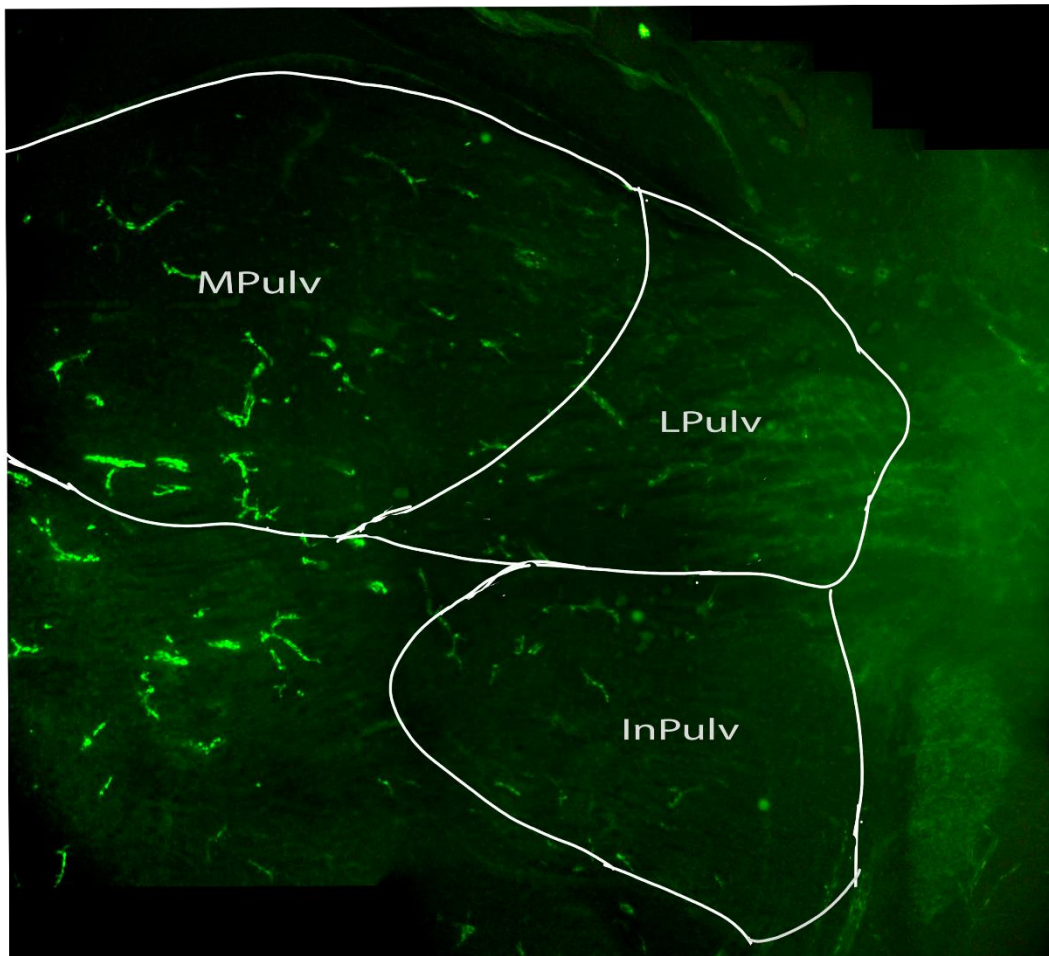


Figura 8: Moisaco de imagens do pulvinar do indivíduo C3; A-P: +3,55; Verde: FE.

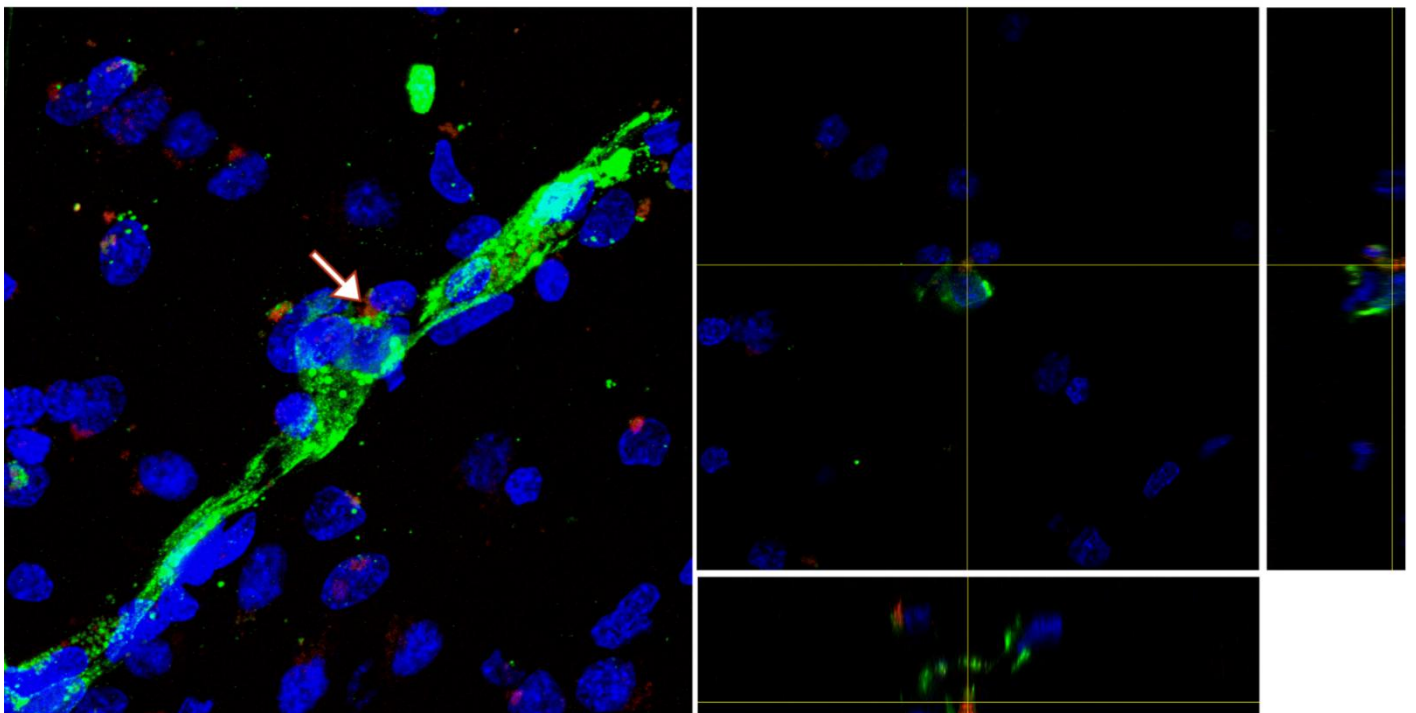


Figura 9: Z-stack do indivíduo C2, com a análise ortogonal do encontro dos traçadores, indicado pela seta. Azul: DAPI; Verde: FE; Vermelho: CTB.

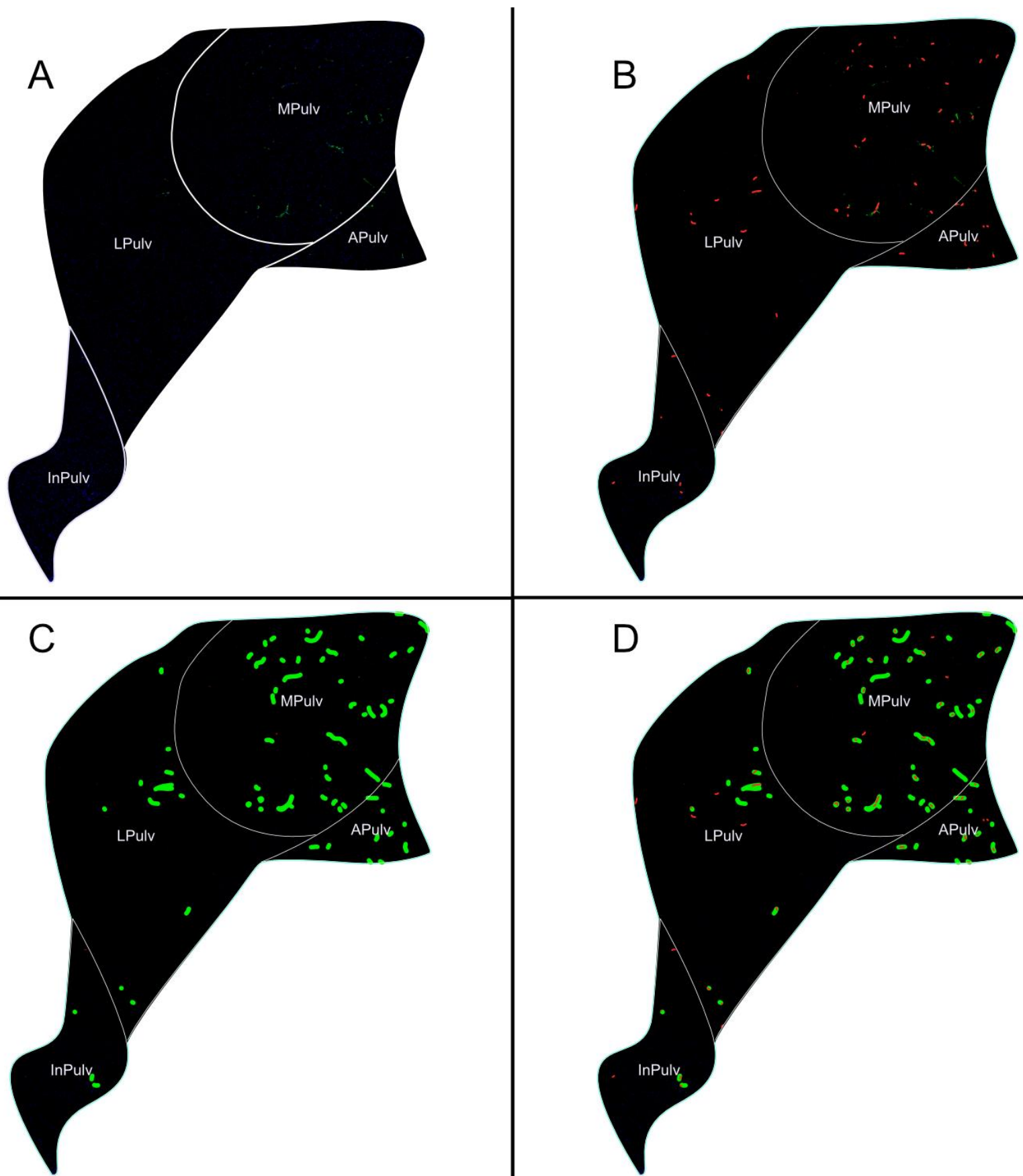


Figura 10: Representação dos traçadores em um corte do pulvinar do indivíduo C3. Verde: FE; Vermelho: CTB. A) Subregiões do pulvinar com os traçadores derivado de mosaico feito em microscópio confocal. B) Plot do CTB nas subregiões. C) Plot do FE nas subregiões do pulvinar. D) Plot de ambos os traçadores no pulvinar; A-P: +4,00

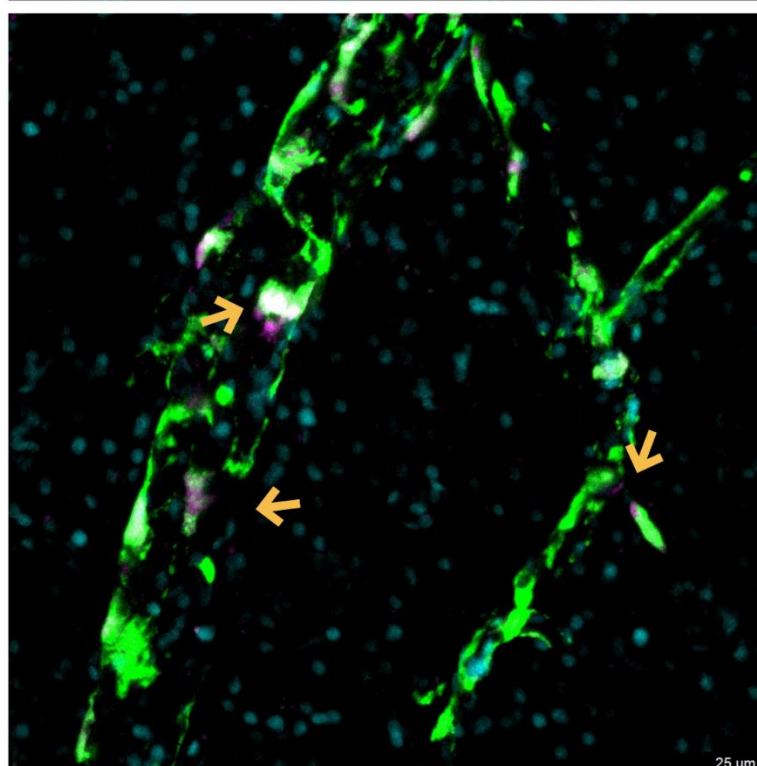
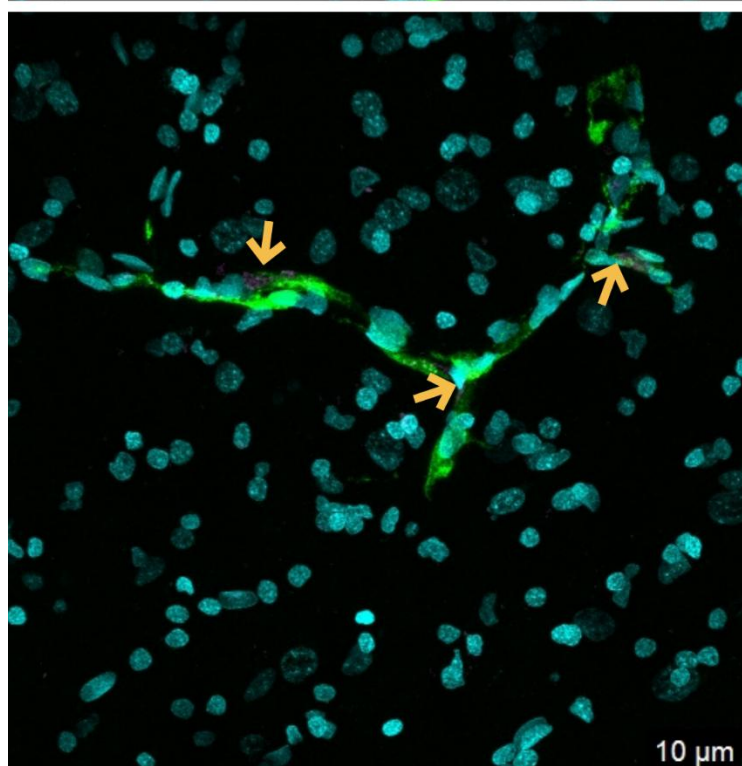
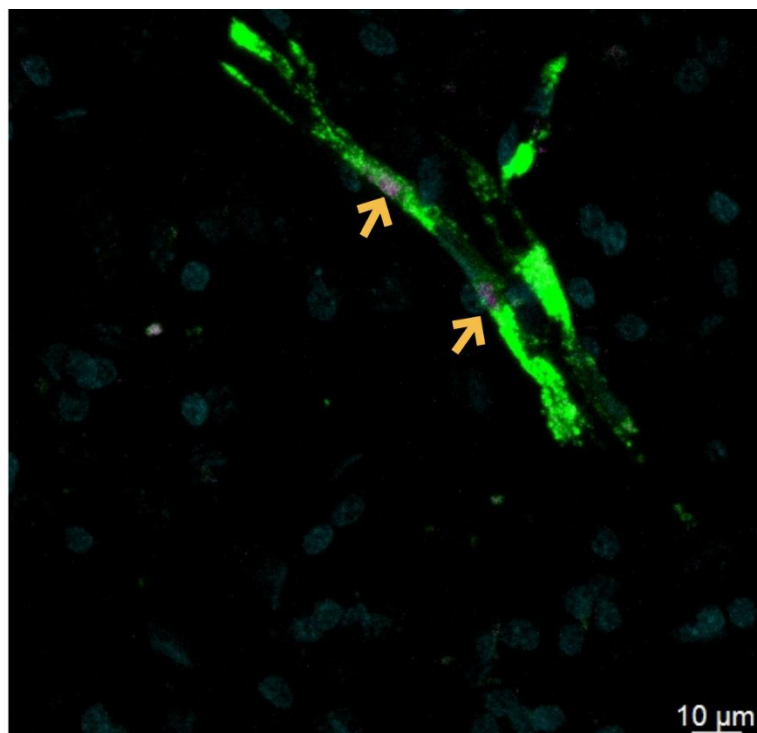
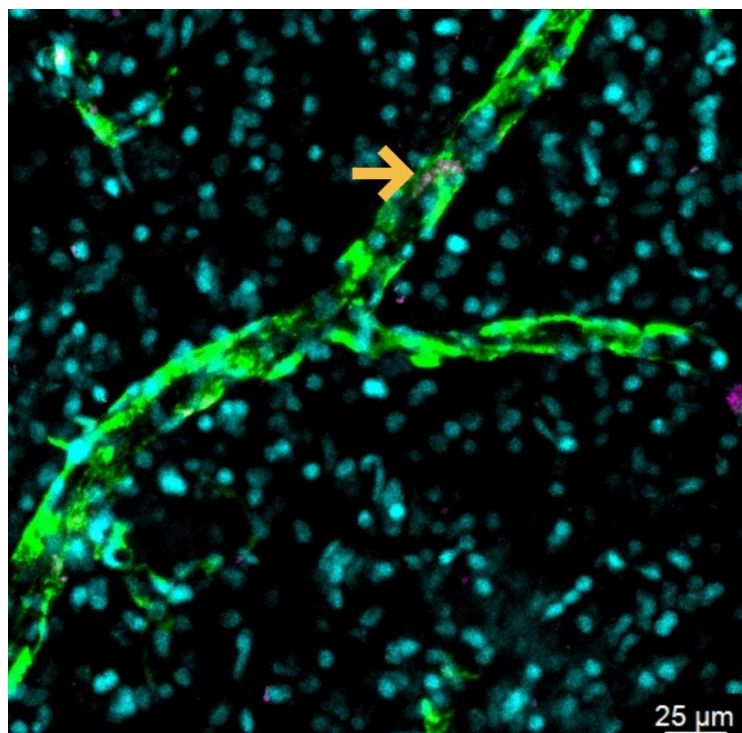


Figura 11: Z-stacks do pulvinar do indivíduo C3. Azul: DAPI; Verde: FE; Magenta: CTB. As setas indicam o encontro dos traçadores.

5. Discussão

O presente estudo estabeleceu, de forma inédita, a padronização de protocolos de traçamento neural anterógrado e retrógrado para a investigação da via subcortical Colículo Superior -> Pulvinar -> Amígdala em *Callithrix jacchus*. A validação dos parâmetros cirúrgicos estereotáxicos e o refinamento das técnicas histológicas de imunofluorescência representam um avanço metodológico significativo, fornecendo a base técnica necessária para futuras investigações anatômicas deste circuito em primatas neotropicais. Embora a microscopia de fluorescência convencional não permita a resolução de contatos sinápticos individuais, a estreita aposição observada entre as terminações axonais provenientes do colículo superior (marcadas com Fluoroemerald) e os somas neuronais projetantes para a amígdala (marcados com CTB) no pulvinar inferior/medial sugere fortemente uma conectividade funcional. Esta convergência topográfica é consistente com estudos ultraestruturais em *Tupaia belangeri*, nos quais a microscopia eletrônica confirmou que tais aposições observadas à microscopia de luz correspondem, frequentemente, a sinapses excitatórias funcionais (Day-Brown et al., 2010). Portanto, nossos dados fornecem evidências anatômicas para a existência de um *relay* pulvinar nesta via em saguis

A confirmação da existência desta via em *C. jacchus* possui implicações importantes para a biologia evolutiva dos primatas. A Teoria de Detecção de Serpentes (Isbell, 2006; 2009) propõe que a pressão seletiva exercida por ofídios peçonhentos foi um motor primário na expansão e especialização do sistema visual dos primatas. Uma das hipóteses bases de Isbell é de que os platyrrhini, devido a um hiato histórico na convivência com serpentes peçonhentas na América do Sul, poderiam apresentar variações ou uma menor dependência desta via subcortical em comparação aos catarrhini. Contudo, nossos resultados indicam a preservação deste circuito, sugerindo que a “via baixa” é uma característica ancestral (plesiomorfia) altamente conservada na ordem Primata, mantendo-se fundamental para a detecção rápida de ameaças, independentemente das variações nas pressões seletivas regionais mais recentes do grupo. Porém, como a teoria de Isbell também postula que os platyrrhini teriam uma maior variabilidade em seus sistemas visuais dentre seus grupos, em contraposição aos catarrhini, que possuem uma grande homogeneidade em seus sistemas visuais.

A adaptação dos protocolos histológicos para o tecido cerebral de *C. jacchus* revelou particularidades neuroquímicas da espécie. A coloração de Nissl exigiu a substituição da Tionina por Cresil Violeta para otimizar o contraste citoarquitetônico. Adicionalmente, o manejo da autofluorescência de lipofuscina, abundante em tecido de primatas adultos, mostrou-se crítico. Tentativas de bloqueio com Sudan Black B resultaram em comprometimento da integridade tecidual devido aos solventes alcoólicos, indicando que, para a preservação de traçadores fluorescentes e da morfologia celular em *C. jacchus*, o uso de métodos de *quenching* alternativos são preferíveis.

Um dos principais achados metodológicos deste trabalho refere-se ao comportamento do traçador retrógrado CTB observado no tecido de *Callithrix*. Diferentemente do padrão de preenchimento citoplasmático difuso ("*Golgi like*") amplamente descrito na literatura para roedores (Mikkelsen, 1992; Dederen, 1994; Conte *et al.*, 2009) e observado por Elorette em *Macaca*, nossos resultados demonstraram uma marcação predominantemente granular e perinuclear. Tal fenômeno não parece ser um artefato de permeabilização, visto que a marcação se acumula próxima a núcleos, condizente com o esperado da molécula. Também foi observado que o comportamento do traçador anterógrado FE foi diferente do de Elorette, pois encontramos menor densidade de fibras, porém elas possuem calibre maior do que as encontradas por Elorette.

Em relação aos subnúcleos onde foram observados os traçadores, encontramos um padrão de marcação similar ao esperado, com o SC projetando aferências para todos os subnúcleos do pulvinar (Benevento and Fallon, 1975; Huerta and Harting, 1984; Stepniewska *et al.*, 2000; Elorette *et al.*, 2018). Entretanto, encontramos marcações de CTB mais abrangentes e menos densas que Elorette, que relata a observação de grupos densos de neurônios marcados no pulvinar pelo CTB, com a área que ocupam dentro de subnúcleos específicos sendo mais restrita. Contudo, o subnúcleo do pulvinar medial, o com a maior quantidade de marcações de CTB no artigo de Elorette, também foi o subnúcleo onde mais observamos o traçador, além de ser o subnúcleo onde os encontros entre os traçadores se concentraram mais.

5.1. Limitações

A interpretação dos dados de conectividade apresentados deve considerar as limitações técnicas e logísticas enfrentadas durante a execução do projeto, que impactaram tanto a amostragem quanto a profundidade das análises quantitativas.

Diferentemente do protocolo de referência (Elorette *et al.*, 2018), este estudo utilizou a subunidade B da toxina da cólera diretamente conjugada a fluoróforos, devido à dificuldade de acesso ao CTB não conjugado. Embora validada pelo fabricante, a ausência de um controle positivo dificultou a titulação fina dos anticorpos. A estratégia de titulação priorizou a redução do ruído de fundo (*background*), o que, por consequência, pode ter reduzido a sensibilidade para a detecção de fibras de menor calibre ou com baixa expressão de transporte retrógrado. Também é possível que o processamento histológico tenha afetado a visualização dos traçadores, aumentando o background ou realizando conexões inespecíficas. Saleeba *et al.* (2019) relata que o laboratório deles não observou efetividade na marcação do CTB-AlexaFluor com anticorpos anti-CTB.

Intercorrências na estabilidade mecânica do criostato resultaram em variações na espessura das seções e, em casos críticos, na perda de fatias contendo o sítio de injeção na amígdala. Somado a leves variações na angulação do plano de corte em relação ao plano coronal padrão, a localização exata dos sítios de injeção em algumas amostras

Adicionalmente, a falta de lupa de fluorescência, e a incompatibilidade dos filtros dos microscópios de epifluorescência disponíveis com o espectro de emissão do fluoróforo Alexa Fluor-594 restringiu a análise e documentação das imagens quase exclusivamente à microscopia confocal.

A logística de acesso restrito e janelas temporais limitadas para uso do microscópio confocal (incluindo a necessidade de deslocamento intermunicipal para acesso a equipamentos com mesa automatizada/slide scanner) impactou diretamente o volume de dados coletados. Consequentemente, a documentação fotográfica de algumas regiões do pulvinar e dos sítios de infusão não pôde ser realizada com a exaustividade de varredura planejada.

Por fim, a ausência de sistemas de plotagem digital semiautomática integrados ao hardware (como o MDPlot utilizado por Elorette *et al.*, 2018) impediu a reconstrução

digital precisa e ágil das fatias inteiras. A análise baseou-se, portanto, em correspondência anatômica manual e critérios qualitativos. Observou-se também, a *posteriori*, que o uso de lamínulas convencionais, em vez de lamínulas de alta precisão específicas para fluorescência, pode ter introduzido aberrações ópticas sutis. Portanto, os resultados atuais confirmam a existência topográfica da via, mas não permitem inferências estatísticas robustas sobre a densidade relativa das projeções.

6. Conclusão

Esse estudo mostra que neurônios do colículo superior projetados para o pulvinar estão muito próximos de neurônios pulvinares direcionados para a amígdala, indicando a existência da via baixa de processamento visual em *Callithrix*. Isso indica que, no mínimo no gênero dos saguis, não houve alterações nessa via específica em relação aos catarrinos. Dado a natureza desse circuito de ser um sistema rápido de detecção e reação a ameaças, era esperado que ele não tivesse sido perdido, mesmo com a falta da pressão seletiva por serpentes. Hoje em dia existem serpentes peçonhentas na América, porém durante o período em que elas não estavam presentes no Novo Mundo os primatas eram predados por outros animais, como felinos e aves de rapina. Então, é possível que a variação tenha sido em padrões de ativação da “via baixa”, assim como quais estímulos são priorizados por esse circuito.

Para estudos futuros que visem a identificação e análise dessas vias, recomenda-se a utilização de sistemas de microscopia com digitalização de lâmina inteira (slide scanner) e o uso de lamínulas de alta precisão (espessura #1.5H) para maximizar a resolução óptica em microscopia confocal. Também se recomenda a utilização de traçadores virais, os quais permitem maior controle experimental e melhor visualização do tecido, com menos etapas de preparo após a extração do tecido.

7. Referências Bibliográficas

ABUHASAN, Q.; REDDY, V.; SIDDIQUI, W. Neuroanatomy, Amygdala. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

ADÁMEK, P.; LANGOVÁ, V.; HORÁČEK, J. Early-stage visual perception impairment in schizophrenia, bottom-up and back again. **Schizophrenia**, v. 8, n. 27, 2022. DOI: 10.1038/s41537-022-00237-9.

AGGLETON, J. P. (ed.). **The Amygdala: A Functional Analysis**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.

AGGLETON, J. P.; SAUNDERS, R. C. The amygdala: what's happened in the last decade? *In: AGGLETON, J. P. (ed.). The Amygdala: A Functional Analysis*. New York: Oxford University Press, 2000. p. 1-30.

ALEXANDER, A. L. *et al.* Diffusion tensor imaging of the brain. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 3, p. 316–329, 2007.

ALLMAN, J.; ZUCKER, S. Cytochrome oxidase and functional coding in primate striate cortex: a hypothesis. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 55, p. 979–982, 1990.

ALMEIDA, I.; SOARES, S. C.; CASTELO-BRANCO, M. The distinct role of the amygdala, superior colliculus and pulvinar in processing of central and peripheral snakes. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, e0129949, 2015.

AMARAL, D. G. *et al.* Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. *In: AGGLETON, J. P. (ed.). The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*. New York: Wiley-Liss, 1992. p. 1-66.

ARAÚJO, A. C. *et al.* Color vision in the black howler monkey (*Alouatta caraya*). **Visual Neuroscience**, v. 25, n. 3, p. 243–248, 2008.

BADEN, T. *et al.* The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. **Nature**, v. 529, p. 345–350, 2016.

BARROS, M. *et al.* Reactions to potential predators in captive-born marmosets (*Callithrix penicillata*). **International Journal of Primatology**, v. 23, n. 2, p. 443-454, 2002.

BARTON, R. A. Olfactory evolution and behavioral ecology in primates. **American Journal of Primatology**, v. 68, n. 6, p. 545–558, 2006.

BARTON, R. A. Primate brain evolution: cognitive demands of foraging or of social life? *In: BOINSKI, S.; GARBER, P. A. (ed.). On the Move: How and Why Animals Travel in Groups*. Chicago: University of Chicago Press, 2000. p. 204-237.

BARTON, R. A.; PURVIS, A.; HARVEY, P. H. Evolutionary radiation of visual and olfactory brain systems in primates, bats and insectivores. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 348, n. 1326, p. 381–392, 1995.

BASSO, M. A.; BICKFORD, M. E.; CANG, J. Unraveling circuits of visual perception and cognition through the superior colliculus. **Neuron**, v. 109, p. 918–937, 2021.

BASSO, M. A.; MAY, P. J. Circuits for Action and Cognition: A View from the Superior Colliculus. **Annual Review of Vision Science**, v. 3, p. 197–226, 2017.

BENARROCH, E. E. Pulvinar: Associative role in cortical function and clinical correlations. **Neurology**, v. 84, n. 7, p. 738–747, 2015.

BENAVIDES, J. A. *et al.* Spatio-temporal dynamics of rabies and habitat suitability of the common marmoset *Callithrix jacchus* in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, e0010254, 2022.

BENEVENTO, L. A.; FALLON, J. H. The ascending projections of the superior colliculus in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **The Journal of Comparative Neurology**, v. 160, n. 3, p. 339–361, 1975.

BENEVENTO, L. A.; STANDAGE, G. P. The organization of projections of the retinorecipient and nonretinorecipient nuclei of the pretectal complex and layers of the superior colliculus to the lateral pulvinar and medial pulvinar in the macaque monkey. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 217, n. 3, p. 307–336, 1983.

BERGQVIST, N. **Rising Incidents and Apparent Population Growth of Callithrix marmosets in São Paulo: Analysing Incidents in São Paulo (2012-2023): Patterns, Seasonal Influences, and Geographic Factors.** 2024. Disponível em: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-s-20669>. Acesso em: 21 jan. 2026.

BERMAN, R. A.; WURTZ, R. H. Functional Identification of a Pulvinar Path from Superior Colliculus to Cortical Area MT. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 18, p. 6342–6354, 2010.

BHARATI, K.; GANGULY, N. K. Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 133, n. 2, p. 179–187, 2011.

BORRA, E. *et al.* Projections to the superior colliculus from inferior parietal, ventral premotor, and ventrolateral prefrontal areas involved in controlling goal-directed hand actions in the macaque. **Cerebral Cortex**, New York, v. 24, n. 4, p. 1054–1065, 2014.

BOUKADI, M. *et al.* Test-retest reliability of diffusion measures extracted along white matter language fiber bundles using HARDI-based tractography. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, 2019.

BURMAN, K. J. *et al.* Subcortical projections to the frontal pole in the marmoset monkey. **European Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 2, p. 303–319, 2011.

CAGNI, P. *et al.* Immediate, but no delayed, behavioral response to a snake model by captive black tufted-ear marmosets. **Behavioural Processes**, v. 87, n. 3, p. 241-245, 2011.

CARTMILL, M. Arboreal adaptations and the origin of the order Primates. *In*: TUTTLE, R. (ed.). **The Functional and Evolutionary Biology of Primates**. Chicago: Aldine-Atherton, 1972. p. 97-122.

CARTMILL, M. Rethinking primate origins. **Science**, v. 184, p. 436-443, 1974.

CARTMILL, M. New views on primate origins. **Evolutionary Anthropology**, v. 6, p. 105-111, 1992.

CELEGHIN, A.; DE GELDER, B.; TAMIETTO, M. From affective blindsight to emotional consciousness. **Consciousness and Cognition**, v. 36, p. 414–425, 2015.

CERKEVICH, C. M. *et al.* Distribution of cortical neurons projecting to the superior colliculus in macaque monkeys. **Eye and Brain**, v. 6, p. 121–137, 2014.

CHALFIN, B. P. *et al.* Scaling of neuron number and volume of the pulvinar complex in new world primates: Comparisons with humans, other primates, and mammals. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 504, n. 3, p. 265–274, 2007.

CHAMBERLIN, N. L. *et al.* Recombinant adeno-associated virus vector: use for transgene expression and anterograde tract tracing in the CNS. **Brain Research**, v. 793, n. 1–2, p. 169–175, 1998.

CHANG, H. T. Anterograde transport of lucifer yellow-dextran conjugate. **Brain Research Bulletin**, v. 26, n. 5, p. 813–816, 1991.

CHI, H. *et al.* Genomic and phenotypic evidence support visual and olfactory shifts in primate evolution. **Nature Ecology & Evolution**, v. 9, p. 721–733, 2025.

CONTE, W. L.; KAMISHINA, H.; REEP, R. L. The efficacy of the fluorescent conjugates of cholera toxin subunit B for multiple retrograde tract tracing in the central nervous system. **Brain Structure & Function**, v. 213, n. 4-5, p. 367–373, 2009.

COVINGTON, B. P.; AL KHALILI, Y. Neuroanatomy, Nucleus Lateral Geniculate. *In*: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

CROMPTON, R. H. “Visual predation”, habitat structure, and the ancestral primate niche. *In*: ALTERMAN, L.; DOYLE, G.; IZARD, M. K. (ed.). **Creatures of the Dark: The Nocturnal Prosimians**. New York: Plenum, 1995. p. 11-30.

DAY-BROWN, J. D. *et al.* Pulvinar projections to the striatum and amygdala in the tree shrew. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 4, art. 143, 2010.

DEDEREN, P. J.; GRIBNAU, A. A.; CURFS, M. H. Retrograde neuronal tracing with cholera toxin B subunit: comparison of three different visualization methods. **The Histochemical Journal**, v. 26, n. 11, p. 856–862, 1994.

DE GELDER, B. *et al.* Non-conscious recognition of affect in the absence of striate cortex. **NeuroReport**, v. 10, p. 3759–3763, 1999.

DISTLER, C.; HOFFMANN, K. P. Direct projections from the dorsal premotor cortex to the superior colliculus in the macaque (*Macaca mulatta*). **The Journal of Comparative Neurology**, v. 523, n. 16, p. 2390–2408, 2015.

DORKENWALD, S. *et al.* Neuronal wiring diagram of an adult brain. **Nature**, v. 634, n. 8032, p. 124–138, 2024.

DOUBELL, T. P. *et al.* Functional connectivity between the superficial and deeper layers of the superior colliculus: an anatomical substrate for sensorimotor integration. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 16, p. 6596–6607, 2003.

DOWLING, J. E. **The retina**: an approachable part of the brain. Rev. ed. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press, 2012.

ELLIOT SMITH, G. **The Evolution of Man**. Smithsonian Institution Annual Report. Washington, DC: Smithsonian Institution, 1912.

ELORETTE, C.; FORCELLI, P. A.; SAUNDERS, R. C.; MALKOVA, L. Co-localization of tectal inputs with amygdala-projecting neurons in the macaque pulvinar. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 12, art. 91, 2018.

EMILE, N.; BARROS, M. Recognition of a 3D snake model and its 2D photographic image by captive black tufted-ear marmosets (*Callithrix penicillata*). **Animal Cognition**, v. 12, n. 5, p. 725–732, 2009.

FLORENCE, S. L.; KAAS, J. H. Ocular dominance columns in area 17 of Old World macaque and talapoin monkeys: complete reconstructions and quantitative analyses. **Visual Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 449–462, 1992.

FRIES, W. Cortical projections to the superior colliculus in the macaque monkey: a retrograde study using horseradish peroxidase. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 230, n. 1, p. 55–76, 1984.

FRITZSCH, B.; WILM, C. Dextran amines in neuronal tracing. **Trends in Neurosciences**, v. 13, n. 1, p. 14, 1990.

GHITANI, N. *et al.* Excitatory synaptic feedback from the motor layer to the sensory layers of the superior colliculus. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 20, p. 6822–6833, 2014.

GLAW, F.; VENCES, M. **A Field Guide to the Amphibians and Reptiles of Madagascar**. 2. ed. Cologne: Vences & Glaw Verlags GbR, 1994.

GLOVER, J. C.; PETURSDOTTIR, G.; JANSEN, J. K. S. Fluorescent dextran-amines used as axonal tracers in the nervous system of the chicken embryo. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 18, n. 3, p. 243–254, 1986.

GOLGI, C. Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. **Gazzetta Medica Italiana: Lombardia**, Milano, v. 33, p. 244-246, 1873.

GOODALE, M. A.; MILNER, A. D. Separate visual pathways for perception and action. **Trends in Neurosciences**, v. 15, n. 1, p. 20–25, 1992.

GREENE, H. W. **Snakes: The Evolution of Mystery in Nature**. Berkeley: University of California Press, 1997.

GUTIERREZ, C.; COLA, M. G.; SELTZER, B.; CUSICK, C. Neurochemical and connectional organization of the dorsal pulvinar complex in monkeys. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 419, p. 61-86, 2000.

GUTIERREZ, C.; YAUN, A.; CUSICK, C. G. Neurochemical subdivisions of the inferior pulvinar in macaque monkeys. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 363, n. 4, p. 545–562, 1995.

HAFED, Z. M.; CHEN, C. Y. Sharper, Stronger, Faster Upper Visual Field Representation in Primate Superior Colliculus. **Current Biology**, v. 26, n. 13, p. 1647–1658, 2016.

HENRY, G. H.; VIDYASAGAR, T. R. Evolution of mammalian visual pathways. *In*: CRONLY-DILLON, J. R.; GREGORY, R. L. (ed.). **Evolution of the Eye and Visual System**. Boca Raton: CRC Press, 1991. v. 2, p. 442-465.

HERCULANO-HOUZEL, S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 3, 2009.

HERCULANO-HOUZEL, S.; MOTA, B.; LENT, R. Cellular scaling rules for rodent brains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 32, p. 12138–12143, 2006.

HESS, D. T.; EDWARDS, M. A. Anatomical demonstration of ocular segregation in the retinogeniculocortical pathway of the New World capuchin monkey (*Cebus apella*). **The Journal of Comparative Neurology**, v. 264, n. 3, p. 409–420, 1987.

HORTON, J. C.; HOCKING, D. R. Anatomical demonstration of ocular dominance columns in striate cortex of the squirrel monkey. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 17, p. 5510–5522, 1996.

HORVATH, J. E. *et al.* Development and application of a phylogenomic toolkit: Resolving the evolutionary history of Madagascar's lemurs. **Genome Research**, v. 18, n. 3, p. 489–499, 2008.

HUERTA, M. F.; HARTING, J. K. The Mammalian Superior Colliculus: Studies of Its Morphology and Connections. *In*: VANEGAS, H. (ed.). **Comparative Neurology of the Optic Tectum**. Boston: Springer, 1984. p. 687–773.

HUNT, D. M. *et al.* Molecular evolution of trichromacy in primates. **Vision Research**, v. 38, n. 21, p. 3299-3306, 1998.

INOUE, T. *et al.* The common marmoset in biomedical research: experimental disease models and veterinary management. **Experimental Animals**, v. 73, n. 2, p. 159-170, 2024.

ISA, T. Intrinsic processing in the mammalian superior colliculus. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 6, p. 668–677, 2002.

ISA, T. *et al.* The tectum/superior colliculus as the vertebrate solution for spatial sensory integration and action. **Current Biology**, v. 31, n. 11, p. R741-R762, 2021.

ISELL, L. A. Snakes as agents of evolutionary change in primate brains. **Journal of Human Evolution**, v. 51, n. 1, p. 1-35, 2006.

ISELL, L. A. **The Fruit, the Tree, and the Serpent: Why We See So Well.** Cambridge: Harvard University Press, 2009.

JACOBS, G. H. Primate color vision: a comparative perspective. **Visual Neuroscience**, v. 25, n. 5-6, p. 619-633, 2008.

JACOBS, G. H.; NEITZ, M.; DEEGAN, J. F.; NEITZ, J. Trichromatic colour vision in New World monkeys. **Nature**, v. 382, n. 6587, p. 156–158, 1996.

JONES, F. W. **Arboreal Man.** London: Arnold, 1916.

KAAS, J. H. The evolution of brains from early mammals to humans. **WIREs Cognitive Science**, v. 4, n. 1, p. 33–45, 2013.

KAAS, J. H.; HUERTA, M. F. The Subcortical Visual System of Primates. *In*: STELIS, H. D.; ERWIN, J. (ed.). **Comparative Primate Biology.** New York: Liss, 1988. v. 4: Neurosciences, p. 327–391.

KALIN, N. H.; SHELTON, S. E.; DAVIDSON, R. J. The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 24, p. 5506–5515, 2004.

KAPLAN, E. The M, P, and K Pathways of the Primate Visual System. *In*: CHALUPA, L. M.; WERNER, J. S. (ed.). **The Visual Neurosciences.** Cambridge: The MIT Press, 2003. v. 1, p. 481–493.

KAWAI, N. **Fear of Snakes: Evolutionary and Psychobiological Perspectives on Our Innate Fear.** Singapore: Springer, 2019.

KINOSHITA, M. *et al.* Dissecting the circuit for blindsight to reveal the critical role of pulvinar and superior colliculus. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 135, 2019.

KIRK, E. C. Comparative morphology of the eye in primates. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 281, n. 1, p. 1095-1103, 2004.

KNUDSEN, E. I. Evolution of neural processing for visual perception in vertebrates. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 528, n. 17, p. 2888–2901, 2020.

KÖBBERT, C. *et al.* Current concepts in neuroanatomical tracing. **Progress in Neurobiology**, v. 62, n. 4, p. 327–351, 2000.

KRAUZLIS, R. J.; LOVEJOY, L. P.; ZÉNON, A. Superior colliculus and visual spatial attention. **Annual Review of Neuroscience**, v. 36, p. 165–182, 2013.

KREMERS, J. (ed.). **The Primate Visual System**. Chichester: Wiley, 2005.

KRISTENSSON, K.; OLSSON, Y. Retrograde axonal transport of protein. **Brain Research**, v. 29, n. 2, p. 363–365, 1971.

KRISTENSSON, K.; OLSSON, Y. Uptake and retrograde axonal transport of peroxidase in hypoglossal neurones. **Acta Neuropathologica**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 1971.

KRUBITZER, L. A.; KAAS, J. H. Cortical connections of MT in four species of primates: areal, modular, and retinotopic patterns. **Visual Neuroscience**, v. 5, p. 165–204, 1990.

KWAN, W. C. *et al.* Unravelling the subcortical and retinal circuitry of the primate inferior pulvinar. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 527, n. 3, p. 558–576, 2019.

LAI, B.-Q. *et al.* Cholera toxin B subunit shows transneuronal tracing after injection in an injured sciatic nerve. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, e0144030, 2015.

LANCIEGO, J. L.; WOUTERLOOD, F. G. A half century of experimental neuroanatomical tracing. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 42, n. 3, p. 157–183, 2011.

LANCIEGO, J. L.; WOUTERLOOD, F. G. Neuroanatomical tract-tracing techniques that did go viral. **Brain Structure and Function**, v. 225, n. 4, p. 1193–1224, 2020.

LACHICA, E. A.; CASAGRANDE, V. A. The morphology of collicular and retinal axons ending on small relay (W-like) cells of the primate lateral geniculate nucleus. **Visual Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 403–418, 1993.

LE, Q. V. *et al.* Pulvinar neurons reveal neurobiological evidence of past selection for rapid detection of snakes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 47, p. 19000–19005, 2013.

LE GROS CLARK, W. E. **The Antecedents of Man**. Edinburgh: Edinburgh University Press, 1959.

LEAL DO AMARAL, C. R. *et al.* Global climate changes and the evolution of area suitability for marmosets of genus *Callithrix*. **Academia Biology**, v. 1, n. 3, 2023.

LEDOUX, J. E. **The emotional brain**. New York: Simon & Schuster, 1996.

LEDOUX, J. The amygdala and emotion: a view through fear. *In*: AGGLETON, J. P. (ed.). **The Amygdala: A Functional Analysis**. New York: Oxford University Press, 2000. p. 281-310.

LEDOUX, J. The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, n. 4-5, p. 727–738, 2003.

LEE, K. H. *et al.* The sifting of visual information in the superior colliculus. **eLife**, v. 9, art. e50678, 2020.

LINKE, R.; DE LIMA, A. D.; SCHWEGLER, H.; PAPE, H. C. Direct synaptic connections of axons from superior colliculus with identified thalamo-amygdaloid projection neurons in the rat: possible substrates of a subcortical visual pathway to the amygdala. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 403, n. 2, p. 158–170, 1999.

LIU, X. *et al.* The superior colliculus: cell types, connectivity, and behavior. **Neuroscience Bulletin**, v. 38, p. 1519–1540, 2022.

LIVINGSTONE, M. S.; HUBEL, D. H. Thalamic inputs to cytochrome oxidase-rich regions in monkey visual cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, p. 6098-6101, 1982.

LIVINGSTONE, M.; HUBEL, D. Segregation of form, color, movement, and depth: Anatomy, physiology, and perception. **Science**, v. 240, p. 740–749, 1988.

LUPPI, P.-H.; FORT, P.; JOUVET, M. Iontophoretic application of unconjugated cholera toxin B subunit (CTb) combined with immunohistochemistry of neurochemical substances: a method for transmitter identification of retrogradely labeled neurons. **Brain Research**, v. 534, n. 1–2, p. 209–224, 1990.

LYNCH, J. C.; GRAYBIEL, A. M.; LOBECK, L. J. The differential projection of two cytoarchitectonic subregions of the inferior parietal lobule of macaque upon the deep layers of the superior colliculus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 235, n. 2, p. 241–254, 1985.

MAIOR, R. S. *et al.* Superior colliculus lesions impair threat responsiveness in infant capuchin monkeys. **Neuroscience Letters**, v. 504, n. 3, p. 257-260, 2011.

MAY, P. J. The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. **Progress in Brain Research**, v. 151, p. 321–378, 2006.

MCFADYEN, J.; MATTINGLEY, J. B.; GARRIDO, M. I. An afferent white matter pathway from the pulvinar to the amygdala facilitates fear recognition. **eLife**, v. 8, art. e40766, 2019.

MESULAM, M.-M. **Tracing Neural Connections with Horseradish Peroxidase**. Chichester: Wiley, 1982.

- MIKKELSEN, J. D. Visualization of efferent retinal projections by immunohistochemical identification of cholera toxin subunit B. **Brain Research Bulletin**, v. 28, n. 4, p. 619–623, 1992.
- MITCHELL, J. F.; LEOPOLD, D. A. The marmoset monkey as a model for visual neuroscience. **Neuroscience Research**, v. 93, p. 20-46, 2015.
- MORRIS, J. S.; ÖHMAN, A.; DOLAN, R. J. A subcortical pathway to the right amygdala mediating “unseen” fear. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 4, p. 1680–1685, 1999.
- NANCE, D. M.; BURNS, J. Fluorescent dextrans as sensitive anterograde neuroanatomical tracers: applications and pitfalls. **Brain Research Bulletin**, v. 25, n. 1, p. 139–145, 1990.
- NAUTA, W. J. H.; GYGAX, P. A. Silver Impregnation of Degenerating Axons in the Central Nervous System: A Modified Technic. **Stain Technology**, v. 29, n. 2, p. 91–93, 1954.
- NEI, M.; ZHANG, J.; YOKOYAMA, S. Color vision of ancestral organisms of higher primates. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 6, p. 611-618, 1997.
- NIE, F.; WONG-RILEY, M. T. Double labeling of GABA and cytochrome oxidase in the macaque visual cortex: quantitative EM analysis. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 356, n. 1, p. 115–131, 1995.
- NIE, F.; WONG-RILEY, M. T. Differential glutamatergic innervation in cytochrome oxidase-rich and -poor regions of the macaque striate cortex: quantitative EM analysis of neurons and neuropil. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 369, n. 4, p. 571–590, 1996.
- ÖHMAN, A.; MINEKA, S. The malicious serpent: Snakes as a prototypical stimulus for an evolved module of fear. **Current Directions in Psychological Science**, v. 12, n. 1, p. 5–9, 2003.
- OLSZEWSKI, J. **The Thalamus of the Macaca Mulatta**: an Atlas for Use with the Stereotaxic Instrument. [S.l.]: S. Karger, 1952.
- PAXINOS, G. *et al.* **The Marmoset Brain in Stereotaxic Coordinates**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012.
- PERRY, V. H.; OEHLER, R.; COWEY, A. Retinal ganglion cells that project to the dorsal lateral geniculate nucleus in the macaque monkey. **Neuroscience**, v. 12, n. 4, p. 1101–1123, 1984.
- PESSOA, L.; ADOLPHS, R. Emotion processing and the amygdala: From a “low road” to “many roads” of evaluating biological significance. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 11, p. 773-783, 2010.

PREUSS, T. M. Evolutionary Specializations of Primate Brain Systems. *In*: RAVOSA, M. J.; DAGOSTO, M. (ed.). **Primate Origins: Adaptations and Evolution**. Boston: Springer, 2007. p. 625-675.

PREUSS, T. M.; STEPNIIEWSKA, I.; KAAS, J. H. Movement representation in the dorsal and ventral premotor areas of owl monkeys: a microstimulation study. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 371, n. 4, p. 649–676, 1996.

RAFAL, R. D. *et al.* Connectivity between the superior colliculus and the amygdala in humans and macaque monkeys: virtual dissection with probabilistic DTI tractography. **Journal of Neurophysiology**, v. 114, n. 3, p. 1947-1962, 2015.

RAJMOHAN, V.; MOHANDAS, E. The limbic system. **Indian Journal of Psychiatry**, v. 49, n. 2, p. 132–139, 2007.

RAMÓN Y CAJAL, S. **Manual de histología normal y de técnica micrográfica**. Valencia: Librería de Pascual Aguilar, 1884.

RASMUSSEN, D. T. The origin of primates. *In*: HARTWIG, W. C. (ed.). **The Primate Fossil Record**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. p. 5-10.

RAVIOLA, E.; MAZZARELLO, P. The diffuse nervous network of Camillo Golgi: facts and fiction. **Brain Research Reviews**, v. 66, n. 1–2, p. 75–82, 2011.

ROBINSON, D. L.; PETERSEN, S. E. The pulvinar and visual salience. **Trends in Neurosciences**, v. 15, p. 127-132, 1992.

ROMANSKI, L. M. *et al.* Topographic organization of medial pulvinar connections with the prefrontal cortex in the rhesus monkey. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 379, n. 3, p. 313–332, 1997.

ROSS, C. F.; WALL, C. E. Mammalian feeding and primate evolution: An overview. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 112, n. 4, p. 449–453, 2000.

SAFA, A.; SULTANA JIME, J.; SHAHEL, F. Cholera toxin phage: structural and functional diversity between *Vibrio cholerae* biotypes. **AIMS Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 144–151, 2020.

SAH, P. *et al.* The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 803–834, 2003.

SALEEBA, C. *et al.* A student's guide to neural circuit tracing. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, art. 897, 2019.

SALEEM, K. S. *et al.* The Subcortical Atlas of the Marmoset ("SAM") monkey based on high-resolution MRI and histology. **Cerebral Cortex**, v. 34, n. 4, 2024.

SANTANA, N. N. M. *et al.* Retinorecipient areas in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): An image-forming and non-image forming circuitry. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 17, 2023.

SAWADA, K. *et al.* Fetal sulcation and gyrification in common marmosets (*Callithrix jacchus*) obtained by *ex vivo* magnetic resonance imaging. **Neuroscience**, v. 257, p. 158–174, 2014.

SCHETTINO, L. F. *et al.* Hand preshaping in Parkinson's disease: effects of visual feedback and medication state. **Experimental Brain Research**, v. 168, p. 186–202, 2006.

SCHIEL, N.; SOUTO, A. The common marmoset: An overview of its natural history, ecology and behavior. **Developmental Neurobiology**, v. 77, n. 3, p. 244–262, 2017.

SCHMUED, L.; KYRIAKIDIS, K.; HEIMER, L. In vivo anterograde and retrograde axonal transport of the fluorescent rhodamine-dextran-amine, Fluor-Ruby, within the CNS. **Brain Research**, v. 526, n. 1, p. 127–134, 1990.

SCHRAGO, C. G. On the time scale of new world primate diversification. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 132, p. 344–354, 2007.

SCHWAB, M. E.; JAVOY-AGID, F.; AGID, Y. Labeled wheat germ agglutinin (WGA) as a new, highly sensitive retrograde tracer in the rat brain hippocampal system. **Brain Research**, v. 152, n. 1, p. 145–150, 1978.

SEABROOK, T. A. *et al.* Architecture, function, and assembly of the mouse visual system. **Annual Review of Neuroscience**, v. 40, p. 499–538, 2017.

SNYDER, L. H.; CALTON, J. L.; DICKINSON, A. R.; LAWRENCE, B. M. Eye-hand coordination: Saccades are faster when accompanied by a coordinated arm movement. **Journal of Neurophysiology**, v. 87, n. 5, p. 2279–2286, 2002.

SOARES, S. C. *et al.* Fast detector/first responder: interactions between the superior colliculus-pulvinar pathway and stimuli relevant to primates. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, art. 67, 2017.

SOLOMON, S. G.; ROSA, M. G. P. A simpler primate brain: The visual system of the marmoset monkey. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 8, art. 96, 2014.

SOOKSAWATE, T. *et al.* Organization of GABAergic inhibition in the motor output layer of the superior colliculus. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, p. 421–432, 2011.

SPORNS, O.; TONONI, G.; KÖTTER, R. The human connectome: A structural description of the human brain. **PLoS Computational Biology**, v. 1, n. 4, e42, 2005.

STEPNIEWSKA, I. The pulvinar complex. *In*: KAAS, J. H.; COLLINS, C. E. (ed.). **The Primate Visual System**. New York: CRC Press, 2004. p. 53–80.

STEPNIEWSKA, I.; KAAS, J. H. Architectonic subdivisions of the inferior pulvinar in New World and Old World monkeys. **Visual Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 1043–1060, 1997.

STEPNIEWSKA, I.; QI, H.-X.; KAAS, J. H. Projections of the superior colliculus to subdivisions of the inferior pulvinar in New World and Old World monkeys. **Visual Neuroscience**, v. 17, n. 4, p. 529–549, 2000.

STRENGE, H. The functional significance of the pulvinar. **Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie**, v. 46, p. 491-507, 1978.

SUMNER, P.; MOLLON, J. D. Catarrhine photopigments are optimized for detecting targets against a foliage background. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 13, p. 1963-1986, 2000.

SUSSMAN, R. W. Primate origins and the evolution of angiosperms. **American Journal of Primatology**, v. 23, p. 209-223, 1991.

THOMAS, C. *et al.* Anatomical accuracy of brain connections derived from diffusion MRI tractography is inherently limited. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 46, p. 16574–16579, 2014.

TOOTELL, R. B. *et al.* Functional organization of the second cortical visual area in primates. **Science**, v. 220, n. 4598, p. 737–739, 1983.

TROJANOWSKI, J. Q.; GONATAS, J. O.; GONATAS, N. K. Horseradish peroxidase (HRP) conjugates of cholera toxin and lectins are more sensitive retrogradely transported markers than free HRP. **Brain Research**, v. 231, n. 1, p. 33–50, 1982.

UGOLINI, G. Specificity of rabies virus as a transneuronal tracer of motor networks: transfer from hypoglossal motoneurons to connected second-order and higher order central nervous system cell groups. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 356, n. 3, p. 457–480, 1995.

VAN HEYNINGEN, W. E. Gangliosides as membrane receptors for tetanus toxin, cholera toxin and serotonin. **Nature**, v. 249, n. 5456, p. 415–417, 1974.

VEALE, R.; TAKAHASHI, M. Pathways for Naturalistic Looking Behavior in Primate II. Superior Colliculus Integrates Parallel Top-down and Bottom-up Inputs. **Neuroscience**, v. 545, p. 86–110, 2024.

VUILLEUMIER, P. *et al.* Neural response to emotional faces with and without awareness: event-related fMRI in a parietal patient with visual extinction and spatial neglect. **Neuropsychologia**, v. 40, p. 2156–2166, 2002.

WALLER, A. V. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. **Edinburgh Medical and Surgical Journal**, Edinburgh, v. 76, n. 189, p. 369-376, 1851.

WEI, P. *et al.* Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway. **Nature Communications**, v. 6, art. 6756, 2015.

WEISKRANTZ, L. Blindsight revisited. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, n. 2, p. 215–220, 1996.

WHITE, J. G. *et al.* The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 314, n. 1165, p. 1–340, 1986.

WONG-RILEY, M. T. *et al.* Effect of retinal impulse blockage on cytochrome oxidase-poor interpuffs in the macaque striate cortex: quantitative EM analysis of neurons. **Journal of Neurocytology**, v. 23, n. 9, p. 533–553, 1994.

WURTZ, R. H.; GOLDBERG, M. E. **The Neurobiology of saccadic eye movements**. Reviews of Oculomotor Research. Amsterdam: Elsevier, 1989.

YU, W. S. *et al.* Neuroprotective effects and therapeutic potential of transcorneal electrical stimulation for depression. **Cells**, v. 10, n. 9, 2021. DOI: 10.3390/cells10092492.

ZAMUDIO, K. R.; GREENE, H. W. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 62, p. 421-442, 1997.

Apêndice A – Protocolo Cirurgia Infusão dos Traçadores em Mico

Protocolo Operacional Padrão (POP) - Cirurgia Estereotáxica em *Callithrix sp.*

Projeto: Co-Localização de entradas tectais e neurônios pulvinares projetados para a amígdala.

Objetivo: Infusão de traçadores neuroanatômicos.

1. Checklist Pré-Operatório e Segurança

Antes de iniciar qualquer procedimento, é mandatório realizar as seguintes verificações:

- Conferir disponibilidade dos fármacos e realizar os cálculos das doses.
- Confirmar se todo o material cirúrgico foi devidamente autoclavado.
- Testar o funcionamento de: Dremel, centrífuga, aparelho de barbear, seringas Hamilton e bomba de infusão.
- Para eutanásia de emergência:
 - Transportar para o local da cirurgia: 160 mL de PBS e 200 mL de Formol + Agulha scalp
 - Estoque de Segurança: Certificar-se de que permaneça na geladeira do laboratório um volume mínimo de 100 mL de PBS e 200 mL de Formol.

2. Materiais

| Instrumentação Cirúrgica | Fármacos e Soluções | Equipamentos e Consumíveis |
|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Kit Cirúrgico Completo | Quetamina e Dexmedetomidina | Estereotáxico para sagui |
| Cabo para bisturi e lâmina | Isoflurano | Bomba de infusão |

| | | |
|--|--------------------------------------|---------------------------------|
| Pinça dente de rato | Lidocaína (Líquida e Gel) | Seringa Hamilton |
| Pinça sem dentes | Tramadol | Máquina Dremel e Brocas |
| Fórceps e Hemostática | Meloxicam | Tricotomizador (Aparador) |
| Tesoura pequena | Ceftriaxona sódica | Agulhas e Seringas diversas |
| Tesoura reta | Propofol | EPI (Jaleco, Máscara, Luva) |
| Kit de sutura | Água Destilada e Água Oxigenada | Algodão, Cotonete, Papel Toalha |
| | Álcool 70% | Caneta marcadora |
| Traçadores | PBS e Formol (Emergência) | |
| Subunidade B da Toxina da Cólera (CTB) | Soro Fisiológico e Lactato de Ringer | |
| <i>Fluoroemerald</i> | | |

3. Procedimentos Pré-Cirúrgicos

3.1. Planejamento (Dias Anteriores)

1. Realizar visita ao Centro de Primatologia juntamente com o veterinário responsável para escolha do indivíduo que será utilizado na cirurgia.

2. Confirmar data e horário com o veterinário do Centro e com a anestesiolegista veterinária.
3. Separar todo o material no laboratório e realizar o transporte para o Centro de Primatologia, utilizando a checklist para conferência final.

3.2. Preparação do Ambiente (Dia da Cirurgia)

1. Chegar no Centro de Primatologia com antecedência ao horário agendado.
2. Separar os materiais e esterilizar o que ainda precisar.
3. Limpar a bancada e o aparelho estereotáxico com Álcool 70%.
4. Instalar o sistema de infusão, esterilizar a seringa Hamilton e zerar as coordenadas do aparelho estereotáxico, anotando o zero intra auricular.

4. Procedimento Cirúrgico

1. Capturar o animal e transportá-lo à sala de cirurgia.
2. Anestésiar o indivíduo inicialmente com isoflurano.
3. Administrar a associação de Quetamina (15 mg/kg) e Dexmedetomidina (0,01 mg/kg), via intramuscular.
4. Realizar tricotomia e assepsia na coxa ou na cauda para cateterismo, visando repiques anestésicos (Propofol/Quetamina), a critério da anestesista.
5. Realizar a tricotomia da cabeça.
6. Aplicar lidocaína gel nos canais auditivos.
7. Fixar o animal no aparelho estereotáxico.
8. Administrar analgésico e antiinflamatório, Tramadol (2 mg/kg) e Meloxicam (0,2 mg/kg), via intramuscular.
9. Desinfetar a área de incisão e aplicar a lidocaína líquida subcutânea, de maneira a formar uma bolha de lidocaína no escalpo.
10. Realizar incisão no escalpo e craniotomia unilateral sobre as coordenadas do Colículo Superior (CS) e da Amígdala*.

*Para realizar a craniotomia sobre a amígdala é necessário a realização da retração do músculo.

11. Infusão de CTB na Amígdala.

12. Infusão de *Fluoroemerald* no Colículo Superior (CS).

13. Realizar a sutura da incisão.

14. Ao final do procedimento organizar a mesa cirúrgica, lavar e autoclavar o instrumental utilizado.

5. Manejo Pós-Cirúrgico

A responsabilidade pelos procedimentos de analgesia pós-cirúrgica é do estudante. Deve-se coordenar com os cuidadores o auxílio na captura do animal para administração.

Duração do Tratamento: 3 dias após a cirurgia.

| Período | Protocolo Medicamentoso |
|----------------------|--|
| Manhã (08:00) | <ul style="list-style-type: none"> • Analgesia: Dipirona e Tramadol • Anti-inflamatório: Meloxicam • Antibiótico: Ceftriaxona sódica |
| Tarde (18:00) | <ul style="list-style-type: none"> • Analgesia: Dipirona e Tramadol • Anti-inflamatório: Meloxicam |

Apêndice B – Protocolo Eutanásia e Preparo do Tecido para Histologia

Protocolo Operacional Padrão (POP) - Eutanásia, Perfusão e Processamento de Tecido em *Callithrix sp.*

1. Observações

- **Estoque de Emergência:** Certificar-se de que permaneça no laboratório uma reserva mínima de 100 mL de PBS e 200 mL de Formol.
- **EPIs:** Uso obrigatório de luvas e jaleco durante todo o procedimento de perfusão e manipulação de reagentes.

2. Materiais

Itens necessários para a execução da eutanásia e processamento do tecido:

| Instrumentais e Equipamentos | Soluções e Fármacos | Consumíveis |
|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Bomba de infusão | Tiopental Sódico | Seringas de 20mL (x2) |
| Balança de precisão | PBS (160mL/animal) | Scalp tipo borboleta 27G |
| Tesoura de ponta e Tesoura reta | Formol 4% (200mL/animal) | Pote de coleta (50mL) |
| Pinça dente de rato e Hemostática | Paraformaldeído (PFA) | Saco de descarte branco |
| Alicate para craniotomia | NaOH (1 M) e HCl (0,1 M) | Filtro (ex: café) |

| | | |
|------------------------------|------------|-------------------------|
| Espátula | Sacarose | Papel alumínio e Caneta |
| "Rabo Quente" ou Micro-ondas | Isopentano | Pote de coleta |
| Becker, Proveta e Bailarina | Isoflurano | |

3. Procedimento de Eutanásia e Perfusão

1. Arrumar a bancada com todos os materiais listados e pesar o animal.
2. Sedar o animal com Isoflurano
3. Administrar Tiopental Sódico na dose de 500mg/kg via intraperitoneal (i.p.).
4. Enquanto o anestésico faz efeito, aquecer 160 mL de PBS à 30-35°C (aprox. 20 segundos no micro-ondas).
5. Testar reflexos para confirmar a anestesia profunda.
6. Realizar incisão em no peito até expor a cavidade peritoneal, cortar o diafragma e expor o coração. Cortar as laterais da caixa torácica e suspender o esterno (com hemostática ou pinça) para visualização total do coração.
7. Configurar a bomba de infusão utilizando seringa de 20mL com diâmetro de 72 mm, volume de 20 mL (20000 µL) e taxa de fluxo de 10 mL/min (10000 µL/min).
8. Preencher o scalp com o PBS aquecido (evitando bolhas) e inseri-lo no ápice do ventrículo esquerdo. Cortar o átrio direito imediatamente para permitir a saída do sangue/fluídos.
9. Iniciar a bomba injetando 8 seringas de 20mL de PBS (total 160mL) para lavagem. Em seguida, trocar para o fixador e injetar 8 seringas de 20mL de Formol 4% gelado (4°C).
10. Decapitar o animal, remover a pele e realizar a craniotomia cuidadosa com alicates para retirada do encéfalo íntegro.

4. Pós-Fixação e Criopreservação

Os cérebros removidos devem ser pós-fixados em Formol 4% por no mínimo 24h antes de iniciar o processo de sacarose.

Protocolo de Gradiente de Sacarose (10% - 20% - 30%)

Os tecidos devem ser transferidos sequencialmente conforme afundam nas soluções.

Certificar-se de cobrir 100% do tecido no pote de coleta com a solução.

5. Congelamento Rápido de Tecido

Após o tecido afundar na solução de sacarose 30%, proceder ao congelamento.

1. Preparar pedaços de papel alumínio devidamente identificados com caneta permanente.
2. Levar encéfalos (no tubo), pinça, Becker vazio e luvas para o freezer -80°C.
3. Colocar Isopentano no Becker (suficiente para cobrir totalmente o tecido).
4. Remover o encéfalo do tubo de sacarose e mergulhar o tecido por 20 segundos no Isopentano.
5. Retirar com pinça e embrulhar imediatamente no papel alumínio identificado.
6. Colocar os tecidos embrulhados dentro de um recipiente adequado (também identificado) e manter a -80°C.
7. Retornar o isopentano para o frasco original com cuidado e fechar bem.

Formol 4% (Paraformaldeído)

Este procedimento deve ser realizado previamente para garantir que o fixador esteja gelado (4°C) no momento da perfusão.

Materiais para 1 Litro:

- PBS 0,01 M: 1000 mL (800 mL para aquecimento inicial + q.s.p.).
- Paraformaldeído (PFA): 40 gramas.

Passo a passo:

1. Em um Becker de 1 L, adicionar 800mL de PBS e aquecer a **60°C** (monitorar rigorosamente para não ultrapassar essa temperatura).
2. Adicionar 40g de PFA.
3. Com a bailarina ligada (agitação), adicionar lentamente gotas de NaOH 1M até a solução clarear e o PFA dissolver completamente.
4. Aguardar esfriar, filtrar a solução e completar o volume até 1 L com PBS.
5. Ajustar o pH para 6,9 utilizando HCl diluído.
6. Armazenar em garrafa na geladeira (4°C).

Solução Antifreezing

Solução crioprotetora para armazenamento de longo prazo de cortes ou tecidos.

Materiais e Reagentes (Para 800 mL de solução final):

| Componente | Quantidade |
|---|------------|
| PBS 0.01M | 320 mL |
| Etilenoglicol | 240 mL |
| Glicerol | 240 mL |
| Fosfato de sódio monobásico $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (137,99 g/mol) | 1,256 g |
| Fosfato de sódio dibásico Na_2HPO_4 (141,96 g/mol) | 4,36 g |

Passo a passo:

1. Em um Becker de 1 L, adicionar os 320 mL de PBS.
2. Adicionar os fosfatos (monobásico e dibásico) e dissolver com auxílio da bailarina magnética.
3. Transferir a mistura para a garrafa de armazenamento (1 L).
4. Adicionar os 240 mL de Etilenoglicol.
5. Adicionar os 240 mL de Glicerol.

6. Misturar bem a solução (pode ser feito na própria garrafa) e armazenar na geladeira (4°C).

Sacarose

1. Adicionar 400 mL de PBS em um Becker.
2. Adicionar a massa de sacarose correspondente (ver tabela).
3. Completar com PBS até 500 mL e misturar na bailarina até homogeneizar.

| Etapa | Concentração | Quantidade de Sacarose (p/ 500mL PBS) | Tempo Estimado |
|--------------|---------------------|--|--------------------------|
| 1 | Sacarose 10% | 50 g | ~ 1 dia (até afundar) |
| 2 | Sacarose 20% | 100 g | ~ 1 dia (até afundar) |
| 3 | Sacarose 30% | 150 g | 2 a 3 dias (até afundar) |

Apêndice C – Protocolo de Imunofluorescência

Protocolo Operacional Padrão (POP) - Imunofluorescência em Tecido *Free-Floating*

Padronização do procedimento de imunofluorescência para detecção de traçadores neuroanatômicos (CTB e Fluoroemerald) em cortes de tecido cerebral.

- DAPI é possivelmente mutagênico, utilize EPI.

1. Materiais

| Instrumentais e Equipamentos | Soluções e Reagentes | Consumíveis |
|-------------------------------------|--|---------------------------------|
| Mesa agitadora | PBS | Placas de cultura 12 poços |
| Geladeira (4°C) | PBS-T (PBS + Triton X-100 0,3%) | Ponteiras e Micropipetas |
| Pinça fina | Soro de Asno (Normal Donkey Serum) | Papel Alumínio |
| Pincel | Anticorpos Primários (Anti-FE, Anti-CTB) | Lâminas de vidro |
| | Anticorpos Secundários (Alexa 488, 594) | Lamínulas |
| | DAPI (10ug/ml) | Meio de montagem (Glicerol/PPD) |
| | Esmalte | |

Procedimento - Dia 1: Lavagem, Bloqueio e Primário

1. Retirar os cortes armazenados e transferir para a placa de poços contendo PBS.
2. Deixar em PBS por 15 minutos para hidratação e aclimatação à temperatura ambiente.
3. Lavar em PBS (2X5 minutos/80 RPM) para remoção do *antifreezing*.
4. Incubar na Solução de Bloqueio (90 minutos/80 RPM) para permeabilização e bloqueio de sítios inespecíficos.
5. Preparar a solução de Anticorpos Primários (Anti-CTB e Anti-FE) diluídos em Solução de Bloqueio 1:5 em PBS (ver tabela de diluição).
6. Incubar os cortes na solução de anticorpos primários por 48 horas a 4°C (na geladeira), sob agitação suave, se possível.

Procedimento - Dia 3: Secundário, DAPI e Montagem

Nota: A partir da etapa de adição do secundário, manter as amostras protegidas da luz.

1. Retirar a solução de anticorpo primário.
2. Lavar os cortes em PBS (5 vezes de 5 minutos) sob agitação a 80 RPM.
3. Incubar na solução de Anticorpos Secundários (Anti-Bode Alexa 488 e Anti-Coelho Alexa 594) diluídos em Solução de Bloqueio 1:5 em PBS, por 90 minutos à temperatura ambiente, sob agitação reduzida a 40 RPM.
4. Lavar os cortes em PBS (5X5 minutos) sob agitação.
5. Incubar com DAPI (10ug/ml) por 20 minutos sob agitação a 80 RPM para marcação nuclear.
6. Lavar os cortes em PBS (5X5 minutos) para remoção do excesso de DAPI.
7. Montar os cortes em lâminas silanizadas, utilizando pincel e PBS para deixar o tecido alinhado e sem dobras
8. Deixar as lâminas secarem em temperatura ambiente, protegidas da luz, por 30 a 60 minutos (até o tecido aderir, mas não secar completamente).

9. Pingar o Meio de Montagem (Glicerol tamponado com PPD) sobre o tecido e cobrir com lamínula, evitando bolhas.
10. Selar as bordas da lamínula com esmalte e armazenar a lâmina na horizontal em geladeira (4°C), protegida da luz.

Solução de Bloqueio (5 mL)

Mistura utilizada para bloquear ligações inespecíficas e permeabilizar a membrana.

Materiais:

- Soro de Asno (Sigma-Aldrich #D9663): 500 µL.
- PBS-T (PBS + 0,3% Triton X-100): 4500 µL.

Passo a passo:

1. Misturar os componentes em um tubo tipo Falcon ou Eppendorf grande.
2. Homogeneizar suavemente (inversão).

Nota: Para diluição de anticorpos, utilizar esta solução diluída 1:5 em PBS.

Tabela de Anticorpos e Diluições

| Tipo | Anticorpo | Hospedeiro | Alvo/Conjugado | Fabricante | Diluição |
|-------------------|-------------|------------|--------------------------|------------------------------|----------|
| Primário | Anti-FE | Bode | FITC (Fluoroemerald) | Invitrogen #PA1- 26793 | 1:1000 |
| Primário | Anti-CTB | Coelho | CTB (Cholera Toxin B) | Invitrogen #BS- 12862R | 1:500 |
| Secundário | Anti-Goat | Asno | Alexa Fluor 488 | Invitrogen #A-11055 | 1:2000 |
| Secundário | Anti-Rabbit | Asno | Alexa Fluor 594 | Invitrogen #A-21207 | 1:1500 |

Meio de Montagem com PPD

Solução *anti-fade* para preservar a fluorescência.

Materiais:

- Glicerol: 9 partes.
- PBS: 1 parte.
- p-Fenilenodiamina (PPD): 0,1% (1 g/L).

Passo a passo:

1. Dissolver o PPD na mistura de Glicerol e PBS. *Atenção: O PPD oxida facilmente e escurece; a solução deve ser levemente amarelada ou transparente. Se estiver marrom escuro, descartar.*
2. Armazenar em alíquotas a -20°C, protegido da luz.

Apêndice D – Protocolo de Histoquímica

Protocolo Operacional Padrão (POP) - Coloração de Nissl com Cresil Violeta

1. Observações

Antes de iniciar o procedimento, é mandatório realizar as seguintes verificações:

- Utilizar lâminas gelatinizadas. O uso de lâminas silanizadas não é recomendado, pois tivemos muitos problemas com elas não prenderem o corte adequadamente durante este processo, levando à perda do tecido.
- Clorofórmio e Xileno são tóxicos e voláteis. O manuseio deve ser realizado obrigatoriamente dentro da capela de exaustão.
- Verificar se o banho-maria está estabilizado entre 38-40°C antes de iniciar a etapa de coloração.

2. Materiais

Itens necessários para a execução da coloração:

| Instrumentais e Equipamentos | Soluções e Reagentes | Consumíveis |
|-------------------------------------|--|--|
| Microscópio óptico | Cresil violeta (pó) | Lâminas gelatinizadas com cortes |
| Banho-maria (38-40°C) | Clorofórmio | Lamínulas |
| pHmetro | Etanol (100%, 95%, 70%, 50%, 25%, 10%) | Papel filtro |

| | | |
|-----------------------------|------------------------------------|---|
| Cubetas de vidro (Baterias) | Xileno (Xilol) | Meio de montagem (Verniz) |
| Capela de exaustão | Ácido Acético Glacial | Pipetas Pasteur |
| Suporte para lâminas | Acetato de Sódio (0.2M) | Becker e Provetas |
| Estufa (opcional) | Água destilada (dH ₂ O) | Alúmen de Cromo e Gelatina (p/ lâminas) |

Procedimento - Dia 1: Desengorduramento

1. Preparar uma solução 1:1 (50:50) contendo Etanol 100% e Clorofórmio dentro da capela de exaustão.
2. Mergulhar as lâminas com o tecido nesta solução.
3. Manter as lâminas imersas *overnight* para desengorduramento do tecido.

Procedimento - Dia 2: Coloração

1. Retirar as lâminas da solução de desengorduramento e limpar rapidamente em Etanol 100%.
2. Colocar as lâminas em Xileno por 3 horas.
3. Transferir para Etanol 100% (Banho 1) por 5 minutos. *Não reutilizar este álcool na etapa 13.*
4. Transferir para Etanol 100% (Banho 2) por 5 minutos. *Não reutilizar este álcool na etapa 13.*
5. Transferir para Etanol 95% por 2 minutos. *Não reutilizar este álcool na etapa 13.*
6. Iniciar a reidratação passando as lâminas sequencialmente pelas seguintes soluções, 2 minutos cada:
 - o Etanol 70%
 - o Etanol 50%

- Etanol 25%
 - Etanol 10%
 - Água destilada
 - Água destilada
7. Retirar o excesso de água das lâminas (secagem leve das bordas).
 8. Mergulhar na solução de Cresil Violeta (previamente aquecida em banho-maria a 38-40°C).
 9. Manter na coloração por **8 a 12 minutos**. *Checar a intensidade da cor no microscópio na metade do tempo (aprox. 5 min) para ajustar se necessário.*
 10. Limpar o excesso de corante mergulhando em Água destilada.
 11. Iniciar a desidratação passando as lâminas sequencialmente pelas seguintes soluções, 1 minuto cada:
 - Etanol 10%
 - Etanol 25%
 - Etanol 50%
 - Etanol 70%
 12. Realizar a diferenciação em solução de Etanol 70% com Ácido Acético (preparo descrito no Apêndice). Controlar visualmente até que o fundo fique claro e os somas neuronais visíveis.
 13. Continuar a desidratação utilizando álcoois frescos (limpos), 5 minutos cada:
 - Etanol 95%
 - Etanol 100%
 - Etanol 100%
 14. Xilol por 5 minutos.
 15. Xilol por 5 minutos.
 16. Montar as lâminas com lamínula e verniz (meio de montagem).

Soluções

- Solução de Cresil Violeta 0.05%

Materiais:

- Violeta de Cresil (pó).
- Água destilada.
- Ácido Acético Glacial ou Acetato de Sódio 0.2M.
- Filtro de papel.

Passo a passo:

1. Dissolver o Cresil Violeta em água destilada para obter a concentração de 0.05%.
2. Filtrar a solução utilizando papel filtro.
3. Medir o pH da solução.
4. Ajustar o pH para 3,76 utilizando gotas de Ácido Acético Glacial ou Acetato de Sódio 0.2M.
5. Filtrar novamente a solução antes do uso.

- Solução de Diferenciação

Materiais:

- Etanol 70% (200 mL).
- Ácido Acético Glacial.

Passo a passo:

1. Separar 200 mL de Etanol 70% em um recipiente.
2. Adicionar 4 a 6 gotas de Ácido Acético Glacial.
3. Misturar bem antes de usar na etapa de diferenciação.

- Gelatinização de Lâminas

Procedimento simples para revestir lâminas, garantindo a aderência de cortes histológicos.

Materiais:

- Gelatina incolor (5 g).
- Sulfato de Cromo e Potássio (Alúmen de Cromo) (0,5 g).
- Água destilada (1000 mL).
- Alguns cristais de Timol.
- Lâminas de vidro limpas.

Passo a passo:

1. Aquecer a água destilada a 60°C e dissolver a gelatina completamente sob agitação.
2. Adicionar o Alúmen de Cromo e misturar até dissolver.
3. Filtrar a solução ainda morna.
4. Mergulhar as lâminas limpas na solução (imersão e retirar suavemente, cerca de 3 a 5 vezes).
5. Deixar as lâminas secarem verticalmente em temperatura ambiente ou estufa (37°C) durante a noite, protegidas de poeira.

Apêndice E – Redução de Autofluorescência

Protocolos de Redução de Autofluorescência

Métodos independentes para redução de autofluorescência em tecidos biológicos.

Escolha o método adequado conforme a necessidade do tecido e etapa do processamento.

1. Observações

- Sudan Black B é tóxico e corante forte. Uso obrigatório de EPIs.
- Manipular soluções voláteis (Etanol) preferencialmente em capela.

Materiais Gerais:

- Agitador orbital (Shaker).
- Cubetas ou placas para incubação.
- PBS (Phosphate Buffered Saline).

Protocolo A: Glicina 0,3M (Bloqueio de Aldeídos)

Bloqueio de grupos aldeídos livres (fixação com paraformol/formol).

Timing: Antes da imunofluorescência (pode ser feito logo após a pós-fixação com o cérebro inteiro ou então antes da solução de bloqueio com o tecido já cortado).

- Preparo da Solução

- Solução Glicina 0,3M: Dissolver a Glicina (pó) em PBS na concentração molar de 0,3M.
- Procedimento
 1. Submergir o tecido (inteiro ou em cortes) na solução de Glicina 0,3M.
 2. Incubar sob agitação suave por: 1 hora (cérebro inteiro); 20 minutos (fatia).
 3. Lavar com PBS (3x de 5 minutos).
 4. Prosseguir com o protocolo normal (sacarose/bloqueio).

- **Protocolo B: Sudan Black B (Bloqueio de Lipofuscina)**

Mascaramento de autofluorescência de lipídios e lipofuscina.

Após o término da imunofluorescência (após a marcação nuclear), antes da montagem na lâmina.

- Preparo da Solução
- Solução SBB 0,1%: Dissolver 0,1g de Sudan Black B em 100mL de Etanol 70%.
- Proteger da luz (fotossensível) e agitar bem.
- Filtrar antes do uso para evitar precipitados.
- Procedimento
 1. Finalizar a última lavagem da imunofluorescência.
 2. Retirar o excesso de líquido das lâminas (não deixar secar).
 3. Cobrir o tecido com SBB 0,1%.
 4. Incubar por 5 minutos (ambiente, escuro).
 5. Realizar lavagens rápidas para remover excesso e reidratar:
 - Etanol 70%: 15 segundos.
 - Etanol 50%: 15 segundos.
 - PBS: 3x de 5 minutos.
 6. Montar o tecido na lâmina e depois cobrir com meio antifade.

Anexo A – Declaração de Aprovação do CEUA - UnB

Brasília, 22 de abril de 2024.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “Co-localização de entradas tectais nos neurônios pulvinares projetados para a Amígdala em micos-estrela (*Callithrix sp.*)”, SEI nº 23106.137976/2023-59, sob responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Rafael P. Souto Maior, (rsmaior@unb.br)**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Esse projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília na 212ª reunião ordinária, em **01/04/2024** para fins de **PESQUISA** e para utilização de **Callithrix penicillata ou jacchus (mico-estrela/saguí, 5 indivíduos independentemente de sexo)** provenientes do(a) Centro de Primatologia-UnB.

O presente certificado é válido pelo período de **22/04/2024 a 30/12/2025**.



Dr. Bruno Stéfano Lima Dallago
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.