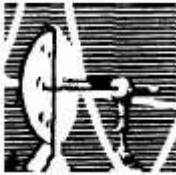


RENATA FIGUEIREDO ANOMAL

A evolução do sistema somato-motor dos mamíferos e o amálgama sensório-motor do gambá *Didelphis aurita*.

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009

UFRJ/2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Renata Figueiredo Anomal

A evolução do sistema somato-motor dos mamíferos e o amálgama sensório-motor do gambá *Didelphis aurita*.

Volume 1 (único)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências biológicas (Fisiologia).

Orientador: Dr. João Guedes da Franca

Rio de Janeiro
2009

**A EVOLUÇÃO DO SISTEMA SOMATO-MOTOR DOS MAMÍFEROS E O
AMÁLGAMA SENSORIO-MOTOR DO GAMBÁ *DIDELPHIS AURITA*.**

Renata Figueiredo Anomal

Orientador: Prof. João Guedes da Franca

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências

Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Aprovada por:

Dr.(a) Leny Cavalcante

Dr.(a) Claudia Domingues Vargas

Dr.(a) Letícia Oliveira

Dr. Jean Cristophe Houzel

Dr. Mario Fiorani Jr.

Rio de Janeiro

Maio/2009

Anomal, Renata Figueiredo.

A Evolução do sistema somato-motor dos mamíferos e o amálgama sensório-motor do gambá *Didelphis aurita*/ Renata Figueiredo Anomal. Rio de Janeiro: UFRJ/ IBCCF, 2009.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro/ IBCCF, Programa de Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), 2009.

Orientador: João Guedes da Franca

1. Introdução, 2. Objetivos, 3. Materiais e Métodos, 4. Resultados, 5. Discussão, 6. Conclusão, Referências Bibliográficas. I. João Guedes da Franca, II. UFRJ/ IBCCF, III. A Evolução do sistema somato-motor dos mamíferos e o amálgama sensório-motor do gambá *Didelphis aurita*.

DEDICATÓRIA

“À Bianca e aos meus avós, Aloir Rodrigues e Zenetti Anomal.”

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos vão inicialmente à causa primária de todas as coisas e a oportunidade que a vida me permitiu de desenvolver este trabalho em circunstâncias tão especiais.

Agradeço a cada uma das experiências que passei ao longo minha estadia aqui no laboratório de Neurobiologia II, pois todas elas foram fundamentais para meu crescimento intelectual e interno.

Agradeço a todas as pessoas que fizeram parte deste período. Aquelas que já continuaram seu caminho em outros lugares, aquelas que ainda fazem parte deste grupo, aquelas que me acompanharam de perto e aquelas que contribuíram mais distantemente.

Em especial gostaria de citar minha família, pelo apoio que me ofertaram nestes cinco anos.

Agradeço à Bia, meu amor maior, que com certeza foi fundamental para que eu esteja concluindo meu trabalho.

Não posso esquecer dos meus amigos, Nanda e Brian, que praticamente fizeram comigo o doutorado, me ouvindo naqueles momentos de “Lei de Murf”. Agradeço também àqueles amigos que continuam sendo meus amigos, mesmo com tantas artigos para ler e experimentos para fazer.

Agradeço àqueles me abriram as portas para estar hoje aqui no Instituto e me ajudaram na minha formação, como a Vanessa Rocha, a Professora Eliane Volchan e o Professor João Franca.

Agradeço aos meus alunos Jorge Arigoni, Fabiana Santana e Fernanda Muniz pela ajuda. Que eles tenham levado um pouco do pensamento científico para sua vida.

Agradeço aos meus companheiros de jornada, com os quais dividi bons momentos, como Eliã Botelho, Carlomagno Bahia, Cristiane Ashidamini, Ghislain Saunier e Anaelli Campos.

Agradeço finalmente à todos que fizeram parte da nossa equipe, como o Luiz Bernardino, Paulo e seu Gervásio, pois suas contribuições foram muito importantes o desenvolvimento deste trabalho; assim como todos os componentes de outros laboratórios que me auxiliaram nos meus experimentos, como os professores Mário Fiorani e Jean Christopher Houzel.

Que todos as outras pessoas que estiveram conosco neste período da minha vida se sintam igualmente envolvidas com estes sinceros agradecimentos.

RESUMO

No presente trabalho estudamos o padrão de projeções talâmicas e corticais para o córtex parietal do gambá *Didelphis aurita* através de injeções de traçadores fluorescentes retrógrados nas áreas somestésicas primária (S1) e caudal (SC). Para caracterizar as bordas rostral e caudal de S1, as características eletrofisiológicas e arquitetônicas de S1 e SC também foram descritas no córtex parietal anterior desta espécie. A marcação celular retrógrada no córtex e no tálamo mostrou que S1 e SC apresentam padrões de conexão distintos entre si. A área S1 apresenta conexões intrínsecas e recebe projeções de outras áreas corticais somestésicas, tais como SR e SC. Projeções a partir das áreas somatossensorial secundária (S2) e parietal ventral (PV) foram raras. Por outro lado, a área SC recebe projeções corticais das áreas somestésicas, visuais, auditivas e do córtex frontal, sugerindo um processamento multimodal nesta região. As conexões talâmicas para a área S1 surgem do núcleo “somestésico” talâmico ventral basal (VB), e dos núcleos “motores” talâmicos ventral lateral (VL), ventral anterior (VA) e ventral medial (VM). A área SC também recebe projeções de VB, VL e VA, além de grupos talâmicos que não projetam para S1 (grupo posterior). As projeções talâmicas motoras para S1 e SC sugerem haver um processamento de informações cerebelares em ambas as áreas, sem necessariamente caracterizá-las como córtex motor. Este padrão de projeção observado no gambá *Didelphis aurita* pode representar a organização primordial do sistema sensorio-motor dos mamíferos, onde áreas envolvidas com o processamento multimodal e motor, tais como S1 e SC, poderiam ter originado as áreas sensorio-motoras observadas atualmente na maioria dos mamíferos existentes.

ABSTRACT

We studied the pattern of thalamic and cortical projections to the parietal cortex of the opossum *Didelphis aurita* using injection of fluorescent neurotracers into primary (S1) and caudal (SC) somatosensory areas. The electrophysiological and architectonic characteristics of these areas were also described in the anterior parietal cortex to define the rostral and caudal borders of S1. The retrogradely labeled neurons showed a distinct pattern of cortical projections in S1 and SC. S1 receives intrinsic projections and from adjacent somatosensory areas, such as SR and SC. The projections from the secondary (S2) and the ventral parietal (PV) somatosensory areas were sparse. On the other hand, SC receives projections from frontal, visual, auditory and somatosensory cortex. The thalamic connections to S1 arrive from the somatosensory ventral basal thalamic nucleus (VB) and from the ventral lateral (VL), ventral anterior (VA) and ventral medial (VM) motor thalamic nuclei. SC also receives projections from VB, VL, and VA. The motor thalamic projections to S1 and SC suggest that both areas participate in the processing of motor information. However, this last result does not affirm the existence of a primary motor area overlapped with S1. The organization of S1 and SC in *Didelphis aurita* opossum may represent the ancestral neocortical organization, where multimodal and motor primordial areas, such as S1 and SC, originated sensory-motor areas in most currently living mammals.

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1 Reconstruindo a evolução do neocórtex nos mamíferos	16
1.2 Áreas corticais topograficamente organizadas	21
1.3 Critérios de delimitação de áreas corticais	24
1.4 Plano comum de organização cortical dos mamíferos	26
1.5 Mudanças que podem ocorrer no encéfalo das diferentes espécies de Mamíferos	33
1.6 Hipótese do amálgama sensorio-motor	44
1.7 O Gambá <i>Didelphis aurita</i> como animal experimental	54
2. Objetivos	57
3. Materiais e métodos	58
3.1 Animais	58
3.2 Procedimentos gerais	59
3.3 Preparação pré-cirúrgica e anestesia	60
3.4 Procedimentos cirúrgicos	62
3.5 Registro eletrofisiológico	64
3.6 Injeção dos neurotraçadores	65
3.7 Perfusão, dissecação e achatamento	67
3.8 Criomicrotomia	68
3.9 Processamento Histológico	69
3.9.1 Cortes para análise em microscopia de fluorescência	69
3.9.2 Coloração de Nissl para análise da citoarquitetura	69
3.9.3 Impregnação da mielina pela prata e mieloarquitetura	70
3.9.4 Histoquímica para citocromo-oxidase e NADPH-diaforase	71
3.9.5 Imunohistoquímica para calbindina, parvalbumina	72
3.10 Análise e Documentação dos resultados	73
3.10.1 Plotagem das células marcadas pela fluorescência	73
3.10.2 Delimitação dos núcleos do tálamo	74
3.10.3 Delimitação das áreas corticais	74
3.10.4 Fotomicrografia	75
4. Resultados	76
4.1 Caracterização anátomo-funcional das áreas somestésicas do <i>Didelphis aurita</i>	76
4.1.1 Mieloarquitetura	79
4.1.2 Características eletrofisiológicas de S1, SR e SC	80
4.1.3 Projeções cortico-corticais para S1 e SC	90
4.1.4 Sumário das projeções cortico-corticais para S1 e SC	104
4.2 Caracterização anátomo-funcional do tálamo sensorio-motor	105
4.2.1 Subdivisões arquitetônicas do tálamo somestésico e motor do gambá	105
4.2.2 Projeções tálamo-corticais para S1 e SC	112
4.2.3 Sumário das aferências talâmicas para S1	124
4.2.4 Sumário das aferências talâmicas para SC	126
5. Discussão	131
5.1 O neocórtex e o comportamento do gambá	131
5.2 Delimitação dos núcleos talâmicos	133
5.2.1 Marcadores Histoquímicos	134
5.2.2 Marcadores Imunohistoquímicos	134
5.3 Mapeamento eletrofisiológico do córtex parietal anterior do gambá <i>Didelphis</i>	136

aurita	
5.4 Projeções cortico-corticais para S1 e SC	138
5.5 Projeções tálamo-corticais para S1	141
5.6 Projeções tálamo-corticais para SC	147
5.7 Hipótese do amálgama sensório-motor	148
5.8 Parcelamento Ebbessoniano e o aparecimento de novas áreas corticais	155
6. Conclusão	162
Referências Bibliográficas	164

LISTA DE SIGLAS

A1 – área auditiva primária
 AD – anterior dorsal
 Agl – córtex motor agranular lateral
 Agm – córtex agranular medial
 AIP – córtex intraparietal anterior
 AM – anterior medial
 AV – anterior ventral
 C – núcleo talâmico central
 CIN – núcleo central intralaminar
 CL – núcleo talâmico central lateral
 CM – área caudomedial
 CO – citocromo oxidase
 DAB – diamino benzidina
 DY – Diamidino-yellow
 FE – Fluoro-emerald
 FR – Fluoro-ruby
 Fr – córtex frontal
 HRP – peroxidase de raíz forte
 I.M. – via intramuscular
 I.P. – via intraperitoneal
 KFeCN – ferrocianeto de potássio
 Li – núcleo talâmico lateral intermédio
 Lid – núcleo talâmico lateral intermédio dorsal
 Liv- núcleo talâmico lateral intermédio ventral
 Lme – lâmina medular externa
 M ou M1 – área motora primária
 MD – núcleo talâmico medio dorsal
 MT – área visual temporal média-
 NaThioS – tiosulfato de sódio
 ONS – oxido nítrico sintase
 OR – Fissura orbital
 PA - córtex parietal anterior
 PC – núcleo talâmico paracentral
 PF – núcleo talâmico parafascicular
 PFP – núcleo talâmico parafascicular posterolateral
 PM - córtex paramarginal
 Po – núcleo talâmico posterior
 PV – núcleo paraventral
 R ou- campo rostral
 S1 – área somestésica primária
 S2 – área somestésica secundária
 SC – área somestésica caudal
 SG – núcleo supragenicolado
 SMA – área motora suplementar

SR – área somestésica rostral
ST – córtex estriado
V1 – área visual primária
V2 – área visual secundária
VA – núcleo ventral anterior
VM – núcleo ventral medial
VB – núcleo ventral basal
VII – vibrissa dois
VL – núcleo ventral lateral
VP – núcleo ventral posterior
VPS – núcleo ventral posterior superior
CL – núcleo central lateral
CM – núcleo central medial
DIP - núcleo talâmico dorsointermediário
DIVA – núcleo talâmico dorsal intermédio ventral anterior
PO – complexo posterior
VIA – núcleo ventrointermediário
VIM – núcleo talâmico ventrointermédio
VPL – núcleo talâmico ventral posterolateral
VPM – núcleo talâmico ventralmedial

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Cladograma mostrando a distribuição de uma característica “+” entre espécies existentes. Página 18.
- Figura 2. Árvore filogenética ilustrando a relação entre os campos corticais comuns entre os três grandes grupos dos mamíferos. Página 20.
- Figura 3. Organização do córtex somestésico em mamíferos: comparação entre o gambá (marsupial) e macaco da noite (primata). Página 29.
- Figura 4. Tipos de mudanças que ocorreram no neocórtex dos mamíferos. Página 34.
- Figura 5. Tamanho proporcional de sistemas sensoriais de três espécies com tamanho de neocórtex similar. Página 38.
- Figura 6. Magnificação cortical de partes do corpo importantes para o comportamento do animal. Página 38.
- Figura 7. Desenho esquemático de conversão e proliferação filogenética. Página 41.
- Figura 8. Modificação de conexões neurais. Página 46.
- Figura 9. Parcelamento de áreas e conexões corticais. Página 47.
- Figura 10. Hipótese do amalgama sensorio-motor. Página 48.
- Figura 11. Fotomicrografia das áreas sensoriais do gambá *Didelphis aurita* reveladas pela mieloarquitetura. Página 78.
- Figura 12. Proporção ocupada pelas áreas corticais no gambá *Didelphis aurita*. Página 79.
- Figura 13. Quantificação dos tipos de respostas somatossensoriais presentes nas áreas S1, SR e SC, em preparações anestesiadas. Página 82.
- Figura 14. Organização somatotópica da pata anterior de S1 (experimento 0602). Página 85.
- Figura 15. Organização somatotópica da pata anterior e da face de S1 (experimento 0629). Página 86.
- Figura 16. Organização somatotópica da pata anterior de S1 (experimento 0701). Página 89.
- Figura 17. Organização somatotópica da pata anterior de S1 (experimento 0705). Página 88.
- Figura 18. Fotomicrografia dos sítios de injeções e células marcadas. Página 94.
- Figura 19. Projeções cortico-corticais para área S1 (Caso 0602). Página 96.
- Figura 20. Projeções cortico-corticais para a área S1 (Caso 0705). Página 97.
- Figura 21. Projeções cortico-corticais para a área S1 (Caso 0705). Página 100.
- Figura 22. Projeções cortico-corticais para a área SC (Caso 0602). Página 101.
- Figura 23. Projeções cortico-corticais para a área SC (Caso 0705). Página 102.
- Figura 24. Projeções cortico-corticais para a área SC (Caso 0409). Página 106.
- Figura 25. Padrão de marcação das atividades enzimáticas de Citocromo-oxidase e NADPH-diaforase no tálamo. Página 107.
- Figura 26. Subdivisões talâmicas por imunohistoquímica para Calbindina e Parvalbumina. Página 108.
- Figura 27. Subdivisões talâmicas reveladas pelo método de Nissl. Página 114.
- Figura 28. Projeções tálamo-corticais para a área S1 (Caso 0602). Página 115.
- Figura 29. Projeções tálamo-corticais para a área S1 (Caso 0602). Página 116.
- Figura 30. Análise quantitativa das projeções talâmicas para a representação somatotópica de pata em S1 (Caso 0602) – injeções de FE e DY. Página 117.
- Figura 31. Projeções tálamo-corticais para a área S1 (Caso 0629). Página 118.
- Figura 32. Projeções tálamo-corticais para a área S1 (Caso 0629). Página 119.
- Figura 33. Sítios de injeção do caso 0629. Página 120.

- Figura 34. Análise quantitativa das projeções talâmicas para a representação somatotópica da pata em S1 (Caso 0629) – injeções de FE e DY. Página 121.
- Figura 35. Projeções tálamo-corticais para a área S1 (Caso 0705). Página 122.
- Figura 36. Projeções tálamo-corticais para a área S1 (Caso 0705). Página 123.
- Figura 37. Projeções tálamo-corticais para a área SC (Caso 0602). Página 127.
- Figura 38. Projeções tálamo-corticais para a área SC (Caso 0629). Página 128.
- Figura 39. Projeções tálamo-corticais para a área SC (Caso 0705). Página 129.
- Figura 40. Análise quantitativa das projeções talâmicas para a área SC. Página 130.
- Figura 41. Desenho esquemático das aferências corticais para as áreas S1 e SC. Página 143.
- Figura 42. Desenhos esquemáticos sobre hipóteses da evolução dos córtices S1 e M1 nos mamíferos. Página 151.
- Figura 43. Desenvolvimento dos mapas corticais. Página 158.
- Figura 44. O parcelamento de Ebbesson e as projeções tálamo-corticais do gambá *Didelphis aurita*. Página 162.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos procedimentos realizados em cada experimento. Página 60.

Tabela 2. Resumo dos resultados dos registros eletrofisiológicos e injeções de neurotraçadores. Página 81.

Tabela 3. Medidas da área SC. Página 90.

Tabela 4. Resumo das injeções de neurotraçadores. Página 92.

1. INTRODUÇÃO

Não raramente, observamos atletas e músicos superando expectativas ao mostrar habilidades sensório-motoras surpreendentes que claramente se diferem de alguns comportamentos estereotipados e simples de outros mamíferos. A diferença nas habilidades sensório-motoras entre as espécies de mamíferos ocorrem em parte, pela morfologia e fisiologia de cada espécie. No entanto, sabe-se que a organização do encéfalo e do neocórtex desempenham uma participação especial na execução e aperfeiçoamento destas habilidades (KAAS, 2008; KAAS, 2004).

O **neocórtex** é uma estrutura de seis camadas que cobre o encéfalo dos mamíferos e que está envolvida em uma série de funções complexas (*cf.* BRODMANN, 1909, pág. 17). Esta estrutura é considerada uma das características mais marcantes da evolução do encéfalo dos mamíferos e foi subdividida nos humanos e outros mamíferos por Brodmann (1909) em “órgãos de processamento” funcionalmente diferentes, chamados de **áreas corticais**. Cada área cortical, por sua vez, se conecta com outras áreas e com estruturas subcorticais, formando assim, os **sistemas corticais**. Sabe-se atualmente, que algumas áreas corticais do sistema somatossensorial possuem tanto funções somatossensoriais como motoras (KAAS e STEPNIEWSKA, 2002). A maneira como os sistemas sensoriais e motor interagem caracteriza a natureza das habilidades sensório-motoras de uma espécie de tal maneira, que podemos estimar suas capacidades conhecendo sua organização cortical (KAAS, 2008).

Estima-se, atualmente, que o encéfalo humano tenha mais de 200 áreas corticais, e que muitas destas áreas estariam envolvidas no processamento sensorial e motor (KAAS, 2008). Em contraste, acredita-se que as espécies ancestrais possuíam um encéfalo pequeno em relação ao

seu peso corporal, e aparentemente sistemas sensoriais e motores mais simples, composto de poucas áreas corticais (KRUBTIZER, 1995; KRUBITZER e KAAS, 2005; KAAS, 2008, 2004; CATANIA, 2005).

Mas como teria, então, o encéfalo alcançado diferentes níveis de complexidade ao longo da evolução? Embora esta seja uma pergunta difícil de se responder por completo, algumas respostas podem ser obtidas estudando-se os sistemas sensoriais e motor de mamíferos existentes e analisando fósseis ancestrais.

1.1 Reconstruindo a evolução do neocórtex nos mamíferos

Durante um determinado tempo, de 1880 a 1920, ocorreu uma intensa atividade da paleontologia interessada na evolução do cérebro (BUTLER e HODOS, 1996). Inicialmente, as informações obtidas através dos fósseis de mamíferos antigos, como área e volume encefálico, foram muito utilizadas para estudos evolutivos (BUTLER e HODOS, 1996). Entretanto, considerando somente fósseis do crânio, poucos subsídios são fornecidos para se entender a organização interna do encéfalo. Isto ocorre porque o cérebro não se fossiliza e as informações de interesse são obtidas indiretamente através das marcas deixadas na superfície interna do crânio, com pouca ou nenhuma informação acerca das suas conexões, arquitetura e organização cortical (KAAS, 2008; KAAS, 2002; KAAS e COLLINS, 2001a).

As primeiras tentativas de se reproduzir um modelo para o encéfalo do mamífero ancestral a partir das espécies existentes, utilizaram o critério **quase-filogenético** (CLARK, 1959; KAAS, 2002). Segundo este critério, as espécies são classificadas em níveis de complexidade, criando-se uma seqüência evolutiva de acordo com a presença de determinadas características encefálicas consideradas primitivas ou não (SMITH, 1924; CLARK, 1959). Entretanto, levando-se em

consideração que as espécies existentes não possuem características encefálicas unicamente primitivas ou unicamente derivadas, esta idéia de progressão no encéfalo em uma única direção – do simples para o mais complexo – não corresponde à realidade (KAAS, 2002).

A análise cladística é a alternativa mais confiável no estudo da evolução do encéfalo através da comparação das espécies existentes (KAAS, 2002), pois classifica os animais de acordo com suas relações filogenéticas, que são estabelecidas pela similaridade das características compartilhadas entre as espécies, agrupando-as em grupos taxonômicos. Neste sistema de análise, as espécies são ordenadas em um cladograma ou dendrograma e se encaixam em ramos (como em uma árvore), cada qual representando um grupo taxonômico ou uma espécie, explicitando as distâncias filogenéticas entre os grupos (KAAS, 2002).

Dois princípios elementares são usados na análise cladística: a *comparação dos grupos externos* e o *princípio da parcimônia*. As comparações feitas com grupos externos são realizadas entre espécies ou grupos distintos, sejam eles filogeneticamente distantes ou próximos (BUTLER e HODOS, 1996).

No princípio da parcimônia, as hipóteses geradas pela análise dos grupos ou espécies, são baseadas no menor número de transformações possíveis entre as espécies estudadas (BUTLER e HODOS, 1996). Assim, para investigarmos se uma determinada característica pertenceu ou não a uma suposta espécie ancestral, sua frequência entre os diferentes grupos taxonômicos é analisada. Seguindo o princípio da parcimônia, uma característica é dita homóloga entre as espécies, quando observada em todas ou na maioria das espécies estudadas em um grupo taxonômico. Esta característica é, então, considerada, **plesiomórfica**, pois, pelo princípio da parcimônia, teria sido mantida ao longo da evolução a partir da espécie ancestral (BUTLER e HODOS, 1996). Deve-se

levar em consideração que a hipótese mais simples e parcimoniosa provavelmente será a correta, mas ela não é uma garantia da melhor hipótese.

Observe a Figura 1 abaixo. Uma determinada característica “+” (a existência de uma área cortical, por exemplo) está presente nas espécies A, C e D, mas não em B. O princípio da parcimônia sugere que o ancestral comum de A e B possuiria a característica “+” (pois C e D a possuem) e que B a teria perdido no seu processo evolutivo. Mas é possível que este ancestral tenha apresentado esta característica e que a espécie subsequente tivesse perdido antes de B aparecer. Outra possibilidade, é que o ancestral de A e B não tivesse esta característica e A tivesse a desenvolvido independentemente. Note que estas últimas hipóteses sugerem um maior número de mudanças do que a primeira, considerada a mais parcimoniosa.

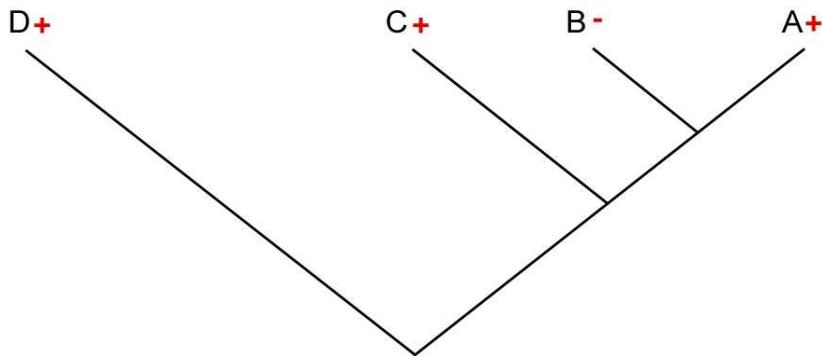


Figura 1. Cladograma mostrando a distribuição de uma característica “+” entre espécies existentes.

Conforme ilustra a Figura 2, as áreas corticais primárias, envolvidas com o processamento sensorial visual, auditivo e somestésico, estão presentes nos principais subgrupos dos mamíferos, como os marsupiais, euterianos ou placentários (roedores, primatas e carnívoros) e prototerianos (ornitorrinco e echidna) (KRUBITZER, 2007). Sugere-se então, segundo o princípio da parcimônia, que a presença destas áreas nos mamíferos existentes seja uma característica plesiomórfica, mantida nas espécies a partir do mamífero ancestral comum.

As características particulares de determinadas espécies, que não são amplamente distribuídas no cladograma, supostamente teriam surgido independentemente (ELDREDGE e CRACRAFT, 1980; WILEY, 1981). Este deve ser considerado um caractere **apomórfico**, pois é uma especialização que estava ausente no ancestral imediato.

Um problema frequentemente defrontado com o uso da análise cladística decorre dos procedimentos experimentais necessários para os estudos, que muitas vezes inviabilizam o uso de muitas espécies, permitindo conclusões que não refletem a evolução real de uma determinada estrutura (KAAS, 2002). Na prática, tem-se acesso a poucas espécies para a observação. Uma alternativa ao uso indiscriminado de numerosas espécies baseia-se na comparação de um número restrito de espécies escolhidas como representantes de um grupo taxonômico com base nos critérios “quase-filogenéticos” (KAAS, 2002).

A partir destes conhecimentos e conceitos básicos sobre o uso da análise cladística no estudo da evolução, iremos definir o que caracteriza uma área cortical, para em seguida mostrar

quais áreas corticais sensório-motoras provavelmente estariam presentes no mamífero ancestral e qual delas surgiram ou se perderam nas espécies ao longo do processo evolutivo dos mamíferos.

PLANO COMUM DE ORGANIZAÇÃO CORTICAL DOS MAMÍFEROS

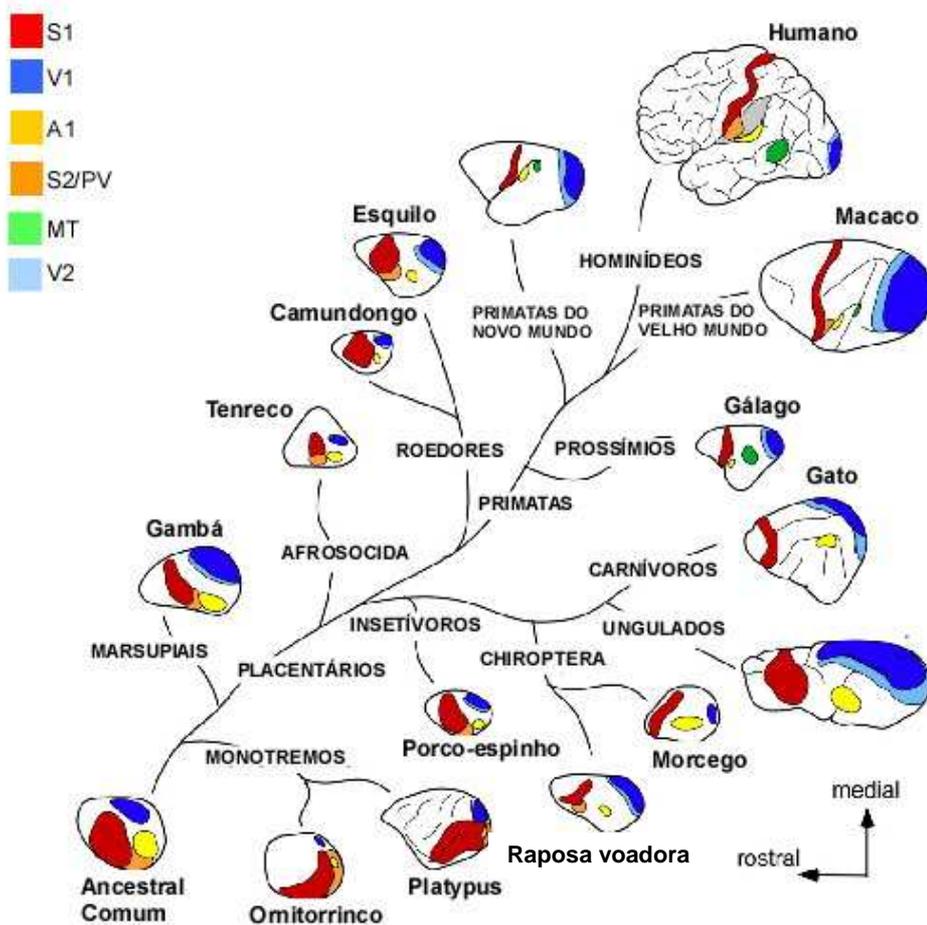


Figura 2. Árvore filogenética ilustrando a relação entre os campos corticais comuns entre os três grandes grupos dos mamíferos. Modificado de Krubitzer, 2007.

1.2 Áreas corticais topograficamente organizadas

As áreas corticais sensoriais podem possuir uma representação sistemática da superfície sensorial, assim como uma representação motora dos movimentos corporais. Esta representação é chamada de mapa cortical (KILLACKEY et al., 1995). Com relação a estes mapas, observamos, por exemplo, que existe uma forte correlação entre a periferia sensorial receptora e sua projeção para a região cortical correspondente, o que chamamos de organização topográfica (KILLACKEY et al., 1995). Nas organizações topográficas, as projeções a partir de um determinado grupo de receptores periféricos agrupam-se ordenadamente para a mesma região alvo no mapa cortical, e podem ser observadas nas projeções do tálamo para o córtex, nas projeções entre áreas corticais, ou entre o córtex a as estruturas subcorticais (KILLACKEY et al., 1995).

Observamos tal topografia nos mapas corticais retinotópicos ou visuotópicos (do sistema visual), tonotópicos (do sistema auditivo) e somatotópicos (do sistema somatossensorial) (KILLACKEY et al., 1995). Nestes mapas, pode ocorrer o processamento segregado de determinadas características do estímulo sensorial, tais como a localização espacial e submodalidades sensoriais (KAAS, 1997).

Inicialmente, vários autores acreditavam que a organização topográfica era de pouca significância para o processamento cortical e incompatível com as funções associativas exercidas pelo neocórtex (KAAS, 1997). Atualmente, predomina o princípio de que a topografia seja

necessária para a discriminação sensorial, pois a separação espacial da atividade dos neurônios dentro dos mapas topográficos seria importante para a localização e distinção de estímulos separados nas superfícies sensoriais (KAAS, 1997).

Os neurônios localizados na mesma região topográfica do córtex costumam se comunicar intensamente durante o processamento de uma informação sensorial ou motora (ALLMAN, 1999). A comunicação entre neurônios funcionalmente relacionados em um sistema não topograficamente organizado poderia resultar em conexões mais longas e densas do que nas organizações topográficas. Desta maneira, sugere-se que a organização das áreas corticais em mapas topográficos poderia também representar uma forma econômica para conectar neurônios com funções semelhantes (ALLMAN, 1999).

As primeiras demonstrações de mapas topográficos no córtex são antigas (ALLMAN, 1999). Em 1740, Emanuel Swedenborg observou que determinadas fibras surgiam dos órgãos sensoriais se conectavam indiretamente com o córtex, e que outras fibras surgiam do córtex e se direcionavam aos músculos do corpo (ALLMAN, 1999). Embora tenha sido ignorado, Swedenborg já sugeria em sua época a existência de uma organização topográfica para o córtex motor, com o controle dos músculos do pé localizado dorsalmente no córtex e dos músculos da face no córtex ventral (ALLMAN, 1999).

No entanto, as idéias subsequentes sobre as subdivisões corticais em módulos, propostos em 1810 por Franz Josef Gall e Johann Spurzheim, tornaram-se mais conhecidas (ALLMAN, 1999). Eles propuseram que o encéfalo seria feito de órgãos responsáveis por traços da personalidade, tais como: humor, concentração, benevolência e tenacidade. Esta teoria foi chamada por Spurzheim de frenologia (estudo da mente), e embora tenha sido largamente aceita

na época, não tinha apoio em nenhum dado experimental ou observação clínica (ALLMAN, 1999; STRIEDTER, 2005).

A identificação direta de um mapa topográfico no córtex só foi realizada em 1860 por John Hughlings em pacientes epiléticos (ALLMAN, 1999). Ele concluiu, com base em suas observações clínicas, que os músculos do corpo eram representados no encéfalo em uma região específica. Este mapa foi confirmado em 1870 pelos alemães Gustav Fritsch e Eduard Hitzig. Eles descobriram o córtex motor estimulando a superfície do encéfalo de um cachorro e observando os movimentos do corpo gerados por esta estimulação. Outros pesquisadores também contribuíram para a descrição de mapas motores em outros animais, como David Ferrier (responsável pela primeira publicação de um mapa cortical) (ALLMAN, 1999).

Os famosos trabalhos de Charles Sherrington, Oscar Vogt e Wilder Penfield foram pioneiros em descrever a magnificação das representações corticais da mão e face nos grandes macacos e humanos, mostrando que estas partes do corpo ocupam uma grande área no córtex motor (SCHIEBER, 2001; ALLMAN, 1999).

Posteriormente, em 1930, vieram os amplificadores eletrônicos e os osciloscópios permitindo o registro da atividade elétrica do córtex. Os primeiros registros eletrofisiológicos foram realizados por Edgar Adrian e Clinton Woosley, na região cortical adjacente ao córtex motor (ALLMAN, 1999). Eles nomearam esta região de córtex somatossensorial (soma em grego = corpo), pois ela era ativada por estimulação mecânica da superfície do corpo. A representação cortical de uma determinada região da superfície corporal era identificada pela sucessiva movimentação dos eletrodos pela superfície cortical. Na década de 70, Jon Kaas, Michael Merzenich e seus colaboradores identificaram pelo menos 4 mapas corticais representando a superfície corporal no córtex somatossensorial de primatas (ALLMAN, 1999).

Outros mapas corticais, desta vez relacionados ao sistema visual, foram descritos também no século XX. O primeiro mapa topográfico do córtex visual primário foi descrito pelo oftalmologista Tatsuji Inouye durante a primeira guerra mundial (ALLMAN, 1999). A organização topográfica deste mapa foi sugerida com base nos déficits visuais apresentados por soldados atingidos durante os combates. A região de maior representação cortical observada por Tatsuji foi a região central da retina, em detrimento da periferia retiniana (ALLMAN, 1999). Só na década de 1960, Jon Kaas e John Allman realizaram um mapeamento do córtex visual utilizando microeletrodos (de maior resolução espacial do que os eletrodos de superfície) e observaram que o sistema visual ocupa no córtex uma região mais extensa do que inicialmente observado e que era composto de muitas outras áreas corticais (ALLMAN, 1999).

1.2.1 Critérios de delimitação de áreas corticais

Conforme pudemos observar no item anterior, a identificação de mapas corticais pode ser realizada por diferentes métodos, incluindo registro eletrofisiológico e eletroestimulação, além de observações clínicas. É importante notar, que os critérios utilizados para a delimitação de uma área cortical e de um mapa cortical nem sempre apontam para um mesmo resultado. Cada método de subdivisão possui suas fraquezas e, por si só, pode não ser conclusivo para a demarcação de uma determinada área. Por isso, para se delimitar uma área cortical, vários métodos de estudo devem ser considerados (KAAS, 1983).

Inicialmente, a análise da arquitetura cortical era o principal método de delimitação de áreas corticais. Um dos estudos mais conhecidos neste campo foi realizado por Brodman, em 1909, no córtex cerebral de mamíferos de todas as ordens (*cf.* BRODMANN, 1909; STRIEDTER, 2005). No entanto, outros pesquisadores também descreveram a arquitetura de

áreas corticais em diferentes espécies e muitas divergências surgiram a respeito das bordas propostas por eles (KAAS, 1987). Comparar limites arquitetônicos entre espécies é uma tarefa difícil, visto que existe uma variação da morfologia cortical muito grande entre espécies distintas (*cf.* BRODMANN, 1909). Além disso, uma borda arquitetônica evidente para um pesquisador, pode ser considerada por outro pesquisador como uma variação dentro da área ou uma distorção provocada por um sulco. Outro problema evidente é que o neocórtex pode ser subdividido em vários campos funcionais, e que a análise arquitetônica evidencia apenas algumas destas bordas (KAAS, 1983).

Resolvendo este problema, as técnicas de registro e estimulação eletrofisiológica permitiram uma delimitação mais acurada das subdivisões corticais. No entanto, os primeiros experimentos de eletrofisiologia utilizaram somente eletrodos de superfície, que poucos detalhes revelavam sobre os mapas corticais (KAAS, 1983). As subdivisões corticais refinadas só puderam realmente ser compreendidas com o registro e estimulação cortical através de eletrodos mais finos (microeletrodos) do que os anteriores, e capazes de penetrar toda a espessura cortical.

Além disso, cada área cortical possui um padrão de projeções particular que pode ser observado através de técnicas neuroanatômicas. Estas técnicas podem ser utilizadas após a delimitação eletrofisiológica de uma área ou como técnica auxiliar na caracterização de uma área cortical através do conhecimento das suas conexões, conforme ocorrerá em nosso estudo (KAAS, 1983). A identificação do córtex visual primário (V1) é uníssona entre os diversos métodos de delimitação das áreas corticais. Por isso, os mesmos critérios usados para se delimitar V1 servem de referência para as demais áreas corticais (KAAS, 1983). Estes critérios incluem:

- 1) uma citoarquitetura distinta (com um padrão de organização celular único);
- 2) uma representação da metade contralateral da periferia (ou da superfície sensorial);

- 3) um padrão único de conexão com estruturas corticais e subcorticais;
- 4) um único tipo de processamento (sensorial) e
- 5) deficits específicos após lesão ou remoção da área em questão.

1.3 Plano comum de organização cortical dos mamíferos

Antes de compreender como e quais modificações ocorreram no encéfalo ao longo da evolução dos mamíferos, é preciso ter em mente as similaridades existentes entre as espécies até agora estudadas. As áreas corticais comuns aos três grandes ramos dos mamíferos (prototerianos, metaterianos e euterianos), provavelmente estiveram presentes no ancestral comum e fazem parte de um plano comum de organização cortical dos mamíferos (KAAS, 1983, 2004, 2008; KRUBITZER, 1995, 2007).

A existência de um plano básico cortical é uma característica importante na organização do neocórtex. Embora seja possível modificar o tamanho, número, forma e organização interna de algumas áreas corticais, os estudos de neurobiologia comparada sugerem que a eliminação completa de algumas áreas ou a formação de um novo plano não seria possível sem alterar outros eventos envolvidos na formação de outras áreas corticais (KRUBITZER, 1995). Um exemplo disso é a presença do córtex visual e da via retino-geniculo-cortical mesmo em mamíferos subterrâneos com visão quase inexistentes, como o rato topeira (KRUBITZER, 1995, 2007). Estes roedores possuem os olhos reduzidos e cobertos por uma pele, e seu sistema visual só é utilizado para funções circadianas (KRUBITZER, 2007).

Ao longo da extensão do neocórtex, campos de processamento sensorial específicos e um ou mais campos motores parecem estar presentes na maioria dos grupos dos mamíferos (KRUBITZER, 1995, 2007; KAAS e COLINS, 2001b; KRUBITZER e KAAS, 2005). Entre estes campos estão o córtex visual primário, somatossensorial primário e auditivo primário - V1,

S1 e A1, respectivamente (KRUBITZER, 1995, 2007; KAAS, 1983; KAAS e COLLINS, 2001b; KRUBITZER e KAAS, 2005). A proposta de homologia destas áreas entre espécies de mamíferos existentes é sustentada pelas similaridades observadas na organização topográfica, estrutura arquitetônica, padrão de conexão entre o tálamo e o córtex e preferência para um determinado tipo de estímulo (KRUBITZER, 1995).

Até recentemente, acreditava-se que estas áreas eram as únicas preservadas entre os mamíferos. Entretanto, o plano comum de organização cortical parece ser mais complexo do que se supunha originalmente. Outras áreas foram descritas mais recentemente nos prototerianos e metaterianos, tais como: a área somatossensorial secundária (S2), área parietal ventral (PV), um campo somatossensorial rostral (R, DS ou 3a), um campo motor (M ou M1), um campo auditivo além de A1 e um campo visual secundário (V2). Novamente, quando comparado em diferentes espécies, estes campos possuem as mesmas características topográficas e o mesmo padrão de conexões e organização arquitetônica; o que nos permite admitir que eles são homólogos entre as espécies estudadas e que não surgiram independentemente nas diferentes linhagens. (KRUBITZER, 1995; KAAS e COLLINS, 2001b)

A Figura 2 ilustra um cladograma com os principais grupos taxonômicos dos mamíferos e suas espécies representantes. Nota-se que as áreas primárias V1, S1 e A1 estão presentes tanto em mamíferos com encéfalos menores, como o gambá, porco-espinho, camundongo e prototerianos (ornitorrinco e echidna), quanto nos mamíferos de encéfalo complexo, como os primatas. É possível observar que, conforme o encéfalo aumenta de tamanho em algumas espécies, novas áreas corticais são “adicionadas” ao longo do processo evolutivo. É o que ocorre nos primatas. A área temporal média (MT) é ativada por estímulos visuais em movimento (KAAS e

COLLINS, 2001b), e pode ser notada em todos os primatas representantes da figura 2, caracterizando-a como um caractere comum a este grupo de mamíferos.

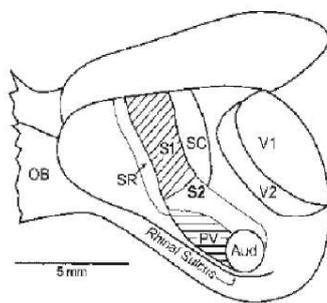
1.3.1 Córtex somatossensorial

Em várias espécies de mamíferos, a ativação do córtex somestésico pela via espino-talâmica, por meio da estimulação dos mecanorreceptores cutâneos superficiais e profundos, além dos receptores profundos cinestésicos (proprioceptores localizados nos tendões, articulações e músculos) e viscerorreceptores (KAAS, 2004). Esta ativação, ocorre através das aferências vindas da periferia sensorial, que adentram a medula espinhal e o tronco encefálico para fazerem sinapse com um neurônio de segunda ordem, o qual pode estar nos núcleos grácil e cuneiforme, ou nos núcleos da via trigeminal (KAAS, 2004). Informações espino-talâmicas dos neurônios da lâmina 5, nocirreceptores, termorreceptores e outros neurônios associados com a interocepção na lâmina I, projetam para o núcleo talâmico VPI (CRAIG e ZHANG, 2006).

Conforme ilustra a figura 3, a maioria dos mamíferos parece possuir ao menos cinco áreas somatossensoriais: S1, S2, PV e duas bandas de córtex somatossensorial localizadas rostral e caudalmente à S1 (SR e SC, respectivamente) (KRUBITZER, 1995; KAAS, 2004; KAAS e COLLINS, 2001b). Até mesmo espécies de encéfalo pequeno, como o gambá *Didelphis virginiana*, parecem possuir cinco campos somatossensoriais: S1, SR, SC, S2 e PV (Figura 3) (BECK et al., 1996).

No entanto, em algumas espécies, a área PV não pôde ser distinguida de S2 (CATANIA et al., 1999). As áreas SR e SC muitas vezes são muito estreitas ou até mesmo ausentes em alguns animais (CATANIA et al., 1999). Estas duas áreas são conhecidas por realizar conexões densas com S1, embora não respondam claramente aos estímulos somatossensoriais em mamíferos anestesiados (CATANIA, 2000). Somente em primatas estas respostas são mais evidentes, permitindo a caracterização das áreas rostral e caudal à S1 como área 3a e 1, respectivamente (Figura 3). Nos primatas do Velho mundo, o córtex somestésico possui uma sexta área bem caracterizada, caudal à área 1, chamada de área 2 (Figura 3)

Gambá



Macaco da noite

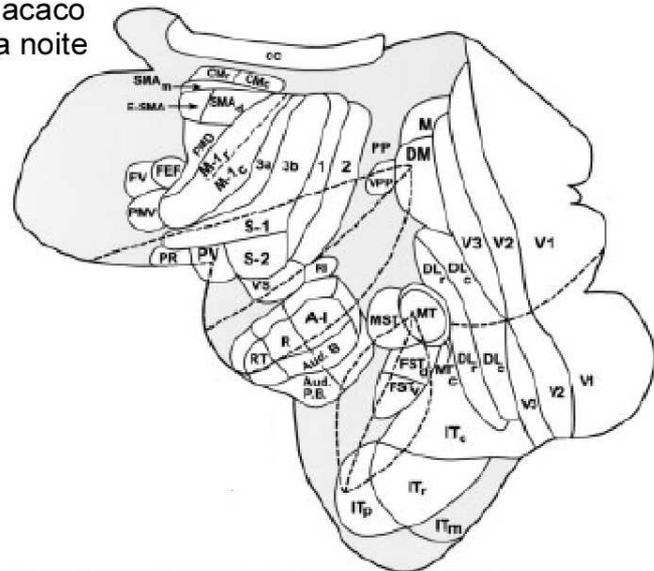


Figura 3. Organização do córtex somatossensorial de mamíferos: comparação entre o gambá (marsupial) e o macaco da noite (primata). Nota-se que o neocórtex do gambá apresenta um menor número de áreas corticais do que o neocórtex do macaco da noite (vista dorsolateral e aplainada, respectivamente). Modificado de Kaas, 2004.

(PADBERG et al., 2005). A homologia entre a área SC de não-primatas e as áreas 1 e 2 ainda não está bem caracterizada.

Inicialmente, a área S1 foi definida pela eletrofisiologia como uma representação somatotópica única da superfície corporal (*cf.* WOOLSEY e FAIRMAN, 1946; WOOLSEY, 1958). No entanto, posteriormente foram reconhecidas nesta região dos macacos quatro campos arquitetonicamente distintos: as áreas 3a, 3b, 1 e 2 de Brodman (Figura 3) (KAAS, 1983). Segundo Jon Kaas (1983), somente a área 3b dos macacos pode ser comparada com a área S1 de mamíferos não-primatas (KAAS, 1983). Ambas as áreas S1 e 3b são caracterizadas por 1) representar os receptores cutâneos da superfície corporal contralateral; 2) serem o principal alvo de projeções do núcleo ventral posterior (VP ou VB) do tálamo (principal núcleo somatossensorial); 3) possuir uma camada IV bem desenvolvida (KAAS, 2004).

1.3.2 Córtex visual

Embora o número de áreas visuais varie muito entre os mamíferos, todas estas espécies possuem ao menos a área V1, e, provavelmente, também a área V2 (Figura 2). Segundo Rosa e Krubitzer (1999), os roedores possuem uma área V2 lateral a V1, ao invés de várias áreas menores como se acreditava inicialmente (*cf.* ROSA e KRUBITZER, 1999). Além disso, a área V2 foi descrita recentemente em uma espécie de marsupial (*Dasyurus hallucatus*), o que indica sua presença em um largo número de mamíferos e, possivelmente também no ancestral comum dos mamíferos (ROSA, et al., 1999).

1.3.3 Córtex Auditivo

As informações obtidas sobre o córtex auditivo não são suficientes para se caracterizar quais áreas são comuns à maioria das espécies. Conforme mostra a Figura 2, somente a área A1

tem sido identificada consistentemente (KRUBITZER, 1995; KAAS e COLLINS, 2001b). No entanto, a representação tonotópica do córtex auditivo primário parece não seguir um plano comum de organização. No porco-da-índia, a representação de baixas frequências de som encontra-se localizadas rostralmente e as de altas frequências caudalmente (*cf.* WALLACE et al., 2000), enquanto que em gerbils esta representação mostra-se organizada de maneira oposta (*cf.* BUDINGER et al., 2001b).

Sabe-se que algumas áreas auditivas são também multisensoriais. Nos roedores, por exemplo, o campo auditivo secundário dorso-rostral responde também a estímulos somatossensoriais (*cf.* WALLACE et al., 2000). Outro campo secundário, a área caudomedial (CM), também responde para ambos os estímulos auditivos e somatossensoriais (*cf.* SCHROEDER et al., 2001). Nenhuma homologia foi sugerida para estas áreas, uma vez que não existem estudos suficientes para concluir o que é comum a vários mamíferos e o que é uma característica específica de uma determinada espécie (KAAS e COLLINS, 2001b).

1.3.4. Áreas multimodais

Conforme observamos na Figura 2, até o momento, todas as áreas comuns entre os três grandes grupos dos mamíferos são de processamento unimodal, ou seja, estão envolvidas em uma única modalidade sensorial.

Na maioria dos mamíferos, uma forma rudimentar de córtex parietal posterior parece estar presente, sugerindo que este córtex teria surgido precocemente na evolução do encéfalo e se mantido em várias espécies (PADBERG et al., 2005). O córtex parietal posterior é uma região grande do córtex localizada entre os campos corticais somatossensoriais rostralmente e os campos visuais localizados caudalmente (PADBERG e KRUBITZER, 2006). Esta região difere-se das áreas sensoriais puras e é considerada uma especialização de alta-hierarquia do sistema

sensorio-motor pelos seguintes motivos: 1) apresentam respostas a mais de uma modalidade sensorial, geralmente possuindo neurônios que podem responder tanto a estímulos somestésicos quanto visuais; 2) a microestimulação de algumas áreas do córtex parietal posterior de primatas induz a movimentos defensivos, agressivos e de alcance de objetos (STEPNIEWSKA et al., 2005; COOKE et al., 2003); 3) estas áreas estão intensamente interconectadas com áreas sensoriais somestésicas e visuais, e com os campos motores frontais (PADBERG et al., 2005; cf. RIZZOLATI e FADIGA, 1998).

Segundo Kaas (1987), a adição de novas áreas corticais ao longo da evolução do cérebro parece ter se baseado na adição de novas áreas unimodais, e não pela adição do córtex multimodal. Mais estudos são necessários para se confirmar a presença de uma área multimodal homóloga ao córtex parietal posterior em todos os grupos de mamíferos e se traçar uma linha de evolução para esta região.

1.3.5 Áreas motoras

A presença de um córtex motor primário (M1) é consistente entre os mamíferos placentários (KAAS, 2004; KARLEN e KRUBITZER, 2007). Nestes mamíferos, a área M1 é caracterizada por: 1) projeções talâmicas originadas principalmente do núcleo ventral lateral (VL); 2) projeções corticais de S2/PV, SR, SC; 3) células de Betz ou piramidais gigantes na camada V e ausência de uma camada IV óbvia, caracterizando-o como córtex agranular; e 4) um mapa de movimentos da face até o membro posterior evocados por eletroestimulação (KAAS, 2004).

Entretanto, nos mamíferos não-placentários a presença de um córtex motor primário com estas características é questionável. Nos marsupiais, por exemplo, a área M1 não foi localizada e alguns autores sugerem que o córtex somatossensorial seja responsável pelas funções motoras

(ver próximos itens) (KAAS, 2004; BECK et al., 1996; KARLEN e KRUBITZER, 2007). Em alguns prototerianos, como o echidna, a área M1 parece ocupar uma região separada de S1 (*cf.* LENDE, 1964; ULINSKY, 1984; KRUBITZER, 2005). No entanto, no ornitorrinco, outro prototeriano, os primeiros estudos eletrofisiológicos sugeriram uma sobreposição parcial desta área com S1 (BOHRINGER e ROWE, 1977). A presença ou não de M1 no mamífero ancestral será discutida adiante.

1.4 Mudanças que podem ocorrer no encéfalo das diferentes espécies de mamíferos

Embora possamos propor com uma relativa segurança, um plano comum de organização cortical entre os mamíferos, uma análise detalhada do neocórtex de diversas espécies nos permite estabelecer algumas diferenças nesta organização cortical. Essas variações, em geral, estão associadas às diversas especializações morfológicas e comportamentais apresentadas por cada espécie em seu processo evolutivo (KRUBITZER, 1995, 2007; KRUBITZER e KAAS, 2005; KARLEN e KRUBITZER, 2007; CATANIA, 2005).

A Figura 4 ilustra as principais variações fenotípicas observadas entre as diversas espécies de mamíferos (KRUBITZER, 2007):

- 1) mudanças no tamanho do neocórtex;
- 2) mudanças no tamanho e forma das áreas corticais;
- 3) mudanças na organização interna de uma área cortical;
- 4) aparecimento de módulos em uma área cortical;
- 5) aparecimento de novas áreas corticais;
- 6) mudanças nos padrões de conexões das áreas corticais.

Nos próximos itens iremos descrever algumas teorias envolvendo as modificações e mecanismos de evolução das áreas corticais.

Possíveis modificações do neocórtex

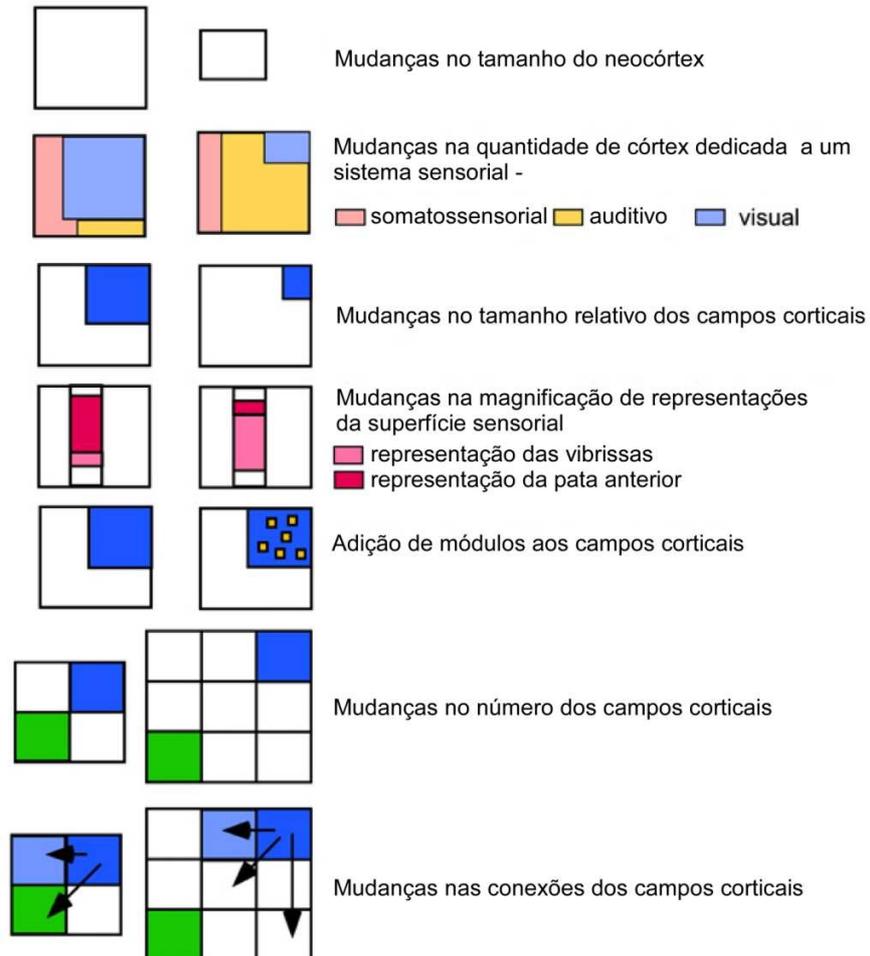


Figura 4. Tipos de mudanças que ocorreram no neocórtex dos mamíferos. Modificado de Krubitzer, 2007.

1.4.1 Mudanças no tamanho das áreas corticais

As áreas corticais sofreram modificações em seu tamanho durante o processo evolutivo de cada espécie. Duas hipóteses principais têm sido discutidas a respeito de como estas áreas cerebrais mudaram individualmente seu tamanho ao curso da evolução dos vertebrados (STRIEDTER, 2005).

Considerando que as diferentes espécies de animais apresentam comportamentos específicos e que determinadas áreas cerebrais estão relacionadas a estes diferentes comportamentos, é possível que ao longo da evolução, as regiões cerebrais tenham se especializado independentemente, de maneira a refletir o comportamento especializado das espécies. A esta hipótese chamamos *evolução em mosaico* (STRIEDTER, 2005).

No entanto, não se pode ignorar que as áreas cerebrais estão interconectadas entre si formando uma rede complexa de processamento, o que indica que mudanças no tamanho de uma área podem provocar modificações em outras áreas, o que chamamos de evolução *em concerto* (KRUBITZER, 2007; STRIEDTER, 2005).

Alguns estudos fisiológicos têm demonstrado correlações entre o aumento do tamanho das áreas cerebrais e habilidades sensoriais altamente desenvolvidas. O mecanismo pelo qual maiores áreas resultam em um melhor processamento das informações sensoriais e motoras foi inicialmente definido por Harry Jerison em 1973 no *princípio de propriedade de massa* (STRIEDTER, 2005).

Esse princípio de propriedade de massa sugere, a partir de comparações entre espécies, que a importância de uma função na vida de cada espécie poderá ser refletida pela quantidade absoluta de tecido neural para a função na espécie. Isso também implica que, dentro de uma espécie, a massa relativa de tecido neural associada com diferentes funções está relacionada à importância desta função na espécie (*cf.* JERISON, 1973, pág. 8-9).

Se considerarmos o tamanho absoluto de determinadas regiões, essa afirmação pode não ser correta. Pequenas regiões do encéfalo podem apresentar um processamento de informações menor, mas ainda sim, podem desempenhar um papel importante na vida do indivíduo (STRIEDTER, 2005). O núcleo supraquiasmático, por exemplo, é um dos menores grupos celulares em relação ao tamanho absoluto do encéfalo. No entanto, por ser fundamental na manutenção do “relógio biológico” interno, o tamanho deste núcleo é muito conservado entre as espécies e parece ser importante na vida do organismo (STRIEDTER, 2005).

Uma alternativa à análise do tamanho absoluto das estruturas cerebrais é a análise do tamanho proporcional, ou seja, quão grande é uma estrutura em comparação ao resto do encéfalo ou neocórtex (KRUBITZER, 1995, 2007; KRUBITZER e KAAS, 2005; CATANIA, 2005). Esta comparação, quando feita entre espécies diferentes, pode indicar a importância de uma região no comportamento da espécie.

Com base no conceito de tamanho relativo citamos as alterações corticais que ocorrem no tamanho ocupado por um sistema sensorial no cortex, de uma área cortical e na organização interna desta área (Figura 5). As três espécies citadas na figura (camundongo, gambá e morcego) possuem aproximadamente o mesmo tamanho da superfície cortical, mas a quantidade do córtex devotada a um determinado sistema sensorial varia de acordo com o uso de determinados receptores sensoriais pela espécie (KRUBITZER e KAHN, 2003).

O ornitorrinco é um outro exemplo clássico onde especializações da morfologia periférica parecem influenciar na magnificação de áreas corticais e na especialização de representações corticais (Figura 6). A área S1 deste animal não só ocupa uma região proporcionalmente maior no neocórtex do que as áreas V1 e A1, como também é proporcionalmente maior do que em outros mamíferos (KRUBITZER, 1995, 2007). Esta expansão de S1 no ornitorrinco está relacionada à densidade dos eletrorreceptores e

mecanorreceptores localizados no bico. A magnificação cortical de outras áreas somatossensoriais do ornitorrinco, tais como as áreas R (somestésica rostral) e S2/PV, reforçam a importância do sistema somatossensorial nesta espécie. Não obstante, a representação cortical do bico ocupa quase 90% da área S1, conforme ilustra a Figura 6.

1.4.2 Mudanças no número de áreas corticais

No início da neurociência evolutiva, acreditava-se que o encéfalo evoluía e se tornava mais complexo pelo acréscimo de novas estruturas. Esta crença iniciou-se com Ludwig Edinger em 1908 e foi muito aceita na primeira metade do século XX (STRIEDTER, 2005). Edinger propôs que a evolução do telencéfalo dos vertebrados ocorreu em estágios progressivos com aumentos de complexidade e tamanho, culminando no encéfalo humano (THE AVIAN BRAIN NOMENCLATURE CONSORTIUM, 2005). Segundo sua proposta, o palencéfalo seria o encéfalo antigo, envolvido com o comportamento instintivo. A adição de novas estruturas teria formado o neotelencéfalo (pallium ou córtex) que controlaria o aprendizado e a inteligência. Estas subdivisões do telencéfalo ficaram amplamente conhecidas pelos prefixos paleo (mais antigo), arqui (arcaico) e neo (novo) e designavam a ordem evolutiva de uma determinada estrutura (THE AVIAN BRAIN NOMENCLATURE CONSORTIUM, 2005).



Figura 5. Tamanho proporcional de sistemas sensoriais de três espécies com tamanho de neocórtex similar. Representação de uma vista tangencial do córtex do camundongo, morcego e gambá. Note que a proporção de área ocupada pelos sistemas sensoriais no neocórtex varia entre as espécies. Modificado de Krubitzer e Kahn, 2003.

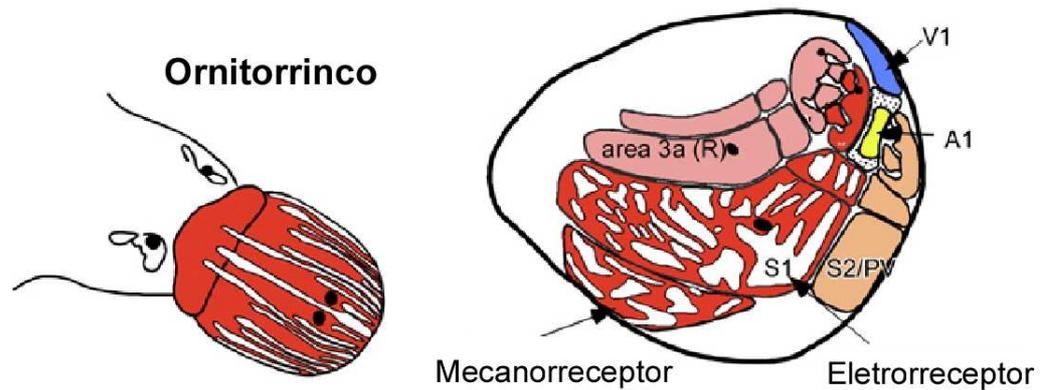


Figura 6. Magnificação cortical de partes do corpo importantes para o comportamento do animal. A representação cortical do bico do ornitorrinco ocupa a maior parte de S1 (em vermelho). As áreas V1 e A1 ocupam uma região proporcionalmente menor no neocórtex desta espécie. Modificado de Krubitzer, 2007.

O pallium dos peixes foi, então, denominado paleocórtex, e seria o ancestral do córtex olfatório dos humanos. Os répteis teriam adicionado um arquicórtex, o qual seria o antecessor do hipocampo humano. Enquanto nas aves nenhuma adição de estruturas tenha sido inicialmente proposta, nos mamíferos sugeriu-se o aparecimento do neocórtex, responsável pelo seu

comportamento mais sofisticado (THE AVIAN BRAIN NOMENCLATURE CONSORTIUM, 2005).

Em contraposição, J. B. Johnston afirmou com base em suas investigações e na literatura, que regiões consideradas novas ou únicas a uma espécie de mamífero por Edinger possuíam homólogos em peixes e répteis (JOHNSTON, 1923). A partir destas evidências, Johnston afirmou que ao longo da evolução novas estruturas não surgem no encéfalo “do nada”. Seguindo este raciocínio, sugere-se atualmente o termo isocórtex como referência ao córtex característico dos mamíferos (NORTHCUTT e KAAS, 1995, STRIEDTER, 2005), ao invés de neocórtex (um córtex completamente novo). No entanto, o termo neocórtex continua sendo utilizado na literatura e parece ser correto quando nos referimos a exclusividade desta estrutura nos mamíferos, embora não signifique que ela seja uma organização cortical que evoluiu completamente independente do paleo e/ou arquicórtex (THE AVIAN BRAIN NOMENCLATURE CONSORTIUM, 2005).

Se compararmos o neocórtex de diferentes mamíferos, observamos claramente que diferentes espécies diferem no número de áreas corticais devotadas a um sistema cortical. Sendo assim, novamente perguntamos: como teria o encéfalo se tornado mais complexo ao longo da evolução?

A explicação mais utilizada para esta pergunta é que determinadas regiões do encéfalo ancestral teriam se subdividido em duas ou mais regiões nos encéfalos descendentes (STRIEDTER, 2005). Assim, as regiões que apareceram no encéfalo seriam chamadas de “novas” por não estarem presentes no ancestral, mas não teriam sido “adicionadas” às estruturas antigas a partir do nada.

Estas regiões podem ter aparecido por meio de dois mecanismos diferentes: *conversão* e *proliferação filogenética* (STRIEDTER, 2005). Na *conversão filogenética* uma região

encefálica é transformada em uma nova região através de mudanças estruturais, como aquelas que ocorrem na conectividade, citoarquitetura ou histoquímica (STRIEDTER, 2005). Neste mecanismo, existe uma homologia de um-por-um entre o caractere em todas as espécies (Figura 7A). Porém, um caractere (o “novo”) é diferente dos seus homólogos.

Um exemplo clássico desta *conversão filogenética* é o surgimento do neocórtex nos mamíferos a partir de uma estrutura cortical pobremente laminada em outros vertebrados. Neste caso, existe a relação de um-para-um entre a estrutura cortical precursora e o neocórtex.

Por outro lado, a *proliferação filogenética* ocorre quando uma espécie tem mais caracteres do que outra e que estes caracteres não são homólogos ao ancestral (STRIEDTER, 2005). Existem dois mecanismos distintos aceitos para a ocorrência da proliferação filogenética: *segregação* e *adição* (Figura 7B). O termo *segregação* é frequentemente utilizado para descrever a evolução de regiões homogêneas no ancestral em regiões múltiplas e distintas, não homólogas ao ancestral (STRIEDTER, 2005).

Evolução de novas áreas corticais

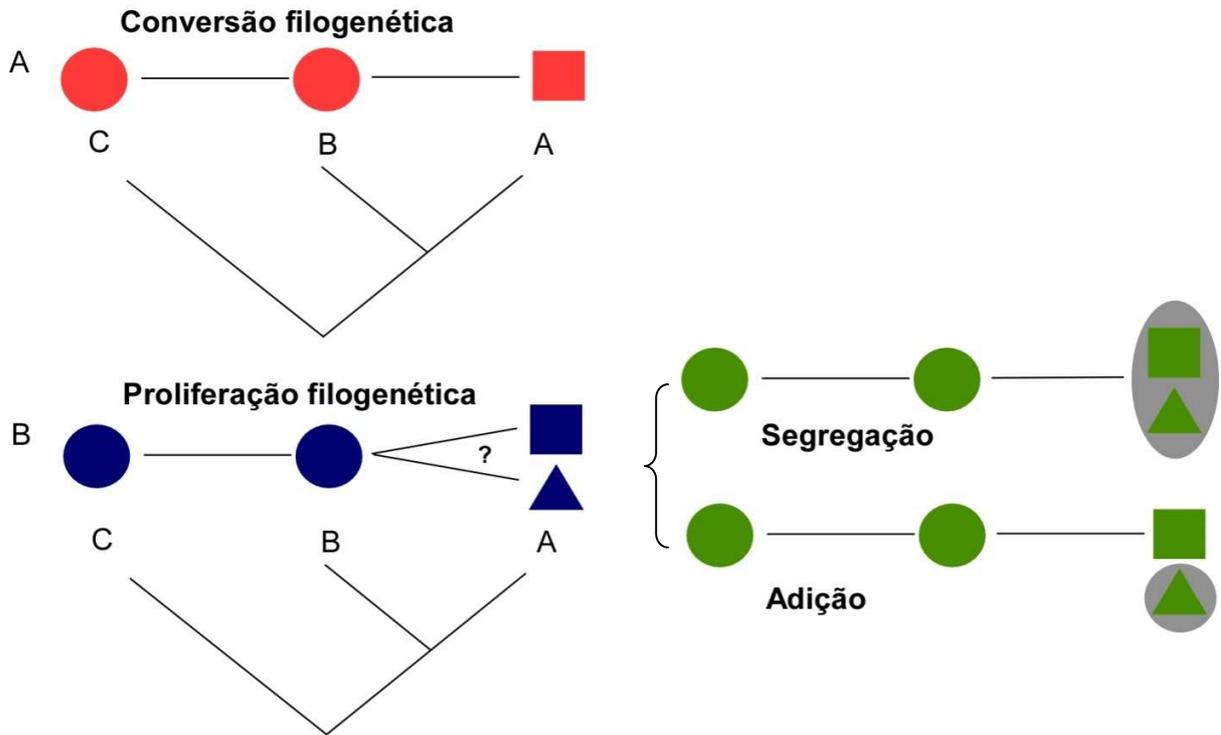


Figura 7. Desenho esquemático de conversão e proliferação filogenética. Em (A) ilustra-se a conversão filogenética onde um único carácter é diferente do seu homólogo. Novas áreas corticais também podem surgir e não necessariamente apresentar uma relação de homologia com a estrutura ancestral análoga, como no caso da proliferação filogenética (B). Modificado de Striedter, 2005.

A hipótese de evolução por segregação é exemplificada por de Ann Butler (1994), a qual explica o maior número de núcleos no tálamo dorsal dos amniotes do que nos anamniotes. Segundo Butler, o tálamo dorsal é subdividido em dois grupos de núcleos: lemnótalamo e colótalamo (STRIEDTER, 2005). O lemnótalamo nos anamniotes, peixes e anfíbios, consiste

em um único núcleo, o núcleo anterior. Enquanto isso, nos amniotes, inclusive mamíferos, observam-se vários núcleos nesta região. Sabe-se que nenhum destes núcleos nos amniotes é homólogo isoladamente ao núcleo anterior dos anamniotes, e por isso supõe que este é um exemplo de *segregação filogenética* (STRIEDTER, 2005). Desta forma, se estes núcleos não são homólogos, não se pode dizer que houve uma conversão de um núcleo ancestral em vários núcleos distintos, como ocorre na *conversão filogenética*.

Em geral, quando as hipóteses de segregação e conversão não satisfazem às explicações para o aparecimento de estruturas no encéfalo, lança-se mão da *adição filogenética* como uma hipótese alternativa. Neste modelo, novas estruturas seriam adicionadas com o aparecimento de novas expressões genéticas de uma região embriologicamente precursora (STRIEDTER, 2005). O precursor modificado poderia, a partir de então, gerar uma nova estrutura no adulto. Outro tipo de *adição filogenética* poderia ocorrer quando a região embriologicamente precursora se expandisse. Esta expansão deixaria uma parte do córtex sem exposição ao estímulo de desenvolvimento antigo, gerando assim, uma nova trajetória de desenvolvimento (STRIEDTER, 2005).

Mas e quanto às áreas corticais?

Um argumento favorável à hipótese de segregação filogenética como um mecanismo responsável pelo aparecimento de **novas áreas** é fortemente apoiado na proposta de Richard Lende (1969) de que as áreas primárias somatossensorial e motora corresponderiam a uma única área cortical nos mamíferos ancestrais, formando um amálgama sensório-motor.

Segundo Lende (1969),

“(...) o presente padrão de localização das áreas corticais evoluíram de um pallium polimodal contendo áreas representacionais (ex. sensorial e motora) completamente superpostas.” (LENDE, 1969, pág. 273).

Quanto às demais espécies, Jon Kaas e colaboradores mapearam o córtex sensorial de vários mamíferos e encontraram ao menos as áreas sensoriais primárias e secundárias bem segregadas nestas espécies (KAAS, 1987; KRUBITZER, 1995; NORTH CUTT e KAAS, 1995; CATANIA et al., 1999). No córtex motor, menos estudos foram conduzidos, mas a maioria das espécies parece possuir um córtex motor primário e algumas regiões pré-motoras. Assim, sugere-se que estas áreas teriam mesmo se separado ao longo do processo evolutivo dos mamíferos a partir de um amálgama no ancestral comum. Resta-nos saber, porém, se estas áreas realmente surgiram de um córtex polimodal no ancestral como sugere Lende (1964), o que iremos discutir adiante.

1.4.3 Mudanças nas conexões neurais

As mudanças no número de áreas corticais ao longo da evolução implicam conseqüentemente, num rearranjo das conexões destas áreas com o restante do córtex (STRIEDTER, 2005). Ou ainda, as mudanças nas conexões neurais durante a evolução de uma espécie poderiam provocar o aparecimento de novas áreas corticais (STRIEDTER, 2005).

Inicialmente, predominou entre os neuroanatomistas, a *teoria da invasão* de C. J. Herrick. Segundo esta teoria, conexões não usuais poderiam invadir uma região e favorecer a uma diferenciação cortical (STRIEDTER, 2005).

De acordo com esta hipótese, Leah Krubitzer (1995) propõe que novas áreas corticais surgiriam a partir da invasão de novas projeções talâmicas aferentes, causando um realinhamento das projeções pré-existentes (Figura 8). Sendo assim, as novas projeções poderiam formar módulos corticais, se agregando dentro das áreas. Ao longo do processo evolutivo, alguns campos poderiam gerar uma completa segregação entre as projeções “novas e

antigas”, ou o novo campo com ambas projeções poderia permanecer dentro da área invadida, gerando novas áreas corticais (KRUBITZER e KAHN, 2003).

Em 1980, Ebbesson, propôs a *hipótese do parcelamento* para tentar explicar tais mudanças nas conexões corticais (Figura 9A).

Segundo Ebbesson,

“O sistema nervoso tornou-se mais complexo, não por um sistema invadindo outro, mas por um processo de parcelamento que envolve a perda seletiva de conexões de sistemas e agregados vizinhos formados” (cf. EBBESSON, 1980, p. 213).

O amálgama sensorio motor de Richard Lende (1963) é um exemplo comumente citado do parcelamento Ebbessoniano (Figura 9B). Estudos com neurotraçadores mostram que ambos os núcleos talâmicos somestésicos e motores projetam para a região do amálgama sensorio-motor nos marsupiais estudados (DONOGUE e EBNER, 1981). Em mamíferos placentários, as áreas primárias somatossensorial e motora encontram-se espacialmente separadas e os núcleos somestésico e motor do tálamo projetam-se respectivamente para estas áreas sem sobreposição de projeções (KAAS, 2004).

1.5 Hipótese do amálgama sensorio-motor

A hipótese do amálgama sensorio-motor foi descrita pela primeira vez por Richard Lende em 1963. Naquela época, muitas dúvidas existiam a respeito da representação somatotópica do córtex motor dos marsupiais. Poucos estudos anteriores ao de Lende conseguiram identificar no neocórtex a representação motora das regiões caudais à pata anterior, tais como a cauda e a pata posterior (KARLEN e KRUBITZER, 2007).

Em 1940, o córtex motor primário de seis espécies de marsupiais (*Perameles nasuta*, *Sacrophilus harrissi*, *Dasyurus viverrinus*, *brush-tailed opossum*, *Macropus rufogriseus*,

Macropus agilis) foi estudado por Abbie. Em nenhum destes, foi encontrada uma representação motora de todo o corpo do animal (KARLEN e KRUBITZER, 2007).

Com base em seus estudos, Abbie (1940) afirmou que os dados eram inconclusivos sobre a existência de uma representação somatotópica completa do corpo no córtex motor no *Didelphis virginiana* (um didelfídeo) (KARLEN e KRUBITZER, 2007). Em 1963, Richard Lende utilizou os métodos mais refinados da época para mapear o córtex motor detalhadamente nesta espécie. Utilizando eletroestimulação por eletrodos bipolares, ele encontrou a representação da pata posterior e da cauda na parede medial do neocórtex. Além do córtex motor, o córtex somatossensorial primário também foi mapeado através da técnica de potencial evocado (LENDE, 1963a,b).

No entanto, o principal resultado de Lende foi que o córtex motor primário do gambá estava completamente sobreposto com o córtex somatossensorial primário no córtex parietal, o que ele chamou de *amálgama sensório-motor* (Figura 10).

Segundo Lende (1963),

“A representação motora somática no córtex cerebral do gambá é espacialmente coincidente com a representação somática sensorial. Não existe uma área homóloga na posição da área motora pré-central. Esta área sensório-motora não é dividida em uma porção mais sensorial e outra mais motora. O padrão de localização dentro desta área de ambos os aspectos sensorial e motor correspondem ao que é encontrado na área somatossensorial primária de mamíferos placentários.”

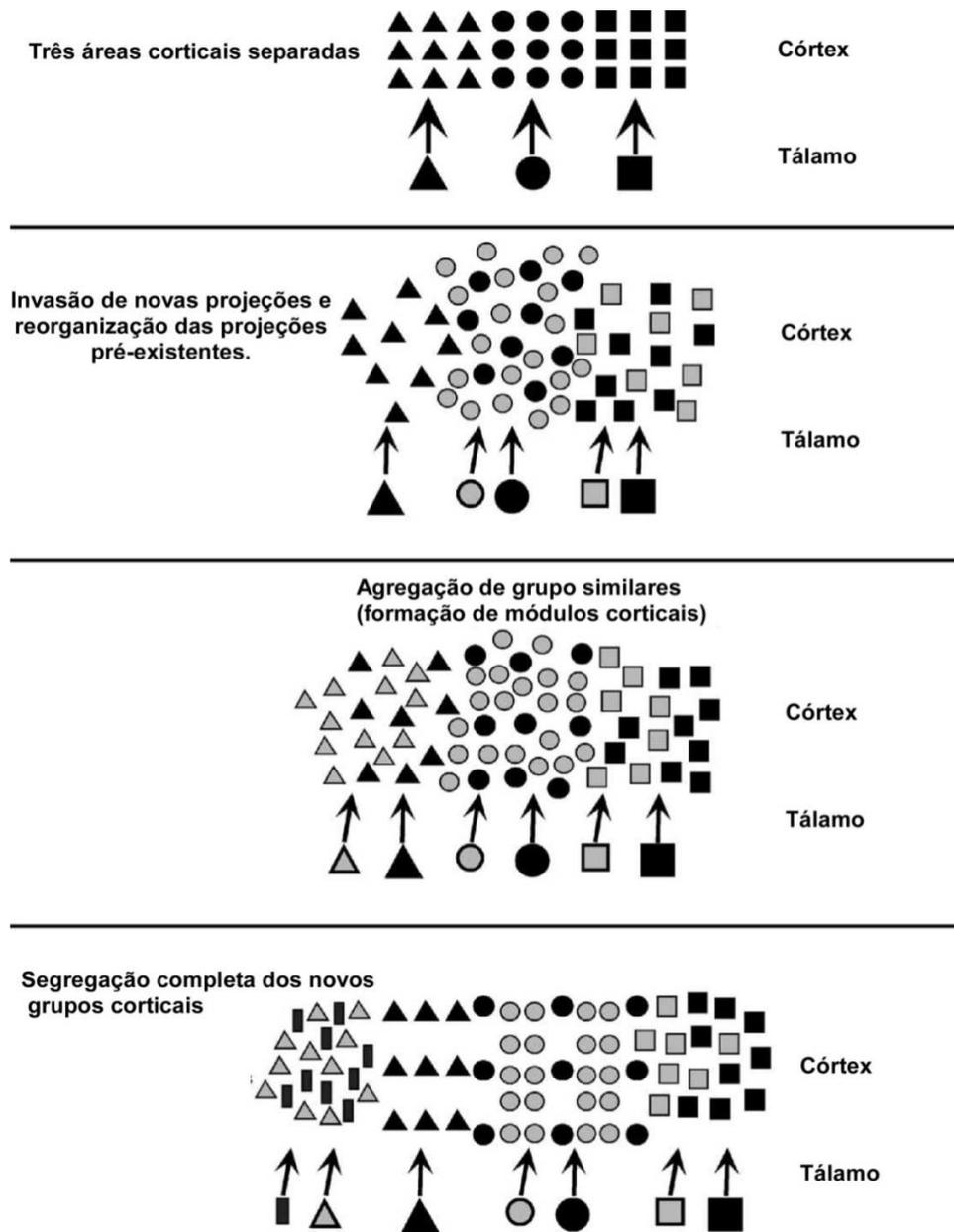


Figura 8. Modificação de conexões neurais. Segundo a teoria de invasão, novas áreas corticais poderiam surgir ao longo do processo evolutivo por invasão de novas conexões neurais. Adaptado de Krubitzer e Kahn, 2003.

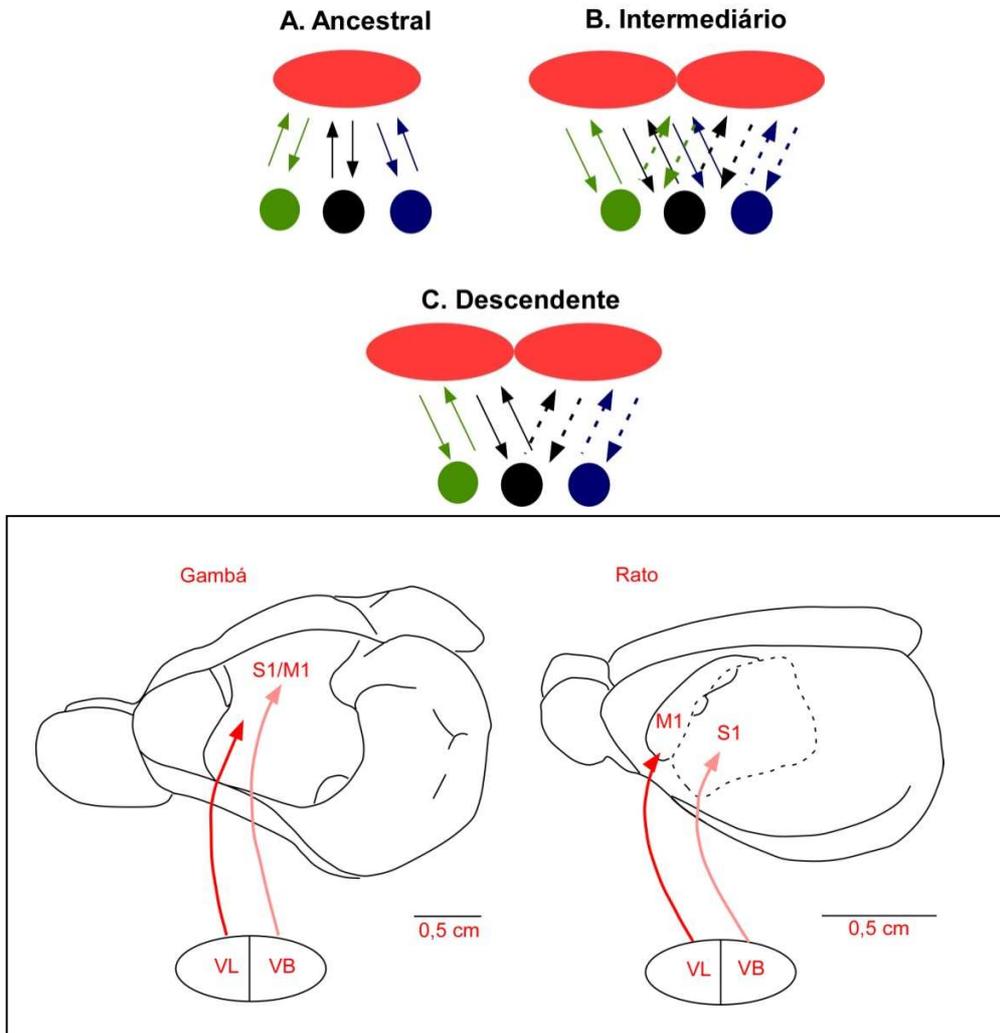


Figura 9. Parcelamento de áreas e conexões corticais. Em (A) observa-se uma possível área ancestral (acima) com suas respectivas conexões talâmicas (em baixo). Na hipótese do parcelamento Ebbessoniano (B), as áreas corticais e suas conexões se duplicariam formando uma condição intermediária. Ao longo da evolução, estas conexões poderiam segregar, gerando novos padrões de projeções para ambas as áreas (C). De forma semelhante, sugere-se que M1 teria evoluído a partir de um amálgama sensório-motor no mamífero ancestral (representado no quadro no interior da figura pelo encéfalo do gambá) e que a convergência das projeções talâmicas motoras (VL) e somestésicas (VB) para S1/M1 teriam segregado nos mamíferos existentes (representado no quadro pelo desenho do rato). Modificado de Striedter, 2005.

Hipótese do amálgama sensório-motor de Richard Lende

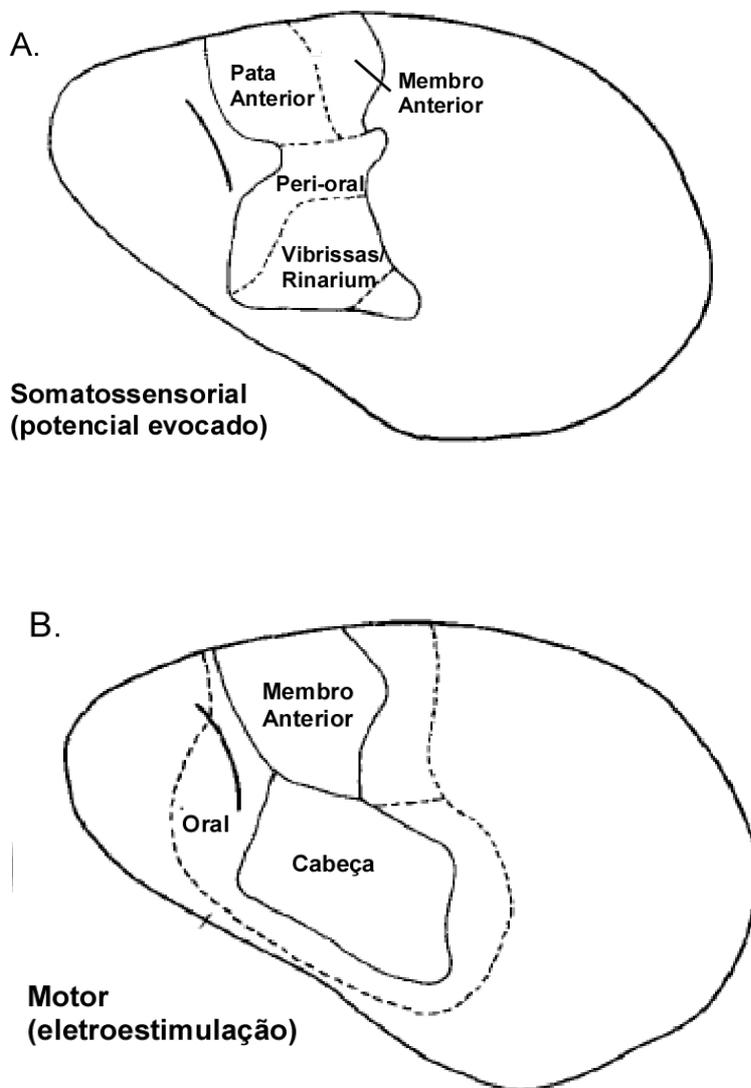


Figura 10. Hipótese do amálgama sensório-motor. Visão dorsolateral do neocórtex do gambá *Didelphis aurita* ilustrando a sobreposição dos mapas somatossensorial (A) e motor (B) no córtex parietal deste animal. Modificado de Pubols et al., 1976.

A proposta de que o amálgama sensório-motor do gambá pudesse ser uma característica primitiva do isocórtex dos mamíferos estimulou novos estudos na década de 70 visando confirmar a organização das áreas primárias motoras e somatossensoriais nestes animais.

Em 1976, Pubols e colaboradores realizaram um remapeamento do córtex parietal do *Didelphis virginiana* utilizando, desta vez, microeletrodos (PUBOLS et al., 1976). Estes eletrodos, diferentemente dos eletrodos de superfície usados por Lende (1963), penetravam no córtex registrando um volume de tecido cortical reduzido, e permitindo uma maior resolução espacial da representação somatotópica cortical. As propriedades neuronais e os campos receptores de S1 mostraram-se semelhantes aos dos outros mamíferos, porém a superfície corporal aparece ocupando uma porção menor do córtex parietal do que o proposto anteriormente por Lende (1963).

Para verificar a existência da sobreposição dos sistemas sensório-motor em outra espécie marsupial da ordem dos didelfídeos, um novo mapeamento das representações motoras e somatossensorial foi realizado no gambá *Didelphis azarae azarae* (MAGALHÃES-CASTRO, 1971). Novamente, foi demonstrada a ocupação de áreas coincidentes pelos sistemas motor e sensorial somático no córtex parietal.

Posteriormente, um estudo do córtex somatossensorial do gambá *Didelphis virginiana* apresentou evidências topográficas, arquitetônicas e hodológicas (de conexões) para a existência de cinco áreas somatossensoriais nesta espécie (BECK et al., 1996). Três representações da superfície corporal foram encontradas no córtex parietal. Estas representações correspondem às áreas S1, S2 e área parietal ventral (PV). Dois campos somatossensoriais foram adicionalmente propostos, para os quais, entretanto, não foi identificada uma representação somatotópica. Os novos campos encontrados localizam-se na região rostral e caudal à S1, os quais foram denominados área somatossensorial rostral (SR) e área somatossensorial caudal (SC).

Estes últimos foram considerados áreas separadas de S1, por não apresentarem resposta clara à estimulação somática na preparação anestesiada e pelo padrão de projeções topográficas de S1 para estas áreas somestésicas (BECK et al., 1996).

Adicionalmente, a técnica de impregnação pela prata na bainha de mielina (GALLYAS, 1979), largamente utilizada para a delimitação de áreas corticais, foi útil na identificação das áreas S1, S2, PV, que se apresentaram densamente marcadas (BECK et al., 1996). As áreas SR e SC encontraram-se também visíveis por este método, porém não tão mielinizadas como as demais áreas somatossensoriais, e, portanto, menos marcadas por este método.

A microestimulação de S1 e áreas ao seu redor foi realizada no mesmo estudo (BECK et al., 1996). Em macacos e outros mamíferos, correntes de 5 a 20 μA aplicadas no córtex motor são capazes de produzir movimentos (STEPNIEWSKA et al., 1993). No gambá, surpreendentemente, não foram observados movimentos na maioria dos sítios de estimulação, mesmo com o uso de correntes acima de 100 μA , limiares bem maiores do que os encontrados em outras espécies (BECK et al., 1996).

Uma outra contribuição ao esclarecimento da condição ancestral do córtex parietal dos mamíferos, consistiu no mapeamento motor e somatossensorial no marsupial sul-americano *Monodelphis domestica* (FROST et al., 2000). Esta espécie, segundo os autores, estaria mais próxima dos primeiros metaterianos do que os *Didelphis*. Este trabalho utilizou o registro multiunitário com microeletrodos para identificar as áreas S1 e S2. A eletroestimulação ocorreu através de três métodos diferentes: microestimulação intracortical, estimulação profunda de baixa impedância e estimulação bipolar superficial. Este último método era similar ao realizado por Lende (1963). Em todos os três procedimentos, os movimentos obtidos se restringiram à região da face, e estiveram sobrepostos com a representação da mandíbula, vibrissas e focinho

em S1. Entretanto, tais resultados foram obtidos com correntes de até 60 μA , novamente muito superiores à corrente necessária para evocar movimento no córtex motor de outros mamíferos.

1.5.1 Projeções tálamo-corticais para a região do proposto amálgama sensório-motor

O tálamo é uma massa nuclear localizada no diencéfalo, que possui vários agrupamentos celulares, os quais possuem diferentes organizações anatômicas e funcionais (MOUNTCASTLE, 1980). Alguns núcleos talâmicos estão associados com sistemas de processamento de sinais vindos do mundo externo e outros participam de funções motoras somáticas e autonômicas. A interconexão do tálamo com o córtex forma um substrato anatômico importante para nossa percepção do mundo externo e do corpo, assim como nossas ações e respostas motivacionais (MOUNTCASTLE, 1980).

Quando analisamos as conexões das áreas somatossensoriais, observamos que os axônios relacionados aos receptores cutâneos (superficiais e profundos) se direcionam principalmente para o núcleo talâmico ventral posterior (VP ou VB) (KAAS, 2004). As informações originadas dos receptores profundos, como os fusos neuromusculares, pelo menos em primatas, direcionam-se para o núcleo ventral posterior superior (VPS). Destes núcleos partem as projeções direcionadas às áreas somestésicas localizadas no córtex parietal anterior.

As áreas motoras corticais estão conectadas reciprocamente com grupos nucleares talâmicos específicos. Tais projeções tálamo-corticais são críticas para o funcionamento dos córtices motores (KAAS e STEPNIEWSKA, 2000). Os núcleos cerebelares eferentes, o segmento interno do globo pálido e a substância nigra são centros motores subcorticais que recebem informações indiretas de uma variedade de áreas corticais somatossensoriais, motoras e associativas e enviam estas informações novamente ao córtex motor via tálamo (KAAS e STEPNIEWSKA, 2000). Ao longo do nosso estudo, iremos nos referir aos núcleos talâmicos

que fazem a conexão dos centros motores subcorticais com os córtices motores como núcleos talâmicos motores.

Os núcleos motores do gambá são os núcleos talâmicos ventral lateral (VL), ventral anterior (VA) e ventral medial (VM). Os núcleos VL, VA e VM recebem projeções cerebelares no *Didelphis virginiana* (WALSH e EBNER, 1973). Em primatas, o núcleo ventral lateral (VL) também recebe projeções dos núcleos profundos do cerebelo (cf. JONES, 1985). As informações cerebelares que atingem VL se dirigem para os córtices motor primário e pré-motor.

Com intuito de verificar a natureza das informações que chegam na região do amálgama sensório-motor do gambá, projeções talâmicas para o córtex parietal foram observadas no gambá *Didelphis virginiana* através da técnica de degeneração anterógrada na década de 70 (KILLACKEY e EBNER, 1973). Lesões através de corrente direta foram realizadas no tálamo em três núcleos diferentes: VP, VAL (VA e VL) e o núcleo central intralaminar (CIN). Os axônios e terminais axonais degenerados mostraram que as projeções destes três núcleos talâmicos convergem para todo o córtex parietal. Nesta espécie, o núcleo VP recebe projeções do lemnisco medial enquanto que o núcleo VAL recebe do cerebelo. O núcleo CIN está localizado entre as subdivisões medial e lateral do tálamo e recebe projeções convergentes do lemnisco medial, do cerebelo, da medula espinhal e da formação reticular (DONOGHUE e EBNER, 1981; WALSH e EBNER, 1973).

Com o surgimento de técnicas neuroanatômicas de maior resolução espacial, as projeções dos núcleos talâmicos para o córtex parietal, foram reavaliadas. Em 1981, Donoghue e Ebner realizaram várias injeções de peroxidase da raiz forte (HRP) nesta região. Este traçador é captado pelos axônios no sítio de injeção e transportado retrogradamente para o corpo celular, permitindo a detecção da origem das projeções tálamo-corticais. Estes autores realizaram

injeções nas seguintes regiões corticais: 1) córtex pós-orbital (ou seja, entre a fissura orbital e a borda anterior de S1), em 2) S1 propriamente dito, e 3) no córtex parietal posterior (identificado como a região do córtex parietal imediatamente caudal à S1). Como resultado, observou-se novamente que, em S1, as projeções se originavam nos núcleos VB, VL, CIN e o núcleo central lateral (CL). O núcleo CL localiza-se anteriormente ao núcleo CIN, e recebe projeções da medula espinhal, do cerebelo e núcleo pretectal (DONOGHUE e EBNER, 1981).

As marcações resultantes da injeção pós-orbital se apresentaram principalmente nos núcleos intralaminares e mediais. A injeção de HRP no córtex parietal posterior marcou somente o núcleo VL, entre os núcleos ventrais do tálamo dorsal. Assim, foi concluído que o córtex correspondente ao amálgama somatomotor de Lende, (1963), recebe projeções convergentes dos núcleos “somestésico” VB e do núcleo “motor” VL, sem nenhuma segregação entre elas (DONOGHUE e EBNER, 1981).

Uma importante reserva em relação a este estudo é a falta da delimitação de áreas somestésicas no córtex parietal anterior, até então não identificadas. É possível que estas injeções rostrais e centrais realizadas na área S1 por Donoghue e Ebner (1981), não correspondam somente à S1, tendo incluído também parte das áreas SR e SC descritas posteriormente por Beck et al (1996) (que iremos descrever no próximo parágrafo). Além disso, neste mesmo estudo foi utilizado somente um neurotraçador, impedindo a comparação das injeções em um mesmo espécime. O HRP apresenta ainda como desvantagem, um espalhamento maior e uma resolução mais baixa do que os traçadores atualmente utilizados (conjugados à dextrana, por exemplo) (REINER et al., 2000; VERCELLI et al., 2000).

Como vimos no item anterior, os resultados encontrados por Lende (1963) sobre a localização do córtex motor primário sobreposto com o córtex somestésico primário não foram confirmados posteriormente no gambá por Beck et al (1996) nem por Frost et al, 2000. No

entanto, os núcleos talâmicos “motores” parecem projetar para a região do amálgama reforçando a idéia de um processamento motor nesta região. Sabe-se atualmente que esta região possui outras subdivisões que incluem S1, SR e SC (BECK et al., 1996). As projeções para SR e SC até então não foram estudadas no gambá.

1.6 O Gambá *Didelphis aurita* como animal experimental

O nosso trabalho tem por principal objetivo analisar a organização do córtex somatossensorial primário no gambá *Didelphis aurita* pela caracterização das projeções tálamo-corticais e córtico-corticais das áreas S1 e SC, descritas por Beck et al. (1996).

Os gambás são marsupiais representantes dos metaterianos, uma das três subclasses dos mamíferos: prototerianos (monotremos), metaterianos (marsupiais) e euterianos (placentários). Em geral, o termo marsupial é associado aos mamíferos que possuem uma bolsa ou marsúpio, mas convém ressaltar que nem todas as espécies deste grupo possuem um marsúpio (KARLEN e KRUBITZER, 2007). Já o termo metateriano, é mais adequado, pois significa que os marsupiais representam um meio termo entre os prototerianos (cujo desenvolvimento não ocorre na placenta) e os euterianos (que possuem uma placenta durante a gestação).

Pode-se dizer que os marsupiais formam um grupo muito diversificado, com aproximadamente 270 espécies divididas em sete diferentes ordens (KARLEN e KRUBITZER, 2007). Conseqüentemente, seus representantes ocupam diferentes *habitats* e apresentam comportamentos distintos. Encontramos espécies terrestres, arbóreas ou aquáticas; espécies muito sociáveis (*Dactylopsila trivirgata*), outras solitárias como o coala (*Phascolarctos cinereus*). Os marsupiais podem ser ainda carnívoros, herbívoros ou onívoros (KARLEN e KRUBITZER, 2007).

Como resultado desta diversidade biológica, observamos marsupiais com diferentes adaptações morfológicas, as quais refletem também em diferenças no tamanho do encéfalo, na organização cortical e na conectividade encefálica. (KARLEN e KRUBITZER, 2007). Na natureza são observados encéfalos de marsupiais desde pequenos, lisos e com uma pequena proporção devotada ao neocórtex (*Didelphis virginiana*) até encéfalos grandes, girencefálicos, com proporcionalmente grande neocórtex (*Vombatus ursinus*). (KARLEN e KRUBITZER, 2007).

Estas diversidades nas características morfológicas e comportamentais tornam o grupo dos marsupiais importante para o estudo da relação entre o cérebro e comportamento animal. Muitos dos marsupiais atuais mantiveram uma organização cortical semelhante ao seu ancestral e se assemelham mais ao ancestral dos mamíferos do que outros mamíferos atuais. Por isso, teorias a respeito da evolução das áreas corticais se baseiam nos resultados obtidos a partir do estudo do cérebro de marsupiais (KARLEN e KRUBITZER, 2007).

No presente estudo, o gambá *Didelphis aurita* foi escolhido segundo os critérios “quase-filogenéticos” (KAAS, 2002) como um modelo para se estudar o plano básico da organização do córtex sensorio-motor dos mamíferos. O gambá *Didelphis aurita* faz parte da ordem dos didelfídeos, que representa os gambás americanos e é a mais antiga entre os marsupiais (KIMBLE, 1997). Estes marsupiais possuem um encéfalo pequeno em relação ao próprio corpo e uma organização cortical com poucas áreas (KARLEN e KRUBITZER, 2007). O encéfalo pequeno se assemelha ao dos répteis e dos primeiros mamíferos, que também eram lisos, permanecendo assim até 50 a 60 milhões de anos atrás (BECK et al., 1996).

Entretanto, com base no método cladístico, informações sobre a organização do córtex somatossensorial das espécies de outros grupos dos mamíferos (Euterianos e Prototerianos)

também foram consideradas em nosso estudo para se inferir a organização cortical do sistema sensório-motor no ancestral comum dos mamíferos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

2.1.1 Verificar se o sistema sensorio-motor do gambá *Didelphis aurita*, uma espécie com encéfalo de características primitivas, apresenta áreas somatossensoriais semelhantes às das de mamíferos com o neocórtex complexo ou se representa uma organização simplificada deste sistema.

2.1.2 A partir de então, avaliar como a área somatossensorial do gambá *Didelphis aurita* poderia representar um estágio do parcelamento de conexões proposto por Ebbesson (1980), observando se as projeções talâmicas somestésicas e motoras convergem ou não para as áreas estudadas.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Estudar as projeções tálamo-corticais para as áreas S1 e SC, em especial dos núcleos motores VL, VA e VM, e do núcleo somestésico VB. As projeções tálamo-corticais para a área imediatamente anterior à S1 foram exploradas previamente na tese de mestrado da presente aluna (ANOMAL, 2004) e por Santiago Martinich (MARTINICH et al., 2000).

2.2.2 Para tanto, iremos antes confirmar a segregação arquitetônica dos núcleos talâmicos motores e somatossensoriais através das técnicas de citocromo-oxidase, NADPH-diaforase, calbindina e parvalbumina.

2.2.3 Estudar as projeções córtico-corticais para as áreas S1 e SC.

2.2.4 Para alcançar este objetivo, iremos identificar as bordas precisas das áreas S1 e SC utilizando concomitantemente metodologias eletrofisiológicas e arquitetônicas (mieloarquitetura).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

O animal escolhido como modelo experimental foi o gambá da espécie *Didelphis aurita*. Este animal é um marsupial silvestre encontrado nas florestas do Rio de Janeiro. Os animais utilizados foram doados pelo Centro de Triagem do IBAMA (licenças no. 20/06-CT-RJ, 61/06-CT-RJ) ou capturados nas matas de floresta atlântica de Guapimirim - Rio de Janeiro (licença do IBAMA no. 87/05-RJ). Estes animais permaneceram no biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na Universidade Federal do Rio de Janeiro até a ocasião da cirurgia. Todos os procedimentos e protocolos experimentais abaixo descritos foram aprovados pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (CAUAP protocolo no. 053-06-2005).

Dos 19 gambás utilizados no total, obtivemos sucesso em 8 gambás adultos, de ambos os sexos e peso entre 1,4 e 2,8 kg. Dentre estes animais, 2 animais foram usados exclusivamente para a análise arquitetônica do tálamo e córtex, enquanto que os outros seis foram utilizados ou para experimentos de eletrofisiologia ou para a injeção de neurotraçadores (Tabela 1).

	Mapeamento Eletrofisiológico	Injeção de Neurotraçador	Arquitetura Talâmica
Caso 0409	-	Sim	-
Caso 0506	Sim	-	Sim
Caso 0602	Sim	Sim	Sim
Caso 0629	Sim	-	Sim
Caso 0630	-	-	Sim
Caso 0631	-	-	Sim
Caso0701	Sim	Sim	Sim
Caso 0705	Sim	Sim	Sim

Tabela 1. Resumo dos procedimentos realizados em cada caso. Em todos os experimentos de injeção de neurotraçadores analisados os núcleos talâmicos foram identificados através da coloração de Nissl e/ou citocromo-oxidase. Nos casos 0630 e 0631, os núcleos talâmicos foram identificados através de Nissl, citocromo-oxidase, NADPH-diaforase, calbindina e parvalbumina.

3.2. Procedimentos gerais

Os experimentos de mapeamento eletrofisiológico e injeção de neurotraçadores envolveram duas etapas, separadas entre si por um intervalo de 10 a 12 dias de sobrevivência. Na primeira etapa, os limites rostral e caudal do córtex somestésico primário (S1) foram identificados por um breve registro eletrofisiológico multiunitário. Ainda nesta etapa, foram realizadas injeções de neurotraçadores retrógrados em S1 e na área somatossensorial caudal (SC). Na segunda etapa era feito um mapeamento completo das áreas injetadas, com maior densidade de penetrações, para a identificação mais detalhada dos limites de S1 e sua organização topográfica. Após este segundo mapeamento, os animais eram perfundidos, e o cérebro submetido ao processamento histológico, para posterior análise. Animais adicionais, não submetidos ao registro eletrofisiológico nem à injeção de neurotraçadores foram processados para obtenção do material histológico de caracterização arquitetônica do tálamo e

do córtex.

Tais procedimentos serão detalhados nas seções a seguir.

3.3 Preparação pré-cirúrgica e anestesia

No dia precedente à primeira etapa cirúrgica do experimento, o animal era tratado com a administração de 0,5 ml da combinação de benzilpenicilina, diidroestreptocina base e estreptomicina base via intramuscular (I.M.) (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte FORT DODGE, 0,58 mg/ml, I.M.) como procedimento profilático para possíveis infecções durante o período de sobrevida. Adicionalmente, 0,3 ml de vitamina K (Kanakion, Roche, 10 mg/ml, I.M.) era administrado também por via intramuscular, como profilaxia para hemorragia. Os instrumentos cirúrgicos eram esterilizados com Germekil (Johnson Wax Professional) ou autoclavados.

Para que o animal pudesse ser manipulado, de modo a permitir a sua preparação cirúrgica, uma dose anestésica única de 60 mg/kg de Tiopental sódico (Thionembatal 0,5g, Abbott) era injetada por via intraperitoneal. Este protocolo anestésico foi desenvolvido durante este estudo para a obtenção de um nível anestésico adequado para a realização da cirurgia, e que ainda permitisse a identificação de respostas celulares no registro eletrofisiológico e garantisse a recuperação do animal no período de sobrevida. A dose utilizada permitia um nível anestésico ideal para os procedimentos cirúrgicos por aproximadamente 4 horas. Não era possível recuperar os animais após administração de doses totais superiores a 60 mg/kg por experimento.

Nos animais 0409 e 0602, utilizamos um protocolo de anestesia diferente do descrito acima. Nestes dois casos, o nível anestésico fora alcançado com uma dose de 2 ml/kg de uma combinação de 9 mg/ml de alfaxolone e 3 mg/ml de alfadolone (Saffan, Schering-Plough, I.M.) injetada via intramuscular na pata traseira. Este anestésico é específico para uso veterinário

(gatos) e sua aplicação em gambás fornece excelentes resultados (OLIVEIRA, 2001). No entanto, sua fabricação foi descontinuada recentemente. Nestes casos, para a administração da dose de manutenção do anestésico, uma veia superficial na parte lateral da cauda do animal sofria incisão após breve dissecação da pele. Nesta região introduzia-se uma cânula endovenosa conectada a uma bomba de infusão contínua (Harvard Apparatus) ajustada para um fluxo de 1,0 ml/kg/h.

Visando diminuir a produção de muco nas vias respiratórias, 0,1 ml de sulfato de atropina (Ariston; 0,25 mg/ml; I.M.) era injetado logo após a indução anestésica. Da mesma forma, o edema cerebral durante a cirurgia era prevenido ou minimizado com 0,5 ml de dexametasona (Decadron, Prodome, 4 mg/ml).

Uma vez induzida a anestesia, o animal era submetido à tricotomia na pata traseira, no tórax e no escalpo. Em seguida, o animal era conectado a um sistema de registro eletrocardiográfico por meio da introdução de duas agulhas de seringa no tórax para a monitoração da frequência cardíaca. Uma cânula endotraqueal untada de gel anestésico (Lidocaína 2%, União Química) era introduzida na traquéia com o auxílio de um laringoscópio pediátrico, para a eventual necessidade de ventilação artificial. A temperatura interna do animal era controlada por meio de um termorregulador retal (Frederick Haer Inc.) e mantida a 34,5 °C por um cobertor elétrico.

Na segunda etapa do experimento, cerca de 10 dias após, o animal era anestesiado com uma dose inicial de 1,25 g/kg uretano (Sigma-Aldrich) via intraperitoneal (I.P.). Este anestésico era mantido até o fim da sessão de registro, com até duas doses adicionais de manutenção de 0,42 g/kg I.P., aplicadas quando o animal superficializava o nível anestésico. Geralmente, as doses de manutenção eram administradas duas e quatro horas após a aplicação da dose inicial, após o que, o animal costumava manter o nível anestésico até o final do experimento.

3.4 Procedimentos Cirúrgicos

Inicialmente o animal era posicionado em um sistema estereotático de Horsley-Clarke (La Precision Cinematographique), devidamente adaptado para a espécie (OSWALDO CRUZ e ROCHA-MIRANDA, 1968). A craniotomia era precedida pela incisão da pele e afastamento do músculo temporal com o auxílio de um eletrocautério (Medicir, Medical-cirurgia-Ltda). Em todos os casos, a incisão ocorria na superfície dorsolateral do hemisfério esquerdo do animal.

O crânio era perfurado com o auxílio de uma broca cirúrgica odontológica (Promeco Ltda) e de um estereomicroscópio cirúrgico (DF-Vasconcelos, nº 1189). Durante este procedimento, uma solução estéril de cloreto de sódio a 0,9 % era aplicada sobre o crânio para dissipar o calor induzido pelo atrito da broca cirúrgica com o osso. A janela de abertura, de aproximadamente 15 mm, buscava expor a fissura orbitária e todo o córtex parietal, sendo inicialmente estimada com o auxílio das coordenadas estereotáticas descritas no atlas do cérebro do gambá (OSWALDO CRUZ e ROCHA-MIRANDA, 1968). No eixo médio-lateral a abertura estendia-se de uma área próxima à linha média até a região mais lateral exposta visualmente pelo afastamento do músculo temporal. Por fim, a dura-máter era cuidadosamente cortada e afastada para as bordas ósseas para permitir que a superfície do córtex pudesse ser visualizada.

A superfície cortical com seu padrão vascular era fotografada por uma câmera digital (Sony, Cyber-shot 3.3 mega pixels) posicionada sobre a ocular do microscópio cirúrgico. O contraste e brilho da imagem obtida eram ajustados em um programa de edição de imagens (Adobe Photoshop 7.0, Adobe Systems Inc.). O padrão vascular presente na fotografia impressa servia como referência para o posicionamento dos sítios de penetração do eletródio e das injeções de neurotraçadores.

Após a exposição cirúrgica do córtex, gotejava-se solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% diretamente sobre o córtex para prevenir seu ressecamento. Quando eventualmente ocorria hemorragia proveniente do tecido ósseo, as bordas ósseas eram cobertas por uma cera específica para hemostasia óssea (Bone Wax W-31, Ethicon).

Ao término dos procedimentos experimentais, o córtex era protegido com uma lente de contato estéril (Astralens, Methafilcon 55% H₂O) recortada para o adequado encaixe sobre a superfície cortical exposta. A seguir, as bordas da dura-máter eram reposicionadas sobre a superfície da lente de contato e o espaço gerado pela abertura óssea era preenchido com gel-foam (Pharmacia & Upjohn Company). Uma massa de material acrílico era moldada e posicionada sobre a janela de abertura do crânio, de modo a recobrir a região do córtex exposta, evitando assim possíveis lesões mecânicas. Em seguida, o músculo e a pele eram suturados de volta à sua posição original. Ao término do experimento, um adesivo de Fentanil transdérmico era fixado na pata posterior do animal para prevenir a dor pós-cirúrgica.

Os mesmos cuidados pré-cirúrgicos descritos foram mantidos no experimento terminal (segunda cirurgia), com exceção dos procedimentos de esterilização do material, agora desnecessários. Na segunda etapa, o animal era anestesiado e reposicionado no sistema estereotáxico. Os tecidos moles eram afastados ou retirados com o eletrocautério; e a cobertura acrílica era retirada para re-expor o córtex parietal anterior e a fissura orbitária. Quando necessário, a craniotomia era aumentada com um saca-bocado, para maior exposição do tecido cortical a ser registrado.

3.5 Registro eletrofisiológico

O registro da atividade neuronal realizava-se com microeletrodos de tungstênio

(Frederick Haer Inc. e Micro Probe Inc.) revestidos com verniz e com uma ponta cônica exposta com diâmetro menor que 1 μm . A impedância dos eletrodos variava de 800 KOhms à 1,2 Mohms, segundo o fabricante. A escolha do eletrodo buscava favorecer aqueles que permitiam um registro com características multi-unitárias. O eletrodo era preso a um segurador de acrílico sustentado por um micromanipulador mecânico. O manipulador era posicionado no trilho do aparato estereotáxico, de forma a permitir penetrações perpendiculares à superfície cortical.

O sinal elétrico era amplificado por intermédio de um pré-amplificador de alta impedância (PS11J, Grass Instruments), próximo ao eletrodo, e de um amplificador de alto ganho (RPS1070, Grass Instruments). Em seguida, o sinal era enviado para um osciloscópio (2120, BK Precision, Model) e para um monitor de áudio. O sinal elétrico era, portanto, convertido em um sinal sonoro cuja intensidade variava conforme a maior ou menor atividade da região de tecido cortical registrada. Nestas condições de registro, o sinal obtido consiste na superposição da atividade elétrica produzida por corpos celulares e fibras localizadas na proximidade do microeletrodo.

Na primeira etapa experimental, o registro eletrofisiológico visava apenas a identificação grosseira da representação da pata dianteira de S1 e dos bordos entre as áreas S1, SR e SC. O mapeamento completo não era realizado na primeira cirurgia para reduzir o tempo cirúrgico e facilitar a recuperação do animal durante o período de sobrevivência. Na segunda etapa, os mesmos procedimentos e critérios eletrofisiológicos descritos eram mantidos, com exceção do tempo da sessão de registro que durava mais de 10 horas.

O primeiro sítio de penetração escolhido localizava-se a cerca de 2,5 mm da fissura orbitária, objetivando o centro de S1. Quando as respostas à estimulação mecânica apresentavam características de S1 (vide descrição abaixo), prosseguiam-se as penetrações em

uma fileira a intervalos médios de 500 μm entre cada sítio, sendo os sítios de registro orientados paralelamente à linha média.

Os tipos de estímulos somatossensoriais testados no mapeamento incluíram: 1) toque leve sobre a pele ou manipulação dos pelos ou vibrissas; 2) toque profundo e pressão da pele; e 3) movimentação passiva das articulações (propriocepção). Os estímulos sobre a pele em geral eram aplicados por uma vareta de madeira. Durante a estimulação profunda da pele, tomava-se o cuidado de minimizar o movimento das articulações. Com exceção do toque leve superficial da pele, todas as respostas aos outros estímulos foram consideradas respostas à estímulos profundos, incluindo os estímulos de propriocepção.

Os critérios eletrofisiológicos para se estimar os limites rostral e caudal a partir de S1 incluíram: 1) a diminuição ou ausência da resposta ao estímulo somestésico e 2) a mudança na modalidade somestésica da resposta evocada (de cutânea superficial para profunda, por exemplo) (BECK et al., 1996). A intensidade da resposta neuronal mediante o estímulo somestésico era avaliada auditivamente, sem a avaliação final dos picos de resposta. A inversão topográfica não foi um critério utilizado pois não havia respostas nas áreas imediatamente rostral e caudal à S1.

3.6 Injeção dos Neurotraçadores

As injeções foram efetuadas com os neurotraçadores fluorescentes fluoro-ruby (FR, conjugado à dextrana de 3 kD, Molecular Probes, Inc.), fluoro-emerald (FE, conjugado à dextrana de 3 kD, Molecular Probes, Inc.) e o cristal de diamidino yellow (DY, Sigma). Todos os três traçadores escolhidos eram considerados retrógrados. Os traçadores retrógrados são preferencialmente captados pelos axônios e transportados para o corpo celular que originou a

projeção (VERCELLI et al., 2000). A injeção deste tipo de traçador permite identificar a localização de neurônios que projetam para a área injetada.

Estes traçadores possuem um espalhamento menor do que o HRP (REINER et al., 2000; VERCELLI et al., 2000) utilizado por Donoghue e Ebner (1981) para analisar as conexões tálamo-corticais de S1. Outra vantagem dos neurotraçadores fluorescentes é que em um mesmo animal podem ser injetados traçadores sensíveis a diferentes comprimentos de onda, para rastrear, simultaneamente, as conexões de áreas diferentes (VERCELLI et al., 2000).

Os traçadores fluorescentes estão quimicamente associados a dextranas, que são polissacarídeos hidrofílicos conjugados a moléculas fluorescentes distintas ou biotiniladas (VERCELLI et al., 2000). As dextranas fluorescentes diferem umas das outras no seu peso molecular e no fluorocromo ao qual estão acopladas (VERCELLI et al., 2000). No caso do fluoro-ruby, a dextrana é conjugada com rodamina e no fluoro-emerald com fluoresceína. As dextranas fluorescentes diferem entre si pelo peso molecular (VERCELLI et al., 2000). Por isso, utilizamos os traçadores de 3kD, de menor peso molecular (3 kD), que são considerados ideais para análise de marcação retrógrada.

As injeções foram realizadas em S1 e SC com seringas Hamilton de 1 e 10 μ l. Injeções diferentes dentro de S1 foram realizadas buscando a identificação de possíveis diferenças no padrão de conexão. Cada injeção constava de um volume total de 0,4 a 1 μ l. A seringa permanecia posicionada em três profundidades diferentes no córtex, que variou de 500 μ m a 1,5 mm a partir da superfície cortical (Tabela 4 - em resultados). Em cada uma das três profundidades escolhidas, a seringa permanecia de 10 à 20 minutos por injeção.

O tempo de sobrevivência esperado para que o neurotraçador fluorescente se transportasse retrogradamente foi de 10 a 12 dias. Somente então, realizou-se o experimento terminal para o mapeamento detalhado de S1, SR e SC.

3.7 Perfusão, dissecação e achatamento

Ao final da sessão de registro eletrofisiológico, era administrada uma dose letal de 10 ml de pentobarbital (30 mg/ml) via I.P. Após verificar-se a ausência de reflexos dolorosos, iniciava-se os procedimentos de perfusão com a realização de uma toracotomia. A seguir, o pericárdio era seccionado e o músculo cardíaco exposto para a aplicação de um anticoagulante - heparina sódica (5.000 UI/ml Liquemine, Roche). A artéria aorta era amarrada acima de sua origem no ventrículo esquerdo. Em seguida, a artéria era perfurada, a vazante do nó, para a introdução de uma cânula, que, depois de posicionada corretamente, era amarrada na própria aorta. Através desta cânula, as soluções de perfusão eram introduzidas no sistema vascular que irriga o cérebro. Por fim, o átrio direito era também perfurado por uma pequena incisão, visando o escoamento do sangue e das soluções que retornavam pelo sistema venoso.

As soluções de perfusão consistiam de: 1) 300 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9 % (solução salina); 2) 300 ml de solução fixadora de paraformaldeído a 4 % em tampão fosfato 0,1 M; 3) 300 ml de solução crioprotetora de sacarose 10%; e 4) 300 ml de sacarose a 30 %, ambas em tampão fosfato 0,1 M.

Ao término da perfusão, o cérebro era retirado da caixa craniana. A seguir, o telencéfalo esquerdo (hemisfério injetado) era separado cuidadosamente da substância branca e demais estruturas subcorticais para ser achatado (ou aplainado). No achatamento, comprimia-se o córtex entre duas lâminas de vidro, espaçadas entre si por pequeno pedaço de lâmina histológica para que não houvesse uma excessiva deformação durante o processo de achatamento. O diencéfalo tornava-se um bloco separado de tecido nervoso, a ser cortado coronalmente.

O material era então colocado em uma solução de pós-fixação (paraformaldeído 4% mais sacarose 30%) por um período de 1 dia, com exceção do hemisfério direito que, em alguns

casos, não foi processado nos experimentos de injeção de neurotraçador.

O mesmo protocolo de perfusão descrito acima foi utilizado nos experimentos de análise arquitetônica. Nestes casos, durante a dissecação, os hemisférios eram separados e o telencéfalo direito era cuidadosamente separado do diencéfalo.

3.8 Criomicrotomia

Para a criotomia, o isocórtex esquerdo previamente achatado e o diencéfalo foram congelados em dois blocos diferentes. O congelamento foi realizado com a imersão destes em Tissue-teck OCT (Sakura) envolvido por gelo seco a -70°C .

Os blocos foram a seguir posicionados em um criostato (Leica CM1850) durante cerca de uma hora para atingirem a temperatura de -18°C , ideal para a microtomia.

3.8.1 Isocórtex

O plano de corte dos hemisférios achatados era tangencial à superfície cortical, utilizando-se uma espessura de $40\ \mu\text{m}$. Os cortes resultantes eram individualmente imersos em recipientes separados contendo solução de tampão fosfato $0,1\ \text{M}$ ($\text{pH} = 7,2-7,4$). Cortes alternados eram colhidos em séries distintas destinadas à análise de fluorescência e ao processamento para mielina (GALLYAS, 1979), sendo esta última acondicionada por um período mínimo de 30 dias em formalina a 10% antes de ser submetida ao processamento histológico. Eventualmente, nos casos de análise arquitetônica não-submetidos ao registro eletrofisiológico e injeção, o telencéfalo direito era seccionado no plano parasagital para a análise histológica do córtex parietal anterior.

3.8.2 Diencéfalo

Os cortes coronais de 40 ou 60 µm provenientes do diencéfalo eram recolhidos em, no mínimo, duas séries alternadas diferentes, geralmente uma para a análise de fluorescência e a outra para a coloração de Nissl. No caso 0629, uma terceira série foi selecionada para a reação de citocromo-oxidase. Nos casos 0630 e 0631, realizamos também imunohistoquímica para calbindina e parvalbumina. Nas colorações de Nissl, os cortes eram conservados em recipientes contendo formalina a 10%. Para as séries de fluorescência, citocromo-oxidase e outras reações, os cortes eram recolhidos em recipientes contendo tampão fosfato 0,1 M.

3.9 Processamento Histológico

3.9.1 Cortes para análise em microscopia de fluorescência

Os cortes reservados para a microscopia de fluorescência foram montados em lâminas histológicas gelatinizadas em até 1 dia após a microtomia. Após os cortes terem secado sobre as lâminas, glicerol (VETEC) a 10% foi gotejado sobre a lâmina e os cortes foram cobertos com lamínula, e vedados com esmalte de unhas. O material era conservado sob refrigeração à 4° C.

3.9.2 Coloração de Nissl para análise da citoarquitetura

As secções destinadas à coloração de Nissl eram mantidas por um período mínimo de sete dias em solução de formalina a 10 %. Após este período mínimo de fixação das secções, os cortes eram montados em lâminas histológicas gelatinizadas, e deixadas para secar por no mínimo 24 horas.

Os cortes eram então desidratados em soluções de etanol nas seguintes concentrações: 75 %, 95 % e 100 %. As lâminas permaneciam por 5 minutos em cada solução, sendo, então, mergulhadas por 10 minutos em solução desengordurante de etanol 100 % mais clorofórmio

numa proporção de 1:1. Os cortes eram novamente hidratados nas soluções de etanol numa seqüência de concentração a 100 %, 95% e 75 %, por cinco minutos em cada. Logo após, durante um minuto, todos os cortes eram lavados em água destilada para serem imersos na solução de cresil violeta a 37-40° C por 1 a 2 minutos. Novamente, as lâminas eram passadas na água destilada, até que todo o excesso de cresil violeta fosse lavado. Em seguida, os cortes passavam pelo etanol a 95 % com 5 gotas de ácido acético, por 3 a 6 minutos, com o intuito de diafanizar a coloração de cresil violeta. Por fim, os cortes montados percorriam uma seqüência de soluções de etanol a 95 %, etanol a 100 %, etanol a 100 % mais ácido butílico (proporção de 1:1), por 3 minutos em cada. Antes de serem cobertas com Entellan (Merk) como meio de montagem, as lâminas eram desidratadas em xilol por 5 minutos.

3.9.3 Impregnação da mielina pela prata e mieloarquitetura

A camada granular (IV) de áreas corticais sensoriais primárias são geralmente mais mielinizadas do que as de áreas de segunda ordem e/ou associativas. O protocolo utilizado (GALLYAS, 1979 modificada por JAIN et al., 1988) visa revelar esta mielinização através da impregnação pela prata e sua posterior revelação, criando-se um contraste entre as áreas corticais com diferentes intensidades de mielinização.

Os cortes histológicos separados para o protocolo de Gallyas eram mantidos em formalina a 10 % por no mínimo 30 dias. Inicialmente, os cortes eram lavados em água destilada por cinco minutos e em seguida, eram incubados em uma solução 2:1 de piridina/anidrido acético, por trinta minutos. Em seguida, os cortes eram lavados três vezes por três minutos em ácido acético a 0,5 %. Logo após, os cortes eram colocados em prata amoniacal e mantidos por uma hora. Esta solução consiste de água destilada, nitrato de prata, nitrato de amônia e hidróxido de sódio. Novamente, os cortes eram lavados em ácido acético a 0,5 %. Na

etapa final, os cortes eram colocados seguidamente em: 1) solução reveladora com carbonato de sódio, nitrato de prata, nitrato de amônia, ácido tungstosílico, água destilada e formalina a 35% por 5 a 10 minutos; 2) água destilada para a lavagem dos cortes; 3) solução “branqueadora” de ferricianeto de potássio (KFeCN) e 4) solução fixadora de tiosulfato de sódio (NaThioS). Após cinco minutos no fixador, os cortes eram lavados em água destilada por três vezes, para em seguida serem montados em lâmina gelatinizada em um meio de gelatina e álcool a 95%.

3.9.4 Histoquímica para citocromo-oxidase e NADPH-diaforase

Os protocolos abaixo utilizados se baseiam no conceito de que a presença das enzimas citocromo-oxidase e NADPH-diaforase no tecido pode ser revelada pela conversão de um substrato aplicado ao tecido, o cromógeno, o qual resulta em um produto corado no final da reação (HOROBIN, 1982).

3.9.4.1 Citocromo-oxidase (WONG-RILEY, 1979)

As secções separadas para a reação de citocromo-oxidase eram incubadas “overnight” em uma solução contendo: 50 ml de tampão fosfato 0,1 M; 5g de sacarose; 25 mg de citocromo C; 13 mg de diaminobenzidina (DAB, Sigma) e 19 mg de catalase. Os cortes eram protegidos da luz e monitorados inicialmente de 1 em 1 hora para verificar a velocidade da reação. No dia seguinte, caso os cortes não tivessem atingido a intensidade de reação adequada, uma nova solução era preparada e os cortes eram reincubados.

3.9.4.2 NADPH-diaforase (SCHERER-SINGLER et al., 1983)

Os cortes a serem reagidos para NADPH-diaforase eram recolhidos após a criotomia em tampão fosfato 0,1 M. Antes da reação todas as secções eram lavadas 3 vezes por 10 minutos em tampão tris 0,1 M.

Após a lavagem, os cortes eram incubados em uma solução de incubação. Para preparar esta solução, inicialmente misturava-se 50 ml de solução de tris 0,05 M (pH não corrigido) com 300 mg de D-L-Ácido Málico (0,4 M). Em seguida era ajustado o pH da solução resultante para 8.0 com NaOH 5N. Após o ajuste de pH, era acrescentado à solução: 1) 15 mg de nitro blue tetrazolium (SIGMA, catálogo no. N-6876); 2) 0,5 ml de dimetil-sulfóxido (DMSO, SIGMA, catálogo no. D-5879); 3) 0,5 ml Triton X-100; 4) 18 mg de cloreto de manganês, 50 mg de beta-NADPH (SIGMA, catálogo no. N-0505).

Os cortes permaneciam na solução sob agitação constante ao abrigo da luz com monitoração de 1 em 1 hora para verificar a velocidade da reação. Caso os cortes não reagissem nas primeiras 6 horas, permaneciam incubados “overnight” e sendo retirados da solução de incubação no dia seguinte.

3.9.5 Imunohistoquímica para calbindina e parvalbumina

Células de determinados sistemas bioquímicos possuem interações específicas entre regiões protéicas com determinados grupos químicos particulares (HOROBIN, 1982). Valendo-se deste princípio, as técnicas imunohistoquímicas utilizam-se preferencialmente da ligação antígeno-anticorpo para “marcar” determinadas proteínas. A calbindina e a parvalbumina são proteínas que podem se ligar a anticorpos específicos revelados posteriormente na reação.

Todos os cortes separados para as séries de calbindina e parvalbumina eram lavados em uma solução de tampão fostato salina na diluição de 1:10 (PBSB) 2 vezes por 10 minutos e uma vez por 60 minutos antes do início da reação.

A seguir os cortes de cada série eram incubados no anticorpo primário por aproximadamente 22 horas sob agitação constante. Os anticorpos primários utilizados eram do kit Vector, soro de cavalo. A diluição do anticorpo primário para calbindina era de 1:2500 e de 1:3000 para parvalbumina. Em seguida os cortes eram lavados em PBSB três vezes por 10 minutos e então, incubados no anticorpo secundário (kit Vector PK4002, 1:200) por 1 hora. Antes da próxima etapa de revelação das células marcadas, os cortes eram novamente lavados três vezes por 10 minutos. No preparo para a revelação, as secções eram incubadas na solução resultante do kit ABC (Vector) por 1 hora. Esta solução continha 15 ml de diluente, três gotas do reagente “A” e três gotas do reagente “B” (kit ABC Standard da Vector). Após o preparo, era deixada em repouso por cerca de 20 minutos para formar o complexo avidina-biotina que caracteriza a solução resultante “C”. Após a incubação na solução “C”, os cortes eram lavados três vezes por 10 minutos. Por fim, os cortes eram revelados na solução de DAB 0,05% por aproximadamente três minutos. Esta solução consistia em DAB (Sigma-Aldrich), PBSB e peróxido de hidrogênio a 3%.

3.10 Análise e Documentação dos resultados

3.10.1 “Plotagem” das células marcadas pela fluorescência

Os cortes montados para fluorescência foram analisados em um microscópio Leitz (Orthoplan 2) dotado de uma fonte de epifluorescência e filtros adequados para a observação das células marcadas retrogradamente pelos traçadores fluorescentes.

Os cortes eram desenhados com o auxílio de um codificador dos eixos x e y da platina do microscópio, conectado a um computador dotado do programa de plotagem celular MD-Plot versão 3.3 (Minnesota Datametrics Corporation). A posição dos corpos celulares das células marcadas retrogradamente no tálamo e no córtex era digitalizada. Adicionalmente, eram desenhados neste sistema o contorno dos sítios de injeção, vasos sanguíneos, lesões e o contorno dos cortes histológicos onde as células marcadas eram encontradas. Os desenhos eram feitos com objetivas de 10x (tálamo) e 25x (córtex aplanado).

O cálculo da porcentagem de células marcadas retrogradamente no tálamo foi realizada nos casos mais completos. A contagem final foi feita em todos os cortes plotados, incluindo todos os núcleos talâmicos identificados. O resultado final foi ilustrado mostrando-se a porcentagem de células marcadas do núcleo somatossensorial (VB) e dos núcleos motores (VL, VA e VM). A totalidade do restante dos núcleos talâmicos foi considerada em conjunto.

3.10.2 Delimitação dos núcleos do tálamo

Os núcleos talâmicos foram identificados em secções coradas pelo método de Nissl e/ou citocromo-oxidase. A delimitação dos núcleos iniciou-se com o ajuste do ganho das secções para permitir o alinhamento com os desenhos resultantes da plotagem da fluorescência. Os desenhos da arquitetura talâmica foram realizados com o auxílio de um microprojeter de lâminas histológicas (Ken-Vision) ou de um aristofoto (Eleitz Wetzlar). A sobreposição entre o corte corado para substância de Nissl e o corte adjacente usado para análise de fluorescência era baseada no contorno da secção e na posição dos vasos sanguíneos presentes em ambos os cortes. Uma vez realizada esta sobreposição, os limites dos núcleos eram desenhados sobre o desenho da plotagem das células marcadas. O desenho resultante desta sobreposição era escaneado e transferido para o programa gráfico Canvas X (ACD-Systems) para acabamento final.

3.10.3 Delimitação das áreas corticais

As áreas corticais foram identificadas pela delimitação das bordas evidenciadas no método de marcação de mielina. A delimitação das áreas corticais foi possível através da fotomicrografia do melhor corte corado pela mielina que permitia a visualização das áreas corticais (2,5x). Os contornos de todas as áreas identificadas eram realizados no programa Canvas X, através do qual foi possível obter informações do tamanho da área ocupada por cada área cortical e pelo neocórtex do animal. Em alguns casos, mais de um corte eram desenhados no arístofoto e o resultado da sobreposição mostrando os limites arquitetônicos era utilizado para a análise.

Uma vez identificadas as bordas eletrofisiológicas e mieloarquitetônicas das áreas S1, SR e SC, todos os cortes de fluorescência plotados no MD-Plot eram sobrepostos aos mapas eletrofisiológico e arquitetônico para unir as informações de marcação fluorescente retrógrada com a bordas das áreas. Esta sobreposição era realizada no programa Canvas X, baseada no contorno das secções, na posição dos vasos sanguíneos e dos sítios de injeção.

A medida da área ocupada no neocórtex por S1, V1, A1, e córtex frontal foi obtida automaticamente a partir da criação de um contorno em torno destas áreas - recurso disponível no programa Canvas X.

3.10.4 Fotomicrografia

Os cortes destinados à análise arquitetônica do córtex e tálamo foram fotografados numa câmera acoplada ao microscópio Leitz (Orthoplan 2) sob a objetiva de 2,5x, 5x e 6,3x. Os ajustes de imagem antes da montagem das figuras eram feitos no programa Adobe Photoshop

versão 5.5. A fotografia resultante era transferida para o programa gráfico Canvas X para tratamento final final.

4. RESULTADOS

Nos resultados que se seguem, objetivamos descrever as projeções tálamo-corticais e cortico-corticais para as áreas somatossensoriais S1 e SC do gambá *Didelphis aurita*. Para tanto, utilizamos mais de um critério de delimitação de bordas corticais, cujos resultados serão descritos a seguir. Primeiramente, nós descreveremos as subdivisões arquitetônicas do neocórtex do gambá *Didelphis aurita* através da técnica de Gallyass (mieloarquitetura). Com o intuito de definir a região onde foram injetados os neurotraçadores, descrevemos também, as respostas eletrofisiológicas que caracterizam as áreas S1, SR e SC. Os dados de mapeamento foram corroborados pela sobreposição com a mieloarquitetura obtida.

Em seguida, nós reanalisaremos as subdivisões arquitetônicas do tálamo motor e somatossensorial desta mesma espécie, comparando a marcação obtida pelo método clássico de Nissl, com as técnicas de citocromo-oxidase, NADPH-diaforase, calbindina e parvalbumina, utilizadas pela primeira vez no tálamo desta espécie, para certificarmos-nos dos limites dos núcleos talâmicos que projetam para o córtex somestésico.

Por fim, após o reconhecimento das áreas corticais e dos núcleos talâmicos a serem estudados, descreveremos o padrão de projeções talâmicas e corticais através de injeções de neurotraçadores nas áreas S1 e SC do neocórtex do gambá *Didelphis aurita*. As injeções de neurotraçadores em SR desta espécie foram realizadas anteriormente por Santiago Martinich (1996) na região pós-orbital e também por Donoghue e Ebner (1981). A área SC foi enfatizada no nosso estudo para verificarmos a possível homologia desta região com outras áreas somatossensoriais caudais à S1 características do sistema sensório-motor de mamíferos com encéfalos complexos, tais como as áreas 1, 2 ou córtex parietal posterior (KAAS, 2004).

4.1 Caracterização Anátomo-Funcional das áreas somestésicas do *Didelphis aurita*

4.1.1. Mieloarquitetura

A mieloarquitetura do córtex do gambá *Didelphis aurita* foi analisada através de secções tangenciais, as quais incluíram cortes desde a superfície pial até a substância branca, processados através da técnica de Gallyas (1979) modificada por Jain et al. (1988). Foram escolhidos para ilustração fotográfica aqueles cortes que melhor permitiram a identificação das bordas de áreas sensoriais.

As áreas sensoriais primárias destacam-se por serem mais densamente marcadas para mielina do que o restante do neocórtex (Figura 11). Nos quatro casos analisados, o córtex visual primário sobressaiu-se como o mais extenso, seguido do córtex somatossensorial primário S1 (Figura 12a-d). Em geral, o córtex auditivo tendeu a ocupar uma menor porção do neocórtex, assim como o córtex frontal (não-sensorial), que também apresentou densa marcação para mielina (Figura 11a-c). A região frontal, foi intensamente marcada pela técnica de Gallyass e parece incluir a área F4 citada por Martinich et al. (2000).

De especial interesse para o nosso estudo, as áreas S1, SR e SC puderam ser facilmente distinguidas entre si pela marcação de mielina. Conforme descrito acima, a área S1 mostrou-se densamente marcada (Figura 11). A região mais clara, imediatamente rostral à S1 e caudal à fissura orbitária foi identificada como SR (BECK et al., 1996). A área SC, apresentou intensa marcação de mielina, embora tenha marcado menos densamente do que S1. Uma exceção ocorreu no caso 0705 (Figura 11b), onde a área SC mostrou-se muito levemente marcada.

O córtex peristriado no *Didelphis aurita* foi identificado entre V1 e o córtex parietal, de acordo com Martinich et al. (2000). Ainda na região medial do córtex peristriado, foi possível observar uma região altamente mielinizada e de formato arredondado (Figura 11a e 11c) semelhante àquelas

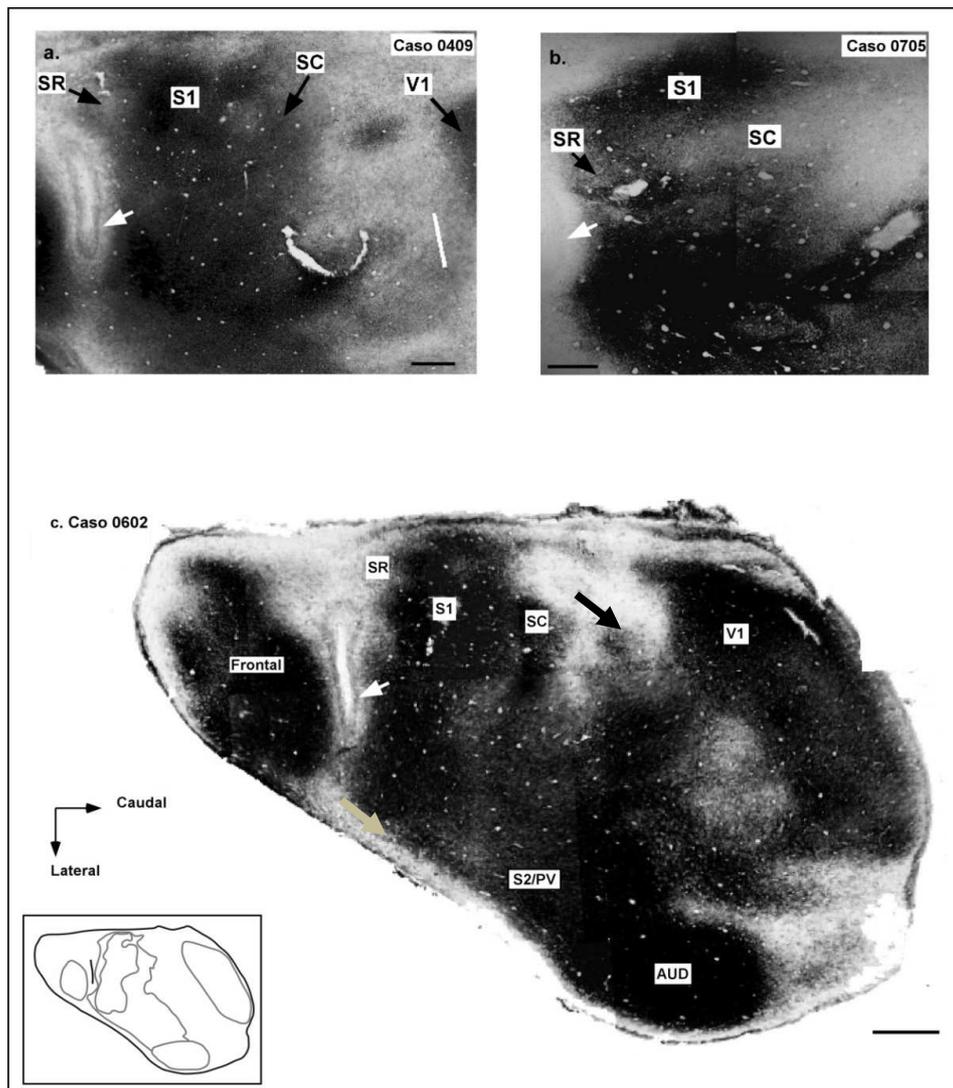


Figura 11. Fotomicrografia das áreas sensoriais do gambá *Didelphis aurita* reveladas pela mioarquitetura. Em (a) e (b) têm-se as áreas S1, SR e SC em maior detalhe, em dois casos diferentes. A área S1, central, é a mais densamente marcada para mielina (em preto), enquanto que as áreas SR e SC são caracterizadas por uma marcação um pouco menos densa do que a de S1. Em (c), um terceiro exemplo, em menor aumento, mostrando V1 e o córtex auditivo (AUD) que também apresentam intensa marcação para mielina. O desenho esquemático no canto inferior esquerdo da figura ilustra as subdivisões propostas para o caso 0602. A seta branca nos três casos aponta para a fissura orbitária. As setas em preto e cinza representam, respectivamente, a localização do córtex periestriado e parte da ínsula. Barra de calibração em (a) e (b) = 1 mm; em (c) = 2 mm.

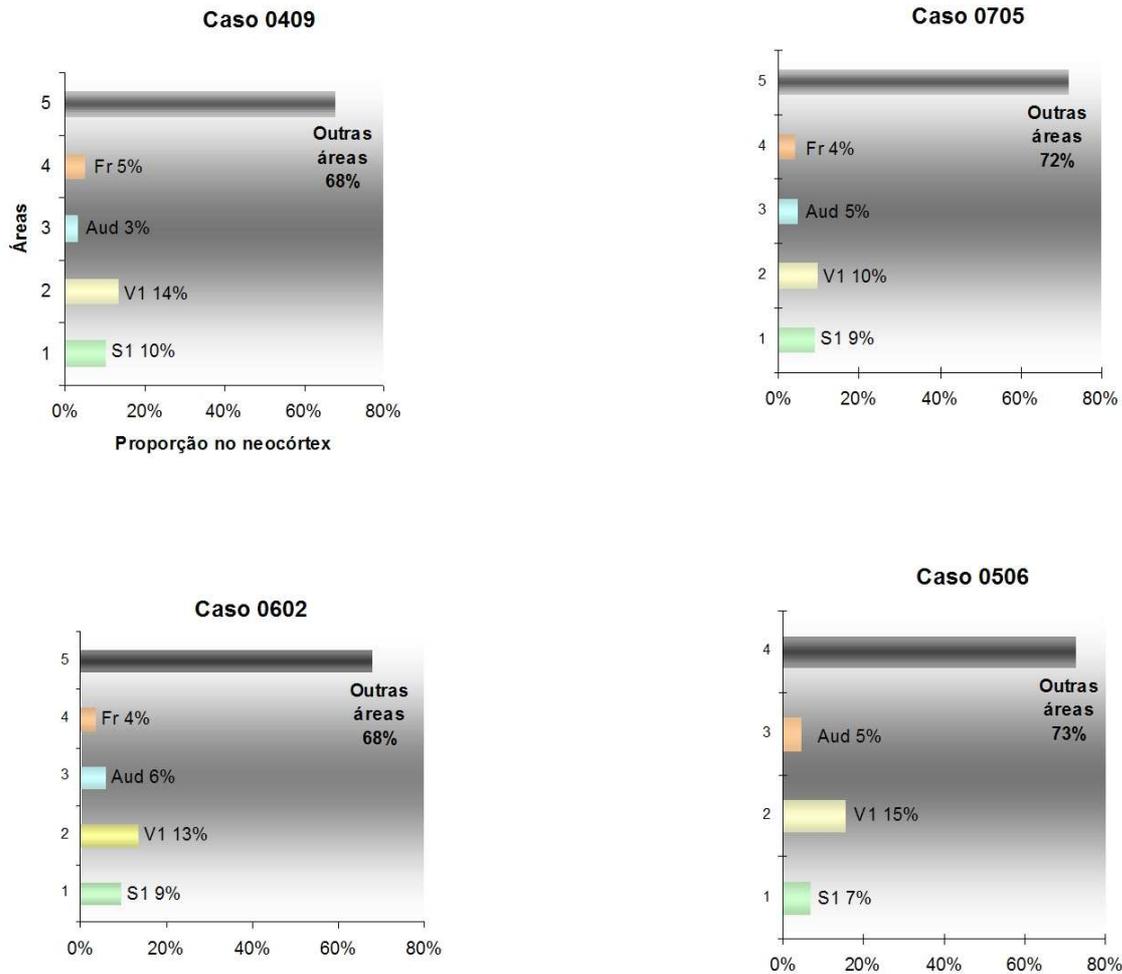


Figura 12. Proporção ocupada pelas áreas corticais no gambá *Didelphis aurita*. Análise quantitativa da área ocupada pelas áreas sensoriais primárias e área frontal (Fr) no neocórtex do gambá, tendo como base a marcação de mielina. Em todos os casos ilustrados, o córtex visual primário (V1) destacou-se como a área sensorial primária mais extensa, seguida do córtex somatossensorial (S1). No caso 0506, a delimitação da área Fr não foi possível. Aud = córtex auditivo.

observadas nesta espécie e no *Monodelphis domestica*, com a utilização de técnicas histoquímicas (MARTINICH et al., 1990; FRANCA, 1999).

4.1.2 Características eletrofisiológicas de S1, SR e SC

4.1.2.1 Mapeamento do córtex somatossensorial primário (S1)

As características eletrofisiológicas do córtex parietal anterior do gambá *Didelphis aurita* foram estudadas em cinco animais (Tabela 2).

O córtex parietal anterior foi mapeado através do registro eletrofisiológico multiunitário detalhado dos córtices SR, S1 e SC. Para a composição do mapa eletrofisiológico, foram realizadas de 62 a 94 penetrações por experimento (vide Tabela 2). Após o processamento histológico do tecido cortical, o mapa eletrofisiológico foi sobreposto à fotomicrografia do padrão de marcação de mielina, permitindo assim se delimitar as bordas das áreas S1, SR e SC.

Resumo dos resultados dos registros eletrofisiológicos		
	Nº. de sítios de registro Realizados	Extensão aproximada de S1 (mm)
Caso 0409	-	4,6
Caso 0506	62	-
Caso 0602	82	3,86
Caso 0629	99	1,96
Caso 0701	94	-
Caso 0705	84	3,2

Tabela 2. Número de penetrações de cada experimento realizado no córtex parietal para a delimitação das áreas S1, SR e SC pelo mapeamento eletrofisiológico. Os desenhos resultantes da análise da mieloarquitetura e eletrofisiologia permitiram identificar a extensão ocupada por S1 no córtex parietal anterior e a distância estimada desta área para a da fissura orbitária.

De acordo com os nossos resultados, a área S1 ocupa uma extensão média no eixo rostro-caudal de 3,5 mm, sendo o seu centro localizado a aproximadamente 3 mm da fissura orbitária.

Dentro de S1, em todos os casos analisados, houve predomínio de sítios de registro com respostas cutâneas (ao toque leve ou superficial, Figura 13). No entanto, alguns sítios só apresentavam resposta à estimulação profunda dos receptores cutâneos (toque profundo), apertos leves ou respostas fracas à estimulação superficial dos receptores cutâneos. Isto foi observado tanto na representação da pata dianteira quanto na da face (Figura 15). Ainda dentro de S1, obtivemos alguns sítios de registro sem resposta à estimulação somestésica. Em geral, os sítios não-responsivos eram novamente testados em um segundo momento para verificar possível interferência da anestesia, que ocasionalmente poderia estar diminuindo a resposta neuronal.

O objetivo principal do mapeamento eletrofisiológico era caracterizar a área onde o neurotraçador havia sido injetado. Considerando que as representações da face em S1 e S2 do gambá são vizinhas e possuem uma borda comum (BECK et al., 1996), decidimos que as injeções de neurotraçadores seriam realizadas na representação da pata anterior, para que não existisse o risco de injetar na representação da face de S2 por engano. Como as injeções na representação da pata anterior do córtex somestésico primário foram privilegiadas, a maioria dos mapeamentos realizados limitaram-se a detalhar principalmente esta região em S1.

Conforme descrito anteriormente (BECK et al., 1996; LENDE, 1963; PUBOLS et al., 1976), notamos que a representação da pata anterior no córtex somatossensorial primário do gambá encontra-se medial à representação de face (Figura 14-17). Tanto na representação da

Tipos de respostas somatossensoriais em S1, SR e SC

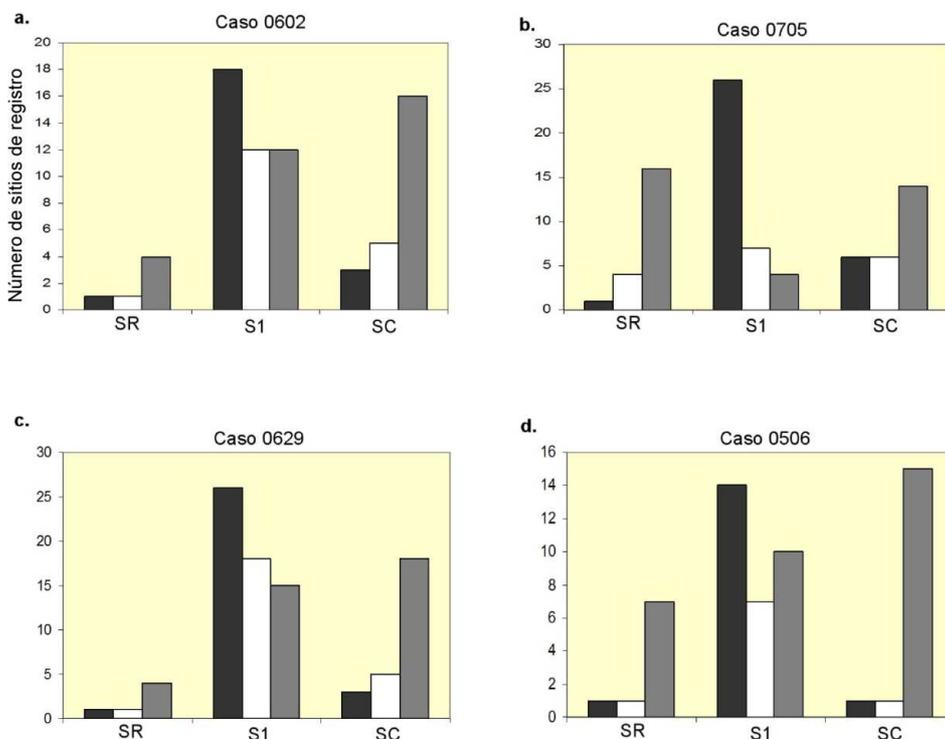


Figura 13. Quantificação dos tipos de respostas somatossensoriais presentes nas áreas S1, SR e SC, em preparações anestesiadas. Em todas as três áreas existem sítios de penetração responsivos ao toque leve (barra preta) e à estimulação somatossensorial profunda (barra branca, a-d). A área S1 caracteriza-se pela predominância de respostas a toque leve a-d), enquanto as áreas SR e SC distinguem-se pela predominância de sítios sem resposta a estímulos somestésicos (barra cinza, a-d). Para padronização, os sítios de registro quantificados referem-se à segunda sessão de registro eletrofisiológico de cada caso apresentado.

face quanto na pata os campos receptores multiunitários tendem a ser pequenos, representando partes restritas do corpo, tais como uma única falange, coxim ou vibrissa (Figura 15).

A borda rostral e caudal de S1 foi obtida pela combinação da eletrofisiologia com a mieloarquitetura. De uma maneira em geral, estas bordas tendem a ser aproximações. Caso a borda eletrofisiológica não coincidissem com a borda mieloarquitetônica (Figura 17) observávamos os sítios de registro próximos à borda arquitetônica: considerávamos fora de S1, os sítios apresentando campos receptores grandes representando, por exemplo, toda a pata anterior ou o antebraço, e/ou com resposta à estimulação profunda, ou ainda sítios não responsivos. Sítios de registro com resposta intensa ao toque leve geralmente circundados por sítios não responsivos eram eventualmente localizados fora de S1, dependendo de sua localização.

Nossos resultados demonstram ainda, que as representações dos segmentos distais e proximais da pata dianteira orientam-se no eixo rostro-caudal de S1, estando os segmentos mais distais próximos à área SR e os proximais progressivamente mais posteriores em S1 (Figuras 15 e 17). Em geral, após a representação das falanges, prosseguindo-se em direção à borda caudal de S1, passa-se progressivamente pela representação dos coxins, e a seguir, do punho (Figura 15 penetrações 1, 2 e 3, respectivamente; Figura 16 penetrações 1-5). Em alguns casos (Figura 16), a representação do antebraço foi identificada dentro de S1, caudal à representação do punho (Figura 16b penetração 5).

A disposição dos cinco dedos no córtex somatossensorial primário parece ser orientada no eixo médio-lateral. Nos casos 0629 (Figura 15) e 0705 (Figura 17), nota-se que o primeiro dedo (polegar) está representado lateral à representação dos demais dedos, enquanto que a representação do quinto dedo localizou-se mais medialmente no córtex. No caso 0629 (Figura 15), o dedo cinco, a região ulnar da pata, do punho e do antebraço são encontrados em uma

mesma seqüência rostro-caudal de penetrações (Figura 15, sítios 1 a 4). Na fileira imediatamente lateral a esta, foram encontradas as representações do dedo três e o coxim palmar imediatamente proximal a ele (Figura 15, sítios 5, 6 e 7). Nesta mesma fileira, observamos as representações dos coxins 4 (Figura 15, sítios 8). No caso 0705, os dedos 5, 3 e 1 encontram-se representados sequencialmente de medial para lateral (Figura 17, sítios de penetração 3, 10 e 12, respectivamente). Esta organização assemelha-se à vista dorsal da pata, com as falanges distais dos dedos apontando para o pólo rostral do neocórtex. Em alguns casos, no entanto, uma topografia organizada da pata anterior não pode ser observada (Figura 15, sítios de penetração 14 a 21).

Prosseguindo lateralmente no córtex, identifica-se a borda entre a representação da pata dianteira e da face em S1. A borda entre as representações de face e pata é caracterizada eletrofisiologicamente por penetrações com respostas ao toque profundo e campos receptores maiores (Figura 14 a 17). O mesmo princípio pôde ser estendido para as bordas rostral e caudal de S1, como mostra a Figura 16. As penetrações que caracterizaram estas bordas também apresentaram respostas aos estímulos profundos e campos receptores maiores (Figura 16, sítios 1 e 6).

A representação topográfica das vibrissas em S1 pode ser avaliada no experimento 0629 (Figura 15). Os campos receptores multiunitários encontrados podiam tanto envolver múltiplas vibrissas de uma mesma fileira, ou representar uma única vibrissa. Além disso, esse resultado sugere que vibrissas de uma mesma coluna estão representadas no eixo rostro-caudal do córtex. Como mostra a Figura 15g, a segunda vibrissa (VII) da fileira inferior, encontra-se representada na região rostral de S1 (sítio 2), enquanto que as vibrissas VII das fileiras mais dorsais são representadas sucessivamente nas regiões caudais de S1 (sítios de registro 33-36, Figura 15).

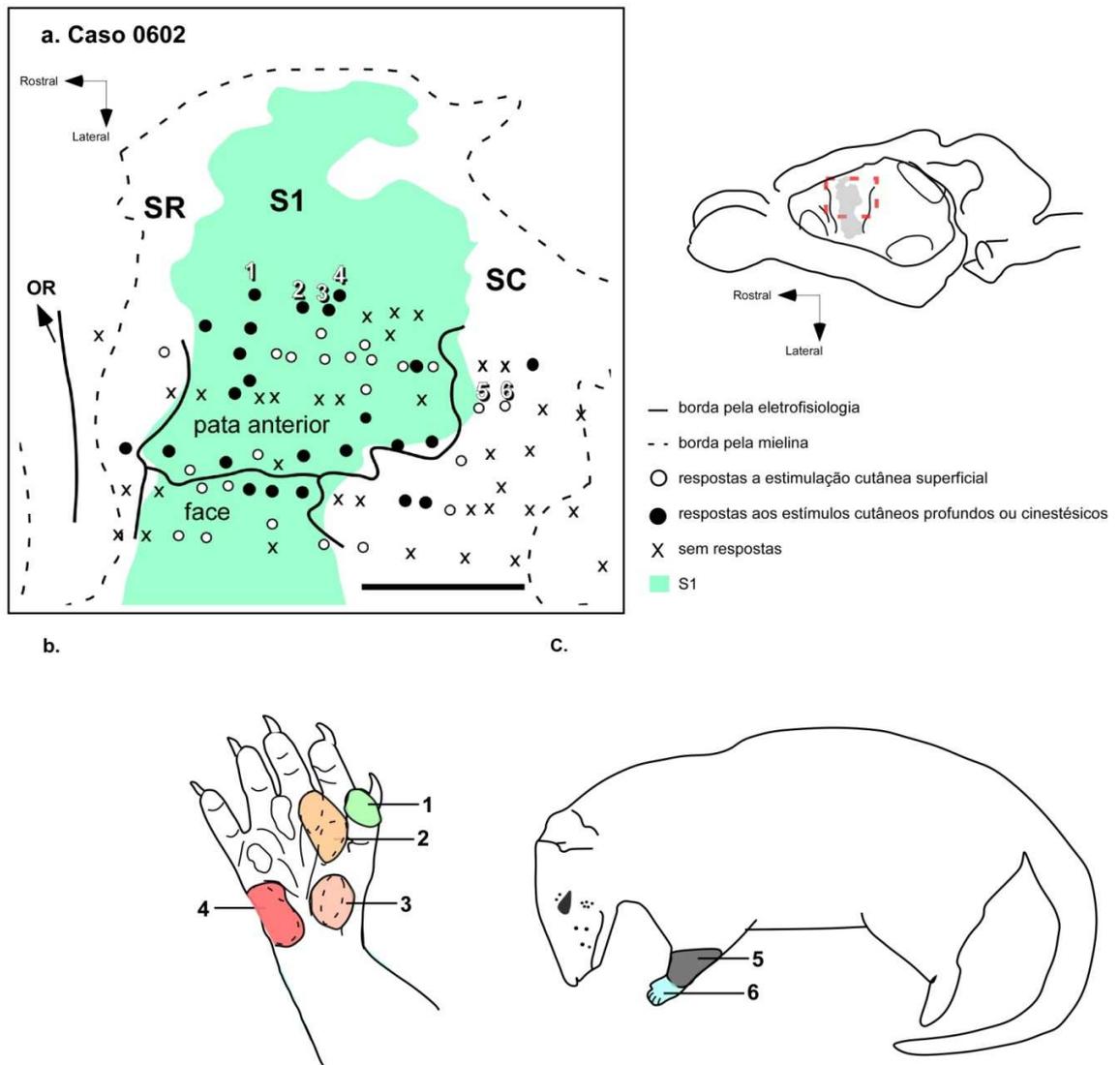


Figura 14. Organização somatotópica da pata anterior de S1 (experimento 0602). Em (a) área em verde ilustra a extensão de S1 neste caso pela mieloarquitetura. As linhas pretas contínuas e pontilhadas representam a fissura orbital e a borda arquitetônica de SR (rostral) e SC (caudal), respectivamente. Os campos receptores correspondentes aos sítios 1 a 4 localizados em S1 (b) são pequenos e representam uma única falange ou coxim. Os sítios 5 e 6 em SC possuem campos receptores maiores (c). As convenções adotadas para esta figura serão utilizadas também nas figuras 20 a 22. OR = fissura orbital. Barra de calibração = 1mm.

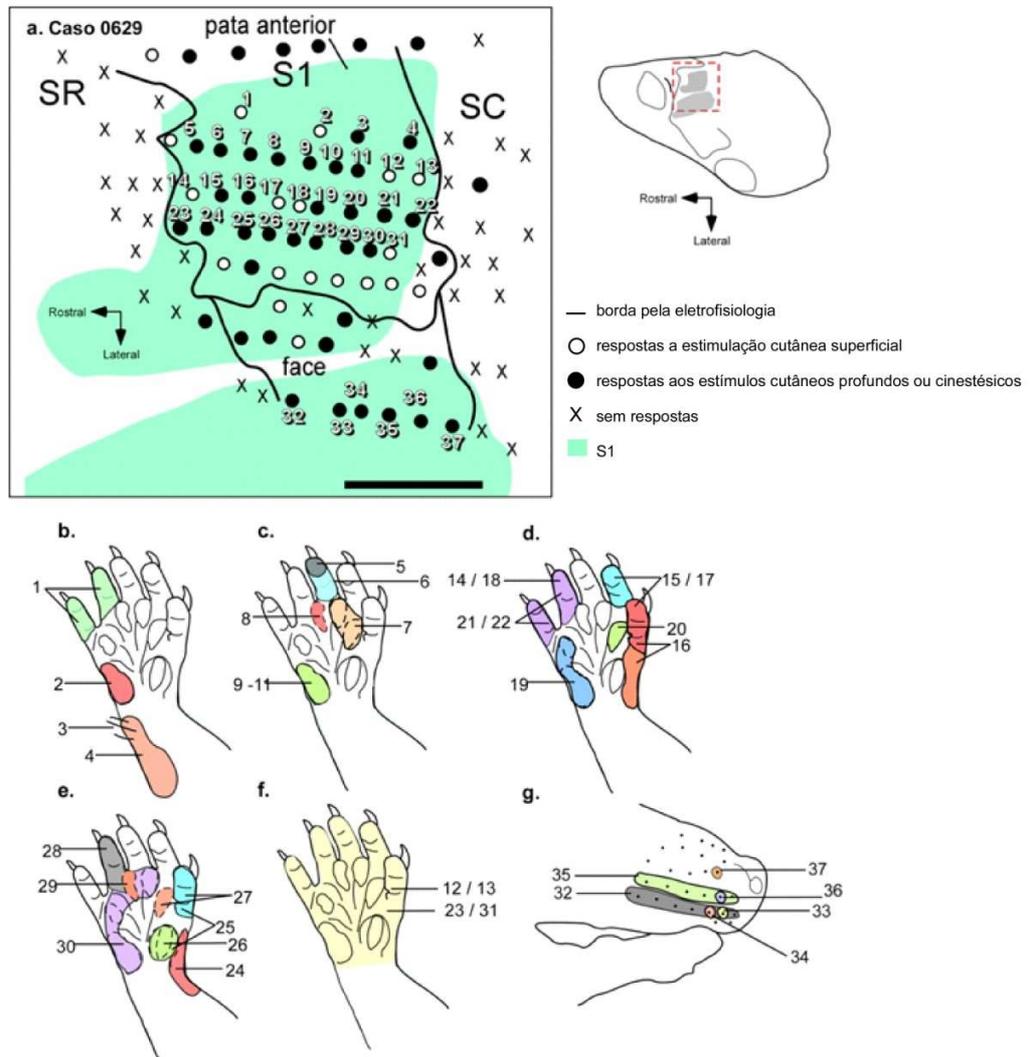


Figura 15. Organização somatotópica da pata anterior e da face de S1 (experimento 0629).

Os campos receptores em (b) correspondentes aos sítios 1 a 4 localizados em S1 (a) representam a região ulnar dos dedos, pata, punho e antebraço. Os sítios 5 a 7, posicionados mais lateralmente em S1 (a) possuem campos receptores para a região central da mão (c). Os sítios 32-37 (g) representam uma fileira de penetrações localizada mais lateralmente em S1, orientada no eixo rostro-caudal, na representação da face. Os respectivos campos receptores progridem das vibrissas localizadas nas fileiras inferiores (ventrais) para as superiores (mais dorsais). Barra de calibração = 1mm.

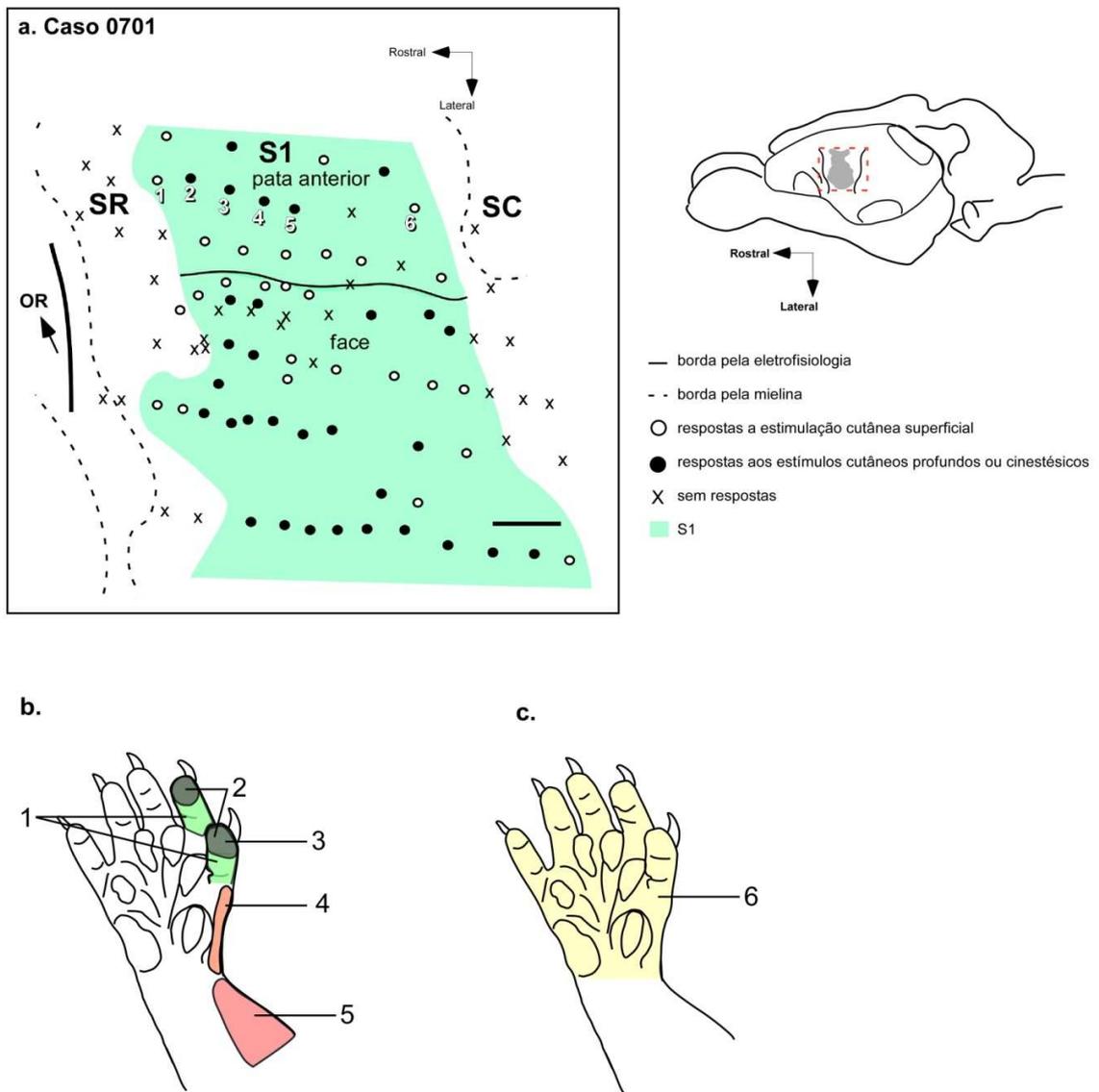


Figura 16. Organização somatotópica da pata anterior de S1 (experimento 0701). Os sítios 1-6 (a) localizados em S1 representam uma fileira de penetrações orientada no eixo rostro-caudal. Em (b) os respectivos campos receptores progridem dos segmentos mais distais da mão para os proximais, como o antebraço. As bordas de S1 com SR e SC correspondem a penetrações (sítios 1 e 6) com resposta à estimulação profunda (círculos brancos) e campos receptores maiores (c). Barra de calibração = 1mm. OR = Fissura orbital

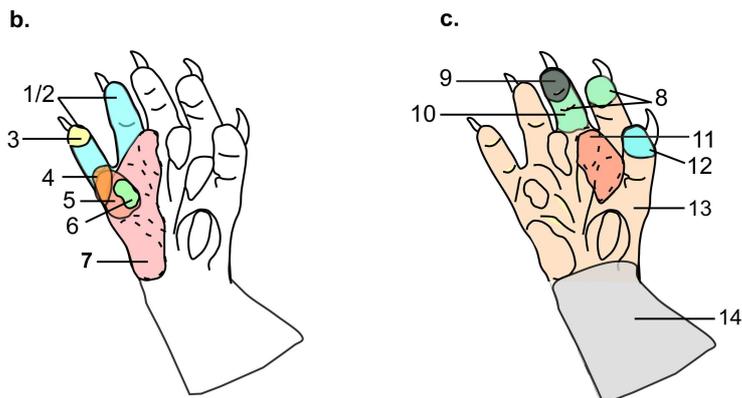
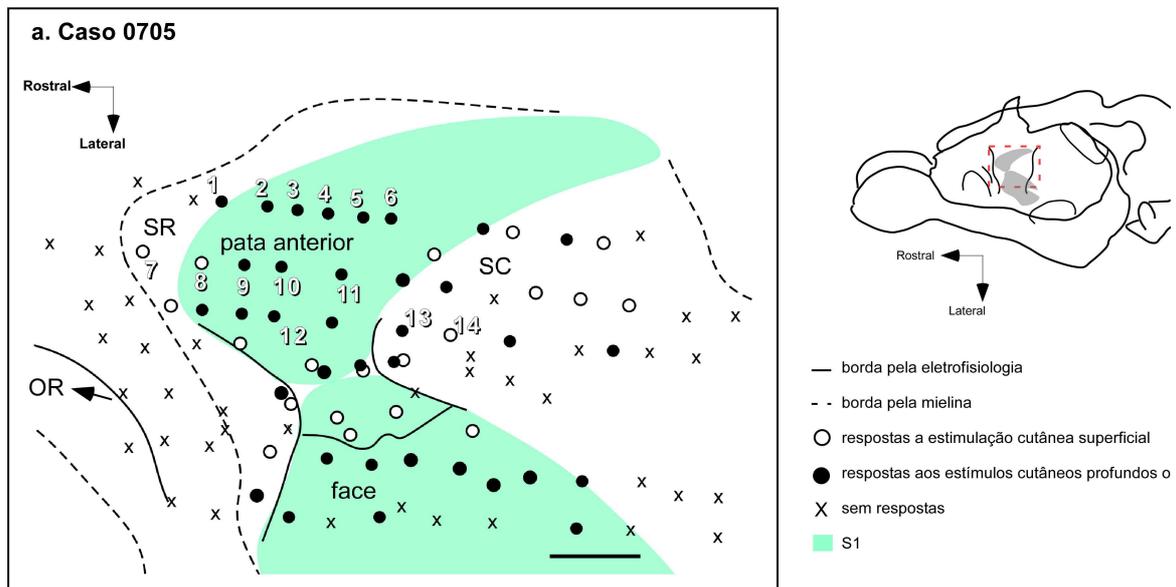


Figura 17. Organização somatotópica da pata anterior em S1 (experimento 0705). Os campos receptores em (b) correspondentes aos sítios 1 a 6 localizados em S1 (a) representam a região ulnar dos dedos e mão. Os sítios 8 a 11, posicionados mais lateralmente (a) possuem campos receptores para a região central da mão (c). O sítio de penetração 7 localizado em SR (a) corresponde a três coxins da região ulnar da pata anterior (b). Os sítios 13 e 14 (a) localizados em SC representam toda a pata anterior e o antebraço (c). Em ambas as áreas, os sítios ilustrados apresentaram resposta apenas à estimulação profunda (círculos brancos). Barra de calibração = 1mm. OR = Fissura Orbitária.

4.1.2.2 Córtex somatossensorial caudal (SC) e rostral (SR)

O córtex somatossensorial caudal (SC) corresponde a uma área localizada entre S1 e o córtex periestriado (MARTINICH et al., 2000), sendo identificado como uma região com intensidade de mielinização intermediária entre S1 (mais densamente mielinizado) e o córtex periestriado (pouco mielinizado) (Figura 11).

A Figura 13 mostra a prevalência dos sítios de penetração sem respostas na área SC, o que dificulta o estabelecimento de uma borda eletrofisiológica com o córtex periestriado, uma vez que esta região também não é responsiva em preparações anestesiadas. No entanto, foi possível registrar algumas respostas à estimulação tátil superficial e profunda (Figura 13), o que reforça a caracterização desta região como sendo uma área de processamento somestésico.

A extensão de SC no eixo rostro-caudal, avaliada pela mieloarquitetura em dois casos diferentes encontra-se quantificada na Tabela 3.

Já a área somestésica rostral (SR) compreende a região localizada entre a fissura orbitária e a borda rostral de S1 (Figura 11). A área SR é caracterizada eletrofisiologicamente pela predominância de sítios de penetração não-responsivos à estimulação somestésica (Figura 13).

	Extensão de SC (mm ²)	Distâncias do centro de SC para a fissura (mm)
Caso 0409	1,8	5,3
Caso 0506	-	-
Caso 0602	1,8	5,7
Caso 0705	-	-

Tabela 3. Medidas da área SC. Área ocupada por SC no córtex parietal anterior e distância do centro desta área para a fissura orbitária (medida obtida a partir da metade da fissura).

Neurônios tanto em SC quanto em SR apresentam campos receptores em geral maiores do que aqueles registrados em S1. A Figura 14 (caso 0602) ilustra os campos receptores para os sítios 5 e 6 em SC que corresponderam, respectivamente à toda a pata anterior e ao antebraço (Figura 14A e C). O mesmo resultado foi obtido no caso 0705 (Figura 17). Os sítios de registro em SC (13 e 14) e SR (7) respectivamente, apresentaram campos receptores maiores do que aqueles descritos para S1. É possivelmente que ambas as áreas SR e SC possuam uma representação completa do corpo que não pôde ser observada por nosso trabalho nem por Pamela Beck (BECK et al., 1996), pois além das respostas encontradas após estimulação da pata anterior, respostas à estimulação da face também foram obtidas em ambas as áreas corticais, porém em poucas penetrações (dados não ilustrados).

4.1.3 Projeções cortico-corticais para S1 e SC

A Tabela 4 lista todas as injeções de neurotraçadores realizadas neste estudo. Em resumo, nos casos 0602 e 0629 foram realizadas mais de uma injeção em regiões diferentes da representação da pata anterior em S1, uma mais rostral e outra caudal. No caso 0629, duas injeções foram realizadas, porém obtivemos problemas técnicos no processamento do córtex. Assim, apenas as projeções tálamo-corticais puderam ser estudadas no caso 0629. Todas as injeções abrangeram a mesma profundidade no córtex, com exceção do caso 0705 e caso 0602 (injeção na representação da face e pata de S1, respectivamente). Não observamos um espalhamento do neurotraçador para a substância branca nos casos apresentados. Nos animais 0705 e 0701, foram feitas injeções em S1 tanto na representação da face quanto na da pata, permitindo comparar as conexões efetuadas por diferentes campos de representação topográfica. A figura 18 ilustra sítios de injeção e células marcadas correspondentes às injeções de FE (A,B), DY (C,D) e FR (E,F), respectivamente.

	Área injetada	Neurotraçador	Distância da fissura orbitária	Área de espalhamento	Tempo de sobrevida	Profundidade da injeção
Caso 0409	Borda S1/SC	FR	4,5 mm	0,0645 mm ²	12 dias	-
Caso 0602	S1pata	FE	1,7 mm	0,0194 mm ²	11 dias	Superfície ate 1440 µm
	S1 pata	DY	3,8 mm	0,129 mm ²	11 dias	Superfície ate 840 µm
	SC	FR	5,1 mm	0,0258 mm ²	11 dias	Superfície ate 1440 µm
Caso 0629	S1 pata	DY	2,5 mm	0,9677 mm ²	11 dias	-
	S1 pata	FE	3,6 mm	0,0258 mm ²	11 dias	-
	SC	FR	4,6 mm	0,258 mm ²	11 dias	-
Caso 0701	S1 pata	DY	2,7 mm	-	12 dias	-
	S1 face	FE	2,6 mm	-	12 dias	-
	SC	FR	3,8 mm	-	12 dias	-
Caso 0705	S1/SR/SC	DY	1,5 mm	1,3548 mm ²	10 dias	Superfície ate 1200 µm
	S1 face	FE	2,3 mm	0,0645 mm ²	10 dias	80 µm ate 1200 µm
	SC	FR	4,2 mm	0,1935 mm ²	10 dias	Superfície ate 1200 µm

Tabela 4. Resumo das injeções de neurotraçadores. Dados de todos os experimentos realizados que envolveram injeção de neurotraçadores no córtex somestésico. FR = fluoro-emerald; FE = fluoro-ruby; DY = diamidino-yellow.

4.1.3.1 Córtex somatossensorial primário (S1-pata anterior)

No ***caso 0602*** (Figura 19), foi realizada uma injeção de FE em S1 próxima à borda com SR e outra injeção de DY mais caudal. A Figura 19b mostra os campos receptores correspondentes aos sítios de injeção, correspondendo à representação do punho e antebraço, respectivamente. Muito poucas células foram marcadas retrogradamente por FE, a maioria próxima ao sítio de injeção nas áreas S1 e SR (Figura 19c). No entanto, algumas células também foram visualizadas em porções mediais de S1. Já na área S2/PV, muito poucos neurônios foram marcados por FE.

Ainda no caso 0602, a injeção de DY na região caudal de S1 (Figura 19) resultou em células marcadas nas áreas somatossensoriais S1, SC e SR. O sítio de injeção correspondeu à representação do antebraço do córtex somestésico primário (Figura 19b). Semelhante à injeção de FE neste mesmo caso, os neurônios retrogradamente marcados por DY limitaram-se à área circunvizinha ao sítio de injeção (Figura 19c) tanto em S1 e quanto em SC. Células marcadas também foram identificadas em SR, mediais ao sítio de injeção. Esta injeção não resultou em marcação em S2/PV.

No ***experimento 0705*** (Figura 20), foi realizada uma injeção de FE na representação da face em S1. As células retrogradamente marcadas ficaram restritas ao córtex somestésico, destacando-se os neurônios em torno do sítio de injeção. Um grupo de células foi encontrado na região medial do neocórtex. Estas células se estenderam do sítio de injeção até SC e prolongaram-se para uma zona medial ao córtex somestésico, que parece corresponder a área PM previamente descrita nesta espécie (MARTINICH et al., 2000).

A injeção realizada com o neurotraçador DY na representação da pata anterior no caso 0705 (Figura 21), resultou em um grande espalhamento do neurotraçador, provocando uma intensa marcação no córtex. Diferente do padrão obtido nas injeções descritas acima, foi obtido

um grande número de células marcadas em S1, SR, SC, no córtex periestriado, auditivo e na área frontal (Figura 21).

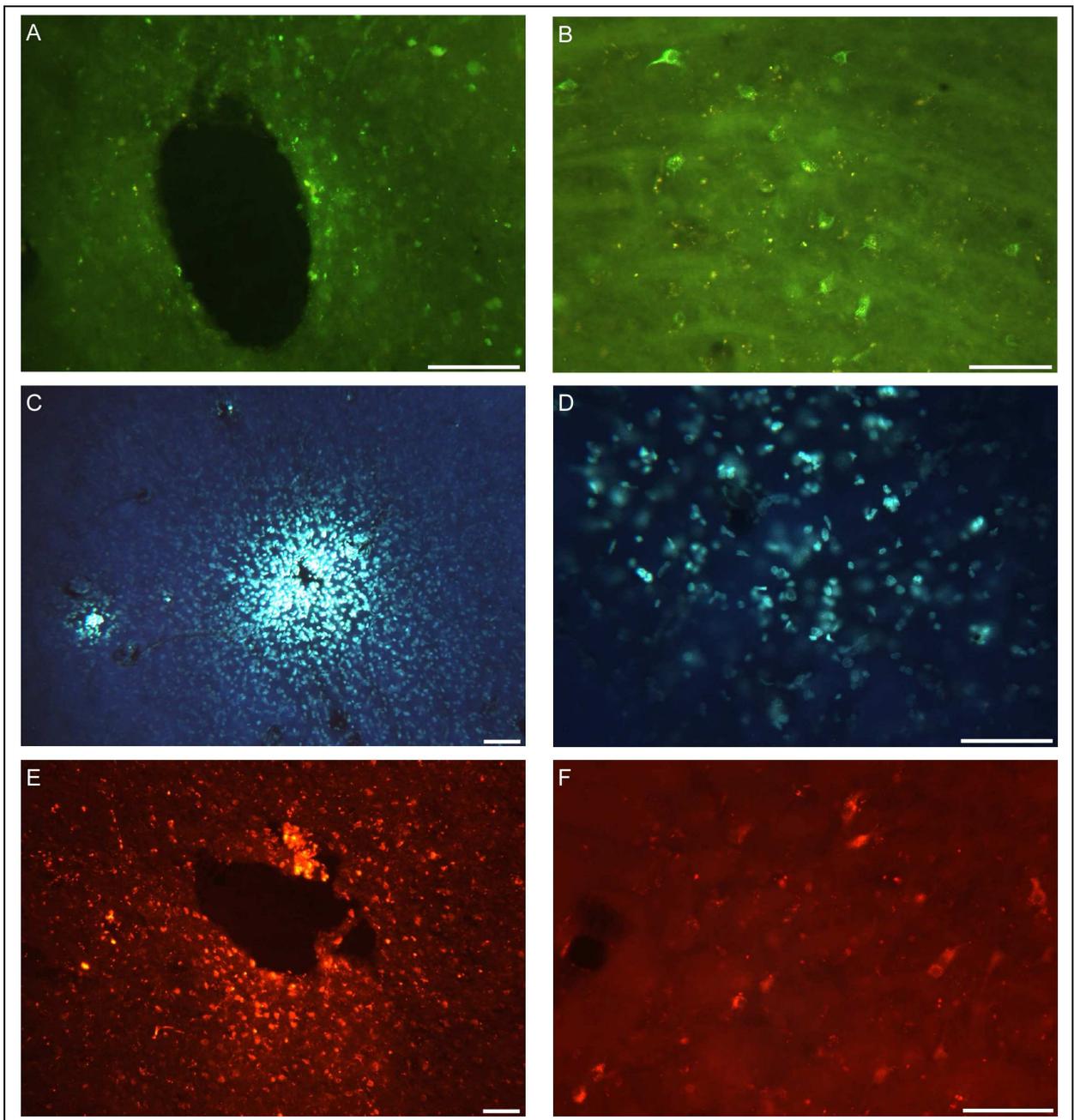
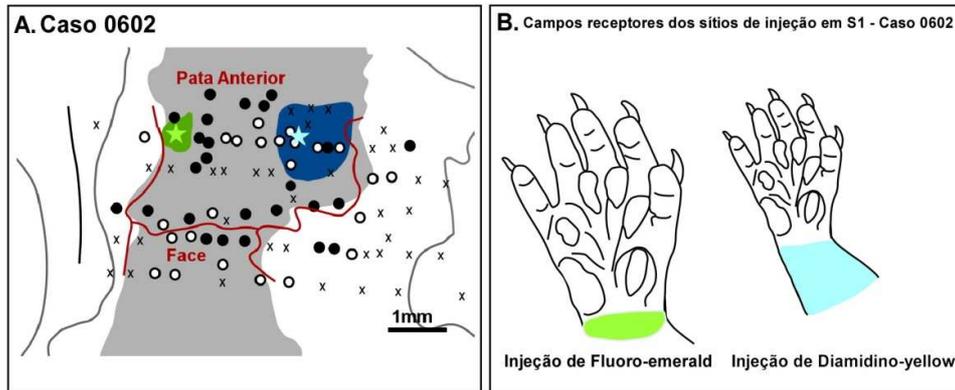


Figura 18. Fotomicrografia dos sítios de injeções e células marcadas. Note que o sítio de injeção do fluoro-emerald (a) apresenta menor espalhamento. Em (b) observa-se células retrogradamente marcadas no núcleo VB (b). O sítio de DY (c) e o de FR (e) eram facilmente identificados. Em (d) e (f) tem-se células marcadas retrogradamente por DY e FR, respectivamente no núcleo VB (caso 0629). Barra de calibração (A, B, D e F) = 100 μm ; (C e E) = 50 μm .



C. Caso 0602

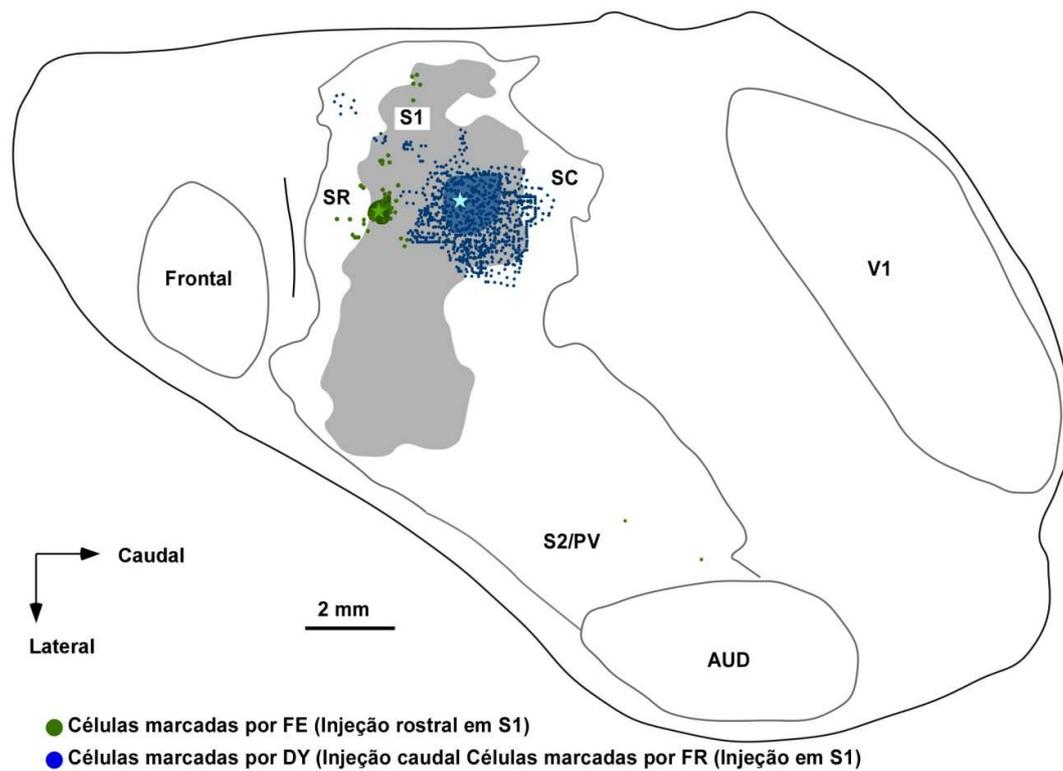
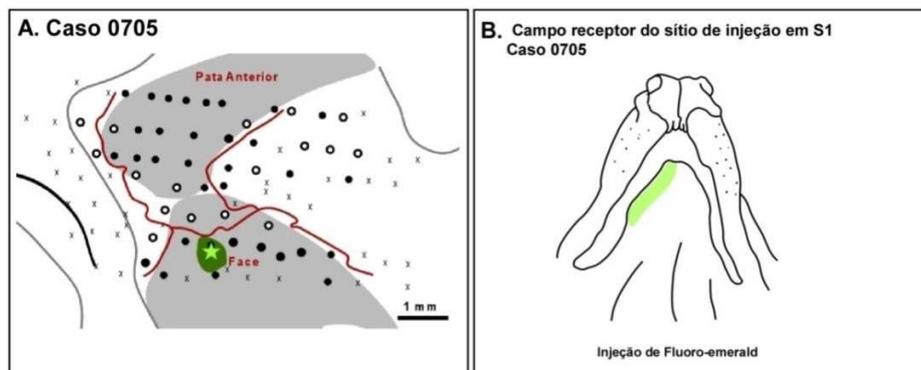


Figura 19. Projeções cortico-corticais para S1 (Caso 0602). Reconstrução de cortes transversais do neocórtex. As injeções de FE e DY foram realizadas na representação da pata anterior de S1 (a) e (b). A maioria das células marcadas foi observada dentro de S1, em torno do sítio de injeção (c). Poucas células marcadas foram visualizadas em SR, SC e S2/PV. Linha vermelha = borda eletrofisiológica de S1.



C. Caso 0705

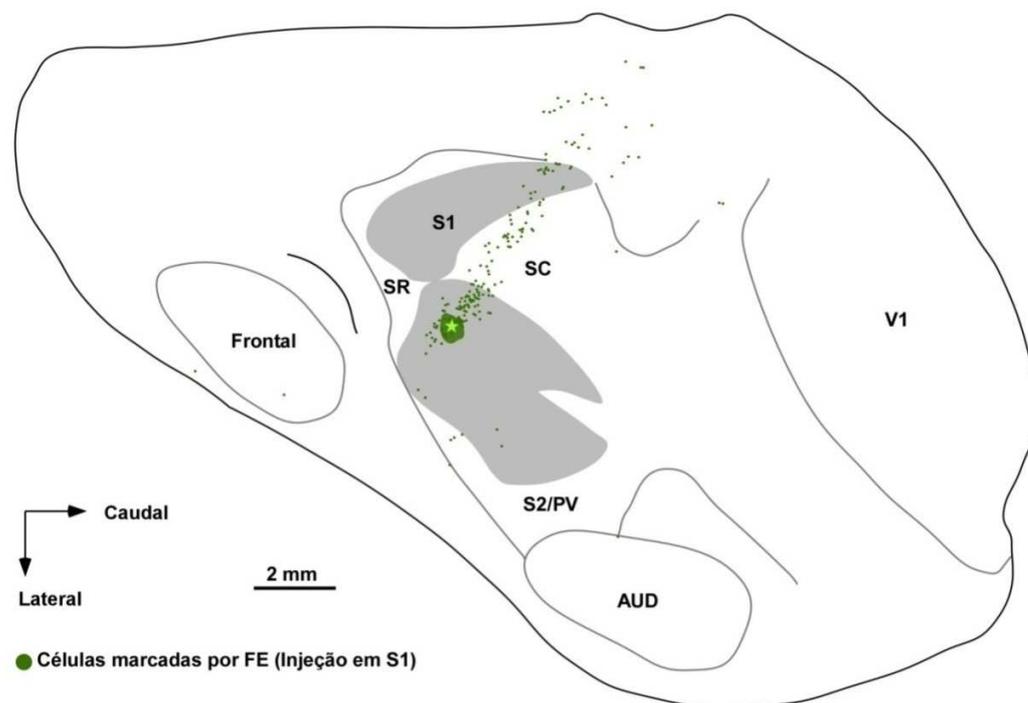
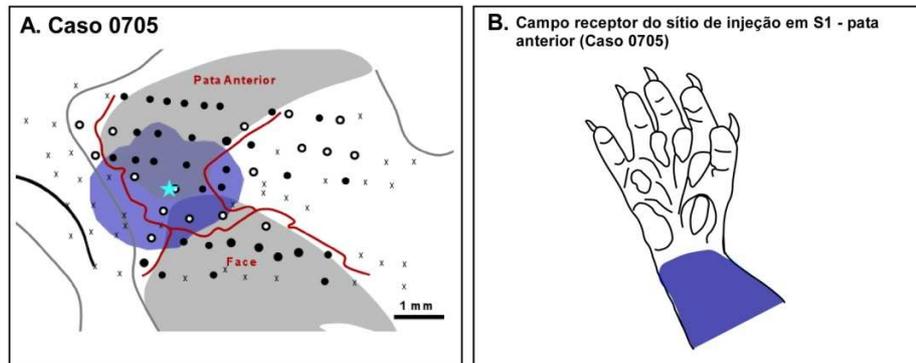


Figura 20. Projeções cortico-corticais para representação da face em S1 (Caso 0705).

Reconstrução de cortes transversais do neocórtex. Neste caso, a injeção de FE foi posicionada na representação da face de S1 (a) e (b). A maioria das células marcadas foi observada dentro de S1, em torno do sítio de injeção (c). Poucas células marcadas foram visualizadas em SC, zona medial do neocórtex e frontal.



B. Caso 0705

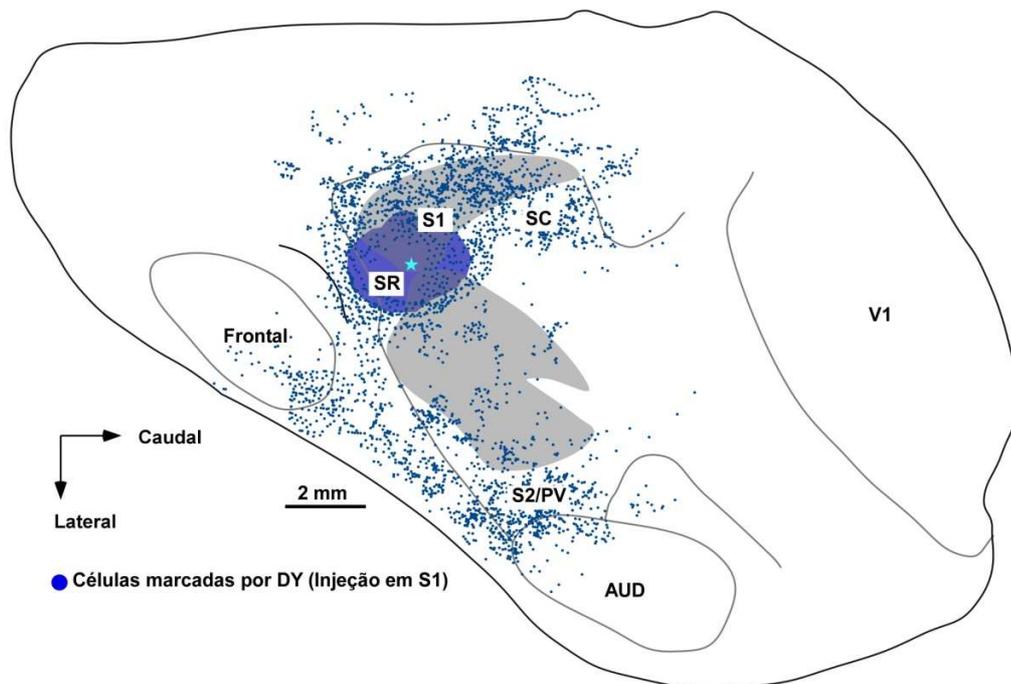


Figura 21. Projeções cortico-corticais para a representação da pata anterior na área S1 (Caso 0705). Reconstrução de cortes transversais do neocórtex. Neste caso, a injeção de DY foi posicionada na representação da face de S1, com espalhamento do neurotraçador para SR e SC (a). As células marcadas foram observadas em S1, SR, SC, S2/PV, córtex auditivo, córtex periestriado, córtex frontal e zona medial do neocórtex (c).

4.1.3.2 Córtex somatossensorial caudal (SC)

Foram realizadas quatro injeções distintas na área somestésica caudal em 3 casos diferentes (Casos 0602, 0705, 0409). Assim como em S1, a posição destas injeções variou dentro do eixo ântero-posterior de SC (Tabela 4).

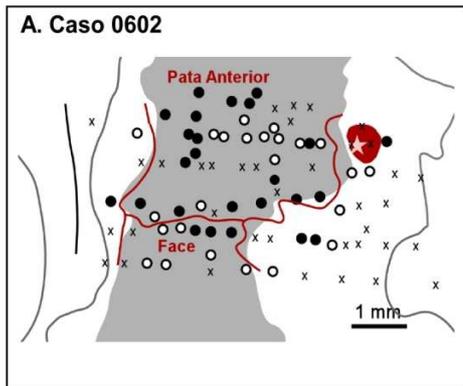
No caso 0602, foi injetado FR em uma região do mapa eletrofisiológico sem resposta à estimulação somestésica (Figura 22a), mas próximas à sítios responsivos à estimulação da pata anterior (Figura 14, penetrações 5 e 6). As células marcadas retrogradamente após esta injeção encontram-se não só no córtex somestésico, como também no córtex auditivo e no córtex visual periestriado (Figura 22b). No córtex somestésico, destacou-se um grande contingente de células dentro de SC, numa posição medial ao sítio de injeção. As células marcadas em S1 e SR apresentaram uma distribuição semelhante, com maior número de células marcadas nas regiões corticais mediais. Entretanto, foi possível notar também esparsos neurônios retrogradamente marcados em toda a extensão de S1 e SR. Em S2/PV, outro grupo de células foi visualizado, próximo ao córtex auditivo, parecendo evitar a representação da face nestas áreas (*cf.* BECK et al., 1996).

O córtex auditivo, por sua vez, apresentou alguns poucos neurônios espalhados na sua metade posterior (Figura 22b). Na região rostral ao córtex auditivo, correspondente ao córtex insular (MARTINICH et al., 2000) foram encontradas poucas células marcadas (Figura 22b).

No córtex visual, os neurônios marcados foram identificados apenas no córtex periestriado. Não foram observadas células marcadas em V1 neste caso (Figura 22b). Um grupo de células marcadas foi encontrado numa zona medial ao córtex periestriado. Esta região parece corresponder ao córtex PM (MARTINICH et al., 2000).

No caso 0705, a injeção de FR em SC ocorreu em uma região caracterizada por sítios de penetração responsivos à estimulação profunda da pata anterior (Figura 23a e b), mais especificamente dos dedos um e dois.

Assim como no caso 0602, a injeção de FR em SC marcou células no córtex somestésico, visual e auditivo (Figura 23c). Novamente, houve uma intensa marcação de neurônios na região medial às áreas S1, SR e SC. No entanto, no caso 0705, a marcação em S1 difere-se do caso 0602 por apresentar neurônios marcados na região de representação da pata anterior. Em ambos os casos 0602 e 0705, esparsos neurônios retrogradamente marcados foram localizados na representação da face de S1. Na área S2/PV, foram observadas células próximas ao córtex auditivo. Novamente, observamos neurônios na região lateral à marcação de mielina, correspondente a ínsula (MARTINICH et al., 2000).



B. Caso 0602

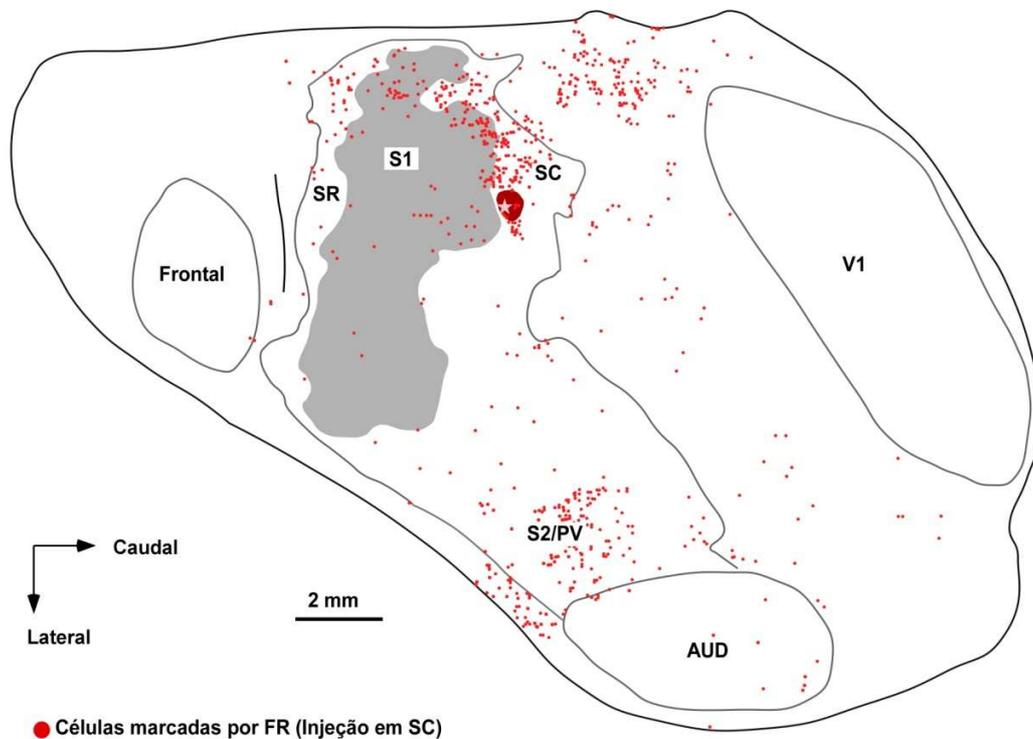
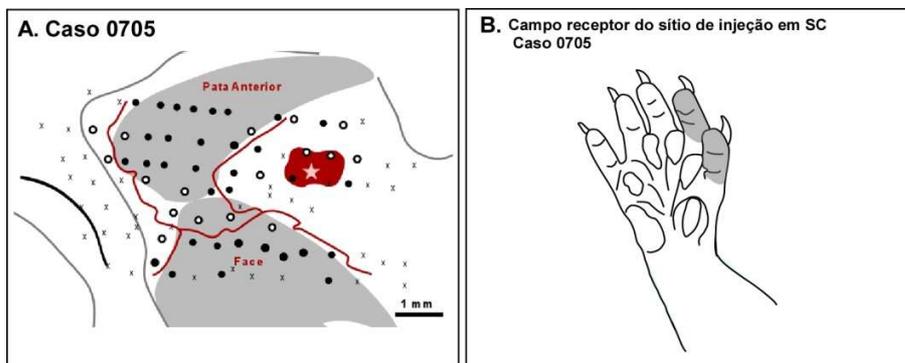


Figura 22. Projeções cortico-corticais para a área SC (caso 0602). Reconstrução de cortes transversais do neocórtex. A injeção de FR foi posicionada em SC (a). No córtex parietal anterior, a maioria das células marcadas foi observada na região medial de S1, SR e SC (b). Células marcadas também foram observadas em S2/PV, córtex auditivo, córtex periestriado, córtex frontal e zona medial do neocórtex (b).



C. 0705

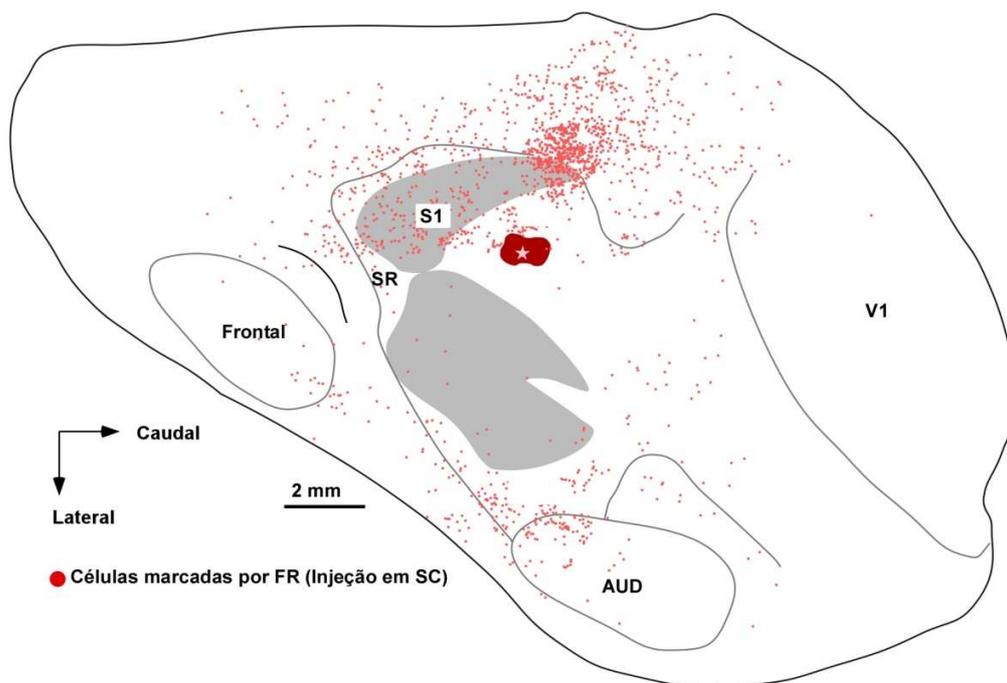


Figura 23. Projeções cortico-corticais para a área SC (caso 0705). Reconstrução de cortes transversais do neocórtex. A injeção de FR foi na representação da pata anterior de SC (a) e (b). No córtex parietal anterior, a maioria das células marcadas foi observada na representação da pata de S1 e na região medial a S1, SR e SC (c). Células marcadas também foram observadas em S2/PV, córtex auditivo, córtex periestriado, córtex visual primário, córtex frontal e zona medial do neocórtex.

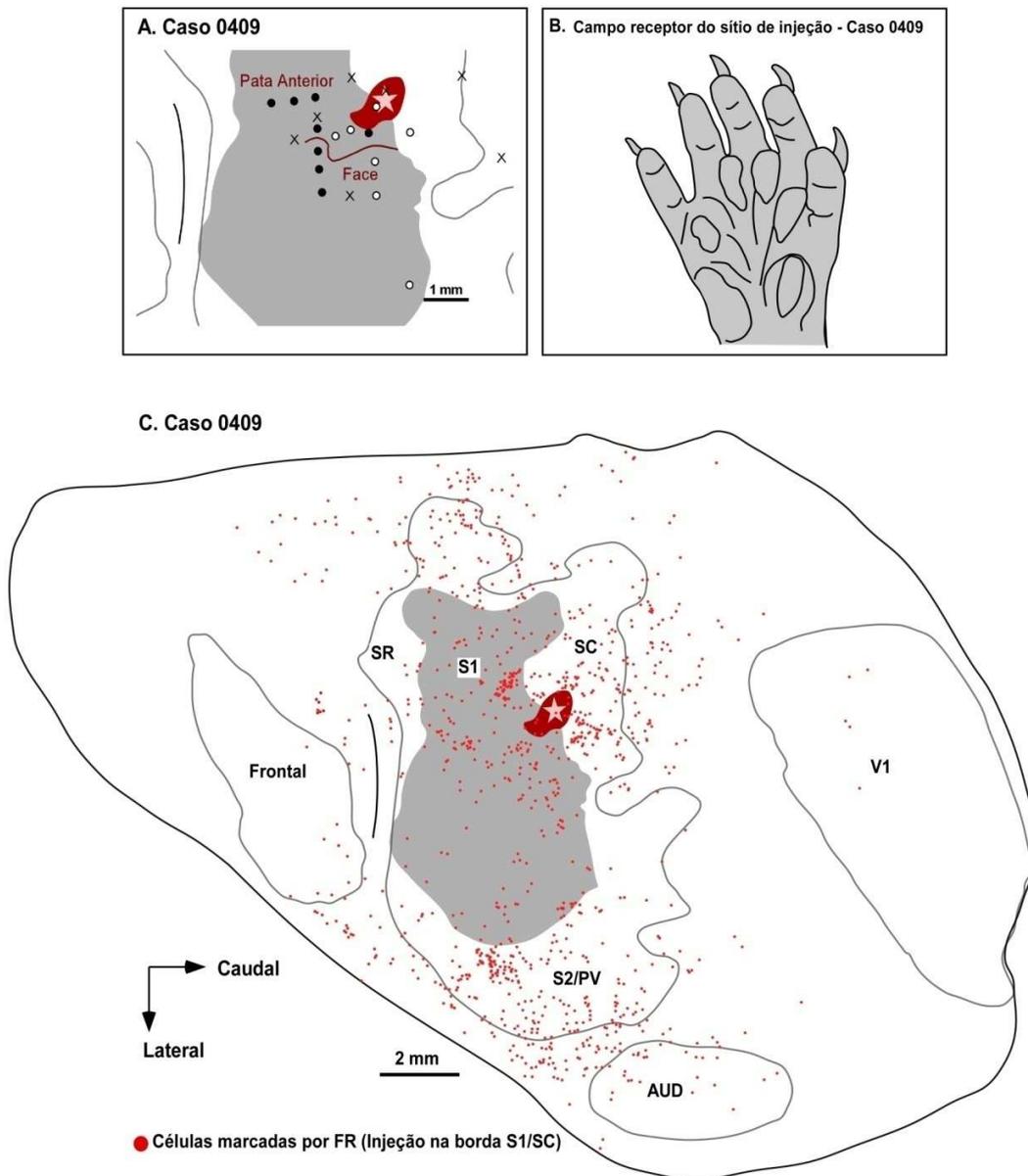


Figura 24. Projeções cortico-corticais para a área SC (caso 0409). Reconstrução de cortes transversais do neocórtex. A injeção de FR foi posicionada na borda entre S1 e SC, numa região de representação da pata anterior de SC (a) e (b). No córtex parietal anterior, as células marcadas foram observadas dentro de toda extensão de S1, em SR e SC (c). Células marcadas também foram observadas em S2/PV, córtex auditivo, córtex periestriado, córtex visual primário, córtex frontal, ínsula e zona medial do neocórtex (c).

O córtex auditivo, no caso 0705, foi marcado na sua metade rostral (Figura 23c), diferentemente do que ocorreu no caso 0602, que marcou sua porção caudal (Figura 22b).

Ainda no caso 0705, poucos neurônios marcados foram observados no córtex visual primário. Um número maior de células marcadas foi encontrado no córtex periestriado (Figura 23c).

A região medial ao córtex parietal, novamente apresentou uma grande densidade de células marcadas em toda sua extensão ântero-posterior, sendo possível destacar aquelas agrupadas acima de SC e do córtex periestriado, que correspondem ao cortex paramarginal (MARTINICH et al., 2000).

Adicionalmente, células marcadas no córtex frontal (anterior à fissura orbitária) também foram encontradas no caso 0705 (mas não no caso 0602) (Figura 23c).

No *experimento 0409*, foi realizada uma injeção na borda entre S1 e SC (Figura 24). O campo receptor correspondente ao centro da injeção encontra-se ilustrado na Figura 24b, e corresponde a toda pata anterior (estimulação profunda). A densidade de penetrações neste caso foi insuficiente para a formação de um mapa somatotópico detalhado de S1, assim como para a delimitação eletrofisiológica de suas bordas rostral e caudal, que foi estimada principalmente pela de marcação de mielina.

A injeção na borda de S1 com SC difere-se das demais injeções em SC por apresentar maior densidade de marcação em S1 (Figura 24c). Além de S1, as outras áreas marcadas foram: SR, SC, S2/PV, córtex auditivo, córtex periestriado, V1, córtex frontal e região medial do neocórtex (Figura 24c). Nestas áreas, os resultados obtidos se assemelham às injeções realizadas nos casos supracitados.

4.1.4 Sumário das projeções cortico-corticais para S1 e SC.

Os dados acima descritos mostram que a área S1 recebe projeções corticais intrínsecas e de outras áreas somestésicas. Essas conexões advêm de regiões adjacentes ao sítio de injeção em S1, além das áreas SC e SR. Intensa projeção surgindo da área S2/PV foi identificada em apenas um dos casos, onde o sítio de injeção apresentou maior espalhamento.

Em contraste, a área somestésica caudal (SC) notavelmente recebe aferências corticais de diferentes modalidades sensoriais, uma vez que recebe projeções de regiões corticais somestésicas, visuais, auditivas, além das projeções originadas do córtex frontal.

4.2 Caracterização anátomo-funcional do tálamo sensorio-motor

Neste item serão descritas as projeções tálamo-corticais para as áreas S1 e SC. A identificação das projeções tálamo-corticais ajudam a caracterizar o tipo de processamento realizado nas áreas corticais. Mais especificamente, a identificação de projeções de núcleos talâmicos motores e sensoriais para as áreas S1 e SC é importante para esclarecer o envolvimento destas áreas no circuito sensorio-motor do gambá *Didelphis aurita*.

4.2.1 Subdivisões arquitetônicas do tálamo somestésico e motor do gambá

A identificação dos núcleos talâmicos retrogradamente marcados foi realizada através secções coronais coradas por cresil-violeta (método de Nissl) e, em alguns casos, confirmadas por secções reagidas para revelação da enzima citocromo-oxidase. O método do Nissl se baseia principalmente no tamanho do corpo celular, na morfologia celular e na densidade de células para separar os diferentes núcleos.

As subdivisões arquitetônicas do tálamo somestésico e motor (tálamo ventral) do gambá *Didelphis aurita* previamente descritas na literatura (OSWALDO-CRUZ E ROCHA-MIRANDA, 1968) foram reanalisadas no presente trabalho pelas técnicas de NADPH-diaforase, citocromo-

oxidase, parvalbumina e calbindina. Com exceção do Nissl, as técnicas supracitadas ainda não haviam sido utilizadas na demarcação dos núcleos talâmicos do gambá *Didelphis aurita*.

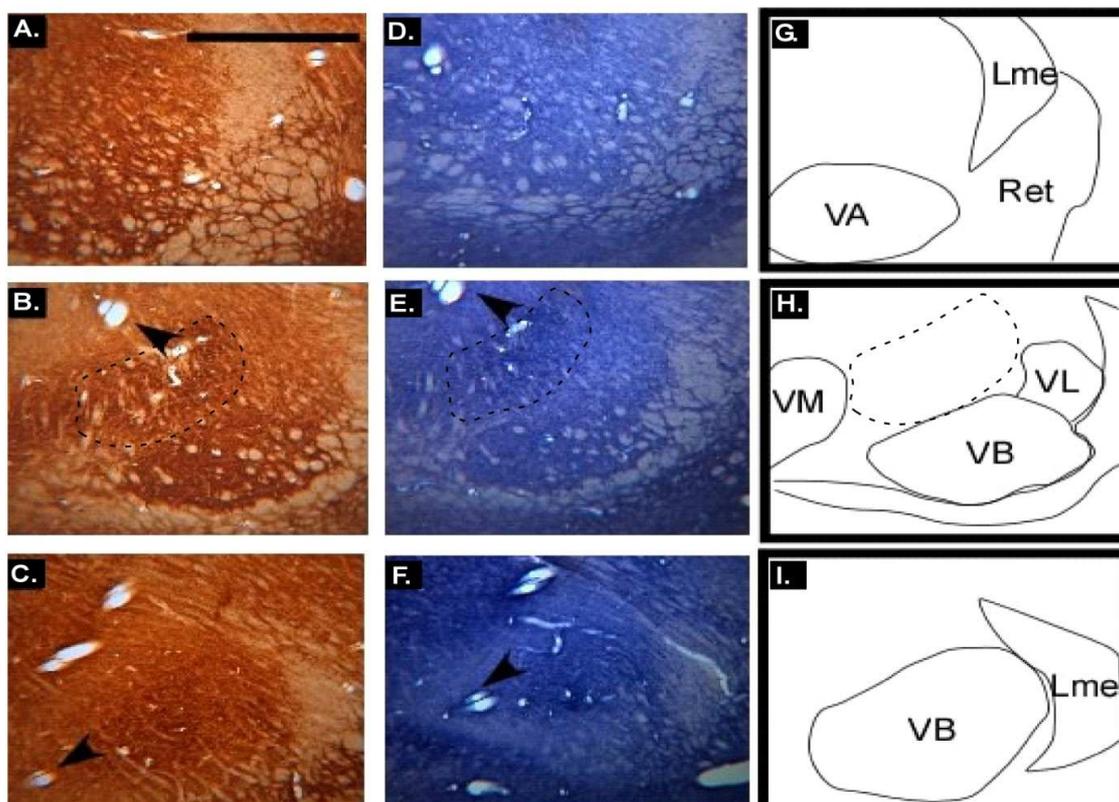


Figura 25. Padrão de marcação das atividades enzimáticas de citocromo-oxidase e NADPH-diaforase no tálamo. As fotomicrografias (A,D), (B,E), (C,F) são diferentes planos no eixo rostro-caudal de um mesmo animal. A coluna da esquerda ilustra o padrão de marcação de citocromo-oxidase, enquanto que a coluna da direita ilustra o padrão de marcação de NADPH-diaforase. As bordas dos núcleos VA, VB e VL foram facilmente identificadas por ambos os métodos e o mesmo padrão de marcação foi observado em ambas as marcações, representado na ilustração (G, H, I). Os cortes ilustrados lado a lado para os dois diferentes protocolos são adjacentes e as setas indicam o mesmo vaso sanguíneo. As linhas pontilhadas em (B) e (E) correspondem a uma marcação da neurópila dorsal à VB consistentemente

observada por ambas as técnicas de citocromo-oxidase e NADPH-diaforase e que não é visualizada com os demais métodos. Barra de calibração = 1mm.

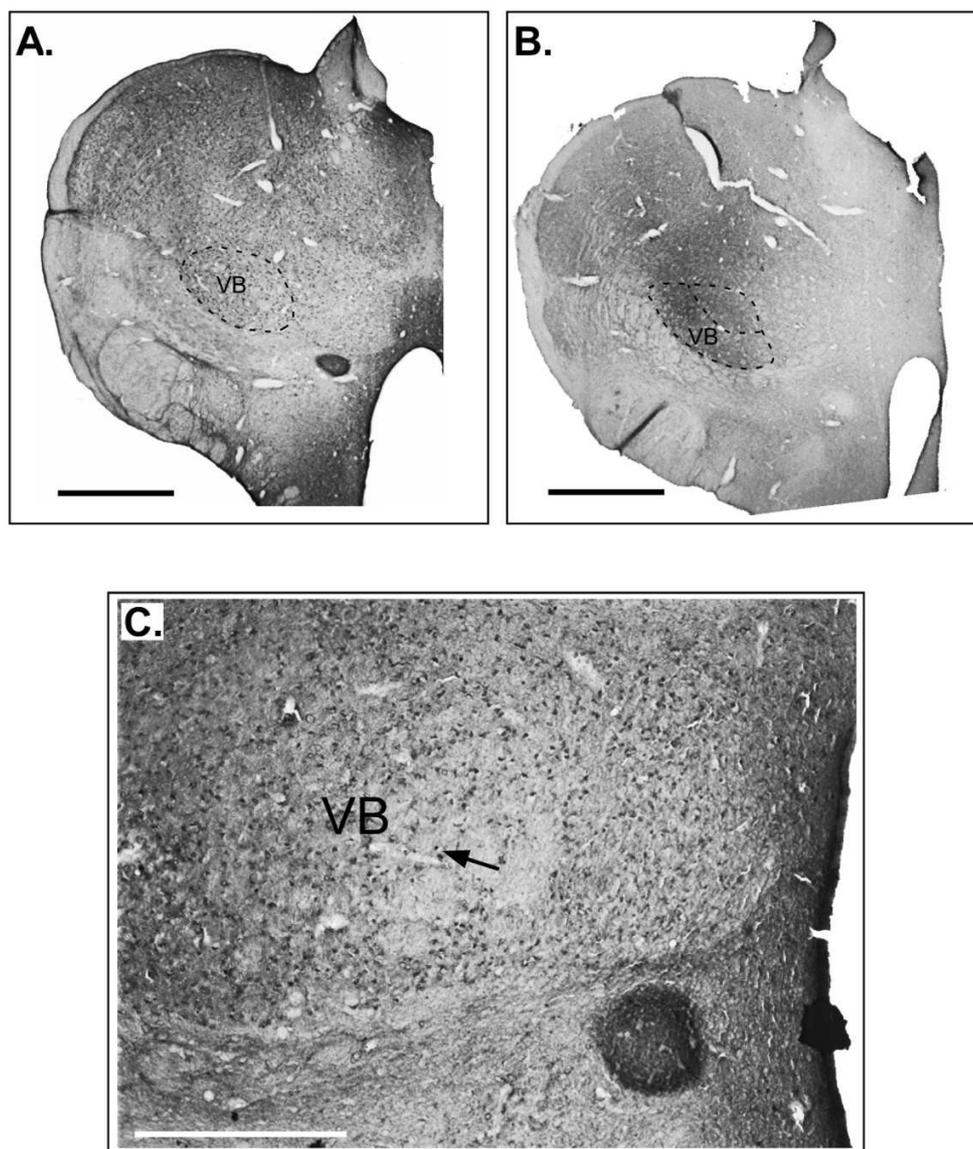


Figura 26. Subdivisões talâmicas reveladas por imunohistoquímica para calbindina e parvalbumina. Nota-se as bordas do núcleo talâmico VB na secção reagida para calbindina (A),

e em (B) para parvalbumina. Células calbindino-positivas (seta) foram encontradas difusamente no tálamo, inclusive em VB (C). Barra de calibração = 500 μ m (A e B); 125 μ m (C).

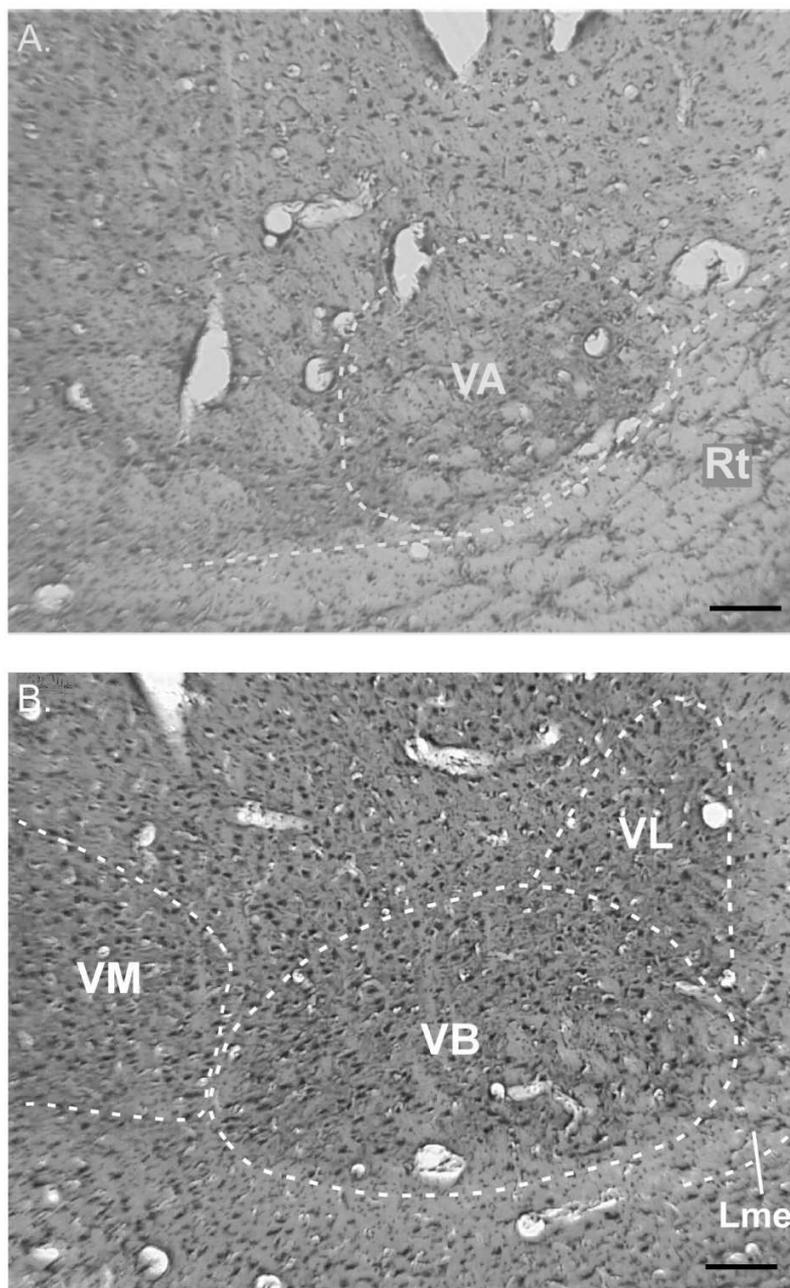


Figura 27. Subdivisões talâmicas reveladas pelo método do Nissl. Em (A) observa-se que as células encontradas no núcleo VA são de tamanho médio, com formato espinhoso e ovóide. Em

VB (B), os neurônios são grandes ou médios com processos celulares longos, enquanto que em VL (B) as células são também de tamanho médio, porém com formato poligonal. Barra de calibração = 200 μ m.

As secções talâmicas reagidas para citocromo-oxidase e NADPH-diaforase apresentaram o mesmo padrão de marcação de neurópila (Figura 25). As secções talâmicas reagidas para calbindina e parvalbumina diferem no padrão de suas marcações nos dois casos analisados (caso 0630 e 0631 – Figura 26). Notavelmente, os cortes talâmicos reagidos para calbindina apresentaram muitas células calbindino-positivas marcadas, as quais estavam distribuídas por todo tálamo. Em contraste, não foram visualizadas células parvalbumino-positivas após reações para parvalbumina nos dois casos estudados.

O tálamo dorsal nesta espécie pode ser subdividido em diversos grupos, tais como: 1) grupo anterior, 2) da linha média, 3) medial, 4) ventral, 5) laterodorsal (OSWALDO-CRUZ e ROCHA-MIRANDA, 1968). A descrição das subdivisões arquitetônicas que se segue se restringirá ao grupo ventral, onde estão localizados os principais núcleos talâmicos somestésicos e motores.

4.1.2.1 Núcleo Talâmico ventral basal (VB)

Segundo Oswaldo Cruz e Rocha-Miranda (1968), o núcleo (VB) do gambá limita-se aos planos $A = 5.5$ e $A = 3.2$ e é caracterizado por ser formado por neurônios grandes e médios com processos celulares longos. Em nossos cortes coronais, o núcleo VB, rostralmente, era encontrado em um nível onde não se via mais o núcleo reticulado. A este nível, observa-se a lâmina medular externa (Lme), ventral à VB (Figura 27). O limite dorsal de VB, entretanto, é mais dificilmente delimitado pela técnica de Nissl, uma vez que os núcleos vizinhos a VB nesta região possuem células com morfologia e densidade semelhantes (Figura 27).

Os cortes reagidos para a CO e NADPH-diaforase permitiram a identificação do núcleo talâmico VB. Este núcleo foi intensamente marcado, sendo caracterizado por intensa reatividade para CO e NADPH-d (Figura 25). Um núcleo ou complexo nuclear localizado dorsalmente à VB foi caracterizado por uma densa marcação nas reações de citocromo-oxidase e NADPH-diaforase, porém não foi marcado tanto pela calbindina quanto pela parvalbumina.

O núcleo VB possui a neurópila marcada tanto para calbindina quanto para a reação de parvalbumina (Figura 26). A região latero-ventral de VB apresentou uma marcação mais intensa do que a porção medial do núcleo em ambas as técnicas. Esta marcação sugere uma subdivisão de VB em duas regiões. Estas subdivisões não foram visualizadas nitidamente com os outros métodos utilizados (comparar Figura 26 com 25 e 27).

Além da neurópila marcada descrita acima, a histoquímica de NADPH-diaforase revelou neurônios marcados fracamente em VB e em todos os outros núcleos talâmicos marcados.

4.1.2.2 Núcleos talâmicos ventral anterior (VA) e ventral lateral (VL)

Os núcleos VL e VA formam um complexo nuclear xVL, que segundo Oswaldo-Cruz e Rocha-Miranda (1968), se estende de A= 6.7 a A= 4.4 e são identificados nos planos de corte mais rostrais do grupo ventral.

No tálamo, VA aparece como o primeiro núcleo do grupo ventral, localizado medialmente ao núcleo reticulado, e no primeiro plano de corte onde o pedúnculo cerebral aparece (Figura 27). Na preparação de Nissl, suas células são de tamanho médio, com formato espinhoso e ovóide.

Nos cortes reagidos para a CO e NADPH-d também foi possível identificar os núcleos talâmico “motores” (VA, VL e VM). VL mostrou-se menos reativo (Figura 25), permitindo a

identificação de sua borda ventral com VA rostralmente, e com VB caudalmente. A neurópila do núcleo VA mostrou-se intensamente reativa para ambas as reações (Figura 25).

O núcleo VL, no seu extremo rostral, localiza-se dorsalmente a VA, em posição medial na primeira secção onde surge a lâmina medular externa. Este núcleo possui células também de tamanho médio, porém com formato poligonal (Figura 27).

4.1.2.3 Núcleo talâmico ventral medial (VM)

O núcleo VM forma um complexo limitado nos planos A= 6.3 e A= 4.0 (Oswaldo-Cruz e Rocha-Miranda, 1968). Sua morfologia celular repete a descrita para VB, de acordo com a coloração de Nissl. Este núcleo foi identificado como um grupo de células localizado medialmente aos demais núcleos ventrais, localizado dorsalmente ao extremo medial da zona incerta (Figura 27).

Nos cortes reagidos para citocromo-oxidase e NADPH-diaforase, o núcleo VM apresenta-se bem delimitado e com a neurópila fortemente marcada (Figura 25).

Nas secções reagidas para calbindina e parvalbumina, a neurópila do núcleo VM mostrou-se fracamente reativa ou não-reativa (Figura 26).

As células calbindino-positivas distribuem-se por todo o tálamo dorsal. Observamos uma borda separando a região de células calbindino-positivas da região de não-marcação celular. Esta borda encontra-se no limite entre VB e a lâmina medular externa (Lme). Poucas células calbindino-positivas foram visualizadas abaixo desta borda (Figura 26c).

4.2.2 Projeções tálamo-corticais para S1 e SC

4.2.2.1 Projeção para a representação da pata anterior no córtex somatossensorial primário (S1)

No total, foram realizadas nove injeções no córtex somatossensorial primário de cinco animais (Tabela 4).

Na extremidade rostral do córtex somatossensorial primário, foi injetado fluoro-emerald no caso 0602 a 1,7 mm da fissura orbitária (Tabela 4) (Figura 20). Embora esta tenha sido uma injeção pequena (Tabela 4), foi possível identificar projeções talâmicas advindas dos seguintes grupos: grupo anterior, grupo lateral ventral, grupo laterodorsal e grupo medial (Figura 28).

As poucas células visualizadas no grupo anterior ficaram restritas aos núcleos anterior ventral (AV) e anterior medial (AM) (não ilustrado). Já no grupo lateral ventral, foram encontradas células marcadas nos núcleos VA, VB, VL, VM e C, enquanto que no grupo laterodorsal foi marcado somente o núcleo lateral intermédio ventral (Liv). Em especial, as células encontradas em VB se encontravam espalhadas por todo o núcleo sem uma segregação somatotópica evidente. Em alguns cortes, as células marcadas pareciam concentrar-se na região latero-ventral do núcleo. (Figura 28 – A 4.90 e 4.50). Os núcleos do grupo medial marcados foram o paracentral (PC) e médio dorsal (MD).

A quantificação realizada neste caso (Figura 30) revelou que o núcleo VB apresentou maior incidência de células marcadas (59,5%) do que os núcleos motores VA (1,5 %) e VL (4,2 %).

Em contraste com esse padrão, a injeção de DY na borda com a área SC (Figura 29) marcou menos células no tálamo do que a injeção de FE. Os núcleos do grupo anterior não foram marcados pela injeção de DY. As escassas células marcadas estavam restritas à região dorsal dos núcleos VA, VL, Liv e C.

Considerando que esta foi a segunda maior injeção realizada no nosso estudo (Tabela 4), fica impossível relacionar este padrão adstrito de projeções talâmicas para S1 com o volume da injeção. O próximo experimento a ser descrito sugere que este resultado seria uma consequência do transporte lento de diamidino-yellow. Sendo assim, é possível que o tempo de sobrevivência do animal tenha sido insuficiente para a efetiva marcação retrógrada de células no tálamo. Outra possibilidade é que a lesão cortical provocada pela inserção dos cristais tenha lesado os aferentes talâmicos, impedindo seu transporte para o tálamo.

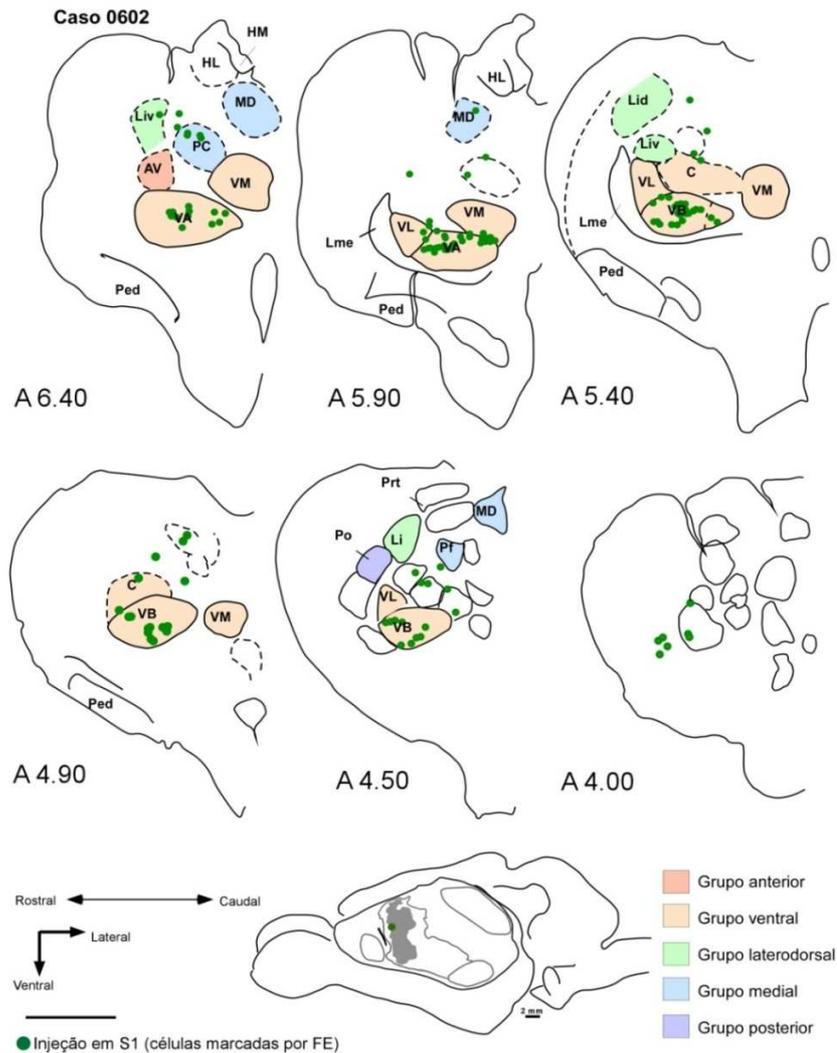


Figura 28. Projeções tálamo-corticais para a área S1 (caso 0602). Reconstrução de cortes coronais do tálamo. Acima, desenhos esquemáticos de cortes do tálamo com os núcleos e a distribuição de células marcadas pelo neurotraçador FE, injetado na borda das áreas SR e S1 (abaixo). As linhas pretas finas denotam as bordas entre os núcleos talâmicos. As linhas tracejadas representam bordas menos evidentes dos núcleos talâmicos marcados com a coloração de Nissl. A numeração ao lado das seções talâmicas correspondem ao plano de secções do atlas do estereotático do gambá. (OSWALDO-CRUZ e ROCHA-MIRANDA, 1968). Neste caso, a injeção de FE foi colocada na representação da pata anterior de S1 (Figura 20a e b). A maioria das células marcadas foi observada no núcleo VB e VA. Poucas células marcadas foram visualizadas nos núcleos VL, VM, PC e C.

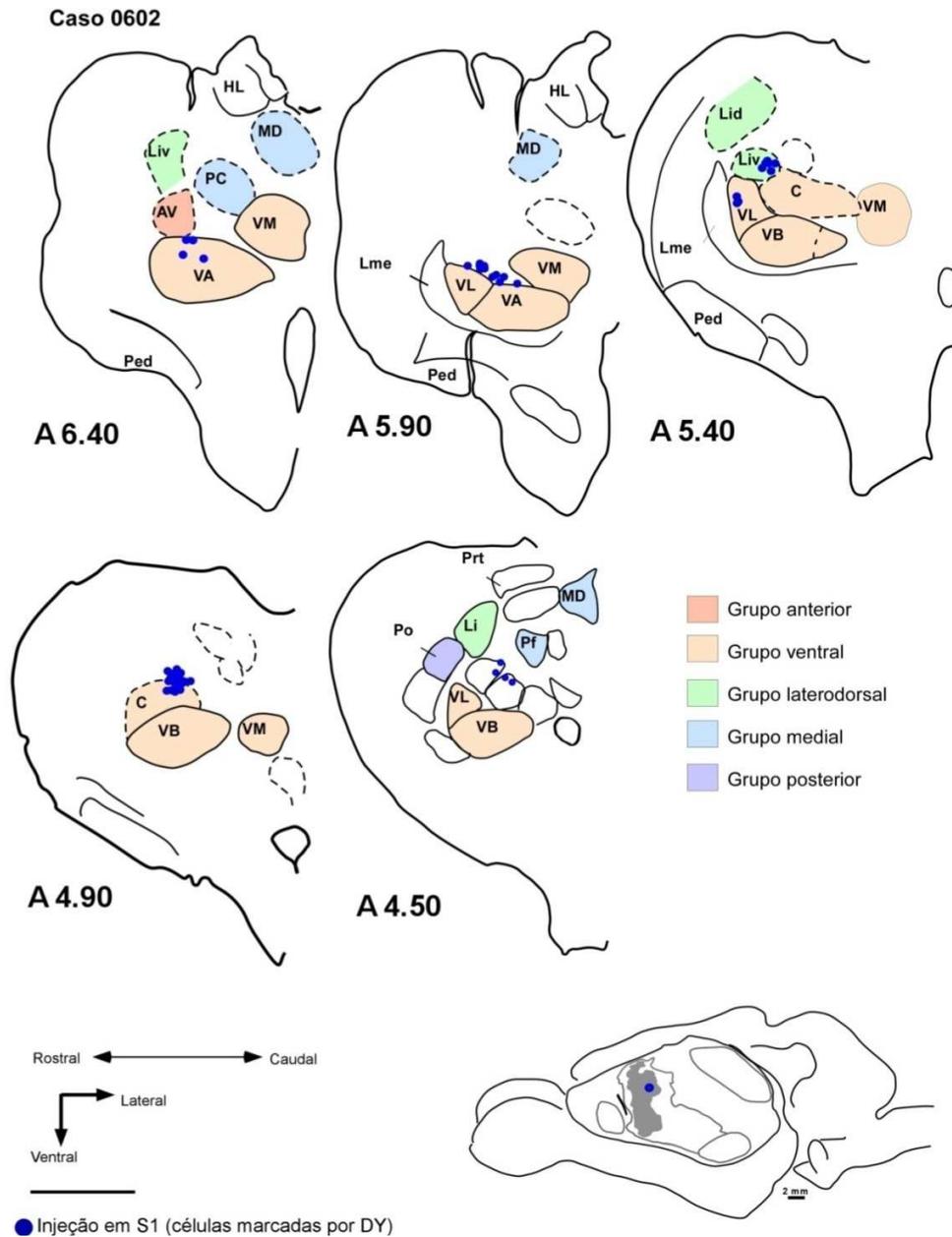


Figura 29. Projeções tálamo-corticais para a área S1 (caso 0602). Reconstrução de cortes coronais do tálamo. Neste caso, a injeção de DY foi colocada na representação da pata anterior de S1 (Figura 10a e b). Poucas células marcadas foram visualizadas nos núcleos VA, VL, Liv e C.

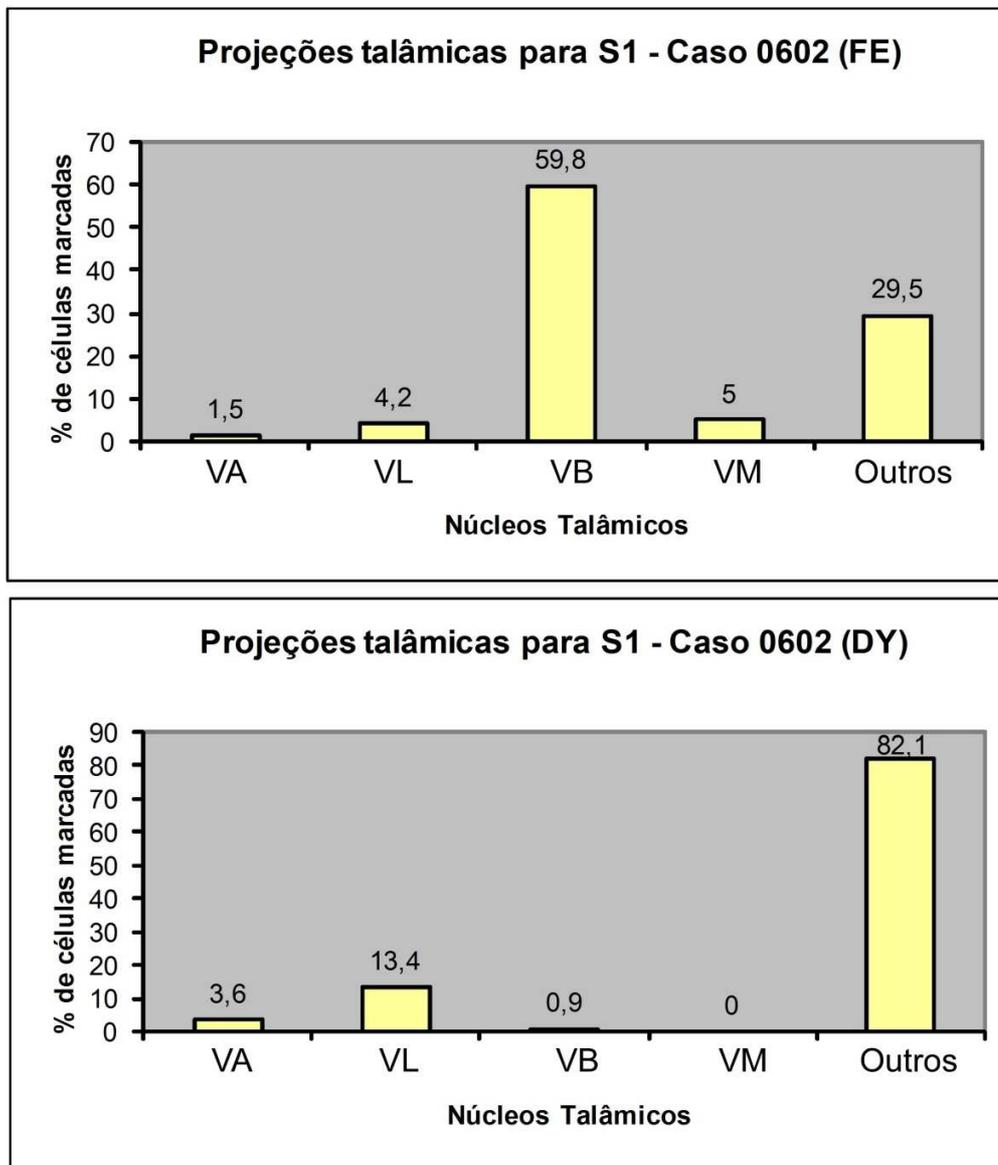


Figura 30. Análise quantitativa das projeções talâmicas para a representação somatotópica de pata em S1 (caso 0602) - injeções de FE e de DY. Nota-se que o núcleo somestésico VB obteve maior densidade de células marcadas na injeção de FE, seguido do núcleo VL.

Caso 0629

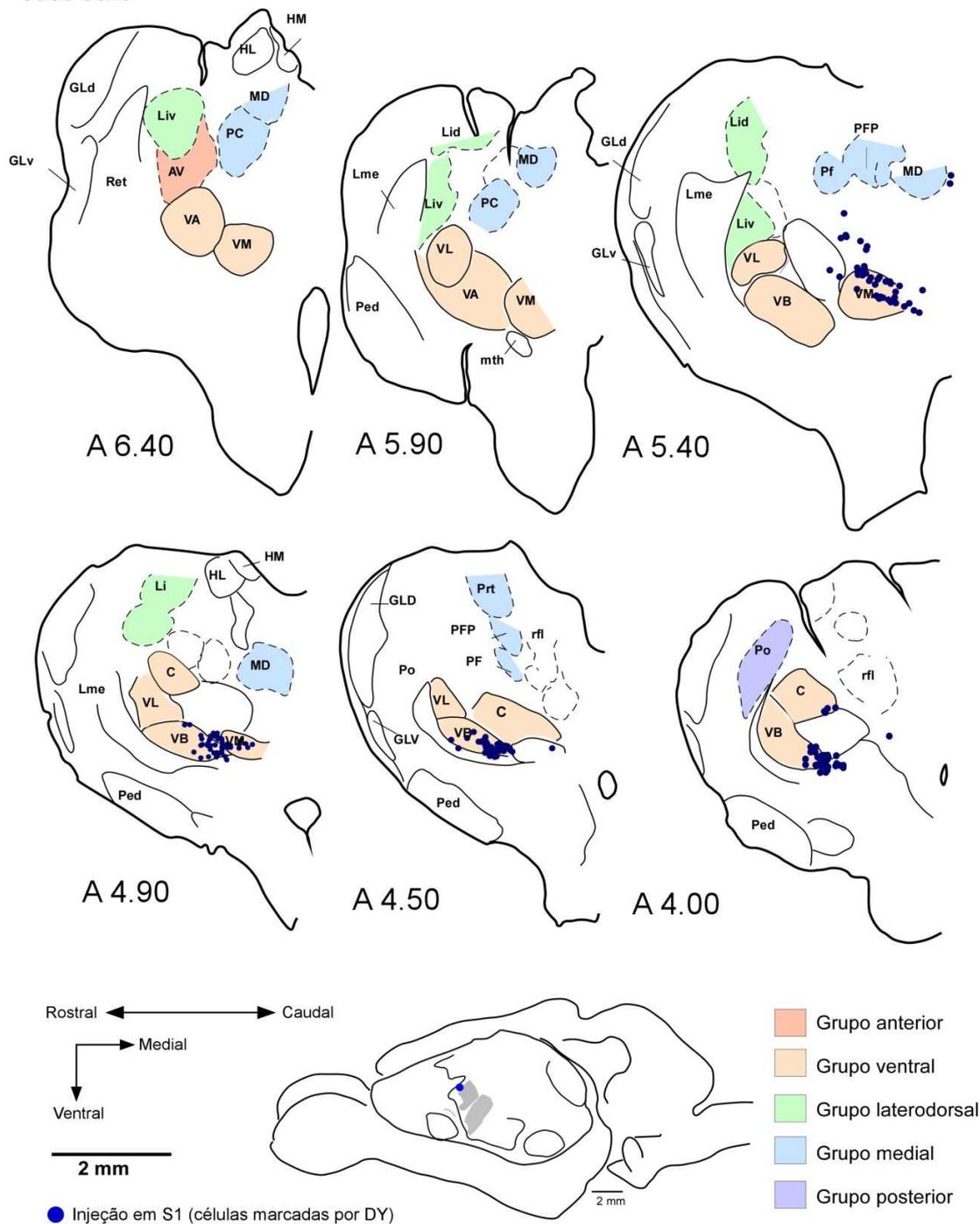


Figura 31. Projeções tálamo-corticais para a área S1 (caso 0629). Reconstrução de cortes coronais do tálamo. Neste caso, a injeção de DY foi colocada na representação da pata anterior de S1. A maioria das células marcadas foi observada nos núcleos VB, VA e PC. Poucas células marcadas foram visualizadas nos núcleos VB, VM e C.

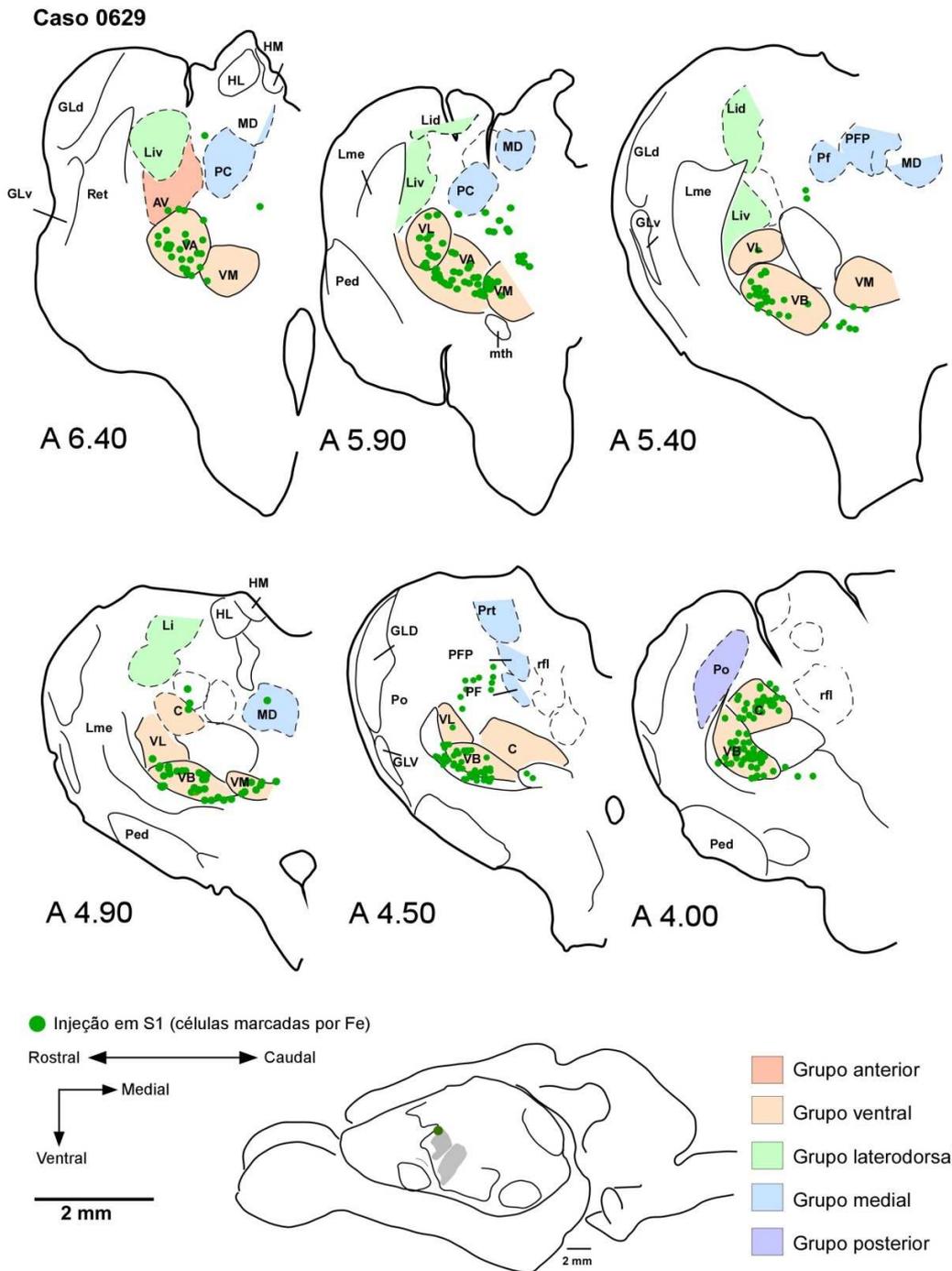


Figura 32. Projeções tálamo-corticais para a área S1 (caso 0629). Reconstrução de cortes coronais do tálamo. Neste caso, a injeção de FE foi colocada na representação da pata anterior de S1. A maioria das células marcadas foi observada nos núcleos VB, VA e C. Poucas células marcadas foram visualizadas nos núcleos AV, VL, VM, PF, PFP, PC e MD.

No caso 0629, duas injeções foram realizadas em S1 com os neurotraçadores DY e FE (Tabela 4 e Figura 33). A injeção de DY foi posicionada a 2,5 mm da fissura orbitária e seu sítio de injeção abrangeu cerca de 0,9677 mm² do córtex somatossensorial primário.

Outra vez, após a injeção de DY, foi observada uma marcação restrita a poucos núcleos no tálamo. Tais resultados podem ser visualizados na Figura 31, onde se observa a ausência de células em núcleos do grupo anterior (Figura 31, A 7.00 – A 5.90). Em verdade, os neurônios marcados por DY limitaram-se principalmente na região medial do núcleo VB (A 5.40-A 4.00, 65,3% dos neurônios marcados, Figura 31); e em menores proporções, aos núcleos vizinhos VM e C.

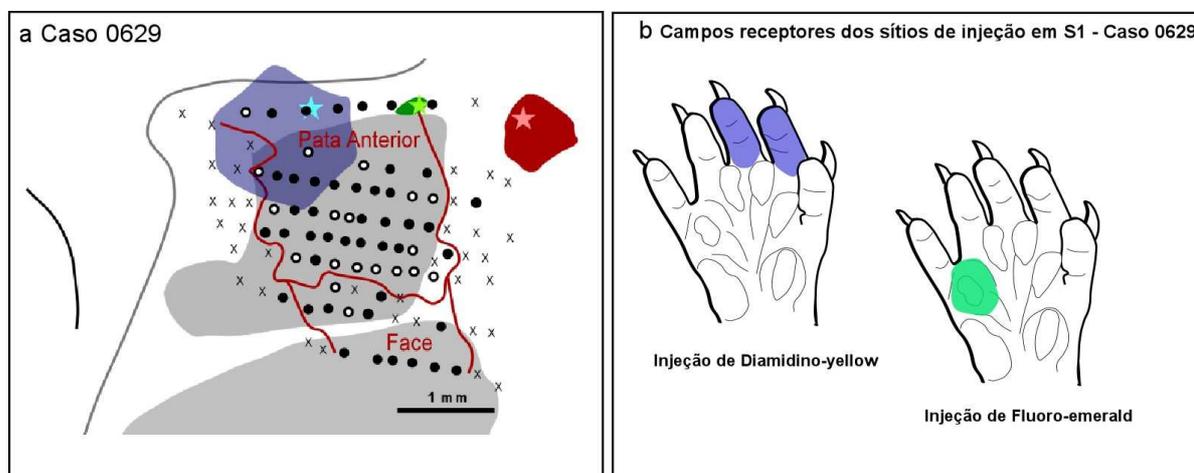


Figura 33. Sítios de injeção do caso 0629. Em (A) nota-se os sítios de injeção de DY, FE e FR (círculos em azul, verde e vermelho respectivamente). Os campos receptores para dos sítios de penetração mais próximos aos sítios de injeção são pequenos (B).

Neste mesmo caso, realizamos uma injeção de FE em S1 a 3,6 mm da fissura orbitária (Tabela 4). A análise desta injeção permitiu a visualização de diversos núcleos talâmicos marcados (Figura 32), tais como: AV do grupo anterior; VA, VL, VB, VM e C do grupo lateral ventral; parafascicular (PF), parafascicular postero-lateral (PFP), PC e MD do grupo medial e o núcleo posterior (Po), do grupo posterior. O núcleo VB, mais uma vez, se apresentou mais intensamente marcado (34,5%), seguido de VA (17,2%) (Figuras 32 e 34).

No experimento 0705 também foram estudadas projeções dos núcleos talâmicos para a representação da pata anterior em S1. O sítio de DY apresentou uma área de 1,3545 mm², expandindo-se para as áreas SR e SC (Figura 21A). No tálamo, foram marcados os seguintes núcleos (Figura 35): AV, AM (grupo anterior), VA, VB, VL, VM, C (grupo lateral ventral), Liv (grupo laterodorsal) e PF, PC (grupo medial). Uma região na zona medial do tálamo foi marcada, porém os núcleos não puderam ser identificados pelos métodos arquitetônicos utilizados.

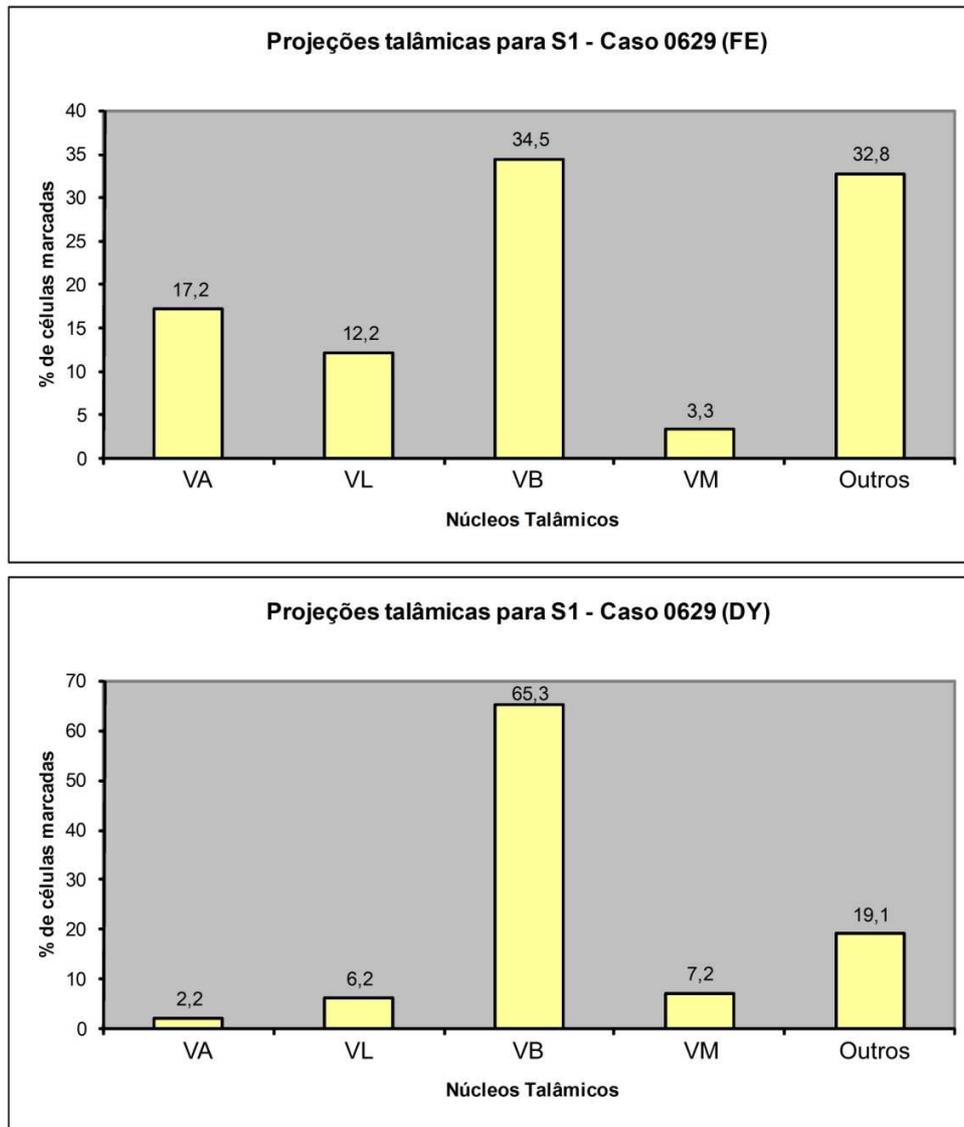


Figura 34. Análise quantitativa das projeções talâmicas para a representação somatotópica da pata em S1 (caso 0629) – injeções de FE e DY. Nota-se que o núcleo somestésico VB obteve maior densidade de células marcadas do que os núcleos motores em ambas as injeções de FE e DY.

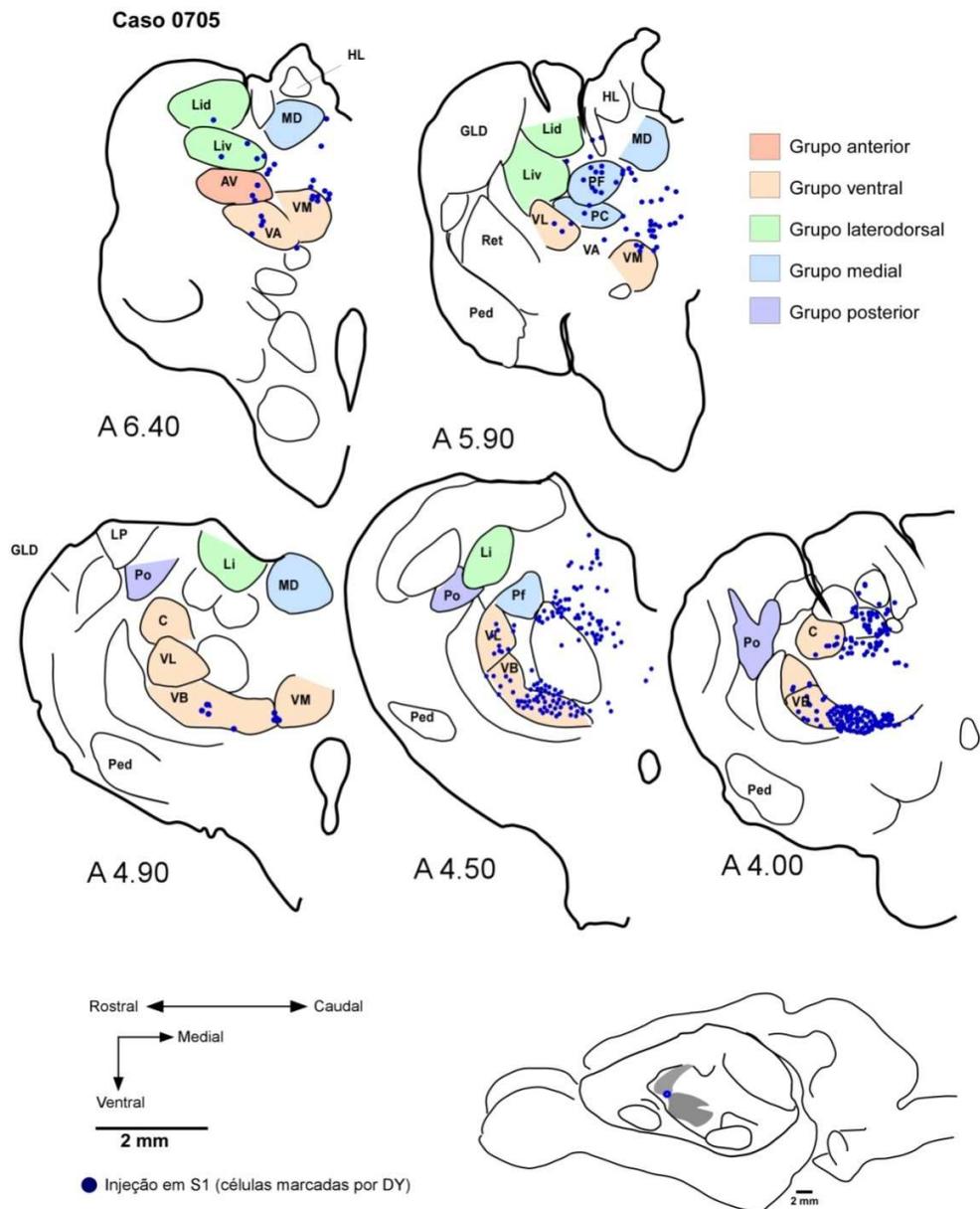


Figura 35. Projeções tálamo-corticais para a área S1 (caso 0705). Reconstrução de cortes coronais do tálamo. Neste caso, a injeção de DY foi colocada na representação da pata anterior de S1, com espalhamento do neurotraçador para as áreas SR e SC. As células marcadas foram observadas no núcleo AM, AV, VB, VA, VL, VM, C, PF e PC.

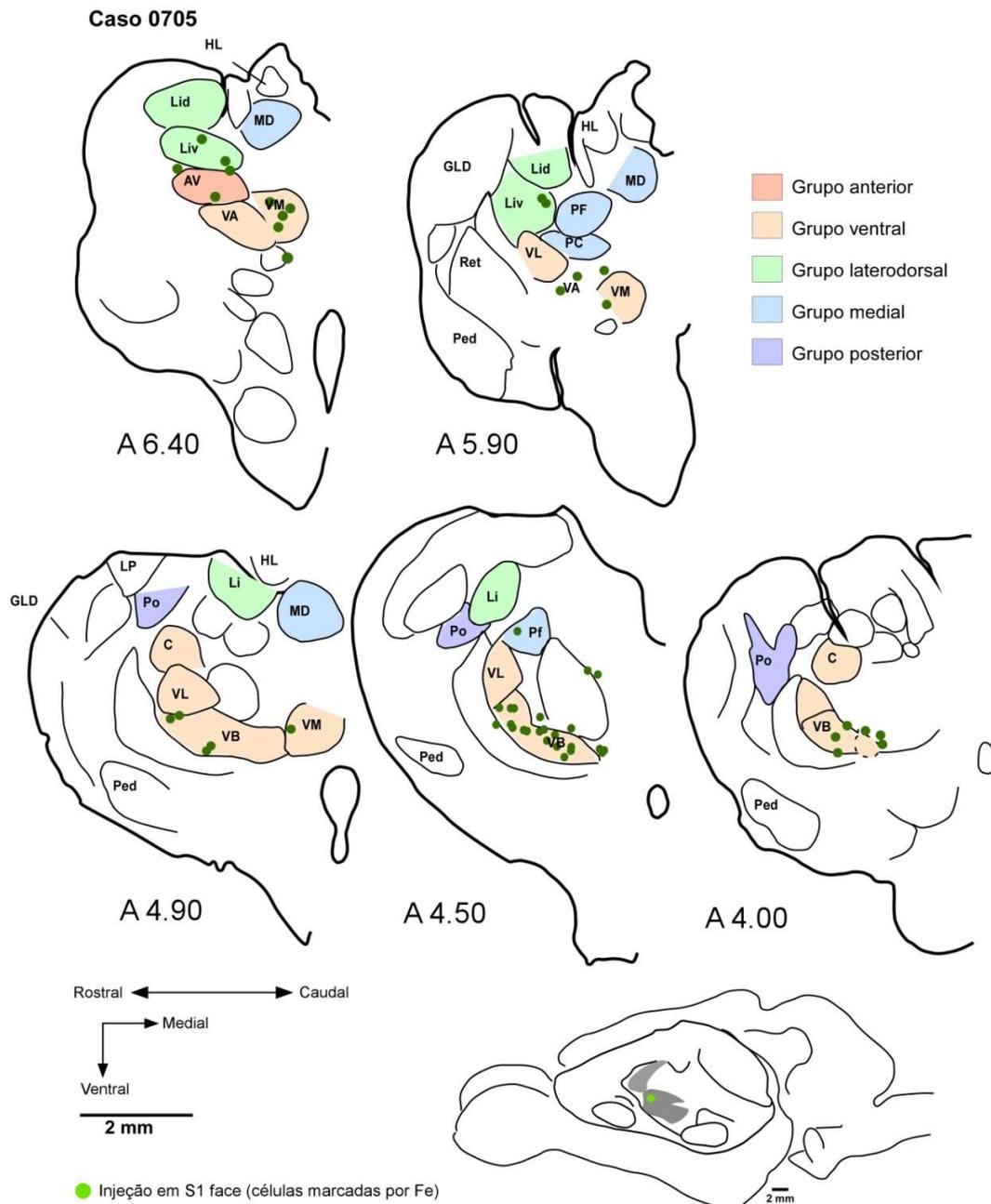


Figura 36. Projeções tálamo-corticais para a área S1 (caso 0705). Reconstrução de cortes coronais do tálamo. Neste caso, a injeções de FE foi colocada na representação da face de S1. A

maioria das células marcadas foi observada nos núcleos VB, AM. As demais células marcadas foram visualizadas nos núcleos AD, VA, VL e VM, Liv e PF.

4.2.2.2 Projeção para a representação da face no córtex somatossensorial primário

No experimento 0705, uma injeção de FE foi realizada na representação de face em S1 (Figura 36). O padrão de distribuição dos neurônios talâmicos marcados foi semelhante àquele obtido após injeções na representação da pata anterior (Figura 35). Neurônios marcados retrogradamente foram identificados nos seguintes grupos: grupo anterior (núcleos AV, AM, AD), grupo lateral ventral (núcleos VB, VA, VL e VM), grupo lateral dorsal (Liv) e grupo medial (PF). Embora a sobreposição do sítio injetado com o resultado de nosso mapeamento sugira a ausência de espalhamento do traçador para a representação da pata anterior (Figura 20A), encontramos células marcadas ao longo de toda a extensão de VB (Figura 36, seções A4.90 e 4.50); embora nas seções mais caudais, a marcação no núcleo VB tenha sido encontrada mais medialmente (Figura 36, A 4.00) onde a representação da face foi eletrofisiologicamente identificada nesta espécie (SOUZA et al., 1971).

No caso 0705, também foi realizada uma injeção de DY na representação da pata anterior. Esta injeção apresentou um espalhamento para a região de representação da face em S1 que pode ser observado na Figura 21. Conforme ilustra a Figura 35, notamos células marcadas na região lateral do núcleo, porém as células retrogradamente marcadas concentraram-se na região medial do núcleo VB dos cortes posteriores (A 4.50 e 4.00), reforçando a existência de uma organização topográfica dentro de VB.

4.2.3 Sumário das aferências talâmicas para S1:

Verificou-se que os seguintes grupos talâmicos projetam para os campos de representação da pata anterior e face de S1: 1) o grupo anterior, 2) grupo ventral, 3) grupo laterodorsal e 4) grupo medial.

As projeções consistentes para S1, que aparecem em todos os casos, no grupo anterior, originam-se no núcleo anterior ventral (AV). No grupo lateral ventral, as projeções surgem dos núcleos motores ventral anterior (VA), núcleo ventral medial (VM) e núcleo ventral lateral (VL). O componente somestésico do grupo ventral se origina do núcleo somestésico ventral basal (VB) e do núcleo central (C). Neurônios do grupo medial com projeções para as representações de pata anterior e face foram identificadas nos núcleos parafascicular (PF), núcleo paracentral (PC), enquanto que as projeções do grupo laterodorsal surgem do núcleo lateral intermédio ventral (Liv).

Projeções marginalmente topográficas do tálamo para S1 foram encontradas no núcleo VB. As células que projetam para a representação de face do córtex somestésico primário tendem a se concentrar na região medial do pólo posterior do núcleo; mesmo assim foram encontradas células marcadas em toda a extensão do núcleo, independente da região injetada.

4.2.2.4 Projeções tálamo-corticais para SC

Foram realizadas quatro injeções em SC em quatro animais diferentes (Tabela 4), tornando possível caracterizar o padrão de projeções tálamo-corticais para esta área. Em todos os casos, a injeção de FR em SC resultou em numerosas células marcadas no tálamo, abrangendo, em um dos casos analisados (0705, ver abaixo), marcação de núcleos talâmicos que não haviam sido marcados pelas injeções feitas em S1.

Na Figura 37 observamos o caso 0602, onde temos um sítio de injeção localizado a 5,1 mm fissura orbitária (Tabela 4). Isto configura a injeção mais caudal realizada em nossos experimentos.

A marcação talâmica resultante (Figura 37) foi encontrada nos núcleos AV, AM (grupo anterior), VA, VB, VL, VM, C (grupo lateral ventral), Liv, lateral intermédio dorsal (Lid) (grupo laterodorsal) PF, PC, MD (grupo medial) e suprageniculado (SG) (grupo posterior).

Dentre eles, o núcleo com maior concentração de células marcadas foi o núcleo VB (22,4%) (Figura 40). Uma menor incidência de marcação celular foi notada também nos núcleos motores VL (12,2%) e VA (4,2%).

Em contraste com o caso 0602, a injeção de FR em SC no caso 0629 (Figura 38) revelou uma marcação um pouco mais restrita, encontrada nos núcleos: AV (grupo anterior), VA, VB, VL, C (grupo lateral ventral) e Po (grupo posterior). Convém ressaltar que, a área ocupada por este sítio de injeção (Tabela 4) é maior do que no caso 0602, o que não explicaria essa marcação limitada no tálamo.

A quantificação das projeções para SC revelou, novamente, predominância das projeções originadas do núcleo VB (39,8%) em relação aos núcleos motores VA e VL (16,6 e 16%, respectivamente) (Figura 40).

No ***experimento 0705***, a injeção em SC, revelou neurônios em núcleos talâmicos até então não marcados, tais como: AD do grupo anterior e Li do grupo laterodorsal (Figura 39). Os demais núcleos que apresentaram projeções para SC, neste caso, foram: AV, AM (grupo anterior), VA, VB, VL, VM, C (grupo lateral ventral), Lid, Liv, Li (grupo laterodorsal), PC, PF, MD (grupo medial) e Po (grupo posterior).

4.2.4 Sumário das aferências talâmicas para SC: *As projeções para a área SC se originam dos seguintes grupos talâmicos: 1) o grupo anterior, 2) grupo lateral ventral e laterodorsal, 3) grupo medial e 4) grupo posterior. Os núcleos do grupo anterior que enviam projeções consistentes para SC incluem o núcleo anterior medial (AM) e o anterior ventral (AV). No grupo lateral ventral os núcleos motores que se projetam para SC correspondem ao núcleo ventral anterior (VA), núcleo ventral medial (VM) e núcleo ventral lateral (VL). De sobremaneira, o núcleo somestésico ventral basal (VB) também projeta para SC. O núcleo central (C), também projeta para SC. No grupo laterodorsal, os núcleos que projetam para SC são: lateral intermédio ventral (Liv) e intralaminar ventral dorsal (Lid). Neurônios do grupo medial com projeções para SC foram identificados nos núcleos parafascicular (PF), paracentral (PC) e médio dorsal (MD). Por fim, destacam os núcleos do grupo posterior por não terem sido*

identificados com frequência nas injeções em S1. São eles o núcleo posterior (Po) e o núcleo suprageniculado (SG).

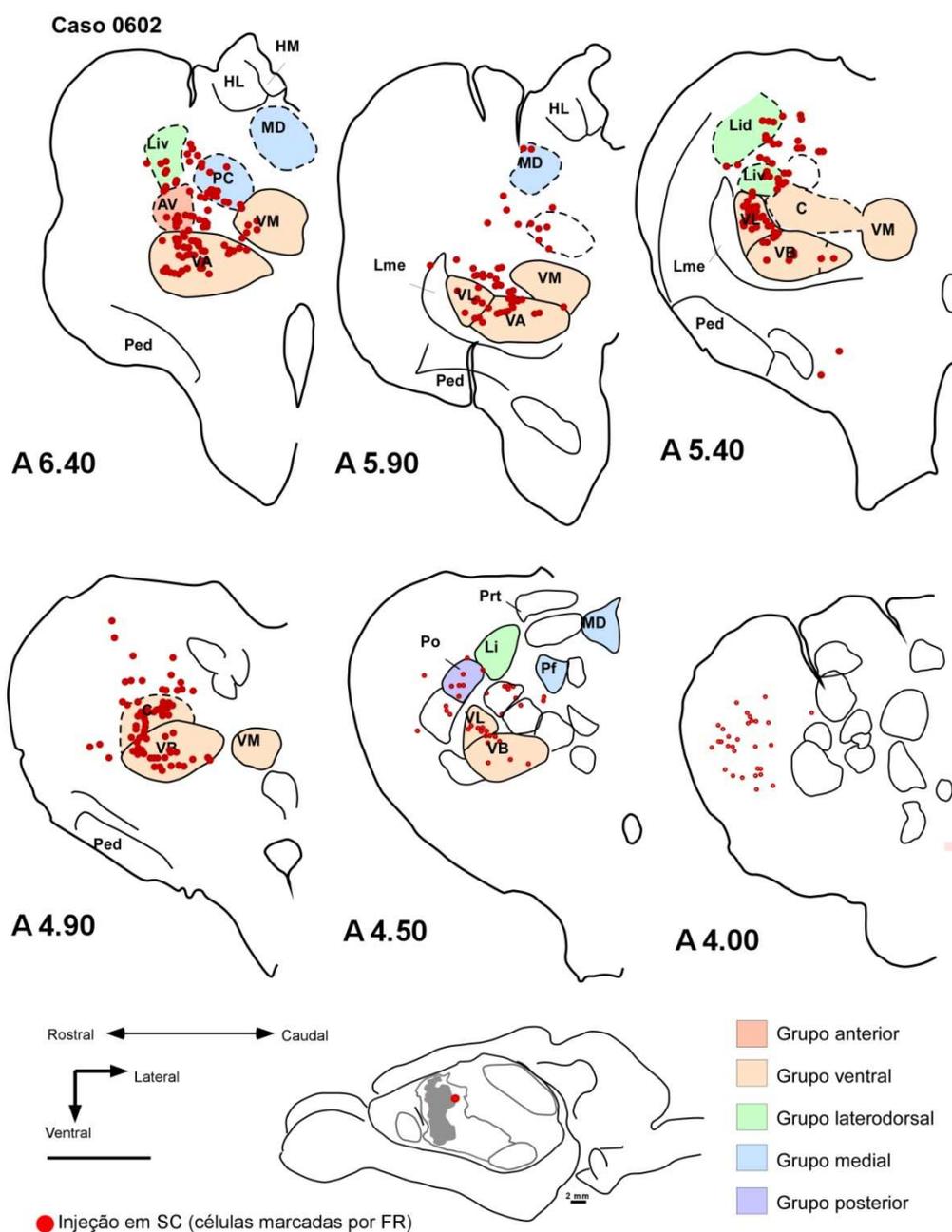


Figura 37. Projeções tálamo-corticais para a área SC (caso 0602). Reconstrução de cortes coronais do tálamo. A injeção de FR foi posicionada em SC. A maioria das células marcadas foi

observada nos núcleos VB, VA e AV. As demais células marcadas foram visualizadas nos núcleos AV, AM, VA, VB, VL, Liv, Lid, C, PF, PC, SG e MD.

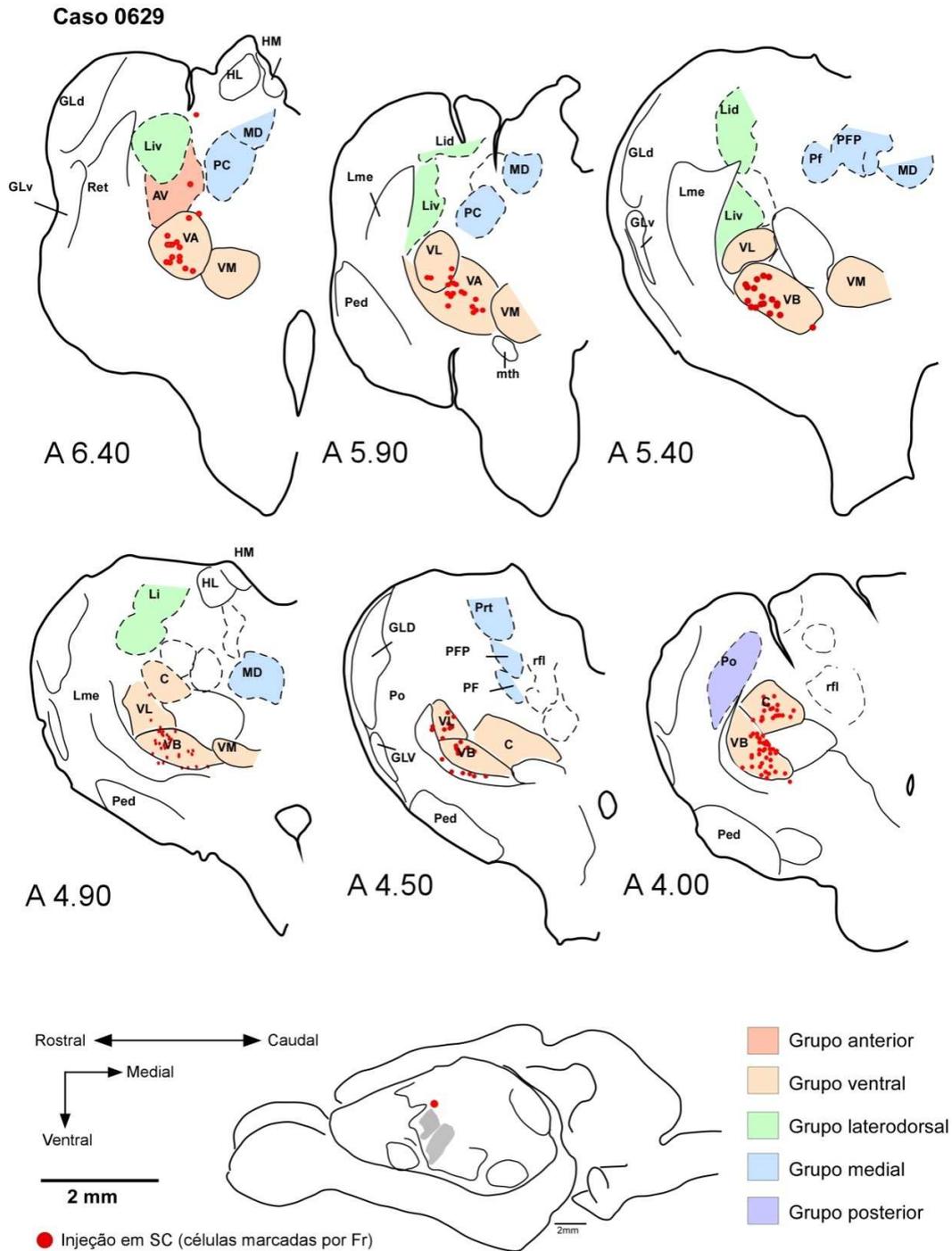


Figura 38. Projeções tálamo-corticais para a área SC (caso 0629). Reconstrução de cortes coronais do tálamo. Neste caso, a injeção de FR foi posicionada em SC. As células marcadas foram visualizadas nos núcleos AV, VA, VB, VL, C e Po.

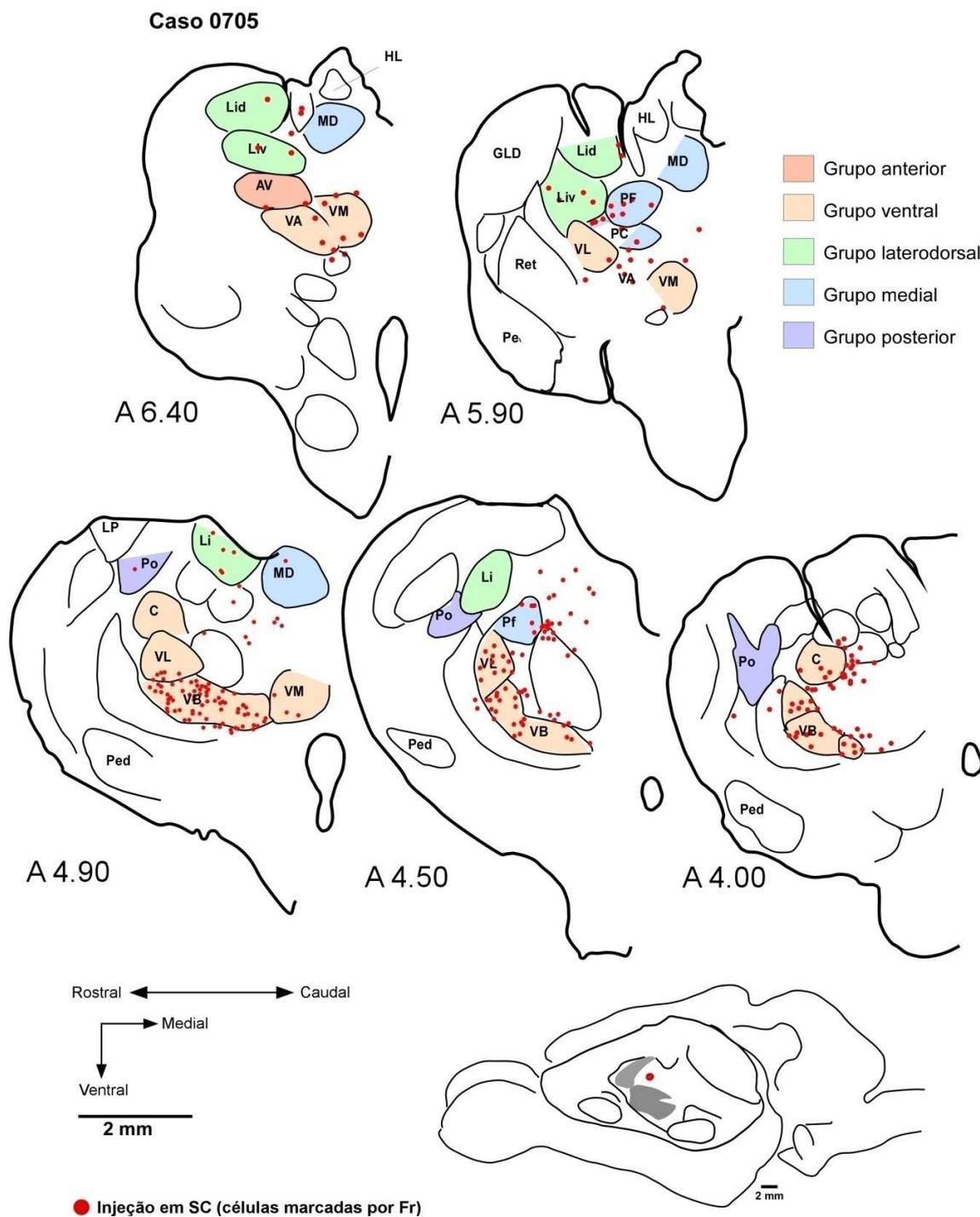


Figura 39. Projeções tálamo-corticais para a área SC (caso 0705). Reconstrução de cortes coronais do tálamo. A injeção de FR foi posicionada em SC. A maioria das células marcadas foi observada nos núcleos VB, VL e AM. As demais células marcadas foram visualizadas nos núcleos AV, AM, VA, VB, VL, VM, Lid, Liv, AD e Li.

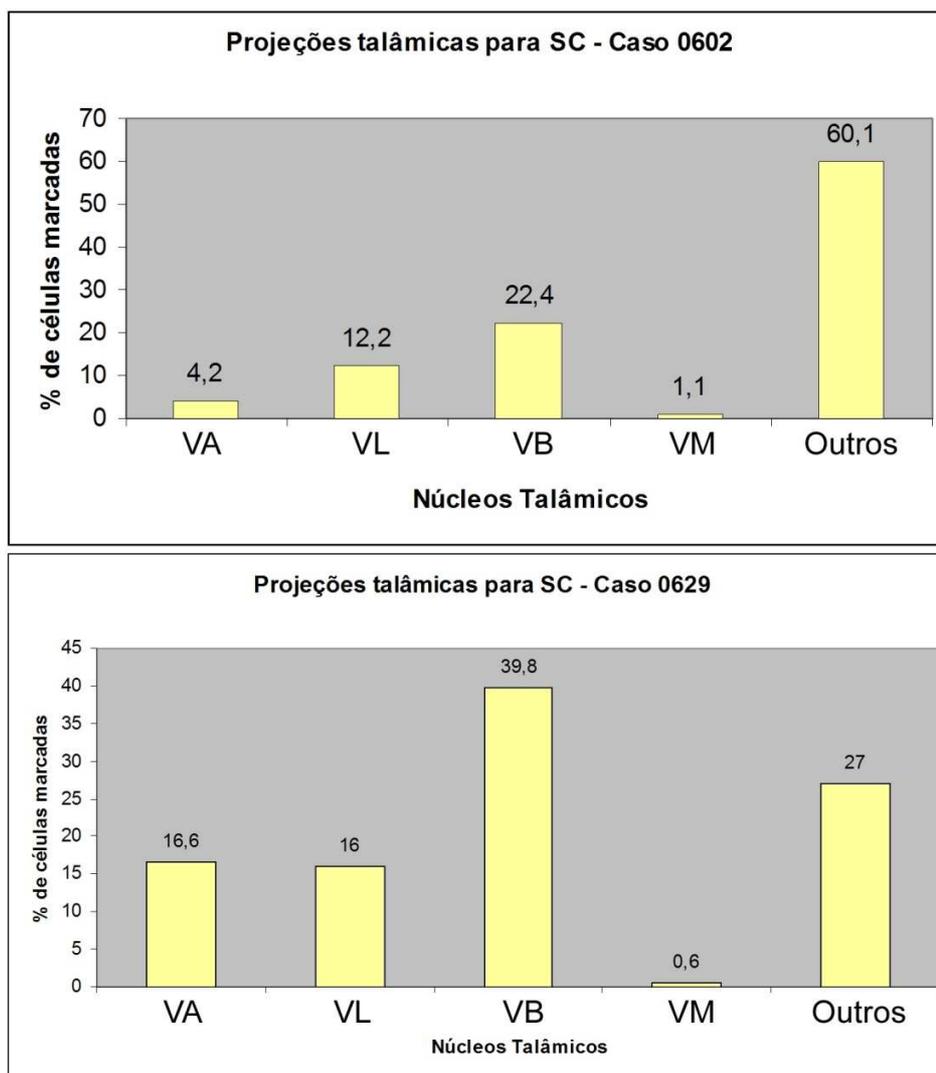


Figura 40. Análise quantitativa das projeções talâmicas para a representação SC. Nota-se que o núcleo somestésico VB obteve maior densidade de células marcadas em ambos os casos. O núcleo VM mostrou-se pouco marcado nestes casos analisados para injeções em SC.

5. DISCUSSÃO

5.1 O neocórtex e o comportamento do gambá

Atualmente na neurobiologia comparada existe uma tendência em se caracterizar nos primatas as áreas somatossensoriais caudais a S1, incluindo aquelas que perfazem o córtex parietal posterior (PADBERG et al., 2005; PADBERG e KRUBITZER, 2006, STEPNIEWSKA et al., 2005). Este esforço se deve, em parte, à interrelação proposta entre a evolução das habilidades manuais e a organização das áreas somatossensoriais e motoras no neocórtex.

De uma forma geral, movimentos poucos complexos são uma característica comum entre os didelfídeos (KIMBLE, 1997). Embora os gambás sejam rápidos e eficientes no momento da captura, estes animais realizam movimentos muito estereotipados na manipulação da presa. Outros mamíferos não-primatas, como os ratos, são capazes de desempenhar movimentos mais complexos durante o comportamento predatório, utilizando os membros para manipular os alimentos, através da pronação, supinação e ajustamento dos dedos no alcance do alimento (IVANCO et. al., 1996).

Embora estudos comparativos indiquem que os mamíferos compartilhem algumas características comuns na organização do sistema somatossensorial e motor, as habilidades motoras das mãos e outros membros parecem estar relacionadas às diferenças anatômicas, como por exemplo, as das terminações das vias do tracto piramidal na medula espinhal destes animais. As diferenças anatômicas nas terminações do tracto córtico-espinhal permitem classificar os

mamíferos em quatro grupos distintos (IVANCO et al., 1996). No primeiro grupo, onde se encontra o gambá, as fibras corticais terminam na medula cervical e torácica, principalmente na parte dorsal da substância cinzenta contralateral e da zona intermediária (IVANCO et al., 1996). No segundo grupo, onde observamos os ratos, as fibras se distribuem por toda a medula espinhal e terminam contralateralmente tanto no corno dorsal quanto na zona intermediária da medula espinhal. Algumas poucas fibras corticais do grupo II se distribuem também para a lamina IX, que contém motoneurônios do corno ventral da medula espinhal (*cf.* MARTIN e FISHER, 1968). Nos outros dois grupos, que incluem alguns primatas, como os humanos, as fibras córtico-espinhais terminam densamente na lamina IX do corno ventral (*cf.* MARTIN e FISHER, 1968). Assim, no grupo dos gambás e outros marsupiais, as terminações do tracto córtico-espinhal na parte medial do corno dorsal da medula espinhal se assemelham mais a projeções sensoriais do que motoras (IVANCO et. al., 1996, BECK et al., 1996).

Atualmente sabe-se que o tracto córtico-espinhal possui mais de um sítio de origem em pelo menos 22 espécies de mamíferos. Estes sítios, na maioria das espécies, surgem predominantemente do lado contralateral ao tracto (90%). Nos marsupiais, a principal fonte destas projeções corresponde ao córtex parietal ou amálgama sensório-motor (NUDO e MASTERTON, 1990). Nos primatas, a principal zona de projeção inclui as áreas 6, 4, 1, 2, 5 e parte das áreas 23 e 24 de Brodman. Desta maneira, nota-se que as áreas somatossensoriais também compartilham projeções consistentes para o tracto piramidal, de forma que estimulação elétrica de sítios nestas áreas são capazes de produzir movimentos do corpo mesmo após lesão completa de M1 (NUDO e MASTERTON, 1990). Se levarmos em conta a distribuição destas projeções, observou-se que nos marsupiais, a distribuição destas projeções no cortex parietal tende a ser homogênea, enquanto que nos primatas a região rostral ao cortex somatossensorial,

correspondente ao cortex motor, apresenta projeções mais densas. Esta região de projeção mais densa localiza-se paralela ao sulco central, dentro da área 4, incluindo também a borda com a área 3a (NUDO e MASTERTON, 1990). A existência de projeções córticoespinhais a partir do córtex somestésico, não é, portanto, um parâmetro único para caracterizar esta área como tendo funções motoras no gambá.

Acredita-se que outras características podem estar envolvidas nos comportamentos e movimentos de diferentes espécies, como a morfologia periférica dos membros. A organização do córtex motor também está diretamente relacionada à habilidade motora de uma espécie. Secções do tracto piramidal dos ratos ou lesões do córtex motor, resultam em prejuízos dos movimentos de alcance com o membro contralateral à lesão. Os animais lesionados utilizam uma série de movimentos rotatórios do corpo para obter comida sem o movimentos das mãos, porém não realizam abdução do cotovelo ou fazem adução da pata para levar a comida à boca. Estes movimentos lembram a estratégia de alcance dos gambás, que não realizam abdução do cotovelo, pronação ou supinação da pata.

A presença ou não de um córtex motor primário que comande as funções motoras no gambá *Didelphis aurita* será discutida adiante. Este trabalho teve por foco principal tentar compreender como as áreas somatossensoriais se relacionam com a execução do movimento nesta espécie através de suas conexões talâmicas e motoras. Inicialmente iremos discutir a segregação das informações motoras e somestésicas em níveis subcorticais, como o tálamo, para depois analisar as conexões corticais propriamente ditas.

5.2 Delimitação dos núcleos talâmicos

Os núcleos talâmicos somestésicos e motores do gambá *Didelphis aurita* foram descritos previamente através das reações clássicas de Nissl e Mielina por Bodian (1939), Oswaldo-Cruz e Rocha-Miranda (1979) e Donoghue e Ebner (1981). Nossa avaliação arquitetônica de alguns núcleos talâmicos teve como objetivo reanalisar e confirmar os limites entre os núcleos somestésicos e motores propostos anteriormente para o *Didelphis aurita*. As técnicas escolhidas de NADPH-diaforase, calbindina e parvalbumina foram recentemente utilizadas com sucesso no gambá *Didelphis aurita* para a reanálise das bordas nucleares do complexo amigdalóide (ROCHA-REGO et al., 2008).

5.2.1 Marcadores Histoquímicos

Tanto a reação de NADPH-diaforase quanto a de citocromo-oxidase se revelaram bons marcadores dos núcleos talâmicos do gambá *Didelphis aurita*, e as bordas entre os núcleos VB (somestésico), VL, VA e VM (motor) do grupo ventral foram identificadas com ambos os métodos. Além disso, foi observada uma correspondência no padrão de marcação da neurópila entre a NADPH-diaforase e a citocromo-oxidase. Esta colocalização da marcação de NADPH-diaforase com a citocromo-oxidase reforça a ligação entre a atividade destas duas enzimas (ver também FRANCA, 1999). A técnica de citocromo-oxidase revela a atividade de uma enzima mitocondrial, a citocromo aa3. Regiões intensamente marcadas por este método histoquímico correspondem, portanto, a porções do tecido nervoso metabolicamente mais ativas (WONG-RILEY, 1979), onde se registra uma maior atividade neuronal (cf. LIVINGSTONE e HUBEL, 1984; ALLMAN e ZUCKER, 1990).

5.2.2 Marcadores imunohistoquímicos

No gambá *Didelphia aurita*, a distribuição das células calbindina e parvalbumina-positivas no tálamo diferem entre si. Notavelmente, numerosas células marcadas para calbindina encontram-se espalhadas por todo o tálamo dorsal, enquanto que as parvalbumina-positivas parecem ser inexistentes. Em ambos os casos 0630 e 0631 observamos uma neurópila reativa para a calbindina e parvalbumina. No entanto, estes marcadores não se destacaram na delimitação dos núcleos talâmicos somestésicos e motores.

Historicamente, foram propostos dois tipos de conexões tálamo-corticais com papéis diferentes nas atividades corticais dos primatas (JONES, 1998). O primeiro grupo de conexões surgiria dos principais núcleos de transmissão talâmica (incluindo os sensoriais), com projeção topograficamente organizada para as camadas médias do córtex cerebral. O outro grupo tem origem nos núcleos intralaminares, e possivelmente nos associativos. Sua projeção é difusa e direcionada para as camadas superficiais do córtex cerebral, indicando o envolvimento em aspectos generalizados da função encefálica. Acredita-se que estes neurônios que projetam para as camadas superficiais do córtex estejam distribuídos pelo tálamo dorsal sem respeitar bordas nucleares. Organizados de maneira mais restrita, estariam os neurônios de projeção para as camadas médias do córtex, evidentes principalmente nos núcleos de transmissão sensoriais e motores.

As evidências para esses dois sistemas são baseadas em estudos da distribuição e conexão das células do tálamo de macacos pela imunohistoquímica para proteínas ligadoras de calbindina e parvalbumina (JONES, 1998). Nestes estudos, observou-se que as células calbindina positivas estendem-se por todos os núcleos, enquanto que as células parvalbumina-positivas encontram-se restritas em alguns núcleos específicos.

É possível que o padrão de marcação celular evidenciado no presente estudo indique a existência de projeções talâmicas difusas para o córtex do gambá *Didelphis aurita* (JONES, 1998). No entanto, relacionar a marcação para proteínas ligadoras de cálcio isoladamente com a existência dos sistemas de projeções talâmicas em determinadas espécies pode gerar erros, uma vez que a expressão específica destas proteínas e a conexão de suas células com o córtex não foi sistematicamente estudada em mamíferos não-primatas, como o gambá (JONES, 1998).

5.3 Mapeamento eletrofisiológico do córtex parietal anterior do gambá *Didelphis aurita*

Assumindo que os sistemas somatossensorial e motor do *Didelphis aurita* estejam segregados no tálamo em núcleos somestésicos e motores, cumpre-nos analisar a organização destes dois sistemas no neocórtex. Partindo da proposta que o córtex motor primário esteja sobreposto com o córtex somestésico primário nesta espécie (LENDE 1963), começaremos por analisar as características eletrofisiológicas e as bordas de S1, para então discutir as projeções corticais e talâmicas para as áreas S1 e SC.

A superfície cortical somatossensorial no córtex parietal anterior do *Didelphis aurita*, assim como proposto por Beck et. al (1996), possui subdivisões que apresentam diferentes padrões de conexões. Os nossos resultados indicam que as áreas somatossensoriais S1, e SC no gambá *Didelphis aurita* diferem-se pelas projeções cortico-corticais e tálamo-corticais, embora nas primeiras estas diferenças sejam mais nítidas. A presença destas áreas foi observada em outros mamíferos, como os gambás *Didelphis virginiana* e *Monodelphis domestica*, o rato (*Euarchontoglires rat*), no tupaia *Tupaia* (REMPLE et al., 2006) e o porco espinho (KAAS, 2004).

De uma maneira geral, a representação somatotópica de S1 estudada reflete o padrão descrito para outros mamíferos, com a representação da pata anterior medialmente, seguida da representação da face lateralmente (BECK et al., 1996, MAGALHÃES-CASTRO e SARAIVA, 1971, HUFFMAN e KRUBITZER, 2001). O nosso estudo foi o primeiro a mostrar uma representação detalhada dos dedos em S1 do gambá *Didelphis aurita*. Em outros marsupiais, a análise detalhada da organização interna de S1 mostra uma representação grosseira da pata anterior em S1. No *Didelphis azarae azarae*, foram encontradas regiões corticais representativas do membro anterior e da mão, mas não dos dedos individualmente (MAGALHÃES-CASTRO e SARAIVA, 1971). No *Didelphis virginiana* focalizou-se a representação somatotópica de S1 no eixo médio-lateral e a reversão de campos receptores entre S1 e S2 (BECK et al., 1996). Pouco detalhe a respeito da representação individual dos dedos foi revelado. Nossos resultados sugerem ainda que as vibrissas faciais estão individualmente representadas dentro de S1 (Figura 15).

Por outro lado, no gambá *Didelphis aurita* não foi possível mapear adequadamente as áreas SR e SC. Nos dois protocolos anestésicos testados ao longo deste estudo, ambas as áreas foram predominantemente não-responsivas à estimulação somatossensorial, embora sítios responsivos aos estímulos somatossensoriais pudessem ser observados tanto em SR quanto em SC. Sítios responsivos à estimulação somatossensorial também foram observados nas áreas SR e SC do *Didelphis virginiana* (BECK et al., 1996), provendo indícios eletrofisiológicos de que estas áreas processam informações somatossensoriais. Estudos eletrofisiológicos prévios no *Didelphis azarae azarae* não consideraram a existência destas áreas (MAGALHÃES-CASTRO e SARAIVA, 1971) e, portanto, não podemos confirmar sua existência em outros didelfídeos além destes citados.

As diferenças na mielinização observadas entre as áreas S1, SR e SC também foram descritas no *Didelphis virginiana* (BECK et al., 1996). Em primatas, como o sagui, a área 3b, homóloga a S1 de mamíferos não-primatas, aparece altamente mielinizada entre a área 3a rostralmente (levemente marcada) e a área 1 caudalmente (moderadamente marcada) (KRUBITZER e KAAS, 1990). Em morcegos, a área 3b é coextensiva com zonas de densa mielinização (KRUBITZER et al, 1993). Novamente, a região das áreas 1/2 foi levemente marcada, assim como a área 3a (KRUBITZER et al, 1993). No morcego (*flying fox*), o córtex parietal posterior mostrou-se como uma região fracamente mielinizada entre V2 (moderadamente mielinizada) e as áreas 1/2.

5.4 Projeções córtico-corticais para S1 e SC

Com base em nossos resultados, nota-se que no gambá *Didelphis auritaas* áreas somestésicas mantêm conexões entre si. Observamos que a área S1 recebe projeções exclusivamente somestésicas, com origem nas áreas somestésicas rostral (SR), caudal (SC), somestésica secundária/parietal ventral (S2/PV) (Figura 40). As projeções intrínsecas de representações adjacentes e aquelas advindas das áreas SR e SC predominam em todos os casos analisados. Em contrapartida, ao contrário do que esperávamos obtivemos projeções muito esparsas, ou até mesmo, ausentes, a partir da área S2/PV, na maioria dos casos analisados. É possível que o diâmetro e volume reduzido de nossas injeções tenha sido insuficiente para mostrar maior densidade destas projeções. A presença de numerosas células retrogradamente marcadas em S2/PV após a inserção de um cristal de DY na representação da pata anterior em S1, no caso 0705, parece comprovar esta possibilidade (Figura 23). No gambá *Didelphis virginiana* conexões entre as áreas S1, SR e SC foram previamente demonstradas (BECK et al.,

1996). Injeções de neurotracadores realizadas em S1 mostraram marcação irrelevante em S2/PV.

Em primatas, como os saguis, estas conexões incluem áreas do sistema motor (KRUBITZER e KAAS, 1990). Nesta espécie, a área 3b conecta-se reciprocamente com as áreas 3a, 1, S2 e PV. Projeções menos densas são também observadas com as áreas 2, M1, área motora suplementar (SMA) e o córtex límbico medial a SMA (KRUBITZER e KAAS, 1990). Nos ratos, as conexões de S1 incluem áreas do córtex parietal e frontal, tais como regiões adjacentes de S1, S2, PV, PM, PR, PL, Agl e Agm – estas duas últimas correspondentes ao córtex motor e a área motora suplementar/pré-motora, respectivamente (FABRI e BURTON, 1991).

Por outro lado, a área SC exibiu um padrão de projeções cortico-corticais que inclui um maior número de áreas corticais. Embora esta área pareça fazer parte do sistema somatossensorial no gambá, nossos resultados provêm fortes indícios de um **processamento multimodal** nesta região, com conexões originadas no córtex somestésico (S1, SR, SC, S2/PV), córtex visual, córtex auditivo e córtex frontal (Figura 40).

Muitas das vezes, as áreas imediatamente caudais a área 3b tem sido precipitadamente descritas como homólogas à área somatossensorial 1, embora esta idéia apoie-se principalmente na sua posição anatômica, e não em critérios eletrofisiológicos e nas suas projeções. No entanto, caudalmente a S1, ou a área 3b das diferentes espécies, pode-se encontrar diversas áreas que só podem ser identificadas como sendo uma área somatossensorial, córtex parietal posterior ou área visual pelas suas projeções e ou características eletrofisiológicas.

Em mamíferos não-primatas, tais como os esquilos, insetívoros e alguns marsupiais, o córtex caudal a S1 possui neurônios que respondem tanto a estimulação profunda dos receptores contralaterais e em alguns casos à estimulação visual (*cf.* SLUTSKY et al., 2000; KRUBITZER

et al., 1997; HUFFMAN et al., 1999; FROST et al., 2000). Esta região é conhecida como campo caudal (C), área somatossensorial caudal (SC), área parietal medial (PM) ou área ½ (cf. PADBERG et al., 2005).

Nos ratos, a área parietal medial (PM) ocupa a mesma posição de SC (caudal à S1) e assim como no gambá *Didelphis aurita*, também recebe projeções do córtex visual, auditivo e somatossensorial (REMPLE et al., 2006).

O tupaia (Tree shrew) é um mamífero parecido com o esquilo e parente próximo dos primatas. Esta espécie também possui a área SC caudalmente à 3b, a qual difere-se arquitetonicamente de 3b por uma camada granular menos densa (REMPLE et al., 2006). As projeções cortico-corticais desta área incluem M1, M2, a área motora medial, áreas somatossensoriais (3a, 3b, S2, PV) e subdivisões do córtex parietal posterior (REMPLE et al., 2006).

Caudal a área SC, o tupaia possui um córtex parietal posterior. Injeções no córtex parietal posterior desta espécie marcaram retrogradamente V2, V1, S2, PV, SC, subdivisões do córtex parietal posterior e áreas do córtex temporal (REMPLE et al., 2006). As áreas 3b, 3a e M1 obtiveram pouquíssimas marcações. (REMPLE et al., 2006). Estas projeções cortico-corticais do córtex parietal posterior do tupaia assemelham-se às nossas injeções na área SC, por incluir marcações nas áreas visuais, somatossensoriais e temporais.

Nos primatas, o córtex parietal posterior expandiu-se consideravelmente. Nos galagos, a metade rostral do córtex parietal posterior, caudal à SC recebe projeções densas de S2 e PV, e projeta para o córtex pré-motor (KAAS, 2004). Esta possível especialização da região rostral do córtex parietal posterior do galago difere claramente do córtex parietal posterior multimodal dos tupaia (Tree shrew).

Nos primatas antropóides, em especial os primatas do Velho mundo, o córtex parietal posterior possui várias subdivisões (KAAS, 2004). Os campos mais rostrais recebem projeções somatossensoriais da área 2 e do córtex parietal lateral e projetam para M1 e outras áreas motoras. As áreas mais caudais recebem informações auditivas e visuais e projetam para áreas premotoras (KAAS, 2004).

Quando analisamos as áreas somatossensoriais que se localizam caudalmente a área 3b dos primatas e rostralmente ao córtex parietal posterior, pouca semelhança observamos com as nossas injeções na área SC do gambá *Didelphis aurita*. No primata *Callicebus moloch*, a área 1 conecta-se consistentemente com as áreas 3b, 2, S2/PV, 5, 7b/AIP, e esparsamente com as áreas 3a, M1 e córtex frontal. Nenhuma conexão com outra área sensorial foi observada nesta espécie (PADBERG et al., 2005).

No macaco macaca, outra área somatossensorial caudal a área 1 tem sido identificada: a área 2. Neurônios na área 2 são bem responsivos à estimulação cutânea e aos receptores profundos, em ambos animais acordados e anestesiados (PADBERG et al., 2005). Esta área possui uma representação completa da superfície receptora contralateral, assim como a área 3b e 1, porém com campos receptores maiores. Injeções realizadas na área 2 indicam conexões com as áreas 3b, 1, 3a, S2, M1 e área 5 (PADBERG et al., 2005). Assim como na área 1, não são observadas conexões corticais entre a área 2 e outras modalidades sensoriais.

A comparação das conexões córtico-corticais entre estas espécies com nossos resultados apoia a hipótese de que a existência do córtex parietal posterior, tal como observado em grandes primatas (KAAS, 2004) pode ter se originado de uma única área multimodal. As projeções da área SC do gambá *Didelphis aurita* assemelham-se mais ao córtex parietal posterior de primatas e outros mamíferos do que outras áreas imediatamente caudais a S1, tais como as áreas 1 e 2.

5.5 Projeções tálamo-corticais para S1

No gambá *Didelphis aurita*, a marcação retrograda no tálamo foi similar entre os casos analisados, embora algumas variações estivessem presentes. Pequenas variações nas projeções talâmicas para o córtex somestésico também foram observadas nos primatas, como o zogue-zogue (*Calicebus moloch*) (PADBERG e KRUBITZER, 2006). Conforme ilustram nossos resultados, a área somestésica primária do gambá *Didelphis aurita* recebe projeções talâmicas consistentes do núcleo VB. Entretanto, núcleos talâmicos motores também projetam para S1 de acordo o presente trabalho. São estes núcleos o núcleo talâmico ventral anterior (VA), ventral lateral (VL) e ventral medial (VM).

As projeções talâmicas para S1 foram extensamente estudadas nos primatas. Sem dúvida, a principal fonte de projeções para a área 3b é o núcleo VP, tanto nos primatas de Novo Mundo, quanto nos primatas do Velho Mundo (*cf.* JONES et al., 1979). Nos primatas do Novo Mundo, o núcleo VP é a principal fonte de projeções talâmicas para 3b, embora projeções menos densas também tenham origem nos núcleos pulvinar anterior, e em alguns casos em VPS, VL e CL (KRUBITZER e KAAS, 1992).

Sumário das projeções córtico-corticais para S1 e SC

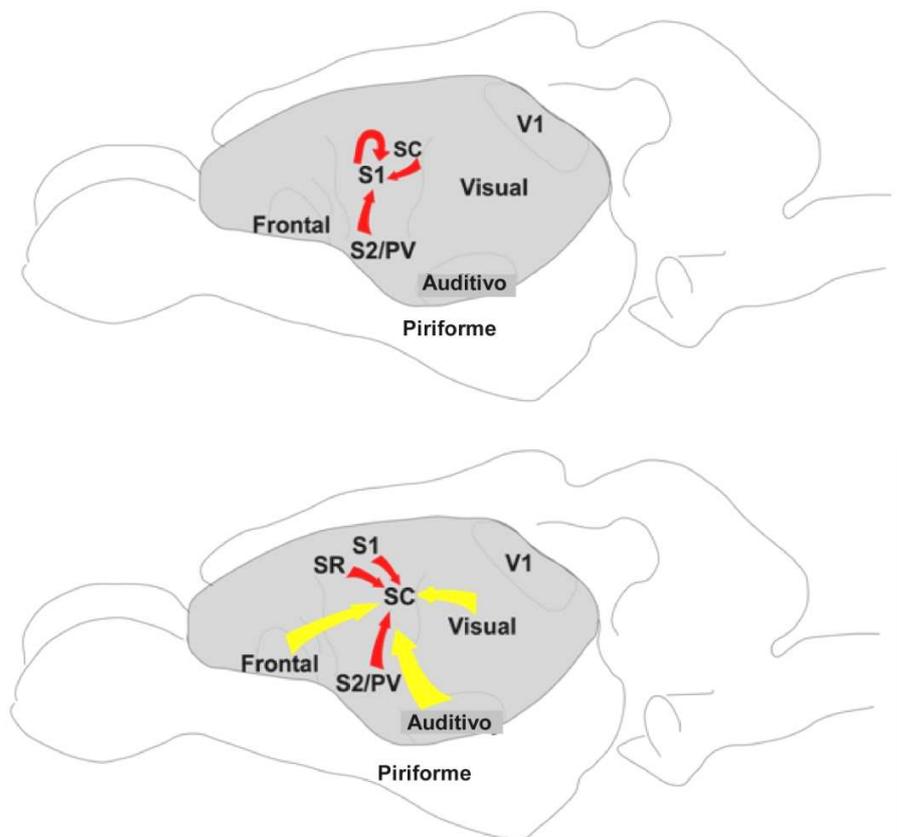


Figura 41. Desenho esquemático das aferências corticais para as áreas S1 e SC. A área S1 recebe projeções de outras áreas corticais, tais como SR, SC, S2 e PV. A área SC recebe projeções do córtex somestésico, de outras área sensoriais (visual e auditivo) e do córtex frontal. As setas em vermelho ilustram as conexões somestésicas, enquanto que as setas amarelas representam as conexões de outras modalidades sensoriais ou do córtex frontal.

Nos galagos, estas projeções são mais espalhadas e incluem VP, VIM, VL, CM, CL e PO (PEARSON e HAINES, 1980). Porém estes resultados resultam de sítios de injeções muito grandes que podem ter incluído também o córtex motor (PADBERG e KRUBITZER, 2006). Projeções de núcleos homólogos a VP para S1 têm sido amplamente demonstradas em outros grupos de mamíferos como roedores, carnívoros e outros primatas (KAAS, 1983). No *Didelphis aurita*, nota-se que as células que projetam para a representação da pata anterior de S1 espalham-se por todo o núcleo VB, e não exclusivamente da sua região lateral. Poucos indícios de segregação topográfica foram observados nestas projeções tálamo-corticais. É possível que a marcação medial em VB após injeção na representação da face, reflita a representação somatotópica do núcleo descrita previamente por registro eletrofisiológico (SOUZA et al., 1971). Nesta representação, o eixo rostro-caudal do corpo do animal coincide com o eixo médio-lateral do núcleo respectivamente. Em outros mamíferos, o complexo ventro-posterior apresenta uma subdivisão representando a face medialmente denominada-se núcleo ventroposterior medial (VPM), enquanto que o restante do corpo é representado mais lateralmente, no núcleo ventroposterior lateral (VPL) (KAAS, 1988). Em nossos resultados, somente estas subdivisões parecem evidentes somente nas reações de Parvalbumina.

As projeções dos núcleos talâmicos motores para S1 foram descritas anteriormente por Donoghue e Ebner (1981) no *Didelphis virginiana*; embora neste estudo, a área S1 definida pelos autores incluísse também SR e SC. Segundo Donoghue e Ebner (1981), quando injeções de neutraçadores eram feitas em S1, os núcleos VB, VL, CIN e CL eram marcados.

No entanto, existem diferenças importantes nos critérios arquitetônicos utilizados para a delimitação do núcleo VL entre o nosso estudo e o de Ebner (DONOGHUE e EBNER, 1981). O atlas do cérebro do gambá de Oswaldo-Cruz e Rocha-Miranda (1968), utilizado como referência

no nosso trabalho, foi o único a ilustrar os três núcleos “motores” identificados em outros mamíferos (VL, VA e VM) (BODIAN, 1939; OSWALDO-CRUZ e ROCHA-MIRANDA, 1979). O núcleo ao qual este estudo se refere (DONOGHUE e EBNER, 1981) como VL, aparentemente consiste no núcleo VA de Oswaldo-Cruz e Rocha-Miranda (1968) e na descrição arquitetônica feita anteriormente por Bodian (1939). Segundo estes dois estudos, o núcleo VA coexiste medialmente com o núcleo reticulado e é substituído posteriormente pelo núcleo VB. Essa localização corresponde exatamente ao que Donoghue e Ebner (1981) identificam como VL. Em nosso estudo, adotamos os critérios de Bodian (1939) e Oswaldo-cruz e Rocha-Miranda (1979) para a identificação do núcleo VL.

Tais diferenças na delimitação destes núcleos talâmicos parecem explicar as diferenças existentes entre nossos resultados e os de Donoghue e Ebner (1981). Estes consideram uma porção maior do tálamo como correspondendo ao núcleo VB, por isso observando uma marcação retrógrada lateral no núcleo após injeção no córtex parietal (DONOGHUE e EBNER, 1981). O núcleo VB definido no presente trabalho ocupa uma menor região do tálamo e corresponde somente à porção lateral de VB citada por Donoghue e Ebner (1981). Por isso, após a injeção de neurotraçador retrógrado na pata anterior de S1 nosso estudo encontrou marcação de neurônios em todo o núcleo VB, enquanto que Donoghue e Ebner somente na porção lateral do núcleo, inferindo a esta marcação uma segregação topográfica da pata anterior.

A análise das projeções aferentes para tais núcleos talâmicos é uma alternativa elucidativa que pode ser utilizada para conhecer suas subdivisões. Projeções somestésicas dos núcleos grácil e cuneiforme através do lemnisco medial para o tálamo (WALSH e EBNER, 1973) se direcionam profusamente para a parte lateral de VB citada por Donoghue e Ebner. Já as projeções somestésicas com origem no núcleo trigeminal (correspondente à face) terminam no núcleo VB,

predominantemente no pólo posterior do núcleo (WALSH e EBNER, 1973). A porção lateral de VB que recebe projeções somestésicas corresponde exatamente ao núcleo VB do atlas de Oswaldo-Cruz e Rocha-Miranda (1968). No nosso estudo, esta região foi retrogradamente marcada após injeção na representação cortical da pata anterior de S1.

Por outro lado, axônios com origem nos núcleos profundos do cerebelo se direcionam para a região dorsal de VB (WALSH e EBNER, 1973). Esta região corresponde ao núcleo VL do atlas de Oswaldo Cruz e Rocha-Miranda (1968). Mais anteriormente, são encontradas projeções dos mesmos núcleos cerebelares terminando na região que corresponde ao núcleo VA do atlas de Oswaldo Cruz e Rocha-Miranda (1968), fortalecendo a interpretação das subdivisões talâmicas propostas por estes autores.

Nos casos 0602 e 0629, as projeções de VL para a representação da pata anterior do córtex somestésico primário tendem a se originar topograficamente da região ventral do núcleo, próxima a sua borda com VB, embora células marcadas retrogradamente também tenham sido encontradas na porção dorsal do núcleo em alguns cortes. Em outros mamíferos, tais como os gatos e macacos, a região ventral de VL projeta para a zona posterior do córtex. Esta zona de projeção está relacionada a musculatura distal, enquanto que a parte dorsal de VL projeta-se para zonas anteriores de representação da musculatura proximal.

Adicionalmente, núcleos de outros grupos talâmicos projetam para o córtex somestésico primário no gambá *Didelphis aurita*. No grupo anterior, o principal núcleo de projeção para esta área parece ser o núcleo anterior ventral (AV), embora tenham sido encontradas projeções a partir dos núcleos anteriores dorsal (AD) e medial (AM). Segundo Bodian (1939), no gambá América do Norte (*Didelphis virginiana*), lesões no córtex retrosplenial e cingulado foram capazes de induzir degeneração na porção lateral dos núcleos anterior dorsal (AD) e anterior

ventral (AV). Projeções individuais a partir de AV parecem se direcionar para a ínsula e o cortex cingulado. O núcleo AD, por outro lado, enviaria projeções para a área retrosplenial e pós-orbital. Por fim, o núcleo AM seria responsável por conexões com uma região interhemisférica do pólo frontal.

5.6 Projeções tálamo-corticais para SC

Em nosso estudo, tanto o núcleo somestésico VB quanto os núcleos motores VA, VL e VM projetam para a área SC. Além destes núcleos observamos projeções consistentes dos núcleos AV, AM, Liv, PF, PC e MD para SC. Aparentemente, existe uma convergência de projeções de alguns núcleos talâmicos para as áreas S1 e SC no gambá *Didelphis aurita*. As grandes diferenças entre estas projeções encontram-se no maior espalhamento de células marcadas após injeções em SC.

Embora a área SC do gambá *Didelphis aurita* receba projeções dos mesmos núcleos talâmicos somestésicos e motores que S1, nota-se uma diferença na proporção das projeções de VB para ambas as áreas. Mais da metade das projeções para S1 surge do núcleo VB (com exceção dos casos onde foram feitas injeções de DY). Da mesma forma, na área SC, as projeções com origem em VB também predominam, porém são proporcionalmente menores (Figura 34 e 40). Das três injeções em S1 analisadas, em duas delas mais de 50% das células marcadas se encontravam no núcleo VB, enquanto que nas injeções de SC esta observamos apenas 22,4 ou 39,8% das células marcadas em VB.

Outros núcleos talâmicos que se destacam nas projeções para SC por não projetarem para S1 é o núcleo do grupo posterior Po e do grupo medial, MD.

No gambá *Didelphis virginiana*, a região denominada córtex parietal posterior por Donoghue e Ebner (1981) e que recebe projeções de VL, VM, CIN e CL, localiza-se caudalmente à zona de projeção de VB. No gambá *Didelphis aurita*, a região do córtex imediatamente caudal à S1, recebe aferências corticais multimodais, e portanto pode ser homóloga ao córtex parietal posterior dos primatas. Uma outra possibilidade é que exista uma região localizada entre SC e o córtex visual no gambá *Didelphis aurita* homóloga ao córtex parietal posterior de primatas. No entanto, tal subdivisão, se existente, não pode ser evidenciada em nosso estudo.

5.7 Hipótese do amálgama sensório-motor

O conceito do amálgama sensório-motor consiste na sobreposição do córtex somatossensorial primário (S1) com o córtex motor primário (M1) em uma única área do córtex parietal – o córtex somato-motor - e foi proposto para o gambá *Didelphis virginiana* por Lende (1963). Além disto, a principal característica do amálgama sensório-motor consistia no fato de que, a mesma região cortical responsável pelo processamento sensorial de uma determinada região do corpo, correspondia topograficamente à região cortical responsável pelo comando motor daquela mesma parte do corpo. De acordo com esta proposta, a presença de um amálgama sensório-motor em um mamífero com características corticais primitivas sugere que os primeiros mamíferos ancestrais apresentavam um córtex somatossensorial e motor igualmente amalgamado (Figura 42a). Assim, as áreas S1 e M1 espacialmente separadas que identificamos atualmente nos mamíferos euterianos poderiam ter surgido a partir da duplicação do tecido cortical correspondente ao amálgama sensório-motor dos mamíferos ancestrais (LENDE 1963, 1964). Para discutir esta hipótese é necessário avaliar quais evidências confirmariam a existência da área M1 neste animal, e caso exista, onde ela estaria localizada.

Os resultados encontrados em nosso estudo, **se considerados isoladamente**, corroboram com a hipótese do amálgama sensorio-motor no gambá. Ao longo desta discussão iremos nos referir à região do amálgama sensorio-motor como “S1 motor” por uma questão metodológica: a ausência de indícios suficientes para confirmar a existência de um córtex motor primário. A utilização deste termo não implica conceitualmente na inexistência de um amálgama sensorial e motor nesta região como proposto por Richard Lende em 1963. Torna-se somente uma precaução em não afirmar a presença de uma área motora no córtex parietal como proposto por Lende, visto que não existem indícios suficientes para esta confirmação.

Como vimos, as projeções consistentes dos núcleos motores VA/VL para S1 sustentam a hipótese de um processamento de informações provenientes de centros motores nesta região (BECK et al., 1996) (Figura 42 a e b). No entanto, a principal fonte de projeção talâmica para S1 se origina do núcleo VB, um núcleo talâmico que recebe informações táteis da periferia sensorial através dos núcleos grácil e cuneiforme (KAAS, 1983, 2004). E como vimos anteriormente, esta região apresenta características eletrofisiológicas e histológicas de área somestésica primária, tal como aquelas identificadas nos mamíferos euterianos (Figura 42b). Nos primatas, a área 3b possui células densamente agrupadas na camada IV e III e VI (KAAS, 1983).

Evolução do córtex motor primário nos mamíferos

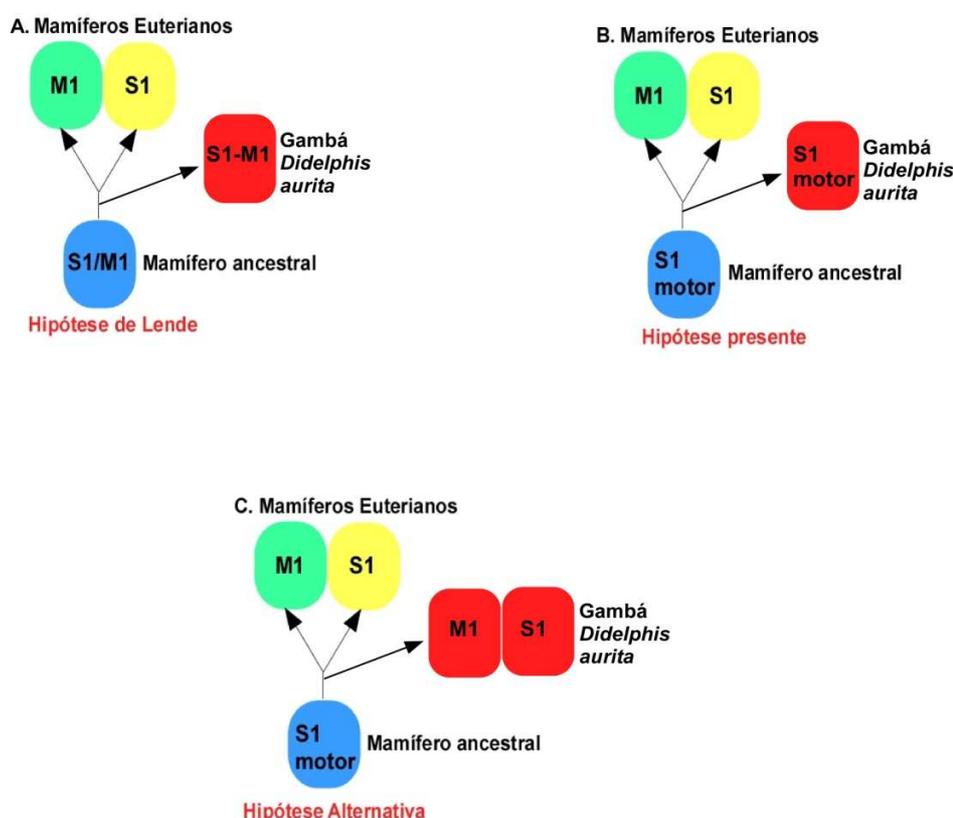


Figura 42. Desenhos esquemáticos sobre hipóteses da evolução dos córtices S1 e M1 nos mamíferos. Segundo Richard Lende (1963), os primeiros ancestrais apresentavam um amálgama sensorio-motor, o qual teria sido retido pelos gambás (A). Ao longo da evolução, os mamíferos euterianos teria surgido as áreas S1 e M1 separadas a partir do amálgama. No entanto, os registros eletrofisiológicos posteriores ao de Lende não confirmam a hipótese do amálgama. A organização arquitetônica da região do amálgama demonstra uma camada IV identificável, sugerindo que o amálgama seja uma área somestésica primária (BECK et al., 1996, Gray, (B)). É possível que a área motora primária não tenha sido ainda identificada no córtex rostral à S1 (C). No entanto, esta região no gambá parece receber projeções talâmicas somestésicas e apresenta a

organização arquitetônica com características de uma área sensorial (Modificado de BECK et al., 1996).

No gambá, o córtex parietal possui uma camada IV granular e não lembra de forma alguma o córtex motor agranular (BECK et al., 1996; GRAY, 1924). Adicionalmente, o mapeamento eletrofisiológico da área 3b em primatas demonstra que os sítios responsivos desta área respondem ao estímulo cutâneo superficial, tal como observado no córtex somestésico primário do gambá *Didelphis aurita*, onde a maioria dos sítios são responsivos à estimulação cutânea superficial. (KAAS, 1983).

Alem disso, os dados eletrofisiológicos que indicam a existência de M1 no córtex parietal do gambá permanecem controversos. Os primeiros trabalhos de mapeamento utilizaram técnicas eletrofisiológicas menos refinadas para a identificação de M1, através de eletroestimulação com eletrodos superficiais (LENDE, 1963). Estudos posteriores realizados com microeletroestimulação, onde o eletrodo é mais fino e penetra no córtex, não confirmam a existência de M1 completamente amalgamado com S1 no gambá. Beck et al. (1996) não encontraram uma área motora primária topograficamente coincidente com S1 no *Didelphis virginiana* após microeletroestimulação do córtex parietal com correntes baixas. Outro estudo realizado no *Monodelphis domestica* demonstrou somente uma sobreposição parcial do córtex motor com o somestésico na representação face (FROST et al., 2000).

Considerar outra posição para M1 no neocórtex do gambá parece uma tarefa difícil, pois o próprio Lende eliminou a possibilidade de uma região motora característica de M1 no lobo frontal (LENDE, 1963, 1964) (Figura 42c). Em seu trabalho, a estimulação desta região só resultou em movimentos oculares. Os movimentos dos olhos, as variações no diâmetro pupilar, retração da membrana nictante e o fechamento dos olhos que ele descreve após estimulação

elétrica do córtex frontal são características do chamado campo frontal ocular dos mamíferos placentários (LENDE, 1963).

As projeções cortico-espinhais do gambá *Didelphis virginiana* se caracterizam por poucas projeções que se originam da região rostral à região do amálgama (NUDO e MASTERTON, 1990) (Figura 42c). A maior parte das projeções que compõem o tracto cortico-espinhal desta espécie se origina em S1, e ainda sim, estas projeções se direcionam para o corno posterior da medula.

A análise da arquitetura cortical de S1 igualmente coloca em dúvida a presença de um córtex motor no córtex parietal, tal como identificado em outros mamíferos. Como vimos, esta região apresenta uma camada IV granular característica das áreas sensoriais (GRAY, 1924; BECK et al. 1996). No entanto, SR apresenta a camada IV granular também bem desenvolvida, sugerindo uma função sensorial (GRAY, 1924; BECK et al., 1996).

Martinich (1996) investigou as projeções tálamo-corticais para a região, localizada em torno da fissura orbitária. Como resultado ele observou que os núcleos talâmicos MD, VM e VL projetam para esta região. Donoghue e Ebner (1981) também realizaram injeções na região imediatamente posterior à fissura orbital do gambá e observaram células marcadas nos núcleos mediais PF e PC; nos núcleos ventrais VB e VL e nos núcleos intralaminares. No *Didelphis aurita*, realizamos uma injeção na área SR e observamos marcações retrogradadas nos núcleos talâmicos VB, VA, VL e VM (dados não publicados). Assim como em S1 e SC, houve uma predominância de células com origem em VB projetando para SR, enfraquecendo a possibilidade de que esta região poderia corresponder à área motora primária no gambá (ANOMAL, 2003).

Se voltarmos nossa atenção para outros mamíferos buscando procurar organizações corticais que se assemelhem ao amálgama sensorio-motor, veremos que outros marsupiais

parecem possuir tal organização, como o *brush-tailed opossum* (REES e HORE, 1970), o gambá do planalto central (*Didelphis azarae*, MAGALHÃES-CASTRO e SARAIVA, 1971) e o *Monodelphis domestica* (FROST et al., 2000). No caso do cuíca, sugere-se que somente as representações da mandíbula e das vibrissas formariam um amálgama sensório-motor. De acordo com essa proposta, as projeções córtico-espinhais se originam na área S1 de todas estas espécies e não no córtex frontal (NUDO E MASTERTON, 1990).

As técnicas de neuroanatomia (análise de projeções) em outros marsupiais também indicam a existência de um amálgama sensório-motor, ainda que por uma sobreposição parcial. Segundo estudos de degeneração axonal, o córtex motor do *quokka wallaby*, *western gray kangaroo* e *red kangaroo* se localizaria caudal a área pós-orbital, onde encontramos o amálgama sensório-motor no gambá (WATSON, 1971).

No entanto, a área M1 tem sido localizada espacialmente separada de S1 em mamíferos não-marsupiais. Nos placentários menos especializados, observa-se ainda uma sobreposição parcial da representação somatotópica de S1 e M1, mas na maioria dos mamíferos placentários estas representações estão completamente separadas e espelhadas uma na outra (KAAS, 2004, 2008; LARSEN e KRUBITZER, 2008).

Nos monotremos, várias teorias têm sido propostas, mas aparentemente, existe uma representação espacialmente coincidente com S1 e outra localizada anteriormente em uma posição espelhada (LARSEN e KRUBITZER, 2008).

Em aves, o circuito que promove movimentos voluntários parece envolver núcleos talâmicos comparáveis ao tálamo ventral dos mamíferos (MEDINA et al., 1997), embora a precisa homologia entre eles não esteja ainda completamente estabelecida. Indicando semelhanças com as conexões tálamo-corticais de S1 e SC no gambá *Didelphis aurita*, no Wulst

rostral do pingüim, nota-se projeções talâmicas com origem no núcleo somestésico dorsal intermédio ventral anterior - DIVA (MEDINA et al., 1997), o qual é o maior alvo das projeções dos núcleos da coluna dorsal (*cf.* KORZENIEWSKA e GÜNTÜRKÜN, 1990). O Wulst rostral das aves tem sido comparado as áreas S1 e M1 dos mamíferos, e estudos eletrofisiológicos tem confirmado que esta região compõe uma região somatossensorial (*cf.* FUNKE, 1989). Fortalecendo a idéia de que o Wulst rostral pode ser comparável à M1, observa-se nos pingüins projeções a partir do núcleo talâmico dorsointermediário (DIP) e ventrointermediário (VIA). O núcleo VIA, por sua vez, recebe aferências dos núcleos basais, indicando a existência de uma via pálido-talamo-córtex mediando funções motoras (MEDINA et al., 1997). Já o núcleo VIA recebe projeções adicionais da substância nigra e dos núcleos internos do cerebelo e lembra a parte motora dos núcleos talâmicos, tais como VA, VL e VPL (MEDINA et al., 1997).

Mas será que os núcleos VIA e DIVA do tálamo dorsal das aves são homólogos aos núcleos VA, VL e VP dos mamíferos. Caso estes núcleos sejam homólogos, é de se esperar regiões comparáveis no tálamo dos ancestrais répteis.

Nas tartarugas, um campo somatossensorial parece presente na parte dorsal do córtex. Em lagartos, o campo somatossensorial encontra-se no pallium rostral, o qual recebe projeções do núcleo talâmico dorsal comparável ao DIVA das aves e VP dos mamíferos. Esta região do tálamo dorsal recebe projeções da medula espinhal e dos núcleos da coluna dorsal (HOOGLAN, 1982). Da mesma maneira, sugere-se que o núcleo intermédio dorsal e ventral dos répteis seja comparável aos núcleos VIA das aves e VA/VL dos mamíferos (MEDINA et al., 1997).

Os exemplos de conexões citados acima, em marsupiais, mamíferos euterianos, e vertebrados externos ao grupo dos mamíferos (aves e répteis), indicam que o neocórtex ancestral dos mamíferos possuía, ao menos, uma convergência de projeções talâmicas somatossensoriais e

motoras para a região anterior do córtex parietal. A concentração de projeções córtico-espinhais com origem nesta região, indicam que a área somestésica primária poderia processar informações motoras originadas no cerebelo e núcleos da base e comandar informações para o corno dorsal da medula espinhal através do tracto cortico-espinhal. Estas últimas conexões não atingem diretamente os motoneurônios, mas é possível que elas ocorram indiretamente através dos interneurônios localizados na medula espinhal (LEMON, 2008). A dificuldade em se encontrar na região do amálgama um padrão característico de córtex motor primário de euterianos através da eletrofisiologia, padrão de conexões e histologia pode ser explicada pelo fato de que a espécie estudada pode apresentar características primitivas combinadas com características derivadas. Devemos lembrar que cada espécie representa um “momento congelado” do processo evolutivo, com sua própria história e adaptações ao seu habitat. O neocórtex do gambá *Didelphis aurita* pode localizar-se em um estágio desde o amálgama sensorio-motor completo até a segregação de áreas sensorio-motoras (Figura 42). Com base em nossos resultados, podemos dizer que a região cortical do amálgama sensorio-motor recebe projeções de núcleos talâmicos que recebem projeções do cerebelo e núcleos da base, embora não seja clara a localização do seu córtex motor primário até o momento.

5.5 Parcelamento Ebbessoniano e o aparecimento de novas áreas corticais

O aumento do tamanho do neocórtex ao longo da evolução dos mamíferos desencadeou uma série de mudanças em sua organização que contribuem para muitas características comportamentais observadas nos mamíferos. Quando o neocórtex aumenta de tamanho em uma espécie, não necessariamente suas áreas corticais irão aumentar de tamanho em escala (LARSEN e KRUBITZER, 2008). Na verdade, com a encefalização, as áreas corticais parecem sofrer um

parcelamento, e novas áreas podem surgir nos mamíferos (KAAS, 2004; LARSEN e KRUBITZER, 2008).

Nos encéfalos maiores, o número de neurônios e as conexões entre eles tendem a aumentar (KAAS, 2004). Como a distância entre as áreas aumenta nestes casos, os axônios que conectam diferentes áreas precisariam ser mais longos e espessos para manter a mesma topografia das conexões, e a mesma velocidade de processamento da informação. Uma modificação desta natureza geraria um custo energeticamente alto para o organismo, visto que o cérebro deveria reservar mais espaço para os axônios. O que parece acontecer de fato, é que os encéfalos maiores se tornam mais modulares (com mais áreas) reduzindo a distância entre as conexões dos neurônios (KAAS, 2004, STRIEDTER, 2005).

Por outro lado, nos mamíferos com encéfalos menores, o número total de neurônios tende a ser menor e se o cérebro mantivesse o mesmo número de áreas corticais, haveria menos unidades de processamento (neurônios) para cada uma delas (KAAS, 2004). Reduzir o número de áreas não-primárias parece ser um mecanismo eficiente na concentração de neurônios em uma única função (CATANIA et al., 1999; KAAS, 2004).

Quando analisamos o sistema sensorio-motor dos mamíferos, observamos que os mamíferos ancestrais possuíam um sistema sensorio-motor simples e que muitos mamíferos existentes desenvolveram características novas e diferentes ao longo da evolução (KAAS, 2004, 2008).

As áreas S1 e SC do gambá *Didelphis aurita* no presente estudo aparecem como potenciais regiões precursoras de outras áreas sensorio-motoras por receberem conexões com origem no cerebelo e núcleos da base. Em especial, a área SC recebe projeções também dos córtices visual, auditivo e somatossensorial. Estas conexões para S1 ou SC podem ter segregado à

medida que novas áreas foram surgindo no processo evolutivo, gerando o padrão de conexões encontrado atualmente em alguns mamíferos para as áreas M1, S1 e córtex parietal posterior (REMPLE et al., 2007; PADBERG et al., 2005; PADBERG e KRUBITZER, 2006).

Mas o que nos diz a presença da área SC multimodal no gambá *Didelphis aurita*? Será que as áreas corticais teriam surgido de uma organização cortical multimodal ou a área multimodal teria surgido a partir de uma área cortical modalidade-específica?

Inicialmente, acreditava-se que o neocórtex era composto de poucas áreas primárias e/ou secundárias e que estas áreas eram circundadas por um córtex associativo, não responsivo em preparações anestesiadas (KAAS, 1999). Como os encéfalos maiores apresentavam mais córtices não responsivos do que os menores, supunha-se que a evolução do cérebro era baseada na adição de mais campos associativos para permitir funções mais complexas (KAAS, 2004). A partir da década de 60, novos estudos indicaram que as regiões não-responsivas no neocórtex dos mamíferos, consideradas associativas, na verdade desempenhavam funções sensoriais unimodais (HUBEL e WIESEL, 1965). Assim, identificou-se nos mamíferos com encéfalo pequeno tanto áreas multimodais quanto áreas unimodais sensoriais e motoras, sendo que as áreas unimodais ocupam a maioria do neocórtex (KAAS, 2004). Desde então, passou-se a acreditar que a evolução dos encéfalos complexos teria ocorrido pela adição de áreas sensoriais e motoras de alta-hierarquia e unimodais (KAAS, 2004).

Os possíveis mecanismos que desencadeiam estas modificações no neocórtex permanecem em discussão. Sabe-se que o fenótipo cortical resulta da interação entre diversos fatores genéticos e ambientais (KRUBITZER e KAHN, 2003; KAAS e KRUBITZER, 2005; Krubitzer, 2007; LARSEN e KRUBITZER, 2008; SUR e RUBENSTEIN, 2005). A existência de um plano de organização cortical comum aos mamíferos em geral, reforça a idéia de que a

formação das áreas corticais primárias (e algumas áreas secundárias) seriam geneticamente controladas (Figura 43) e que as modificações possíveis seriam restritas (LARSEN e KRUBITZER, 2008; KRUBITZER e KAAS, 2005).

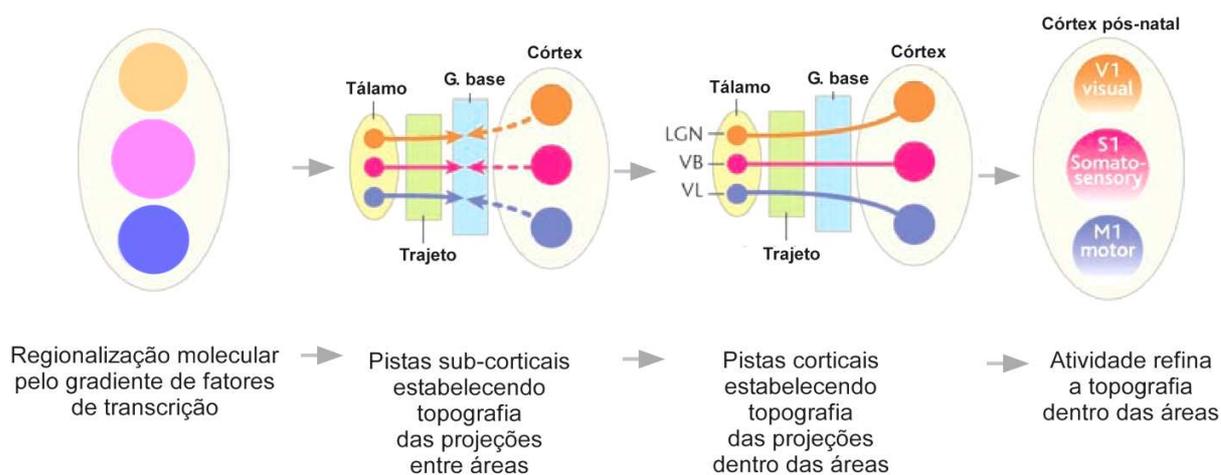


Figura 43. Desenvolvimento dos mapas corticais. Durante o desenvolvimento, um gradiente de fatores de transcrição é criado na zona ventricular gerando uma identidade na placa cortical e formando protótipos de áreas corticais. A topografia dos axônios que crescem a partir da placa cortical e do tálamo é regulada pelas zonas intermediárias ao alvo (gânglio basal, por exemplo). Quando estas conexões chegam à zona alvo no córtex, são criadas topografias dentro das áreas,

que são refinadas por mecanismos dependentes da atividade talâmica. Modificada de Sur e Rubenstein, 2005.

Por exemplo, a localização das áreas corticais no eixo antero-posterior do neocortex é controlada durante o desenvolvimento pelos fatores de transcrição Emx2 e Pax6 (SUR e RUBENSTEIN, 2005). Ambos os fatores de transcrição possuem sua expressão graduada no eixo caudorostral (Emx2) e rostrocaudal (Pax6) (O'LEARY e NAKAGAWA, 2002). De alguma maneira, as conexões e outras características corticais também são gerenciadas por estes genes. O Emx2 e Pax6 regulam a expressão específica de genes que codificam moléculas de adesão celular (Cad 6,8 e 11), outros fatores de transcrição (Tbr1) e moléculas (epinefrina-5) que guiam axônios até o córtex. Sabe-se ainda, que durante o desenvolvimento, estes genes estão envolvidos no estabelecimento da identidade histológica, funcional, neuroanatômica e molecular das áreas corticais. Mesmo na ausência da atividade tálamo-cortical, a atividade destes genes persiste, indicando uma regulação intrínseca destas características (LARSEN e KRUBITZER, 2008).

Um exemplo clássico de regulação gênica nos módulos corticais foi demonstrado pela transposição da proteína sinalizadora FGF-8 no camundongo *in utero* (FUKUCHI-SHIGOMORI e GROVE, 2001). Esta proteína está localizada no pólo rostral do neocórtex e foi electroporada para uma região caudal a S1, gerando uma duplicação dos campos de barris.

Seguindo no raciocínio evolutivo, a duplicação de barris mostrada por Fukuchi-Shimogori e Grove (2001) pode representar um dos mecanismos responsáveis pelo parcelamento de áreas corticais (RAKIC, 2001). Como vimos, a hipótese do parcelamento de Ebesson sugere que novas áreas corticais poderiam surgir durante o desenvolvimento por duplicações de uma área precursora. Conseqüentemente, as conexões neurais se reorganizariam gerando novos padrões de projeções caracterizando novas áreas (Figura 44) (STRIEDTER, 2005).

Se a localização de um mapa cortical é determinada geneticamente durante o desenvolvimento e a trajetória das projeções tálamo-corticais é guiada por pistas moleculares localizadas ao longo do trajeto do axônio para o córtex (SUR e RUBENSTEIN, 2005) (Figura 43), a duplicação de áreas corticais pode alterar a distribuição das moléculas sinalizadoras que atraem as projeções talâmicas, o que geraria um rearranjo das projeções para o córtex (STRIEDTER, 2005).

Analisando as características de M1 nos mamíferos euterianos existentes, sugere-se que esta área poderia ter surgido a partir da duplicação de uma área somatossensorial com conexões talâmicas com origem também no cerebelo e núcleos da base.

O nosso estudo foi pioneiro em mostrar as conexões da área SC no gambá *Didelphis aurita*. A semelhança nas conexões tálamo-corticais entre S1 e SC e o fato de ambas apresentarem respostas a estimulação somestésica, sugere-se que estas áreas possam ter uma origem cortical comum. Estudos neuroanatômicos conseguintes das conexões de SC em outras espécies de mamíferos irão prover indícios para afirmar se 1) esta área estava presente ou não em um suposto ancestral comum dos mamíferos, e se ela poderia ter dado origem ao sistema sensorio-motor dos mamíferos; ou se 2) esta se originou da região do amálgama sensorio-motor.

Evolução das conexões e áreas sensório-motoras

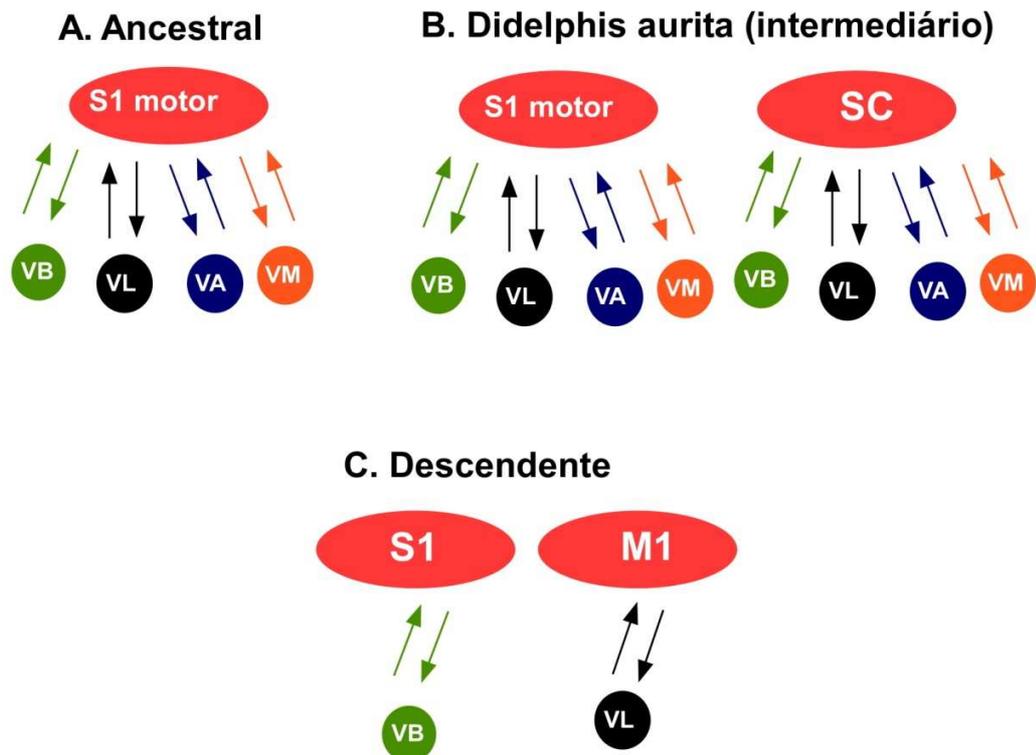


Figura 44. O parcelamento de Ebbesson e as projeções tálamo-corticais do gambá *Didelphis aurita*. O encéfalo ancestral dos mamíferos poderia representar um condição amálgama sensório-motor, tal como observado em (A). Com o parcelamento de áreas, a espécie descendente, com uma nova área semelhante à precursora herdaria o mesmo padrão de conexões (B) e aos poucos poderia desenvolver um novo padrão de projeções tálamo-cortical ou córtico-cortical. Este seria o caso do gambá *Didelphis aurita*, cujas projeções tálamo-corticais dos núcleos ventrais para S1 se assemelham às projeções para SC, embora o padrão não seja totalmente idêntico. Da mesma maneira, a região do amálgama poderia ter originado as áreas S1 e M1 nos mamíferos euterianos existentes, as quais teriam desenvolvido suas próprias conexões tálamo-corticais ao longo do processo evolutivo (C).

6. CONCLUSÃO

Antes de qualquer conclusão sobre a existência ou não de um amálgama sensório-motor no gambá *Didelphis aurita*, é preciso entender o que se discute nesta questão: a identificação de um córtex motor primário tal como descrito para alguns mamíferos euterianos e prototerianos, ou uma região somestésica primária que processa informações motoras. Decididamente, a região parietal imediatamente caudal à fissura orbitária possui características de uma área somestésica e podem ser subdividida em S1, SR e SC. Mas devemos considerar que todas as técnicas anatômicas e eletrofisiológicas devem concorrer juntas para confirmação de uma área motora primária sobreposta à S1. Como vimos ao longo deste estudo, os dados eletrofisiológicos são inconclusivos a este respeito e deixam dúvidas a sobre a presença de uma representação somatotópica exclusivamente motora no gambá.

É possível que o córtex motor primário com as características definidas nos euterianos atuais tenha surgido ao longo da evolução dos mamíferos a partir de um córtex somatossensorial, como o amálgama sensório-motor. O córtex somestésico primitivo poderia processar informações que nos mamíferos euterianos são realizadas por áreas do sistema motor sem necessariamente ser

nomeado “córtex motor”. Esta hipótese se baseia na observação dos nossos dados de projeções tálamo-corticais, nas projeções córtico-espinhais e nos dados histológicos de S1 apresentados anteriormente por outros estudos. A própria organização cortical sensório-motora de algumas espécies de animais não pertencentes ao grupo dos mamíferos recebe projeções de núcleos talâmicos que recebem projeções cerebelares, dos núcleos da base e somatossensoriais sem necessariamente ser segregadas em áreas somestésica ou motora primária. Mas podemos ir além...

Em nosso trabalho encontramos uma região somatossensorial que recebe projeções corticais de três modalidades sensoriais diferentes. No entanto, pouco se sabe se estas características estão presentes em todos os mamíferos ou somente naquelas cujo encéfalo é considerado primitivo. Podemos sugerir que o aparecimento e a especialização do córtex motor e parietal posterior ao longo do processo evolutivo certamente contribuiu para o aperfeiçoamento das habilidades sensoriais e motoras observadas no comportamento dos mamíferos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALLMAN J.; ZUCKER S. **Cytochrome oxidase and functional coding in primate striate cortex: a hypothesis.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 55: p. 979-82, 1990.

ALLMAN, J.M.. **Evolving brains.** New York, Scientific American Library. 225. 1999.

ANOMAL, R.F. **“Organização anátomo-funcional do córtex somestésico do gambá *Didelphis aurita*: projeções tálamo- corticais para as areas S1, SR e SC”.** Monografia de Mestrado. 2005.

BECK, P.D.; POSPICHAL, M.W.; KAAS, J. H. **Topography, architecture and connections of somatosensory cortex in opossums: evidence for five somatosensory areas.** J. Comp. Neurol.366, p. 109-133, 1996.

BODIAN, D. **Studies of the diencephalon of the *Virginia opossum*.** J. Comp. Neurol. 71, p. 259-323, 1939.

BOHRINGER, R.C.; ROWE, M.J. **The organization of the sensory and motor areas of the cerebral cortex in platypus (*Ornithorhynchus anatinus*).** J. Comp. Neurol.174, p. 1-14, 1977.

BRODMANN, K. **Vergleichende localisationslehre der grosshirnrinde.** Leipzig. East

Germany: Barth. 1909.

BUDINGER E.; HEIL P.; SCHEICH H. **Functional organization of auditory cortex in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). III. Anatomical subdivisions and corticocortical connections.** Eur J Neurosci. Jul;12(7): p. 2425-51, 2000.

BUTLER, A.; HODOS, W. **Comparative Vertebrate Neuroanatomy.** Ed Wiley-liss. New York, 1996.

CARLSON, M.; WELT, C. **Somatic sensory cortex (SmI) of the prosimian primate *Galago crassicaudatus*: organization of the mechanoreceptive input from hand in relation to architecture.** J. Comp. Neurol. 189, p. 249-271, 1980.

CATANIA, K.C. **Cortical organization in insectivore: The parallel evolution of the sensory periphery and the brain.** Brain Behav Evolution. 55: p. 311-321, 2000.

CATANIA, K.C. **Evolution of sensory specializations in insectivores.** The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology. 287(1): p. 1038-50, 2005.

CATANIA, K.C.; JAIN, N.; FRANCA, J.G.; VOLCHAN, E.; KAAS, J.H. **The organization of somatosensory cortex in the short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*).** Somatosensory and Motor Research, 171, p. 39-51, 2000.

CATANIA K.C.; LYON D.C.; MOCK O.B.; KAAS J.H. **Cortical organization in shrews: evidence from five species.** J Comp Neurol. 19;410(1): p. 55-72, 1999.

CLARK, LE; GROS W.E. **The antecedents of man.** Edinburgh University Press, Edinburgh, UK. 1959.

COOKE, D.F.; TAYLOR, C.S.; MOORE, T.; GRAZIANO, M.S. **Complex movements evoked by microstimulation of the ventral intraparietal area.** Proc Natl Acad Sci. Maio. 13;100(10): p. 6163-8, 2003.

COOPER, H.M.; HERBIN, M.; NEVO, E. Camp. Neural. 328, p. 313-350, 1993.

CRAIG, A.D. e ZHANG, E.T. **Retrograde analyses of spinothalamic projections in the macaque monkey: input to posterolateral thalamus.** J Comp Neurol. 499: p. 953-964, 2006.

CUSICK, C.G.; GOULD, H.J. **Connections between area 3b of the somatosensory cortex and subdivisions of the ventroposterior nuclear complex and the anterior pulvinar nucleus in squirrel monkeys.** J Comp Neurol. Feb 1;292(1): p. 83-102, 1990.

DARIAN-SMITH, C.; DARIAN-SMITH, I.; CHEEMA, S.S. **Thalamic projections to sensorimotor cortex in the macaque monkey: use of multiple retrograde fluorescent tracers.** J Comp Neurol. Set 1;299(1):p. 17-46, 1990.

DONOGHUE, J.P.; EBNER, F.F. **The organization of thalamic projections of the parietal cortex of the Virginia opossum.** J.Comp. Neurol. 20, p. 365-388, 1981.

EBBESSON S.O. **The parcellation theory and its relation to interspecific variability in brain organization, evolutionary and ontogenetic development, and neuronal plasticity.** Cell and tissue research. 213(2): p. 179-212, 1980.

ELDREDGE N.; CRACRAFT J. **Phylogenetic patterns and evolutionary process.** New York: Columbia University Press. 1980.

FABRI, M.; BURTON, H. **Ipsilateral cortical connections of primary somatic sensory cortex in rats.** J Comp Neurol. Set 15;311(3): p. 405-24, 1991.

FRANCA, J.G. **NADPH-diaforase no isocórtex de mamíferos: Neurônios do tipo I e neurópila reativa no córtex visual e somestésico.** Tese de Doutorado. Centro de Ciências da Saúde – UFRJ, Rio de Janeiro, 1999.

FROST S.B.; MILLIKEN, G.W.; PLAUTZ, J.E.; MARSTERTON, B.; NUDO, R. **Somatosensory and motor representations in cerebral cortex of a primitive mammal (*Monodelphis domestica*): a window into the early evolution of sensorimotor cortex.** J. Comp. Neurol. p. 421, 29-51, 2000.

FUKUCHI-SHIMOGORI, T.; GROVE E.A. **Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8.** Science. Nov 2; 4(5544):p. 1071-4, 2001.

FUNKE, K. **Somatosensory areas in the telencephalon of the pigeon. I. Response characteristics.** Exp Brain Res. 76(3): p. 603-19, 1989.

GALLYAS, F. **Silver sataining of myelin by means of physical development.** Neurology. 1, p. 203-209, 1979.

GRAY, P.A. **The Cortical lamination pattern of the opossum *Didelphis Virginiana*.** J. Comp. Neurol. 37, p. 221-263, 1924.

HOOGLAND P.V. **Brainstem afferents to the thalamus in a lizard, *Varanus exanthematicus*.** The Journal of Comparative Neurology. 10; 210(2): p.152-62, 1982.

HOROBIN, R. W. **Histochemistry.** Ed. Stuttgart, New York (1982).

HUBEL D.H.; WIESEL T.N. **Receptive fields and functional architecture in two nonstriate visual areas (18 and 19) of the cat.** J neurophysiol. 28:p. 229-89, 1965.

HUFFMAN, K.J.; KRUBITZER, L. **Thalamo-cortical connections of areas 3a and M1 in Marmoset Monkeys.** J. Comp. Neurol. 435, p. 291-310, 2001.

HUFFMAN, K.J. et al. **Organization of somatosensory cortex in three species of marsupials *Dasyurus hallucatus*, *Dactylopsila trivirgata* and *Monodelphis domestica*: neural correlates of morphological specializations.** J. Comp. Neurol. 403, p. 5-32, 1999.

IVANCO, T.L.; PELLIS, S.M.; WHISHAW, I.Q. **Skilled forelimb movements in prey catching and in reaching by rats (*Rattus norvegicus*) and opossums (*Monodelphis domestica*): relations to anatomical differences in motor systems.** Behavi Brain Res. Set, 79 (1-2): p. 163-81, 1996.

JAIN N.; CATANIA K.C.; KAAS J.H. **A histologically visible representation of the fingers and palm in primate area 3b and its immutability following long-term deafferentations.** Cereb Cortex. 8: p. 227–236, 1998.

JOHNSTON, J. B. **Further contributions of the study of evolution of the forebrain.** J. Comp. Neurol. 36: p.143-192, 1923.

JONES, E.G. **The thalamus.** New York: Plenum Press. 1985.

JONES, E.G. **A new view of specific and nonspecific thalamocortical connections.** Advances in neurology. 1998;77: p.49-71, 1998.

JONES, E.G.; WISE, S.P.; COULTER, J.D. **Differential thalamic relationships of sensory-motor and parietal cortical fields in monkeys.** The Journal of Comparative Neurology. 15;183(4): p.833-81, 1979.

KAAS, J.H. **The segregation of function in the neurons systems: Why do sensory systems have so many subdivisions?** In: Contributions to sensory physiology, W.P. Nef. New York Academic. 7, p. 201-240, 1982.

KAAS, J.H. **What, if anything, is S1? Organization of first somatosensory area of cortex.** Physiological Reviews. 63 (1) p. 206-231, 1983.

KAAS, J.H. **The organization of neocortex in mammals: implications for theories of brain function.** Annual review of psychology. 38: p. 129-51,1987.

KAAS, J.H. **How the somatosensory thalamus is subdivided and interconnected with areas of somatosensory cortex in monkeys?** Ed. M. Bentivoglio and R. Spreafico. Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division). p.143-50, 1988.

KAAS, J.H. **Topographic maps are fundamental to sensory processing.** Brain Res Bull. 44(2): p. 107-12, 1997.

KAAS, J.H. **The transformation of association cortex into sensory cortex.** Brain Research Bulletin. 50(5-6): 425. 1999.

KAAS, J.H. **Convergences in the modular and areal organization of the forebrain of mammals: implications for the reconstruction of forebrain evolution.** Brain, Behavior and Evolution. 59, p. 262-272, 2002.

KAAS, J.H. **Evolution of somatosensory and motor cortex in primates.** The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology. 281(1): p. 1148-56, 2004.

KAAS, J.H. **The evolution of the complex sensory and motor systems of the human brain.** Brain Research Bulletin. 18;75 (2-4): p. 384-90, 2008.

KAAS, J.H.; COLLINS, C.E. **Envolving ideas of brain evolution.** Nature. 411, p. 141-419, 2001.

KAAS, J.H.; COLLINS, C.E. **The organization of sensory cortex.** Current Opinion in Neuro biology. 11, p. 498-504, 2001.

KAAS, J.H.; NELSON, R.J. **Connections of the ventroposterior nucleus of the thalamus with the body surface representations in cortical areas 3b and 1 of the cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*).** J. Comp. Neurology. 199, p. 29-64, 1981.

KAAS, J.H.; STEPNIIEWSKA. **Encyclopedia of the human Brain.** Ed. Elsevier Science (USA). p. 159-168, 2002.

KAAS, J.H.; NELSON, R.J.; MERZENICK, M. **Multiple representations of the body within the primary somatosensory cortex of primates.** Science. 204; p. 521-523, 1979.

KAAS, J.H.; NELSON, R.J.; MERZENICK, M. **Organization of somatosensory cortex in primates. In: The organization of the cerebral cortex,** F.O. Schmitt, F.G. Worden G. Adelman and S.G. Dennis. Boston, MA: MIT Press. p. 237-261, 1981.

KALIL, K. **Neuroanatomical organization of the primate motor system: afferent and efferent connections of the ventral thalamic nuclei.** Multidisciplinary Perspectives in the Event Related. D. Otton Washington. Brain Potencial Research. p. 112-123, 1978.

KARLEN, S.J.; KRUBITZER, L. **The functional and anatomical organization of marsupial neocortex: evidence for parallel evolution across mammals.** Progress in Neurobiology. 82(3):p 122-41, 2007.

KILLACKEY, H.; EBNER, F. **Convergent projections of the three thalamic nuclei onto a single cortical areas.** Science. 179, p. 283-285, 1973.

KILLACKEY, H., RHOADES, R.W., BENNETT-CLARKE, C.A. **The formation of a cortical somatotopic map.** Trends in Neuroscience. 18(9): p. 402-7, 1995.

KIMBLE, D.P. **Didelphid behavior.** Neurosci Biobehav Rev. Março;21(3): p. 361-9, 1997. Review.

KORZENIEWSKA, E. ; GÜNTÜRKÜN O. **Sensory properties and afferents of the N. dorsolateralis posterior thalami of the pigeon.** J Comp Neurol. 15;292(3): p. 457-79, 1990.

KRUBITZER, L. **The organization of neocortex in mammals: are species differences really so different?** Trends in Neuroscience. 18(9): p. 408-17, 1995.

KRUBITZER, L. **The magnificent compromise: cortical field evolution in mammals.** Neuron. 25; 56(2): p. 201-8, 2007.

KRUBITZER, L.A.; KAAS, J.H. **The organization and connections of somatosensory cortex in marmosets.** J Neurosci. Mar;10(3): p. 952-74, 1990.

KRUBITZER, L.A.; KAAS, J.H. **The somatosensory thalamus of monkeys: cortical connections and a redefinition of nuclei in marmosets.** J Comp Neurol. Maio 1;319(1):p. 123-40, 1992.

KRUBITZER,L.; KAAS, J. **The evolution of the neocortex in mammals: how is phenotypic diversity generated?** Current Opinion in Neurobiology. 15(4): p. 444-53, 2005.

KRUBITZER, L.; KAHN, D.M. **Nature versus nurture revisited: an old idea with a new twist.** Progress in Neurobiology. 70(1): p. 33-52, 2003.

KRUBITZER, L. KÜNZLE, H.; KAAS, J. **Organization of sensory cortex in a Madagascan insectivore, the tenrec (Echinops telfairi).** J Comp Neurol. Mar 17; 379 (3), p. 399-414, 1997.

KRUBITZER, L.; CALFORD, M.; SCHMID, L. **Connections of Somatosensory Cortex in Megachiropteran Bats: The Evolution of Cortical Fields in Mammals.** The journal of Comparative Neurology. 327, p. 473-506, 1993.

LARSEN, D.D.; KRUBITZER, L. **Genetic and epigenetic contributions to the cortical phenotype in mammals.** Brain Research Bulletin. 18;75(2-4): p. 391-7, 2008.

LEMON, R.N. **Descending pathways in motor control.** Annu Rev Neurosci. 31: p. 195-218, 2008. Review.

LENDE, R.A. **Sensory representation in the cerebral cortex of the opossum (*Didelphis virginiana*).** J. Comp. Neurol. 121, p. 395-403, 1963a.

LENDE, R.A. **Motor representation in the cerebral cortex of the opossum (*Didelphis virginiana*).** J. Comp. Neurol., 121, p. 405-415, 1963b.

LENDE, R.A. **Representation in the cerebral cortex of the primitive mammal.** J. Neurophysiology. 27, p. 37-48, 1964.

LENDE, R.A. **A comparative approach to the neocortex: localization in monotremes, marsupials and insectivores.** Ann NY Acad Sci 167: p. 262-275, 1969.

LIVINGSTONE, M.S.; HUBEL, D.H. **Specificity of intrinsic connections in primate primary visual cortex.** Journal of Neuroscience. 4(11): p. 2830-5, 1984.

MAGALHÃES-CASTRO, B.; SARAVIA, P.E. **Sensory and motor representation in the cerebral cortex of the marsupial *Didelphis azarae azarae*.** Brain Research. 34, p. 291-299, 1971.

MARTIN, G.F.; FISHER, A.M. **A further evaluation of the origin, the course and the termination of the opossum corticospinal tract.** J Neurol Sci. Jul-Ag;7(1): p. 177-87, 1968.

MARTINICH, S.; ROSA, M.G.; ROCHA-MIRANDA, C.E. **Patterns of cytochrome oxidase activity in the visual cortex of a South American opossum (*Didelphis marsupialis aurita*).** Braz J Med Biol Res. 1990;23(9):p. 883-7, 1990.

MARTINICH, S. **Organização morfo-funcional do córtex visual peristriado do gambá (*Didelphis marsupialis*).** Tese de Doutorado. Centro de Ciências da Saúde – UFRJ, Rio de Janeiro, 1996.

MARTINICH, S.; PONTES, M.; ROCHA-MIRANDA, C.E. **Patterns of Corticocortical, Corticotectal, and Commissural Connections in the Opossum Visual Cortex.** The journal of comparative neurology. 416: p. 224–244, 2000.

MEDINA, L.; VEENMAN, C.L.; REINER, A. **Evidence for a possible avian dorsal thalamic region comparable to the mammalian ventral anterior, ventral lateral, and oral ventroposterolateral nuclei.** J Comp Neurol. 21; 384(1):p. 86-108, 1997.

MOUNTCASTLE, V. **Human physiology.** The C.V. Mosby Company. 1980.

MURPH, W.J. ; EIZIRIK, E.; O' BRIEN, S.J.; MADESEN, O.; SCALLY, M.; DOUADY, C.J.; TEELING, E.; RYDER, A.O.; STANPHONE, M.J.; JONG, W.W.; SPRINGER, M.S. **Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics.** Science. 294, p. 2348-2351, 2001.

NELSON, R.J.; KAAS J.H. **Connections of the ventroposterior nucleus of the thalamus with the body surface representation in cortical Areas 3b and 1 of the cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*).** J. Comp. Neurol. 199, p. 29-64, 1981.

NORTHCUTT, R.G.; KAAS, J.H. **The emergence and evolution of mammalian neocortex.** Trends in Neuroscience. 18(9): p. 373-9, 1995.

NUDO, R.J.; MASTERTON, R.B. **Descending pathways to the spinal cord, III: Sites of origin of the corticospinal tract.** J Comp Neurol. 22; 296(4):p. 559-83, 1990.

OLIVEIRA, L. **Interpolação não-linear de contornos no córtex visual primário do gambá (*Didelphis aurita*)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências da Saúde – UFRJ, Rio de Janeiro, 2001.

O'LEARY, D.D.; NAKAGAWA Y. **Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex**. *Current Opinion in Neurobiology*. 12(1):p. 14-25, 2002.

OSWALDO CRUZ, E.; ROCHA-MIRANDA, C.E. **The Brain of the opossum (*Didelphis marsupialis*)**. Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1. 1968.

OSWALDO CRUZ, E.; ROCHA-MIRANDA, C.E. **The dicephalon of the Opossum in Stereotaxic Coordinates. I. The epithalamus and dorsal thalamus**. *J. Comp. Neurol.* 129, p. 1- 38, 1968.

PEARSON, J.C.; HAINES, D.E. **Somatosensory thalamus of a prosimian primate (*Galago senegalensis*). II. An HRP and Golgi study of the ventral posterolateral nucleus (VPL)**. *J. Comp Neurol.* Abr 1;190(3):p. 559-80, 1980.

PADBERG, J.; KRUBITZER, L. **Thalamocortical connections of anterior and posterior parietal cortical areas in New World titi monkeys**. *The Journal of Comparative Neurology*. 20;497(3):p. 416-35, 2006.

PADBERG, J.; DISBROW, E.; KRUBITZER, L. **The organization and connections of anterior and posterior parietal cortex in titi monkeys: do New World monkeys have an area 2?** *Cerebral Cortex*. 15(12): p. 1938-63, 2005.

PALMER, A.R.; JIANG, D.; MCALPINE, D. **Neural responses in the inferior colliculus to binaural masking level differences created by inverting the noise in one ear**. *Journal of Neurophysiology*. 84(2): p. 844-52, 2000.

PUBOLS, B.H.; PUBOLS, L.M.; DIPETTE, J.C.; SHEELY, J.C. **Opossum somatic sensory cortex: a microelectrode mapping study**. *J. Comp. Neurol.* 165, p. 229-246, 1976.

RAKIC, P. **Neurocreationism--making new cortical maps**. *Science*. 2;294(5544): p. 1011-2, 2001.

REES, S.; HORE, J. **The motor cortex of the brush-tailed possum (*Trichosurus vulpecula*): motor representation, motor function and the pyramidal tract.** Brain Res. Jun 15;20(3): p. 439-51, 1970.

REINER, A.; VEENMAN, C.L.; MEDINA, L.; JIAO, Y.; DEL MAR, N.; HONIG, M.G. **Pathway tracing using biotinylated dextran amines.** Journal of Neuroscience Methods. 103, p. 23-37, 2000.

REMPLE, M.S.; REED, J.L.; STEPNIIEWSKA, I.; KAAS, J.H. **Organization of frontoparietal cortex in the tree shrew (*Tupaia belangeri*). I. Architecture, microelectrode maps, and corticospinal connections.** The Journal of Comparative Neurology. 1;497(1): p. 133-54, 2006.

REMPLE, M.S.; REED, J.L.; STEPNIIEWSKA, I.; LYON, D.C.; KAAS, J.H. **The organization of frontoparietal cortex in the tree shrew (*Tupaia belangeri*): II. Connectional evidence for a frontal-posterior parietal network.** The Journal of Comparative Neurology. 1; 501(1): p. 121-49, 2007.

RIZZOLATTI, G.; FADIGA, L. **Grasping objects and grasping action meanings: the dual role of monkey rostroventral premotor cortex (area F5).** Novartis Found Symp. p. 218:81-95; discussion p. 95-103, 1998.

ROCHA-REGO, V.; CANTERAS, N.S.; ANOMAL, R.F.; VOLCHAN, E.; FRANCA, J.G. **Architectonic subdivisions of the amygdalar complex of a primitive marsupial (*Didelphis aurita*).** Brain Res Bull.15;76(1-2): p. 26-35, 2008.

ROSA, M.G.; KRUBITZER, L.A. **The evolution of visual cortex: where is V2?** Trends Neurosci. 22: p. 242-248, 1999.

ROSA, M.G.; KRUBITZER, L.A.; MOLNÁR, Z.; NELSON, J.E.. **Organization of visual cortex in the northern quoll, *Dasyurus hallucatus*: evidence for a homologue of the second visual area in marsupials.** The European journal of neuroscience. 11(3): p. 907-15, 1999.

SCHERER-SINGLER, U.; VINCENT, S.R.; KIMURA, H.; MCGEER, E.G. **Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry.** Journal of Neuroscience Methods. 9(3): p. 229-34, 1983.

SCHIEBER, M.H. **Constraints on somatotopic organization in the primary motor cortex.** Journal of Neurophysiology. 86(5): p. 2125-43, 2001.

SCHROEDER, C.E.; LINDSLEY, R.W.; SPECHT, C.; MARCOVICI, A.; SMILEY, J.F.; JAVITT, D.C. **Somatosensory input to auditory association cortex in the macaque monkey.** J Neurophysiol. Mar;85(3): p. 1322-7, 2001.

SLUTSKY, D.A.; MANGER, P.R.; KRUBITZER, L.A. **Multiple somatosensory areas in the anterior parietal cortex of the California ground squirrel (Spermophilus beechyii).** J. Comp. Neurol. 416, p. 521-539, 2000.

SMITH, E.G. **The evolution of man.** Essays. Oxford University Press, London, UK. 1924.

STRIEDTER, G. **Principles of brain evolution.** Sinauer Associates, Inc. EUA. 2005.

SOUSA, A.P.B.; OSWALDO CRUZ E.; R. GATTASS. **Somatotopic organization and response properties of neurons of the ventrobasal complex in the opossum.** J. Comp. Neurol. 142, p. 231-248, 1971.

STEPNIEWSKA, I.; FANG, P.C.; KAAS, J.H. **Microstimulation reveals specialized subregions for different complex movements in posterior parietal cortex of prosimian galagos.** Proc Natl Acad Sci. Mar 29;102(13): p. 4878-83, 2005.

STEPNIEWSKA, I.; PREUSS, T.M.; KAAS, J.H. **Architetic subdivisions of the motor thalamus of owl monkeys: Nissl, acetylcholinesterase, and cytochrome oxidase patterns.** J. Comp. Neurol. 349, p. 536-557, 1993.

SUR, M.; RUBENSTEIN, J.L. **Patterning and plasticity of the cerebral cortex.** Science. 4;310(5749): p. 805-10, 2005.

THE AVIAN BRAIN NOMENCLATURE CONSORTIUM. **Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution.** Neuroscience. 6(2): p. 151-9, 2005.

ULINSKY, P.S. **Thalamic projections to the somatosensory cortex of the echidna, (Tachyloglossus aculeatus)**. In: Comparative neurology of the telencephalon. New York: Plenum Press, p. 449-481, 1984.

VERCELLI, A.; REPICI, M.; GARBOSSA, D.; GRIMALDI, A. **Recent techniques for tracing pathways in the central nervous systems of developing and adult mammals**. Brain Research Bulletin. 50, p. 11-28, 2000.

VOLCHAN, E.; FRANCA, J.G. **Distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons in the opossum neocortex**. Brazilian journal of medical and biological research. 27(10): p. 2431-5, 1994.

WALLACE, M.N., RUTKOWSKI, R.G. e PALMER, A.R. **Identification and localisation of auditory areas in guinea pig cortex**. *Exp Brain Res* **132** (2000), p. 445–456, 2000.

WALSH, T.M.; EBNER F.F. **Distribution of cerebellar and somatic lemniscal projections in the ventral nuclear complex of the Virginia opossum**. *J Comp Neurol*. Feb 15;147(4): p. 427-46, 1973.

WATSON, C.R. **The corticospinal tract of the quokka wallaby (*Setonix brachyurus*)**. *J Anat*. Maio;109(Pt 1): p. 127-33, 1971.

WILEY, E.O. **Phylogenetics: the theory and practice of phylogenetic systematic..** John Wiley and Sons. New York. 1981.

WOOLSEY, C.N. **Organization of somatic sensory and motor areas of the cerebral cortex**. In: Biological and Biochemical Bases of Behavior, H.F. Harlow and C.N. Woolsey. Madison, WI: Univ. of Wisconsin Press, p. 63-81, 1958.

WOOLSEY, C.N.; FAIRMAN, D. **Contralateral, ipsilateral and bilateral representation of cutaneous receptors in somatic areas I and II of the cerebral cortex of pig, sheep and other mammals**. *Surgery*. 19, p. 684-702, 1946.

WONG-RILEY, M. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. Brain Research. 27;171(1): p. 11-28, 1979.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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