

FÁBIO VIEGAS CAIXETA

ATIVIDADE MULTIMODAL NO CÓRTEX SENSORIAL PRIMÁRIO DE RATOS

Natal

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FÁBIO VIEGAS CAIXETA

ATIVIDADE MULTIMODAL NO CÓRTEX SENSORIAL PRIMÁRIO DE RATOS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Rio
Grande do Norte como requisito
parcial para a obtenção do título de
Mestre em Psicobiologia.

Orientador: Sidarta Ribeiro

Natal

2010

Título: Atividade multimodal no córtex sensorial primário de ratos

Autor: Fábio Viegas Caixeta

Data da defesa: 26/02/2010

Banca examinadora:

Prof. Sidarta Tollendal Gomes Ribeiro
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Antônio Pereira Júnior
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Mário Fiorani Junior
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus professores Carlos Alberto Schwartz e Valdir Filgueiras Pessoa, que despertaram minha paixão pelo estudo da eletrofisiologia e da percepção.

Agradecimentos

Agradeço ao professor Sidarta Ribeiro pelo apoio e pela orientação durante o mestrado;

Aos professores da Pós-graduação em Psicobiologia da UFRN, particularmente Fívia Lopes, Regina Silva e Daniel Pessoa, que me ensinaram muito mais do que comportamento animal e neurofisiologia;

Aos colegas Hindiael Belchior, Diego Laplagne, Regielly Moreno, Marco Aurélio Freire, Flávio Barbosa, Arthur França, Vítor Santos e Gilvan Filho pelo companheirismo e pelo auxílio prestado em diferentes etapas do trabalho;

Ao Sr. João, Bastos, Jeberson, Ciro, Everton, Júnior, Ana Rosa, Dri, Marcelo, Valéria, Gileno, Genário, Tati, Roberto, Meiri, Dalva, Nilda, e todos os pesquisadores e colegas do IINN/ELS, por manterem o Instituto funcionando e bem cuidado, garantindo a boa execução dos experimentos;

À minha mãe, meu pai, meu irmão, e toda a minha família pelo apoio incondicional à minha rebeldia em vir fazer o mestrado na praia;

Aos amigos de infância, os da escola, aqueles da graduação e outros tantos do mestrado, que sabem quem são, e vão ficar frustrados quando virem que eu não os citei individualmente aqui (desculpa gente, num cabem todos vocês em uma página). É graças a cada um de vocês que a minha vida continua alegre e tranquila;

À Patrícia Cordeiro e família pelo carinho, compreensão, e as refeições compartilhadas durante a escrita desta dissertação;

A Rafael Volochen e três revisores anônimos por valiosas sugestões de redação;

E à CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

O modelo de processamento sensorial mais aceito atualmente afirma que os sentidos são processados em paralelo, e que a atividade de córtices sensoriais específicos define a modalidade sensória percebida subjetivamente. Neste trabalho utilizamos registros eletrofisiológicos crônicos de múltiplos neurônios para investigar se neurônios nos córtices primários visual (V1) e tátil (S1) de ratos anestesiados podem responder a estímulos das modalidades sensoriais não associadas tradicionalmente a estes córtices. Durante a estimulação visual, 87% dos neurônios de V1 foram responsivos, enquanto 82% dos neurônios de S1 responderam à estimulação tátil. Nos mesmos registros, encontramos 23% dos neurônios de V1 responsivos a estímulos táteis e 22% dos neurônios de S1 responsivos a estímulos visuais. Nossos dados corroboram uma crescente série de evidências que indica a presença de processamento multimodal nos córtices sensoriais primários, o que desafia o paradigma do processamento sensorial unimodal e sugere a necessidade de uma reinterpretação do modelo de hierarquia cortical atualmente aceito.

Palavras-chave

Modalidade cruzada, processamento neural distribuído

ABSTRACT

The currently accepted model of sensory processing states that different senses are processed in parallel, and that the activity of specific cortical regions define the sensorial modality perceived by the subject. In this work we used chronic multielectrode extracellular recordings to investigate to which extent neurons in the visual and tactile primary cortices (V1 and S1) of anesthetized rats would respond to sensory modalities not traditionally associated with these cortices. Visual stimulation yielded 87% of responsive neurons in V1, while 82% of S1 neurons responded to tactile stimulation. In the same stimulation sessions, we found 23% of V1 neurons responding to tactile stimuli and 22% of S1 neurons responding to visual stimuli. Our data supports an increasing body of evidence that indicates the existence multimodal processing in primary sensory cortices. Our data challenge the unimodal sensory processing paradigm, and suggest the need of a reinterpretation of the currently accepted model of cortical hierarchy.

Key-words

Crossmodal activity, distributed neural processing

SUMÁRIO

I – Apresentação.....	1
II – Introdução.....	2
III – Objetivos.....	14
IV – Materiais e Métodos.....	15
V – Resultados.....	30
VI – Discussão.....	48
VII – Conclusões.....	57
VIII – Referências bibliográficas.....	58
Anexo A – Protocolo cirúrgico.....	72

APRESENTAÇÃO

Ao tentar entender fisiologicamente como percebemos a realidade ao nosso redor, o primeiro fator a levar em conta é que as cores, os cheiros e os sons do mundo estão dentro da nossa cabeça, e não fora dela. Esta pode parecer uma idéia contra-intuitiva a princípio, mas ela tem sido cada vez mais confirmada experimentalmente.

Segundo Kaas (1989), o sistema nervoso dos mamíferos apresenta uma divisão funcional-anatômica comum em que grande parte do cérebro, especialmente no tálamo dorsal e no neocórtex, é composta por núcleos celulares e regiões corticais que integram um complexo sistema de análise de informação sensória. Esse sistema permite que o comportamento seja guiado a partir de inferências precisas sobre o mundo externo.

Dessa forma, os estímulos físicos e químicos com que nos deparamos são compreendidos pela mente após serem captados por sensores espalhados pelo corpo, codificados em um sinal inteligível para nossos neurônios e decodificados, ou recodificados, em percepções subjetivas que servem de substrato para os pensamentos e ações. As implicações dessa visão pragmática e anti-poética sobre nossa percepção da realidade compõem a base da neurociência sensorial, e seus mecanismos ainda não foram totalmente explicados.

Esta dissertação trata de uma pequena fração dos processamentos envolvidos na formação da percepção, e apresenta dados experimentais coletados nos últimos dois anos no Instituto Internacional de Neurociência de Natal Edmond e Lily Safra, que podem contribuir um pouco para elucidar os mecanismos que permitem a “invenção” da realidade.

INTRODUÇÃO

As bases teóricas da neurociência sensorial desenvolveram-se a partir dos trabalhos pioneiros realizados por Weber e Fechner (Weber 1846 e Fechner 1860 citados por Kandel 2003). Estes autores propuseram que todas as sensações apresentam quatro tipos básicos de informação: **modalidade, localização, intensidade e duração**, e que os sistemas sensoriais devem utilizar uma mesma linguagem fisiológica (hoje sabe-se que esta linguagem baseia-se em potenciais bioelétricos conduzidos e processados por neurônios) para representar qualquer estímulo (luz, som, cheiro, sabor, etc) se valendo apenas dessas quatro unidades de informação.

A **modalidade** sensorial é definida pelo tipo de estímulo, assim como pelos receptores especializados em reconhecer esse tipo de estímulo. A **localização** do estímulo é representada pela ativação de um grupo localizado de receptores, de forma que a ativação de uma determinada população de sensores indica simultaneamente a modalidade e a localização do estímulo no espaço. A **intensidade** é codificada pela frequência de disparos e pelo tamanho da população de receptores ativados. Finalmente, a **duração** do estímulo é codificada através do início e do término da ativação dos receptores (Kandel 2003).

Outra idéia que direcionou os estudos da neurociência sensorial desde cedo é o conceito das “energias nervosas específicas”, proposto por Johannes Müller no século XIX. Segundo este conceito, a percepção subjetiva é determinada pelas fibras nervosas ativadas, e não pelo estímulo que originalmente ativou essas fibras

(Casagrande e Royal 2004). Esse conceito é facilmente comprovado, por exemplo, ao se estimular mecanicamente o olho, o que produz a sensação de luz, da mesma forma que a estimulação elétrica de um nervo auditivo causa a sensação de um som (Shannon 1983).

A interpretação mais aceita das idéias de Müller afirma que a anatomia funcional dos sistemas sensoriais opera como um conjunto de linhas marcadas (do inglês *labeled lines*), em que a atividade de elementos individuais de cada via (receptores, nervos periféricos e áreas cerebrais alvo) define a modalidade sensória percebida (Boring 1942). Observações anatômicas iniciais reunidas por Jones e Powell (1969 e 1970) indicaram que as regiões cerebrais, incluindo as áreas corticais, que respondiam à estimulação de diferentes modalidades sensoriais não apresentam conexões entre si, o que levou esses autores a proporem que cada modalidade sensorial é processada separadamente, dando apoio à ideia das linhas marcadas no processamento sensorial.

Esta é a visão prevalente nos livros-texto de neurociência atuais, como pode ser percebido no trecho abaixo, retirado do livro *Princípios de Neurociências*:

“Pelo menos nos estágios iniciais do processamento da informação sensória, cada classe de receptor faz conexões com estruturas diferentes no sistema nervoso central. Dessa forma, a visão ou o tato ocorrem em razão da ativação de estruturas específicas do sistema nervoso central. Por isso, a modalidade é representada por um grupo de neurônios conectados a classes específicas de receptores. Os sistemas sensoriais são formados por grupos de neurônios que compreendem o sistema somatossensorio,

sistema visual, sistema auditivo, sistema vestibular, sistema olfatório e sistema gustatório.” (Kandel et al. 2003, p.416)

O primeiro estudo que encontrou uma representação sensória precisa no sistema nervoso humano foi realizado por Penfield e Boldrey em 1937, e envolveu 163 pacientes submetidos a neurocirurgia sob anestesia local. Neste trabalho constatou-se que a estimulação elétrica de regiões corticais específicas resulta na percepção de estímulos mecânicos ou em movimentos involuntários de determinadas partes do corpo. Os autores concluíram que existiam no córtex representações separadas do corpo, uma envolvida com as sensações e outra com o controle motor. Posteriormente verificou-se que existem não uma, mas várias representações sensoriais e motoras no córtex, assim como em outras partes do sistema nervoso central. Na Figura 1 temos uma das primeiras tentativas de Penfield e Boldrey para descrever suas descobertas, e uma micrografia do córtex somestésico de um rato indicando agrupamentos de neurônios responsivos a estímulos táteis.

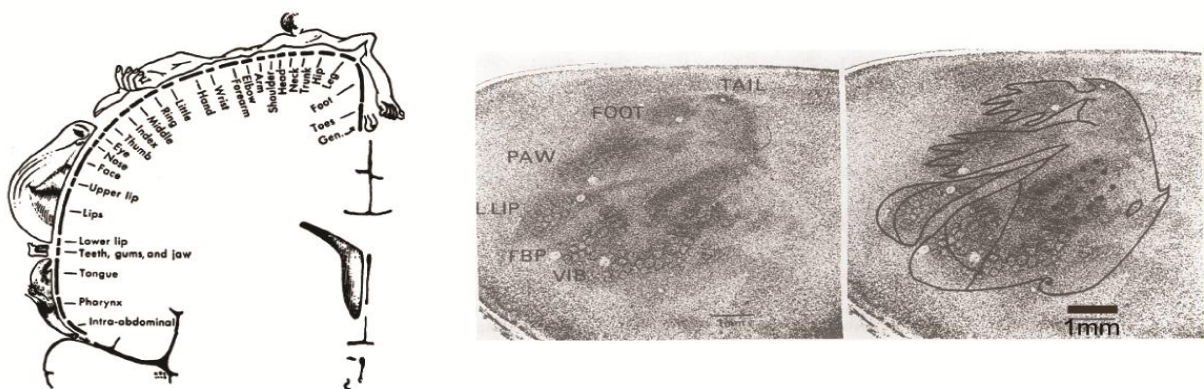


Figura 1. Mapas corticais somatotópicos do homem, à esquerda, e do rato, à direita. Extraído de Schott 1993.

As áreas corticais referentes às sensações são denominadas mapas somatotópicos (do grego *soma*: corpo e *topos*: lugar). Mapas somatotópicos semelhantes aos descritos por Penfield foram encontrados em diversos mamíferos. Para citar alguns exemplos, ratos (Woolsey 1958, Chapin e Lin 1984), gatos (Mountcastle 1957), primatas (Kaas et al. 1979), morcegos (Calford et al. 1985) e humanos (Penfield e Boldrey 1937, Woolsey et al. 1979) possuem somatotopia em seus córtices, indicando uma organização funcional semelhante envolvida no processamento sensorial desses animais. Existem variações entre as representações topográficas dos mapas sensoriais de animais de diferentes espécies, até mesmo em animais filogeneticamente próximos, como foi observado em mapas somatotópicos de primatas (Sur et al. 1982) e de roedores (Santiago et al. 2007).

Em 1862, no livro “Sobre a sensação dos tons como uma base fisiológica para a teoria da música”, Helmholtz propôs um outro tipo de mapa topográfico para o sistema auditivo. Helmholtz, que foi aluno de Müller, acreditava que o som seria percebido através da ativação de regiões cerebrais distintas que responderiam a tons puros, formando uma representação espacial do espectro de frequências sonoras audíveis. Apesar de ainda existirem controvérsias sobre o que é efetivamente representado nesse mapa cortical (Goldstein 1973, Shannon 1983, Pantev et al. 1989, Oxenham et al. 2004), claramente existe uma topografia funcional no córtex auditivo dos mamíferos (Oxenham et al. 2004).

Um mapa cortical referente ao campo visual foi relatado pela primeira vez no córtex de mamíferos em 1940 (Talbot e Marshal 1940, Talbot 1942), e constitui um tipo de representação sensorial aparentemente mais complexa do que a dos outros

sentidos, conforme será abordado mais adiante. Uma característica comum às áreas visuais de primatas é a presença de múltiplas representações do campo visual (Gattass et al. 2005). No córtex de primatas já foram catalogadas mais de 32 áreas visuais distintas, ocupando quase dois terços da área cortical (Royal e Casagrande 2004). A quantidade exata e os limites entre essas áreas visuais, assim como a organização visuotópica de cada uma delas, entretanto, varia de espécie para espécie, assim como entre estudos da mesma espécie feitos por diferentes grupos de pesquisa (Gattass et al. 2005).

A representação gustatória no córtex também foi descrita (Benjamin e Akert 1959), apesar de que durante muito tempo não se soubesse exatamente o que era representado nesse mapa (Braun et al. 1982). Isso parece ter sido resolvido recentemente por estudos de dinâmicas de populações neurais (Katz et al. 2001 e 2002, Stapleton et al. 2007) que descobriram que a representação dos gostos não é feita por neurônios individuais, mas está codificada em populações de neurônios. Dessa forma, apesar de não termos neurônios corticais específicos para amargo ou para doce, se registrarmos uma população de algumas dezenas de neurônios podemos decifrar o sabor percebido pelo rato após apenas uma lambida (Stapleton 2007). No caso da olfação, uma representação odotópica grosseira foi encontrada no bulbo olfatório de ratos por Adrian (1950), mas ainda hoje não existe um modelo satisfatório de processamento cortical para odores (Gottfried et al. 2006).

Apesar da aparente rigidez organizacional das representações corticais, há mais de 30 anos sabe-se que os mapas corticais remodelam-se de forma dinâmica, adaptando-se para representar melhor estímulos comportamentalmente mais relevantes (Merzenich et al. 1983, Kaas 1991, Buonomano e Merzenich 1998). Em

humanos, um período de três semanas de treino de uma tarefa manual é suficiente para alterar a somatotopia do pulso e dos dígitos (Hluštík 2004). Em casos drásticos, como a amputação de um membro ou a deafferentação deste, ocorre uma reorganização cortical permanente em animais adultos, e até mesmo uma remodelação total da topografia sensorial, quando ocorre em animais jovens (Pons et al. 1991, Jones 2000). Um fenômeno semelhante é observado no córtex visual de gatos com privação monocular (Wiesel e Hubel 1963), onde a representação do olho funcional “invade” a região cortical referente ao olho inativo.

A existência de representações anatomicamente bem definidas para cada sensação favoreceu a consolidação do modelo de processamento sensorial unimodal em vias paralelas, com a integração da informação multissensorial só ocorrendo em algumas áreas corticais após um extenso processamento unimodal em áreas separadas (Ghazanfar e Schroeder 2006).

O processamento sensorial, entretanto, não se inicia no córtex. Os receptores sensoriais espalhados pelo corpo enviam nervos específicos para o tálamo, de onde a informação sensorial segue para o córtex (Kaas 1989). A primeira região cortical a receber as projeções subcorticais é chamada de córtex sensorial primário (Kaas 1989). A organização das vias de transmissão dos sistemas sensoriais em geral (à exceção do olfato, que não será abordado) é semelhante à do sistema visual, descrito a seguir.

No sistema visual as células fotorreceptoras da retina recebem simultaneamente luz de cores e brilhos variados, mas apenas algumas células são ativadas a cada momento, orquestrando uma representação complexa das imagens que atingem a retina (Stryer 1996). Já existe um processamento inicial da

informação visual na retina, o que pode ser inferido a partir da constatação de que existem aproximadamente 100 milhões de fotorreceptores na retina, e apenas um milhão de axônios formando o nervo óptico que transporta essa informação até o cérebro (Stryer 1996).

Em primatas, a informação visual sai da retina e se dirige para diferentes estruturas cerebrais: o núcleo supraquiasmático, onde participa no ajuste do fotoperíodo e dos ciclos circadianos (Moore 1983); o colículo superior, que coordena o movimento dos olhos, da cabeça e do corpo em relação aos estímulos visuais (Schiller e Malpeli 1977); enquanto a maior parte das fibras oriundas da retina segue para uma estrutura talâmica denominada núcleo geniculado lateral (NGL) (Schiller e Malpeli 1978).

As células do NGL que recebem projeções da retina apresentam uma notável organização em camadas que recebem alternadamente aferências de ambos os olhos. Essas camadas recebem conexões de tipos específicos de fotorreceptores, e projetam-se, principalmente, para regiões específicas no córtex visual primário (Schiller e Malpeli 1978). Apesar da aparente função do NGL de simples estação de transferência e direcionamento de informação visual dos olhos até o córtex, a maior parte das sinapses que chegam ao NGL são provenientes do córtex, indicando um forte papel modulatório sobre a informação visual antes mesmo de sua entrada no córtex (Hubel e Wiesel 1961, Alitto e Martin 2003).

Hubel e Wiesel estudaram a resposta de neurônios do córtex visual primário de gatos a estímulos visuais e concluíram que além do processamento em paralelo para diferentes modalidades sensoriais, deveria existir também algum tipo de processamento em série dentro de cada modalidade (Hubel e Wiesel 1962 e 1968).

Estes autores observaram como células corticais de gatos respondiam a estímulos visuais progressivamente mais complexos e sugeriram que um processamento hierárquico deveria estar ocorrendo.

Vários estudos anatômicos e eletrofisiológicos (Zeki 1991, Felleman e Van Essen 1991, Kaas e Collins 2004, Gattass et al. 2005) encontraram dados que suportam o modelo de processamento visual hierárquico sugerido por Hubel e Wiesel, atualmente tido como o modelo geral para o processamento sensorial no córtex de mamíferos. De forma sucinta, este modelo postula que o processamento cortical da informação sensorial inicia-se nos córtices sensoriais primários, que por sua vez redistribuem a informação para córtices sensoriais secundários que decompõe e analisam separadamente os atributos básicos de cada sub-modalidade sensorial (Felleman e Van Essen 1991, Zeki 1991, Lamme et al. 1998).

Esse modelo recebe apoio de estudos realizados em pacientes com lesões cerebrais localizadas, que podem perder a visão de cores, ou de movimento (Zeki et al. 1991), ou até mesmo a capacidade de reconhecer rostos (Sacks 1985), sem no entanto perder a visão como um todo. A representação gráfica mais conhecida do modelo de processamento hierárquico foi proposta por Felleman e Van Essen em 1991 e está indicada na Figura 2.

Um outro conceito introduzido posteriormente no modelo de processamento hierárquico é a existência de várias conexões córtico-corticais que enviam informação entre áreas secundárias e de áreas secundárias para áreas primárias, formando uma rede com várias recorrências (Mignard e Malpeli 1991, Lamme e Roelfsema 2000, Gattass et al 2005), sempre entre regiões corticais da mesma modalidade.

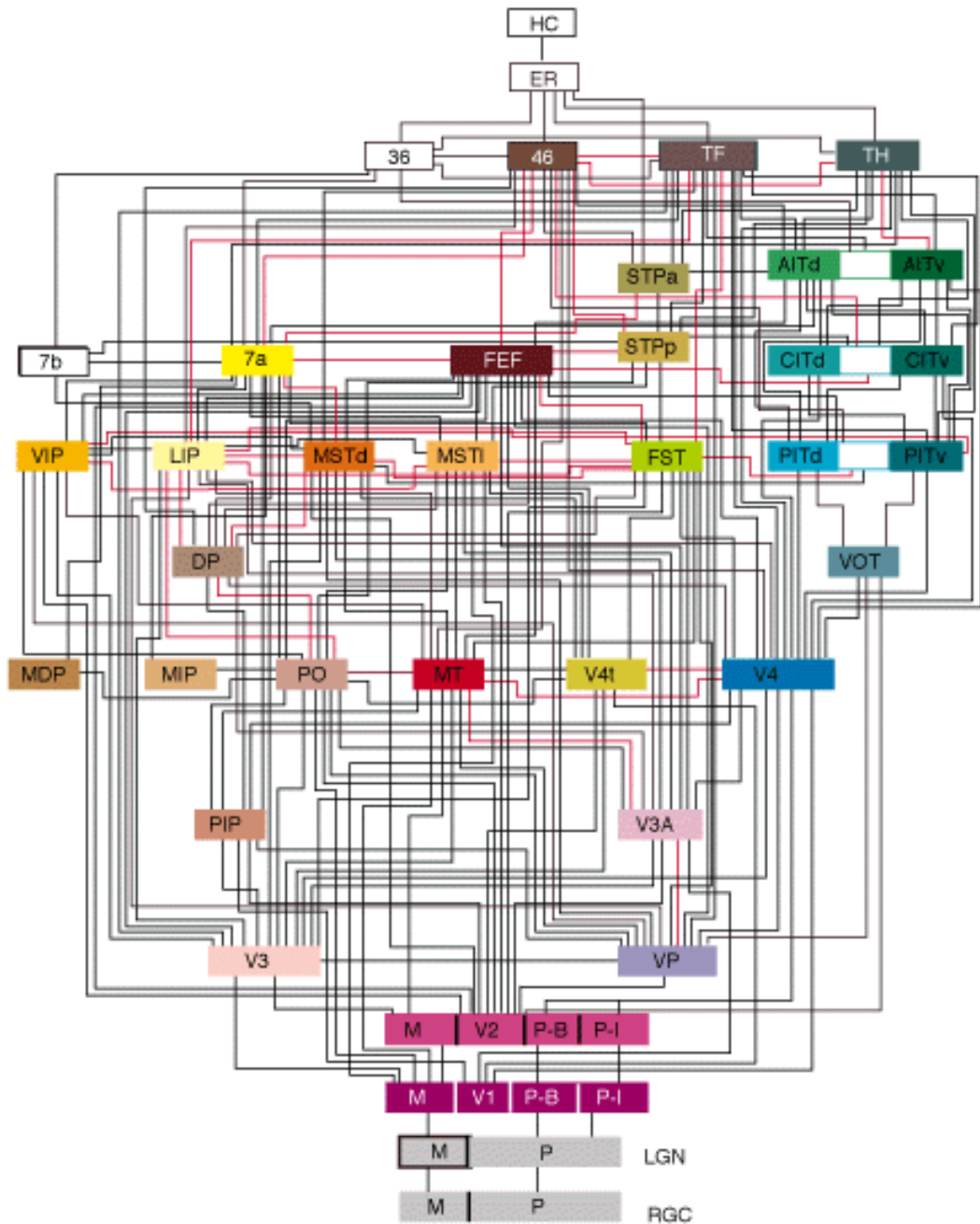


Figura 2. Hierarquia das áreas visuais do macaco Rhesus, baseado nos padrões laminares de conexões anatômicas. Extraído de Felleman e Van Essen 1991.

Com a incorporação das idéias de Hubel e Wiesel, o modelo de processamento sensorial passa a ser constituído por dois elementos principais: enquanto o processamento de uma modalidade sensorial ocorre paralelamente às

demais modalidades (Jones e Powell 1970), dentro de cada modalidade existe um processamento hierárquico e paralelo, sendo os diferentes atributos de cada modalidade analisados em regiões separadas, o que foi constatado nos sistemas visual (Felleman e Van Essen 1991, Zeki 1991, Lamme et al. 1998), somatossensorial (Burton e Sinclair 1996) e auditivo (Rauschecker et al. 1997).

Apenas após extenso processamento unimodal de cada modalidade sensorial ocorreria a integração multimodal das sensações nos córtices associativos, como o córtex parietal posterior (Mountcastle et al. 1975, Andersen 1997), cujas células respondem a estímulos de diversas modalidades, e o córtex pré-frontal, inicialmente chamado de “córtex silencioso”, por não responder a qualquer tipo de estimulação sensorial específica (Goldman-Rakic 1988).

A questão de onde e como essa integração sensorial dá origem à percepção é normalmente referida como “*the binding problem*” (do inglês: o problema da conjunção). Este problema originou calorosos debates no meio científico, e várias hipóteses foram formuladas para tentar resolvê-lo (Crick 1994, Friedman-Hill et al. 1995, Treisman 1996 e 1999, Reynolds e Desimone 1999, Shadlen e Movshon 1999, Singer 1999, Hommel 2004, Körding et al. 2007), sem, no entanto, chegarem a um consenso.

O modelo de processamento sensorial apresentado até este ponto tem sido contestado recentemente por um crescente número de estudos anatômicos (Falchier et al. 2002, Rockland e Ojima 2003, Cappe e Barone 2005 e 2009, Allman e Meredith 2008), de imageamento cerebral por ressonância magnética funcional e tomografia de emissão de pósitrons (Sadato et al. 1996, Sathian et al. 1997, Calvert et al. 2000, Laurienti et al. 2002, Sathian 2005, Merabet et al. 2008) e

eletrofisiológicos (Giard e Peronnet 1999, Foxe et al. 2000, Schroeder & Foxe 2005, Wallace et al. 2004, Ojima et al. 2010) que sugerem a existência de conexões entre os córtices sensoriais tradicionalmente considerados como unimodais.

A latência da interação multimodal encontrada em alguns desses estudos é tão baixa (Giard and Peronnet 1999, Foxe et al. 2000, Molholm et al. 2002, Murray et al. 2005, Senkowski et al. 2007, Sperdin et al. 2009) que a possibilidade de que essa interação seja causada por recorrências vindas de áreas associativas é descartada. Alguns desses estudos encontraram inclusive conexões entre córtices sensoriais primários (Falchier et al. 2002, Rockland e Ojima 2003, Martuzzi et al. 2007, Wang et al. 2008), indicando que o processamento sensorial ocorre em um substrato cortical multimodal, contrariando frontalmente as observações iniciais reunidas por Jones e Powell (1970).

Um outro grupo de dados experimentais que desafia o modelo de processamento em áreas compartimentalizadas foi levantado pelo grupo de pesquisa de Miguel Nicolelis na Universidade de Duke. Resultados deste grupo indicam que o processamento cortical ocorre simultaneamente em diferentes áreas do córtex somatossensorial (Nicolelis et al. 1998), e que a estimulação de vibrissas em ratos anestesiados desencadeia padrões de ativação que têm origem nas representações corticais das vibrissas e se espalham por todo o córtex somatossensorial (Ghazanfar et al. 2000). A dinâmica de ativação cortical encontrada nesses experimentos não se enquadra no modelo de distribuição hierárquica prevista pelo modelo tradicional.

Dados recentes do grupo de pesquisa de Sidarta Ribeiro (2007) indicam a alteração da taxa de disparos de neurônios do córtex visual primário de ratos

durante uma tarefa de exploração tátil no escuro completo. A interpretação inicial para esses dados foi de que tal variação era causada por um efeito inespecífico de aumento do estado de alerta do animal, devido à introdução de novos objetos. Análises posteriores realizadas por Nivaldo Vasconcelos (Ribeiro et al, submetido) indicaram a presença de informação sobre os objetos explorados pelas vibrissas na atividade populacional de neurônios do córtex visual primário (V1).

Em virtude desses resultados e da escassez de dados na literatura indicando a presença de neurônios táteis em V1, um novo experimento foi planejado para testar se a estimulação tátil isoladamente causaria uma alteração significativa em neurônios de V1. Aproveitando a ocasião, desenhamos o experimento para testar também se a estimulação visual causaria um efeito significativo em neurônios do córtex somestésico primário (S1). Para indicar neurônios de áreas corticais sensoriais responsivos a estímulos de modalidades diferentes das tradicionalmente associadas a estas córtices, utilizaremos o termo *neurônio crossmodal* (do inglês: modalidade cruzada).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar a presença de neurônios em V1 e em S1 que respondam de maneira não-unimodal (crossmodal) utilizando a técnica de registro eletrofisiológico extracelular crônico de múltiplos eletrodos em ratos anestesiados submetidos à estimulação visual e à estimulação tátil em sessões alternadas.

Objetivos específicos

1. Verificar a existência de neurônios em V1 e em S1 responsivos a estímulos visuais e a estímulos táteis;
2. Quantificar a resposta unimodal e a resposta crossmodal nos córtices investigados; e
3. Comparar os tempos de latência da resposta de neurônios unimodais e crossmodais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Colaboradores

Os experimentos apresentados nesta dissertação de mestrado foram desenvolvidos pelo autor como parte do projeto de pesquisa “Processamento *cross-modal* na área cortical visual primária”, sob a coordenação de Sidarta Ribeiro e Miguel Nicolelis. Este projeto também contou com a participação da equipe de pesquisadores do Instituto Internacional de Neurociências de Natal Edmond e Lily Safra – IINN/ELS. Ao longo dos experimentos o autor recebeu colaboração de outros pesquisadores, além de colaborar com outros experimentos que não serão abordados neste texto. Para dar o devido crédito aos colaboradores de cada etapa do trabalho ora apresentado, serão indicados ao longo da seção de Materiais e Métodos os pesquisadores que auxiliaram nos experimentos, bem como seus papéis específicos na execução dos mesmos.

Animais

Seis ratos machos adultos (285-355g) da linhagem Long-Evans (Figura 3) foram utilizados. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob ciclo claro-escuro de 12 horas (luz de 6:00-18:00) recebendo ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados com os animais anestesiados durante a fase clara ou a fase escura, indistintamente.

Os procedimentos descritos abaixo, bem como o número de animais utilizados, foram previamente autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto

Internacional de Neurociências de Natal, através do parecer favorável N° 04/2009, emitido no dia 28 de setembro de 2009.



Figura 3. Rato Long-Evans adulto em uma gaiola padrão.

Cirurgia para implante de microeletrodos corticais

Cada animal foi submetido à cirurgia estereotáxica para o implante permanente de duas matrizes de microeletrodos (Figura 4). Os implantes foram realizados utilizando-se o protocolo anexado no final da dissertação (Anexo A).



Figura 4. Rato Long-Evans com os implantes neurais indicados por setas vermelhas.

A área ocupada pelos microeletrodos de cada matriz é de aproximadamente 2,0mm x 4,0mm. As matrizes foram implantadas segundo as coordenadas estereotáticas das regiões corticais primárias tátil e visual de acordo com o Atlas Neuroanatômico do Rato Paxinos e Watson 6^a ed. (2007). Os centros das matrizes, a partir de Bregma, são: **Córtex Somatossensorial Primário (S1)**: AP: 1,5; ML: 5,0; DV: 1,5 e **Córtex Visual Primário (V1)**: AP: 7,3; ML: 4,0; DV: 1,4 (Figura 5). Todos os implantes foram feitos no hemisfério esquerdo. As matrizes foram projetadas para amostrar a maior área possível de córtex sensorial primário, o que resultou em um posicionamento indesejado de alguns microeletrodos da matriz V1 na região V2. Por este motivo, desconsideramos todos os dados coletados na fileira mais lateral da matriz de V1.

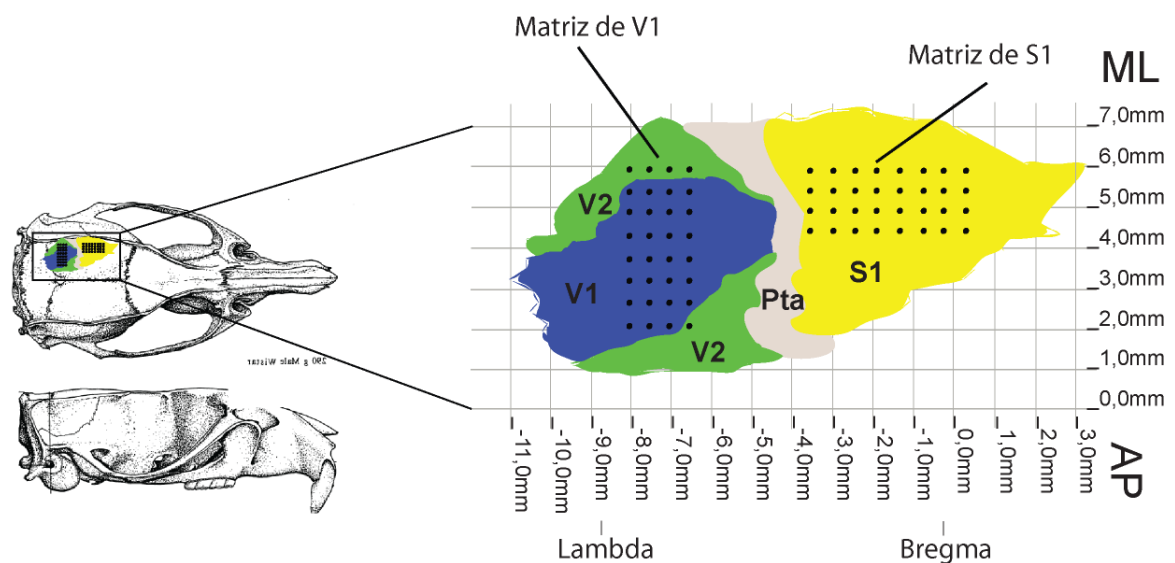


Figura 5. Coordenadas estereotáticas indicando o posicionamento esperado dos microeletrodos corticais. AP – Eixo ântero-posterior; ML – Eixo medial-lateral; Pta – Área associativa parietal; S1: Córtex somatossensório primário; V1: Córtex visual primário; V2: Córtex visual secundário. Ilustração do crânio de rato adulto retirada de Paxinos e Watson (2007).

Os animais receberam pelo menos uma semana de repouso pós-operatório antes do início dos registros eletrofisiológicos, sendo observados e pesados para assegurar a sua recuperação. Todas as cirurgias foram realizadas pelo autor, contando com o auxílio de Diego Laplagne em duas cirurgias e de Hindiael Belchior em outras três.

Matrizes de microeletrodos

As matrizes de microeletrodos foram compostas por 32 fios de 50 micrômetros de diâmetro feitos de tungstênio insulado por Teflon®, acoplados a um conector Omnetics®. Os microeletrodos foram dispostos em quatro fileiras de oito eletrodos com espaçamento de 500 micrômetros entre si (Figura 6). Apenas a ponta de cada microeletrodo não era coberta por Teflon, de modo a estabelecer contato elétrico com o tecido implantado, com impedância $>0,5\text{M}\Omega$ a 1kHz. Antes do posicionamento dos microeletrodos corticais, um fio de prata para aterramento da matriz foi soldado entre o conector e um parafuso cirúrgico posicionado sobre o hemisfério direito, de forma a estabelecer contato elétrico com o líquido encéfalo-raquidiano.

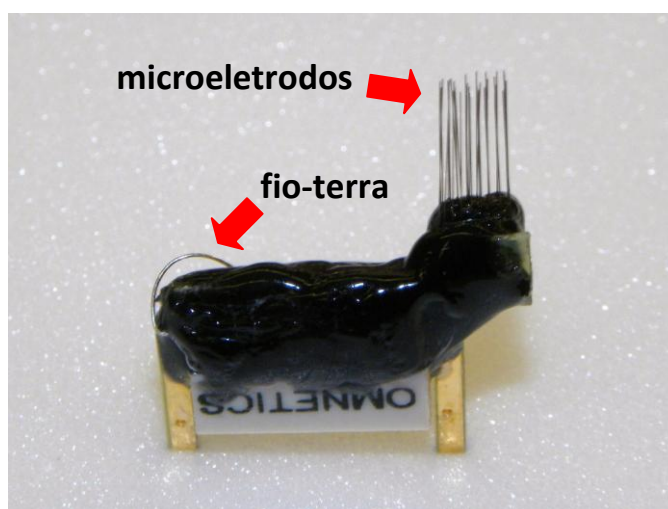


Figura 6. Matriz padrão utilizada nos experimentos.

Todas as matrizes de microeletrodos foram manufaturadas no Laboratório de Neuroengenharia do IINN/ELS por Gilvan Filho.

Aquisição de dados eletrofisiológicos

Para a aquisição, a discriminação e o armazenamento do sinal neural utilizamos um sistema de Aquisição de Sinal Multineuronal (MAP, Plexon Inc.) de 64 canais. Utilizando esta ferramenta podemos registrar até quatro neurônios individuais em cada eletrodo (Nicoletis 1997).

Para a obtenção dos potenciais de ação dos neurônios individuais, os sinais de cada microeletrodo são amplificados e submetidos a um filtro passa-alta (0.15 – 8.8 KHz) e coletados a 40 KHz, permitindo que as formas de onda dos potenciais de ação sejam reconstituídas.

A classificação dos neurônios foi feita manualmente em tempo real utilizando o programa SortClient (Plexon, Inc.), um osciloscópio digital TDS 2002B (Tektronix) e um monitor de áudio AM10 (Astro-Med, Inc.) antes do início de cada experimento com o animal acordado. O potencial de ação de neurônios individuais produz variações elétricas estereotipadas e razoavelmente estacionárias, o que possibilita a discriminação de células individuais com bastante confiabilidade (Figura 7).

Os parâmetros utilizados para classificar sinais neurais extracelulares como potenciais de ação foram: limiar de voltagem da aquisição, relação sinal-ruído >2 aferida por observação direta no osciloscópio, distribuição de intervalos entre potenciais de ação, estereotipia das formas de onda, período refratário do potencial de ação >1ms e análise de componentes principais fornecida pelo programa SortClient.

Todas as coletas foram conduzidas pelo autor com a colaboração regular de Regielly Moreno, Diego Laplagne e Hindiael Belchior.

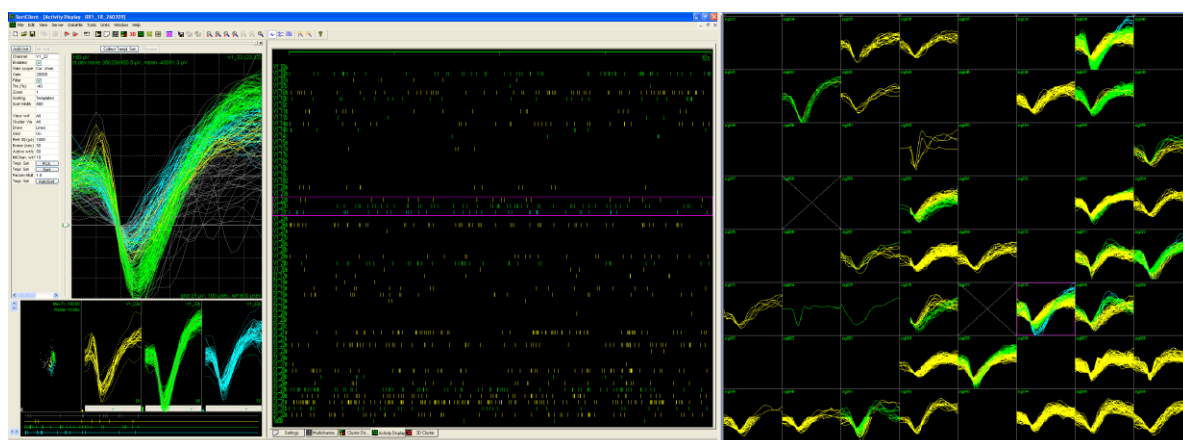


Figura 7. Interface do programa SortClient da Plexon. À direita estão as formas de onda dos neurônios individuais registrados pelos 64 canais, no meio os *trens de disparo* de cada neurônio classificado, e à esquerda uma ampliação de um canal exibindo três neurônios classificados com cores distintas.

Anestésicos utilizados

Os animais receberam anestesia gasosa de isoflurano na concentração de 5% misturado com oxigênio até que o animal perdesse a consciência, e depois de 1,5-2,5% para manter a sedação durante a injeção de profiláticos e dos anestésicos sistêmicos. Foram administrados sulfato de atropina na dose sub-cutânea de 0,04 mg/Kg como medida profilática contra a diminuição do batimento cardíaco e de salivagem excessiva, cloridrato de cetamina na dose intra-muscular de 100,0 mg/kg e cloridrato de xilazina na dose intra-muscular de 8,0 mg/kg.

Estimulação visual sob anestesia

Os estímulos visuais foram gerados por um LED (do inglês, diodo emissor de luz) branco de alto brilho (~1500cd) posicionado a três centímetros do olho direito do

animal. A utilização de LEDs é ideal para protocolos como este por emitir uma luz de brilho constante e por dissipar quantias insignificantes de calor. Utilizamos uma alta intensidade luminosa para obter uma ativação homogênea de todos os fotorreceptores da retina. Optamos pela cor branca para evitar a ativação diferencial de fotorreceptores que respondam à cromaticidade. O momento exato em que o pulso de luz é emitido foi marcado por um sinal digital enviado ao sistema MAP simultaneamente com o acendimento do LED. Os pulsos de luz foram controlados por um circuito integrado e ajustados de maneira analógica para frequências de 0,5Hz, com ciclo de trabalho de 10-45%, conforme será abordado na seção de Resultados.

Os registros eletrofisiológicos iniciaram-se 20-30 minutos após a aplicação da anestesia e prosseguiram até que o animal acordasse. O período total de cada sessão variou entre duas e quatro horas, de acordo com a sensibilidade dos animais à anestesia. Após cada registro o animal era desconectado do sistema MAP e devolvido ao biotério.

Em um único rato obteve-se registros de boa qualidade com o protocolo de estimulação visual alternado com o de estimulação tátil (Animal 01). Para todos os outros animais realizamos apenas estimulação visual ou tátil em cada sessão de registro, com pelo menos um dia de repouso para o animal entre duas sessões.

Alguns neurônios apresentaram artefatos de técnica identificados como um súbito aumento na contagem de disparos neurais precisamente no início ou no final da estimulação visual (Figura 8). Verificou-se que esse artefato era causado por uma descarga elétrica induzida pelo estimulador visual que ocasionalmente era identificada pelo software SortClient da Plexon como sendo um disparo neuronal.

Para evitarmos este artefato submetemos todos os dados de estimulação visual a um filtro gerado no NeuroExplorer® (versão 4.042) que elimina todos os disparos registrados entre um milissegundo antes e cinco milissegundos depois do início, e cinco milissegundos antes e depois do término de cada estimulação.

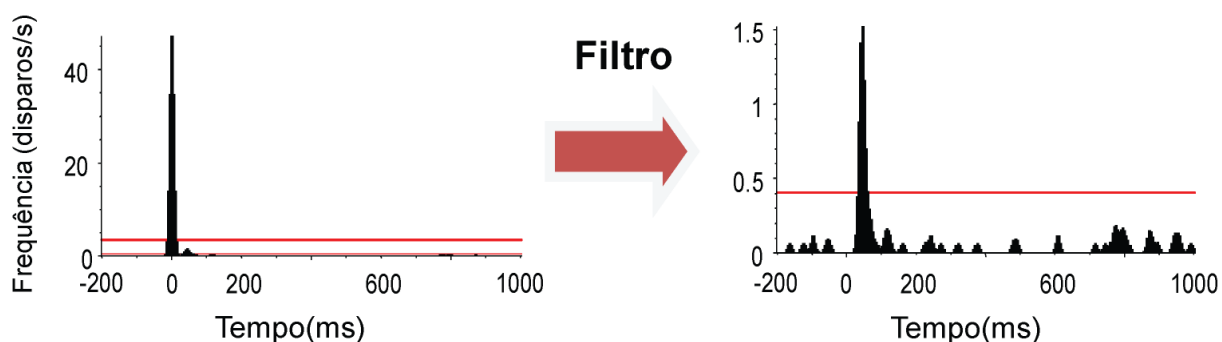


Figura 8. Histograma de atividade neural (HDPE, conforme exposto na próxima seção) contaminado com artefato de técnica de estimulação visual. À esquerda está o HDPE antes do filtro, e à direita o HDPE após o filtro. A linha vermelha indica uma variação significativa.

Estimulação tátil sob anestesia

Foram utilizados dois equipamentos diferentes para estimular as vibrissas do lado direito do rato. O primeiro equipamento utilizado (Estimulador Tátil A) consiste de uma palheta de resina ligada à bandeja de um leitor de DVD, sendo o rato anestesiado posicionado sobre a parte fixa do leitor.

Enquanto a bandeja encontrava-se aberta a palheta estava afastada das vibrissas do rato, e com o fechamento da bandeja a palheta se movia na direção das vibrissas. Um sensor óptico se movia juntamente com a palheta, e era acionado no instante em que a palheta atingia a primeira fileira de vibrissas. Na teoria, este sensor marcaria com grande precisão o início da estimulação tátil. Entretanto, a vibração decorrente do movimento da bandeja ao abrir-se ou fechar-se era suficiente

para estimular as vibrissas, o que gerou um fator de confusão para a interpretação do momento exato em que o estímulo tátil era aplicado.

O segundo estimulador (Estimulador Tátil B) foi projetado para evitar os problemas de trepidação do Estimulador Tátil A, e consistia de um mecanismo mais simples formado por uma palheta ligada a um galvanômetro de bobina móvel alimentado por um gerador de ondas. Neste aparato a palheta inicialmente estava encostada nas vibrissas mais anteriores. Com o movimento da palheta as vibrissas eram deflexionadas e um pulso digital simultaneamente era enviado ao sistema MAP, marcando com precisão o início do estímulo.

A força aplicada por ambos os estimuladores era o bastante para deflexionar todas as grandes vibrissas do lado direito do rato, e mantê-las pressionadas até o fim do período de estimulação. Os parâmetros temporais da estimulação tátil foram ajustados de maneira analógica para frequência de 0,5Hz, com ciclos de trabalho variados, conforme será abordado na seção de Resultados.

Os três estimuladores (o visual e os dois táteis) foram desenvolvidos e construídos por Regielly Moreno.

Análise de sinal eletrofisiológico

- Trem de Disparos

A análise dos registros de sinal eletrofisiológico foi feita utilizando-se o programa Neuroexplorer 4.0. O programa trata os potenciais de ação de cada neurônio ao longo do tempo como um Trem de Disparos, que é uma matriz de uma linha e n colunas, formando uma representação temporal digitalizada da atividade de cada neurônio. Cada coluna indica o número de disparos registrados para cada

neurônio no intervalo $t \rightarrow t+x$, com x sendo a duração arbitrária de cada intervalo. Neste experimento foram utilizados intervalos de 5 milissegundos em todas as análises (Figura 9).

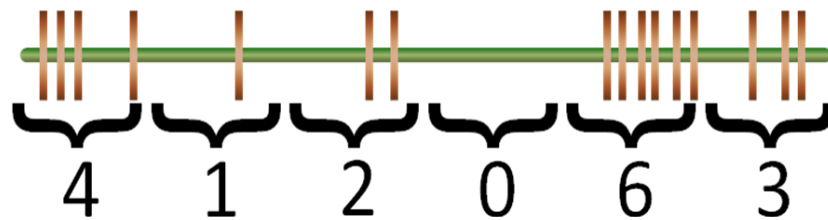


Figura 9. Trem de Disparos de um neurônio fictício com intervalos regulares gerando a matriz $\alpha=\{4,1,2,0,6,3\}$. O tempo é indicado pela linha verde e cada traço vertical indica um disparo de potencial de ação.

- *Histogramas de Disparo Perievento (HDPEs)*

A partir do Trem de Disparos de cada neurônio foram gerados Histogramas de Disparos Perievento (HDPEs) que utilizam os sinais digitais enviados pelos estimuladores como marcadores para o início da estimulação sensorial (sempre indicados como tempo 0). O HDPE analisa quantitativamente a variação da atividade de cada neurônio antes e depois da estimulação sensorial, permitindo inferências estatísticas a partir dos resultados. Caso haja diferença significativa entre a atividade neuronal antes e depois da estimulação, o neurônio é considerado responsivo ao estímulo sensorial aplicado.

- *Limites de Confiança do HDPE*

O método empregado para aferir essa variação foi o dos Limites de Confiança do HDPE, que compara a taxa de disparos por intervalo (total de disparos

contabilizados a cada 5 milissegundos) com a média de disparos dos intervalos anteriores ao estímulo da seguinte forma:

Assume-se que a taxa de disparos de cada neurônio registrado terá uma distribuição Poisson, e calcula-se a média M de disparos antes do início da estimulação, o que serve como aferência para a taxa de disparos basal de cada neurônio. A seguir calcula-se a probabilidade P de um neurônio disparar dentro de cada intervalo (que dura 5ms) corresponde a $P=M*0,005s$. Como cada animal é estimulado n vezes ao longo de cada sessão, a probabilidade de disparo esperada em qualquer intervalo ao longo de n estimulações é computada como C , em função de $P*n$, assumindo-se que C também tem distribuição de Poisson. A partir daí calcula-se o Limite de Confiança de 99% mínimo e máximo aplicando um teste Z , que para um α de 0,01 equivale a um parâmetro $Z_{\alpha/2}$ de 2,58 da seguinte forma:

N = duração da sessão dividida em intervalos de 5ms;

$di[x]$, $x=1, \dots, N$. = contagem de disparos em cada intervalo de 5ms;

M = Média de todos $di[x]$ antes do início da estimulação;

$P=M*0,005s$ (probabilidade de disparo em um dado intervalo);

$C=P*n$ (probabilidade P ao longo de n estimulações);

Limite de Confiança Mínimo = $C - 2.58*raiz\ quadrada(C)$;

Limite de Confiança Máximo = $C + 2.58*raiz\ quadrada(C)$.

Graficamente, os Limites de Confiança do HDPE são representados por duas linhas vermelhas: uma para o Limite de Confiança Máximo e outra para o Limite de Confiança Mínimo, sendo esta última geralmente oculta pela taxa de atividade basal de cada neurônio. Neurônios que apresentem algum $di[x]$ que ultrapasse os Limites

de Confiança Máximo ou Mínimo atendem ao critério dos Limites de Confiança do HDPE.

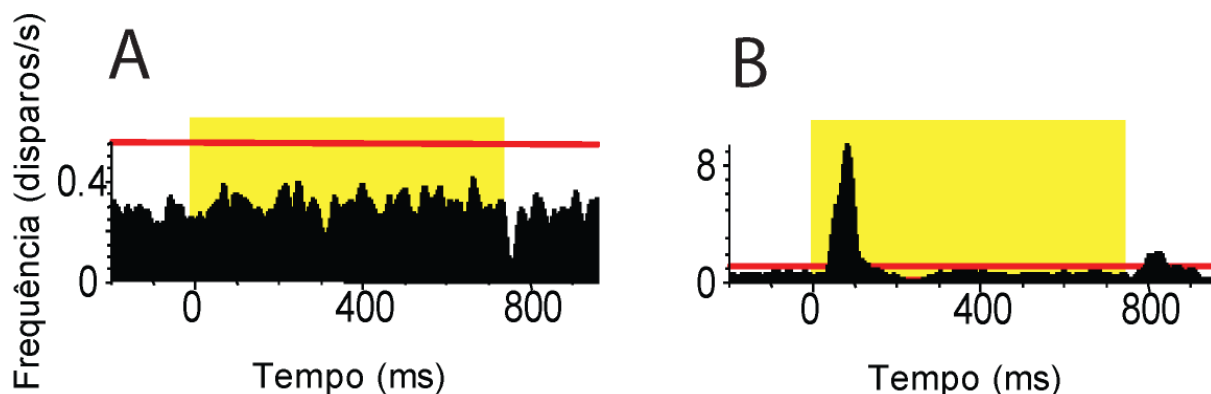


Figura 10. HDPEs de dois neurônios sob estimulação visual, um não responsivo (A), e outro responsivo (B). O período de estimulação é indicado pelo retângulo amarelo e os Limites de Confiança do HDPE pela linha vermelha. O Limite de Confiança Mínimo não é visível em A, mas é visível em B.

- *Definição de neurônios responsivos*

Os neurônios que satisfizeram o critério do Limite de Confiança do HDPE foram considerados neurônios responsivos. A presença de neurônios responsivos foi averiguada pela análise individual dos HDPEs de cada neurônio registrado durante as sessões de estimulação de cada animal (Figura 10).

Antes de iniciarmos as análises, descartamos todos os neurônios que apresentaram menos de 1000 disparos ao longo da sessão. Este valor fixo de 1000 disparos foi escolhido devido às limitações estatísticas do teste utilizado, sendo que esses neurônios apresentavam quantidade insuficiente de disparos/intervalo para atingir o critério de responsividade delineados acima. Foram descartados 68 neurônios, que correspondem a 13% de todos os neurônios amostrados.

A janela de tempo utilizada para todas as análises estendeu-se 200 milissegundos antes do início do estímulo até 200 milissegundos após o término do

estímulo. Os estímulos tiveram duração variada entre 0,48 e 1,10 segundos. A janela temporal empregada permite uma ampla amostragem da taxa basal de disparos de cada neurônio antes do início da estimulação, bem como após o término dessa.

- *Pós-processamento dos HDPEs*

Para melhorar a visibilidade dos HDPEs foi utilizado um filtro gaussiano de suavização dos histogramas, aplicado a cada três intervalos de amostragem. Esse filtro foi aplicado após a análise de responsividade e, portanto, não interferiu nos resultados, alterando apenas suas representações gráficas.

Eutanásia e craniotomia

Findada a coleta de dados, cada animal foi anestesiado com isoflurano 5% e rapidamente decapitado. Procedeu-se, então, com a craniotomia a fresco para a remoção dos encéfalos, tomando cuidado para evitar que a matriz implantada danificasse o tecido durante a sua remoção.

Cada encéfalo foi emblocado e crioprotelado em meio de inclusão TissueTek®, congelado imediatamente em uma mistura de gelo seco moído e álcool absoluto, e conservado em refrigerador -80°C para posterior processamento histológico.

Histologia

Uma vez congelados, os encéfalos dos animais foram cortados em secções coronais de 30 micrômetros de espessura utilizando-se um criostato. Após montagem a seco sobre lâminas previamente gelatinizadas, as secções foram

fixadas por paraformaldeído 4% e coradas por citocromo-oxidase, visualizadas e fotografadas em um microscópio óptico para verificar o posicionamento da ponta dos microeletrodos.

A escolha dessas técnicas e todo o processamento histológico foi realizado por Sidarta Ribeiro e por Marco Freire.

Resposta cortical ao longo do eixo ântero-posterior

Para fornecer uma dimensão espacial dos dados registrados sob cada modalidade de estimulação sensorial, construiu-se um gráfico da responsividade neural ao longo do eixo ântero-posterior. Neste gráfico, apresentado ao final da seção de Resultados (Figura 16), estão representadas as taxas de neurônios responsivos registrados em cada coluna de eletrodos equidistantes de Bregma. O resultado de cada coluna equidistante de Bregma para cada modalidade de estimulação é representada como um ponto. O erro padrão da média foi calculado para cada ponto com base na menor amostragem utilizada (12 eletrodos).

Latência temporal das respostas corticais à estimulação visual e tátil

Para comparar a latência da resposta neural entre V1 e S1, tanto sob estimulação visual quanto sob estimulação tátil, utilizou-se o teste não-paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon ($p=0,05$). Convencionou-se que o período de latência da resposta neural é igual ao intervalo de tempo entre o início do estímulo (tempo 0) e o momento em que a taxa de disparos de cada neurônio ultrapassa o Limite de Confiança Máximo. Os períodos de latência de cada neurônio foram aferidos individualmente analisando-se os HDPEs, com precisão de 5ms, e posteriormente agrupados em quatro conjuntos distintos: latência dos neurônios de V1 sob

estimulação visual, latência dos neurônios de S1 sob estimulação visual, latência dos neurônios de V1 sob estimulação tátil e latência dos neurônios de S1 sob estimulação tátil.

Para a análise de latência neural sob estimulação tátil só foram utilizados os períodos de latência do animal 18, devido aos problemas com o Estimulador Tátil A descritos anteriormente.

RESULTADOS

Estimulação visual sob anestesia

Foram utilizados quatro animais nesta etapa do experimento. A duração do registro eletrofisiológico de cada animal variou em função da estabilidade da aquisição de dados e da resposta individual aos anestésicos. O período mínimo de registro foi de ~45 minutos e o máximo foi de ~190 minutos.

O número e os parâmetros temporais das estimulações visuais às quais cada animal foi submetido são apresentados na Tabela 1. Em um único animal (Animal 01) a estimulação visual foi alternada com a estimulação tátil. Neste caso os trechos de estimulação visual foram agrupados e tratados como um trecho contínuo, assim como foi feito para os trechos de estimulação tátil.

Tabela 1. Quantidade e propriedades dos estímulos visuais aplicados a cada animal.

Animal	Nº de estimulações visuais	Frequência de estimulação	Duração do estímulo
01	1291	0,5Hz	1,110s
02	5815	0,5Hz	0,750s
03	1666	0,5Hz	0,480s
04	4545	0,5Hz	0,490s

Agrupando os neurônios registrados nos quatro animais submetidos a este protocolo de estimulação, foram registrados 104 neurônios em V1 e 143 neurônios em S1. A quantidade de neurônios registrados em cada animal é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Neurônios registrados em cada animal no protocolo de estimulação visual.

Animal	Neurônios de V1 sob estimulação visual	Neurônios de S1 sob estimulação visual
01	31	66
02	37	29
03	15	27
04	21	21
Total	104	143

Estimulação tátil

Foram utilizados três animais para esta etapa do experimento. A duração do registro eletrofisiológico de cada animal também variou em função da estabilidade da aquisição de dados e da resposta individual aos anestésicos. Um trecho de pelo menos 25 minutos de registro eletrofisiológico estável de cada animal foi selecionado para análise.

A estimulação tátil foi alternada com a estimulação visual em um único animal (Animal 01). Neste caso os trechos de estimulação tátil foram agrupados e tratados como um trecho contínuo. A quantidade de estímulos aplicados em cada animal encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Quantidade e propriedade dos estímulos táteis aplicados a cada animal.

Animal	Nº de estimulações táteis	Frequência de estimulação	Duração do estímulo
01	1878	0,5Hz	1,110s
05	753	0,5Hz	0,750s
06	998	0,5Hz	0,940s

Os dois primeiros animais (Animais 01 e 05) foram estimulados pelo Estimulador Tátil A. Conforme explicitado em Materiais e Métodos, este aparelho criou um viés no registro de dados que comprometeu a classificação da responsividade dos neurônios. A incerteza sobre o momento exato da estimulação tátil aplicada por este aparelho torna a transição de intervalos pré-estímulo para intervalos pós-estímulo imprecisa, interferindo nas análises dos dados destes animais, pois o método estatístico utilizado compara a frequência de disparos dos intervalos pré-estímulo com a frequência de disparos dos intervalos pós-estímulo.

Fortuitamente, ao verificar as implicações desse entrave técnico na classificação de neurônios responsivos, foi constatado haver somente um aumento no número de falsos negativos, mas não de falsos positivos. Como o foco deste trabalho é a investigação de células responsivas, julgamos o viés de encontrar menos células responsivas do que se encontraria em um registro ideal como aceitável, e que isso não prejudica a validade de nossos dados. Em outras palavras, talvez houvesse mais neurônios responsivos do que os que foram identificados quando o Estimulador A foi utilizado.

O Estimulador Tátil B forneceu a precisão necessária para os experimentos, e o Animal 06 apresentou quantidades de neurônios responsivos semelhantes às encontradas nos Animais 01 e 05. Esta convergência de resultados reforça a confiabilidade dos resultados obtidos nos registros realizados com o Estimulador Tátil A, apesar dos problemas encontrados.

Não houve variação significativa entre os resultados encontrados nos três animais, portanto os dados foram agrupados da mesma maneira que os dados de estimulação visual. Durante a estimulação tátil foram registrados 136 neurônios em S1 e 61 neurônios em V1, conforme indica a Tabela 4.

Tabela 4. Neurônios registrados em cada animal no protocolo de estimulação tátil.

Animal	Neurônios no S1 sob estimulação tátil	Neurônios no V1 sob estimulação tátil
01	66	31
05	46	2
06	24	28
Total	136	61

Neurônios isomodais

Os neurônios de V1 sob estimulação visual, assim como os neurônios de S1 sob estimulação tátil, que foram classificados como responsivos atendem às características tradicionais de um neurônio sensorio cortical por apresentarem um perfil eletrofisiológico modalidade-específico. Por este motivo, chamaremos estas células de **neurônios isomodais de V1** de **neurônios isomodais de S1**, respectivamente. Essa classificação está de acordo com as recomendações feitas por Stein et al. (2009) que visam a evitar problemas de definições ambíguas ao se estudar respostas neurais multimodais.

Neurônios isomodais de V1

Dentre as 104 unidades registradas em V1 durante a estimulação visual, 90 foram classificadas como neurônios isomodais, representando 87% dessa amostra. A Tabela 5 indica a quantidade dessas células encontrada em cada animal, assim como a porcentagem em relação ao total de neurônios registrados em V1.

Tabela 5. Quantidade e porcentagem de neurônios isomodais de V1 em cada animal.

Animal	Neurônios de V1 responsivos à estimulação visual	% de neurônios de V1 responsivos à estimulação visual
01	23	74%
02	31	84%
03	15	100%
04	21	78%
Total	90	87%

A Figura 11 mostra alguns exemplos típicos de neurônios isomodais de V1 e de neurônios em V1 não responsivos à estimulação visual.

Estimulação visual - córtex visual primário

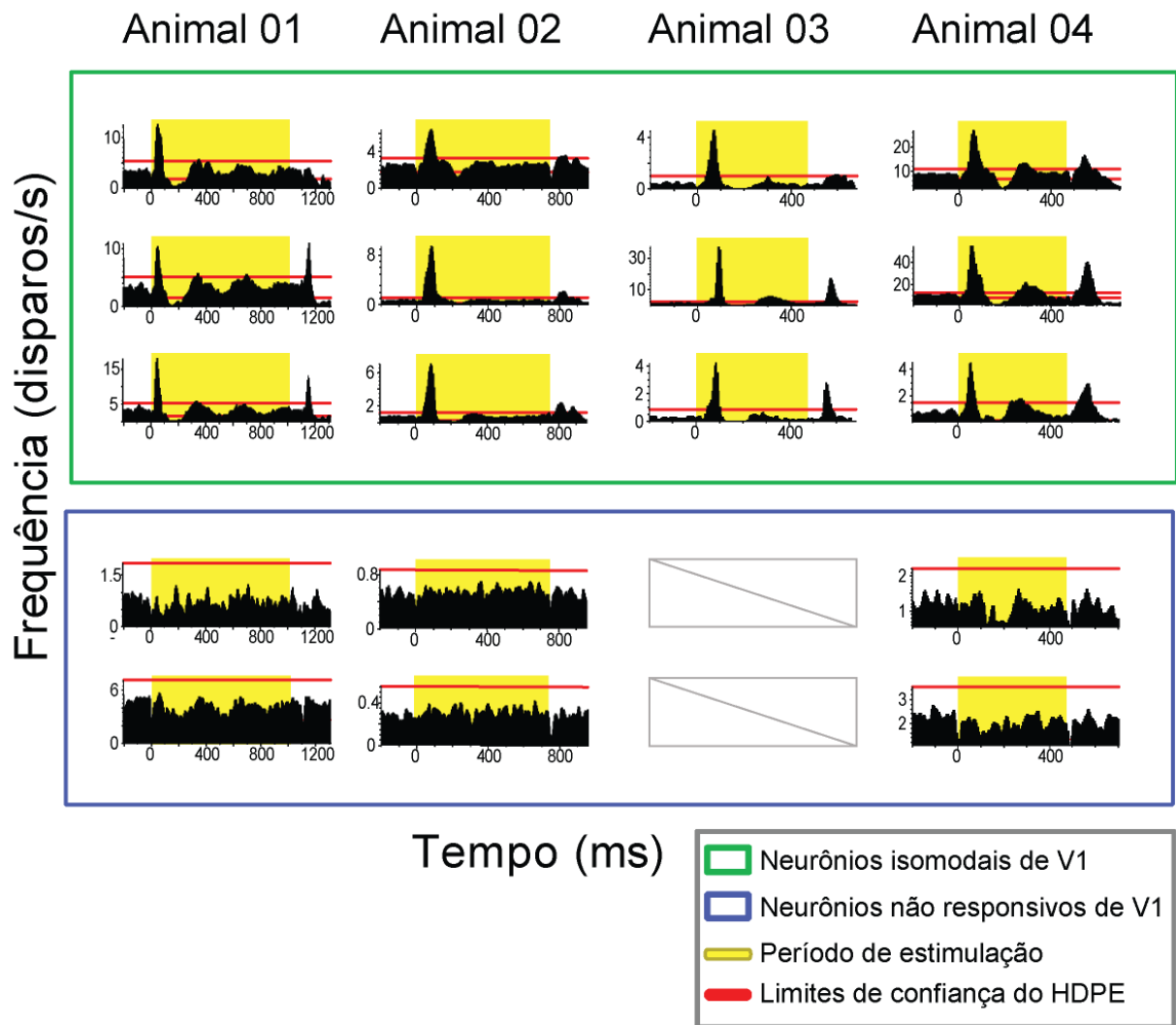


Figura 11. HDPEs típicos de neurônios isomodais de V1 e de neurônios em V1 não responsivos à estimulação visual. O animal 3 apresentou 100% de neurônios responsivos.

Neurônios isomodais de S1

De forma semelhante aos resultados obtidos com a estimulação visual, 82% das 136 unidades registradas em S1 foram classificadas como neurônios isomodais, totalizando 112 células. As quantidades individuais e a proporção de neurônios isomodais em relação ao total de neurônios registrados em S1 estão na Tabela 6.

Tabela 6. Quantidade e porcentagem de neurônios isomodais de S1 em cada animal.

Animal	Neurônios de S1 responsivos à estimulação tátil	% de neurônios de S1 responsivos à estimulação tátil
01	48	73%
05	42	90%
06	22	92%
Total	112	82%

A Figura 12 mostra alguns exemplos típicos de neurônios corticais táteis unimodais e de neurônios em S1 não responsivos à estimulação tátil.

Estimulação tátil - córtex somatossensorial primário

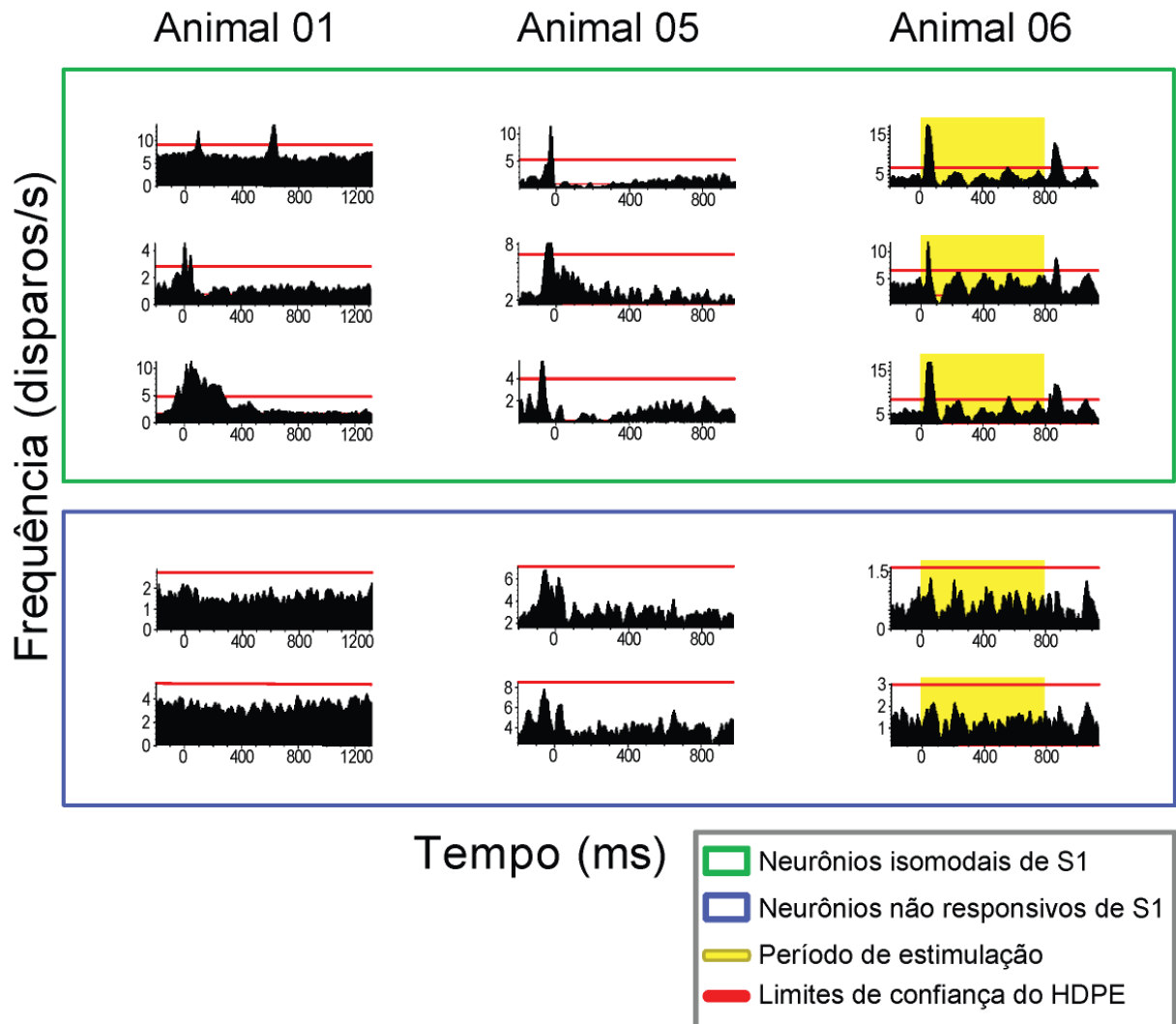


Figura 12. HDPEs típicos de neurônios isomodais de S1 e de neurônios em S1 não responsivos à estimulação tátil. O período de estimulação tátil só foi confirmado para o Animal 06.

Neurônios crossmodais

Diferente de um neurônio isomodal que responde a estímulos sensoriais de acordo com a separação tradicional dos córtices sensoriais, o termo neurônio crossmodal indica um neurônio que apresenta uma mudança significativa de sua taxa de disparos em resposta a estímulos de modalidades sensoriais não associadas tradicionalmente ao córtex investigado.

Neste trabalho, os neurônios de V1 que responderam a estímulos táteis serão chamadas de **neurônios crossmodais de V1**, e neurônios de S1 que responderam a estímulos visuais serão chamados de **neurônios crossmodais de S1**.

Neurônios crossmodais de S1

Dentre as 143 unidades registradas em S1 durante a estimulação visual, 31 foram classificadas como neurônios corticais táteis crossmodais, representando 22% dessa amostra. A Tabela 7 indica a quantidade de neurônios crossmodais de S1 encontrada em cada animal, assim como suas proporções relativas ao total de neurônios registrados nessa região.

Tabela 7. Quantidade e porcentagem de neurônios crossmodais de S1 em cada animal.

Animal	Neurônios de S1 responsivos à estimulação visual	% de neurônios de S1 responsivos à estimulação visual
01	9	14%
02	8	28%
03	5	19%
04	9	43%
Total	31	22%

A Figura 13 apresenta alguns exemplos típicos de neurônios de S1 responsivos e não responsivos à estimulação visual em cada animal.

Estimulação visual - córtex somatossensorial primário

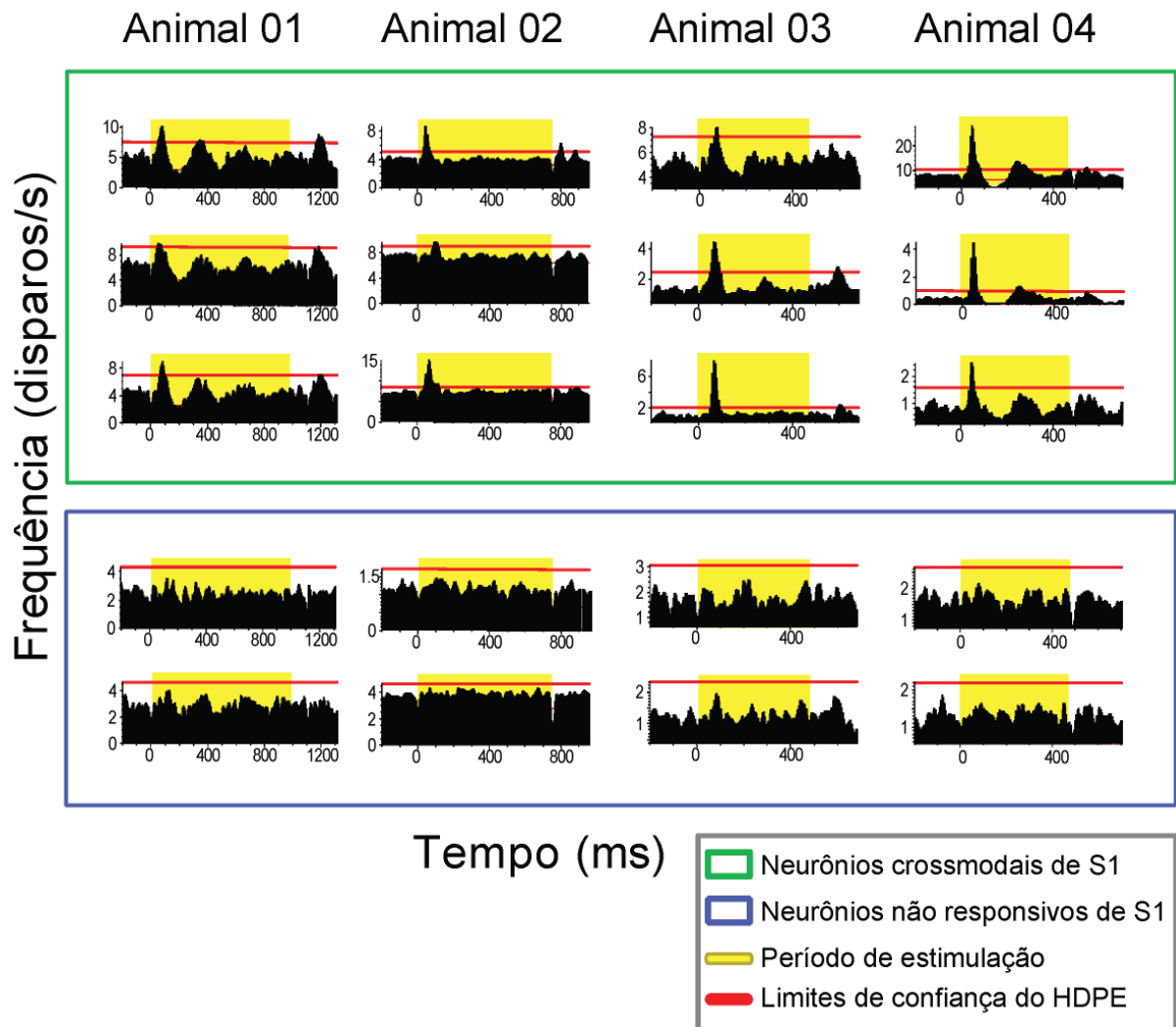


Figura 13. HDPEs típicos de neurônios crossmodais de S1 e de neurônios em S1 não responsivos à estimulação visual.

Neurônios crossmodais de V1

Das 61 células registradas em V1 durante a estimulação tátil, 14 foram classificadas como neurônios crossmodais de V1, representando 23% dessa amostra. A Tabela 8 indica a quantidade de neurônios crossmodais de V1

encontrada em cada animal e a porcentagem destes em relação ao total de neurônios registrados em V1.

Tabela 8. Quantidade e porcentagem de neurônios crossmodais de V1 em cada animal.

Animal	Neurônios de V1 responsivos à estimulação tátil	% de neurônios de V1 responsivos à estimulação tátil
01	7	26%
05	0	0%
06	7	25%
Total	14	23%

A Figura 14 apresenta alguns exemplos típicos de neurônios de V1 responsivos e não responsivos à estimulação tátil em cada animal.

Estimulação tátil - córtex visual primário

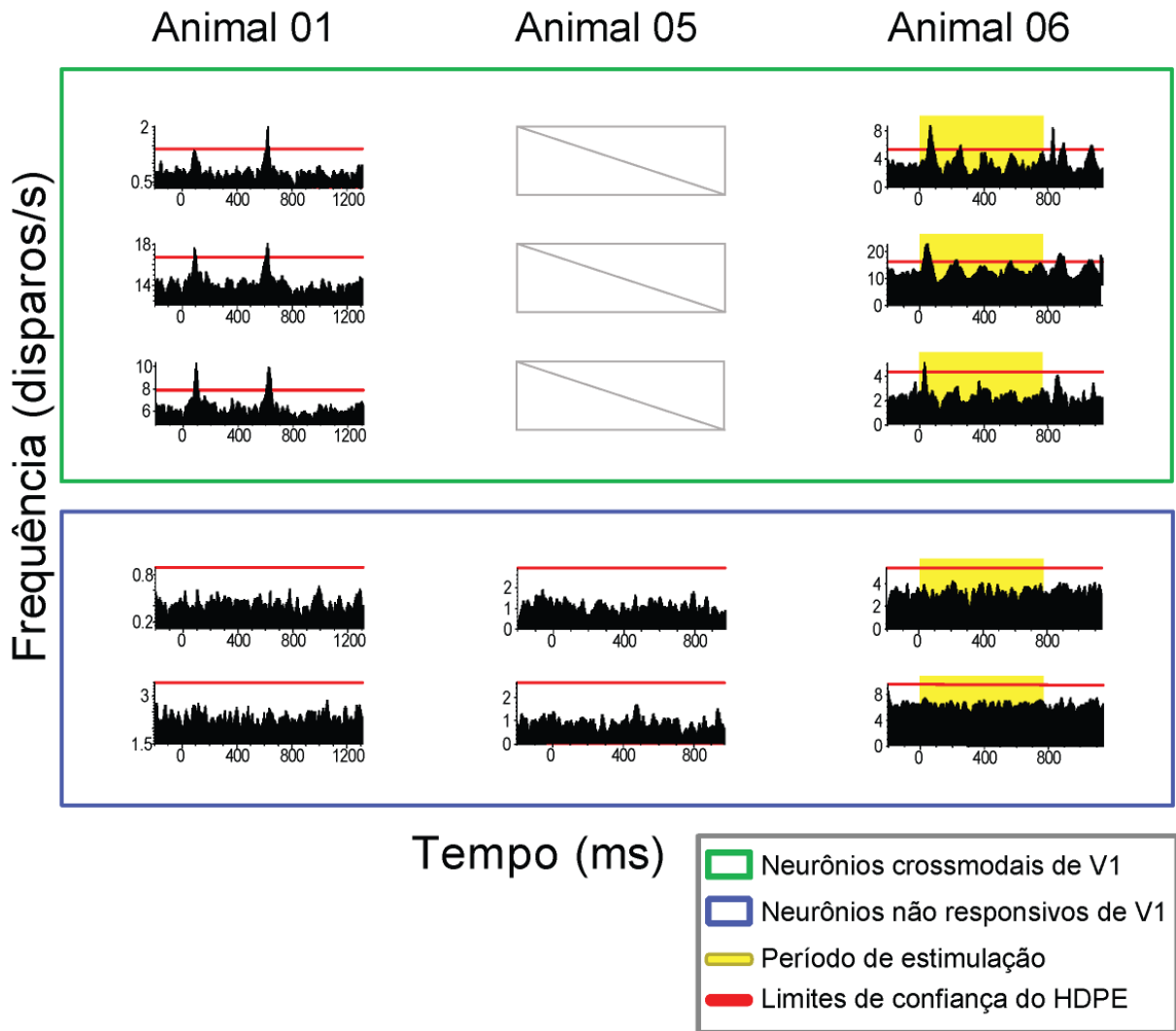


Figura 14. HDPEs típicos de neurônios corticais visuais crossmodais e de neurônios em V1 não responsivos à estimulação visual. O Animal 6 não apresentou qualquer neurônio crossmodal em V1.

O período de estimulação tátil só foi confirmado para o Animal 06.

Latência da resposta de neurônios unimodais e crossmodais

Os neurônios responsivos à estimulação visual apresentam um padrão de aumento fásico significativo na taxa de disparo entre 20 e 120 milissegundos após o estímulo, geralmente seguido de uma diminuição tônica significativa na taxa de disparos, uma flutuação durante o estímulo e um segundo aumento fásico

significativo na taxa de disparos pouco após o fim da estimulação visual. As diferentes durações do estímulo visual não parecem ter influenciado as propriedades de responsividade neural.

As latências de resposta dos neurônios de V1 e de S1 não se mostraram diferentes neste protocolo de estimulação, como pode ser observado na Figura 16.

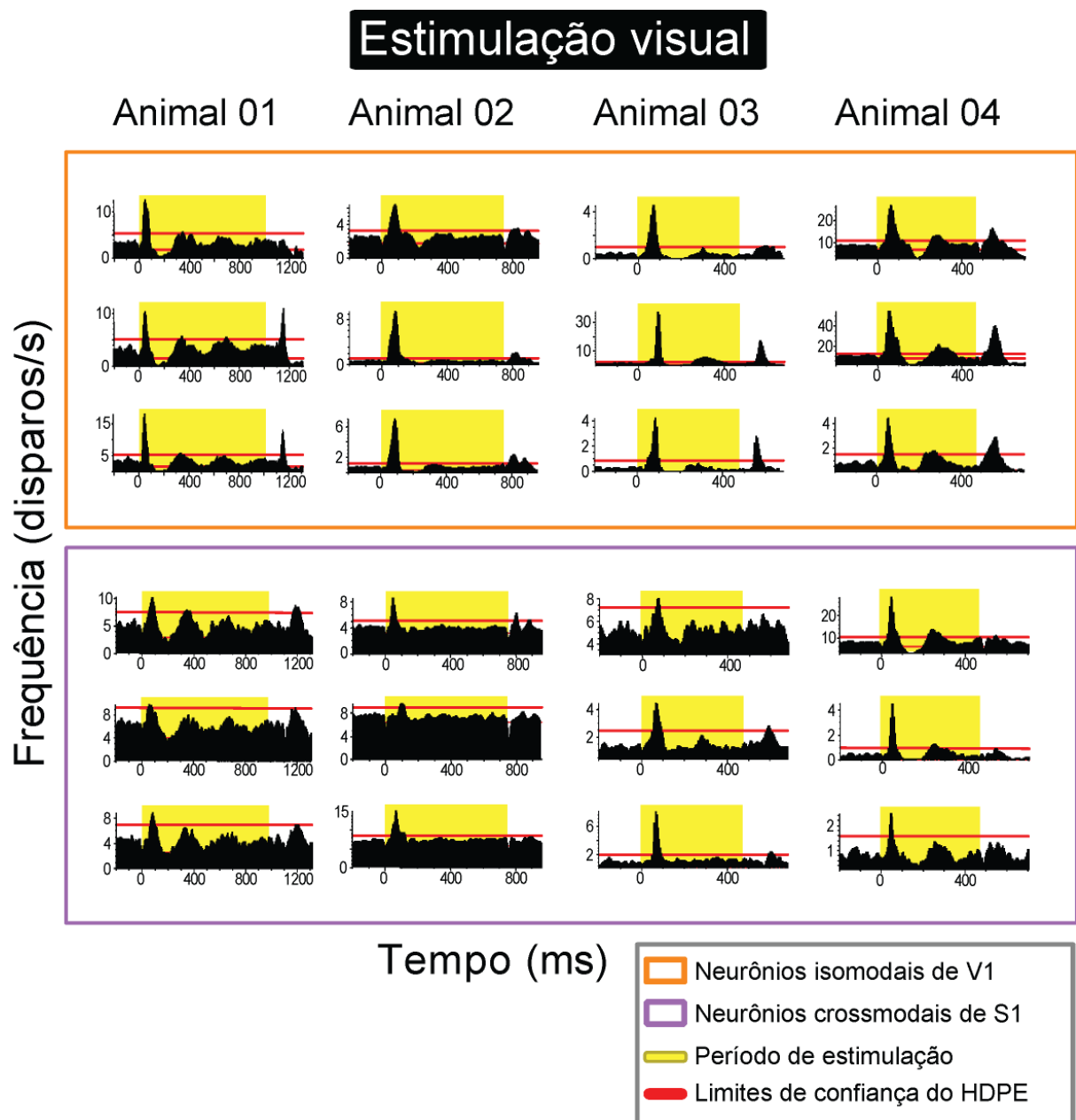


Figura 16. HDPEs de neurônios de V1 e de S1 responsivos à estimulação visual.

Na Figura 17 observa-se que, semelhante ao observado no protocolo de estimulação visual, os neurônios de V1 e de S1 registrados sob estimulação tátil apresentaram latências de resposta semelhantes entre si. No Animal 06 observa-se que a latência da resposta ocorre entre 20 e 100 milissegundos, da mesma forma que o observado nos animais sob estimulação visual.

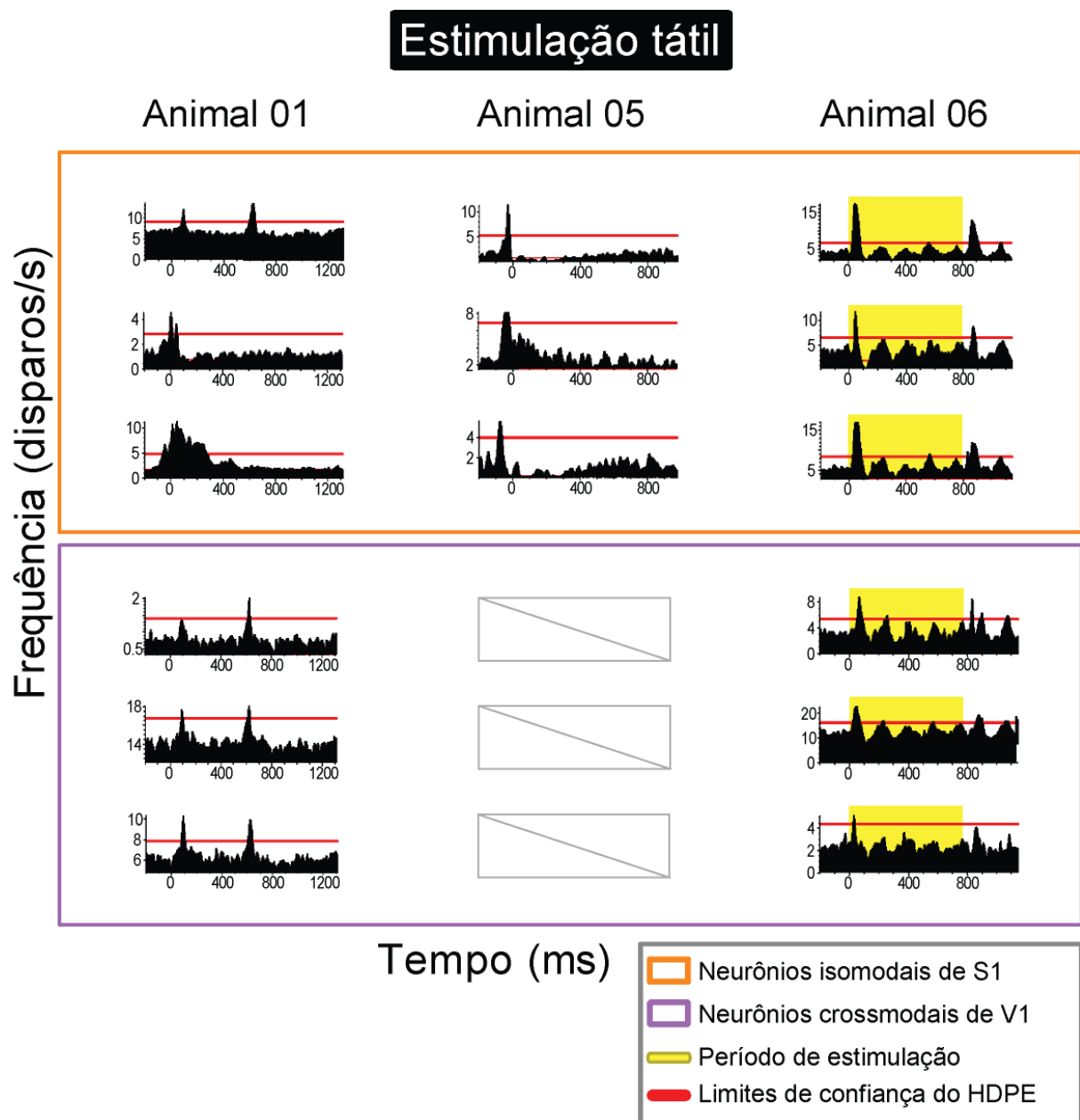


Figura 17. HDPEs de neurônios de V1 e de S1 responsivos à estimulação tátil.

Histologia

O posicionamento de cada matriz foi confirmado comparando-se o local das lesões teciduais causadas pelos microeletrodos às estruturas subcorticiais adjacentes, conforme indica a Figura 18. As análises histológicas confirmaram que as lesões causadas pelos microeletrodos estavam dentro das áreas sensoriais primárias visual e tátil, conforme o esperado segundo as coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson (2007).

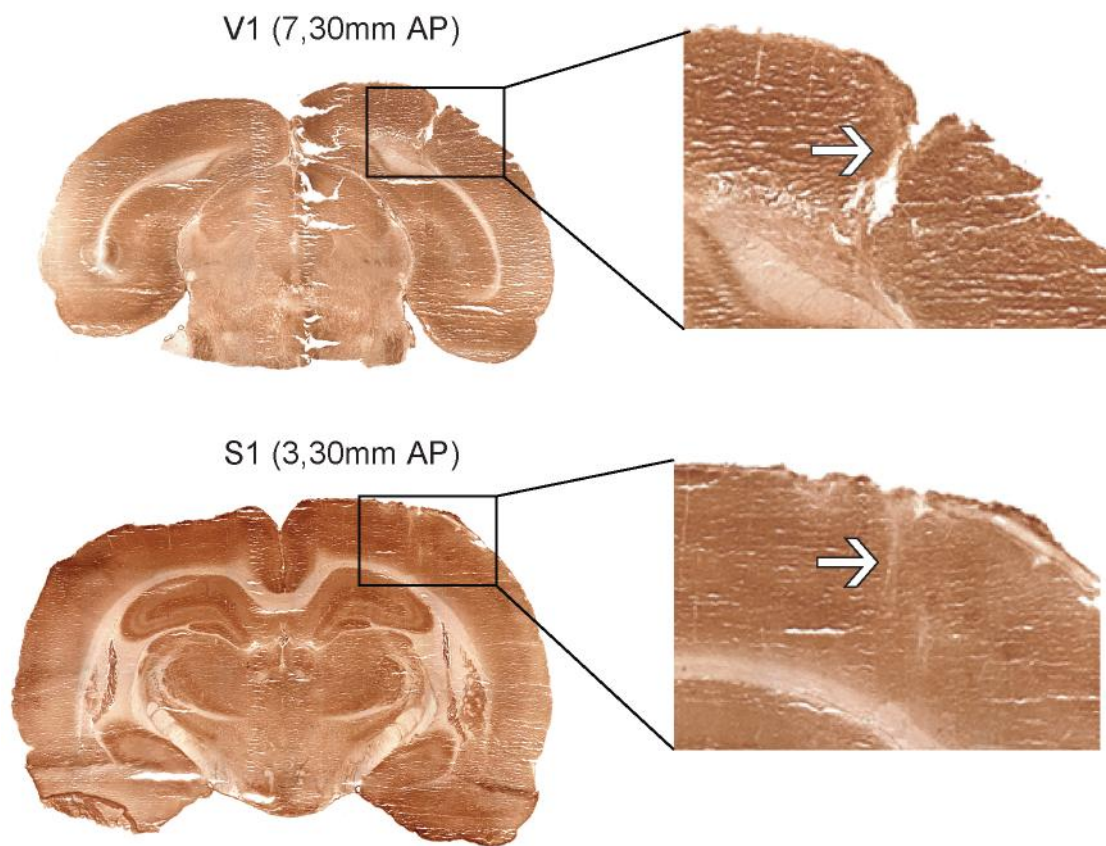


Figura 18. Histologia em secções coronais coradas por citocromo-oxidase identificando o posicionamento dos eletrodos implantados em V1 e em S1. Aumento de 5X à esquerda e 10X à direita.

Resposta cortical ao longo do eixo ântero-posterior

Para verificar se regiões corticais particulares dentro de cada área primária apresentaram resultados destoantes, verificamos a taxa de resposta em cada coluna de eletrodos equidistantes de Bregma (conforme indicado na Figura 5) para ambos os protocolos de estimulação, como mostra a Figura 19 abaixo. Os resultados indicam que a resposta neuronal ao longo do eixo ântero-posterior foi relativamente homogênea dentro de cada área primária, com duas exceções no protocolo de estimulação tátil (-7,5mm e -1mm).

A partir dessa análise pudemos concluir que a resposta crossmodal, assim como a isomodal, ocorre em algum grau através de todo o córtex primário registrado.

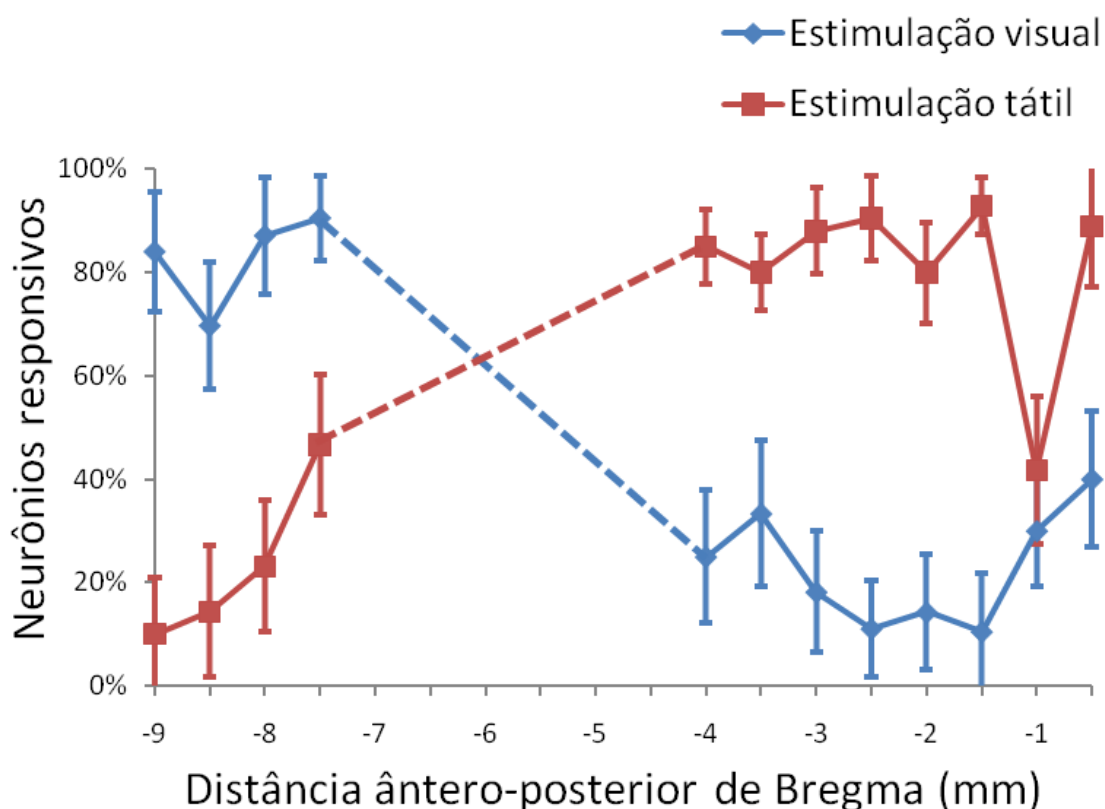


Figura 19. Resposta cortical ao longo do eixo ântero-posterior registrado pelas matrizes de V1 e S1. Média da taxa de responsividade de cada coluna de eletrodos \pm erro padrão da média.

Latência temporal das respostas corticais à estimulação visual e tátil

Não houve diferença significativa entre a latência das respostas corticais de S1 e V1 à estimulação visual (Figura 20), nem à estimulação tátil (Figura 21). Esse resultado indica que as respostas corticais de córtices primários de diferentes modalidades respondem com latências estatisticamente semelhantes tanto sob estimulação visual quanto sob estimulação tátil. Esse resultado sugere que a informação crossmodal, assim como a informação isomodal, percorre vias de tamanhos semelhantes para chegar a S1 e a V1, reforçando a idéia de que a informação sensorial é distribuída por todo o córtex sensorial antes mesmo de chegar às áreas corticais associativas

Latência da resposta neural a estímulos visuais

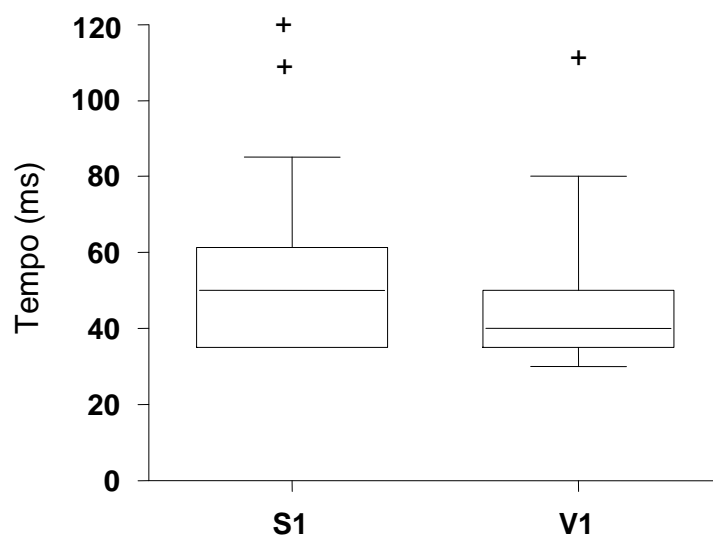


Figura 20. Latência da resposta neural de S1 e de V1 a estímulos visuais. $p > 0,05$. As respostas com latência > 100 ms foram consideradas como *outliers* e estão indicadas pelo símbolo +.

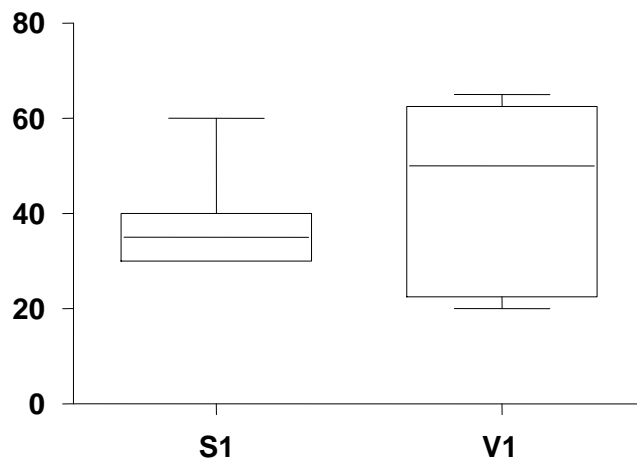


Figura 21. Latência da resposta neuronal de S1 e de V1 a estímulos táteis.

$p > 0,05$.

DISCUSSÃO

Em nossos registros encontramos 87% e 82% de neurônios corticais isomodais em V1 e S1. Nos mesmos registros também observamos 23% e 22% de neurônios corticais crossmodais em V1 e S1, respectivamente. A observação simultânea de células isomodais e crossmodais é um fator que dá grande credibilidade aos dados coletados, pois se houvesse algum disparate no método de coleta ou de classificação de neurônios responsivos, este seria prontamente identificável por uma taxa de neurônios isomodais que não correspondesse às descritas na literatura. Dessa forma, as altas taxas de neurônios isomodais encontradas servem como um controle de qualidade de nossos registros.

A partir dos dados obtidos podemos afirmar que tanto a estimulação visual quanto a estimulação tátil são suficientes para causar um aumento significativo na taxa de disparo de neurônios dos córtices sensoriais primários tátil e visual de ratos anestesiados. É um tanto surpreendente que ambos os estímulos tenham ativado populações tão numerosas de neurônios crossmodais, principalmente ao considerarmos que, historicamente, os córtices sensoriais primários têm sido tratados como unimodais, e apenas recentemente esta unimodalidade foi questionada.

O único trabalho encontrado na literatura que efetivamente quantificou uma resposta crossmodal em córtices sensoriais primários e secundários foi realizado por Wallace, Ramachandran e Stein em 2004, e também utilizou ratos da linhagem Long-Evans como modelo experimental. Nesse trabalho os autores encontraram taxas de neurônios isomodais semelhantes às nossas, totalizando 89,8% de neurônios “específicos às suas modalidades”, mas observaram uma taxa

substancialmente menor de células crossmodais, encontrando apenas 7,2% de neurônios crossmodais e 10% de neurônios multimodais, que respondiam a mais de uma modalidade de estimulação. Nossos dados replicam os obtidos por Wallace e colaboradores, com o acréscimo de serem baseados em registros de implantes crônicos, o que confere maior robustez aos nossos resultados e permitem uma análise mais segura sobre o tempo de latência das respostas neurais.

As latências de resposta de neurônios unimodais e crossmodais encontradas em nossos dados são semelhantes, indicando que ambas são evocadas após atravessarem vias neurais de tamanhos semelhantes. Essa observação descarta a possibilidade de que a atividade crossmodal seja causada por sinapses recorrentes de córtices associativos multimodais, e sugere a existência de sinapses tálamo-corticais crossmodais ou de sinapses córtico-corticais diretas entre os córtices primários.

As dificuldades técnicas encontradas com o registro da atividade neural sob estimulação tátil não impedem comparações entre a latência de resposta isomodal e crossmoda de S1 e V1. Apesar de termos o valor absoluto da latência de resposta dos neurônios de cada um desses córtices, a resposta em ambos ocorreu quase simultaneamente, o que indica o envolvimento de vias neurais com o mesmo número de sinapses carreando a informação para ambos os córtices.

A histologia confirmou que os eletrodos estavam posicionados dentro das áreas corticais primárias, e a análise topográfica da taxa de resposta ao longo do eixo ântero-posterior indicou que a crossmodalidade encontrada, assim como a isomodalidade, distribuem-se por toda a extensão dos córtices primários registrados.

A atividade isomodal de V1 em resposta à estimulação visual e a atividade de S1 em resposta aos estímulos táteis foram reportadas pela primeira vez há mais de

50 anos (Penfield e Boldrey 1937, Talbot e Marshall 1940), e não constituem qualquer novidade. A resposta neuronal de áreas corticais sensoriais primárias a estímulos de outras modalidades, entretanto, é um dado que merece maior atenção, apesar de tampouco ser uma novidade (Wallace et al. 2004).

Atividade multimodal e atividade crossmodal em córtices sensoriais

Contrariando o modelo tradicional de processamento unimodal nos córtices sensoriais, existem cada vez mais trabalhos experimentais demonstrando a convergência de múltiplas modalidades em todos os níveis de hierarquia cortical. Revisões recentes sobre esse novo panorama de processamento multimodal nos córtices sensoriais têm questionado se todo o neocórtex seria multimodal (Ghazanfar e Schroeder 2006), e qual seria o papel funcional da multimodalidade sobre o processamento sensorial de cada modalidade em particular (Driver e Noesselt 2008, Stein e Stanford 2008). Para dar as devidas proporções a essa onda de estudos de multimodalidade, uma edição especial da revista *Brain Research* foi dedicada ao assunto em 2008. Intitulada “Integração Multissensorial”, a edição contém 28 artigos reunindo revisões e trabalhos experimentais sobre as interações entre neurônios de diferentes modalidades sensoriais no córtex e em áreas subcorticais.

Interessantemente, parece haver uma dicotomia nesse campo de estudos, que iremos chamar de linha de pesquisa *multimodal* e linha de pesquisa *crossmodal*. Posto de forma direta, a primeira linha procura entender os mecanismos de integração sensorial que ocorrem em neurônios individuais, enquanto a segunda investiga o recrutamento cortical de áreas de diversas modalidades durante o processamento sensorial unimodal. A diferença é sutil, e provavelmente causada

pelas limitações das técnicas usadas por cada grupo de pesquisa, sendo a primeira baseada em estudos com animais não-humanos (Ghazanfar e Schroeder 2006, Driver e Noesselt 2008, Stein e Stanford 2008, Stein et al. 2009), enquanto a literatura crossmodal utiliza técnicas de imagem não invasivas, geralmente em humanos (Sadato et al. 1996, Sathian et al. 2005, Merabet et al. 2008).

A linha de pesquisa que chamamos de *multimodal* é fortemente influenciada pelos trabalhos pioneiros de Stein, Meredith e Wallace (Wallace et al. 1998) realizados no colículo superior de gatos, em que se observou células que respondiam a diferentes modalidades sensoriais. Segundo Stein e colaboradores (2009), a nomenclatura de neurônio multimodal aplica-se somente a neurônios que apresentam uma maior mudança na taxa de disparos em resposta a interações entre duas ou mais modalidades de estímulo do que à estimulação unimodal. Esta definição não é aplicável aos neurônios descritos em nosso trabalho, pois a simples estimulação com uma modalidade “trocada” foi suficiente para desencadear a variação na taxa de disparos de diferentes proporções de células corticais.

Já os estudos crossmodais iniciaram-se a partir de indícios de atividade em V1 de pessoas cegas durante a leitura Braille (Sadato et al. 1996), e investigam o recrutamento de diversas áreas corticais sensoriais supostamente não associadas às tarefas investigadas, mas que se comportam de maneira multimodal, como no caso da ativação de V1 em resposta à exploração tátil. A indicação de crossmodalidade em nosso trabalho não exclui a possibilidade de que esses neurônios também atuem de maneira unimodal ou multimodal, pois nossa abordagem experimental não permitiu que testássemos adequadamente se as mesmas células

responsivas a uma modalidade de estímulo seriam responsivas a outras modalidades de estímulo.

A peculiar ausência de dados crossmodais em animais

Os nossos resultados indicam que aproximadamente $\frac{1}{4}$ dos neurônios registrados são responsivos a estímulos de modalidades cruzadas para os córtices primários em que os implantes foram feitos. Considerando a densidade neuronal do neocórtex do rato para as regiões de S1 e de V2 (que usaremos como densidade aproximada para V1) de 69.400 neurônios/mm³ e 76.900 neurônios/mm³ (Skoglund et al. 1996), podemos supor que existam aproximadamente 17.350 e 19.225 neurônios crossmodais/mm³ em S1 e em V1, respectivamente.

Uma população tão numerosa de neurônios deveria chamar mais atenção. Uma possível explicação para a ausência de dados eletrofisiológicos sobre a crossmodalidade em áreas corticais sensoriais primárias é a existência de um viés sistemático nas pesquisas desenvolvidas sobre estas estruturas. Analisando a literatura, encontramos quatro características da pesquisa de processamento sensorial que podem ser responsáveis pela falta de conhecimento sobre a crossmodalidade:

1. Estímulos inapropriados para encontrar atividade crossmodal

A maioria das pesquisas realizadas nos córtices sensoriais após os trabalhos pioneiros de Wiesel e Hubel nos anos 50 e 60 se preocupou majoritariamente com neurônios responsivos a estímulos estereotipados da mesma modalidade do córtex analisado em questão. A unimodalidade das áreas sensoriais primárias se tornou um

verdadeiro dogma nas neurociências. Portanto, parece bastante justificável que a maioria das pesquisas sobre o processamento sensorial atual utilize apenas estímulos que reconhecidamente ativassem células da área cortical investigada, sem testar a responsividade desses córtices a estímulos sensoriais a outras modalidades.

2. Omissão de dados sobre neurônios não responsivos nos córtices sensoriais

Um outro fator que provavelmente contribui para a falta de dados sobre respostas crossmodais em córtices sensoriais primários é a omissão ao se indicar a quantidade de células não responsivas a estímulos unimodais encontradas nesses córtices. Estudos que caracterizam a resposta neural a estímulos padronizados raramente relatam a proporção de neurônios responsivos encontrados, e focalizam suas análises nas propriedades encontradas nos neurônios “adequadamente” responsivos (Olshausen e Field 2004).

Essa omissão pode mascarar uma riqueza inesperada de neurônios não responsivos com funções diversas nos córtices primários. É impossível avaliar a quantidade de neurônios não responsivos a estímulos unimodais encontrados até hoje, o que tende a desmotivar a procura por células atípicas nos córtices sensoriais primários.

3. Sub-amostragem de neurônios

As técnicas de registro eletrofisiológico, introduzidas por Adrian e Zotterman em 1926, que utilizaram eletrodos unitários para registrar a atividade de um neurônio por vez. Como resultado, as experiências conduzidas com eletrodos unitários historicamente correlacionam as propriedades de resposta de neurônios individuais com a codificação de uma sensação ou de comportamentos complexos, apesar de

ser amplamente aceito que qualquer comportamento depende da integração de grandes populações neuronais (Nicoletti et al. 1995).

A utilização de múltiplos eletrodos, empregada neste trabalho, aumenta consideravelmente a amostragem, indo de um neurônio para dezenas ou centenas de células simultaneamente.

Baseando-se nas limitações de obtenção energética às quais neurônios corticais estão sujeitos (Attwell e Laughlin 2001, e Lennie 2003), Olshausen e Field (2004) argumentam que a média de disparos global do córtex não pode ser superior a 1Hz, enquanto na literatura se encontra, em geral, uma média de ~4Hz para neurônios corticais nos animais anestesiados e ~8Hz em animais acordados. Esses valores, segundo Olshausen e Field, indicam que apenas 40-50% das células de V1 foram amostradas satisfatoriamente até hoje, e que a principal causa encontrada para este viés de amostragem é o descarte de neurônios com pequenas taxas de disparo, um viés que pode ser adequadamente evitado pela utilização de implantes crônicos de eletrodos com registros de longa duração.

Em nosso estudo registramos múltiplas unidades simultaneamente por períodos entre 60 e 180 minutos sob estimulação sensorial constante, o que nos permitiu amostrar a responsividade em células com pequenas taxas de disparo. Nosso limite de resolução foi de ~0,66Hz, pois neurônios que apresentaram menos de 1000 disparos no período de registro foram descartadas compulsoriamente devido às limitações do método estatístico empregado. A partir de um total de 512 células registradas, utilizamos 444 em nossas análises, descartando, portanto, 13% de nossa amostra. Para aumentar a amostragem de células com baixa contagem de disparos são necessários registros ainda mais longos do que os utilizados, o que foi

limitado no atual trabalho pela duração da anestesia e pela estabilidade do registro eletrofisiológico.

4. *Amostragem enviesada de neurônios responsivos*

Finalmente, além do número limitado de neurônios registrados, uma outra possível característica das investigações eletrofisiológicas sobre o processamento sensorial que atrasou a caracterização de células crossmodais é a metodologia de classificação para células responsivas. Geralmente esta classificação é feita antes de se iniciar a coleta, ou mesmo durante a coleta, direcionando a coleta para células que respondem da maneira esperada aos estímulos aplicados.

Em nosso estudo a classificação de responsividade neural foi realizada somente após toda a coleta de dados, e não influenciou a seleção dos neurônios analisados. Essa implementação técnica aparentemente simples garante uma coleta de dados consideravelmente mais abrangente e imparcial, impedindo que os conhecimento prévio dos pesquisadores influencie os resultados, funcionando como um “controle cego” (do inglês: *blind control* ou *blind experiment*).

Função dos neurônios sensoriais multimodais e crossmodais

A presença de neurônios crossmodais nos córtices sensoriais primários acrescenta um elemento interessante ao estudo do processamento sensorial. É possível que a organização cortical das sensações e percepções seja metamodal, como foi proposto por Pascual-Leone e Hamilton (2001), com áreas corticais especializadas, mas raramente dedicadas exclusivamente a uma única sensação. Dessa forma, o processamento de cada modalidade sensorial ocorreria majoritariamente em seus córtices tradicionais, mas poderia recrutar os outros

córtices sensoriais caso estes não tivessem demanda de processamento sensorial simultâneo.

Dados empíricos que apoiam essa idéia foram obtidos por Merabet et al. (2008) que estudou o envolvimento do córtex visual no processamento de uma tarefa não-visual complexa (leitura Braille) por pessoas saudáveis vendadas durante cinco dias. Antes da privação visual, os sujeitos não apresentavam qualquer mudança na atividade cerebral em V1 enquanto a tarefa era executada. No quinto dia após serem vendados, entretanto, um nítido aumento da resposta de V1 era observado durante a tarefa. Os autores também testaram se a atividade de V1 contribuía para o desempenho da tarefa aplicando estimulação magnética transcraniana (TMS) sobre o pólo occipital dos sujeitos, inibindo a atividade neural desta área. Os resultados indicam que a aplicação do TMS sobre V1 era prejudicial ao desempenho da tarefa apenas enquanto os sujeitos estavam vendados, mas não interferia nos resultados quando aplicada antes ou depois da colocação da venda.

CONCLUSÕES

Em nossos registros encontramos 87% e 82% de neurônios corticais isomodais em V1 e S1. Nos mesmos registros também observamos 23% e 22% de neurônios corticais crossmodais em V1 e S1, respectivamente. A partir dos dados obtidos podemos afirmar que tanto a estimulação visual quanto a estimulação tátil são suficientes para causar um aumento significativo na taxa de disparo de neurônios dos córtices sensoriais primários tátil e visual de ratos Long-Evans anestesiados. As latências de resposta de neurônios unimodais e crossmodais são semelhantes, tornando improvável a possibilidade de que a atividade crossmodal seja causada por sinapses recorrentes de córtices associativos multimodais.

A convergência multimodal em áreas sensoriais anteriormente tidas como unimodais levanta um sério questionamento sobre o atual modelo de hierarquia de processamento cortical. O estudo individualizado de cada modalidade sensorial certamente contribuiu bastante para a atual compreensão dos mecanismos básicos do processamento sensorial. Por outro lado, existe um crescente acúmulo de evidências de que os estímulos sensoriais são representados de forma sobreposta em todas as áreas corticais. Concluímos que um modelo de processamento cortical que trate os córtices sensoriais primários como áreas especializadas, mas não exclusivas, seja mais coerente com os dados experimentais reunidos até o presente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adrian, E.D., e Zotterman, Y.** 1926. The impulses produced by sensory nerve-endings Part II. The response of a Single End-Organ. *The Journal of Physiology*, **61**, 151-171.
- Adrian, E.D.** 1950. The electrical activity of the mammalian olfactory bulb. *Electroencephalographic Clinical Neurophysiology*, **2**, 377-388.
- Alitto, H.J., e Martin, U.** 2003. Corticothalamic feedback and sensory processing. *Current Opinion in Neurobiology*, **4**, 440-445.
- Allman, B.L., Keniston, L.P., Meredith, M.A.** 2008. Subthreshold auditory inputs to extrastriate visual neurons are responsive to parametric changes in stimulus quality: Sensory-specific versus non-specific coding. *Brain Research*, **25**, 95-101.
- Andersen, R.A., Snyder, L.H., Bradley, D.C., Xing, J.** 1997. Multimodal representation of space in the posterior parietal cortex and its use in planning movements. *Annual Review of Neuroscience* **20**, 303-330.
- Attwell, D., e Laughlin, S.B.** 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*, **21**, 1133–1145.
- Benjamin, R.M., e Akert, K.** 1959. Cortical and thalamic areas involved in taste discrimination in the albino rat. *The Journal of Comparative Neurology*, **111**, 231-259.
- Boring, E.G.** 1942. *Sensation and perception in the history of experimental psychology*. Oxford: Appleton-Century.

- Braun, J.J., Lasiter, P.S., Kiefer, S.W.** 1982. The gustatory neocortex of the rat. *Physiological Psychology*, **10**, 13-45.
- Buonomano, D.V. e Merzenich, M.M.** 1998. Cortical Plasticity: From Synapses to Maps. *Annual Review in Neurosciences*, **21**, 149-186
- Burton, H. e Sinclair, R.** 1996. Somatosensory cortex and tactile perceptions. In: *Pain and Touch*. (Ed. por L. Kruger) San Diego: Academic Press.
- Calford, M.B., Graydon, M.L., Huerta, M.F., Kaas, J.H., Pettigrew, J.D.** 1985. A variant of the mammalian somatotopic map in a bat. *Nature*, **313**, 477-479.
- Calvert, G.A.** 2000. Crossmodal processing in the human brain: insights from functional neuroimaging studies. *Cerebral Cortex*, **11**, 1110-1123.
- Cappe, C. e Barone, P.** 2005. Crossmodal connections supporting multisensory integration at low levels of cortical processing in the monkey. *European Journal of Neuroscience*, **22**, 2886-2902.
- Casagrande, V.A. e Royal, D.W.** 2004. Parallel visual pathways in a dynamic system. In: *The Primate Visual System* (Ed. por J.H. Kaas e C.E. Collins) p.1-27. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Chapin, J.K. e Lin, C.S.** 1984. Mapping the Body Representation in the SI Cortex of Anesthetized and Awake Rats. *The Journal of Comparative Neurology*, **229** 199-213.
- Crick, F.** 1994. *The Astonishing Hypothesis*. Londres: Simon and Schuster.

- Driver, J. e Noesselt, T.** 2008. Multisensory interplay reveals crossmodal influences on 'sensory-specific' brain regions, neural responses, and judgments. *Neuron*, **57**, 11–23.
- Falchier, A. Clavagnier, S., Barone, P., Kennedy, H.** 2002. Anatomical evidence of multimodal integration in primate striate cortex. *The Journal of Neuroscience*, **22**, 5749–5759.
- Felleman, D.J. e Van Essen, D.C.** 1991. Distributed Hierarchical Processing in the Primate Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex*, **1**, 1-47.
- Foxe, J., Morocz, I.A., Murray, M.M., Higgins, B.A., Javitt, D.C., Schroeder, C.E.** 2000. Multisensory auditory-somatosensory interactions in early cortical processing revealed by high-density electrical mapping. *Cognitive Brain Research*, **10**, 77–83.
- Foxe, J.** 2008. Toward the end of a “principled” era in multisensory science. *Brain Research*, **1242**, 1-3.
- Friedman-Hill, S.R., Robertson, L.C., Treisman, A.** 1995. Parietal contributions to visual feature binding: evidence from a patient with bilateral lesions. *Science*, **269**.
- Gattass, R., Nascimento-Silva, S., Soares, J.G.M., Lima, B., Jansen, A.K., Diogo, A.C.M., Farias, M.F., Marcondes, M., Botelho, E.P., Mariani, O.S., Azzi, J., Fiorani, M.** 2005. Cortical visual areas in monkeys: location, topography, connections, columns, plasticity and cortical dynamics. *Philosophical Transactions of The Royal Society*, **360**, 709-731.

- Ghazanfar, A.A., Stambaugh, C.R., Nicolelis, M.A.L.** 2000. Encoding of tactile stimulus location by somatosensory thalamocortical ensembles. *Journal of Neuroscience* **20**, 3761-3775.
- Ghazanfar, A.A. e Schroeder, C.E.** 2006. Is neocortex essentially multisensory? *Trends in Cognitive Sciences*, **10**, 278–285.
- Giard, M.H. e Peronnet, F.** 1999. Auditory-visual integration during multimodal object recognition in humans: a behavioral and electrophysiological study. *Journal of Cognitive Neuroscience*, **11**, 473–490.
- Goldman-Rakic, P.S.** 1988. Topography of cognition: parallel distributed networks in primate association cortex. *Annual Review of Neuroscience*, **11**, 137-156.
- Goldstein, J.L.** 1973. An optimum processor theory for the central formation of the pitch of complex tones. *Journal of Acoustical Society of America*, **54**, 1496-1516.
- Gottfried, J.A., Winston, J.S., Dolan, R.J.** 2006. Dissociable Codes of Odor Quality and Odorant Structure in Human Piriform Cortex. *Neuron*, **49**, 467-479.
- Helmholtz, H. von.** 1862. *Sobre a sensação dos tons como uma base fisiológica para a teoria da música*. Braunschweig: Vieweg.
- Hluštík, P., Solodkin, A., Noll, D.C., Small, S.L.** 2004. Cortical Plasticity During Three-Week Motor Skill Learning. *Journal of Clinical Neurophysiology*, **21**, 180-191.
- Hommel, B.** 2004. Event files: feature binding in and across perception and action. *Trends in Cognitive Sciences*, **8**, 494-500.

- Hubel, D.H. e Wiesel, T.N.** 1961. Integrative action in the cat's lateral geniculate body. *The Journal of Physiology*, **155**, 385-398.
- Hubel, D.H. e Wiesel, T.N.** 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *The Journal of Physiology*, **160**, 106-154.
- Hubel, D.H. e Wiesel, T.N.** 1968. Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *The Journal of Physiology* **195**, 215-243.
- Jones, E.G., Powell, T.P.** 1970. An anatomical study of converging sensory pathways within the cerebral cortex of the monkey. *Brain*, **93**, 793–820.
- Jones, E.G.** 2000. Cortical and Subcortical Contributions to Activity-Dependent Plasticity in Primate Somatosensory Cortex. *Annual Review of Neuroscience*, **23**, 1-37.
- Kaas, J.H.** 1989. The evolution of complex sensory systems in mammals. *Journal of Experimental Biology*, **146**, 165-176.
- Kaas, J.H.** 1991. Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. *Annual Review of Neuroscience*, **14**, 137-167.
- Kaas, J.H.** 1997. Topographic maps are fundamental to sensory processing. *Brain Research Bulletin*, **44**, 107-112.
- Kaas, J.H., Collins, C.E.** 2004. *The Primate Visual System*. Boca Raton: CRC Press.

- Kaas, J.H., Nelson R.J., Sur M., Lin C.S., Merzenich M.M.** 1979. Multiple representations of the body within the primary somatosensory cortex of primates. *Science* **204**, 521-523.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M.** 2003. *Princípios da Neurociência*. 4^a ed. Barueri, SP: Manole.
- Katz, D.B., Simon, S.A., Nicolelis, M.A.L.** 2001. Dynamic and Multimodal Responses of Gustatory Cortical Neurons in Awake Rats. *The Journal of Neuroscience*, **21**, 4478-4489.
- Katz, D.B., Simon, S.A., Nicolelis, M.A.L.** 2002. Taste-specific neuronal ensembles in the gustatory cortex of awake rats. *The Journal of Neuroscience*, **22**, 1850-1857.
- Körding, K.P., Beierholm, U., Ma, W.J., Quartz, S., Tenenbaum, J.B., Shams, L.** 2007. Causal Inference in Multisensory Perception. *PLoS ONE*, **2**.
- Lamme, V.A.F., Super, H., Spekreijse, H.** 1998. Feedforward, horizontal, and feedback processing in the visual cortex. *Current Opinion in Neurobiology*, **8**, 529-535.
- Lamme, V.A.F. e Roelfsema, P.R.** 2000. The distinct modes of vision offered by feedforward and recurrent processing. *Trends in Neuroscience*, **11**, 571-579.
- Laurienti, P.J., Burdette, J.H., Wallace, M.T., Yen, Y., Field, A.S., Stein, B.E.** 2002. Deactivation of sensory-specific cortex by cross-modal stimuli. *Journal of Cognitive Neuroscience*, **14**, 420-429.
- Lennie, P.** 2003. The cost of cortical computation. *Current Biology*, **13**, 493-497.

- Martuzzi, R., Murray, M.M., Michel, C.M., Thiran, J.P., Maeder, P.P., Clarke, S., Meuli, R.A.** 2007. Multisensory interactions within human primary cortices revealed by BOLD dynamics. *Cerebral Cortex*, **17**, 1672–1679.
- Merabet, L.B., Hamilton, R., Schlaug, G., Swisher, J.D., Kiriakopoulos, E.T., Pitskel, N.B., Kauffman, T., Pascual-Leone, A.** 2008. Rapid and Reversible Recruitment of Early Visual Cortex for Touch. *PLoS ONE*, **3**.
- Merzenich, M.M., Kaas, J.H., J.T. Wall, R.J. Nelson, M. Sur, D.J. Felleman.** 1983. Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. *Neuroscience* **8**, 33-55.
- Mignard, M. e Malpeli, J.G.** 1991. Paths of information flow through visual cortex. *Science*, **251**, 1249-1251.
- Molholm, S., Ritter, W., Murray, M.M., Javitt, D.C., Schroeder, C.E., Foxe, J.** 2002. Multisensory auditory-visual interactions during early sensory processing in humans: a high-density electrical mapping study. *Cognitive Brain Research*, **14**, 115–128.
- Moore, R.Y.** 1983. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Federation Proceedings*, **42**, 2783-2789.
- Mountcastle, V.B.** 1957. Modality and topographical properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *Journal of Neurophysiology* **20**, 408-434.

- Mountcastle, V.B., Lynch, J.C., Georgopoulos, A., Sakata, H., Acuna, C.** 1975. Posterior parietal association cortex of the monkey: command functions for operations within extrapersonal space. *Journal of Neurophysiology*, **38**, 871-908.
- Murray, M.M., Molholm, S., Michel, C.M., Heslenfeld, D.J., Ritter, W., Javitt, D.C., Schroeder, C.E., Foxe, J.** 2005. Grabbing your ear: rapid auditorysomatosensory multisensory interactions in low-level sensory cortices are not constrained by stimulus alignment. *Cerebral Cortex*, **15**, 963–974.
- Nicolelis, M. A. L.** 1999. *Methods for Neural Ensemble Recordings*. Nova lorque: CRC.
- Nicolelis, M.A.L., Baccala, L.A., Lin, R.C.S., Chapin, J.K.** 1995. Sensorimotor encoding by synchronous neural ensemble activity at multiple levels of the somatosensory system. *Science*, **268**, 1353-1358.
- Nicolelis, M.A.L., Ghazanfar, A.A., Faggin, B.M., Votaw, S., Oliveira, L.M.O.** 1997. Reconstructing the Engram: Simultaneous, Multisite, Many Single Neuron Recordings. *Neuron*, **18**, 529-537.
- Nicolelis, M.A.L., Ghazanfar, A.A., Stambaugh, C.R., Oliveira, L.M.O., Laubach, M., Chapin, J.K., Nelson, R.J., Kaas, J.H.** 1998. Simultaneous encoding of tactile information by three primate cortical areas. *Nature Neuroscience*, **1**, 622-630.
- Ojima, H., Taoka, M., Iriki, A.** 2010. Adaptive Changes in Firing of Primary Auditory Cortical Neurons following Illumination Shift from Light to Dark in Freely Moving Guinea Pigs. *Cerebral Cortex* **20**, 339-351.

- Olshausen, B.A., Field, D.J.** 2004. What is the other 85% of V1 doing? In: *Problems in Neuroscience* (Ed. por T.J. Sejnowski, L. van Hemmen). Oxford University Press.
- Oxenham, A.J., Bernstein, J.G.W., Penagos, H.** 2004. Correct tonotopic representation is necessary for complex pitch perception. *PNAS*, **101**, 1421-1425.
- Pantev, C., Hoke, M., Liitkenhoner, B., Lehnertz, K.** 1989. Tonotopic organization of the auditory cortex: pitch versus frequency representation. *Science*, **246**, 486-488.
- Pascual-Leone, A. e Hamilton, R.** 2001. The metamodal organization of the brain
In: *Vision: from neurons to cognition* (Ed. por C.Casanova e M. Ptito). Elsevier.
- Paxinos, G. e Watson, C.** 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6^a ed. Academic Press.
- Penfield, W. e Boldrey, E.** 1937. Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain*, **60**.
- Pons, T.P., Garraghty, P.E., Ommaya, A.K., Kaas, J.H., Taub, E., Mishkin, M.** 1991. Massive cortical reorganization after sensory deafferentation in adult macaques. *Science*, **252**, 1857-1860.
- Rauschecker, J.P., Tian, B., Pons, T. Mishkin, M.** 1997. Serial and parallel processing in rhesus monkey auditory cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, **382**, 89–103.

- Reynolds, J.H. e Desimone, R.** 1999. The role of neural mechanisms in solving the binding problem. *Neuron*, **24** 19-29.
- Ribeiro, S., Pantoja, J., Vasconcellos, N., Belchior, H.A., Caixeta, F.V., Laplagne, D.A., Freire M., Pereira, C., Faber, J., Cota, V.R., Moreno, R., Dias, G., Santos, S., Batista, E., Gomes, H.M., Nicolelis, M.A.L.** no prelo. Cross-modal processing in the primary visual cortical area.
- Ribeiro, S., Shi, X., Engelhard, M., Zhou, Y., Zhang, H., Gervasoni, D., Lin, S., Wada, K., Lemos, N.A.M., Nicolelis, M.A.L.** 2007. Novel Experience Induces Persistent Sleep-Dependent Plasticity in the Cortex but not in the Hippocampus. *Frontiers in Neuroscience*, **1**, 43-55.
- Rockland, K.S. e Ojima, H.** 2003. Multisensory convergence in calcarine visual areas in macaque monkey. *International Journal of Psychophysiology*, **50** 19–26.
- Sacks, O.W.** 1985. *O homem que confundiu sua mulher com um chapéu*. Companhia das Letras.
- Sadato, N., Pascual-Leone, A., Grafman, J., Ibanez, V., Deiber, M.P., Dold, G., Hallett, M.** 1996. Activation of the primary visual cortex by Braille reading in blind subjects. *Nature*, **380**, 526–528.
- Santiago, L.F., Rocha, E.G., Freire, M.A.M., Dias, I.A., Lent, R., Houzel, J., PicançoDiniz, C.W., Pereira, A., Franca, J.G.** 2007. The organizational variability of the rodent somatosensory cortex. *Reviews in the Neurosciences*, **18**, 283-294.

- Sathian, K., Zangaladze, A., Hoffman, J M., Grafton, S T.** 1997. Feeling with the mind's eye. *NeuroReport*, **8**, 3877-3881.
- Sathian, K.** 2005. Visual cortical activity during tactile perception in the sighted and the visually deprived. *Developmental Psychobiology*, **46**, 279–286.
- Schiller, P.H. e Malpeli, J.G.** 1977. Properties and tectal projections of monkey retinal ganglion cells. *Journal of Neurophysiology*, **40**, 428-445.
- Schiller, P.H. e Malpeli, J.G.** 1978. Functional specificity of lateral geniculate nucleus laminae of the rhesus monkey. *Journal of Neurophysiology*, **41**, 788-797.
- Schott, G.D.** 1993. Penfield's homunculus: a note on cerebral cartography. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, **56**, 329-333.
- Schroeder, C.E. e Foxe, J.** 2005. Multisensory contributions to low level, 'unisensory' processing. *Current Opinion in Neurobiology*, **15**, 454-458.
- Senkowski, D., Talsma, D., Grigutsch, M., Herrmann, C.S., Woldorff, M.G.** 2007. Good times for multisensory integration: effects of the precision of temporal synchrony as revealed by gammaband oscillations. *Neuropsychologia*, **45**, 561–571.
- Shadlen, M.N. e Movshon, J.A.** 1999. Synchrony unbound: review a critical evaluation of the temporal binding hypothesis. *Neuron*, **24**, 67-77.
- Shannon, R.V.** 1983. Multichannel electrical stimulation of the auditory nerve in man. I. Basic Psychophysics. *Hearing Research*, **11**, 157-189.

- Singer, W.** 1999. Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations?
Neuron, **24**, 49-65.
- Skoglund, T.S., Pascher, R., Berthold, C.H.** 1996. Heterogeneity in the columnar number of neurons in different neocortical areas in the rat. *Neuroscience Letters*, **208**, 97-100.
- Sperdin, H., Cappe, C., Foxe, J., Murray, M.M.** 2009. Early, low-level auditorysomatosensory multisensory interactions impact reaction time speed. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, **3**, 2.
- Stapleton, J.R., Lavine, M.L., Nicolelis, M.A.L., Simon, S.A.** 2007. Ensembles of Gustatory Cortical Neurons Anticipate and Discriminate Between Tastants in a Single Lick. *Frontiers in Neuroscience*, **1**, 161-174.
- Stein, B.E., e Stanford, T.R.** 2008. Multisensory integration: current issues from the perspective of the single neuron. *Nature Reviews Neuroscience*, **9**, 255-267.
- Stein, B.E., Stanford, T.R., Ramachandran, R., Perrault Jr, T.J., Rowland, B.A.** 2009. Challenges in quantifying multisensory integration: alternative criteria, models, and inverse effectiveness. *Experimental Brain Research* **198**, 113-126.
- Stryer, L.** 1996. Vision: From photon to perception. *PNAS*, **93**, 557-559.
- Sur, M. Nelson, R.J., Kaas, J.H.** 1982. Representations of the Body Surface in Cortical Areas 3b and 1 of Squirrel Monkeys: Comparisons With Other Primates. *The Journal of Comparative Neurology*, **211**, 177-192.
- Talbot, S.A. e Marshall, W.H.** 1940. Multiple responses in the optic tract and optic cortex of cat. *American Journal of Physiology*, **129**, 478.

- Talbot, S.A. 1942.** A lateral localization in the cat's visual cortex. *Federal Proceedings*, **1**.
- Treisman, A. 1996.** The binding problem. *Current Opinion in Neurobiology*, **6**, 171-178.
- Treisman, A. 1999.** Solutions to the Binding Problem: Progress through Controversy and Convergence. *Neuron*, **24**, 105-110.
- Wallace, M.T., Meredith, M.A., Stein, B.E. 1998.** Multisensory integration in the superior colliculus of the alert cat. *Journal of Neurophysiology*, **80**, 1006–1010.
- Wallace, M.T. Ramachandran, R., Stein, B.E. 2004.** A revised view of sensory cortical parcellation. *PNAS*, **101**, 2167–2172.
- Wang, Y., Celebrini, S., Trotter, Y., Barone, P. 2008.** Visuo-auditory interactions in the primary visual cortex of the behaving monkey: electrophysiological evidence. *BMC Neuroscience*, **9**, 79.
- Wiesel, T.N. e Hubel, D.H. 1963.** Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *Journal of Neurophysiology*, **26**, 1003-1017.
- Woolsey, C.N. 1958.** Organization of somatic sensory and motor areas of the cerebral cortex. In: *The Biological and Biochemical Bases of Behavior* (Ed. por H.F. Harlow e C.N. Woolsey) University of Wisconsin: Madison
- Woolsey, C.N., Erickson, T.C., Gilson, W. E. 1979.** Localization in somatic sensory and motor areas of human cerebral cortex as determined by direct recording of evoked potentials and electrical stimulation. *Journal of Neurosurgery*, **51**.

Zeki, S., Watson, J.D.G., Lueck, C.J., Friston, K.J., Kennard, C., Frackowiak, R.S.J. 1991. A Direct Demonstration of Functional Specialization in Human Visual Cortex. *The Journal of Neuroscience*, **11**, 641-649.

ANEXO A

1. Procedimentos pré-cirúrgicos:

- 1a. Soldar um parafuso cirúrgico a um fio de prata para servir como aterramento do implante;
- 1b. Esterelizar os instrumentos cirúrgicos, cotonetes, solução salina e parafusos cirúrgicos;
- 1c. Aquecer as almofadas térmicas;
- 1d. Medir as dimensões da matriz de eletrodos;
- 1e. Raspar o fio terra da matriz utilizando uma palha de aço;
- 1f. Borrifar mesa cirúrgica, cadeira, bancada, lupa e aparelho estereotáxico com álcool 70% e limpar com flanela absorvente;
- 1g. Pesar o animal e preparar as doses de anestesia injetável (sistêmica).

2. Procedimento de anestesia gasosa:

- 2a. Induzir a anestesia utilizando uma concentração de 5% de Isoflurano até o animal perder a consciência (cerca de um minuto);
- 2b. Diminuir a concentração de Isoflurano para 1,5-2,5%, mantendo a anestesia gasosa enquanto se aplica a anestesia sistêmica.

3. Procedimento de anestesia sistêmica:

- 3a. Injetar Sulfato de Atropina s.c. na dose de 0,04mg/kg;
- 3b. Injetar Cloridrato de Cetamina i.m. na dose de 100mg/kg;
- 3c. Injetar Cloridrato de Xilazina i.m. na dose de 8,0mg/kg;

- 3d. Doses adicionais de Cloridrato de Cetamina de 50mg/kg serão administradas a cada duas horas, ou caso o animal apresente sinais de superficialização da anestesia.
4. Tricotomizar o animal na sala pré-cirúrgica, removendo os pelos soltos do animal.
5. Posicionar a almofada térmica sob o suporte do animal na mesa cirúrgica.
6. Posicionar o animal no aparelho estereotáxico.
7. Realizar assepsia do animal, esfregando um cotonete embebido em Polvidine na cabeça, pescoço e orelhas do animal.
8. Aplicar gel lubrificante à base de água nos olhos do animal para proteção contra ressecamento.
9. Realizar assepsia pessoal, lavando bem as mãos com sabonete líquido anti-séptico.
10. Paramentar-se para a cirurgia com um jaleco limpo, luvas de procedimento, máscara e gorro.
11. Posicionar o material cirúrgico sobre a mesa cirúrgica.
12. Abrir o pacote da lâmina de bisturi e posicioná-la no cabo.
13. Realizar a incisão longitudinal na linha sagital da cabeça usando o bisturi.
14. Rebater a pele utilizando as tesouras hemostáticas (2 pequenas à frente, e 2 grandes atrás).
15. Trocar a lâmina do bisturi por outra estéril e raspar todo o material subcutâneo que recobre o topo do crânio utilizando o bisturi.
16. Limpar a região exposta com cotonetes embebidos de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

17. Verificar e porventura corrigir posicionamento horizontal da cabeça através dos valores da ordenada dorso-ventral entre Bregma e Lambda (diferença máxima de 0,2 mm).
18. Marcar coordenadas estereotáxicas no crânio utilizando uma caneta com ponta de 1mm, demarcando a “janela” retangular da craniotomia.
19. Marcar pontos de introdução dos parafusos de fixação e do eletrodo de referência (terra). Este último deve entrar em contato com o líquido e, portanto, recomenda-se o seu posicionamento através do osso frontal.
20. Obturar locais de inserção para os parafusos, buscando fazer buracos de diâmetro ligeiramente menor que o diâmetro dos parafusos para uma melhor fixação.
21. Raspar o fio de prata do parafuso de terra com palha de aço.
22. Apertar todos os parafusos usando chave de fenda esterilizada.
23. Perfurar a janela previamente demarcada para o implante dos eletrodos.
24. Manter a superfície cerebral exposta úmida utilizando solução salina durante todo o resto do procedimento até o recobrimento do crânio com acrílico.
25. Alisar bem as bordas da janela usando o scoop, para resguardar os eletrodos contra possíveis danos durante a penetração.
26. Remover a dura-máter da janela utilizando a ponta de uma seringa encurvada.
27. Posicionar a matriz de eletrodos sobre a janela de implante, certificando-se que todos eletrodos possam penetrar o cérebro sem tocar o crânio.
28. Soldar o fio terra da matriz ao fio do parafuso-terra, evitando que o calor advindo do processo atinja o cérebro.

29. Descer lentamente a matriz de eletrodos até a região-alvo desejada (aproximadamente 0,1mm por minuto) manualmente utilizando um parafuso micrométrico com precisão de 0,001mm.
30. Recobrir todo o crânio exposto, os parafusos, fio terra e matriz utilizando acrílico auto-polimerizante.
31. Remover as pinças hemostáticas do animal e limpar toda a área ao redor do capacete utilizando solução salina, Polvidine e Sulfato de Neomicina.
32. Aplicar a injeção de antibiótico sistêmico Flotril (2,5mg/kg) s.c.
33. Colocar analgésico (30 gotas de Tylenol em 250ml) na água do animal, e molhar a comida para facilitar a alimentação do animal debilitado devido à cirurgia.
34. Esperar o animal despertar e devolvê-lo ao biotério.
35. Acompanhar a recuperação e o ganho de peso do animal ao longo de toda a semana após o procedimento cirúrgico.

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](#)