



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Física

Antonio Jorge Fontenele Neto

**Implementação de um protocolo experimental
para estudo de propriedades de resposta visual
de neurônios do córtex visual primário (V1) em
ratos utilizando matrizes de eletrodos**

Recife

2015

Antonio Jorge Fontenele Neto

**Implementação de um protocolo experimental para
estudo de propriedades de resposta visual de neurônios
do córtex visual primário (V1) em ratos utilizando
matrizes de eletrodos**

*Dissertação apresentado ao Programa de Pós-
Graduação em Física da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito parcial para ob-
tenção do título de Mestre em Física.*

Orientador: Prof. Dr. Pedro Valadão Carelli

Coorientador: Prof. Dr. Mauro Copelli Lopes da Silva

Recife

2015

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc Leão Salvador CRB4-572

F683i Fontenele Neto, Antonio Jorge.
Implementação de um protocolo experimental para estudo de propriedades de resposta visual de neurônios do córtex visual primário (V1) em ratos utilizando matrizes de eletrodos / Antonio Jorge Fontenele Neto. – Recife: O Autor, 2015.
91 f.: fig.; tab.

Orientador: Pedro Valadão Carelli.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Física, 2015.
Inclui referências e apêndices.

1. Neurociência. 2. Campos visuais. 3. Eletrodos. I. Carelli, Pedro Valadão (Orientador). II. Título.

612.8043 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2015-44

ANTONIO JORGE FONTENELE NETO

**IMPLEMENTAÇÃO DE UM PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DE
PROPRIEDADES DE RESPOSTA VISUAL DE NEURÔNIOS DO CÓRTEX VISUAL
PRIMÁRIO (V1) EM RATOS UTILIZANDO MATRIZES DE ELETRODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Física.

Aprovada em: 25/08/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Valadão Carelli
Orientador
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Mauro Copelli Lopes da Silva
Co-Orientador
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Daniel Felinto Pires Barbosa
Examinador Interno
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Marcelo Bussotti Reyes
Examinador Externo
Universidade Federal do ABC

*A meus pais, Francisca das Chagas Pinheiro de Souza e Alcionio de Brito Fontenele e a minha
tia Iracema de Brito Fontenele.*

Agradecimentos

Inicialmente ao Departamento de Física da UFPE, pela possibilidade de realização deste trabalho. Ao professor Pedro Valadão Carelli pela paciência e dedicação à minha formação como pesquisador, pessoa fantástica. Ao professor Mauro Copelli pelas dicas sempre valiosas. Aos professores do DF por estarem sempre empenhados em nos oferecer a melhor formação. À Igor Tchaikovsky por colaborar imensamente com minha formação técnica no laboratório. Aos amigos de estudo: Márcio Moura (o curso de TQ1 não seria o mesmo sem ele), Jesus Pavon, Ammis Sanchez e Alysson Carvalho. À Leonardo Dornelles que colaborou em diversas etapas de execução deste trabalho. Aos jovens da iniciação científica: Edilson, Alexsandro, Thaís e Daniel pelo apoio no laboratório. Um agradecimento especial a Shayane Moura, por ter não só colaborado com correções, sugestões, lições de *Matlab*, etc como também se dedicar a me mostrar outras dimensões da vida, você é incrível meu amor. À CAPES, CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro.

Resumo

O córtex visual primário (V1) é a região do córtex cerebral responsável pela primeira etapa de processamento da informação visual capturada pela retina. Por ser uma das áreas corticais melhor compreendidas, V1 constitui um dos principais paradigmas de compreensão do processamento sensorial. Desde os anos 70 há uma extensa literatura que estuda propriedades de resposta de neurônios de V1, principalmente com eletrodos individuais e utilizando-se como modelo animal gatos e macacos. Tem-se conhecimento de onde partem seus principais inputs e quais estímulos fazem os neurônios dispararem (grades senoidais com determinadas frequências espaciais e temporais). Mais recentemente, com o uso de matrizes de eletrodos, se tornou possível a investigação de propriedades coletivas da atividade e codificação neurais, que não eram possíveis de serem desvendadas com eletrodos individuais. Além disso, no estado da arte tecnológico atual, o uso do rato como modelo animal permite o registro da atividade neural com os animais em comportamento livre (sem anestesia ou contenção). No entanto, pouco se sabe sobre especificidades das propriedades de resposta dos neurônios do córtex visual do rato. Este trabalho teve por objetivo desenvolver um aparato e um protocolo experimental no Laboratório de Neurociência de Sistemas e Computacional adequado para estudo das propriedades de resposta de neurônios de V1 de ratos usando matrizes de eletrodos. Finalmente, apresentamos resultados experimentais onde caracterizamos respostas de neurônios de V1 a diferentes estímulos visuais (Funções de Gabor ou Grades) seja em ruído denso ou rarefeito, variando as propriedades de frequências temporal e espacial de estimulação, densidades de estímulos, velocidade, etc. Concluímos que implementamos com sucesso a técnica experimental, que abre inúmeras perspectivas futuras de pesquisas nesta linha no Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco.

Palavras-chave: Córtex visual primário. Processamento. Estímulo. Matrizes de eletrodos.

Abstract

The primary visual cortex (V1) is the cerebral cortex region responsible for the first processing step of the visual information captured by the retina. Being one of the most studied and well described cortical sensory areas, V1 is one of the main paradigms for the study of sensory processing. Since the 70s, there is a vast literature that studies properties of V1's neurons, specially using single electrodes and using cats and monkeys as animal models. The anatomical connectivity of the visual pathway is known, from the retina to the lateral geniculate nucleus to V1, as well as the main visual stimulations that make V1 neurons fire (sinusoidal gratings with certain spatial and temporal frequencies). More recently, using multielectrode arrays, it became possible to study collective properties of the activity and neural codification, that could not be unveiled with single electrodes. Furthermore with, the current state of the art in multielectrode recordings it is possible to record the neural activity in freely behaving rats (without anesthesia or restraint). This represents an advantage in using the rat as animal model. However, little is known about specificities of the V1 neurons response properties in the rat. The aim of this work is to develop, in the *Laboratório de Neurociência de Sistemas e Computacional*, an apparatus and an experimental protocol suitable for the study of visual response properties of V1's neurons in rats, using multielectrode array recordings. Finally, we present experimental results that characterize the response of V1's neurons with different visual stimuli (Gabor or Grating Functions), either in dense or sparse noise modes, varying the spatial and temporal stimulation frequencies, stimulus density, speed, etc. We conclude that the experimental technique was implemented successfully. These results open important perspectives of future research on this field for the *Departamento de Física* at the *Universidade Federal de Pernambuco*.

Keywords: Primary visual cortex. Processing. Stimulus. Multielectrode array.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Diagrama de neurônios. A) Célula piramidal do córtex. Esses são os principais neurônios excitatórios do córtex cerebral. O axônio de células piramidais se ramificam localmente, criando sinapses com neurônios próximos. B) Uma célula de Purkinje do cerebelo. Os axônios dessas células transmitem sinais do córtex cerebelar. C) Célula stellate do córtex cerebral. Essas células pertencem a uma grande classe de células responsáveis por enviar sinais inibitórios para neurônios do córtex cerebral. D) Célula nervosa em detalhes, evidenciando a conexão sináptica. Para dar uma ideia de escala, estas figuras foram amplificadas cerca de 150 vezes (o corpo celular de um neurônio tem, tipicamente, diâmetros da ordem de $15 \mu\text{m}$). (Extraído de Peter Dayan e L.F. Abott (2001))(1)	20
Figura 2 – Diagrama do acúmulo de íons positivos no exterior da membrana celular e de íons negativos no interior, produzindo o potencial de repouso. (Adaptado de E.R. Kandel (2013)) (2)	21
Figura 3 – Diagrama esquemático de uma membrana separando duas distribuições assimétricas de íons. Por convenção, a diferença de potencial V através da membrana é definida por $V = V_i - V_e$	22
Figura 4 – Curva do potencial de ação. Inicialmente o neurônio se encontra em um potencial de repouso (-70 mV) - estado A. Ao sofrer uma perturbação que eleve seu potencial acima de um dado limiar, o potencial de membrana segue em direção a valores mais contrastantes que os do repouso - estado B. Ao atingir um máximo de despolarização o potencial retorna a valores negativos - estado C. Com a repolarização, o fechamento lento dos portões de ativação para K^+ , faz o interior da célula ficar, temporariamente, mais negativo que no repouso - estado D.	26
Figura 5 – Circuito elétrico equivalente a um curto segmento do axônio gigante de uma lula. O capacitor representa a capacitância da membrana celular. As resistências representam condutâncias dependentes de voltagem G_{Na} e G_K . As baterias representam potenciais de Nernst para as respectivas condutâncias.	28

Figura 6 – A) Potencial de ação gerado pelo modelo de Hodgkin e Huxley. B) Comportamento das variáveis h , n e m no momento do <i>spike</i> . C) e D) Condutâncias e correntes respectivamente, mediante a perturbação produzida por um pulso de corrente. E) Pulso de corrente usado como estímulo. (Adaptado de Izhikevich (2007)(3))	30
Figura 7 – Propriedades de fotorreceptores: (A) Sensibilidade espectral de cones no olho humano;(B) Distribuição de cones e bastonetes ao longo da retina humana. Disponível em: https://foundationsofvision.stanford.edu/chapter-3-the-photoreceptor-mosaic/	31
Figura 8 – Projeções do LGN ao córtex visual primário. O LGN recebe <i>entradas</i> da retina temporal do olho ipsilateral e da retina nasal do olho contralateral, em cada hemisfério. O núcleo é uma estrutura laminada comprimindo quatro camadas parvocelular (camadas 3 a 6) e duas camadas magnocelular (camadas 1 e 2). As projeções dos dois olhos terminam em diferentes camadas: o olho contralateral projeta para as camadas 1, 4 e 6, enquanto o olho ipsilateral projeta para as camadas 2, 3 e 5. Os canais parvocelular e magnocelular chegam ao córtex visual primário em subcamadas separadas. As camadas parvocelular projetam para a camada $IVC\beta$ e as camadas magnocelular para camadas $IVC\alpha$ (2).	32
Figura 9 – Fluxo de informações através das camadas de V1. Regiões intralaminares do LGN projetam para as camadas 2 e 3 de V1. Magnocelular e parvocelular projetam para as subcamadas 4C. A camada 4C projeta axônios colateralmente para camadas 4B, 2 ou 3. Camadas 2 e 3 projetam para camada 5 que por sua vez projeta para ambas as camadas 2, 3 e 6. A camada 6 projeta axônios colateralmente para a camada 4C. Projeções de saída para outras áreas corticais partem das camadas 2, 3 e 4B. Projeções de saída para áreas subcorticais partem das camadas 5 e 6.(Adaptado de E.R. Kandel) (2)	34
Figura 10 – Caminho visual em humanos. Fluxo dorsal responsável pelo processamento de informações relacionadas à movimentos e frequências temporais. Fluxo ventral responsável pelo processamento de informações ligadas a reconhecimento de formas, frequências espaciais.(Adaptado de E.R. Kandel (2013)) (2)	34

Figura 11 – Organização retinotópica para LGN e Cortex Visual. A) Campo visual. B) Representação da organização retinotópica para o LGN. C) Representação da organização retinotópica para o Córtex Visual.	35
Figura 12 – Resposta de células ganglionares da retina com campos receptivos <i>center-surround</i> (Adaptado de E.R. Kandel (2013) (2)).	37
Figura 13 – Regiões ON (verde) e OFF (vermelho) compondo campos receptivos para células simples A) e complexas B) em V1. (Adaptado de DeAngelis <i>et al.</i> , (1995) (4)).	37
Figura 14 – Colunas de orientação. As diferentes cores indicam a preferência orientacional das colunas. A barra de escala representa 1 mm. (Adaptado de E.R. Kandel (2013) (2)).	39
Figura 15 – As faixas claras e escuras representam as colunas de dominância dos olhos esquerdo e direito respectivamente. (Adaptado de E.R. Kandel (2013) (2)).	39
Figura 16 – Matrizes multieletrodos. A) Matriz confeccionada no LNSC. B) Matriz adquirida junto à TDT.	42
Figura 17 – Componentes básicos para a confecção de uma matriz LNSC. A - Gabarito utilizado na formatação da matriz. B - Tesoura com lâmina de carboneto de tungstênio. C - Microscópio simples 10X. D - Pinças. E - Placa de circuito impresso 36 canais, com trilhas frente e verso em ouro. F - Fios de tungstênio revestidos com material isolante.	42
Figura 18 – Matriz escalonada. Variação da matriz utilizada na captação de sinais paralelos de camadas corticais.	44
Figura 19 – Variações na área de captação. A) Secção inclinada provendo uma área maior de contato com o tecido cerebral. B) Corte convencional.	45
Figura 20 – Defeitos na região de coleta de sinais neurais. A) Acúmulo de impurezas impossibilitando o contato do condutor com o corpo celular. B) Dobra proveniente do acúmulo de tensão elástica acumulada durante o corte imprimido pela tesoura.	45
Figura 21 – Rato Long-Evans adulto	46
Figura 22 – Estante ventilada <i>Alesco</i>	46
Figura 23 – Aparelho estereotáxico SR-5R utilizado na parametrização da cirurgia.	48
Figura 24 – Secções coronais que delimitam a área V1.	49

Figura 25 – Craniotomia com 5cm de diâmetro sobre V1. Observa-se o contraste entre a parte superior à craniotomia, da qual a <i>dura-máter</i> foi removida e a parte inferior, ainda por retirar.	50
Figura 26 – Visão esquemática do campo cirúrgico. Posicionamento anterior ao bregma do parafuso terra. Craniotomia sobre V1.	50
Figura 27 – Equipamentos utilizados na coleta de sinal neural. A) Matriz de 32 microeletrodos. B) <i>Headstage</i> , responsável pela amplificação do sinal neural. C) PZ2, digitalizador. D) Módulo RZ2, núcleo de processamento.	51
Figura 28 – Circuito RPvdsEx responsável pela manipulação dos DSPs , com o propósito de aquisição dos dados a serem estudados.	53
Figura 29 – Janela de controle que permite a visualização das formas de ondas capturadas pelos 32 canais da matriz de multieletrodos.	54
Figura 30 – Janela de controle destinada à monitoração dos <i>Time Stamps</i> , <i>Local Field Potentials</i> e <i>Sync</i>	55
Figura 31 – Esquema do protocolo experimental. O <i>software Elphy</i> gera os padrões de estimulação e os envia a um segundo monitor, posicionado em frente ao rato. Antes de chegar ao segundo monitor o feixe RGB é dividido no GPVGA, que converte os feixes R e B em pulsos de potencial com duração de 1ms. Esses pulsos são capturadas pelo RZ2 e armazenados em <i>Sync</i>	57
Figura 32 – Quadro de estimulação com o protocolo de densidade espacial de <i>gabors</i> . Configuração 3 × 3 proporcionando 9 sítios. Cada sítio pode ser ocupado por um <i>gabor</i> , a depender da probabilidade de ocupação corrente. As probabilidades testadas variaram de $\frac{1}{128}$ a 1. A cada quadro de estimulação o Gabor variava sua orientação dentro de um <i>range</i> de 6 orientações escolhidas aleatoriamente a cada quadro.	58
Figura 33 – Orientações para o objeto grade.	59
Figura 34 – Variação no contraste para uma grade com orientação fixada em 0°.	60
Figura 35 – <i>Grades em translação</i> . Grades com movimento aparente induzido pela alteração gradativa na fase. Foi explorado movimento aparente em 8 direções. A seta indica a direção de alternância da fase.	61

Figura 36 – Torre estereotáxica. Esse equipamento oferece três graus de liberdade, manipuláveis em escala milimétrica. O eixo z permite ainda a opção de deslocamentos em escala micrométrica. A inserção dos microeletrodos é operada nessa escala.	62
Figura 37 – Mapeamento dos canais com resposta neural. A) Tela sem estímulo, resposta basal. B) Alteração na taxa de disparo mediante apresentação de uma barra. Indicando que o eletrodo se encontra próximo a um neurônio sensível às propriedades da barra. C) Leve depressão na resposta neural devido a mudança de orientação da barra. D) Retorno ao basal após ausência de estímulo. . . .	63
Figura 38 – PSTH suavizado por um filtro Gaussiano em duas resoluções temporais $\sigma = 23$ e $\sigma = 50$	66
Figura 39 – Taxa de disparo média para um neurônio em V1 do gato, plotada como função do ângulo de orientação da barra luminosa de estimulação. (Adaptado de Peter Dayan e L.F. Abott (2001))(1)	67
Figura 40 – Taxas de disparo em função da densidade espacial de estímulos do tipo <i>Gabor</i> . O gráfico A apresenta as curvas estímulo-resposta para os canais gravados no primeiro bloco ($800\ \mu\text{m}$). Os gráficos B e C exibem as curvas referentes à gravação do segundo bloco ($1200\ \mu\text{m}$).	69
Figura 41 – <i>Peristimulus time histograms</i> para diferentes valores de contraste (0-90%) obtidos para o canal 29, orientado a 0° (animal C a $1200\ \mu\text{m}$). A estimulação visual é apresentada entre 0 e 100ms.	71
Figura 42 – Taxas de disparo máximas em função do contraste. As curvas representam o comportamento da taxa de disparo, por canal, em função do contraste entre as raias de um objeto do tipo grade de tela interia orientado a 0° . Dados obtidos a partir do animal C.	72
Figura 43 – Taxas de disparo máximas em função do contraste. As curvas representam o comportamento da taxa de disparo, por canal, em função do contraste entre as raias de um objeto do tipo grade de tela interia orientado a 45° . Dados obtidos a partir do animal C.	73
Figura 44 – Taxas de disparo máximas em função do contraste. As curvas representam o comportamento da taxa de disparo, por canal, em função do contraste entre as raias de um objeto do tipo grade de tela interia orientado a 90° . Dados obtidos a partir do animal C.	74

Figura 45 – <i>Peristimulus time histograms</i> para diferentes orientações (0-75°). A estimulação visual é apresentada entre 0 e 100ms. Dados provenientes do animal C gravados a 1200 μm	76
Figura 46 – <i>Peristimulus time histograms</i> para diferentes orientações (90-165°). A estimulação visual é apresentada entre 0 e 100ms. Dados provenientes do animal C gravados a 1200 μm	77
Figura 47 – Curva de seletividade à orientação para neurônio medido no canal 3, animal C a 1200 μm de profundidade em V1.	78
Figura 48 – Curva de seletividade à orientação para neurônio medido no canal 19, animal C a 1200 μm de profundidade em V1.	78
Figura 49 – Curva de seletividade à orientação para neurônio medido no canal 13, animal C a 1200 μm de profundidade em V1.	79
Figura 50 – Curva de seletividade à orientação para neurônio medido no canal 29, animal C a 1200 μm de profundidade em V1.	79
Figura 51 – Estimativa da taxa de disparo a partir de PSTHs obtidas para o protocolo grades em traslação. As curvas foram geradas aplicando-se um filtro Gaussiano ($\sigma = 20\text{ms}$) aos histogramas temporais das taxas de disparos do canal 2. . .	81
Figura 52 – Mecanismo de <i>feedback</i> no grampeamento de voltagem.	90

Lista de tabelas

Tabela 1 – Distribuição dos principais íons através da membrana em repouso para o axônio gigante da lula. (Dados extraídos de E.R. Kandel (2013) (2))	23
Tabela 2 – Permeabilidade relativa dos íons. Dada apenas para o potencial de repouso. .	24
Tabela 3 – Variação da permeabilidade iônica na ocorrência de um Potencial de ação .	26

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
2	ASPECTOS GERAIS	19
2.1	Neurônios	19
2.1.1	Potencial de membrana	19
2.1.1.1	Potencial de repouso em células não-excitáveis	20
2.1.1.2	Potencial de repouso em células excitáveis	23
2.1.1.3	Potencial de ação (<i>Spike</i>)	24
2.1.2	Modelo de Hodgkin-Huxley	27
2.2	Caminho visual	31
2.2.1	Córtex visual primário	32
2.2.1.1	Localização e Conexão	33
2.2.1.2	Organização retinotópica	35
2.2.1.3	Campos receptivos visuais	36
2.2.1.4	Arquitetura funcional	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	Matrizes de eletrodos	41
3.2	Cirurgia estereotáxica	46
3.2.1	Animais	46
3.2.2	Procedimento cirúrgico	47
3.2.3	Anestesia	48
3.2.4	Coordenadas estereotáxicas	48
3.3	Sistema de aquisição	51
3.4	Sistema de estimulação visual	56
3.4.1	Componentes de <i>hardware</i>	56
3.4.2	Componentes de <i>software</i>	56
3.5	Protocolos de estimulação visual	58
3.5.1	Densidade espacial de <i>Gabors</i>	58
3.5.2	Grades em 12 orientações	59

3.5.3	Variação do contraste	59
3.5.4	<i>Grades em translação</i>	60
3.6	Procedimentos para registros eletrofisiológicos	62
3.7	Análise de dados	64
3.7.1	Peristimulus time histograms - PSTH	64
3.7.2	Curva de <i>tuning</i>	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1	Densidade espacial de gabors	68
4.2	Contraste	70
4.3	Orientação	75
4.4	<i>Grades em traslação</i>	80
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	82
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICES	86
	APÊNDICE A – AS EQUAÇÕES DE GOLDMAN-HODGKIN-KATZ	87
A.1	Aproximação de campo constante	88
	APÊNDICE B – VOLTAGE CLAMP	90
	APÊNDICE C – PARECER COMITÊ DE ÉTICA	91

1 Introdução

O cérebro de maneira geral e o córtex cerebral em particular, são estruturas naturais complexas e auto-organizadas que processam informações através da interação entre bilhões de elementos não lineares (neurônios). Desde os anos 90, a física de sistemas complexos tem dado uma enorme contribuição para o estudo do cérebro. Alguns exemplos são: o estudo da geração de ritmos sincronizados (5–9), o uso de técnicas de teoria da informação para compreensão dos trens de disparos neurais (10–13), a emergência de ondas de atividade coletiva (14–16), o uso de modelos de Ising na compreensão das correlações e atividade global de um sistema sensorial (17, 18) e finalmente, o estudo do possível estado de criticalidade auto-organizada no cérebro e suas implicações (19–21).

Dentre os possíveis sistemas cerebrais a serem estudados, o córtex visual foi o escolhido, mais especificamente, o primário (V1). O córtex visual primário (V1) tem um papel central no processamento visual, pois toda a informação transmitida pela retina (via tálamo) chega em V1, onde é processada e depois distribuída para as demais regiões do córtex visual. Ele é também a primeira região onde a representação do campo visual é fundamentalmente diferente da retina. O estudo mais sistemático das propriedades básicas de processamento de V1 teve início na segunda metade do século XX com registros eletrofisiológicos em gatos, realizados por Hubel e Wiesel (22). Os trabalhos de Hubel e Wiesel fundaram um paradigma de pesquisa ainda hoje muito estudado (22–25).

Estudos de processamento visual pelo córtex geralmente utilizam como modelo animal carnívoros ou primatas, visto que possuem um sistema visual mais refinado, incluindo grandes regiões corticais para processamento visual, alta acuidade, dominância ocular e colunas de frequência espacial (26–28). No entanto, o uso de gatos e macacos envolve custos e uma logística extremamente elevados. Dado que o interesse maior deste trabalho está nas propriedades emergentes da dinâmica de interação neural, mais do que no detalhe da visão, a menor acuidade visual do rato, em princípio, não é um problema. Além disso, o rato permite que futuramente possam ser realizados experimentos nos quais a atividade neural seja registrada com animais acordados e em comportamento livre, sem o uso de anestesia. Isso pode ser fundamental em experimentos que pretendam abordar medidas de criticalidade auto-organizada no cérebro.

Embora existam estudos recentes de propriedades de V1 em roedores (29–31), pouco se sabe sobre codificação e processamento visual em ratos. Este trabalho tem como objetivo a montagem de protocolos de estimulação visual, realizando registros eletrofisiológicos usando matrizes de microeletrodos, que permitam o estudo sobre as propriedades básicas de processamento dos neurônios de V1. A compreensão dessas propriedades propiciará investigações futuras que envolvam a codificação e o processamento de informação visual através dos neurônios de V1. No **Capítulo 2** é fornecida uma revisão de conceitos fundamentais, tais como o funcionamento de neurônios e do sistema visual. Os materiais, o delineamento experimental, as técnicas e os métodos utilizados na condução do trabalho são apresentados no **Capítulo 3**. O **Capítulo 4** apresenta os resultados obtidos a partir de certos protocolos de estimulação visual. Conclusões e perspectivas de trabalhos a serem realizados estão presentes no **Capítulo 5**.

2 Aspectos Gerais

Neste capítulo, são discutidos os conceitos-chaves para a compreensão do sistema estudado. Em primeiro lugar, é feita uma revisão das bases da atividade elétrica de neurônios. Em seguida, é apresentado um panorama da organização do sistema visual, desde a retina até o córtex visual primário, que foi o sistema experimental analisado nesta dissertação.

2.1 Neurônios

Pode-se considerar que a estrutura fundamental para o processamento de informação no cérebro é o **neurônio**. Neurônios são células especializadas na geração e transmissão de sinais elétricos, quando estimulados por processos químicos, elétricos ou mecânicos. Estima-se que existem cerca de 86 bilhões de neurônios no cérebro humano (32), cada uma dessas unidades podendo receber informações de muitas outras (tipicamente 10^4 conexões por neurônio). A estrutura física desses neurônios exibe uma variedade de morfologias, no entanto, os elementos fisiológicos básicos permanecem os mesmos (Figura 1). Eles se dividem em três partes principais: **dendritos**, região ramificada que recebe sinais químicos e elétricos de outros neurônios através das sinapses; **axônio**, um longo cabo delgado que conduz impulsos elétricos (potenciais de ação) para regiões distantes do corpo celular; e **soma**, região responsável pela compilação da informação coletada nos dendritos e pela síntese de proteínas neuronais.

2.1.1 Potencial de membrana

Todas as células vivas apresentam alguma diferença de potencial elétrico (biopotenciais) entre o citoplasma e o espaço extracelular, sendo geralmente o lado interno, o negativo (potencial de repouso das células). No repouso, a superfície extracelular da membrana fica com um excesso de cargas positivas e a superfície citoplasmática possui um acúmulo de cargas negativas (Figura 2). A separação de cargas dá origem a uma diferença de potencial elétrico através da membrana, chamado **potencial de membrana** (V_m). O potencial de membrana é definido pela Equação 2.1, na qual V_i é o potencial no interior da célula e V_e é o potencial externo.

$$V_m = V_i - V_e. \quad (2.1)$$

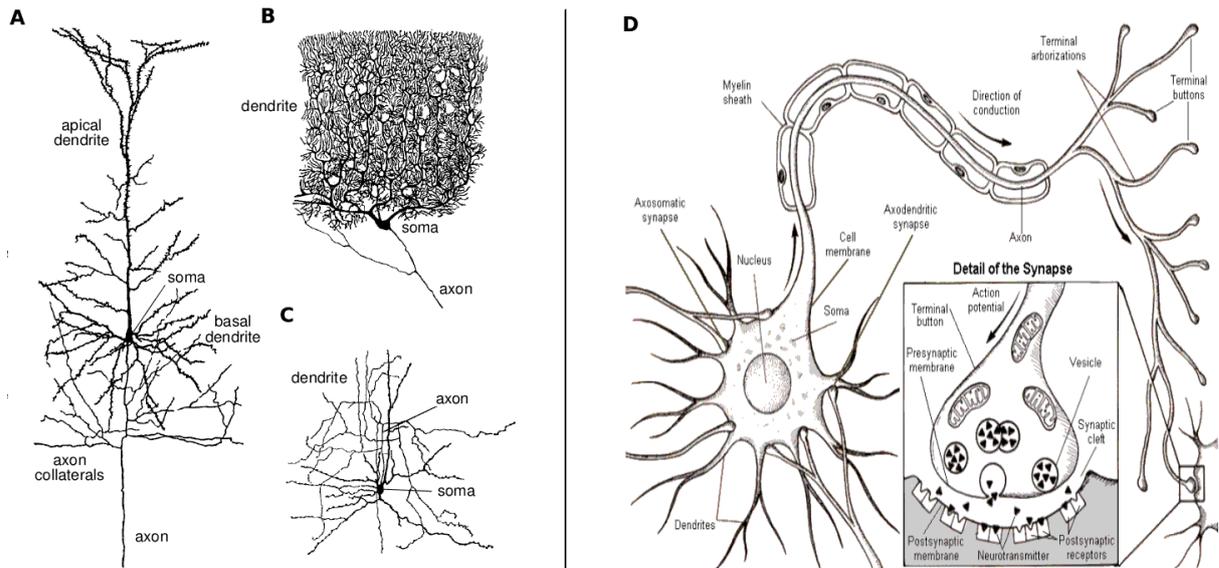


Figura 1 – Diagrama de neurônios. A) Célula piramidal do córtex. Esses são os principais neurônios excitatórios do córtex cerebral. O axônio de células piramidais se ramificam localmente, criando sinapses com neurônios próximos. B) Uma célula de Purkinje do cerebelo. Os axônios dessas células transmitem sinais do córtex cerebelar. C) Célula stellate do córtex cerebral. Essas células pertencem a uma grande classe de células responsáveis por enviar sinais inibitórios para neurônios do córtex cerebral. D) Célula nervosa em detalhes, evidenciando a conexão sináptica. Para dar uma ideia de escala, estas figuras foram amplificadas cerca de 150 vezes (o corpo celular de um neurônio tem, tipicamente, diâmetros da ordem de $15 \mu\text{m}$). (Extraído de Peter Dayan e L.F. Abott (2001))(1)

O potencial de membrana de uma célula em repouso é chamado **potencial de repouso da membrana** (V_r). Por convenção, o potencial extracelular é definido como zero, e o potencial de repouso é igual a V_i . O potencial de repouso típico de neurônios varia entre -60 mV e -70 mV . Todas as sinalizações elétricas partem de alterações no potencial de membrana, devido ao fluxo de íons (correntes) através dela. Isso ocorre por poros existentes na membrana, chamados canais iônicos.

Os canais iônicos são proteínas transmembranares que permitem a passagem seletiva de íons entre os meios intra e extracelulares. Cada canal iônico leva o nome do íon ao qual ele é permeável, tipicamente sódio, potássio, cloreto ou cálcio.

2.1.1.1 Potencial de repouso em células não-excitáveis

Em células não-excitáveis, o potencial de repouso é dado pelo equilíbrio eletroquímico de Gibbs-Donnan sendo esse determinado por três fatores: distribuição assimétrica de íons

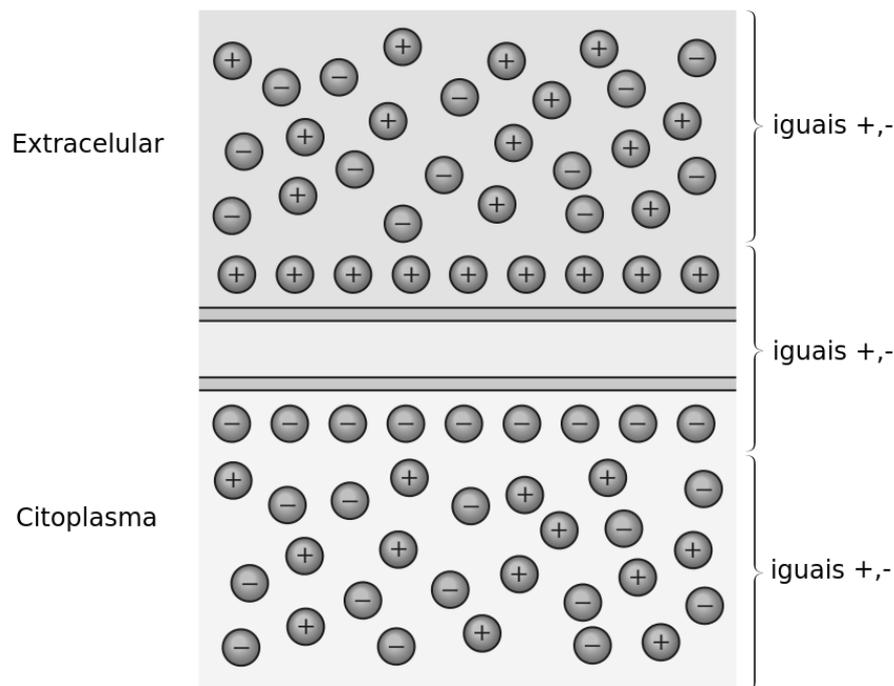


Figura 2 – Diagrama do acúmulo de íons positivos no exterior da membrana celular e de íons negativos no interior, produzindo o potencial de repouso. (Adaptado de E.R. Kandel (2013)) (2)

entre os lados da membrana; a natureza da carga elétrica; e a diferença de potencial através da membrana. Se a espécie difusível consistir de apenas um íon, a equação derivada em 1888 pelo físico-químico alemão Walter Nernst pode ser usada para prever, teoricamente, esse potencial eletroquímico. Esta é uma das equações mais importantes em eletrofisiologia. A equação de Nernst descreve como uma diferença na concentração iônica pode resultar em uma diferença de potencial através da membrana que separa as duas concentrações.

A Figura 3 mostra um reservatório dividido ao meio por uma membrana semipermeável, no qual íons Q se encontram distribuídos assimetricamente entre as partes. As soluções em ambos os lados são assumidas neutras (ao menos, inicialmente), e assim, cada íon Q é balanceado por outro íon Q' com carga oposta. Como o objetivo é a aplicação da equação de Nernst à membrana celular, rotula-se: interno, o lado esquerdo da membrana; externo, o lado direito.

Se a membrana é permeável a Q, mas, não é permeável a Q', devido à diferença na concentração, haverá um fluxo líquido de Q entre os lados da membrana, diminuindo o gradiente de concentração. Esse desbalanceamento na carga gera um campo elétrico que tende a contrapor a difusão de Q. O equilíbrio é atingido quando o campo elétrico balanceia essa difusão. Observa-se que mais íons Q que Q' estão presentes em um lado, e do outro, menos íons Q que Q', fazendo

de um mol de elétrons, $[Q]_i$ e $[Q]_e$ representam respectivamente as concentrações para o íon Q interna e externamente à membrana e R é a constante universal dos gases.

$$V_Q = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[Q]_e}{[Q]_i} \right) = \frac{kT}{zq} \ln \left(\frac{[Q]_e}{[Q]_i} \right) \quad (2.5)$$

Quando $V = V_Q$ não ocorre um fluxo líquido de corrente de Q através da membrana, visto que há um balanceamento entre os gradientes de difusão e elétricos. O vazamento de íons Q se faz através de canais iônicos permanentemente abertos. Como todos os transportadores transmembranares, esses canais são altamente seletivos e deixam passar apenas uma espécie de íon. A seletividade é determinada por dois fatores: o tamanho da abertura do próprio canal protéico e a presença de cargas opostas intracanal.

Essa descrição se aplica bem às células **glia**, que exibem um potencial de repouso de cerca de -75 mV (Tabela 1). Nessas células, a membrana é permeável praticamente só ao K^+ .

Tabela 1 – Distribuição dos principais íons através da membrana em repouso para o axônio gigante da lula. (Dados extraídos de E.R. Kandel (2013) (2))

íons	Concentração no Citoplasma (mM)	Concentração no meio extra celular (mM)	Potencial de equilíbrio (mV)
K^+	400	20	-75
Na^+	50	440	+55
Cl^-	52	560	-60
A^- (íons orgânicos)	385	-	-

2.1.1.2 Potencial de repouso em células excitáveis

Em células excitáveis, o potencial de repouso não pode ser considerado um equilíbrio eletroquímico "verdadeiro", devido a existência de mais de um canal iônico em ação. Pela abordagem de Gibbs-Donnan, os íons de potássio, levados pelo gradiente de difusão, saem da célula e deixam o seu interior, negativo. No entanto temos que levar em conta também a entrada de íons de sódio (Na^+).

Mesmo sendo o número de canais de potássio 25 vezes superior ao de sódio, em um tempo longo, os gradientes elétrico e difusivo seriam esgotados. Ambos os lados da membrana ficariam com iguais quantidades de íons de potássio, levando a um potencial de Nernst igual a zero. Ou seja, com gradientes nulos, a diferença de potencial através da membrana seria nula,

e o potencial de repouso desapareceria. No entanto, essa erosão nos gradientes iônicos não é observada pois um processo ativo (com gasto de ATP) mantém esses gradientes estáveis. A estrutura responsável por manter este gradiente é conhecida como bomba de sódio-potássio.

Para manter seu potencial elétrico, a célula precisa de uma baixa concentração de íons de sódio e de uma elevada concentração de íons de potássio em seu interior. Fora das células há uma alta concentração de sódio e uma baixa concentração de potássio. As **bombas de sódio-potássio** mantêm as concentrações ideais, enviando sódio para fora da célula e potássio para dentro dela. Nota-se que esse transporte é realizado contra os gradientes de concentração dos dois íons. Isso ocorre por causa da energia liberada pela quebra das moléculas de ATP.

Tabela 2 – Permeabilidade relativa dos íons. Dada apenas para o potencial de repouso.

íons	Permeabilidade
K ⁺	1
Na ⁺	0,04
Cl ⁻	0,45

A determinação do potencial de repouso de uma célula excitável não pode ser feita a partir da equação de Nernst, por causa da existência de mais de um canal iônico na membrana celular. Para essa configuração foi desenvolvida uma generalização da equação de Nernst, a equação de Goldman-Hodgkin-Katz. Essa equação é derivada a partir dos estudos em torno da teoria de campo constante, realizados por Goldman , Hodgkin e Katz (33), mostrada abaixo (deduzida no Apêndice A). Esta equação calcula o potencial de repouso, fazendo uma média dos potenciais de Nernst de cada íon ponderados pela permeabilidade da membrana a cada um deles (Tabela 2).

$$V_{repouso} = -\frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{Na}[Na^+]_i + P_K[K^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_e}{P_{Na}[Na^+]_e + P_K[K^+]_e + P_{Cl}[Cl^-]_i} \right) \quad (2.6)$$

2.1.1.3 Potencial de ação (*Spike*)

A complexidade de células excitáveis é justificada por serem capazes de produzir **Potenciais de ação**. O potencial de ação ocorre devido à não-linearidade do comportamento do neurônio, quando despolarizado acima de um limiar. Esta despolarização em condições normais

ocorre por um conjunto de sinais químicos e elétricos, capturados nas conexões sinápticas¹ e processados no soma. Computados esses sinais, o potencial de repouso da célula (que fica por volta de -70 mV) deverá sofrer uma brusca alteração (disparo), invertendo sua polaridade. As taxas desses disparos podem ser vistas como a linguagem de comunicação dos neurônios.

Antes da ocorrência do potencial de ação, a dinâmica neuronal é dominada por um falso equilíbrio eletroquímico (potencial de repouso), uma vez que esse é mantido via gasto de ATP. Os três íons (Na^+ , K^+ e Cl^-) fluem pela membrana através de seus respectivos canais, porém, suas permeabilidades estão ajustadas de modo que K^+ ainda seja o íon dominante saindo da célula. Íons Na^+ entram na célula em uma taxa bem menor que a da saída de K^+ . Já íons Cl^- não são transportados ativamente contra seu gradiente químico, distribuem-se passivamente (Tabela 3).

Posto o cenário pré-disparo, o que faz um neurônio emitir um potencial de ação? Esse fenômeno pode ser entendido com o conceito de uma nova modalidade de canais iônicos, chamada *gated channels*. Canais com "portões", que podem ser ativados por dois tipos básicos de estímulos: alteração na voltagem transmembrana ou via ligações com moléculas neurotransmissoras. O íon Na^+ possui dois tipos de portões, um de ativação e outro de inativação. O íon K^+ é contemplado apenas com portões de ativação.

Aplicando esse conjunto de ideias, a curva do potencial de ação pode ser facilmente compreendida (Figura 4). Inicialmente, com a célula em repouso, os portões de ativação para Na^+ e K^+ estão fechados, enquanto os de inativação para Na^+ encontram-se abertos (estado A - **potencial de repouso**). Em seguida, um estímulo elétrico é aplicado fazendo com que os portões de ativação para Na^+ e K^+ sejam ativados subsequentemente. Portões de Na^+ abrem mais rapidamente que os de K^+ . Com isso, uma grande quantidade de íons de Na^+ entram primeiro na célula, tornando seu interior menos negativo (estado B - **despolarização**). Quando a despolarização atinge um máximo, portões de inativação para Na^+ se fecham, enquanto os de ativação para Na^+ e K^+ continuam abertos. Nessa etapa, apenas K^+ deixa o citoplasma, tornando-o mais negativo (estado C - **repolarização**). Ainda no estado de repolarização, dá-se o fechamento dos portões de ativação para Na^+ . Devido ao fechamento lento dos portões de ativação para K^+ , o interior da célula fica mais negativo que no repouso (estado D - **hiperpolarização**).

¹ Há duas modalidades de conexões sinápticas. Sinapses elétricas, nas quais neurônios estão conectados entre si através de estruturas protéicas, chamadas **Junções**. Nas **Junções** se dá a troca de correntes iônicas. E sinapses químicas, que são regiões nas quais neurotransmissores são liberados mediante a chegada de um potencial de ação, realizando a comunicação entre os neurônios.

Nem todas as perturbações que chegam aos neurônios são capazes de produzir um potencial de ação. A despolarização da célula deve ultrapassar um certo valor (específico de cada célula), denominado **limiar**. Estímulos abaixo do limiar produzem curvas de pequenas amplitudes (disparos frustrados), conhecidas como **potenciais sinápticos**. Esses advêm de estímulos capturados pelas sinapses. Uma vez estabelecida a curva que define um potencial de ação (Figura 4), a amplitude dessa curva é independente da intensidade do estímulo.

Tabela 3 – Variação da permeabilidade iônica na ocorrência de um Potencial de ação

Especie iônica	Repouso	Despolarização	Hiperpolarização	Volta ao repouso
K^+	1	1	100	1
Na^+	0,04	20	0,04	0,04
Cl^-	0,45	0,45	0,45	0,45

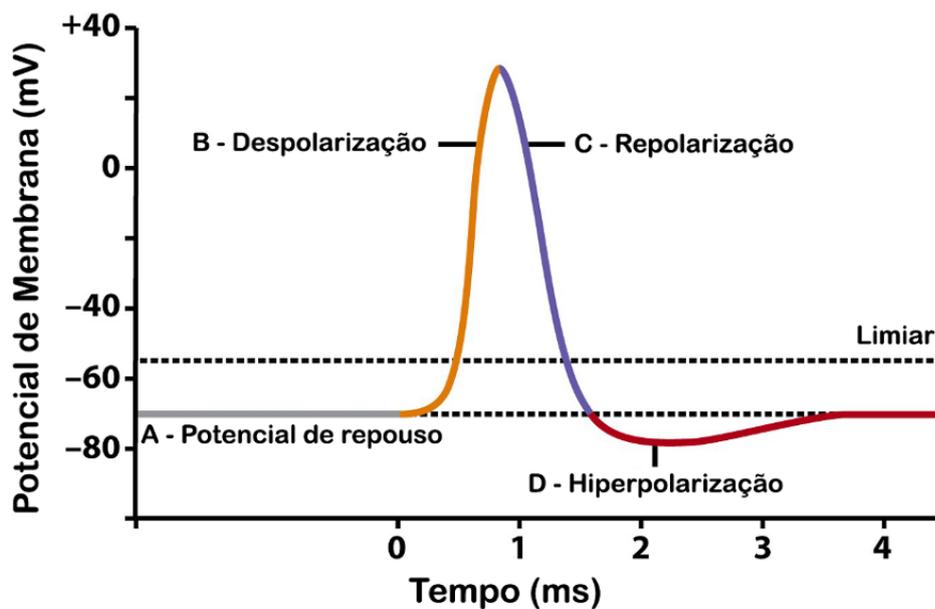


Figura 4 – Curva do potencial de ação. Inicialmente o neurônio se encontra em um potencial de repouso (-70 mV) - estado A. Ao sofrer uma perturbação que eleve seu potencial acima de um dado limiar, o potencial de membrana segue em direção a valores mais contrastantes que os do repouso - estado B. Ao atingir um máximo de despolarização o potencial retorna a valores negativos - estado C. Com a repolarização, o fechamento lento dos portões de ativação para K^+ , faz o interior da célula ficar, temporariamente, mais negativo que no repouso - estado D.

2.1.2 Modelo de Hodgkin-Huxley

As propriedades neuronais, descritas na seção anterior, se tornaram mais claras graças aos estudos da membrana do axônio gigante da lula, realizados por Alan Hodgkin, Andrew Huxley e Bernard Katz, na primeira metade do século XX (34–37). Os resultados obtidos por Hodgkin e Huxley foram alcançados por meio de uma técnica experimental desenvolvida por Kenneth Cole em 1949, chamada **fixação de voltagem**, do inglês *voltage clamp* Apêndice B. Baseado em uma série de experimentos *voltage clamp*, Hodgkin e Huxley desenvolveram um detalhado modelo matemático da dependência temporal e da voltagem das condutâncias para Na^+ e K^+ . O estudo dos dados obtidos via *voltage clamp* levaram ao desenvolvimento de um conjunto de equações diferenciais acopladas que descrevem a base iônica do potencial de ação (37), que ficou conhecido como o **Hodgkin-Huxley (HH)**. Por suas contribuições, Hodgkin e Huxley foram premiados com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1963 (compartilhado com John Eccle por trabalhos relacionados às bases biofísicas das transmissões sinápticas).

Hodgkin e Huxley modelaram um segmento do axônio gigante de uma lula, usando um circuito similar ao da Figura 5. No circuito equivalente, a corrente que atravessa a membrana possui duas componentes principais, uma associada à capacitância da membrana e outra ao fluxo de íons fluindo pelos canais resistivos da membrana. A corrente de capacitância I_c é definida por $I_c = \frac{dq}{dt}$. A carga $q(t)$ está relacionada com o potencial de membrana $V_m(t)$ e com a capacitância C_m por $q = C_m V_m$. Assim, a corrente capacitiva pode ser reescrita como $I_c = C_m \frac{dV_m}{dt}$. No modelo HH, a corrente iônica se subdivide em três distintas componentes, I_{Na} , I_K e uma pequena corrente de fuga² I_L (devido aos íons de cloreto).

A Equação diferencial 2.7 descreve o circuito da Figura 5, na qual $I_{externa}$ corresponde à corrente aplicada. Essa equação relaciona alterações no potencial de membrana ao fluxo de corrente através da mesma. A corrente iônica total I_{ion} , Equação 2.8, é a soma algébrica das contribuições individuais de todos os canais presentes na membrana celular.

$$C_m \frac{dV_m}{dt} + I_{ion} = I_{externa} \quad (2.7)$$

$$I_{ion} = \sum_k I_k = \sum_k G_K (V_m - E_K) \quad (2.8)$$

² O subscrito L vem do inglês *leak*.

No modelo HH, a Equação 2.8 se apresenta como:

$$I_{ion} = G_{Na}(V_m - E_{Na}) + G_k(V_m - E_k) + G_L(V_m - E_L) \quad (2.9)$$

Nessa equação, os G s correspondem às condutâncias dos respectivos canais iônicos. Para explicar seus dados experimentais, Hodgkin e Huxley postularam que G_{Na} e G_K são grandezas que possuem dependência de voltagem, enquanto a condutância de fuga G_L fica constante.

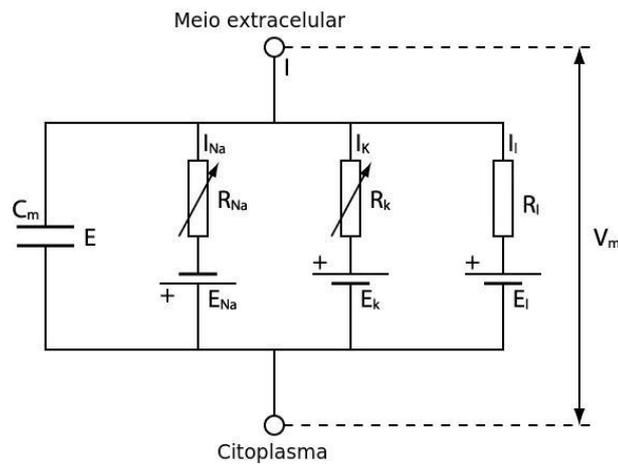


Figura 5 – Circuito elétrico equivalente a um curto segmento do axônio gigante de uma lula. O capacitor representa a capacitância da membrana celular. As resistências representam condutâncias dependentes de voltagem G_{Na} e G_K . As baterias representam potenciais de Nernst para as respectivas condutâncias.

A condutância no modelo HH surge do efeito combinado de inúmeros canais iônicos presentes na membrana. Canais iônicos contêm um ou mais portões que regulam o fluxo de íons pelo canal. A dependência da voltagem no acionamento desses portões foi implementada no modelo HH por meio da probabilidade de um dado portão individual estar em um estado permissivo ou não-permissivo. Supondo que em algum tempo t seja $p(t)$ a fração de portões para um determinado tipo de íons que estão no estado permissivo, $1 - p(t)$, conseqüentemente, deve ser referente aos portões não-permissivos. Para o modelo HH, assume-se que a transição entre estados permissivos e não-permissivos obedece à equação diferencial de primeira ordem:

$$\frac{dp}{dt} = \alpha(V)(1 - p) - \beta(V)p, \quad (2.10)$$

em que $\alpha(V)$ representa a taxa com a qual portões transitam de não-permissivos para permissivos e $\beta(V)$ exerce representação oposta. Quando o potencial de membrana V_m é fixado

em algum valor V , a fração de portões permissivos atinge um estado estacionário ($\frac{dp}{dt} = 0$, com $t \rightarrow \infty$).

$$p_{t \rightarrow \infty} = \frac{\alpha(V)}{\alpha(V) - \beta(V)}. \quad (2.11)$$

Assim, a condutância para um certo íon k pode ser tomada como:

$$G_k = \bar{g}_k \prod_i p_i. \quad (2.12)$$

O produtório corre sobre os portões de íons do tipo k , e \bar{g}_k é a constante de normalização que determina a condutância máxima, quando todos os portões se encontram permissivos.

Hodgkin e Huxley modelaram a condutância para os canais de sódio, por meio de três portões de ativação rotulados por m e um de inativação h , conforme a equação:

$$G_{Na} = \bar{g}_{Na} p_m^3 p_h = \bar{g}_{Na} m^3 h. \quad (2.13)$$

Da mesma maneira, condutâncias para os canais de potássio são modeladas por quatro portões de ativação tipo n :

$$G_K = \bar{g}_K p_n^4 = \bar{g}_K n^4. \quad (2.14)$$

Definidas as variáveis de ativação m , h e n , as Equações (2.7) e (2.10) podem ser reescritas como:

$$I_{externa} = C_m \frac{dV_m}{dt} + \bar{g}_{Na} m^3 h (V_m - E_{Na}) + \bar{g}_K n^4 (V_m - E_K) + g_L (V_m - E_L), \quad (2.15)$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(V)(1 - m) - \beta_m(V)m, \quad (2.16)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(V)(1 - h) - \beta_h(V)h, \quad (2.17)$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(V)(1 - n) - \beta_n(V)n. \quad (2.18)$$

A completa apresentação do modelo HH depende da determinação das seis funções (α_m , β_m , α_h , β_h , α_n , β_n) das Equações 2.16, 2.17 e 2.18. Essas funções podem ser determinadas a partir do ajuste de dados de *voltage clamp*. A geração de potenciais de ação pelo modelo HH parte da integração numérica do conjunto de equações acima (Figura 5).

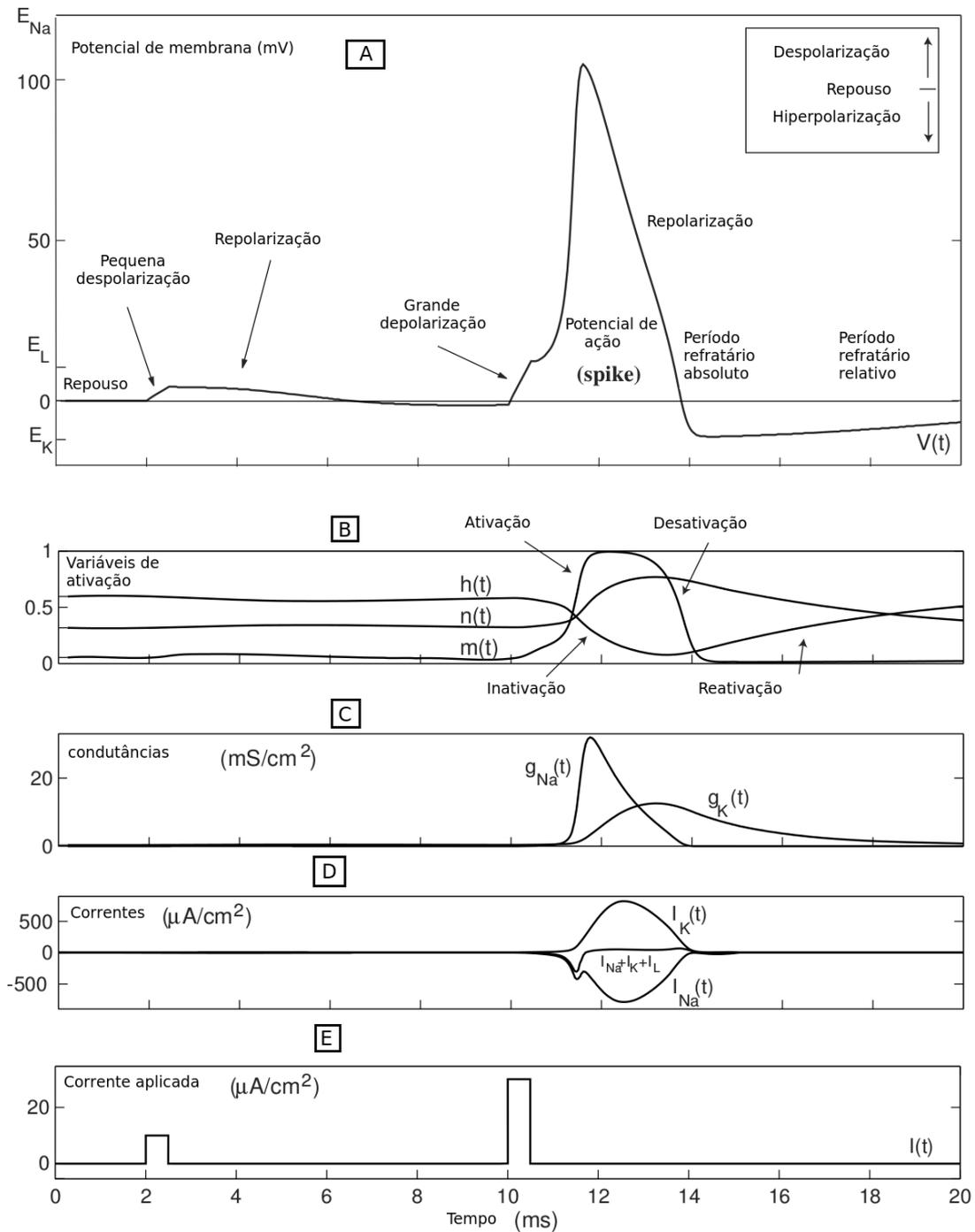


Figura 6 – A) Potencial de ação gerado pelo modelo de Hodgkin e Huxley. B) Comportamento das variáveis h , n e m no momento do *spike*. C) e D) Condutâncias e correntes respectivamente, mediante a perturbação produzida por um pulso de corrente. E) Pulso de corrente usado como estímulo. (Adaptado de Izhikevich (2007)(3))

2.2 Caminho visual

O processamento visual se inicia com a focalização, pelos olhos, de luz nas duas retinas. Na retina encontra-se uma camada de células fotorreceptoras que realizam a conversão de sinais luminosos em eletroquímicos. Essas células se dividem em dois tipos, cones e bastonetes, assim nomeados pelo seu formato.

Células bastonetes são responsáveis pela visão noturna, respondendo bem a pouca luminosidade. Esses bastonetes estão mais presentes na periferia da retina. Células cones são encontradas principalmente na região central da retina (Figura 7B) e são responsáveis por tarefas que envolvem acuidade, sendo também responsáveis pela percepção de cores. Em humanos existem três modalidades de cones, classificados de acordo com sua resposta a certos comprimentos de onda: azul, verde e vermelho (Figura 7A).

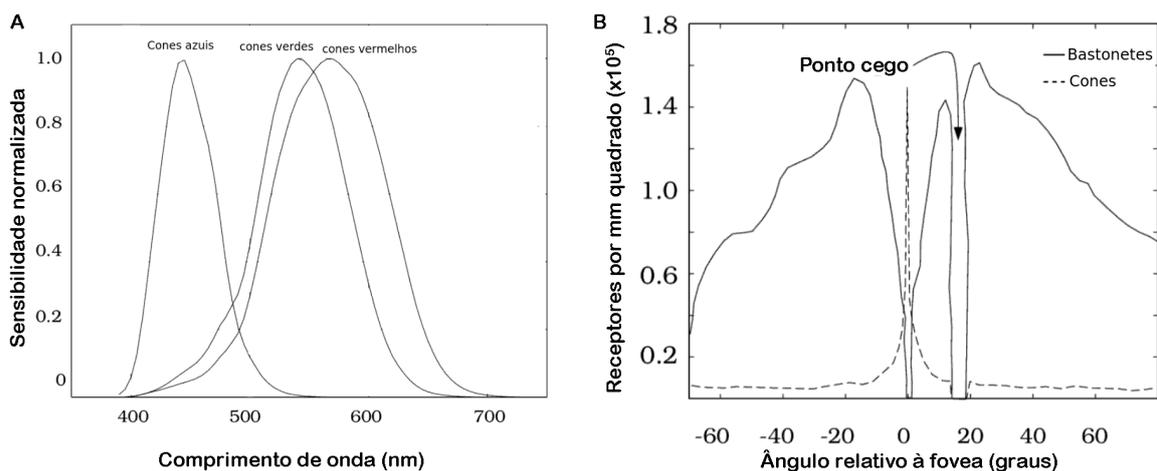


Figura 7 – Propriedades de fotorreceptores: (A) Sensibilidade espectral de cones no olho humano; (B) Distribuição de cones e bastonetes ao longo da retina humana. Disponível em: <https://foundationsofvision.stanford.edu/chapter-3-the-photoreceptor-mosaic/>

O sinal processado pelos fotorreceptores atravessa as demais camadas da retina, passando por células bipolares horizontais até chegar às células ganglionares. Essas células ganglionares possuem a habilidade de emitir potenciais de ação. Os axônios das células ganglionares da retina deixam o olho via nervo óptico e atravessam parcialmente o chiasma óptico, formando o trato óptico. Cada trato óptico “olha” o campo visual oposto, combinando *entradas* da retina temporal ipsilateral e da retina nasal contralateral (Figura 8).

A retina projeta informações para três regiões subcorticais no cérebro: o núcleo geniculado lateral (LGN), principal fonte de *inputs* para o córtex visual primário; o colículo superior,

que controla o movimento dos olhos; e o pretectum, que controla o reflexo pupilar.

O LGN se localiza na região central do tálamo. Cada LGN contém seis camadas de neurônios agrupadas de acordo com a especificidade (Figura 8). Camadas de células responsáveis pelo processamento de cores e estruturas finas são conhecidas como **parvocelular**. Camadas celulares que processam contraste e movimento são denominadas **magnocelular**. As projeções do LGN chegam ao córtex visual primário através do canal de radiação óptico.

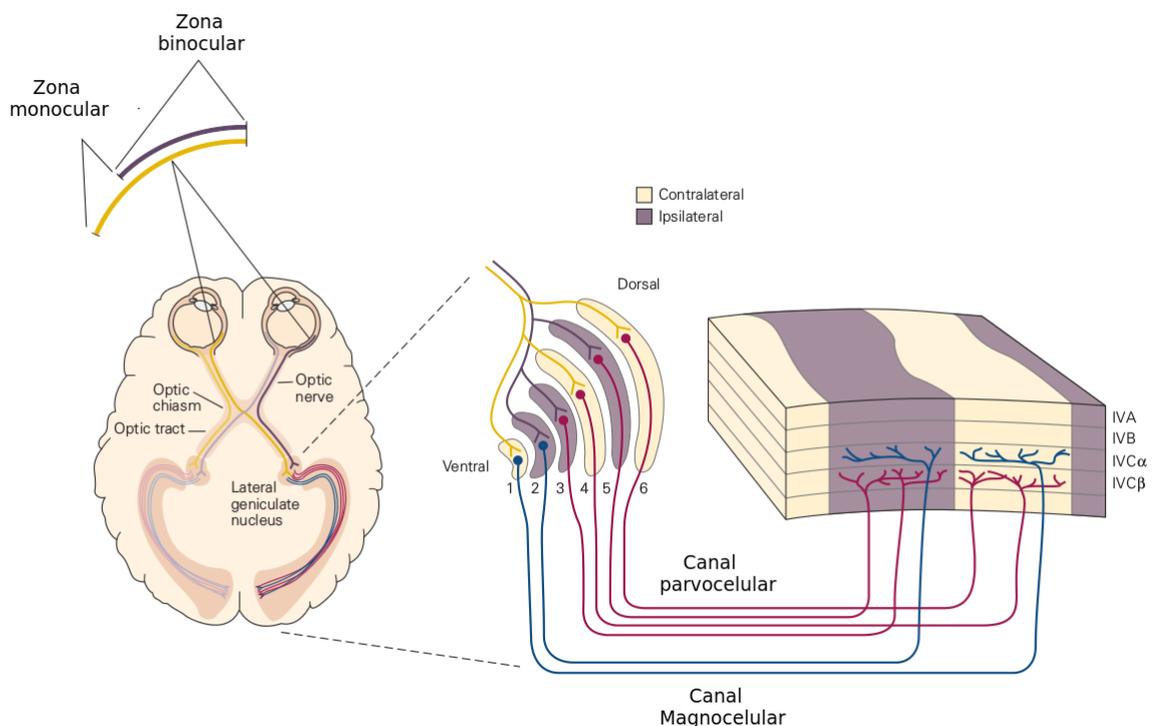


Figura 8 – Projeções do LGN ao córtex visual primário. O LGN recebe *entradas* da retina temporal do olho ipsilateral e da retina nasal do olho contralateral, em cada hemisfério. O núcleo é uma estrutura laminada comprimindo quatro camadas parvocelular (camadas 3 a 6) e duas camadas magnocelular (camadas 1 e 2). As projeções dos dois olhos terminam em diferentes camadas: o olho contralateral projeta para as camadas 1, 4 e 6, enquanto o olho ipsilateral projeta para as camadas 2, 3 e 5. Os canais parvocelular e magnocelular chegam ao córtex visual primário em subcamadas separadas. As camadas parvocelular projetam para a camada $IVC\beta$ e as camadas magnocelular para camadas $IVC\alpha$ (2).

2.2.1 Córtex visual primário

O córtex visual primário (V1) é a região de entrada da informação visual no córtex cerebral. Os neurônios de V1 projetam conexões com diversas outras regiões do córtex visual

onde é posteriormente refinado o processamento de forma, cor, movimento e etc. V1 é uma das áreas corticais melhor compreendidas, constituindo um dos principais sistemas para o estudo de circuitos corticais e computação. Os trabalhos primordiais na caracterização de propriedades de V1 se deram por volta das décadas de 50 e 60 com o registro da atividade elétrica em animais, realizados por Hubel e Wiesel (22–24).

2.2.1.1 Localização e Conexão

A Área V1 está localizada em ambos os hemisférios. V1 no lado direito recebe entradas do LGN direito, conseqüentemente, das porções à direita das duas retinas, que capturam imagens do campo visual esquerdo. Semelhantemente, o lado esquerdo de V1 processa informação do campo visual direito.

O córtex visual primário se encontra dividido em seis camadas: 1, 2, 3, 4(A, B, C α , C β), 5 e 6, elencadas na direção dorsoventral. Essas camadas são constituídas primordialmente por células piramidais e não-piramidais, que podem ser: estreladas espinhosas ou estreladas suaves. Os *inputs* oriundos do LGN chegam em V1 pela camada 4, que projeta conexões para as demais camadas. Essa projeção é formada por células estreladas espinhosas. Células piramidais realizam a integração entre as camadas de V1, assim como, conectam camadas de V1 a camadas externas (V2, V3, 4, 5, córtex médio temporal) ou mesmo as conectam a regiões externas ao córtex visual (Figura 9).

As projeções de V1 para outras áreas do cérebro ocorrem através de duas rotas principais de processamento de informações: fluxo dorsal, indo de V1 para o córtex parietal; e fluxo ventral, deixando V1 até o córtex temporal (Figura 10), sendo esses os responsáveis pelo processamento de outros aspectos visuais. O fluxo dorsal está preliminarmente envolvido no movimento visual (visão espacial), com respostas similares às células magnocelulares e com frequências temporais. Em contrapartida, o fluxo ventral processa informações semelhantes às conduzidas pelas células parvocelulares, tais como alta seletividade a padrões e objetos (reconhecimento de objetos), sendo essas informações mais associadas à frequências espaciais.

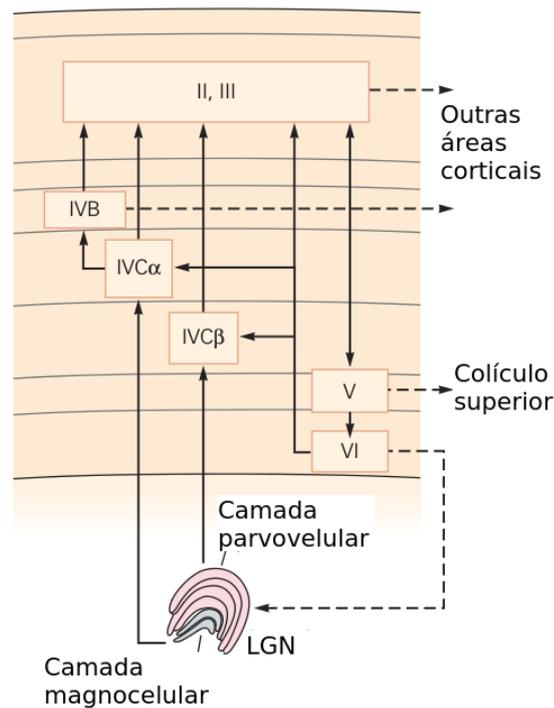


Figura 9 – Fluxo de informações através das camadas de V1. Regiões intralaminares do LGN projetam para as camadas 2 e 3 de V1. Magnocelular e parvocelular projetam para as subcamadas 4C. A camada 4C projeta axônios colateralmente para camadas 4B, 2 ou 3. Camadas 2 e 3 projetam para camada 5 que por sua vez projeta para ambas as camadas 2, 3 e 6. A camada 6 projeta axônios colateralmente para a camada 4C. Projeções de saída para outras áreas corticais partem das camadas 2, 3 e 4B. Projeções de saída para áreas subcorticiais partem das camadas 5 e 6. (Adaptado de E.R. Kandel) (2)

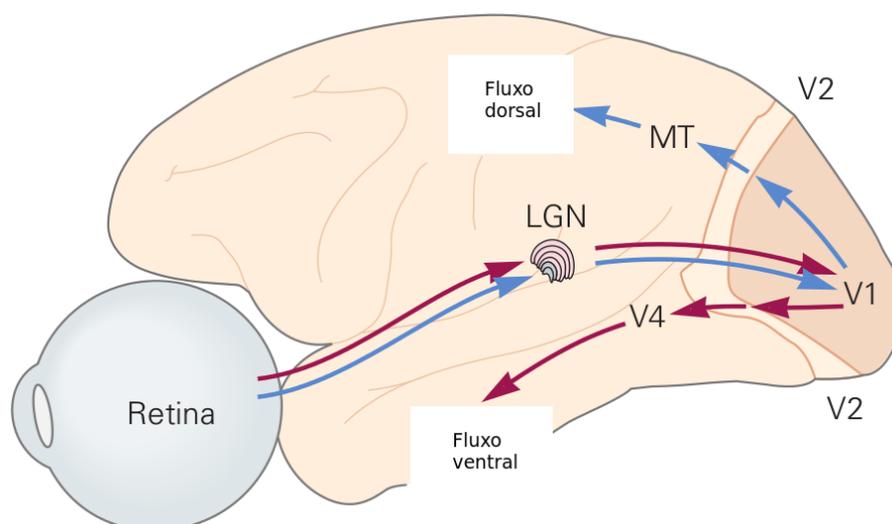


Figura 10 – Caminho visual em humanos. Fluxo dorsal responsável pelo processamento de informações relacionadas à movimentos e frequências temporais. Fluxo ventral responsável pelo processamento de informações ligadas a reconhecimento de formas, frequências espaciais. (Adaptado de E.R. Kandel (2013)) (2)

2.2.1.2 Organização retinotópica

Os neurônios de V1 se organizam ordenadamente, de modo a formarem uma representação 2D da imagem capturada pela retina. Essa propriedade é conhecida como organização retinotópica. Pontos vizinhos no campo visual são representados por regiões próximas no córtex visual.

O conceito de organização retinotópica pode ser compreendido a partir da Figura 11. Tem-se o campo visual A), sua representação no LGN B) e no córtex visual primário C) em macacos. No entanto, essa representação do campo visual pelo córtex visual é distorcida. Note que a região foveal (central 5 graus A)) é representada por uma grande área (região hachurada B) e C)) se comparada com a região periférica da retina, equivalendo a 40% do mapa (38). Pode-se verificar também que a parte superior do campo visual é representada na parte inferior de V1.

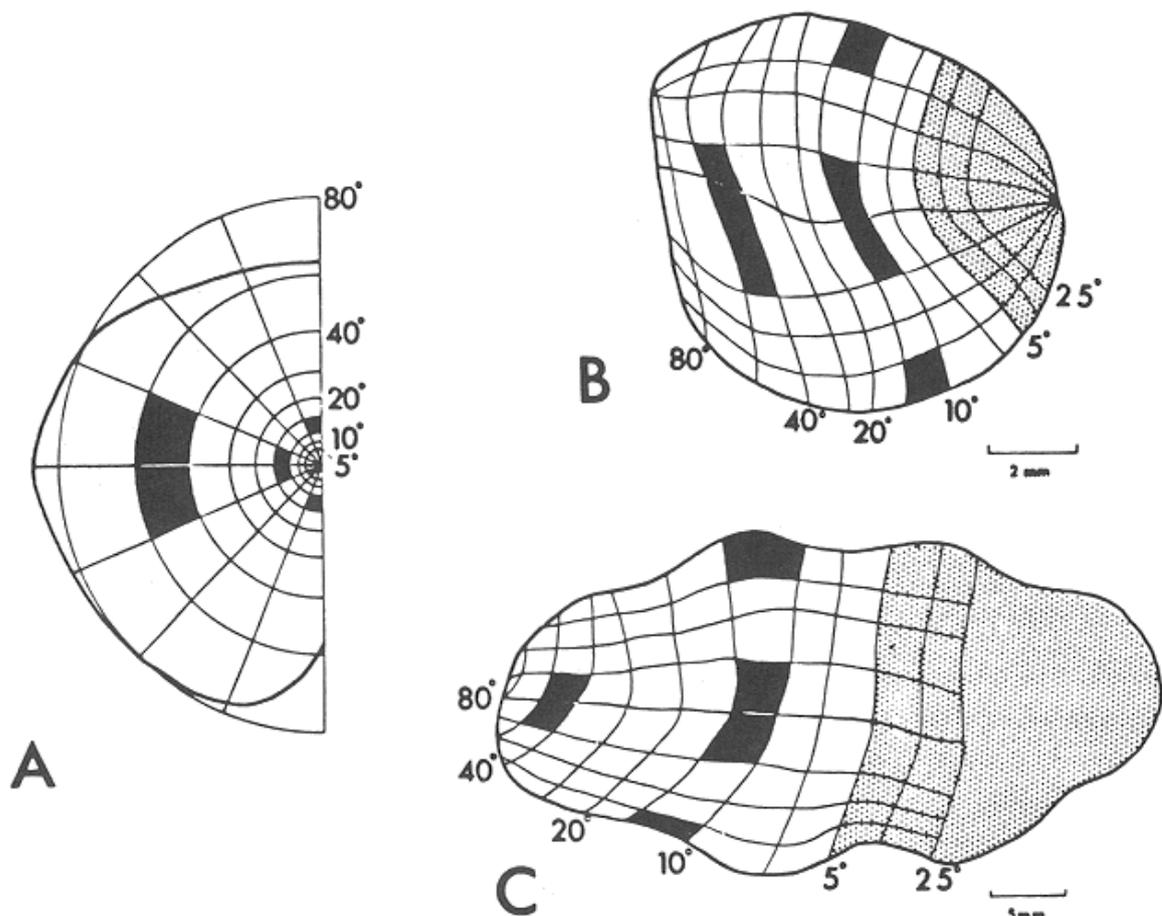


Figura 11 – Organização retinotópica para LGN e Córtex Visual. A) Campo visual. B) Representação da organização retinotópica para o LGN. C) Representação da organização retinotópica para o Córtex Visual.

2.2.1.3 Campos receptivos visuais

Segundo Hartiline, um campo receptivo visual pode ser definido como a região restrita do espaço visual em que um estímulo luminoso pode incrementar a taxa de disparos de unidades neuronais (39). O campo receptivo de neurônios visuais compreende uma região bidimensional no espaço visual, cujo tamanho pode variar de poucos graus visuais (um ponto na folha de leitura) a dezenas de graus (página inteira). O tamanho do campo receptivo aumenta à medida que se avança nos estágios de processamento do caminho visual.

Percorrendo os estágios de processamento do caminho visual, observa-se que os campos receptivos de neurônios nessas regiões variam não somente em tamanho como em estrutura. Nos primeiros estágios de processamento (retina e tálamo), os campos receptivos são pequenos e apresentam uma simetria circular concêntrica. Kuffler rotulou essa estrutura de *center-surround* (40). Células com campos receptivos *center-surround* são classificadas em *ON* e *OFF*. Essa dicotomia pode ser entendida a partir da Figura 12. Ela traz a idealização de um experimento com as possíveis respostas celulares (tipicamente do tálamo ou ganglionares) a certos padrões de estímulos. 1) mostra a estimulação do centro de campos receptivos de células *ON* e *OFF* por um ponto luminoso e um ponto negro, respectivamente. Ainda em 1), pode-se acompanhar a resposta sustentada e transiente³ aos dois tipos de estímulos. 2) O mesmo estímulo de 1) aplicado à periferia provoca a supressão da atividade neural. 3) Uma estimulação em todo o campo receptivo de ambas as células provoca uma tímida alteração na taxa de disparo. 4) Estimulação conjunta do centro e periferia provocando uma vigorosa alteração na taxa de disparo.

Em V1 os campos receptivos são mais complexos que no tálamo ou na retina, sendo a primeira etapa do processamento visual onde os campos receptores não têm simetria circular, sendo de maneira geral sensíveis a estímulos alongados, como barras luminosas ou escuras. A caracterização dos campos receptivos de V1 foi inicialmente estudada por Hubel e Wiesel (22, 23). A partir dessa caracterização eles classificaram as células de V1 em dois tipos: células simples, nas quais os campos receptivos apresentam regiões *ON* e *OFF* separáveis (Figura 13 A) e células complexas que não possuem separação entre regiões *ON* e *OFF* (Figura 13 B). Regiões *ON* respondem a barras luminosas, enquanto regiões *OFF* a barras escuras.

³ Mediante a estimulação de seus campos receptivos as células podem responder em dois ritmos de atividade: atividade sustentada, na qual a célula sustenta um patamar de atividade, acima ou abaixo do basal, por toda a janela de estimulação; e atividade transiente, nas células com esse tipo de atividade, a resposta neural desvia do basal apenas no começo da estimulação.

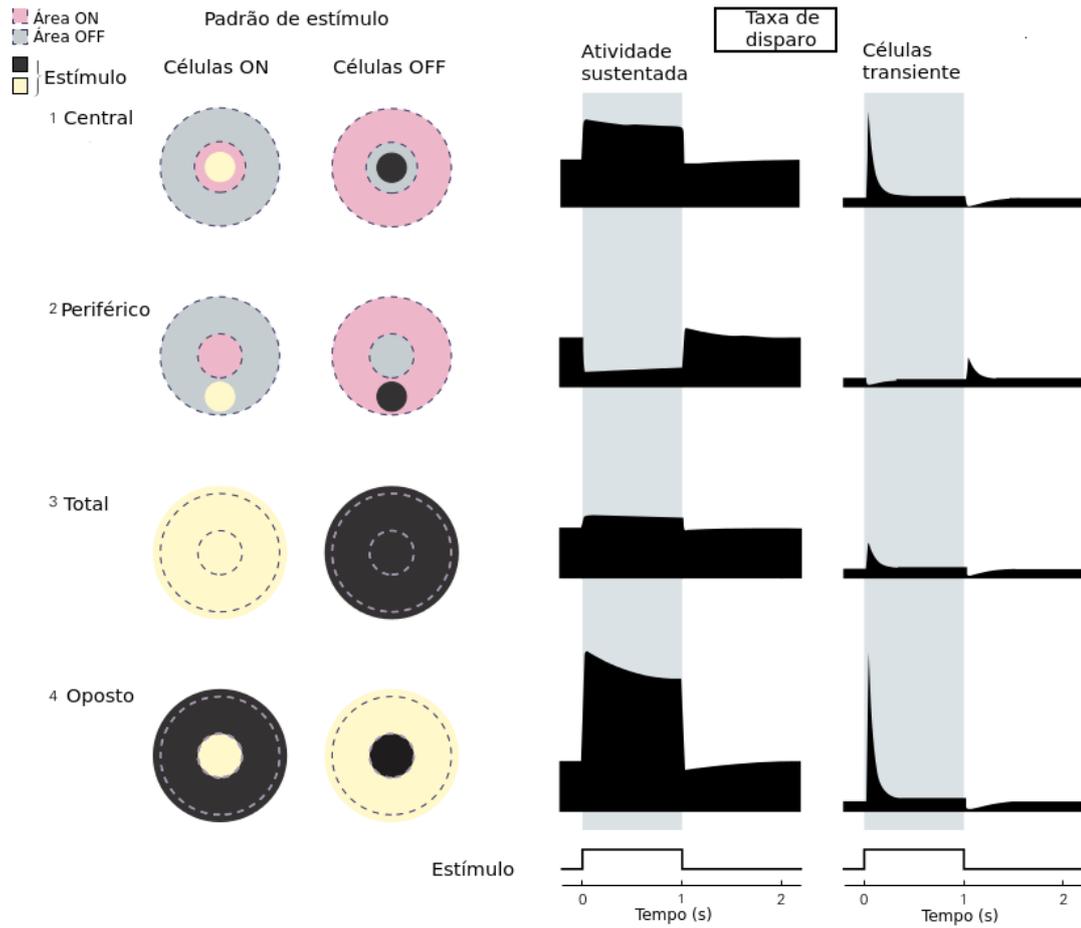


Figura 12 – Resposta de células ganglionares da retina com campos receptivos *center-surround* (Adaptado de E.R. Kandel (2013) (2)).

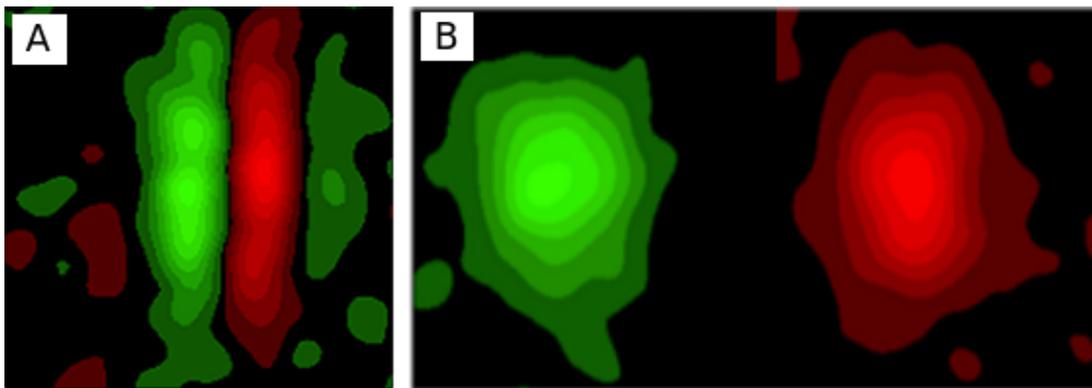


Figura 13 – Regiões ON (verde) e OFF (vermelho) compondo campos receptivos para células simples A) e complexas B) em V1. (Adaptado de DeAngelis *et al.*, (1995) (4)).

A diferença fundamental entre células simples e complexas é que as células simples disparam potenciais de ação em resposta a barras luminosas (escuras) presentes só nas regiões ON (OFF) de seus campos receptores, enquanto que as células complexas respondem igualmente bem a esta barra em qualquer posição dentro de seu campo receptor (insensível à fase). A caracterização de células de V1 como simples ou complexa é feita através do cálculo da taxa de disparo média de uma unidade neuronal, quando estimulada por barras, pontos ou grades.

2.2.1.4 Arquitetura funcional

Além da organização retinotópica, onde neurônios próximos em V1 respondem a regiões próximas no campo visual, também encontramos outras estruturas de organização em função de propriedades mais abstratas da resposta neural. Desta forma encontramos em V1 a organização de seus neurônios em colunas conforme sua funcionalidade de processamento (2). Dentre as organizações colunares presentes em V1 estão colunas de orientação (Figura 14) e colunas de dominância ocular (Figura 15).

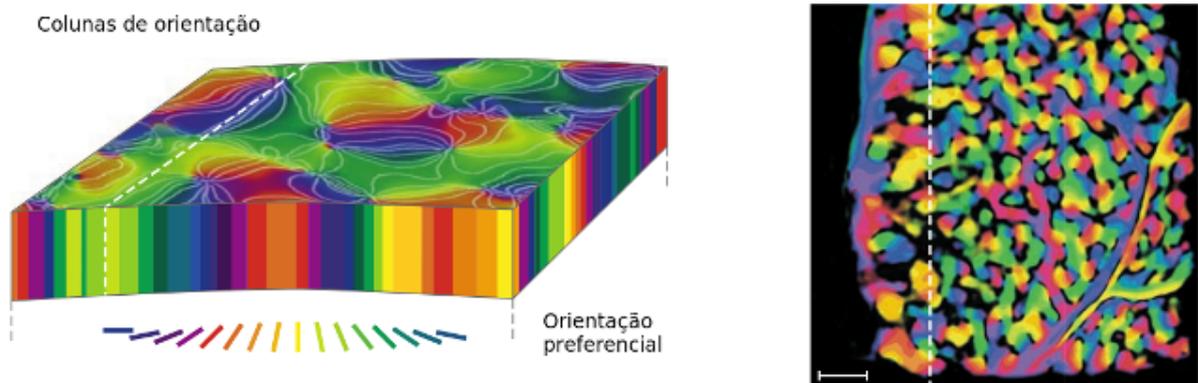


Figura 14 – Colunas de orientação. As diferentes cores indicam a preferência orientacional das colunas. A barra de escala representa 1 mm. (Adaptado de E.R. Kandel (2013) (2)).

Células com seletividade a orientação similar são agrupadas em uma mesma coluna. Na superfície cortical (em gatos, macacos e seres humanos) há ciclos de preferência orientacional, horários e anti-horários, com período π distando entre si $750\mu\text{m}$ (Figura 14).

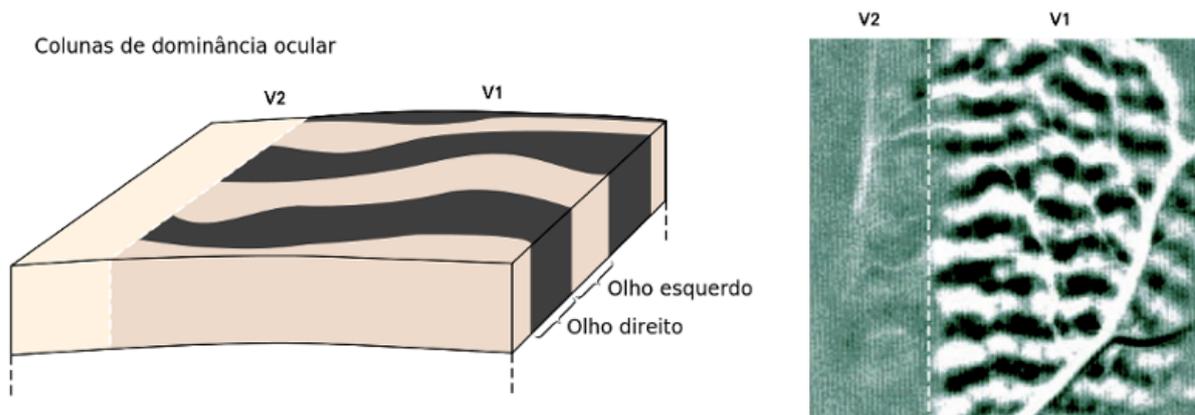


Figura 15 – As faixas claras e escuras representam as colunas de dominância dos olhos esquerdo e direito respectivamente. (Adaptado de E.R. Kandel (2013) (2)).

As colunas de dominância ocular refletem a segregação das projeções liberados pelo LGN Figura 8.

3 Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os materiais, o delineamento experimental, as técnicas e os métodos utilizados na condução do trabalho. Primeiramente, é descrito o processo de confecção da matriz de eletrodos utilizada nos registros eletrofisiológicos. Logo em seguida, discorre-se sobre o procedimento cirúrgico. Nas seções seguintes, é abordada a parte computacional que se divide em: sistemas de estimulação visual; sistema de aquisição de dados; análise de dados.

Todas as medidas eletrofisiológicas reportadas neste trabalho foram feitas utilizando-se eletrodos extracelulares. Obtém-se a medida extracelular introduzindo eletrodos metálicos no cérebro. Se o eletrodo estiver muito próximo a um neurônio, ele pode captar flutuações locais de potencial extracelular que são gerados pelo fluxo iônico através da membrana quando o neurônio dispara um potencial de ação. Além do potencial de ação estes eletrodos também podem captar flutuações mais globais de atividade cerebral, conhecidas como *Local Field Potentials* (LFP), que representam atividades correlacionadas de toda uma população neural. Embora a explicação quantitativa da origem do sinal LFP não seja trivial e ainda seja objeto de estudo, ele é correntemente utilizado como marcador da atividade de regiões cerebrais.

3.1 Matrizes de eletrodos

Os registros eletrofisiológicos foram conduzidos com a utilização de dois modelos de matrizes¹: um fornecido pela empresa *TDT (Tucker-Davis Technologies)* (Figura 16B), e outro confeccionado no **Laboratório de Neurociência de Sistemas e Computação LNSC** (Figura 16A) do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco.

A matriz de microeletrodos confeccionada no **LNSC** é um híbrido de modelos desenvolvidos por pesquisadores do Instituto do Cérebro de Natal (41) e da Universidade Federal de Minas Gerais. Os componentes básicos para a montagem da matriz de microeletrodos se encontram na Figura 17.

¹ O uso da matriz da *TDT* se deu no âmbito de experimentos pilotos, os dados apresentados nesta dissertação foram colhidos com o uso da matriz LNSC.

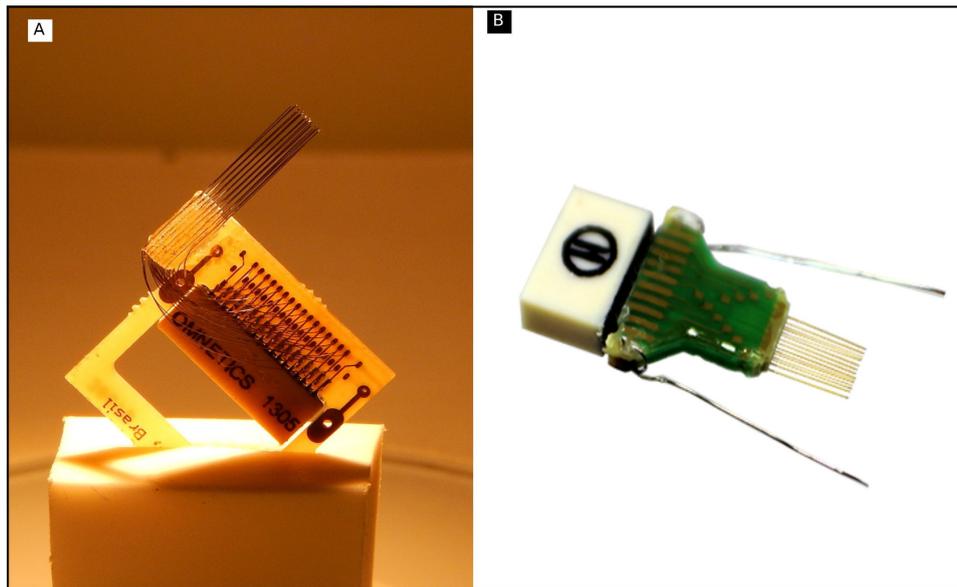


Figura 16 – Matrizes multieletrodos. A) Matriz confeccionada no LNSC. B) Matriz adquirida junto à TDT.

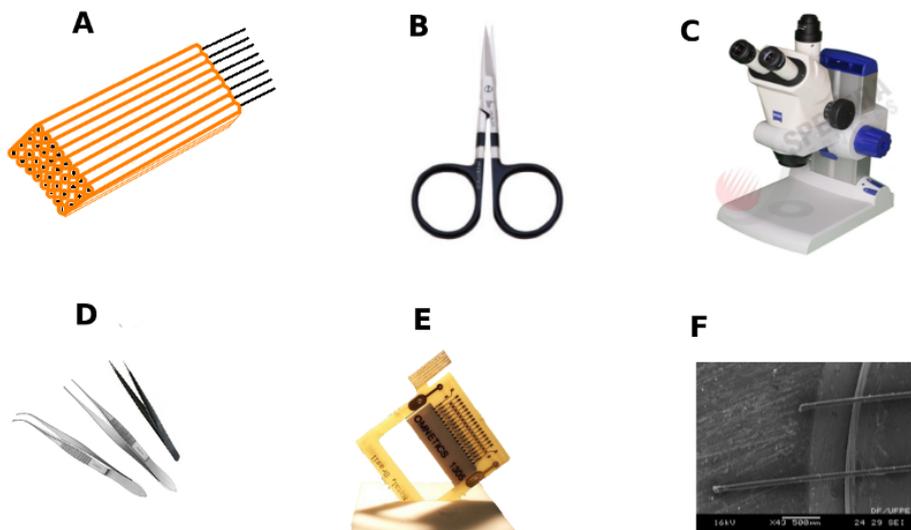


Figura 17 – Componentes básicos para a confecção de uma matriz LNSC. **A** - Gabarito utilizado na formatação da matriz. **B** - Tesoura com lâmina de carboneto de tungstênio. **C** - Microscópio simples 10X. **D** - Pinças. **E** - Placa de circuito impresso 36 canais, com trilhas frente e verso em ouro. **F** - Fios de tungstênio revestidos com material isolante.

O processo pelo qual se obtém uma matriz de 32 microeletrodos pode ser descrito pelos seguintes pontos:

- Construção de um gabarito (Figura 17 - **A**) a partir de tubos de sílica, com a intenção de conferir uma geometria uniforme ao conjunto de 32 microeletrodos. O espaçamento entre microeletrodos é função do diâmetro dos tubos do gabarito. Foram utilizados tubos com diâmetro de 250, 350 ou 380 μm .
- Os microeletrodos consistem em fios de tungstênio (diâmetro 50 μm) revestidos com material poliamida (material isolante). O uso do tungstênio é importante pois devido a sua dureza, permite a penetração de fios finos no cérebro sem que sejam torcidos ou quebrados. Esses fios, obtidos de fábrica no comprimento de 30cm, são cortados em tamanho apropriado (3 cm) por uma tesoura de precisão *DR. SLICK .CO*, que possui uma lâmina reforçada por uma liga de carboneto de tungstênio (Figura 17 - **B**).
- Com auxílio de um microscópio e pinças (Figuras 17 - **C** e **D**), os fios são depositados no gabarito.
- Uma placa de circuito impresso **PCI**² 36 canais, com trilhas de ouro frente e verso, é utilizada como base para os microeletrodos (Figura 17 - **E**). A **PCI** é soldada a um conector *Omnetics*, onde será conectado o equipamento de aquisição.
- Os fios são ajustados (arranjados pelo gabarito) sobre uma haste lateral da **PCI**. Após a devida acomodação, os fios são fixados permanentemente à haste por cola epóxi *Araldite*. O desacoplamento do gabarito do sistema, agora composto por fios, **PCI** e *Omnetics*, deve ser realizado em um tempo hábil à solidificação da cola (12h).
- O contato elétrico entre a **PCI** e os fios é dado pela soldagem desses nos orifícios com paredes metalizadas da placa (com solda em pasta).
- A Matriz é concluída com o isolamento, por epóxi, da região de contato entre a **PCI** e os eletrodos. O epóxi também proporciona uma maior estabilidade mecânica ao corpo da matriz.

² Cedidas inicialmente pelo Instituto do Cérebro de Natal.

Com o procedimento acima, também é possível implementar algumas modificações simples a uma matriz de microeletrodos. Pode-se construir matrizes para o estudo sobre a captação paralela de sinais de camadas corticais diferentes, chamadas de matrizes com escalonamento. Nesse modelo (Figura 18), os microeletrodos se encontram dispostos em comprimentos diferentes, dando um formato de escada à secção de captação.

Uma variável de suma importância na caracterização de matrizes de microeletrodos é a impedância elétrica. Pela medida de impedância conseguimos saber se os eletrodos estão com boa qualidade. Uma impedância muito baixa pode significar que o fio perdeu seu isolamento lateral, podendo comprometer a captação de potenciais de ação. Uma impedância muito alta pode significar que a superfície metálica está coberta ou o fio quebrado, comprometendo a captação de qualquer sinal eletrofisiológico. Antes de qualquer experimento era realizada a medida de impedância de cada um dos 32 eletrodos. Nas medidas de impedância das matrizes construídas no LNSC foi encontrado um valor médio de 55 k Ω a 1 kHz. Essa região depende de muitos fatores, dentre eles a maneira como é realizado o corte pela tesoura com lâmina de carboneto de tungstênio. Ao longo do trabalho foram testadas diferentes formas de produção dos eletrodos: Corte com secção reta transversal **??B**; corte com secção inclinada **??A**; E corte com secção reta posteriormente desencapado para reduzir impedância.

Diversos fatores prejudicam o registro eletrofisiológico, muitos deles imperceptíveis a olho nu. Com o auxílio de um microscópio de varredura eletrônica (MEV), localizado no Departamento de Física e operado pelo técnico Sergio dos Santos Silva, foi possível identificar alguns danos sofridos pelos microeletrodos. Foi observado em alguns eletrodos, o acúmulo de impurezas (Figura 20A) na superfície de contato com o tecido neural, outros apresentaram rugosidades (Figura 20B) provenientes do acúmulo de tensão durante o corte.

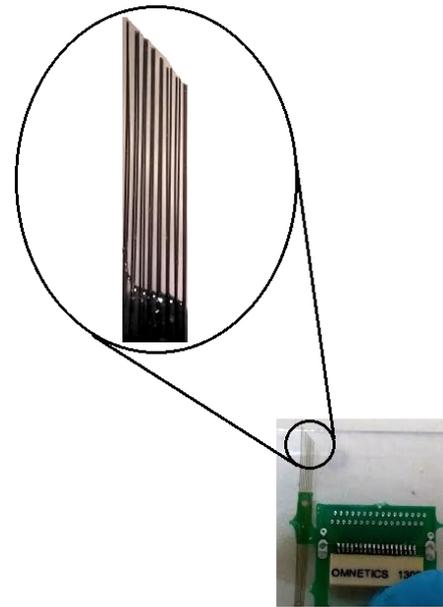


Figura 18 – Matriz escalonada. Variação da matriz utilizada na captação de sinais paralelos de camadas corticais.

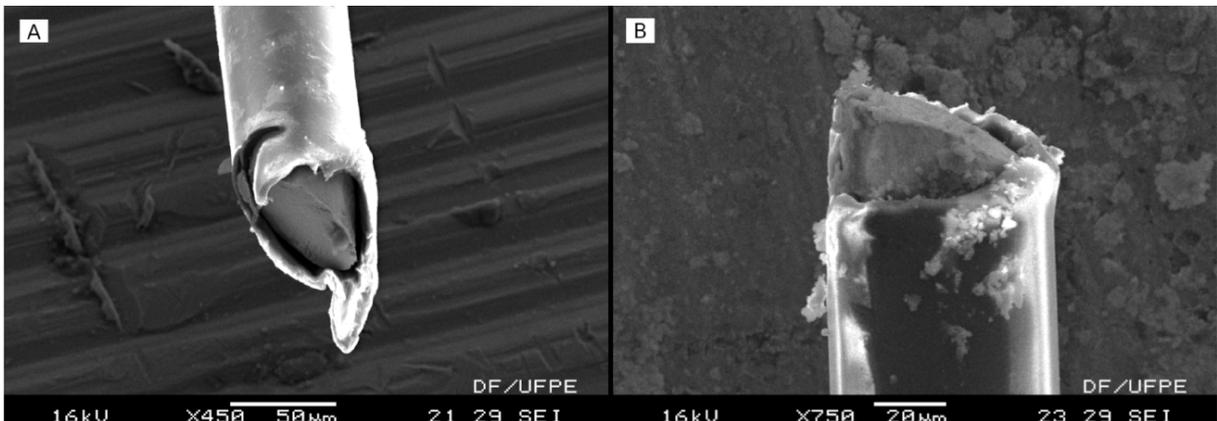


Figura 19 – Variações na área de captação. A) Secção inclinada provendo uma área maior de contato com o tecido cerebral. B) Corte convencional.

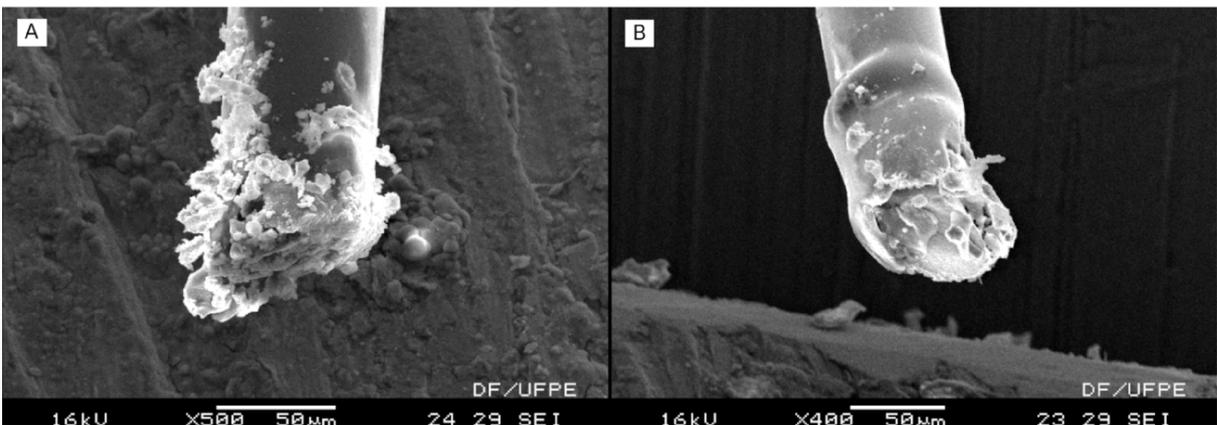


Figura 20 – Defeitos na região de coleta de sinais neurais. A) Acúmulo de impurezas impossibilitando o contato do condutor com o corpo celular. B) Dobra proveniente do acúmulo de tensão elástica acumulada durante o corte imprimido pela tesoura.

3.2 Cirurgia estereotáxica

Todos os experimentos foram realizados no **LNSC**, Departamento de Física, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. Experimentos e procedimentos cirúrgicos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (**CEUA**) da Universidade Federal de Pernambuco referendados pelo Processo nº 23076.030111/2013-95 de 19 de Setembro de 2013 Apêndice C.

3.2.1 Animais

No total foram utilizados 18 ratos machos adultos (70 – 90 dias) da linhagem Long-Evans, pesando aproximadamente 350 g (Figura 21). Destes experimentos, apenas 6 foram bem sucedidos na captura inequívoca de resposta visual. Os resultados apresentados nesta dissertação foram obtidos a partir de 3 experimentos. Os animais foram mantidos em grupos de 4 em caixas plásticas de polipropileno (41 × 34 × 17,5 cm), com cama de maravalha endereçadas em uma estante ventilada *Alesco*® (Figura 22), sediada no **LNSC**, sob ciclo/claro escuro de 12 horas (luz de 5 : 00 – 17 : 00), recebendo ração e água *ad libitum*. A intensidade da luz durante a fase luminosa foi > 100lux. A temperatura na estante era mantida em $20 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e umidade do ar em $55 \pm 10\%$. O manejo dos animais foi assistido pela veterinária do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF), Dra. Cláudia Oliveira.



Figura 21 – Rato Long-Evans adulto



Figura 22 – Estante ventilada *Alesco*

3.2.2 Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico pode ser sumarizado como segue:

- Limpeza dos instrumentos cirúrgicos por álcool 70%.
- Pré-anestesia do animal em uma caixa acrílica (30 × 10 × 12 cm) com anestésico volátil isoflurano ou enurano.
- Os animais são anestesiados profundamente, administrando-se, intraperitonealmente (i.p.), uma baixa dose da combinação cetamina (0,05 ml/kg), xilazina (0,005 ml/kg) e uma dose de uretana (10 ml/kg).
- Fixação da caixa craniana do rato em um aparelho estereotáxico (Narinshige Scientific Instrument/Model SR-5R) (Figura 23).
- Higienização do campo cirúrgico por solução de iodo.
- Aplicação de um anestésico local subcutâneo (0,2 ml lidocaína 2%).
- Antes de qualquer procedimento invasivo, verifica-se o estado de anestesia do animal pela ausência de reflexos: oculares, das patas ou da cauda.
- Incisão longitudinal por meio de um bisturi.
- Remoção das membranas que recobrem o osso craniano.
- Implante de um parafuso inox na região anterior ao bregma. Esse parafuso funciona como terra e referência do registro eletrofisiológico.
- Marcação das coordenadas estereotáxicas que abrangem o córtex visual primário V1 (Figura 24).
- Realização de uma *craniotomia* (diâmetro 5mm) sobre o córtex visual primário esquerdo.
- Retirada da Dura-máter com o auxílio de uma agulha de seringa 30G. Este é o momento mais delicado de todo o procedimento cirúrgico.

3.2.3 Anestesia

Há controvérsias sobre uso de anestésicos no estudo de propriedades visuais (29). Na condução dos experimentos, algumas combinações de anestésicos foram testadas (Cetamina+Xilazina, Uretana+Cloralose, Uretana). O que melhor se adequou aos protocolos de registro foi a combinação de uma baixa dose de cetamina e xilazina, seguida por uma dose de uretana em quantidades suficientes para anestésiar o rato por 8 horas. Alguns trabalhos descrevem a uretana como um supressor da atividade neural (29), no entanto, neste trabalho não foi observado um comprometimento sério nos registros eletrofisiológicos, fato que fica claro na seção de resultados (Capítulo 4). A uretana é um anestésico de longa duração (8 horas) e por isso, proporciona uma liberdade no tempo de registro. Porém seus efeitos anestésicos levam um certo tempo para serem conferidos no animal. O efeito da combinação cetamina+xilazina é mais rápido, fato que viabilizou sua utilização no início da cirurgia.

3.2.4 Coordenadas estereotáxicas

A marcação das coordenadas estereotáxicas foi realizada por meio de um aparelho estereotáxico (Narinshige Scientific Instrument/Model SR-5R) (Figura 23). As coordenadas em mm, com referência no bregma, são dadas por: $-5,28$ a $-7,8$ ântero-posterior, $1,5$ a $5,5$ mesolateral, $+1,3$ dorso ventral (Figura 24) (42). Uma craniotomia, procedimento cirúrgico no qual é removido uma parcela do osso do crânio, é realizada sobre as coordenadas referentes ao córtex visual primário esquerdo. Com o osso removido, encontra-se exposta a *dura-máter*, uma membrana rígida que reveste todo o cérebro. Os microeletrodos, apesar de resistentes, não transpassam a *dura-máter* (Figura 25), fazendo-se necessária a retirada dessa do local de implante. A remoção dessa membrana é feita por meio de cortes em seu perímetro com uma agulha de dentista 30G com uma leve curvatura na ponta. A Figura 26 oferece uma visão global dos elementos que compõem o campo cirúrgico: os pontos de referência bregma, lambda, linha medial, uma craniotomia e o parafuso de aterramento.



Figura 23 – Aparelho estereotáxico SR-5R utilizado na parametrização da cirurgia.

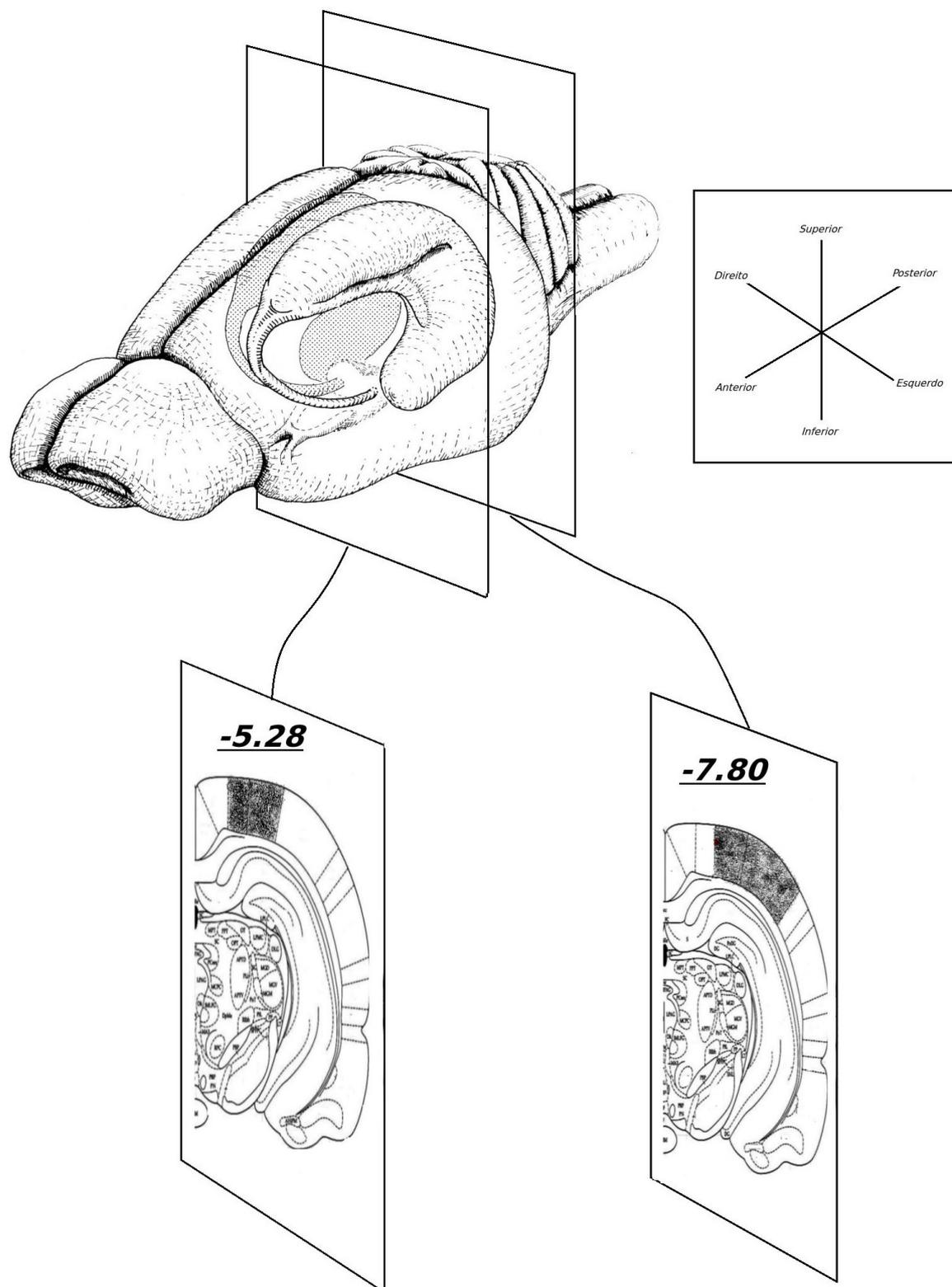


Figura 24 – Secções coronais que delimitam a área V1.

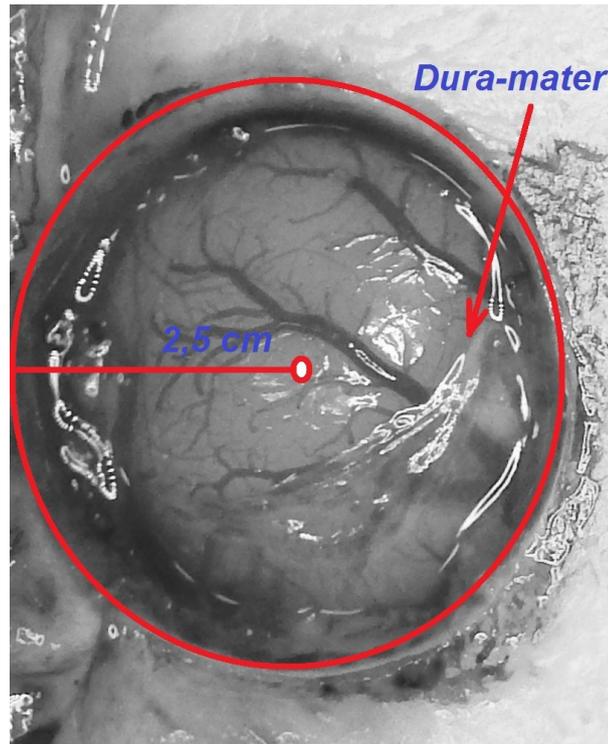


Figura 25 – Craniotomia com 5cm de diâmetro sobre V1. Observa-se o contraste entre a parte superior à craniotomia, da qual a *dura-máter* foi removida e a parte inferior, ainda por retirar.

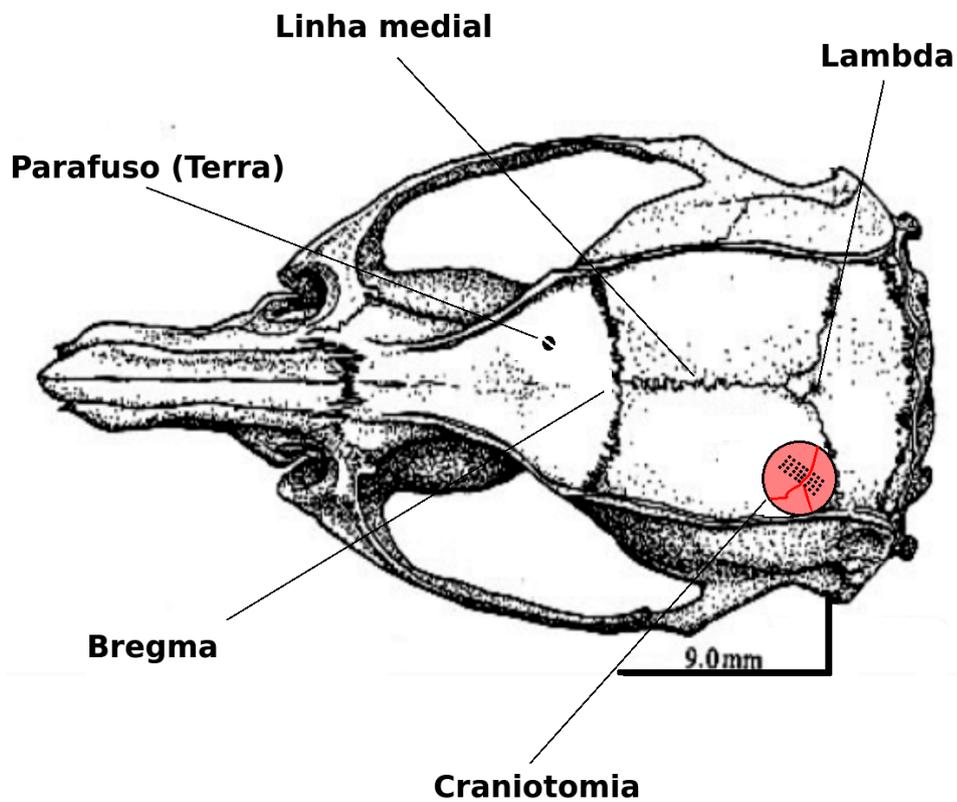


Figura 26 – Visão esquemática do campo cirúrgico. Posicionamento anterior ao bregma do parafuso terra. Craniotomia sobre V1.

3.3 Sistema de aquisição

O processo de aquisição de dados foi feito por meio da plataforma *System 3* da *Tucker-Davis Technologies TDT* de 32 canais, que integra *software* e *hardware*. Os sistemas programáveis de *hardware* são construídos em torno de um grupo de processadores digitais de sinais, do inglês *Digital Signal Processors (DSPs)*, especificamente designados ao processamento de uma grande quantidade de sinais em tempo real. Dentre os procedimentos conduzidos pelo *System 3* podem ser citados: armazenamento, reconstrução, filtragem, compressão e extração de atributos.

A aquisição da informação eletrofisiológica passa por uma série de etapas. Inicia-se com o implante da matriz de microeletrodos que captura a atividade extracelular de um ou mais neurônios por canal (Figura 27A). O sinal é pré-amplificado por um *headstage* (ZIF-Clip®headstage conectado à matriz (Figura 27B). O headstage faz uma pré-amplificação de ganho unitário, que visa somente não perder qualidade do sinal ao longo do fio (~ 1m) até o equipamento que faz a digitalização. O equipamento PZ2 – 32 digitaliza o sinal (Figura 27C) e o transmite por fibra óptica ao módulo de processamento RZ2, onde encontram-se os microprocessadores (**DSPs**) programados para obtenção dos dados de interesse. No equipamento RZ2, o sinal neural pode ser analisado em tempo real e transmitido para registro no disco rígido do computador.

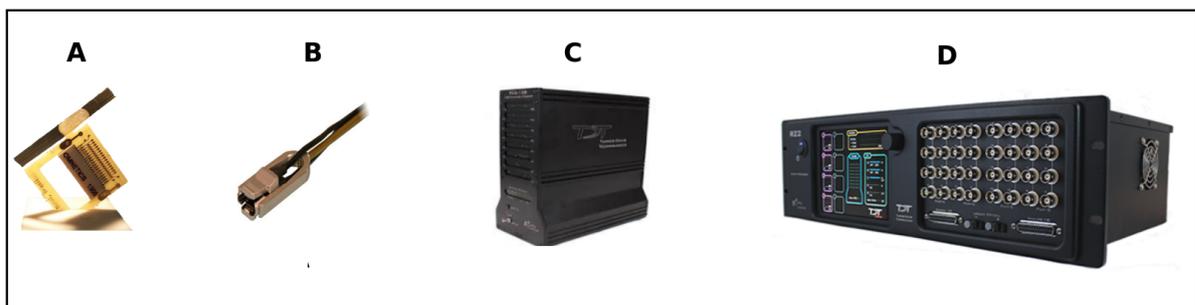


Figura 27 – Equipamentos utilizados na coleta de sinal neural. A) Matriz de 32 microeletrodos. B) *Headstage*, responsável pela amplificação do sinal neural. C) PZ2, digitalizador. D) Módulo RZ2, núcleo de processamento.

O *System 3* disponibiliza uma ferramenta de configuração chamada **RPvdsEx**, do inglês *Real-time Processor Visual Design Studio*, que permite a programação dos **DSPs** através de uma biblioteca com mais de 300 componentes que podem ser combinados pelo usuário, formando um “circuito” capaz de executar as funções desejadas.

O circuito **RPvdsEx**, apresentado na Figura 28, objetiva a aquisição dos seguintes parâmetros necessários à pesquisa realizada neste trabalho: *Time Stamps*, marca o instante de tempo que um potencial de ação ocorre; *Local Field Potential LFP*, variável que caracteriza a atividade global de uma dada região; *Sync*, são pulsos de sincronização emitidos pelo sistema de estimulação visual que fornece as referências de tempo para emparelhamento entre estímulo e resposta. Esse circuito se encontra dividido em três partes:

- **Parte A - Armazenamento dos *Time Stamps***. Corresponde aos macros de: **RZ2_Input_MC** (recepção da informação digitalizada por PZ2 a uma taxa de amostragem de 12207 Hz), **NeuroFilter** (controlador do filtro passa faixa que estipula a frequência de detecção dos potenciais de ação), **PCSort** (detecção da ocorrência dos potenciais de ação em cada canal e separação de potenciais de ação de diferentes neurônios detectados por um mesmo eletrodo), **Spike_Store_MC** (armazenamento do vetor *Time Stamps* completo e separado por canal e por neurônio no bloco de saída).
- **Parte B - Armazenamento dos *Local Field Potentials - LFP***. Corresponde aos macros de: **NeuroFilter** (controlador do filtro passa faixa que estipula a frequência de detecção dos LFPs), **Stream_Store_MC2-Wave** (armazenamento do vetor *LFP* completo e por canal no bloco de saída a uma taxa de amostragem de 3051,8 Hz). O macro **Stream_Store_MC2-Data** cria um *backup* dos dados de PZ2 no bloco de saída.
- **Parte C - Armazenamento do vetor sincronização *Sync***. Corresponde aos macros de: **RZ2_Input_MC**- (recepção da informação do separador de feixes **RGB**), **Stream_Store_MC-Sync** (armazenamento do vetor *Sync* que marca o instante em que uma dada estimulação é apresentada ao animal a uma taxa de amostragem de 12207 Hz).

Durante os experimentos, os filtros passa faixa para detecção de potenciais de ação e LFPs são configurados por meio da ferramenta **OpenEX**. As faixas limites utilizadas foram, respectivamente, 300Hz a 3000Hz para potenciais de ação e 1 Hz a 1000Hz para LFP.

A detecção de um potencial de ação é feita utilizando-se um limiar, baseado na flutuação estimada da atividade de cada canal (*Threshold Factor*). Na literatura, para registros no córtex, em geral utiliza-se 3 desvios padrão, significando que um sinal que se afaste 3 desvios padrão do valor médio do canal será identificado como um potencial de ação. Por cautela, neste trabalho utilizamos um valor de 3,5 desvios padrão para identificação de um potencial de ação.

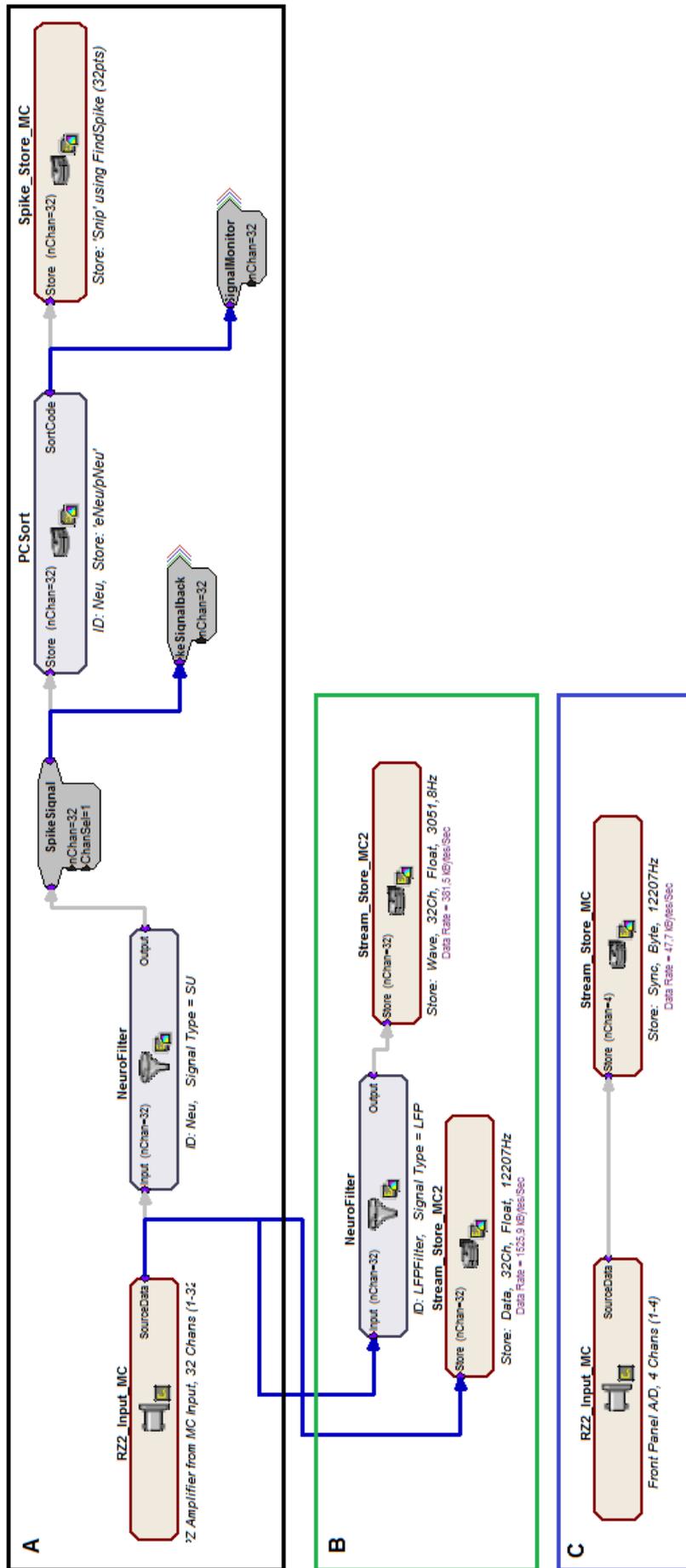


Figura 28 – Circuito **RPvdsEx** responsável pela manipulação dos **DSPs**, com o propósito de aquisição dos dados a serem estudados.

Nessa mesma ferramenta, o experimento pode ser acompanhado em tempo real, conforme observado nas Figuras 29 e 30. Na Figura 29 a janela de controle inclui: à direita, as formas de ondas para potenciais de ação detectados em cada um dos 32 canais; à esquerda, a exibição em destaque do formato de onda para um canal selecionado; acima, o sinal contínuo (em $\sim 12\text{kHz}$) do canal selecionado; abaixo, a identificação de formas de ondas diferentes indicando a presença de mais de uma unidade (neurônio) no canal selecionado.

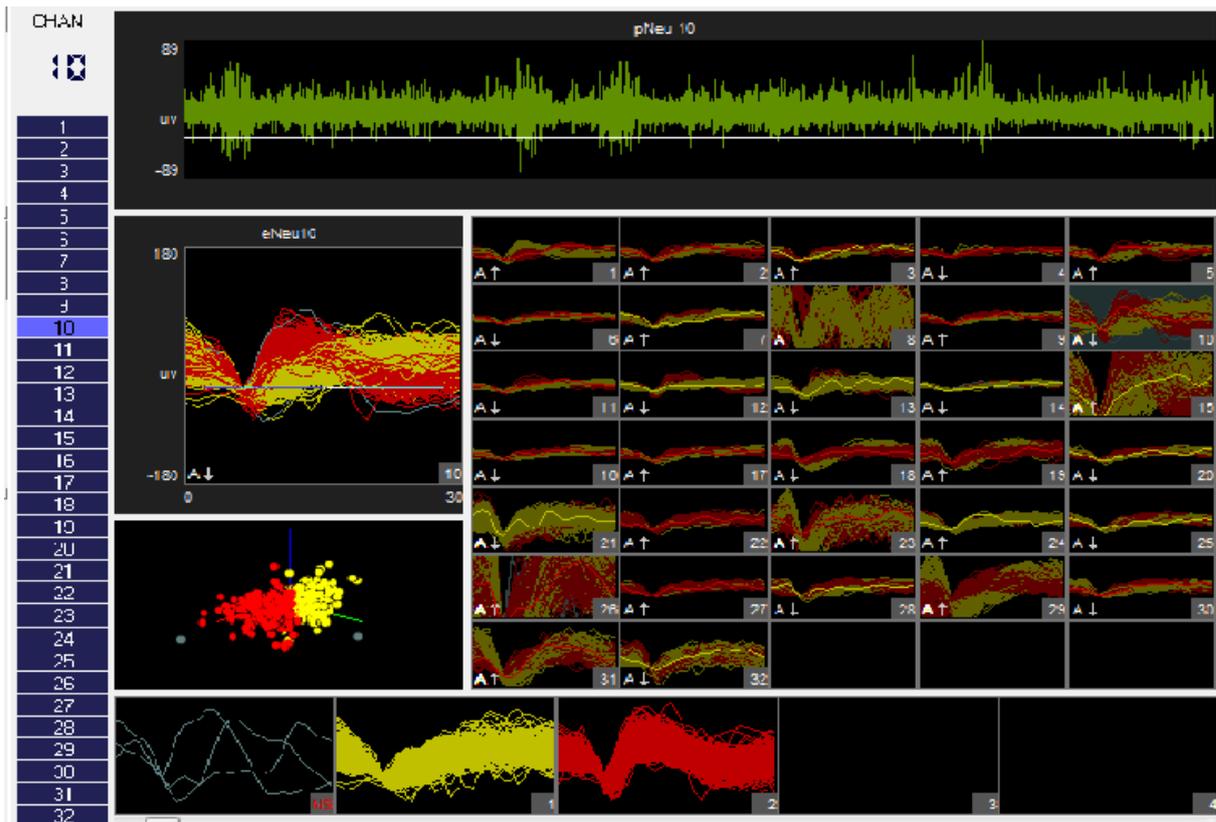


Figura 29 – Janela de controle que permite a visualização das formas de ondas capturadas pelos 32 canais da matriz de multieletrodos.

Os parâmetros *Time Stamps*, LFP e *Sync*, são monitorados em outra janela de controle (Figura 30). Nessa janela de controle são exibidos: acima, os trens de disparo para os 32 canais (ou um subconjunto) onde cada ponto representa um potencial de ação ocorrido no correspondente instante de tempo (gráfico conhecido como *raster plot*); no meio, em uma estreita faixa, visualiza-se o sinal *Sync*; em seguida, são exibidos os sinais de *Local Field Potentials* de um subconjunto dos 32 canais.

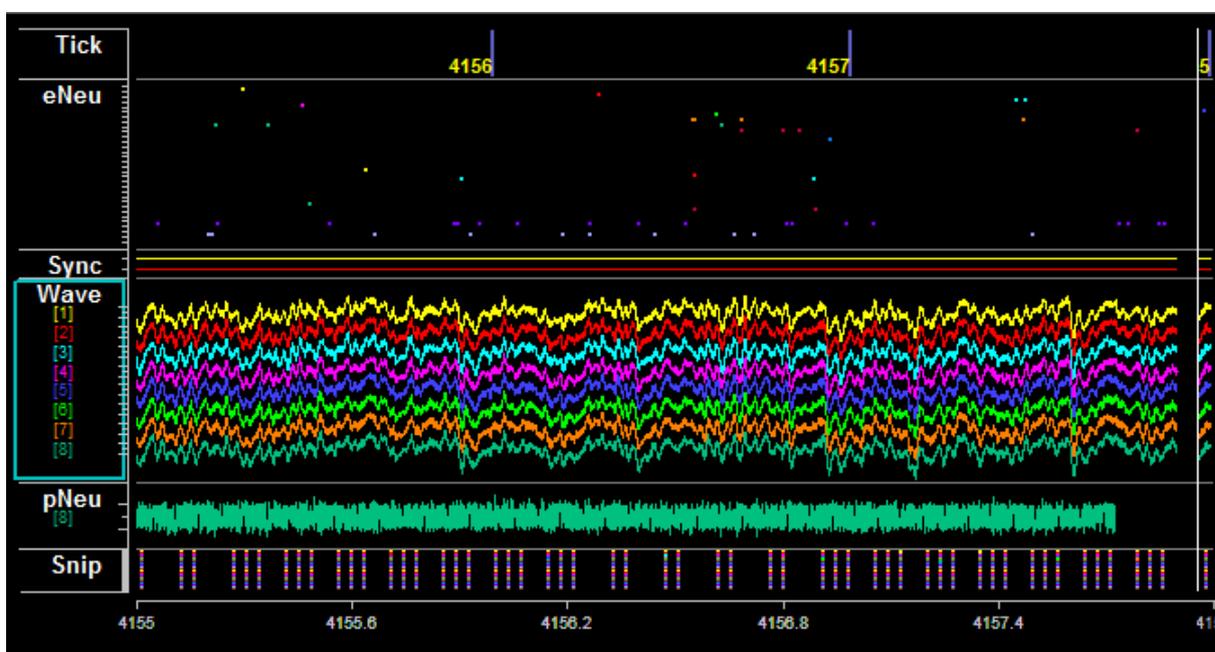


Figura 30 – Janela de controle destinada à monitoração dos *Time Stamps*, *Local Field Potentials* e *Sync*.

3.4 Sistema de estimulação visual

A apresentação do sistema de estimulação visual pode ser melhor apreciada se decomposta em aspectos de *hardware* e *software*.

3.4.1 Componentes de *hardware*

Durante os experimentos, diversos padrões de estimulação visual são apresentados ao rato. Essa exposição é feita através de um monitor LCD (**HP Compaq LA1905wg, 18 polegadas, 60 Hz**), localizado a uma distância de 28,5 cm do olho do animal. O monitor possui uma conexão **VGA** que permite sua comunicação com o **Gerador de Pulsos/Sinc VGA (GPVGA)** (Figura 31).

O GPVGA é responsável pela emissão dos pulsos de sincronização (*Sync*), um parâmetro imprescindível para a análise dos dados. Esse procedimento ocorre com a conversão do sinal luminoso enviado ao monitor em uma diferença de potencial que é capturada pelo painel frontal do RZ2.

A cada *frame* de estímulo enviado à tela, pelo computador de controle, o GPVGA recebe o sinal RGB e separa seus feixes. O feixe Verde (G - *green*) é enviado ao monitor de estimulação, enquanto os outros dois feixes (R - *red* e B - *blue*) são convertidos em diferenças de potenciais e enviados via conexão **BNC** para o painel frontal do RZ2. O RZ2 armazena no vetor *Sync* o exato momento em que esse sinal chega. Isso permite o controle sobre o instante de tempo que o estímulo é apresentado.

3.4.2 Componentes de *software*

Todos os protocolos de estimulação foram construídos sobre a plataforma de programação **Elphy** (executada em *Microsoft Windows 8, 7, XP, 32 e 64 bits*). Essa plataforma foi desenvolvida por Gérard Sadoc na *Unité de Neurosciences, Information et Complexité (UNIC, CNRS - UPR 3293)*. A plataforma **Elphy** consiste de um conjunto de objetos acessíveis por meio de menus, caixas de diálogo ou linguagem de programação. A linguagem de programação **Elphy** é baseada em Pascal, no entanto é uma linguagem orientada a objeto.

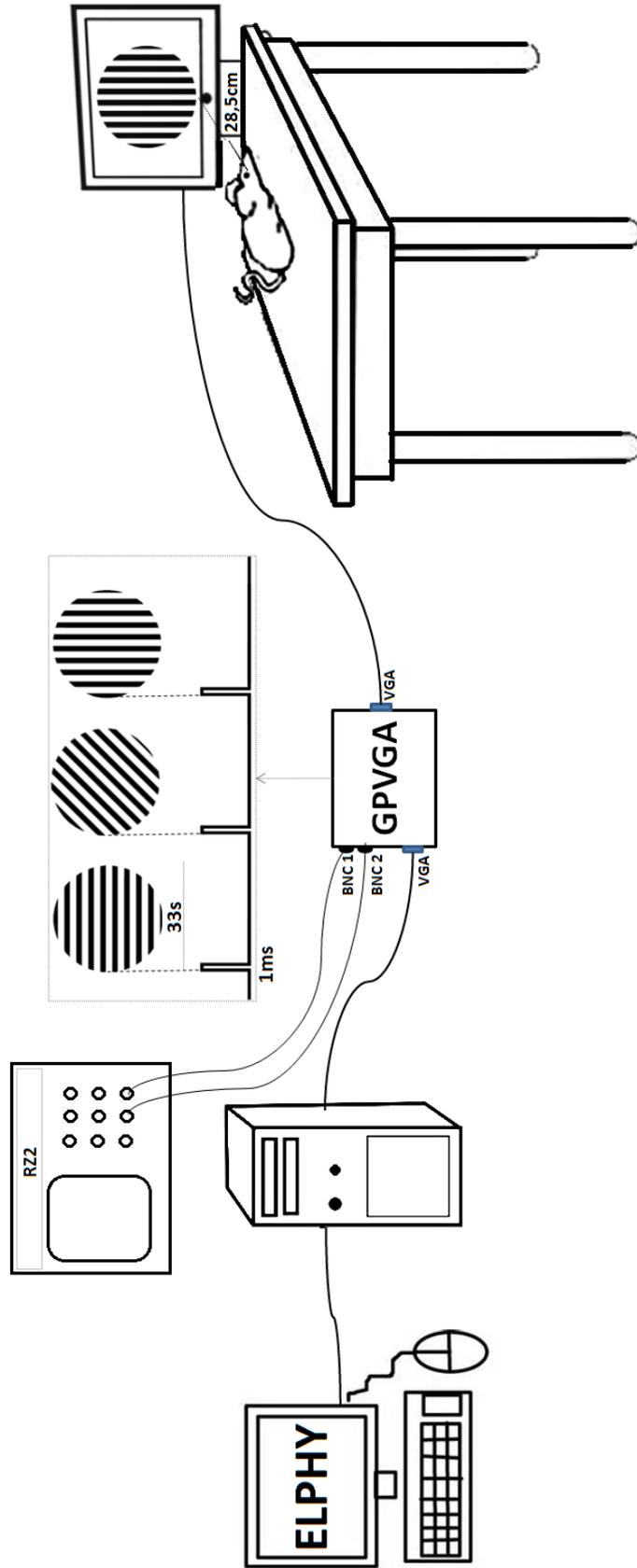


Figura 31 – Esquema do protocolo experimental. O *software* **Elphy** gera os padrões de estimulação e os envia a um segundo monitor, posicionado em frente ao rato. Antes de chegar ao segundo monitor o feixe RGB é dividido no GPVGA, que converte os feixes R e B em pulsos de potencial com duração de 1ms. Esses pulsos são capturadas pelo RZ2 e armazenados em *Sync*.

3.5 Protocolos de estimulação visual

Foi contruída uma série de protocolos de estimulação visual para esse trabalho (usando a plataforma *Elphy*). Em um primeiro momento, foi criado um protocolo que investiga o efeito da variação da densidade espacial de objetos visuais do tipo **Gabor**. Posteriormente, outros protocolos foram gerados: apresentação de grades senoidais com 12 orientações distintas; variação do contraste; grades em translação.

3.5.1 Densidade espacial de *Gabors*

Divide-se a tela em sítios, em que cada um desses pode conter um objeto **Gabor**³ com uma certa orientação Figura 32. A ocupação do sítio é dada pela probabilidade p de um gabor ser encontrado naquela posição. As probabilidades testadas foram de $\frac{1}{128}$, $\frac{1}{64}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e 1 (todos os sítios preenchidos).

A execução de um *trial* do protocolo consistia na varredura das probabilidades, em escala decrescente. O tempo de estimulação para todos os valores de p era constante. Foram testados protocolos com arranjos 3×3 como na Figura 32 e 5×5 .

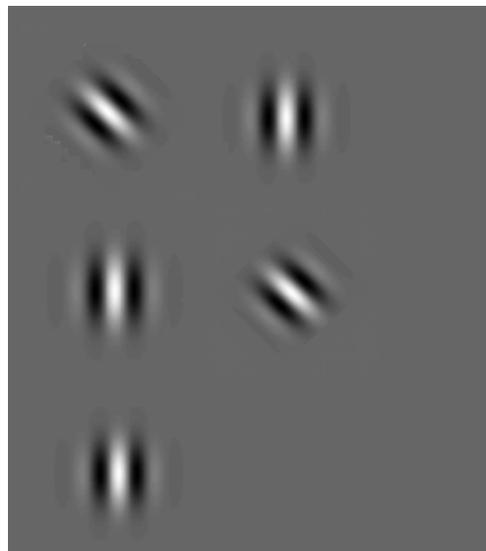


Figura 32 – Quadro de estimulação com o protocolo de densidade espacial de *gabors*. Configuração 3×3 proporcionando 9 sítios. Cada sítio pode ser ocupado por um *gabor*, a depender da probabilidade de ocupação corrente. As probabilidades testadas variaram de $\frac{1}{128}$ a 1. A cada quadro de estimulação o **Gabor** variava sua orientação dentro de um *range* de 6 orientações escolhidas aleatoriamente a cada quadro.

³ Gabor é um objeto gerado a partir da multiplicação de uma senoide por uma Gaussiana.

3.5.2 Grades em 12 orientações

Um estímulo grade consiste em uma série de barras escuras e claras de igual comprimento, com uma fase e frequência espacial bem definidas. Uma grade pode ser do tipo retangular, em que a luminância através da barra é constante, ou tipo seno no qual a luminância na barra apresenta um comportamento senoidal. Grades senoidais foram as escolhidas para esse trabalho.

Inicialmente, é criada uma sequência ordenada de orientações para o objeto grade (0° , 15° , 30° , 45° , 60° , 75° , 90° , 105° , 120° , 135° , 150° , 165°). As orientações são replicadas de acordo com a quantidade de vezes que se deseja exibir cada uma, em quantidades iguais, a fim de obter uma distribuição uniforme. Em seguida, é realizado um embaralhamento na ordem das orientações replicadas, garantindo uma aleatoriedade na apresentação das grades.

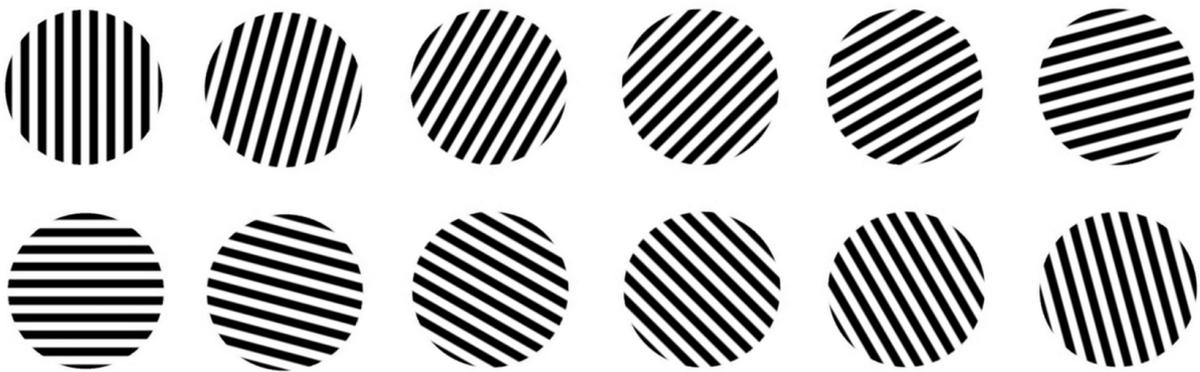


Figura 33 – Orientações para o objeto grade.

O protocolo foi executado com as seguintes características: 12 orientações replicadas 100 vezes cada uma (Figura 33), frequência espacial de 0,17 ciclos/graus de ângulo visual, tempo de exposição de 100 ms para cada orientação e tempo de 1 s de estímulo neutro (ou seja, tela sem qualquer representação visual).

3.5.3 Variação do contraste

Esse protocolo consiste na variação da luminância das raias claras e escuras da grade com relação ao plano de fundo. Em todos os casos a luminância de fundo foi mantida em 12 cd/m^2 . Sendo assim um estímulo com contraste 100% corresponde a uma senoide cuja luminância varia entre 0 e 24 cd/m^2 .

Foram produzidas 10 variações no contraste (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%) conforme mostrado esquematicamente na Figura 34. Cada variação foi mostrada 100 vezes aleatoriamente. Outros parâmetros como orientação e frequência espacial foram mantidos fixos durante a estimulação, para não prolongar demais o tempo de aquisição. Seria interessante realizar a estimulação com o protocolo de variação de contraste para cada uma das 12 orientações, no entanto, a duração típica de um experimento e o tempo de duração da anestesia exigiram uma restrição da faixa de parâmetros explorados para três orientações: 0° , 45° e 90° . O tempo de exposição para cada valor de contraste foi de 100 ms seguido por um período de inatividade de 1 s.

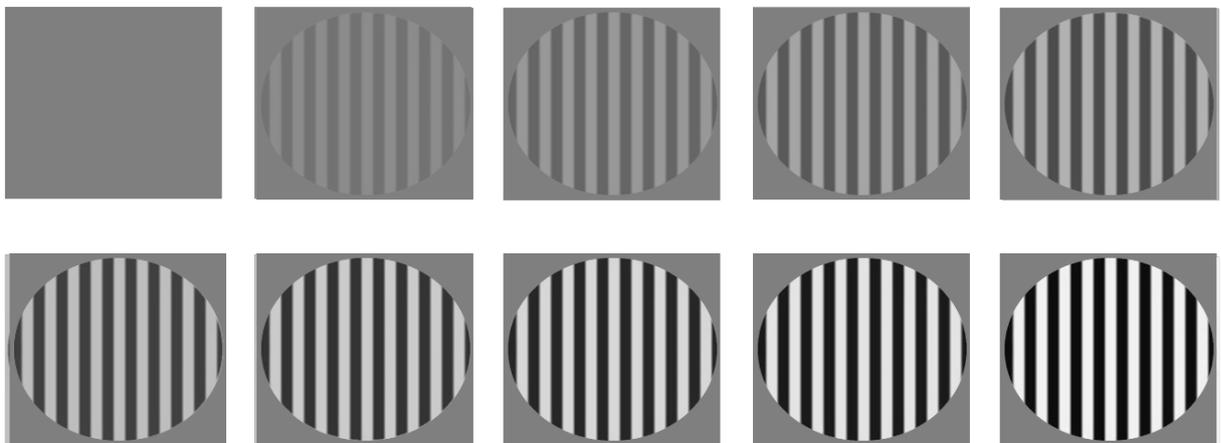


Figura 34 – Variação no contraste para uma grade com orientação fixada em 0° .

3.5.4 Grades em translação

Foi implementado ainda o protocolo grades em translação, que leva em conta outra viés de processamento dos neurônios, a frequência temporal. Um objeto grade em translação consiste de uma grade com alternância na fase da senoide que gera as raias claras escuras. Essa alternância é direcional. Foram escolhidas 8 direções de propagação da fase, (Figura 35).

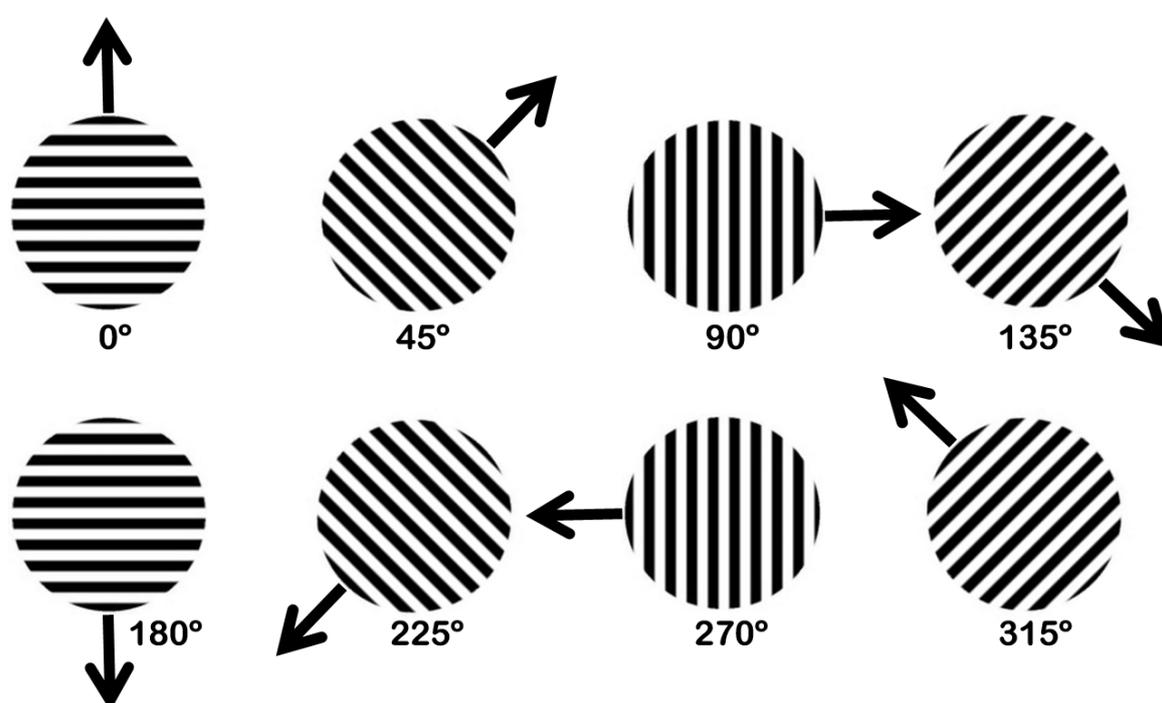


Figura 35 – *Grades em translação*. Grades com movimento aparente induzido pela alteração gradativa na fase. Foi explorado movimento aparente em 8 direções. A seta indica a direção de alternância da fase.

3.6 Procedimentos para registros eletrofisiológicos

Os protocolos descritos na seção anterior foram executados mediante uma padronização de passos.

Estabelecido o estágio final da cirurgia estereotáxica, retirada da dura-máter (Figura 25), dá-se início ao posicionamento da matriz de microeletrodos sobre a superfície exposta de V1. Antes do contato dos microeletrodos, deve-se prender o fio terra/referência ao parafuso de fixação. Com o aterramento preso, os microeletrodos são postos em contato com a superfície do córtex, marcando o zero da escala de profundidade.

A partir da marcação do zero da escala de profundidade, inicia-se o processo de penetração dos microeletrodos no tecido neural. Esse processo de injeção foi controlado por um parafuso micrométrico da torre estereotáxica (Figura 36). A taxa de inserção foi de $50\ \mu\text{m}$ a cada 10 minutos. Essa taxa lenta foi tomada a fim de evitar danos ao tecido neural. Dessa forma cria-se uma pequena pressão sobre o tecido neural que com o tempo se acomoda permitindo a penetração do eletrodo. Em cada etapa da descida dos microeletrodos, é verificada a presença de neurônios responsivos a estímulos visuais.

A verificação da resposta neuronal mediante um estímulo luminoso foi feita em tempo real pelo *software* **OpenEx**. Uma barra luminosa foi apresentada em um monitor posicionado à frente do olho do rato.

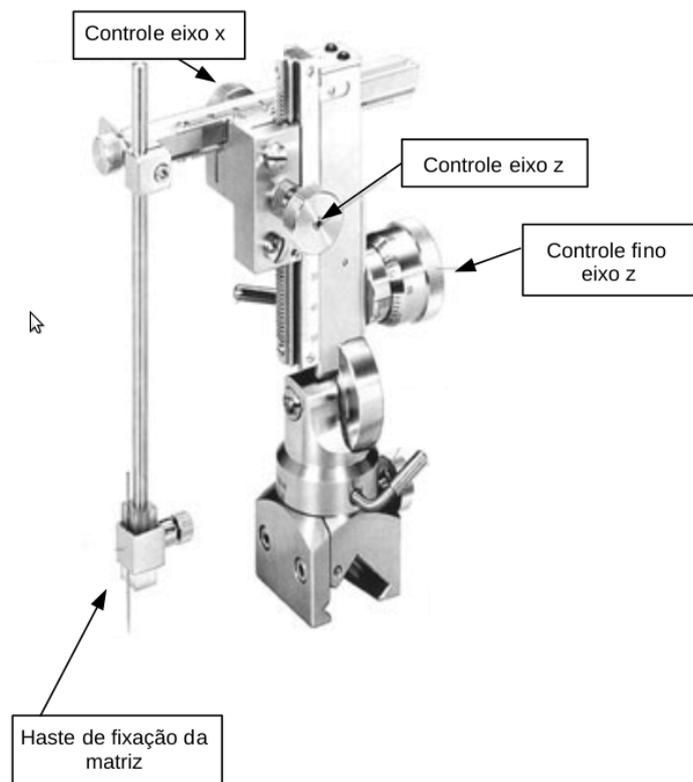


Figura 36 – Torre estereotáxica. Esse equipamento oferece três graus de liberdade, manipuláveis em escala milimétrica. O eixo z permite ainda a opção de deslocamentos em escala micrométrica. A inserção dos microeletrodos é operada nessa escala.

Possíveis alterações na taxa de disparo foram acompanhadas através da sonorização do sinal neural e da visualização do plot contínuo dos disparos dos neurônios, via **OpenEx** (Figura 37).

Identificados os canais responsivos, a penetração dos microeletrodos é interrompida para a gravação⁴. Antes da execução dos protocolos, todas as fontes luminosas do laboratório foram desligadas, exceto os monitores de estimulação e de acompanhamento. O animal foi deixado nesse regime por 30 minutos antes da gravação de cada bloco do experimento, para que a retina se habitue ao estado de luminosidade em que ocorrerá o experimento.

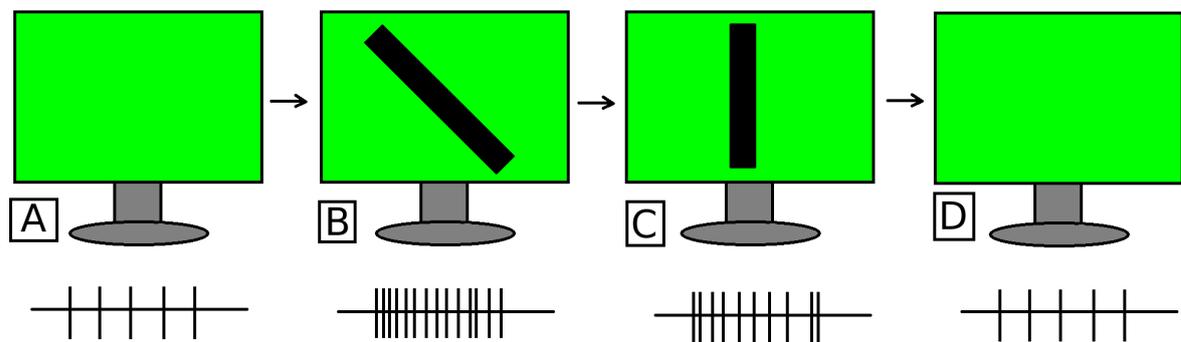


Figura 37 – Mapeamento dos canais com resposta neural. A) Tela sem estímulo, resposta basal. B) Alteração na taxa de disparo mediante apresentação de uma barra. Indicando que o eletrodo se encontra próximo a um neurônio sensível às propriedades da barra. C) Leve depressão na resposta neural devido a mudança de orientação da barra. D) Retorno ao basal após ausência de estímulo.

⁴ O tempo médio de descida na busca de neurônios responsivos foi de duas horas.

3.7 Análise de dados

A análise dos registros eletrofisiológicos iniciou-se com a importação dos dados brutos gravados pelo *System 3* da *TDT*. Os dados são importados para um formato acessível em *Matlab* por meio da função *TDT2mat* fornecida pela *TDT*.

Para as análises realizadas nessa dissertação foram importadas as seguintes variáveis: *timestamps*, tempo de disparo de um neurônio; *chan*, se trata de um vetor com o mesmo tamanho do vetor *timestamps* e determina em qual canal o respectivo potencial de ação foi detectado; *wave*, que representa o potencial de campo local; *Sync* pulsos de sincronização.

3.7.1 Peristimulus time histograms - PSTH

O estudo estatístico dos dados registrados se deu a partir de um método de caracterização de resposta neural muito comum em neurociência, *Peristimulus time histograms - PSTH*. A aplicação dessa técnica se deve tanto à sua simplicidade conceitual quanto a sua implementação. PSTH caracteriza quantitativamente a variabilidade da atividade neural durante e após um estímulo (10).

A cada estímulo visual apresentado, esperamos que haja uma taxa de disparos de potenciais de ação associada. Esta taxa pode variar com o tempo, e a denominamos $r_{(t-t_s)}$, onde t é o tempo e t_s é o momento do estímulo. Para estimar esta taxa temos dois desafios: primeiro, a atividade posterior ao estímulo depende também da atividade espontânea endógena do cérebro; segundo, os potenciais de ação são eventos que ocorrem pontualmente e de forma probabilística. Repetindo diversas vezes cada estímulo e contruindo um PSTH, pode-se obter uma boa estimativa para a taxa de disparos induzida por um dado estímulo.

O tratamento numérico dos dados para obtenção dos histogramas temporais, PSTHs, foi realizado a partir da construção de programas em *Matlab*. As variáveis *Sync*, *timestamps* e *chan* compunham os dados de entrada dos programas. Os passos a seguir ilustram a concepção de um histograma temporal,

- Escolha do canal a ser analisado;
- Extração dos *timestamps* para esse canal;
- Definir um *bin* temporal, ou seja, uma janela para verificação da presença de *spikes*;

- Com o *bin* definido, relizar a busca de spikes em intervalos de tempo marcados a partir do *Sync*. São delimitados por *Sync* justamente porque esse marca os instantes em que os *frames* são apresentados no monitor.
- Essa busca acumula nos bins temporais a quantidade de disparos naquela janela temporal;
- O número de *spikes* por *bin*, taxa de disparo, é guardado em um vetor chamado trens de disparo;
- A partir dos trens de disparos para cada *trial* realizam-se médias das taxas de disparo;
- As médias das taxas de disparo ao longo do tempo de estimulação finalmente fornecem a PSTH.

Quando o número de repetições é muito grande, o PSTH fornece uma boa estimativa da taxa de disparos. No entanto no caso de haver poucas repetições podemos fazer uma melhor estimativa da taxa de disparos suavizando-a através de um filtro, onde ponderamos a taxa de disparos em um dado intervalo de tempo pelo valor estimado nos intervalos de tempo adjacentes. Uma maneira típica de realizar esta filtragem consiste em fazer suavização do histograma por um filtro Gaussiano (equação 3.1). A Figura 38 mostra o histograma temporal da resposta neural de um neurônio de V1, em rato, suavizada por filtros Gaussianos com diferentes resoluções temporais.

$$\omega(\tau) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_\omega} \exp\left(-\frac{\tau^2}{2\sigma_\omega^2}\right) \quad (3.1)$$

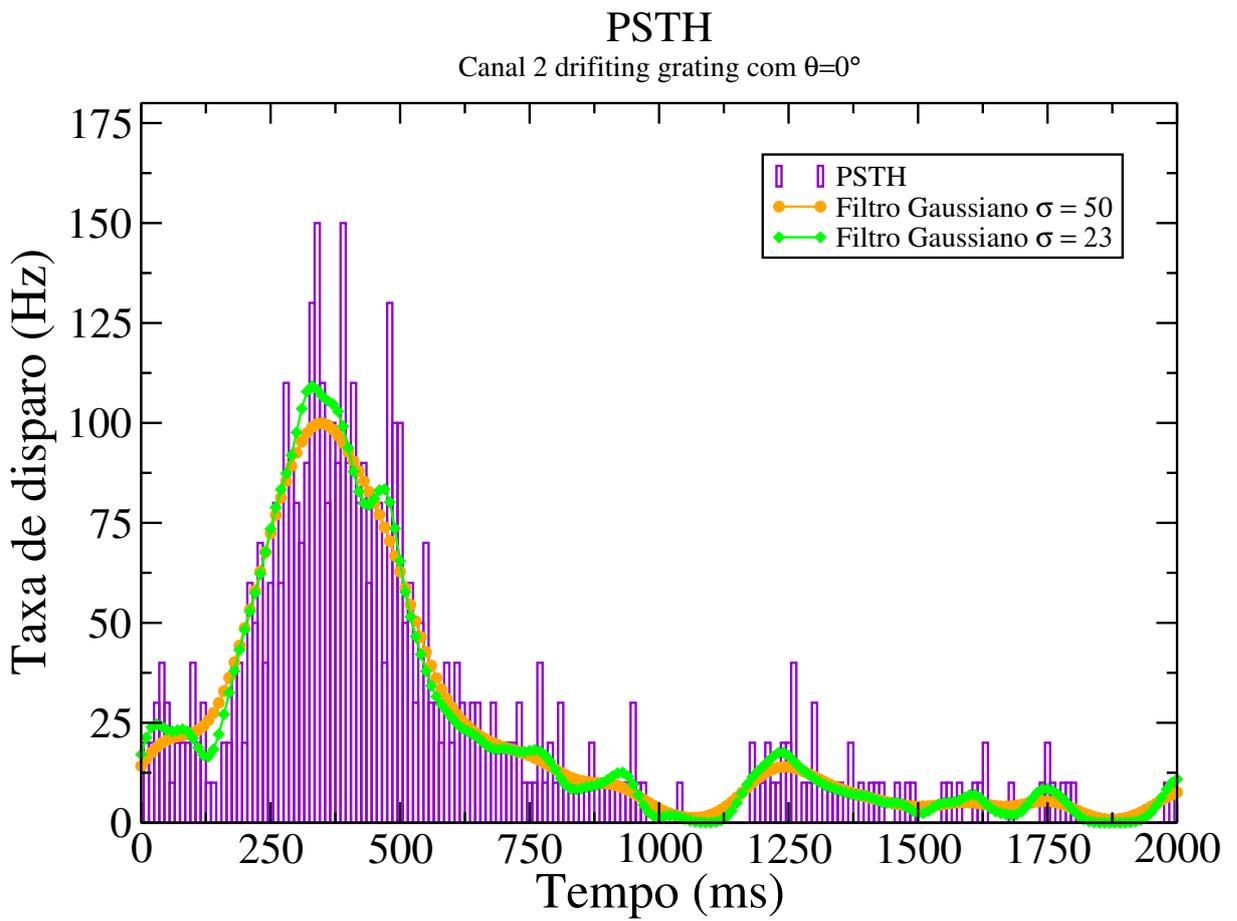


Figura 38 – PSTH suavizado por um filtro Gaussiano em duas resoluções temporais $\sigma = 23$ e $\sigma = 50$.

3.7.2 Curva de *tuning*

A atividade neuronal é tipicamente estocástica, entretanto se observa que neurônios exibem preferência por certas características. A identificação de algum viés na codificação, por neurônios, a um dado estímulo pode ser estudada através de curvas de *tuning*. Essas curvas expressam a taxa de disparo das unidades codificadoras em função das características dos estímulos apresentados. Para o sistema visual, pode-se obter curvas de *tuning* para as seguintes características: orientação, contraste, frequência espacial e frequência temporal.

A Figura 39 mostra a relação entre a orientação do estímulo apresentado e taxa de disparos induzida em um neurônio de V1 do gato.

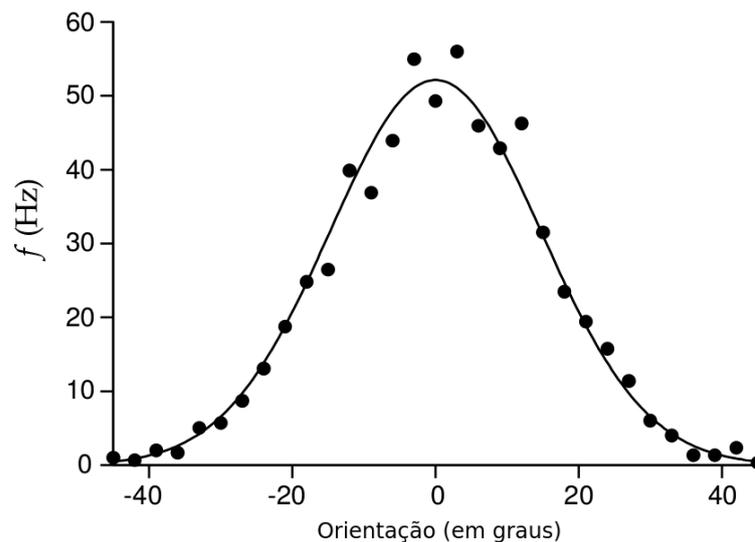


Figura 39 – Taxa de disparo média para um neurônio em V1 do gato, plotada como função do ângulo de orientação da barra luminosa de estimulação. (Adaptado de Peter Dayan e L.F. Abott (2001))(1)

Uma curva de *tuning* para orientação pode ser obtida, pelas PSTHs referentes a cada orientação. Em posse desses dados se verifica o valor máximo na taxa de disparo dentro da janela de estimulação. O plot desses valores por suas orientações correspondentes mostram a qual orientação o neurônio está respondendo preferencialmente.

4 Resultados e discussão

Os resultados apresentados abaixo foram obtidos da análise de experimentos eletrofisiológicos realizados em três animais, rotulados por **A**, **B** e **C**. A **Seção 4.1** exibe a análise de dados de dois blocos de gravação para o animal **A**, visando o estudo do efeito da estimulação via protocolo **densidade espacial de Gabors**. As **Seções 4.2 e 4.3** abordam os dados de quatro blocos, três para o protocolo de contraste e um para orientação, gravados para o animal **B**. A **Seção 4.4** apresenta resultados para o protocolo de grades em translação, obtidos de um bloco gravado a partir do animal **C**.

Uma série de fatores pode influenciar a resposta visual medida, como por exemplo: 1) o modelo animal utilizado; 2) condições do experimento, da cirurgia da anestesia e dos eletrodos; 3) condições da estimulação visual, como taxa de atualização da tela, luminância, distância, etc.

Os três protocolos de estimulação visual, cujos resultados são apresentados a seguir, foram úteis para: 1) validar nosso sistema experimental, 2) validar o protocolo de cirurgia e estimulação visual e 3) avaliar os parâmetros de resposta visual do rato, comparando com a literatura ainda incipiente desse animal e com a literatura de outros modelos animais mais consagrados, como gatos e macacos.

4.1 Densidade espacial de gabors

O efeito da estimulação visual sobre o animal **A** com o protocolo **Densidade espacial de gabors** foi gravado em dois blocos. O primeiro bloco traz registros da atividade neuronal de **V1** a uma profundidade de $800\mu\text{m}$. O tempo de registro do primeiro bloco foi de 55 minutos, dos quais 5 minutos anteriores e posteriores à estimulação foram de estímulo nulo (ausência de alterações no campo visual). O segundo bloco foi gravado a uma profundidade de $1200\mu\text{m}$, mantendo-se os mesmos parâmetros temporais do primeiro bloco.

O primeiro bloco apresentou quatro canais responsivos: 10, 15, 26 e 30. No segundo bloco, o número de canais aumentou para onze: 10, 15, 18, 19, 21, 23, 25, 26, 30, 31, 32.

A **Figura 40** mostra a taxa de disparos de neurônios em função da probabilidade de um estímulo **Gabor** ocupar um sítio do campo visual. As curvas são geradas a partir da média

das taxas de disparo durante cinco execuções do protocolo. O gráfico A apresenta as curvas estímulo-resposta para os canais gravados no primeiro bloco. Os gráficos B e C exibem as curvas referentes à gravação do segundo bloco.

De modo geral, é observado que a taxa média de disparos não se altera com a probabilidade de estimulação. Inicialmente, o objetivo foi obter uma curva com uma taxa de resposta na qual fosse possível calcular uma faixa dinâmica da resposta neural. Como a adaptação neural faz com que a taxa de disparo média seja constante, para todos os parâmetros, este protocolo não serviu para este propósito. No entanto, estes dados experimentais ainda podem ser utilizados no contexto de outro trabalho, que envolve a elaboração de novos algoritmos de análise (por exemplo, propagação de ondas de atividades intracortical e medidas de avalanches neuronais).

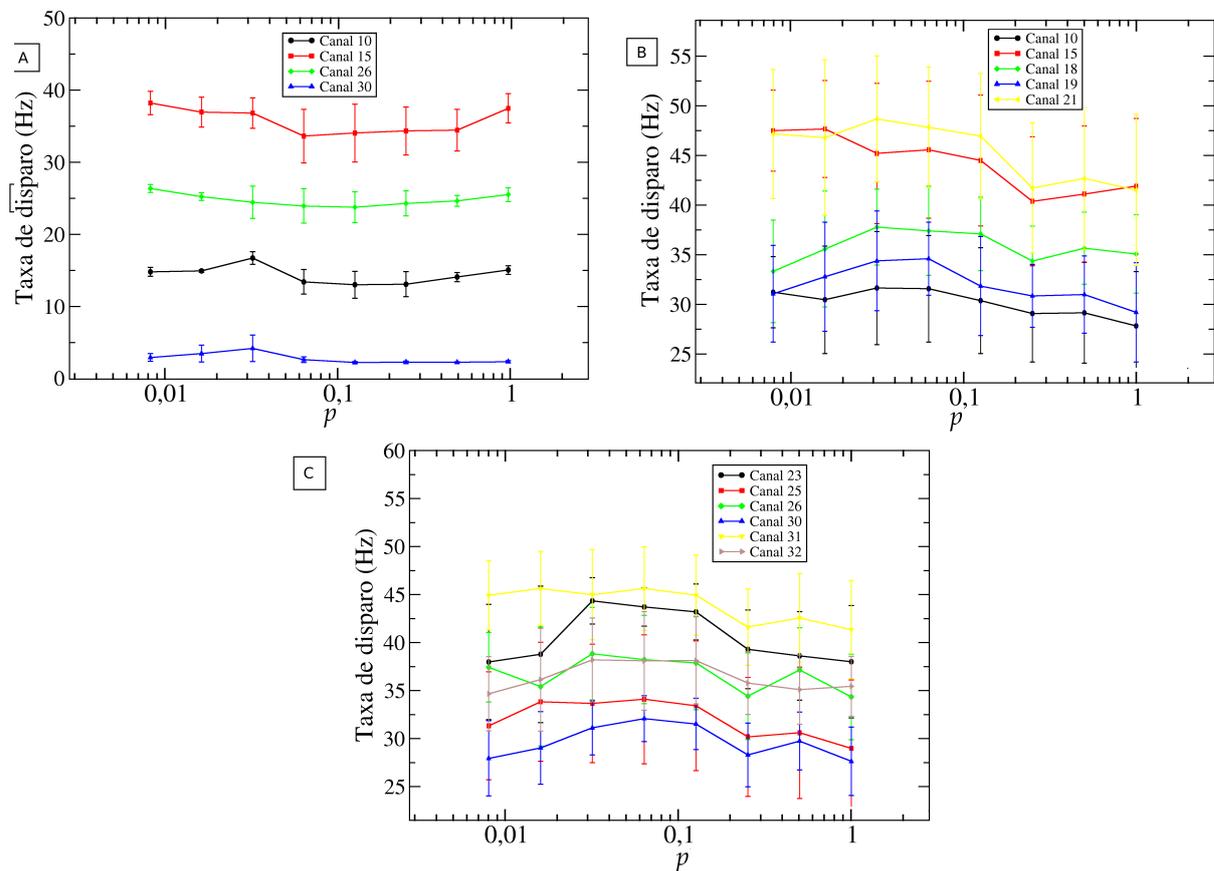


Figura 40 – Taxas de disparo em função da densidade espacial de estímulos do tipo *Gabor*. O gráfico A apresenta as curvas estímulo-resposta para os canais gravados no primeiro bloco ($800\mu\text{m}$). Os gráficos B e C exibem as curvas referentes à gravação do segundo bloco ($1200\mu\text{m}$).

4.2 Contraste

A resposta de V1 com relação ao contraste é outro parâmetro importante que precisávamos analisar para validação de nossos experimentos. Dada a pouca literatura sobre visão em ratos precisávamos estabelecer as curvas de resposta ao contraste e ver se não havia um limiar de resposta muito alto. Além disso queríamos verificar se a resposta tinha um comportamento monotônico ou que decaísse para altos contrastes.

Em primeiro lugar foram obtidas os PSTHs para os diferentes valores de contraste apresentados. A figura 41 mostra PSTHs para o canal 29 orientado a 0° . Podemos ver que para contraste 0 ou contrastes muito baixos não há qualquer variação na taxa de disparos, além de flutuações em torno do valor basal de atividade ($\sim 30\text{Hz}$ para este canal). A partir de contraste 0,4 (40%) aparece um claro aumento de atividade induzida pelo estímulo (entre 100 e 300 ms após o começo da estimulação).

Para a obtenção da resposta neural em função do contraste, foi detectado o valor máximo do PSTH de cada canal para cada contraste e foi feito um gráfico deste valor em função do respectivo contraste (Figuras 42, 43 e 44). Conseguimos obter de modo preliminar curvas de resposta para diferentes neurônios. Dois aspectos dos resultados encontrados tornam esta medida particularmente interessante para estudos futuros: 1) Obtivemos respostas a contrastes relativamente baixos ($\sim 30\%$); As curvas não apresentaram saturação, a maioria delas apresentou comportamento monotônico crescente. Desta forma este estímulo poderá ser utilizado para o estudo da faixa dinâmica do córtex e sua relação com modelos que prevêm uma criticalidade auto-organizada no córtex implicando em faixa dinâmica máxima (19).

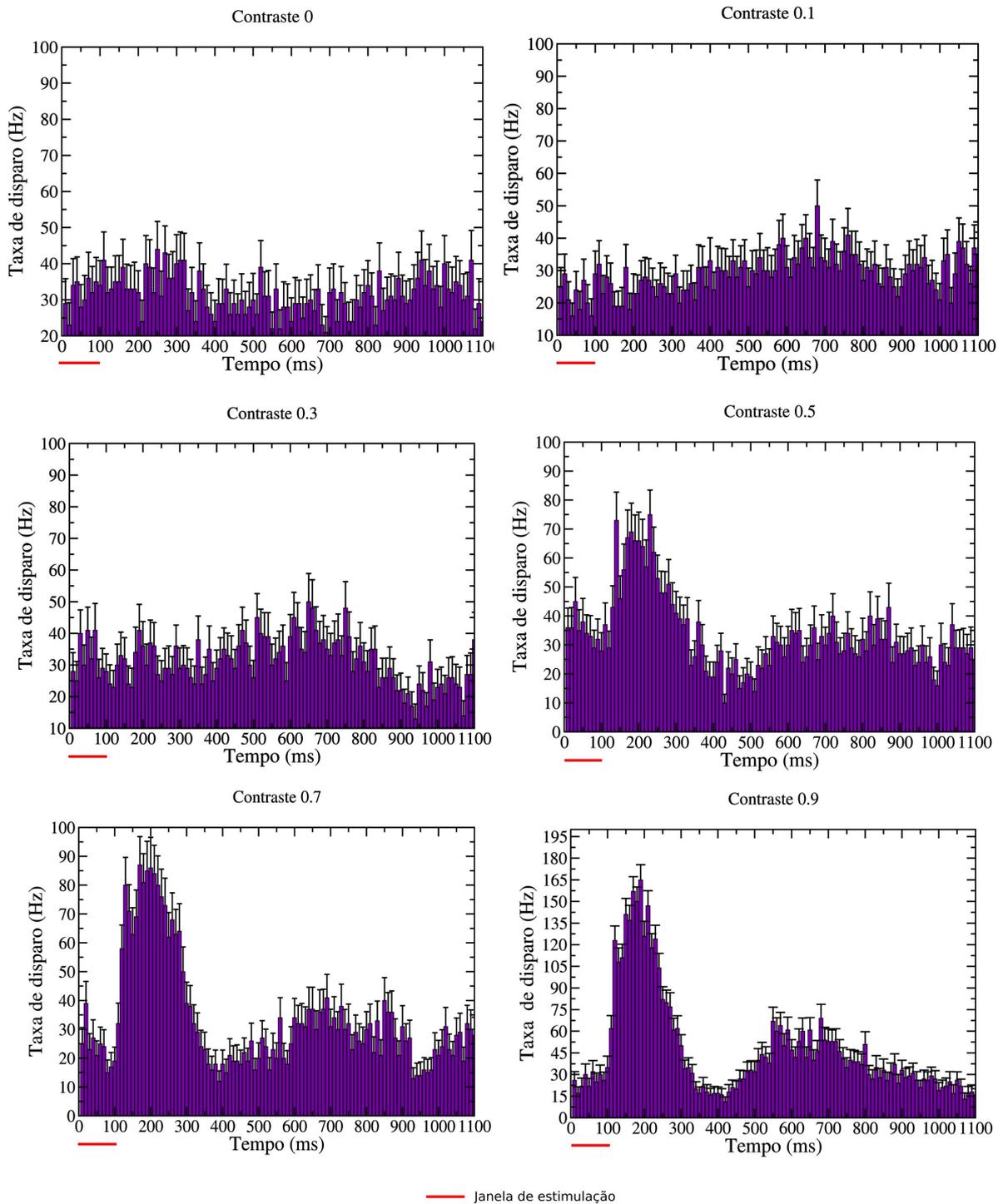


Figura 41 – *Peristimulus time histograms* para diferentes valores de contraste (0-90%) obtidos para o canal 29, orientado a 0° (animal C a $1200\mu\text{m}$). A estimulação visual é apresentada entre 0 e 100ms.

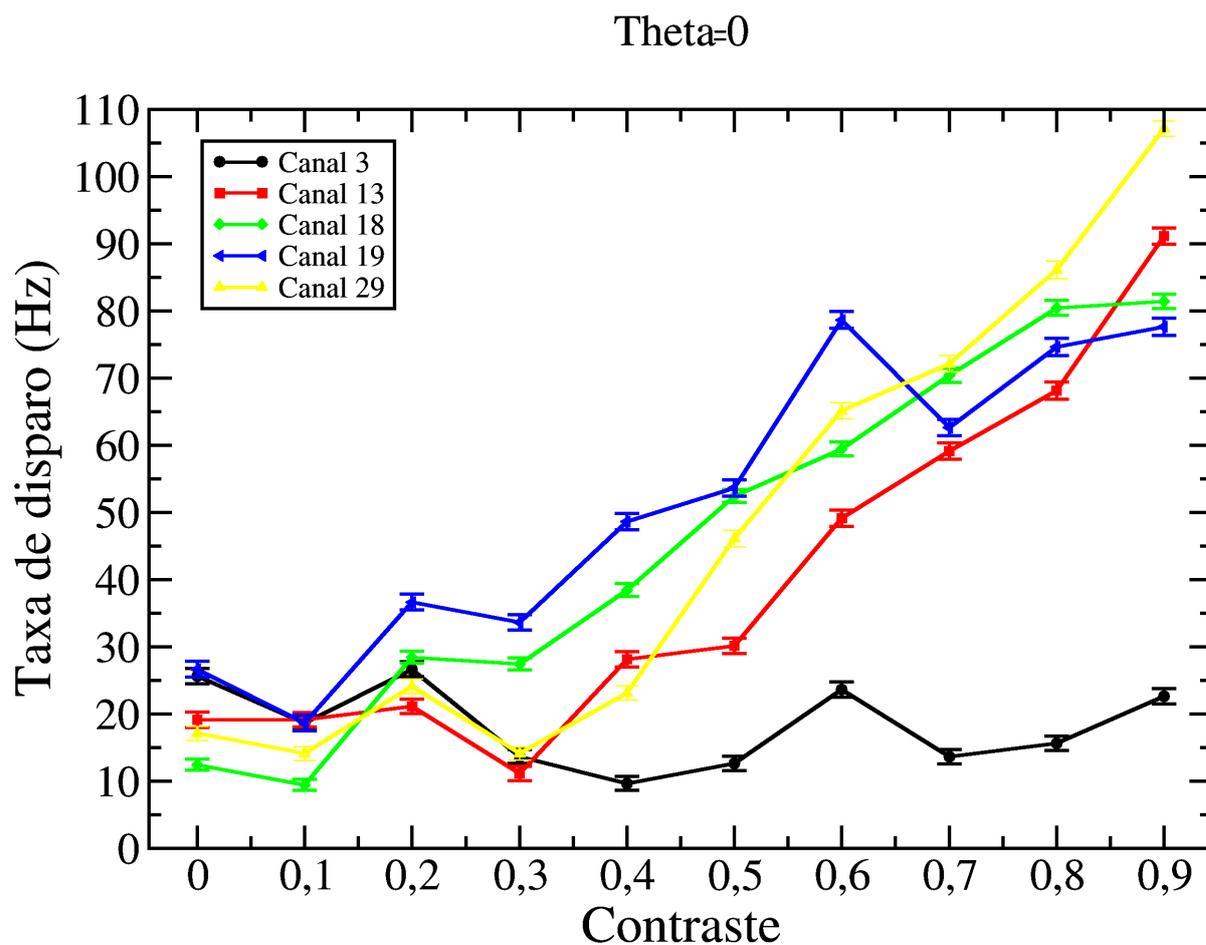


Figura 42 – Taxas de disparo máximas em função do contraste. As curvas representam o comportamento da taxa de disparo, por canal, em função do contraste entre as raias de um objeto do tipo grade de tela interia orientado a 0° . Dados obtidos a partir do animal C.

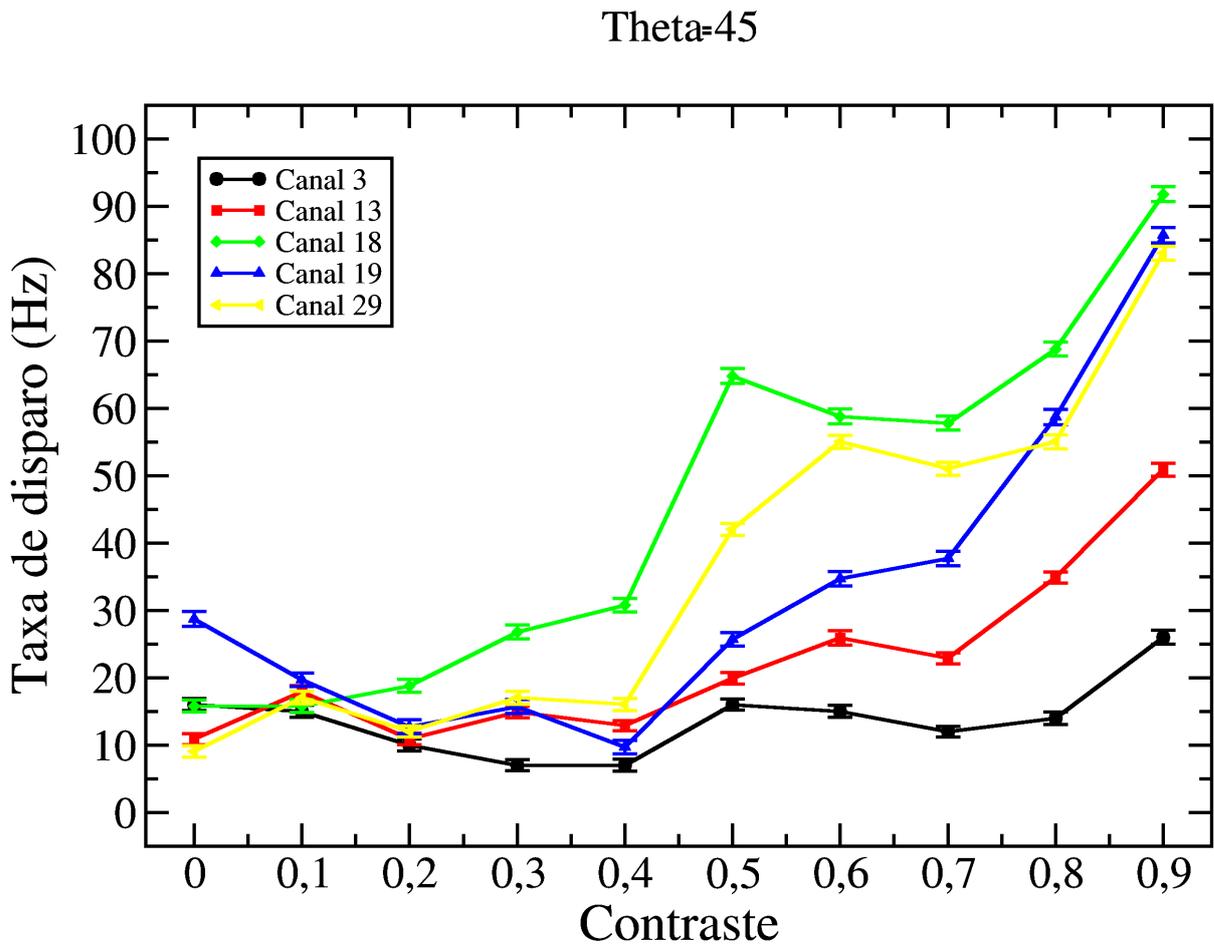


Figura 43 – Taxas de disparo máximas em função do contraste. As curvas representam o comportamento da taxa de disparo, por canal, em função do contraste entre as raiais de um objeto do tipo grade de tela interia orientado a 45° . Dados obtidos a partir do animal C.

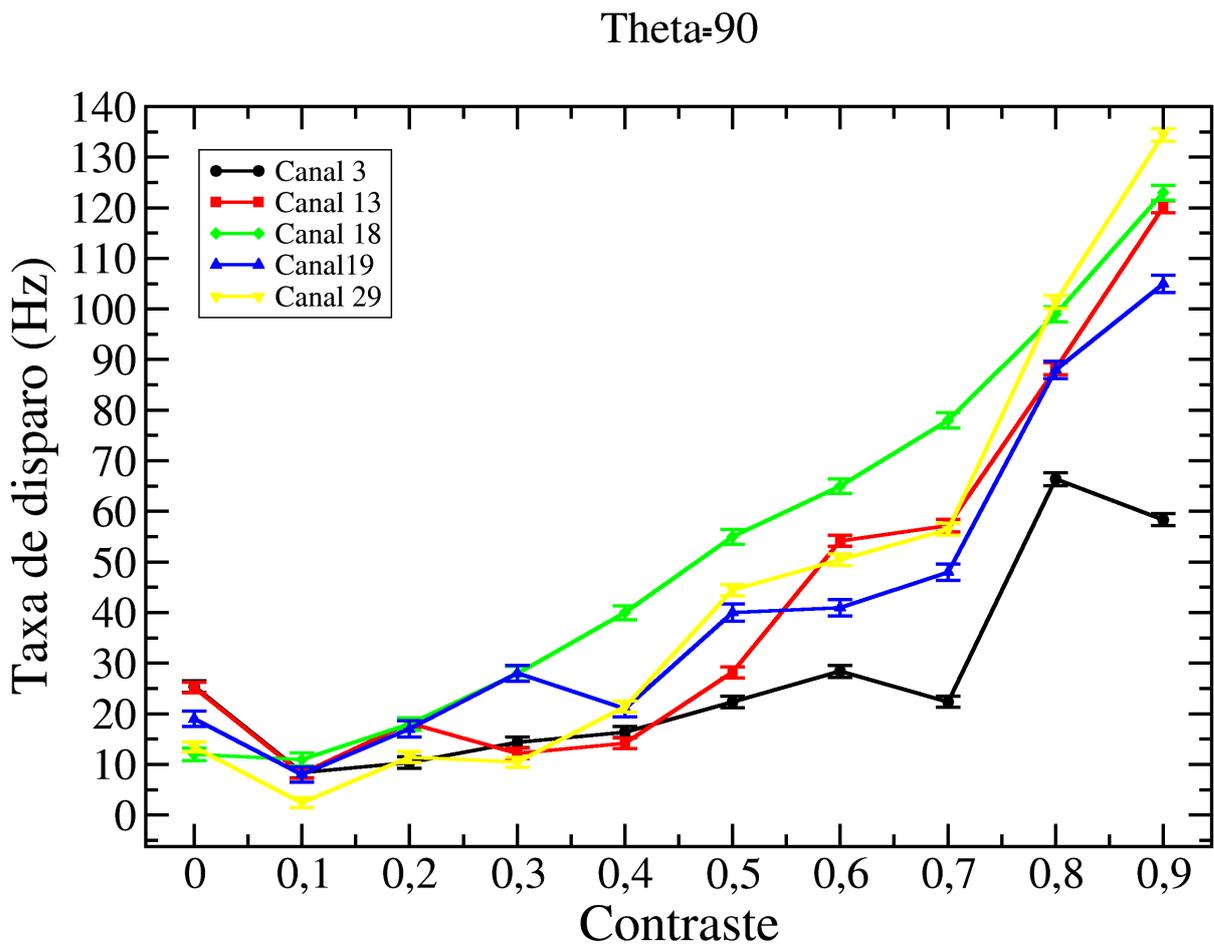


Figura 44 – Taxas de disparo máximas em função do contraste. As curvas representam o comportamento da taxa de disparo, por canal, em função do contraste entre as raias de um objeto do tipo grade de tela interia orientado a 90°. Dados obtidos a partir do animal C.

4.3 Orientação

Uma das propriedades mais notáveis tradicionalmente atribuídas aos neurônios de V1 é a seletividade à orientação. Os resultados clássicos são fruto de estudos com gatos e macacos, havendo ainda pouca literatura sobre roedores e em particular sobre ratos.

Assim como nos protocolos do contraste, foram obtidos os PSTHs a partir de cada um dos estímulos (12 orientações diferentes). Os PSTHs são mostrados nas figuras 45 e 46. Da mesma forma, para cada PSTH foi detectado o pico da resposta e com estes valores foram construídas as curvas de seletividade à orientação (Figuras 47, 48, 49 e 50).

De modo geral nas medidas que foram feitas, embora os eletrodos respondam a todas as orientações, foi possível identificar seletividade à orientação em parte dos eletrodos medidos.

A seletividade à orientação varia muito de neurônio para neurônio e diversos parâmetros podem influenciar as medidas, tais como: camada do córtex do neurônio medido e nível de anestesia. Além disso quando se utiliza medidas extracelulares, nem sempre se pode ter certeza de medir um único neurônio. Dado que V1 do rato não tem estrutura de colunas de orientação bem definidas, neurônios próximos podem ter seletividade à orientação bem diferentes. Desta forma um sinal de um eletrodo pode ser contaminado por captar sinais de dois neurônios diferentes. Em experimentos futuros pretendemos utilizar eletrodos com espessura mais fina e impedância mais alta para confirmarmos estes resultados de seletividade à orientação encontrados.

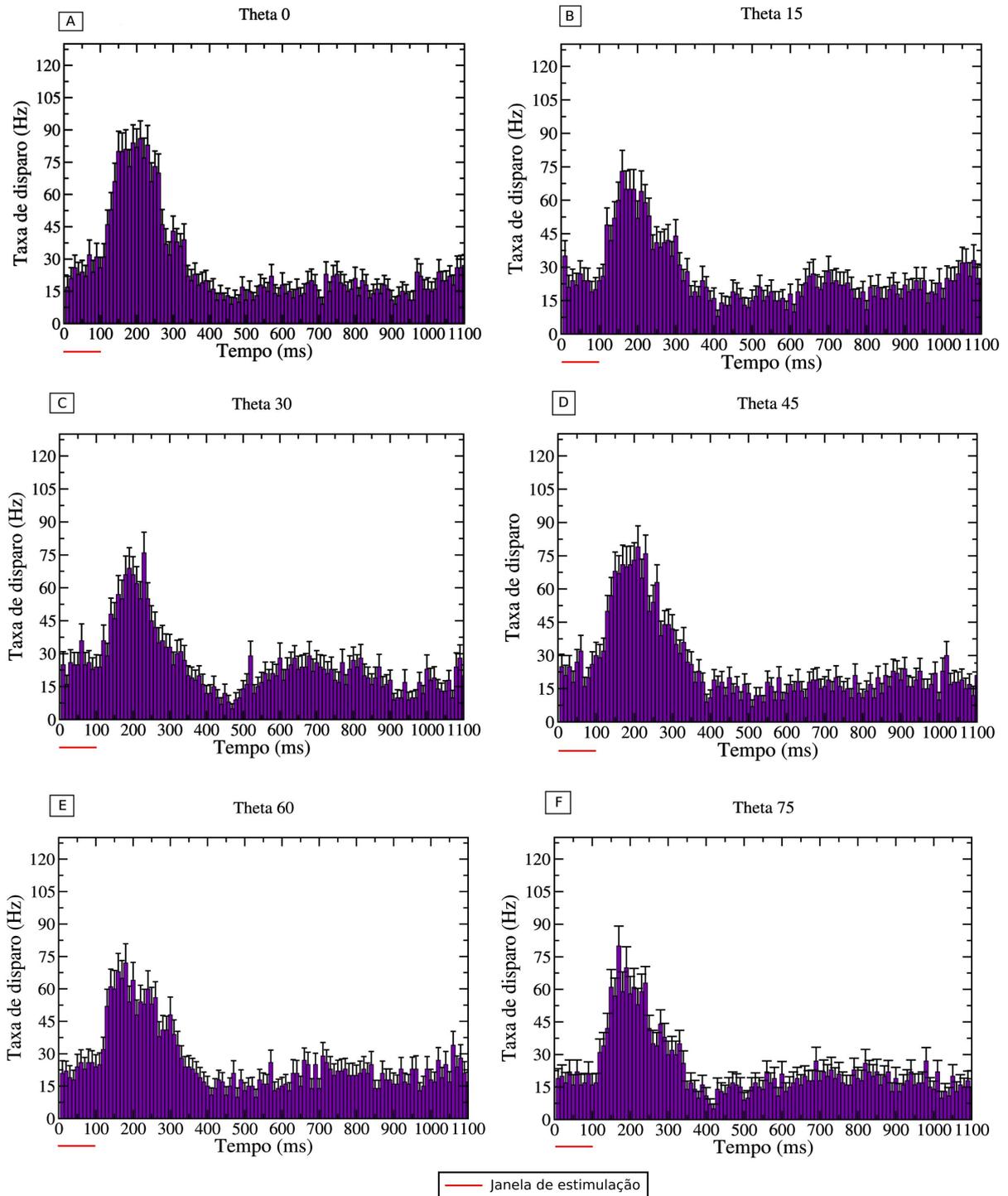


Figura 45 – *Peristimulus time histograms* para diferentes orientações (0-75°). A estimulação visual é apresentada entre 0 e 100ms. Dados provenientes do animal C gravados a 1200 μ m.

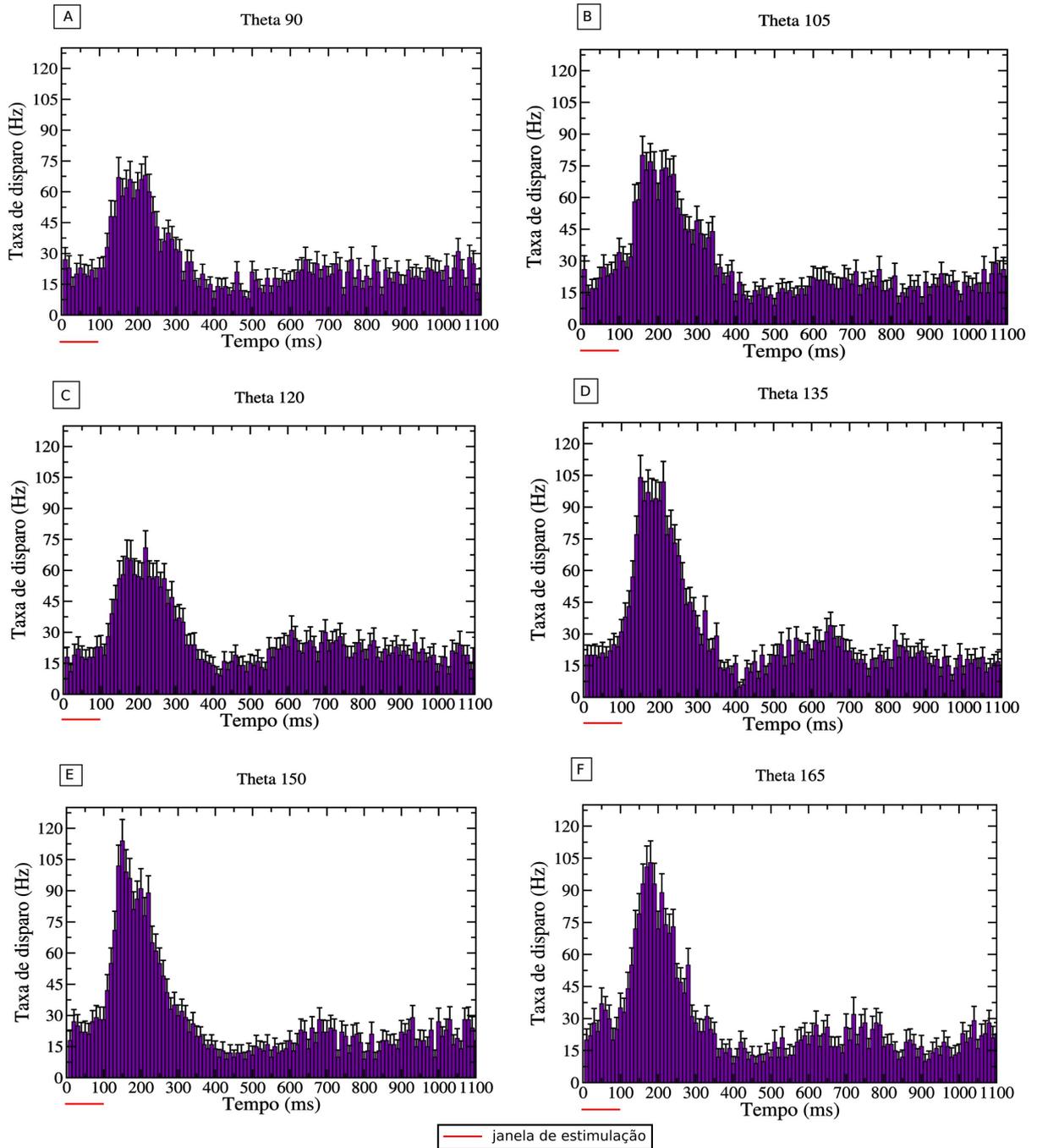


Figura 46 – *Peristimulus time histograms* para diferentes orientações (90-165°). A estimulação visual é apresentada entre 0 e 100ms. Dados provenientes do animal C gravados a 1200 μ m.

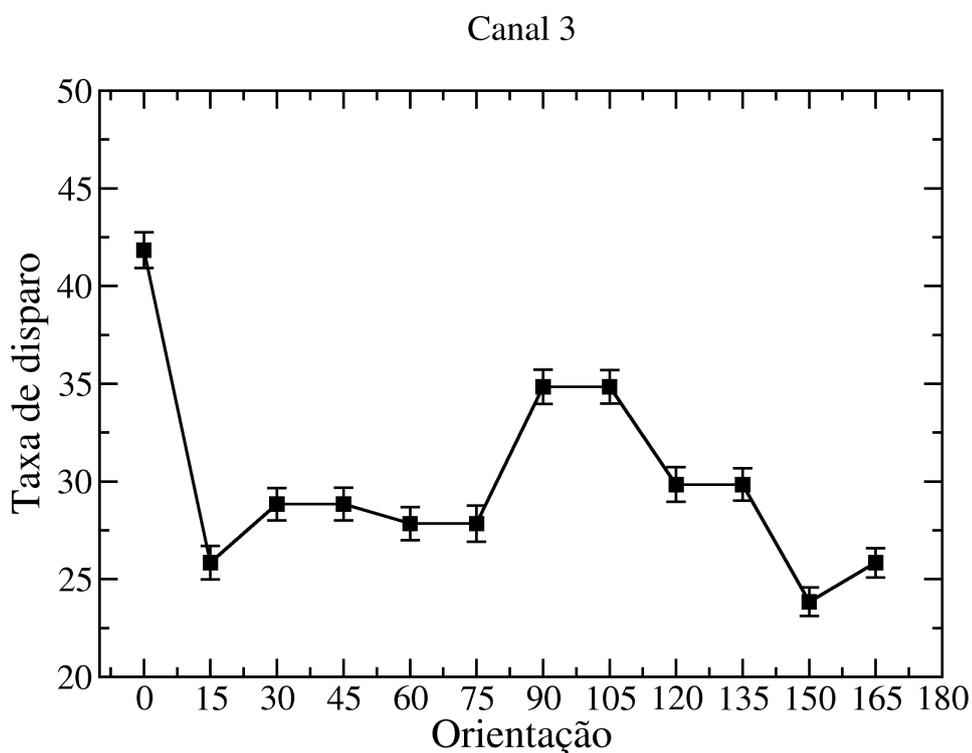


Figura 47 – Curva de seletividade à orientação para neurônio medido no canal 3, animal C a 1200 μ m de profundidade em V1.

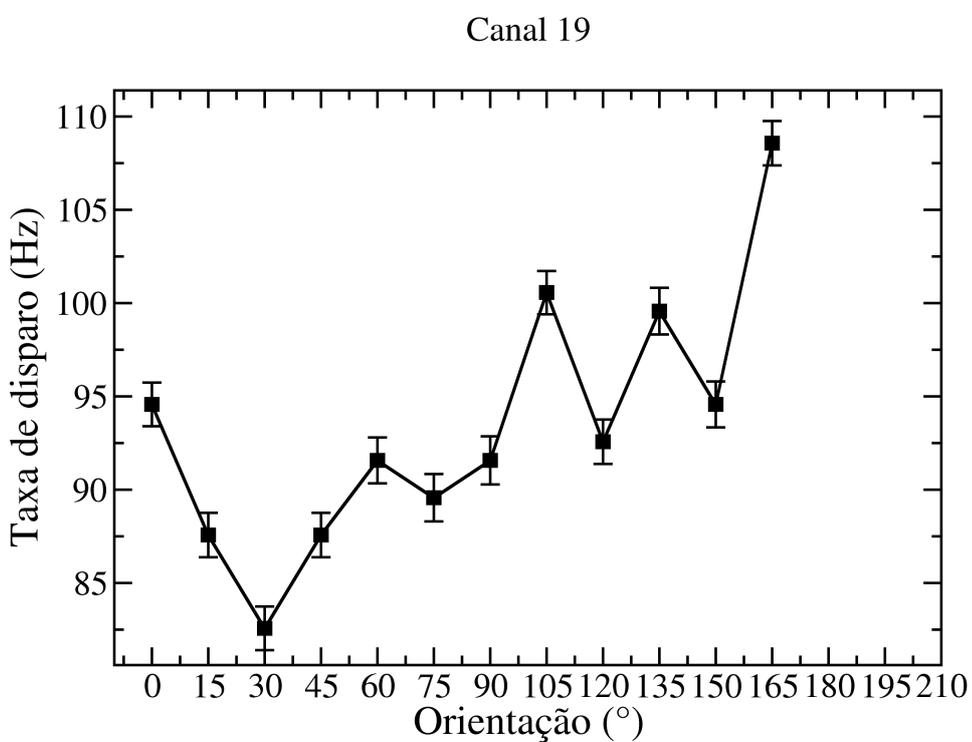


Figura 48 – Curva de seletividade à orientação para neurônio medido no canal 19, animal C a 1200 μ m de profundidade em V1.

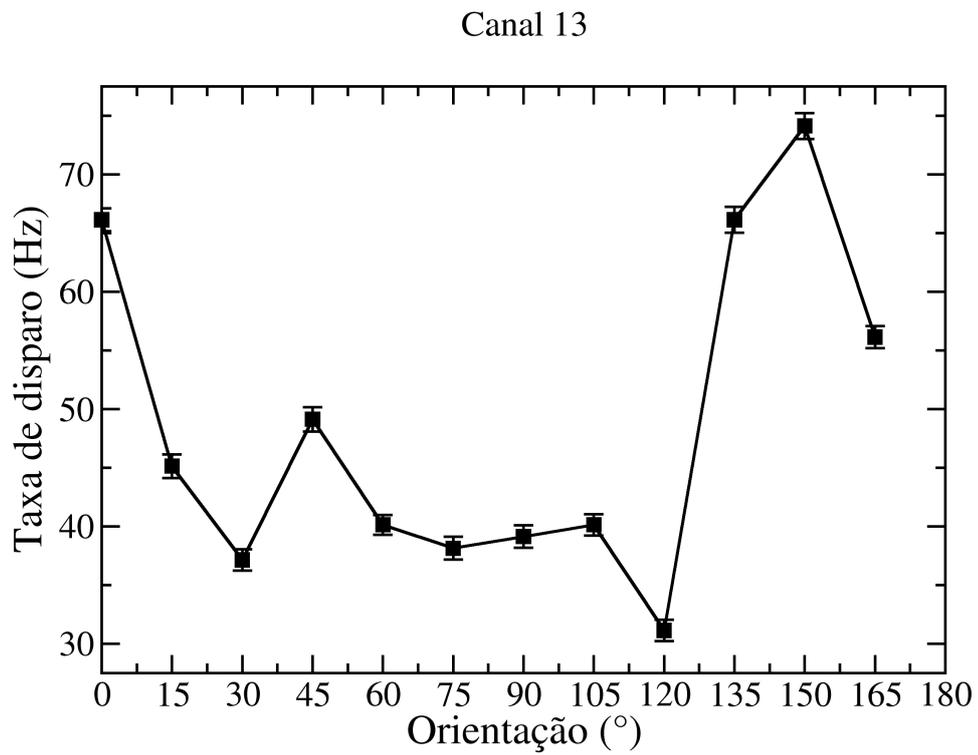


Figura 49 – Curva de seletividade à orientação para neurônio medido no canal 13, animal C a 1200 μm de profundidade em V1.

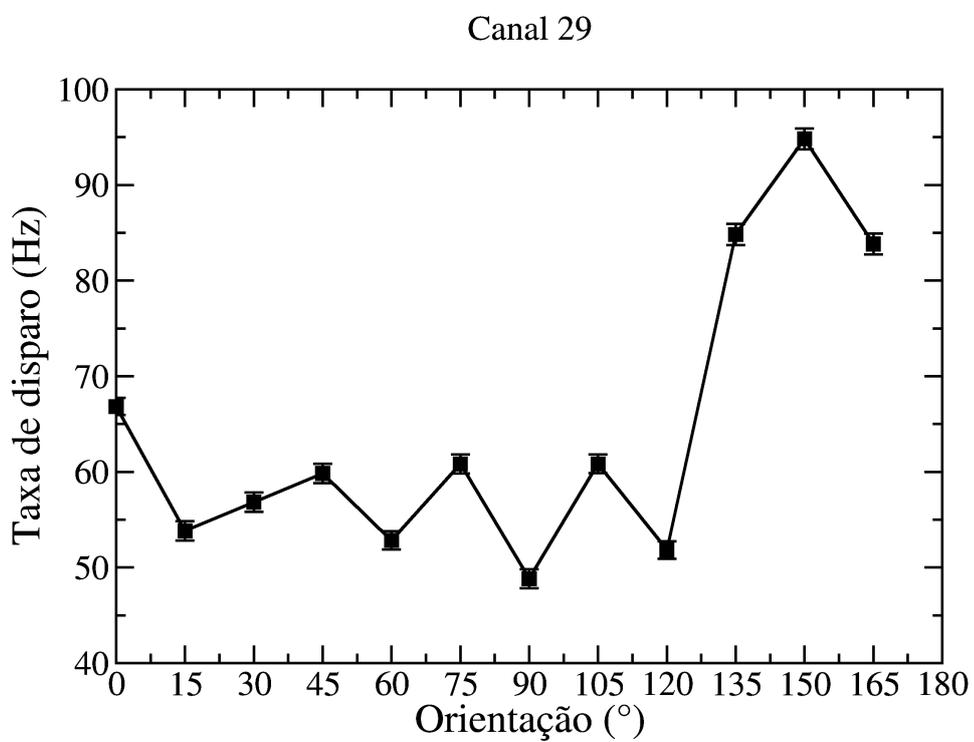


Figura 50 – Curva de seletividade à orientação para neurônio medido no canal 29, animal C a 1200 μm de profundidade em V1.

4.4 Grades em traslação

Além da seletividade à orientação, que acredita-se que sirva de base para a detecção de contornos, as células de V1 também são sensíveis a movimento. Muitas vezes pode-se induzir respostas neurais muito mais intensas nos neurônios de V1 ao apresentar grades em movimento aparente. Foi feito um protocolo de estimulação que apresenta grades com movimento aparente (com deriva de fase). Neste protocolo apresentamos o estímulo por períodos de tempo mais longos, com 1 s de estimulação seguido de 5 s de intervalo. Dado o maior tempo de estimulação e intervalo, cada estímulo só pode ser repetido 10 vezes. Neste caso, como temos poucas repetições, fizemos uso da suavização dos PSTHs com filtro gaussiano ($\sigma = 20\text{ms}$) para obter uma melhor estimativa da taxa de disparos ao custo de uma menor resolução temporal, conforme exemplificado na figura 51 (ver capítulo de métodos, figura 38).

Um dos objetivos deste estímulo era avaliar em que medida a taxa de resposta neural dos ratos mudaria frente a um estímulo prolongado. Sabemos que para um estímulo estático a adaptação neural faz com que os neurônios rapidamente parem de responder. Por isso foi necessário utilizar um estímulo com uma variação temporal (no caso movimento de fase). Verificamos que todos os canais tiveram uma forte depressão de sua resposta após algumas centenas de milisegundos, mostrando que para o rato, estímulos com duração da ordem de 100 ms (como no protocolo anterior) já são suficientes para induzir respostas bastante elevadas.

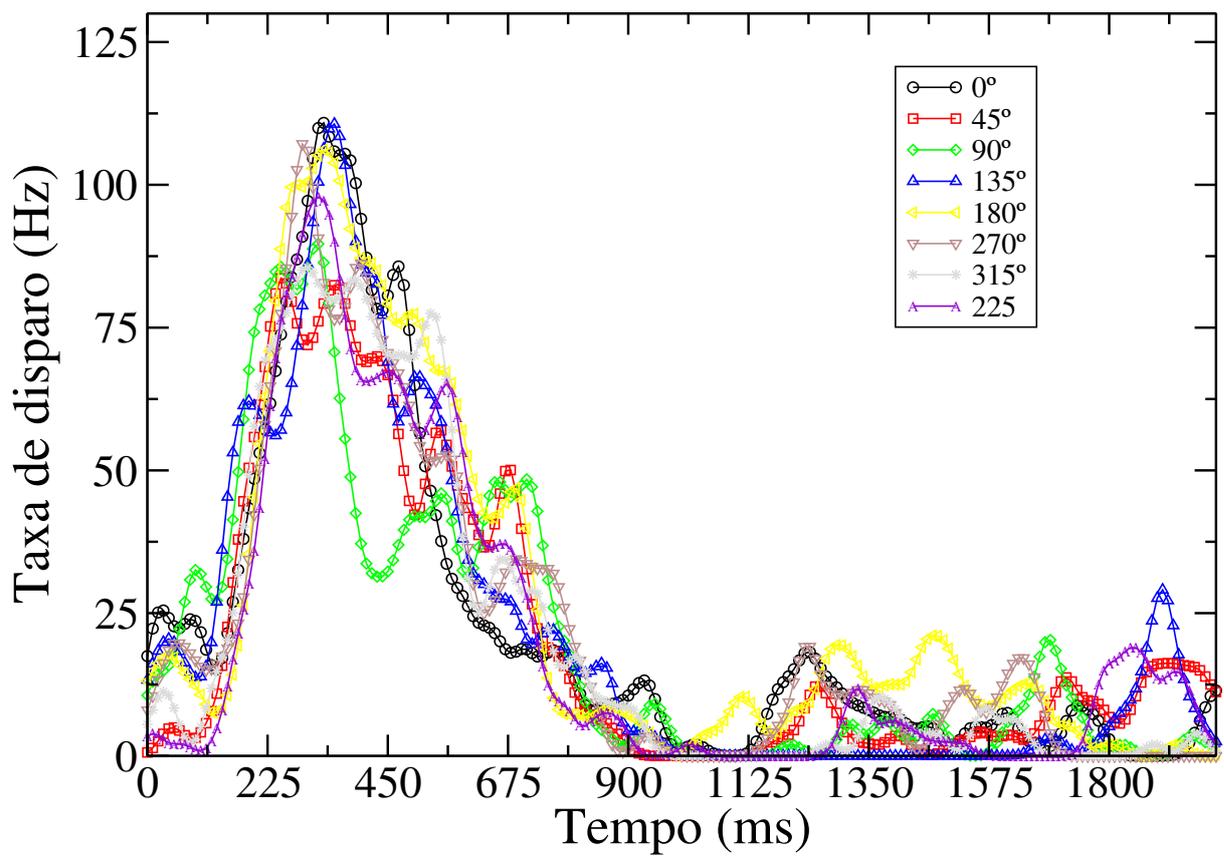


Figura 51 – Estimativa da taxa de disparo a partir de PSTHs obtidas para o protocolo grades em traslação. As curvas foram geradas aplicando-se um filtro Gaussiano ($\sigma = 20$ ms) aos histogramas temporais das taxas de disparos do canal 2.

5 Conclusões e perspectivas

O presente trabalho de mestrado implementou com sucesso um protocolo experimental para o estudo de propriedades de neurônios do córtex visual primário (V1) em ratos. Em primeiro lugar, foi desenvolvida, aprimorada e validada uma técnica de fabricação de matrizes de microeletrodos para implantes cerebrais. Em seguida foi construído o aparato de estimulação visual e foram elaborados programas computacionais para estimulação visual na linguagem Elphy. Além disso foram testados e encontrados os parâmetros adequados para obtenção de respostas visuais tais como protocolo de anestesia, posicionamento dos eletrodos, posicionamento e distância da tela com relação ao animal.

Os protocolos de estimulação visual estudados permitiram obter respostas visuais com confiabilidade assim como avaliar algumas particularidades das respostas visuais de V1 de ratos. Em particular foram identificadas as escalas de tempo da resposta dos neurônio de V1 de ratos a estímulos visuais tipo grade, tempo de adaptação neural a estímulos persistentes e grau de seletividade a orientação.

Estes estudos preliminares serão importantes para balizar os parâmetros a serem utilizados em futuros estudos no LNSC em diversas frentes de pesquisa. Alguns exemplos são: estudo de assinaturas de criticalidade no córtex visual, sob estimulação; o estudo do possível estado de criticalidade auto-organizada no cérebro e suas implicações (19–21); o uso de técnicas de teoria da informação para compreensão dos trens de disparos neurais (10–13), a emergência de ondas de atividade coletiva induzida por estimulação visual (14–16), o uso de modelos de Ising na compreensão das correlações e atividade global de um sistema sensorial (17, 18).

Referências

- 1 DAYAN, P.; ABBOTT, L. Theoretical neuroscience: computational and mathematical modeling of neural systems. *Journal of Cognitive Neuroscience*, v. 15, n. 1, p. 154–155, 2003.
- 2 KANDEL, E. R. et al. *Principles of neural science*. [S.l.]: McGraw-Hill New York, 2013.
- 3 IZHIKEVICH, E. M. *Dynamical systems in neuroscience*. [S.l.]: MIT press, 2007.
- 4 DEANGELIS, G. C.; OHZAWA, I.; FREEMAN, R. D. Receptive-field dynamics in the central visual pathways. *Trends in neurosciences*, Elsevier, v. 18, n. 10, p. 451–458, 1995.
- 5 BUZSAKI, G. *Rhythms of the Brain*. [S.l.]: Oxford University Press, 2006.
- 6 SELVERSTON, A. I. et al. The stomatogastric nervous system: structure and function of a small neural network. *Progress in neurobiology*, Elsevier, v. 7, p. 215–289, 1976.
- 7 RABINOVICH, M. I. et al. Dynamical principles in neuroscience. *Reviews of modern physics*, APS, v. 78, n. 4, p. 1213, 2006.
- 8 CARELLI, P. V. et al. Whole cell stochastic model reproduces the irregularities found in the membrane potential of bursting neurons. *Journal of neurophysiology*, Am Physiological Soc, v. 94, n. 2, p. 1169–1179, 2005.
- 9 REYES, M. B. et al. A modeling approach on why simple central pattern generators are built of irregular neurons. *PloS one*, Public Library of Science, v. 10, n. 3, p. e0120314, 2015.
- 10 RIEKE, F. et al. *Spikes: Exploring the Neural Code*. Cambridge, MA: MIT Press, 1999.
- 11 STRONG, S. P. et al. Entropy and information in neural spike trains. *Physical review letters*, APS, v. 80, n. 1, p. 197, 1998.
- 12 BROCHINI, L.; CARELLI, P. V.; PINTO, R. D. Single synapse information coding in intraburst spike patterns of central pattern generator motor neurons. *The Journal of Neuroscience*, Society for Neuroscience, v. 31, n. 34, p. 12297–12306, 2011.
- 13 REICH, D. S. et al. Interspike intervals, receptive fields, and information encoding in primary visual cortex. *The Journal of neuroscience*, Soc Neuroscience, v. 20, n. 5, p. 1964–1974, 2000.
- 14 BORG-GRAHAM, L. J.; MONIER, C.; FREGNAC, Y. Visual input evokes transient and strong shunting inhibition in visual cortical neurons. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 393, n. 6683, p. 369–373, 1998.
- 15 NAUHAUS, I. et al. Stimulus contrast modulates functional connectivity in visual cortex. *Nature neuroscience*, Nature Publishing Group, v. 12, n. 1, p. 70–76, 2009.
- 16 MULLER, L. et al. The stimulus-evoked population response in visual cortex of awake monkey is a propagating wave. *Nature communications*, Nature Publishing Group, v. 5, 2014.

- 17 SCHNEIDMAN, E. et al. Weak pairwise correlations imply strongly correlated network states in a neural population. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 440, n. 7087, p. 1007–1012, 2006.
- 18 TKAČIK, G. et al. Searching for collective behavior in a large network of sensory neurons. 2014.
- 19 KINOUCI, O.; COPELLI, M. Optimal dynamical range of excitable networks at criticality. *Nature physics*, Nature Publishing Group, v. 2, n. 5, p. 348–351, 2006.
- 20 RIBEIRO, T. L. et al. Spike avalanches exhibit universal dynamics across the sleep-wake cycle. *PloS one*, Public Library of Science, v. 5, n. 11, p. e14129, 2010.
- 21 SHEW, W. L. et al. Adaptation to sensory input tunes visual cortex to criticality. *Nature Physics*, Nature Publishing Group, 2015.
- 22 HUBEL, D. H.; WIESEL, T. N. Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *The Journal of physiology*, Wiley Online Library, v. 148, n. 3, p. 574–591, 1959.
- 23 HUBEL, D. H.; WIESEL, T. N. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *The Journal of physiology*, Blackwell Publishing, v. 160, n. 1, p. 106, 1962.
- 24 HUBEL, D. H.; WIESEL, T. N. Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *The Journal of physiology*, Wiley Online Library, v. 195, n. 1, p. 215–243, 1968.
- 25 HUBEL, D. H.; WIESEL, T. N. Ferrier lecture: Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, The Royal Society, v. 198, n. 1130, p. 1–59, 1977.
- 26 ISSA, N. P.; TREPEL, C.; STRYKER, M. P. Spatial frequency maps in cat visual cortex. *The Journal of Neuroscience*, Soc Neuroscience, v. 20, n. 22, p. 8504–8514, 2000.
- 27 OHKI, K.; REID, R. C. Specificity and randomness in the visual cortex. *Current opinion in neurobiology*, Elsevier, v. 17, n. 4, p. 401–407, 2007.
- 28 HOOSER, S. D. V. Similarity and diversity in visual cortex: is there a unifying theory of cortical computation? *The Neuroscientist*, Sage Publications, v. 13, n. 6, p. 639–656, 2007.
- 29 GIRMAN, S. V.; SAUVÉ, Y.; LUND, R. D. Receptive field properties of single neurons in rat primary visual cortex. *Journal of Neurophysiology*, Am Physiological Soc, v. 82, n. 1, p. 301–311, 1999.
- 30 HEIMEL, J. A.; HOOSER, S. D. V.; NELSON, S. B. Laminar organization of response properties in primary visual cortex of the gray squirrel (*sciurus carolinensis*). *Journal of neurophysiology*, Am Physiological Soc, v. 94, n. 5, p. 3538–3554, 2005.
- 31 OHKI, K. et al. Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 433, n. 7026, p. 597–603, 2005.
- 32 AZEVEDO, F. A. et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, Wiley Online Library, v. 513, n. 5, p. 532–541, 2009.

- 33 KEENER, J. P.; SNEYD, J. *Mathematical Physiology: Cellular Physiology*. [S.l.]: Springer, 2009. v. 1.
- 34 HODGKIN, A. L.; KATZ, B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *The Journal of physiology*, Wiley Online Library, v. 108, n. 1, p. 37–77, 1949.
- 35 HODGKIN, A.; HUXLEY, A. The components of membrane conductance in the giant axon of loligo. *The Journal of physiology*, Blackwell Publishing, v. 116, n. 4, p. 473, 1952.
- 36 HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of loligo. *The Journal of physiology*, Wiley Online Library, v. 116, n. 4, p. 497–506, 1952.
- 37 HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, Wiley Online Library, v. 117, n. 4, p. 500–544, 1952.
- 38 ESSEN, D. C. V.; NEWSOME, W. T.; MAUNSELL, J. H. The visual field representation in striate cortex of the macaque monkey: asymmetries, anisotropies, and individual variability. *Vision research*, Elsevier, v. 24, n. 5, p. 429–448, 1984.
- 39 HARTLINE, H. K. The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina. *American Journal of Physiology*, 1938.
- 40 KUFFLER, S. W. Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *Journal of neurophysiology*, Am Physiological Soc, v. 16, n. 1, p. 37–68, 1953.
- 41 CAIXETA, F. V. Atividade multimodal no córtex sensorial primário de ratos. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010.
- 42 PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. [S.l.]: Academic Press: San Diego, 2006.

Apêndices

APÊNDICE A – As equações de Goldman-Hodgkin-Katz

O fluxo de íons através da membrana celular é dado a partir de gradientes de concentração e de potencial elétrico. A contribuição do campo elétrico sobre o fluxo de partículas é dado pela equação de Planck

$$\mathbf{J} = -u \frac{z}{|z|} c \nabla \phi \quad (\text{A.1})$$

onde u é a mobilidade do íon, definida como a velocidade deste sob campo constante; z é a valência do íon, tal que $\frac{z}{|z|}$ é o sinal da força sobre o íon; c é a concentração do íon; e ϕ o potencial elétrico, tal que $-\nabla \phi$ é o campo elétrico.

Da primeira lei de Fick temos que a contribuição do gradiente de difusão é dado por

$$\mathbf{J} = -D \nabla c \quad (\text{A.2})$$

onde D é o coeficiente de difusão. A mobilidade iônica u está relacionada com o coeficiente de difusão D pela seguinte equação

$$D = \frac{uRT}{|z|F}. \quad (\text{A.3})$$

na qual R é a constante universal dos gases, T a temperatura absoluta e F a constante de Faraday.

Combinando os efeitos dos gradientes de difusão e elétrico obtemos a equação de Nernst-Planck

$$\mathbf{J} = -D \left(\nabla c + \frac{zF}{RT} c \nabla \phi \right). \quad (\text{A.4})$$

Se o fluxo de íons e o campo elétrico são transversais à membrana, (A.4) pode ser reescrita na sua forma unidimensional

$$J = -D \left(\frac{dc}{dx} + \frac{zF}{RT} c \frac{d\phi}{dx} \right) \quad (\text{A.5})$$

A equação de Nernst também pode ser derivada de (A.5), quando o fluxo J é zero

$$-D \left(\frac{dc}{dx} + \frac{zF}{RT} c \frac{d\phi}{dx} \right) = 0 \quad (\text{A.6})$$

tal que

$$\frac{1}{c} \frac{dc}{dx} + \frac{zF}{RT} \frac{d\phi}{dx} = 0 \quad (\text{A.7})$$

Suponha que a membrana celular estende-se de $x = 0$ (internamente) até $x = L$ (externamente), e que i e e denotam quantidades internas e externas respectivamente, logo da integração em (A.7) de $x = 0$ até $x = L$ obtém-se

$$\ln(c)|_{c_i}^{c_e} = \frac{zF}{RT}(\phi_i - \phi_e) \quad (\text{A.8})$$

obtendo assim a diferença de potencial através da membrana, $V = \phi_i - \phi_e$, dado por

$$V = \frac{RT}{zF} \ln\left(\frac{c_e}{c_i}\right), \quad (\text{A.9})$$

que é a equação de Nernst.

A.1 Aproximação de campo constante

Um resultado bem interessante é obtido ao se tomar o campo elétrico como uma constante através da membrana, ou seja, $\frac{d\phi}{dx} = E$ levando após integração a $E = \frac{V}{L}$. Assumindo esta premissa podemos reescrever a equação de Nernst-Plank como

$$\frac{dc}{dx} - \frac{zFV}{RTL}c + \frac{J}{D} = 0 \quad (\text{A.10})$$

cuja solução é

$$\exp\left(\frac{-zVFx}{RTL}\right)c(x) = \frac{JRTL}{DzVF} \left[\exp\left(\frac{-zVFx}{RTL}\right) - 1 \right] + c_i, \quad (\text{A.11})$$

c_i advém da condição de contorno $c(0) = c_i$. Para a outra condição de contorno, $c(L) = c_e$, é necessário que

$$J = \frac{DzFV}{LRT} \frac{c_i - c_e \exp\left(\frac{-zVF}{RT}\right)}{1 - \exp\left(\frac{-zVF}{RT}\right)} \quad (\text{A.12})$$

onde J é densidade de fluxo com unidades de moles por área por unidade de tempo. Esta densidade de fluxo torna-se uma densidade de corrente elétrica (corrente por unidade de área) quando multiplicado por zF ,

$$I_Q = P_Q \frac{z^2F^2}{RT} V \frac{c_i - c_e \exp\left(\frac{-zVF}{RT}\right)}{1 - \exp\left(\frac{-zVF}{RT}\right)} \quad (\text{A.13})$$

o índice subscripto Q denota o íon ao qual se aplica a equação. $P_Q = \frac{D}{L}$ é a permeabilidade da membrana a Q . Esta é a famosa equação de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) para correntes, que desenvolve um papel muito importante em modelos de atividade elétrica celular.

A corrente vai a zero se os gradientes difusivo e elétrico são balanceados, que ocorre, devido $z \neq 0$. Nesta configuração aparece, como era de se esperar, o potencial de Nernst:

$$V = V_Q = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{c_e}{c_i} \right) \quad (\text{A.14})$$

Se houver vários íons separados pela mesma membrana a equação GHK pode ser reescrita como

$$I_{j,k} = \frac{F^2V}{RT} \left[\sum_j P_j \frac{c_i^j - c_e^j \exp\left(-\frac{FV}{RT}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{FV}{RT}\right)} + \sum_k P_k \frac{c_i^k - c_e^k \exp\left(\frac{FV}{RT}\right)}{1 - \exp\left(\frac{FV}{RT}\right)} \right] \quad (\text{A.15})$$

onde a primeira soma em j estende-se sobre íons com valência $+1$ e a segunda em k abrangendo íons de valência -1 . O fluxo de cada um destes íons irá depender separadamente de suas relações corrente-voltagem. Em geral não existe nenhum potencial para o qual todas as correntes sejam individualmente zero. Entretanto, o potencial no qual o fluxo líquido de corrente é zero é chamado potencial de Goldman-Hodgkin-Katz. Para corrente líquida zero a equação (A.15) fornece, após alguma algebra, o seguinte potencial GHK

$$V = -\frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum_k P_k c_e^k + \sum_j P_j c_i^j}{\sum_k P_k c_i^k + \sum_j P_j c_e^j} \right) \quad (\text{A.16})$$

Supondo que a membrana separa os seguintes íons, Na^+ ($z = 1$), K^+ ($z = 1$) e Cl^- ($z = -1$) o potencial de GHK é

$$V_{repouso} = -\frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{Na}[Na^+]_i + P_K[K^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_e}{P_{Na}[Na^+]_e + P_K[K^+]_e + P_{Cl}[Cl^-]_i} \right) \quad (\text{A.17})$$

É importante observar que nem o potencial nem correntes GHK são expressões universais como a equação de Nernst. Ambas dependem da premissa de campo elétrico constante, enquanto a equação de Nernst depende apenas da concentração iônica em ambos os lados da membrana celular.

APÊNDICE B – Voltage Clamp

Essa técnica consiste no controle do potencial de membrana fazendo com esse atinja o valor desejado pelo investigador. A (Figura 52) ilustra o processo pelo qual se dá o grampeamento de voltagem. O potencial de repouso é aferido através de um eletrodo inserido no axônio e outro no meio extracelular. Esse sinal é amplificado e levado até um dispositivo que compara o valor medido com o pré-programado. Uma vez que o dispositivo de decisão avaliou o sinal, esse deverá emitir ou retirar corrente do axônio através de um eletrodo posto externamente, porém, paralelo a outro no interior do axônio. Com esse controle a diferença de corrente pode ser calculada (I_m corrente de membrana). Para realizar medidas de correntes para íons específicos costuma-se aplicar drogas que causem a inibição dos demais íons.

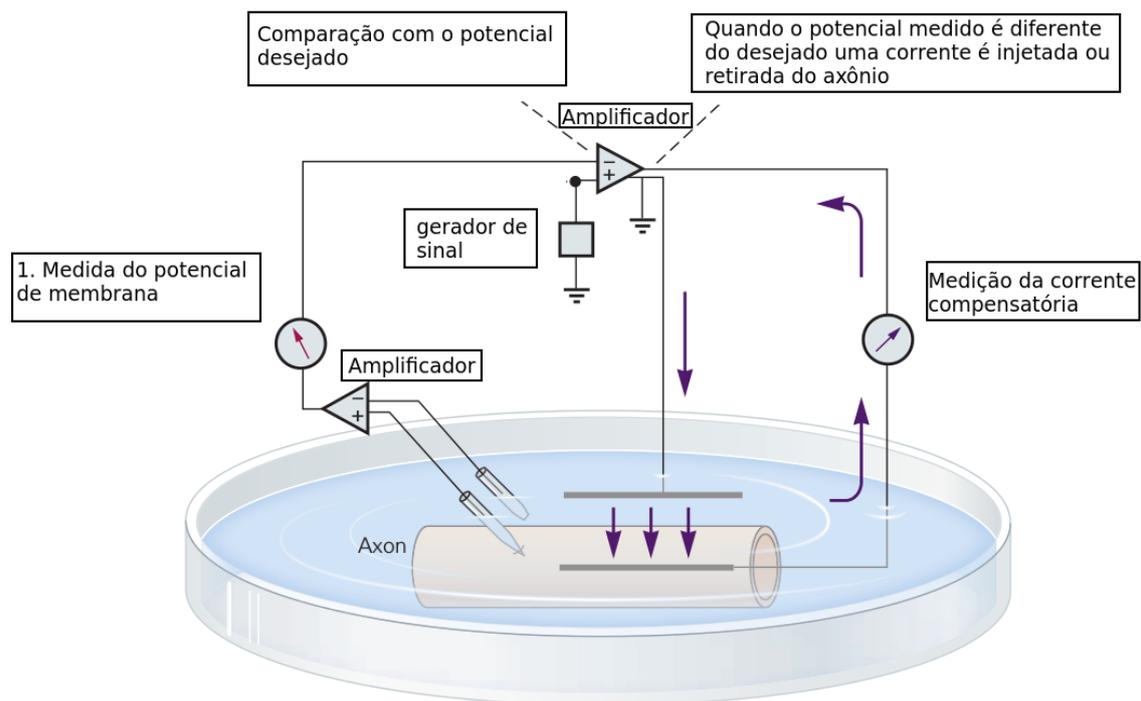


Figura 52 – Mecanismo de *feedback* no grampeamento de voltagem.

APÊNDICE C – Parecer comitê de ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 19 de setembro de 2013.

Ofício nº 625/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Pedro Valadão Carelli**
Departamento de Física – CCEN
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.030111/2013-95

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, “**Medida da faixa dinâmica do córtex visual primário (V1) em ratos, sob variação de contraste, densidade espacial do estímulo e manipulação do balanço de excitação/inibição.**”

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais:
Biotério do Departamento de Anatomia – ICB – USP – SP;
Animais: ratos heterogênicos; Linhagem: LE; Sexo: machos e fêmeas; Idade: 65 a 90 dias; Peso: 350g; Nº total de animais: 63.

Atenciosamente,

 Prof.^a Tania Rieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2308824