

"MOBILIZAÇÃO RÁPIDA DE CITO-CROMO-OXIDASE POR ESTIMULAÇÃO
SENSORIAL EM CÓRTEX VISUAL DE GATOS E PRIMATAS".

SIDARTA TOLLENDAL GOMES
RIBEIRO

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

APROVADA POR:

Jan Nora Hococ

PROFA. JAN NORA HOCOC
(PRESIDENTE DA BANCA)

Rafael Linden

PROF. RAFAEL LINDEN

Eliane Volchan

PROFA. ELIANE VOLCHAN

Fernando Garcia de Mello

PROF. FERNANDO GARCIA DE MELLO

Ricardo Gattass

PROF. RICARDO GATTASS
(ORIENTADOR)

Patricia Franca Gardino

PROFA. PATRICIA FRANCA GARDINO
(REVISOR)

RIO DE JANEIRO, RJ, BRASIL
DEZEMBRO DE 1994

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília e no Laboratório de Neurobiologia III do Programa de Neurobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, sob a orientação de Ricardo Gattass e co-orientação de Valdir Pessoa na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Financiadora de Auxílios e Projetos (FINEP) e pelo Conselho de Ensino para Graduados da UFRJ.

À minha mãe, minha origem, minha fonte.

AGRADECIMENTOS

Por mais solitário que seja, qualquer trabalho é obra coletiva. Por se apoiar no passado de tantas vidas de tantas pessoas, deve ser creditado à Humanidade inteira. Para que esta tese pudesse chegar a termo, contei com mais ajuda e colaboração do que me seria possível enumerar. É importante, entretanto, lembrar aqui as contribuições que mais diretamente têm a ver com o que somos, eu e a tese. Antes de tudo, agradeço à minha família, toda ela, que sempre me amou como sou. Em especial, agradeço à Vovó Neusa e ao Tio Eduardo por me terem acolhido no Rio de Janeiro com carinho total. De Cristine Barreto, nem sei bem o que dizer: minha estrela-guia, meu céu estrelado...

Entre as pessoas que despertaram em mim o interesse pela ciência, Tio Fernando foi e é referência inesquecível. Meu ingresso no meio acadêmico se deu em 1987 em estágio orientado pela Dra Loreny G. Giuglano, que teve ao longo de vários anos todo o cuidado em iniciar-me no método científico, com rigor, paciência, competência e compreensão incomuns. Cheguei a Loreny pelas mãos do Prof. Isaac Roitman, que acompanha desde então minha trajetória com amizade e dedicação, tendo se constituído num modelo exemplar de cientista criativo, crítico e ético. O mesmo posso dizer do Prof. Luiz Fernando G. Labouriau, com quem tive a sorte de conviver e em quem vejo um emocionante exemplo de cientista, de cidadão e de brasileiro.

Quando em 1993 resolvi me dedicar ao estudo do cérebro, fui recebido com imensa generosidade no Laboratório de Neurobiologia da Universidade de Brasília, que me proporcionou um crescimento intelectual rápido e livre. Agradeço a todos os seus integrantes na pessoa do Prof. Paulo Saraiva, cuja presença é fundamental para a vida científica daquele grupo de pesquisa.

Entre os muitos motivos que tenho para agradecer ao Dr. Ricardo Gattass, meu orientador nesta tese, escolho o mais simples e por isso mesmo o mais crucial: ter aceitado com grandeza de espírito meu caráter inquieto e turbulento! Além disso, Ricardo refinou substancialmente minha capacidade de análise de dados, enriquecendo de forma evidente minha formação de pesquisador. Dr. Valdir Pessoa, meu orientador na iniciação científica e co-orientador na tese, esteve sempre por perto neste meu início de caminhada neurobiológica, como amigo e professor a toda prova. Marco Marcondes de Moura foi meu principal interlocutor neste trabalho, tendo me orientado desde seu início tanto prática quanto teoricamente. Todavia, muito mais importante que isso é a confiança extrema que tenho em sua amizade fraternal e em sua excelente companhia intelectual!

O Prof. Gustavo de O. Castro foi a mais grata surpresa que tive no IBCCFº. Mais que os ensinamentos claros e precisos sobre microscopia óptica, agradeço o privilégio de com ele haver convivido estes meses. O mesmo posso dizer de Clarissa M. Maya Monteiro, que foi uma amiga de inestimável valor, generosa e sempre vigilante de detalhes essenciais ao meu bem-estar de “mestrando sob estresse”.

Nas noites de vigília que vivi neste Instituto, contei muitas vezes com as marmitas providenciais de Otávio “Solidariedade” Mariani, bem como com o auxílio pronto de Antônio Pereira Júnior em cirurgias e outros procedimentos experimentais. Dois camaradas de fato, presentes e constantes. Mª Carmen G. Piñon (Carminha) foi uma das primeiras pessoas do Instituto com quem fiz amizade, que se confirmou sólida na leitura

cuidadosa dos originais, na atenção permanente ao meu trajeto acadêmico, na discussão de tópicos excessivamente sucintos da tese. Mário Fiorani Jr. me ajudou inúmeras vezes em trabalhos ao computador, além de se constituir num advogado-do-diabo eficiente e construtivo para a melhor elaboração de meus arrazoados.

Não posso deixar de mencionar a perícia e presteza do apoio técnico com que contei na UnB e no IBCCFº, principalmente expressos por Mauracilene Moreira, Raimundo Pugas, Edil Saturato e Roberto José da R. Netto. Aprendi com todos, e creio ter feito também amigos.

Várias pessoas realizaram contribuições pontuais mas não por isto menos importantes para a tese, como o Dr. Marcus Farina, que se dispôs de bom grado a examinar a parte concernente a alometria. O Dr. Cláudio Mello contribuiu na discussão dos possíveis mecanismos de mobilização rápida de citocromo-oxidase. Da mesma forma, os estudantes Luis Edvar e Alexandre Saddi me auxiliaram com desprendimento na coleta de dados para a tese. Mª Tereza A. Monteiro e Liliane Heringer Pontes foram sempre prestativas na realização de fotocópias de artigos originais.

Considero essencial assinalar a consideração a mim dispensada pelo IBCCFº. Agradeço o zelo, a franqueza e a competência da Dra. Jan Nora Hokoç, coordenadora da pós-graduação, e da Dra. Patrícia Gardino, revisora eficiente, dedicada e crítica inteligente desta tese. Desejo que o respeito com que fui tratado por esta instituição fique reconhecido em meu agradecimento a Sandra Mª Brito de Oliveira, em nome de todo o corpo técnico-administrativo.

Antes que a lista se estenda ao infinito, insisto em lembrar todas as pessoas que, embora não citadas nominalmente aqui, amigos antigos ou recentes, fizeram desta travessia um caminho, deste cotidiano algo possível, desta convivência um sim.

Meu último agradecimento é ao meu país, que mesmo tão empobrecido, triste e aviltado, financia a educação de brasileiros e brasileiras que um dia construirão uma nação profundamente livre e justa. Reafirmo meu compromisso com este dia.

*De quem é o olhar
Que espreita por meus olhos?
Quando penso que vejo,
Quem continua vendo
Enquanto estou pensando?*

Fernando Pessoa

Abstract

The cytochrome oxidase fast mobilization was studied in twelve cats (*Felis catus*) and three monkeys (*Cebus apella*). Visual stimulus of low spatial frequency, with variations in colour and brightness and no spatial orientation allowed the observation of cytochrome oxidase-rich patches in flattened sections of cat's visual cortex. The patches appeared in V1, V2 and V3 supragranular layers, as well as in other extra-striated areas. Morphologically, those patches are equivalent to the blobs recently described in cat by improved histochemical methods. The morphometric analysis reveals that blobs medium size tend to increase from V1 to V2 and from V2 to V3. The densitometric analysis of monocularly stimulated monkey's striate cortex sections shows a cytochrome-oxidase activation peak after thirty minutes of stimulation, followed by a decrease in optical density at greater times. This indicates that the phenomena is composed of two distinct phases. The monocular stimulation by stroboscopic light shows ocular dominance columns in monkey's V1 after thirty minutes. The cytochrome oxidase fast mobilization phenomena may be the product of the immediate activation of one or more genes of the enzyme's subunits, of allosteric interactions with ATP, or of local redistribution of mitochondria.

Resumo

A mobilização rápida de citocromo-oxidase por estimulação visual foi estudada em doze gatos (*Felis catus*) e três macacos (*Cebus apella*). A estimulação visual de baixa frequência espacial, desprovida de orientação espacial e com grandes variações de brilho ou cor permitiu a visualização de grumos ricos em citocromo-oxidase em preparações planas do córtex visual de gatos. Estes grumos apareceram nas camadas supragranulares de V1, V2, V3 e outras áreas extra-estriadas do gato, e são morfologicamente equivalentes aos blobs recentemente descritos em gatos através de métodos histoquímicos não-convencionais. A análise morfométrica revela um aumento do tamanho médio de blobs de V1 para V2 e de V2 para V3. A análise densitométrica de secções do córtex estriado de macacos estimulados monocularmente por diferentes tempos revelou um pico de ativação de citocromo-oxidase em trinta minutos de estimulação, seguido de queda da densidade óptica em tempos maiores. Estes resultados indicam que o fenômeno seja fásico. A estimulação monocular por luz estroboscópica permite evidenciar colunas de dominância ocular em V1 de macaco após trinta minutos. O fenômeno de mobilização rápida de citocromo-oxidase pode provir da ativação imediata de um ou mais genes que codificam suas subunidades, de interações alostéricas com ATP ou da redistribuição local de mitocôndrias.

Abreviações

A=anterior

AMLS= área ântero-medial do banco lateral do sulco supra-sylviano

CDO=colunas de dominância ocular

D=dorsal

FST=área do fundo do sulco temporal superior

GLd=núcleo geniculado lateral dorsal

IP=sulco intraparietal

L=lateral

lat=sulco Lateral

lu=sulco lunatus

M=medial

MH=meridiano horizontal

MST=área MST ou V6

MT=área MT ou V5

P=posterior

Pa=sulco para-occipital

PMLS=área postero-medial do banco lateral do sulco supra-sylviano

PO=sulco parieto-occipital

POd=área parieto-occipital dorsal

spl=sulco Splenialis

ssyl=sulco Supra-Sylviano

TEO=área temporal occipital

V=ventral

V1=área visual primária

V2=área visual secundária

V3=área visual terciária

V4=área V4

VIP=área intraparietal ventral

VLS =área ventral lateral suprasylviana

VM=meridiano vertical

INTRODUÇÃO	2
1.1 O PRINCÍPIO ARQUITETÔNICO DA MODULARIDADE.....	2
1.2 MÓDULOS CORTICais VISUAIS	5
1.3 PARALELISMO E MODULARIDADE.....	8
1.4 CITOCROMO-OXIDASE COMO MARCADOR METABÓLICO	11
1.5 HISTOQUÍMICA PARA CITOCROMO-OXIDASE	14
1.6 BLOB: UM NOVO MÓDULO CORTICAL VISUAL	15
1.7 CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DE BLOBS.....	17
1.8 BLOBS EM GATOS.....	20
1.9 OBJETIVOS DA TESE	23
MATERIAL & MÉTODOS.....	24
2.1 PARADIGMA EXPERIMENTAL	24
2.2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	28
2.2.1 <i>Perfusão, Dissecção e Aplanamento</i>	28
2.2.2 <i>Fixação</i>	31
2.2.3 <i>Corte e Montagem</i>	32
2.2.4 <i>Reação Histoquímica para Citocromo-oxidase</i>	33
2.3 PROCESSAMENTO E RECONSTRUÇÃO FOTOGRÁFICOS	35
2.4 DETERMINAÇÃO DAS COORDENADAS RETINOTÓPICAS	36
2.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA E ESTATÍSTICA	37
2.6 ANÁLISE DENSITOMÉTRICA	39
RESULTADOS.....	40
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	40
3.2 ESTIMULAÇÃO PARCIAL DO CAMPO VISUAL EM GATOS.....	40
3.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE BLOBS EM GATOS	42
3.4 ESTIMULAÇÃO MONOCULAR DO CAMPO VISUAL EM <i>CEBUS</i>	50
DISCUSSÃO.....	56
4.1 SOBRE A EXISTÊNCIA DE BLOBS NO CÓRTEX VISUAL DE GATOS.....	56
4.2 COMPARAÇÃO MORFOMÉTRICA ENTRE BLOBS DE GATOS E PRIMATAS.....	65
4.3 SOBRE A MOBILIZAÇÃO RÁPIDA DE CITOCROMO-OXIDASE EM PRIMATAS:UM FENÔMENO GERAL? REVELAÇÃO DE CDO <i>CEBUS</i>	73
4.4 POSSÍVEIS MECANISMOS DE MOBILIZAÇÃO RÁPIDA DE CITOCROMO-OXIDASE	78
CONCLUSÕES	87
BIBLIOGRAFIA	88

INTRODUÇÃO

1.1 O Princípio Arquitetônico da Modularidade

A singularidade morfológica das células nervosas e a complexidade de conexões por elas estabelecidas representaram por muito tempo um grande desafio ao conhecimento científico do cérebro. No final do século XIX, com a introdução da técnica histológica da impregnação pela prata, Camillo Golgi torna possível pela primeira vez a investigação do neurônio em condições de relativo isolamento anatômico, uma vez que o método é capaz de corar apenas cerca de 1% da população de células nervosas presentes na região estudada. Aplicando sistematicamente o método de Golgi a sistemas nervosos de muitos animais diferentes, Santiago Ramón y Cajal (1909) pôde estabelecer alguns dos princípios gerais da Neurobiologia, descrevendo o neurônio como unidade básica do sistema nervoso, capaz de receber e transmitir sinais unidirecionalmente através de estruturas especializadas (dendritos e axônio) e de estabelecer contatos específicos e precisos (sinapses) com outros neurônios. Brodmann (1905 apud Zeki, 1993b) descreveu a organização laminar do neocôrte de mamíferos, que possui seis camadas distintas de células. Desde então, a elucidação da arquitetura subjacente ao sistema nervoso permanece como um dos problemas centrais da investigação do cérebro.

Os estudos exaustivos pelo método de Golgi da organização sináptica em neocôrte de ratos levaram Lorente de Nô, discípulo de Ramón y Cajal, a propor que

colunas verticais de células corticais seriam capazes de estabelecer conexões aferentes e eferentes sem necessariamente haver espalhamento horizontal da atividade neuronal, uma vez que a conectividade é preponderantemente vertical e não horizontal (1922, 1949 apud Mountcastle 1957). A questão do papel da transmissão intracortical horizontal na função cerebral e a idéia de que o córtex se organiza em unidades morfo-funcionais elementares motivaram Sperry (1947) a realizar múltiplas incisões verticais no córtex somestésico e motor de macacos. Como resultados de tais experimentos, em que os cortes reticulados se estendiam através da substância cinzenta até a substância branca, os animais ainda eram capazes de atividade motora normal, em termos dos testes aplicados. Incisões semelhantes em córtex visual de gatos (Sperry *et al.*, 1955 apud Mountcastle, 1957) foram igualmente ineficazes em prejudicar a discriminação fina de padrões visuais pelos animais. Os estudos de Sperry levantaram evidências de que colunas verticais corticais bastante estreitas são capazes de sustentar funções razoavelmente complexas de modo autônomo: “The results fail to confirm theories of brain function which have assumed that horizontal intracortical transmission (...) of discrete excitations (...) plays any major or essential role in cerebral organization”.

Em 1957, através de estudos eletrofisiológicos de unidades isoladas no córtex somestésico de gatos, Mountcastle apresenta uma base experimental sólida que introduz de forma explícita o conceito de modularidade cortical, ao descrever colunas verticais de células com mesmas propriedades de campos receptores periféricos: “...there is an elementary unit of organization in the somatic cortex made up of a vertical group of cells extending through all the cellular layers. The neurons of such a group are related to the

same, or nearly the same, peripheral receptive field upon the body surface". Com base na descoberta das colunas somestésicas no gato, Mountcastle enuncia claramente sua hipótese: "...the elementary pattern of organization in the cerebral cortex is a vertically oriented column or cylinder of cells capable of input-output functions of considerable complexity, independent of horizontal intragriseal spread of activity".

Logo em seguida a Mountcastle, Scheibel e Scheibel (1958 apud Szentagothai, 1975, 1985) publicam seus estudos anatômicos da formação reticular em ratos, camundongos, gatos, cães, macacos e humanos; a descrição de arranjos espaciais regulares das arborizações axonal e (em menor medida) dendrítica, com forma, tamanho e orientação determinados, estende o princípio arquitetônico da modularidade neuronal para fora do córtex.

1.2 Módulos Corticais Visuais

O grande incremento da atividade de pesquisa em neurociências na década de 50 consolidou a noção de organização colunar cerebral, e particularmente cortical. Estes estudos culminaram com a descoberta das **colunas de seletividade orientacional** e das **colunas de dominância ocular** no córtex visual de gatos (Hubel & Wiesel, 1959, 1962, 1963). Penetrações de microeletródios perpendiculares à superfície cortical encontravam neurônios supragranulares cujas respostas eletrofisiológicas apresentavam preferência por determinadas orientações espaciais do estímulo. A realização de penetrações oblíquas, no entanto, evidenciava variações periódicas da seletividade orientacional. Este achado foi entendido por Hubel e Wiesel como resultado da existência no córtex visual de hipercolunas verticais de células contendo minicolunas para cada orientação; a periodicidade da seletividade orientacional em penetrações oblíquas seria consequência da penetração de múltiplas hipercolunas em sequência, gerando o encontro de igual número de minicolunas correspondentes a cada orientação. Tais estruturas receberam o nome de **colunas de seletividade orientacional (CSO)**.

Nos mesmos experimentos, Hubel e Wiesel verificaram que as penetrações perpendiculares na camada IV do córtex visual primário encontravam células sem seletividade orientacional mas com forte preferência por um dos olhos; analogamente, os sinais obtidos em penetrações oblíquas na camada granular interna eram alternadamente dominados por um dos olhos dos animais.

Poucos anos depois, padrões funcionais semelhantes foram descritos no córtex estriado de macacos (Hubel & Wiesel, 1968, 1974). Tais bandas horizontais de neurônios foram denominadas colunas de dominância ocular (CDO). Na concepção de Hubel e Wiesel, cada hipercoluna estaria sobre uma CDO, de modo que cada região do espaço visual seria representada no córtex por duas hipercolunas adjacentes, cada uma relacionada a um dos olhos. Diversos trabalhos posteriores objetivaram a reconstrução anatômica das CDO. A observação dos terminais degenerados na camada IVc do córtex estriado após lesões localizadas em camadas específicas do núcleo geniculado lateral (GLd) permitiu pela primeira vez a visualização do padrão colunar de dominância ocular (Hubel & Wiesel, 1972). Entre outras abordagens, as CDO foram demonstradas por injeção monocular de aminoácidos triciados e subsequente auto-radiografia (Wiesel *et al.*, 1974), pelo método mieloarquitetônico de Liesegang de prata reduzida (LeVay, 1975), por revelação histoquímica após injeção monocular de aglutinina-peroxidase (Hendrickson *et al.*, 1978) e pela coloração de Nissl vários meses depois de enucleação monocular (Haseltine *et al.*, 1979). A laminação do GLd, bem como a segregação de suas aferências conformando CDO no córtex visual, parecem ser a expressão da competição binocular durante a neurogênese do sistema visual (Swindale, 1980). A consolidação de tais padrões requer, entretanto, excitação visual pós-natal concordante e equivalente em ambos os olhos. A manutenção por várias semanas do equilíbrio ou harmonia binocular da experiência visual é crucial para a formação das CDO, até um período crítico além do qual a plasticidade neuronal diminui drasticamente (Hubel & Wiesel, 1970; Cynader *et al.*, 1980). Experimentos de privação monocular de gatos e macacos recém-nascidos resultam

em grandes alterações de preferência ocular de neurônios do córtex visual, em detrimento do olho ocluído (Hubel & Wiesel, 1977). É provável que as CDO estejam implicadas na visão estereoscópica, uma vez que esta requer a formação de paralaxes produzidas pela binocularidade (Julesz, 1986 apud Kandel, 1991).

A ausência de correspondente anatômico das colunas somestésicas evidenciadas eletrofisiologicamente parece ter permitido que as CDO, morfologicamente bem definidas tanto em gatos (Shatz *et al.*, 1977; Shatz & Stryker, 1978; LeVay & Stryker, 1979; LeVay *et al.*, 1979; Swindale, 1981; Stryker, 1982; Mower *et al.*, 1985; Löwel & Singer, 1987; Löwel *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 1988) quanto em primatas (Wiesel *et al.*, 1974; LeVay *et al.*, 1975; Hubel *et al.*, 1976; Hubel & Wiesel, 1977; Hendrickson *et al.*, 1978; Hubel *et al.*, 1978; Tigges & Tigges, 1979; Hitchcock & Hickey, 1980; LeVay *et al.*, 1985; Hess & Edwards, 1987; Rosa *et al.*, 1988; Spatz, 1989; Florence & Kaas, 1992), ofuscassem a importância dos estudos pioneiros de Mountcastle para o princípio da modularidade cortical.

Técnicas de registro óptico recentemente desenvolvidas permitiram também a visualização das CSO, dispostas no córtex em vórtices ou “pinwheels” (Blasdel & Salama, 1986; Grinvald *et al.*, 1986; T'so *et al.*, 1990; Bonhoeffer & Grinvald, 1991; Bartfeld & Grinvald, 1992; Blasdel 1992). Vários outros módulos corticais e extra-corticais já foram descritos em mamíferos (Goldman & Nauta, 1977; Purves, 1992), indicando que ao menos parte do processamento neural é modularizada.

1.3 Paralelismo e Modularidade

O conceito de módulo no sistema nervoso encontra significado mais completo quando associado à noção de que o processamento sensorial, especialmente o visual, parece ocorrer através de múltiplas vias paralelas (Van Essen *et al.*, 1992). As primeiras evidências de que o processamento da informação visual não poderia ser exclusivamente hierárquico (ou serial) têm origem em estudos neurológicos; síndromes visuais como a acromatopsia, a cromatopsia e a acinetopsia revelaram a possibilidade de deficit isolado em diferentes atributos da imagem, tais como forma, cor e movimento (Zeki, 1990, 1993a). Muito precocemente a investigação clínica de lesões perfurantes no lobo occipital em mutilados de guerra permitiu a construção de uma cartografia surpreendentemente acurada das regiões do córtex associadas a cada uma destas síndromes (Zeki, 1993b).

A sugestão de que a informação visual é decomposta a partir de V1 e se projeta para várias áreas visuais anatômica e funcionalmente distintas motivou uma intensa atividade de pesquisa nas décadas de 70 e 80. Basicamente, é possível entender o córtex visual como sendo composto de três grandes vias paralelas (figura 1), especializadas no processamento de diferentes atributos da imagem (Gattass *et al.*, 1990a). No lobo parietal localizam-se as vias dorso-medial e dorso-lateral, que se projetam a partir de V1 para PO e MT, respectivamente. De modo sumário, tais vias recebem aferências das camadas magnocelulares do GLd (Gattass & Gross, 1981; Ungerleider & Mishkin, 1982; Zihl *et al.*, 1983). No lobo temporal localiza-se a via ventral, que se projeta a partir de V1 para V2,

V3 e V4; preponderantemente, a via ventral recebe aferências das camadas parvocelulares e interlaminares do GLd (Zeki, 1976, 1978, 1983; LaChica & Casagrande, 1992).

Acredita-se que as vias dorsais sejam responsáveis pelo processamento de variáveis espaciais relacionadas a movimento (Zeki, 1974; Gattass & Gross, 1981), fornecendo informações sobre **onde** está o objeto visualizado. Em contraste, a via ventral parece ser responsável por representar forma e cor (Zeki, 1980), informando sobre **o que** é o objeto visualizado. Alguns estudos, entretanto, argumentam contra a noção de um paralelismo estrito, apresentando evidências de representações redundantes dos atributos da imagem em diferentes vias corticais, com a ocorrência de convergências e divergências (DeYoe & Van Essen, 1988; Krubitzer & Kaas, 1989; Schiller & Lee, 1991; Van Essen & Gallant, 1994). De toda forma, o fato de que se originam de V1 vias paralelas distintas implica a existência de subdivisões morfo-funcionais desta área, o que consiste precisamente na noção de módulo cortical.

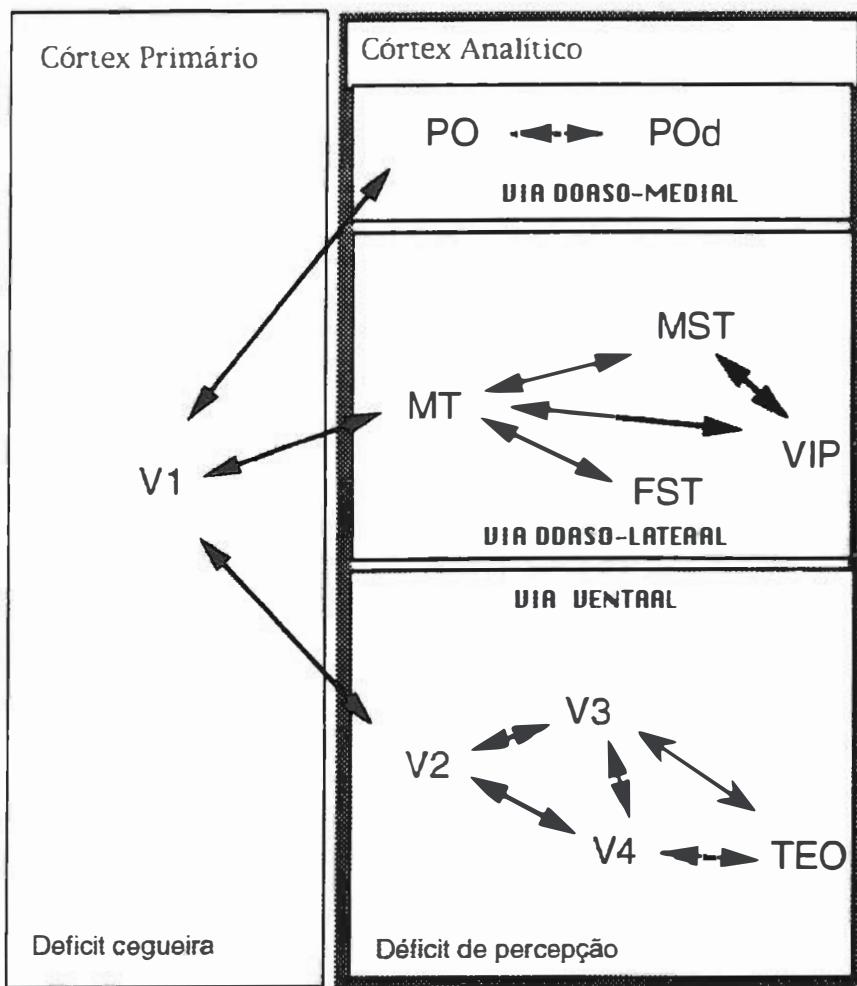


FIGURA 1: VIAS DE PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO VISUAL

1.4 Citocromo-oxidase como Marcador Metabólico

A citocromo-oxidase - também denominada citocromo-c-oxidase, citocromo aa₃, ferrocitocromo-c, oxigênio oxirredutase, indofenol oxidase- foi pela primeira vez referida por MacMunn (1886 apud Keilin, 1925), que se utilizou de um espectroscópio manual para observar seu espectro característico, com quatro bandas de absorção distintas no estado reduzido e nenhuma no estado oxidado. MacMunn denominou o pigmento respiratório ligado a ferro de miohematina ou histohematina, por encontrá-lo nos músculos e outros tecidos de representantes de várias ordens animais. Vários trabalhos posteriores, entretanto, puseram em dúvida a existência da citocromo-oxidase, preferindo acreditar que se tratava de um hemocromógeno ordinário derivado da hemoglobina. A polêmica perdurou até o século XX, quando Keilin (1925) estabeleceu de forma indubitável a identidade autônoma da molécula. A função biológica da então chamada *Atmungsferment* (enzima respiratória) foi elucidada por Warburg (1930), através de estudos espectrofotométricos da inibição por monóxido de carbono da respiração celular, reversível por iluminação.

A citocromo-oxidase é a última enzima da cadeia respiratória presente na membrana interna de mitocôndrias de eucariotos, bem como na membrana plasmática de alguns procariotos (Wong-Riley, 1989a). É composta por três subunidades codificadas no genoma mitocondrial e de três a dez subunidades codificadas no núcleo (Ebner et al., 1973; Mason & Schatz, 1973; Cabral *et al.*, 1978; Kadenbach *et al.*, 1983; Wong-Riley, 1989a); ao contrário das subunidades mitocondriais, extremamente conservadas ao longo

da evolução, as subunidades nucleares variam em quantidade e em suas sequências de aminoácidos, tanto entre espécies quanto entre diferentes tecidos de um mesmo organismo (Kuhn-Nentwig & Kadenbach, 1985; Hevner & Wong-Riley, 1991). A função da citocromo-oxidase consiste da transferência de elétrons do citocromo-c ao oxigênio molecular, numa reação que tem como produto a água (Keilin & Hartree, 1939). Paralelamente, a sequência de oxirredução da cadeia de transporte de elétrons é responsável pelo bombeamento de prótons para o espaço intermembrânico da mitocôndria; o gradiente quimiosmótico resultante é capaz de promover a fosforilação oxidativa de ADP (adenosina di-fosfato) em ATP (adenosina tri-fosfato) através da enzima F₀-F₁ ATPase, suprindo em larga medida as necessidades energéticas da célula (Mitchell, 1966 apud Kadenbach & Merle, 1981). Enquanto as subunidades mitocondriais conformam o sítio catalítico da enzima, acredita-se que as subunidades codificadas no núcleo possuam funções regulatórias (Kadenbach & Merle, 1981; Hüther & Kadenbach, 1986; Bisson *et al.*, 1987).

Tendo em vista seu papel na respiração celular, é compreensível que os níveis de citocromo-oxidase dentro das células estejam relacionados aos graus de atividade das mesmas. Vários trabalhos demonstram a queda dos níveis funcionais de citocromo-oxidase provocada em células nervosas por bloqueio químico ou físico da atividade aferente (Wong-Riley, 1978, 1979; Wong-Riley & Riley, 1983; Onoda & Imamura, 1984; Wong-Riley & Carrol, 1984; Land, 1987; Casagrande & Condo, 1988; Wong-Riley., 1989b, 1989c), bem como por isquemia transitória (Wagner *et al.*, 1991). Durante o desenvolvimento pós-natal do cérebro ocorrem variações marcantes da atividade

enzimática da citocromo-oxidase, cujos níveis são baixos logo após o nascimento e na velhice, ocorrendo um pico de atividade durante o desenvolvimento (Klee & Sokoloff, 1967; Nemat-Gorgani *et al.*, 1984; Kennedy *et al.*, 1985). A cicatrização após injúria química de córneas de coelhos envolve um aumento da atividade de citocromo-oxidase (Hayashi & Kenyon, 1988).

Um dos métodos utilizados para revelar CDO consiste na enucleação monocular do animal seguida de uma sobrevida de alguns meses até o sacrifício; o córtex visual é então processado pelo método histoquímico de citocromo-oxidase, revelando bandas escuras de alta atividade correspondentes ao olho remanescente intercaladas com bandas claras de baixa atividade relativas ao olho enucleado (Wong-Riley, 1979).

1.5 Histoquímica para Citocromo-oxidase

Provavelmente por ser uma proteína estrutural fortemente ancorada à membrana mitocondrial interna, a citocromo-oxidase presente em tecido adequadamente fixado mantém grande parte de suas propriedades enzimáticas, mesmo após meses e até anos (Kugler, 1990; Liu *et al.*, 1993). A detecção de citocromo-oxidase num dado tecido pode ser feita por vários métodos: espectroscopia de refletância diferencial, ensaios enzimáticos, imunohistoquímica, cito- e histoquímica (Jöbsis *et al.*, 1977; Wong-Riley, 1989a; Hevner & Wong-Riley 1990). Métodos histoquímicos para porfirinas são conhecidos pelo menos desde o começo deste século (Adler, 1904 apud Lison 1936; Marinesco 1919 apud Lison 1936); o uso de compostos orgânicos aromáticos para evidenciar a presença de “fermentos oxidativos”, como eram conhecidas catalases, peroxidases e a própria citocromo-oxidase, permitia já em 1922 que Marinesco investigasse processos como a regeneração de nervos, o envelhecimento e a morte de neurônios em termos metabólicos. Entre os diversos compostos cromógenos utilizados, a benzidina estava entre os mais importantes, conforme revisado por Lison (1936).

Curiosamente, tais métodos histoquímicos parecem ter sido “redescobertos” nas décadas seguintes (Graham & Karnovsky, 1966; Wong-Riley, 1979), sem que se tenha dado crédito adequado aos trabalhos pioneiros no assunto. A técnica atualmente empregada não difere em essência da incubação do tecido estudado em presença de uma benzidina reduzida e de um transportador de elétrons. Hoje o método histoquímico para

revelar a citocromo-oxidase utiliza a **diamino-benzidina** (DAB) para ceder elétrons ao **citocromo-c**, que por sua vez os transfere através da citocromo-oxidase ao O₂, reduzindo-o em H₂O. A DAB ao se oxidar gera um polímero indamínico de cor marrom, osmiofilico e insolúvel; a precipitação da DAB permite a detecção da enzima tanto sob microscopia ótica quanto eletrônica (Carroll & Wong-Riley, 1984; Wong-Riley, 1989b, 1989c; Kugler, 1990).

1.6 Blob: um Novo Módulo Cortical Visual

Com o propósito original de estudar a atividade de citocromo-oxidase nas diferentes camadas do córtex de *Macaca* e *Saimiri*, Horton e Hubel (1981) descobriram flutuações periódicas da coloração histoquímica nas camadas II e III, observadas em cortes coronais; a realização de cortes tangenciais à superfície cortical revelou um padrão conspícuo de manchas ricas em citocromo-oxidase regularmente espaçadas entre si, o que os próprios autores consideraram surpreendente em vista da ausência, até então, de quaisquer evidências anatômicas ou funcionais de tal organização. Tais manchas mediam cerca de 250 x 150 µm, separadas entre si por aproximadamente 350 µm de tecido cortical menos reativo. Injetando um dos olhos de um animal com prolina triciada os autores verificaram que as manchas nas camadas II e III estavam em registro com as CDO encontradas na camada IV, formando fileiras (“rows”). A remoção de um dos olhos causava uma redução pronunciada de tamanho e intensidade das manchas sobre as CDO

correspondentes ao olho enucleado. A partir de tais experimentos, Horton e Hubel concluíram que as estruturas descritas são colunas verticais de células ricas em citocromo-oxidase, perpendiculares ao centro das CDO; devido à sua aparência em planos tangenciais de corte, foram denominadas de “blobs”, em contraposição à matriz mais fracamente corada onde se intercalam, chamada de “interblob” (Horton & Hubel, 1981).

A descoberta de padrões de citocromo-oxidase similares em diversas espécies diferentes de primatas do Novo e do Velho Mundos (Horton e Hubel, 1981; Horton, 1984; Horton & Hedley-Whyte, 1984; Hendrickson & Tigges, 1985; Tootell *et al.*, 1985; McGuiness *et al.*, 1986; Condo & Casagrande, 1990) sustentou em certa medida a proposição de Horton e Hubel (1981) de que os blobs seriam a expressão de um sistema de aferências, eferências e conexões intrínsecas característico e distintivo do córtex visual de primatas, uma vez que seus estudos preliminares indicavam a ausência de blobs em outras ordens de mamíferos. Vários estudos levantam evidências da existência de uma via paralela da qual fazem parte as células ganglionares W, as camadas coniocelulares (interlaminares) do GLd, blobs, faixas finas de V2 e finalmente V4 (Livingstone & Hubel, 1982, 1983, 1984; LaChica & Casagrande, 1992; Nakamura *et al.*, 1993; Casagrande, 1994).

Além da detecção de altos níveis de citocromo-oxidase, é possível revelar um padrão de blobs por técnicas histoquímicas para acetilcolinesterase, succinato- e lactato-desidrogenases (Horton, 1984) e NADPH-diaforase (Sandell, 1986; Picanço-Diniz *et al.*, 1992; Da Franca, 1993), por técnicas imunocitoquímicas para glutamato-descarboxilase (Hendrickson *et al.*, 1981), ácido gama-amino-butírico(Hendry & Jones, 1986; Martin,

1988), taquicinina (Hendry *et al.*, 1988) e outros peptídeos cerebrais (Martin, 1988), bem como por colorações específicas para mielina (Horton, 1984). Por outro lado, é relatada a predominância da proteína ligante de cálcio calbindina (Celio *et al.*, 1986) e de neuropeptídeo Y (Kuljis & Rakic, 1989) em neurônios do interblob.

1.7 Características Funcionais de Blobs

Ao contrário do que ocorreu no caso das colunas somestésicas, das CDO e das CSO, o descobrimento dos blobs se deu não no terreno da eletrofisiologia mas no da morfologia, a despeito dos inúmeros estudos unitários e multi-unitários do córtex visual levados a cabo desde os trabalhos clássicos de Hubel e Wiesel (1959, 1962, 1963, 1968). A necessidade de investigar funcionalmente os recém-descobertos módulos corticais motivou Horton e Hubel (1981) a realizar injeções endovenosas de 2-deoxiglicose radioativa seguidas de estimulação visual, de modo a determinar por auto-radiografia quais características dos estímulos oferecidos eram capazes de marcar seletivamente os blobs pelo aumento local da captação de glicose e seus análogos. Tais experimentos sugeriam a coalescência das colunas de seletividade orientacional nos blobs, já que estes eram ativados por estímulos de quaisquer orientações. Livingstone e Hubel (1984), em experimentos eletrofisiológicos em córtex estriado de macacos, descrevem a ausência de seletividade orientacional de neurônios pertencentes a blobs, em contraposição à esperada seletividade orientacional de células no interblob. Bartfeld e Grinvald (1992) endossam estes achados ao determinar, em mapas corticais de alta resolução obtidos por registro

óptico de sinais intrínsecos dependentes de atividade, que 78% dos pixels correspondentes a blobs apresentam pouca ou nenhuma seletividade orientacional, em contraste com o interblob, em que menos de 15% apresentam pouca seletividade orientacional.

Outra diferença funcional entre neurônios de blobs e neurônios do interblob diz respeito às respostas a distintas frequências espaciais dos estímulos. Experimentos de marcação com 2-deoxiglicose radioativa em V1 de *Macaca* (Tootell *et al.*, 1988a) demonstram que blobs respondem preferencialmente a estímulos de baixa frequência espacial, ao contrário do interblob, que prefere altas frequências espaciais. Silverman e colaboradores (1989) corroboraram tais resultados ao mostrar que células localizadas no centro de blobs respondem a baixa frequência espacial, enquanto a preferência por frequências espaciais mais altas cresce continuamente com o aumento da distância das células ao centro dos blobs.

A descoberta de células com dupla oponência cromática em neurônios de blobs (Livingstone e Hubel, 1984) levou à proposição de que a preferência por cor seria outra característica funcional distintiva dos blobs. Experimentos de Tootell e colaboradores (1988b) demonstrando que blobs são mais ativados por estímulos coloridos que por estímulos cinzentos de mesma luminância suportam esta visão, ainda que a presença de blobs em primatas noturnos como o *Galago*, o *Loris* e o *Aotus* (Horton e Hubel, 1981; Horton, 1984; Tootell *et al.*, 1985; McGuiness *et al.*, 1986; Condo & Casagrande, 1990) e sua ausência em certos prossímios diurnos, como o *Tarsius*, o *Hapalemur* e o *Cheirogaleus* (McGuiness *et al.*, 1986), indiquem a insuficiência da proposta de que blobs têm como função básica o processamento cromático.

Em resumo, os blobs parecem estar envolvidos na discriminação de cor, contraste e densidade de texturas. De acordo com a hipótese de Allman e Zucker (1990), blobs seriam responsáveis pela representação de variáveis escalares, relacionadas à intensidade do estímulo, enquanto o interblob representaria variáveis geométricas ou vetoriais, tais como orientação e direção do estímulo. Ao contrário do interblob, portanto, blobs representariam informações codificadas em amplitudes bastante grandes, o que exigiria que suas células tivessem capacidade de suportar níveis extremos de atividade, demandando quantidades muito variáveis de energia. Isto explicaria os níveis elevados de citocromo oxidase no interior de células integrantes de blobs.

Entretanto, a distinção blob-interblob, em termos de concentração de citocromo-oxidase, deve ser entendida mais como um gradiente decrescente a partir do centro dos blobs que como uma dicotomia entre células “rivas e pobres” naquela enzima. Existe uma variação topográfica contínua na densidade da coloração para citocromo-oxidase correspondente à encontrada em termos de preferência por frequências espaciais baixas (Silverman *et al.*, 1989). Segundo Wong-Riley e colaboradores (1989b) os neurônios de blobs não são uniformes, uma vez que cerca de 25% deles são muito mais ricos no seu conteúdo de citocromo-oxidase que seus vizinhos. Esses autores sugerem que tais células correspondam aos neurônios não-cromáticos dos blobs, que aparecem em proporção similar nos estudos eletrofisiológicos de Livingstone e Hubel (1984) e T'so e Gilbert (1988).

Allman e Zucker (1990) propõem que os neurônios descritos por Wong-Riley codificam contraste e são a base para um sistema cortical de constância de brilho. Admitindo as evidências de que os primatas atuais descendem de ancestrais noturnos (Allman, 1977), os blobs podem ter surgido em animais altamente visuais, vivendo em ambientes (ou períodos do dia) fracamente iluminados, com a função de processamento de brilho. Posteriormente, com o aparecimento dos primatas diurnos, os blobs teriam evoluído de modo a conformar também um sistema de constância de cor.

1.8 Blobs em Gatos

Como foi mencionado anteriormente (item 1.6), a presença de blobs em córtex visual de vários primatas é bem estabelecida, assim como sua ausência em outras ordens de mamíferos (Horton e Hubel, 1981; Horton, 1984; Tootell *et al.*, 1985; McGuiness *et al.*, 1986; Condo *et al.*, 1987; Allman e McGuiness, 1988; Gattass *et al.*, 1990b; Rosa *et al.*, 1991). Não obstante, uma série de comunicações ao Congresso da Sociedade de Neurociências dos E.U.A., a partir de 1990, aponta a possibilidade de que um padrão periódico na distribuição de citocromo-oxidase em camadas supragranulares do córtex visual não seja um atributo exclusivo de primatas. Utilizando a histoquímica convencional para citocromo-oxidase, Murphy e colaboradores (1990, 1991) relataram a presença de blobs no córtex estriado de gatos. Dick e Cynader (1993), empregando métodos histoquímicos mais poderosos, confirmam tais observações, assim como Boyd & Matsubara (1994).

Em desacordo com os resultados de Murphy e colaboradores, não encontramos blobs no córtex visual aplanado de 5 gatos pesquisados por histoquímica convencional de citocromo-oxidase. Não obstante, formulamos a hipótese de que a discrepância entre os resultados se deve a diferenças no estado fisiológico dos animais no momento dos experimentos. Considerando que: a) as taxas de síntese e degradação de citocromo-oxidase são reguladas por atividade neural (Wong-Riley, 1979; Hevner & Wong-Riley, 1990); b) variações limitadas agudas nos níveis de citocromo-oxidase são detectáveis por espectrometria de refletância diferencial (Jöbsis *et al.*, 1977); c) a citocromo-oxidase pode ter sua atividade alostericamente regulada por ATP (Hüther & Kadenbach, 1986; Bisson *et al.*, 1987) e d) há evidências de regulação transcripcional e pós-transcripcional de níveis absolutos de citocromo-oxidase, bem como de níveis relativos de seus subtipos moleculares (Groot & Poyton, 1975; Hood, 1990; Luciakova *et al.*, 1992), decidimos verificar se o aparecimento de regiões ricas em citocromo-oxidase, eventualmente organizadas sob o aspecto de blobs, poderia ser induzido agudamente em gatos por estimulação visual breve, imediatamente anterior ao sacrifício. As características funcionais dos blobs em primatas (Livingstone e Hubel, 1984; Tootell *et al.*, 1988a) e a literatura sobre visão cromática de gatos (Loop *et al.*, 1987) determinaram que o estímulo oferecido tivesse baixa frequência espacial e variações intensas de brilho e/ou cor, além de não ser orientado espacialmente. O tempo de estimulação adotado, 45 minutos, foi o mesmo utilizado nos experimentos de captação de 2-deoxiglicose radioativa (Kennedy *et al.*, 1975; Tootell *et al.*, 1988a).

Como resultados de nossos experimentos, pudemos observar nas camadas supragranulares das áreas 17, 18 e 19 de Brodmann um padrão regular de regiões fortemente coradas para citocromo-oxidase imersas numa matriz de coloração mais fraca, semelhante ao padrão blob-interblob encontrado em córtex estriado de primatas e gatos (Ribeiro *et al.*, 1994).

1.9 Objetivos da Tese

Esta tese visa a continuar o estudo de blobs revelados por estimulação visual aguda de gatos, e estender a investigação da mobilização rápida de citocromo-oxidase a outro módulo cortical, a CDO, em primatas. Os estudos com gatos e macacos objetivam:

1. Submeter a teste os resultados anteriormente obtidos em gatos, realizando um experimento onde apenas parte do campo visual seja estimulado. O resultado esperado consiste em obter, num mesmo hemisfério cerebral, regiões com blobs correspondentes à parte estimulada do campo visual, e regiões sem blobs correspondentes à parte não estimulada do campo visual e servindo de controle negativo adequado;
2. Proceder a um estudo topográfico qualitativo e quantitativo dos blobs em gatos com estimulação total do campo visual, determinando as áreas corticais onde aparecem e, para cada área, sua densidade espacial e seu tamanho médio em termos de excentricidade retinotópica;
3. Determinar se a mobilização rápida de citocromo-oxidase também ocorre no córtex visual do macaco *Cebus apella*; em caso afirmativo, investigar seu curso temporal e verificar se a estimulação monocular aguda é capaz de revelar CDO por histoquímica para citocromo-oxidase.

MATERIAL & MÉTODOS

2.1 Paradigma Experimental

A área cortical visual de animais submetidos a estimulação sensorial total ou parcial do campo visual, em condições monocular ou binocular, foi estudada em preparações aplanadas do córtex seccionado em planos tangentes à superfície da pia-máter e coradas para evidenciar padrões de citocromo-oxidase. Com este paradigma foram observadas variações rápidas (45 minutos) do conteúdo de citocromo-oxidase em duas espécies animais: blobs em gatos (*Felis catus*) e CDO em macacos (*Cebus apella*). A tabela abaixo resume informações gerais sobre os animais utilizados:

TIPO DO ESTÍMULO	CASOS
Gênero: Felis	
<i>Não-estimulado (controle negativo)</i>	GB1, GB2, GB3, GB4, GB14
<i>Luz Estroboscópica/ Binocular/ Total</i>	GB5, GB6, GB8
<i>Luz Estroboscópica/ Monocular/ Total</i>	GB10, GB13, GB23
<i>Luz Estroboscópica/ Monocular/ Parcial</i>	GB20, GB25, GR7
<i>Lanternas Verde e Azul/ Binocular/ Total</i>	GB7, GR5
<i>Lanternas Verde e Azul/ Monocular/ Total</i>	GR3
<hr/>	
Gênero: Cebus	
<i>Barras Multi-orientadas/ Monocular/ Parcial</i>	DO1
<i>Barras Multi-orientadas/ Monocular/ Total</i>	DO2
<i>Luz Estroboscópica/ Monocular/ Parcial</i>	DO3

Até o momento das sessões experimentais os animais foram mantidos em jaulas limpas, receberam alimentação adequada, e foram tomadas precauções para evitar qualquer estresse desnecessário. Após anestesia com injeção intraperitoneal de 35 mg/kg de pentobarbital (Abbot) os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico para fixação de pino metálico ao crânio para a contenção da cabeça no plano Horsey-Clarke durante todo o experimento, sem a presença de pontos dolorosos. Este pino foi ancorado através de parafusos auto-roscantes e resina acrílica autopolimerizável (Simplex). Os animais eram depois transferidos para mesa estereotáxica e imobilizados pelo acoplamento do pino a um suporte metálico, o que proporcionava uma desobstrução total do campo visual por elementos do aparelho estereotáxico. Em seguida procedia-se ao exame de fundo de olho para verificar a integridade macroscópica da retina e a transparência dos meios ópticos. Foi induzida midriase por meio da aplicação tópica de cloridrato de fenilefrina a 10% (Oculum). Durante os experimentos foram utilizados afastadores metálicos de pálpebras. Em caso de queda do grau de anestesia, verificada pela avaliação dos reflexos flexor e corneano, doses adicionais de pentobarbital foram administradas.

Nos experimentos de estimulação parcial do campo visual de gatos, o disco óptico foi projetado sobre uma tela tangente situada a 57 cm do ponto nodal do olho do animal por meio de um oftalmoscópio reversível, de modo a determinar a posição da *area centralis* e os meridianos horizontal e vertical. No caso de macacos, foram projetados o disco óptico e a fóvea, após o quê se determinou os meridianos horizontal e vertical. Estímulos monoculares foram realizados pela oclusão de um dos olhos com feltro negro e fita adesiva.

Todos os animais permaneceram 30 minutos em escuridão antes do início das sessões experimentais, que consistiram da projeção de focos de luz verde e azul movimentados em todas as direções sobre a tela tangente, de luz estroboscópica branca ou de barras de baixa frequência espacial movimentadas em todas as orientações, conforme especificado na tabela acima. A duração das sessões foi de 45 minutos para todos os gatos estimulados e para o *Cebus DO2*. No caso dos gatos que receberam estimulação parcial (GB20, GB25, GR7), a tela tangente foi ocluída com papel negro de modo que apenas uma faixa adjacente ao meridiano horizontal fosse iluminada com estroboscópio por 45 minutos. Os macacos (DO1, DO3) estimulados parcialmente visualizaram uma tela tangente dividida em cinco pares simétricos de segmentos que foram iluminados cumulativamente, em intervalos de quinze minutos, através da retirada sucessiva das máscaras de papel negro que ocluíam a tela (figura 2).

ESTIMULAÇÃO PARCIAL

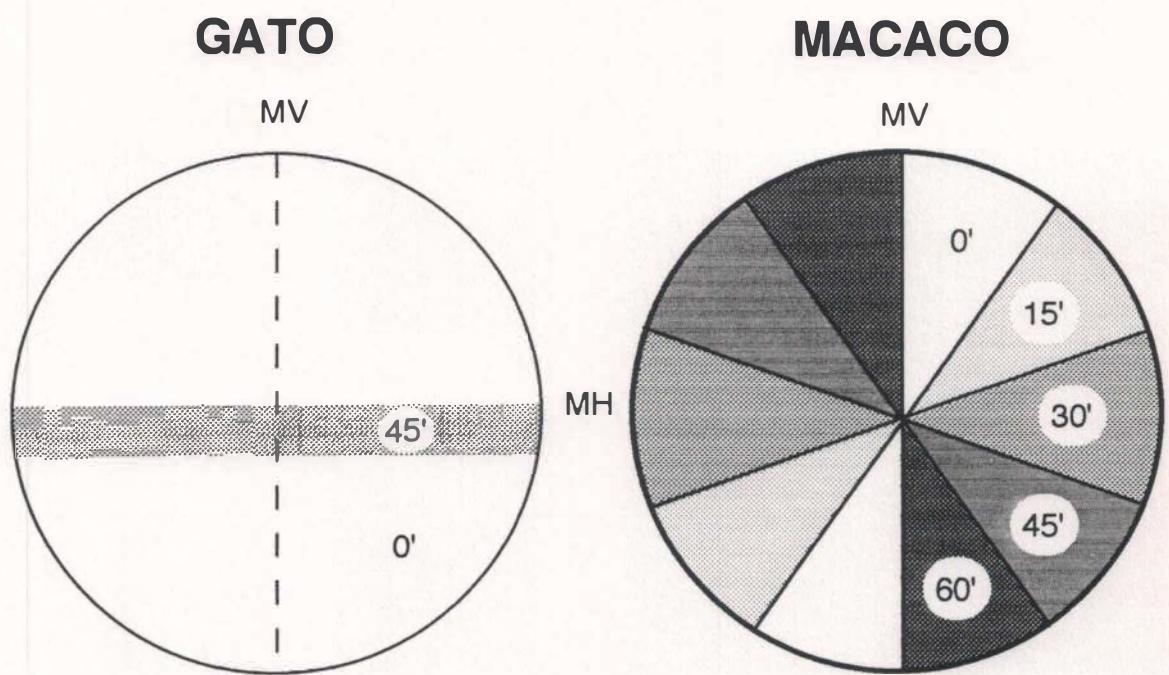


FIGURA 2: ESQUEMA DE ESTIMULAÇÃO PARCIAL EM GATOS E MACACOS. Os números indicam o tempo de estimulação.

2.2 Processamento Histológico

2.2.1 Perfusion, Dissecção e Aplanamento

Após a sessão experimental, os animais receberam dose letal de pentobarbital (100 mg/kg) por via endovenosa, e foram submetidos a perfusão intracardíaca com cerca de 2 litros de solução salina isotônica a 0,9% (NaCl P.A., Reagen). Terminada a perfusão, realizou-se a craniotomia para a retirada do encéfalo. Após uma incisão antero-posterior realizada com bisturi na pele da cabeça, os músculos eram afastados por meio de uma rugina e procedia-se a abertura da calota craniana por intermédio de um saca-bocados. A dura-máter era seccionada expondo o cérebro, que era retirado da caixa craniana após a secção dos nervos cranianos com um bisturi ou com uma espátula. Os hemisférios cerebrais foram separados e seccionados de forma a separar um bloco contendo V1, V2, V3 e parte das áreas PMLS e AMLS, no caso de gatos, ou V1 e parte de V2, no caso de macacos. Os blocos de gatos eram obtidos por meio de uma secção coronal na altura do terço médio do encéfalo, lateral no fundo do sulco suprasylviano e medial no fundo do sulco Splenialis (figura 3); os blocos de macacos incluíam a maior parte dos lobos occipital e parietal (figura 4). Os blocos de cada hemisfério foram aplanados segundo técnica modificada de Olavarria e VanSluyters (1985) e Tootell e Silverman (1985).

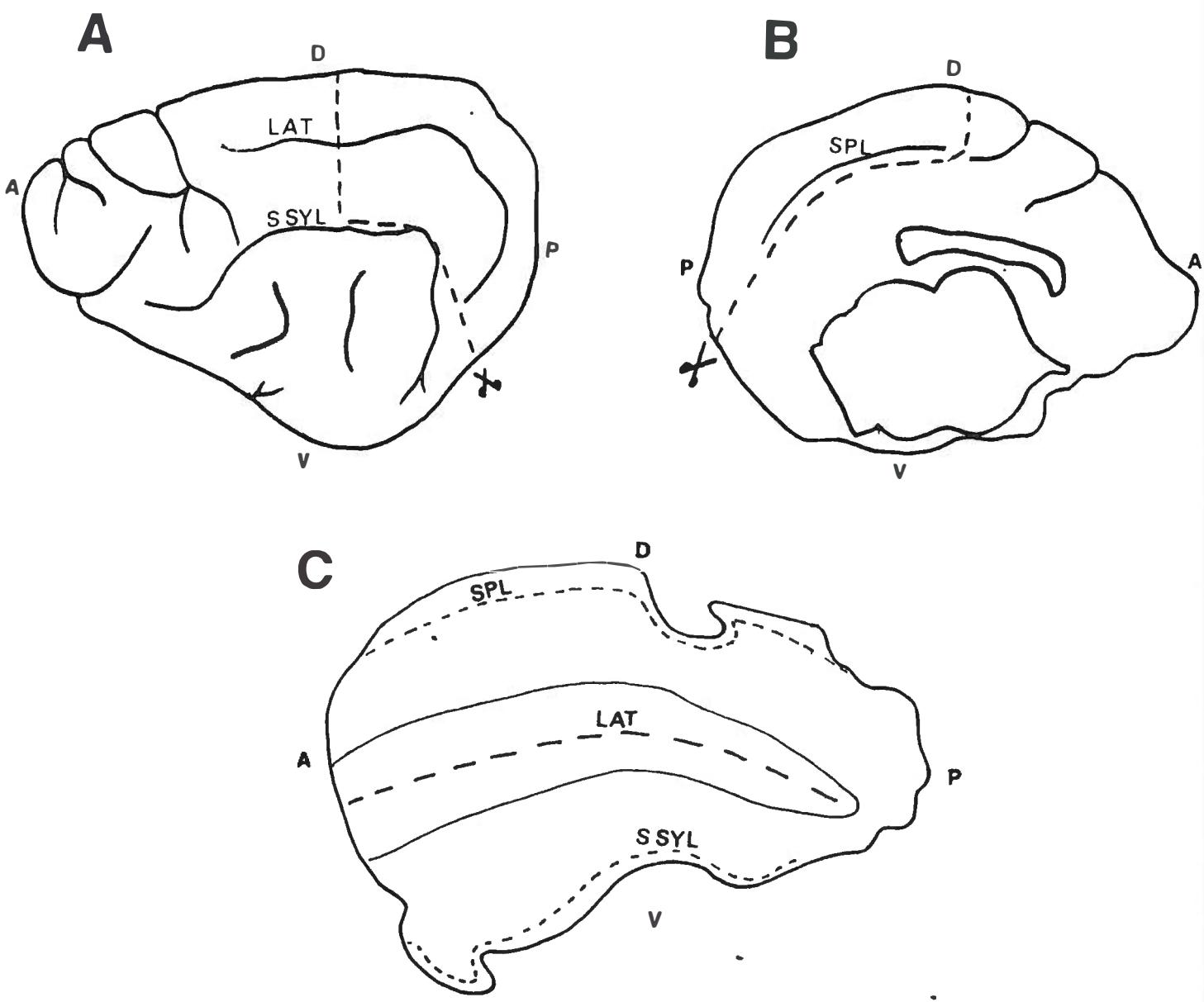


FIGURA 3: SEQUÊNCIA DE EMBLOCAMENTO E APLANAMENTO DO CÓRTEX VISUAL DE GATO. (A) vista lateral; (B) vista medial; (C) bloco aplanado.

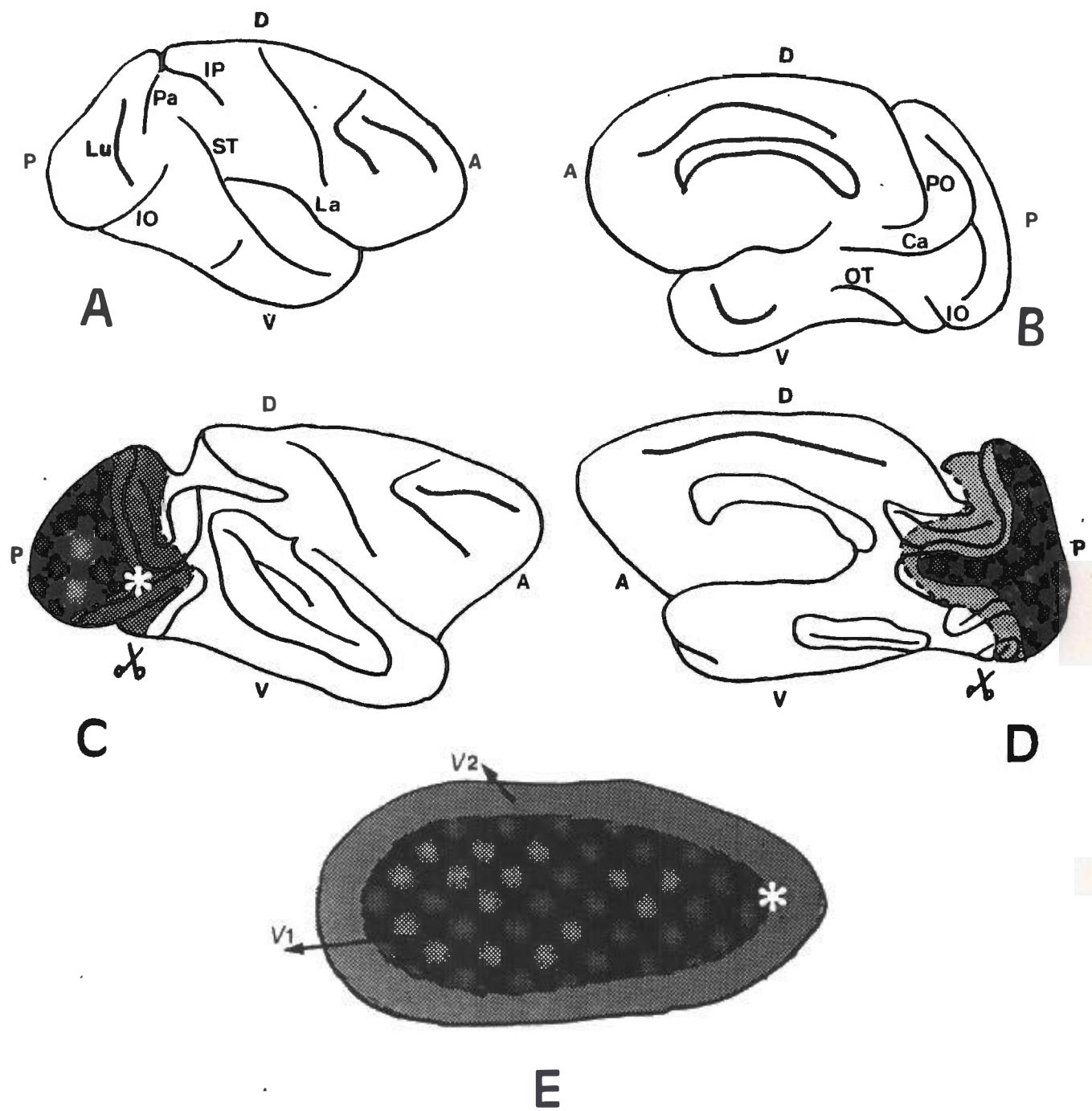


FIGURA 4: SEQUÊNCIA DE EMBLOCAMENTO E APLANAMENTO DO CÓRTEX VISUAL DE *Cebus*. (A) vista lateral; (B) vista medial; (C) vista lateral após abertura dos sulcos indicando a incisão realizada para o emblocamento; o asterisco representa a fóvea; (D) vista medial do emblocamento; (E) bloco aplanado.

Inicialmente foram feitas incisões na pia-máter sobreposta aos sulcos, de modo a permitir sua abertura gentil com os dedos. Em certos casos, devido à convexidade intrínseca ao bloco, foi necessário um corte em sua margem medial, em local escolhido de modo a permitir o melhor achatamento do córtex com um mínimo de distorção do tecido. Passou-se então à remoção da substância branca intra-hemisférica, pela utilização de bastões com ponta de algodão (Cotonetes, Johnson), umedecidos em solução salina isotônica (NaCl 0,9%), que foi também utilizada para manter o bloco hidratado. O aplanamento final foi conseguido pelo achatamento do bloco entre lâminas de vidro cobertas com filme de parafina (Parafilm, ACC). O tempo transcorrido entre o sacrifício do animal e a imersão dos blocos aplanados em fixador foi cerca de 60 minutos.

2.2.2 Fixação

O bloco aplanado foi imerso por 150 minutos em solução de glutaraldeído (Riedel-deHaën) 2% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Os primeiros 15 minutos de fixação se deram com o tecido ainda entre lâminas, de modo a garantir a conservação da forma aplanada depois da retirada das mesmas. Após a fixação, o bloco foi mergulhado em solução de sacarose P.A. (Reagen) 30% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 a 4°C por 12 horas.

2.2.3 Corte e Montagem

O bloco foi posicionado sobre uma base de albumina-gelatina, coberto com resina de inclusão (Lipshaw M-1) e submetido a uma leve pressão por meio de uma placa de cobre de 5mm de espessura untada com silicone. Todo o conjunto foi envolvido em gelo seco por 2 minutos de modo a obter a congelação rápida do bloco, que em seguida foi seccionado tangencialmente em micrótomo refrigerado (Cryostat, Bright Instruments Inc.). A espessura de corte variou entre 30 μ m e 60 μ m. Os cortes obtidos eram montados imediatamente em tampão fosfato 0,05 M pH 7,4 sobre lâminas previamente gelatinizadas e postos a secar em temperatura ambiente por 3 a 4 horas. Após a secagem total, crucial para evitar artefatos histoquímicos por descolamento do tecido, os cortes foram mantidos em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 a 4°C por 12 horas.

2.2.4 Reação Histoquímica para Citocromo-oxidase

O protocolo utilizado no presente trabalho consiste de uma modificação daquele proposto por Silverman e Tootell (1987):

a) Pré-incubação a 25°C por 15 minutos em solução contendo:

⇒CoCl ₂ · 6 H ₂ O.....	0,024%
⇒dimetilsulfóxido (DMSO).....	0,48%
⇒tampão fosfato 0,1M pH 7,4.....	q.s.p.

O cloreto de cobalto (Sigma) é reconhecido como mordente importante para a qualidade da coloração por vários autores (Kugler, 1990; Liu *et al.*, 1993), ainda que os mecanismos de sua ação permaneçam ignorados. O DMSO (Riedel-deHaën), um detergente, tem por função permeabilizar o tecido cortical de modo a maximizar seu contato com os meios de incubação e pré-incubação.

b) Incubação a 40°C por cerca de 2 horas em solução contendo:

⇒3-3'-diaminobenzidina (DAB).....	0,05%
⇒citocromo-c.....	0,01%
⇒catalase de figado bovino.....	0,004%
⇒DMSO.....	0,24%
⇒tampão fosfato 0,1M pH 7,4.....	q.s.p.

A catalase (Sigma) é utilizada para evitar coloração inespecífica devido à reação da 3-3'-DAB com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) presente no tecido, catalisada por peroxidases endógenas. A 3-3'-DAB (Sigma), funciona como cromógeno ao se oxidar, tornando-se insolúvel e de cor marrom e permanecendo estável nesta forma por anos (Adams, 1981).

c) Lavagem por duas vezes em tampão fosfato 0,1M pH 7,4;

d) Interrupção da reação em formaldeído 4% por 30 minutos;

f) Desidratação em série de concentrações crescentes de álcool etílico (75%, 90%, 100%) de 15 minutos de duração cada;

g) Pernoite em xileno, seguido de montagem da lamínula em meio de montagem (Entelan).

Algumas das lâminas foram sobrecoradas pelo cresil violeta (Gattass & Gross, 1981).

O tempo de incubação foi determinado, caso a caso, pela análise macroscópica dos cortes até a obtenção de colorações bem nítidas, de bom contraste, caracterizadas por apresentarem um gradiente de tons do amarelo ao marrom-escuro, conforme o conteúdo crescente de citocromo-oxidase em cada região.

A proporção de número de cortes para volume dos meios de incubação foi de 20 lâminas para cada 250ml.

A estimulação visual em gatos modificou os tempos da reação histoquímica de citocromo-oxidase para cerca de 2 horas. Esses tempos de reação são menores, em média, que os tempos de reação para gatos não-estimulados. A estimulação monocular total de *Cebus* (caso DO1) promoveu redução similar do tempo de reação histoquímica, em comparação com as reações feitas em cortes tangentes de animais não-estimulados (Gattass, comunicação pessoal).

2.3 Processamento e Reconstrução Fotográficos

A série de cortes de cada animal foi fotografada em filme ortocromático 12 ASA (Kodalith, Kodak), transiluminados com luz azul de maneira a aumentar o contraste. Foram feitas cópias em papel fotográfico 18 X 24cm (Kodabrome RC F3, Kodak) numa ampliação de 2,5 vezes; cada caso teve as camadas supragranulares e granular interna reconstruídas pela superposição de cortes seriados, utilizando a organização vascular e acidentes topográficos evidentes como guias para a remontagem, o que foi necessário pela impossibilidade de realizar cortes perfeitamente tangentes à superfície cortical em toda a sua extensão.

As reconstruções fotográficas obtidas foram refotografadas em filme ortocromático 12 ASA (Kodalith, Kodak). Os negativos foram ampliados 13 vezes e copiados em papel fotográfico 50 X 60cm (Kodabrome RC F3, Kodak). A atribuição do nível de um corte tangente em relação às camadas corticais foi realizada pela comparação entre o número de cortes da pia-máter à substância branca e a espessura das camadas (Beaulieu & Colonnier, 1983).

2.4 Determinação das Coordenadas Retinotópicas

Em gatos, a delimitação das áreas visuais V1, V2 e V3, assim como a atribuição de coordenadas retinotópicas, foram feitas de acordo com Tusa e colaboradores (1979) e Anderson e colaboradores (1988). Em macacos, tomou-se como referência o estudo de Gattass e colaboradores (1987) para atribuir coordenadas retinotópicas a V1, que se distingue nitidamente de V2 por seu padrão de citocromo-oxidase (Rosa *et al*, 1991).

2.5 Análise Morfométrica e Estatística

O estudo dos blobs de citocromo-oxidase do caso GB7 (hemisfério direito) foi feito a partir de desenhos em acetato das reconstruções fotográficas. Para determinar a densidade de blobs foram justapostos, sobre os desenhos em acetato, múltiplos quadrados de 13 mm de lado, de modo a cobrir toda a área de ocorrência de blobs em V1, V2 e V3; os quadrados foram numerados em cada amplitude de excentricidade considerada (de 10^0 em 10^0) em cada área pesquisada.

As densidades D de blobs foram determinadas pelo algoritmo:

$$D = \frac{\sum_{i=1}^n \chi_i}{n}$$

onde χ_i = número de blobs no quadrado i ;

n = número de quadrados;

i = índice dos quadrados.

Os desenhos dos blobs foram digitalizados em computador (MacIntosh LC III) através de um ‘scanner’de mesa (UC630 MaxColor); os blobs foram numerados e o número de pixels de cada um foi determinado pelo programa NIH Image V1.47. Os tamanhos médios T dos blobs para cada excentricidade em cada área, dados em mm², foram obtidos pelo algoritmo:

$$T = \frac{\sum_{j=1}^z y_j}{z \cdot p}$$

onde y_j = número de pixels no blob j ;

z = número de blobs;

j = índice dos blobs;

p = número de pixels em 1 mm².

As comparações estatísticas entre T e D foram realizadas por ANOVA univariada (Tukey), após a verificação da homogeneidade das variâncias por um teste de Bartlett.

2.6 Análise Densitométrica

A quantidade de citocromo-oxidase do caso DO1 foi estimada densitometricamente pela digitalização, por meio de um “scanner” de mesa (UC630 MaxColor), de secções da camada IV. A densidade óptica de cerca de 22×10^4 pixels foi determinada pelo programa NIH Image V1.47 numa escala de 0 a 255, e transformada em porcentagem tomando por mínimo (0%) a menor densidade medida no tecido fora de V1 e por máximo (100%) a maior densidade medida em V1.

RESULTADOS

3.1 Considerações gerais.

Zonas periódicas ricas em citocromo-oxidase foram encontradas em cortes tangentes à superfície da pia nos córtices visuais primário (V1), secundário (V2) e terciário (V3) de todos os 12 gatos estimulados. O mesmo não ocorreu em nenhum dos 5 gatos não-estimulados, com idênticos procedimentos histoquímicos. Itas em cortes tangentes de animais não-estimulados (Gattass, comunicação pessoal).

3.2 Estimulação parcial do campo visual em gatos.

A estimulação parcial do campo visual em gatos revelou um padrão regular de regiões ricas em citocromo-oxidase (blobs) apenas nas regiões topograficamente correspondentes às regiões estimuladas, conforme pode ser visto na figura 5, que representa o caso GB20, hemisfério direito.



FIGURA 5: DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA DE BLOBS EM CÓRTEX VISUAL DE GATO COM ESTIMULAÇÃO PARCIAL DO CAMPO VISUAL.(A) Vista geral da secção histológica com indicação dos sulcos; o retângulo representa a região topograficamente correspondente à porção do campo visual estimulado; (B) Vista ampliada do retângulo indicado em (A) e suas regiões adjacentes; as setas indicam regiões de alta atividade de citocromo-oxidase contendo blobs.

3.3 Análise morfométrica de blobs em gatos.

Os blobs evidenciados por estimulação visual se apresentam como estruturas fortemente coradas para citocromo-oxidase de aspecto arredondado ou elipsóide quando observadas em corte tangencial (Figura 6). As densidades médias e tamanhos médios de blobs em V1 nos casos GB7, GB23 e GR3 podem ser vistos na figura 7. Encontramos blobs nas camadas supragranulares do córtex visual de gatos com estimulação total do campo visual em toda a extensão das áreas visuais V1, V2 e V3, bem como na área AMLS. Isto pode ser evidenciado na montagem fotográfica, a partir de cortes adjacentes através da camada III, que reconstrói o padrão supragranular completo de citocromo-oxidase do caso GB7 (Figura 8).

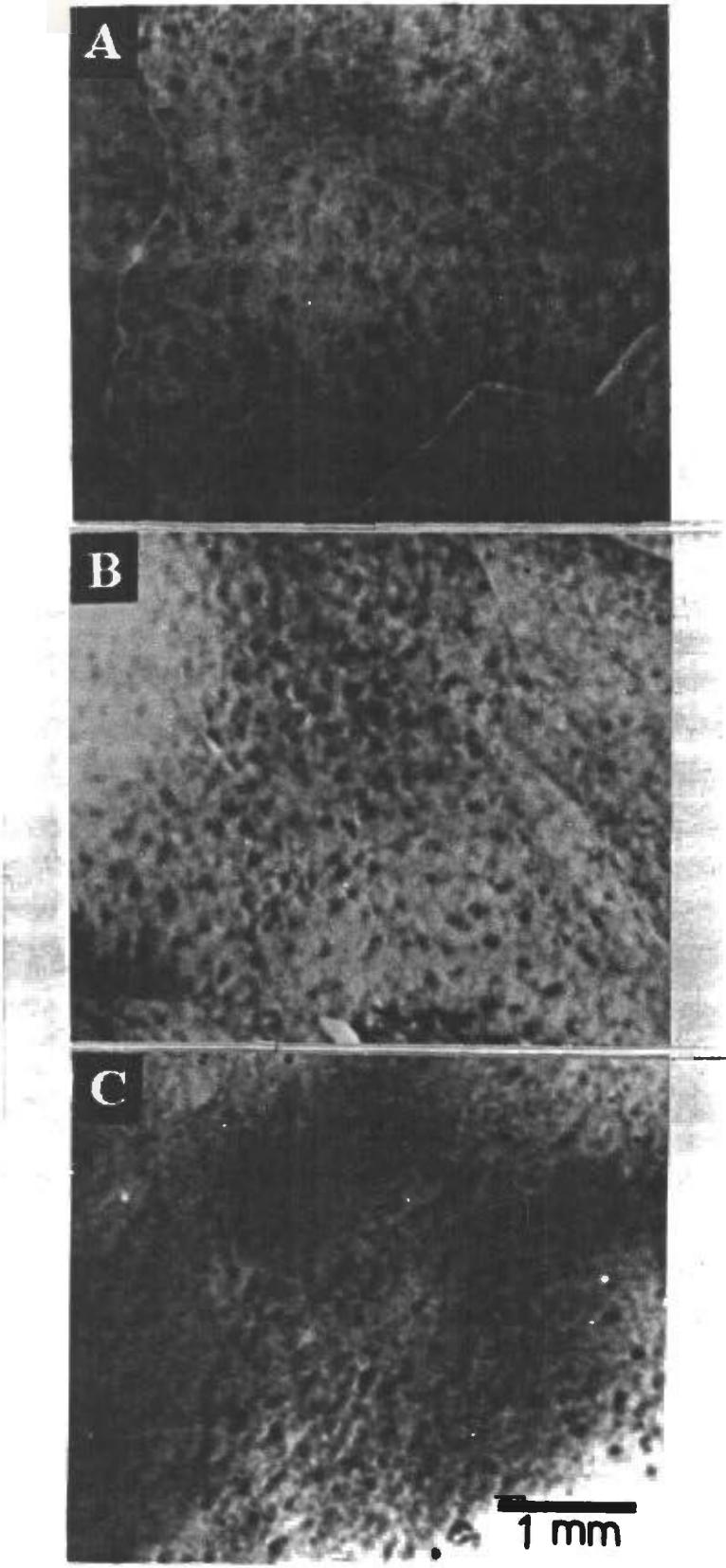


FIGURA 6: ILUSTRAÇÃO DO PADRÃO PERIÓDICO DE CITOCLORO-OXIDASE EM V1 DOS CASOS GB7 (A), GB23(B) E GR 3(C).

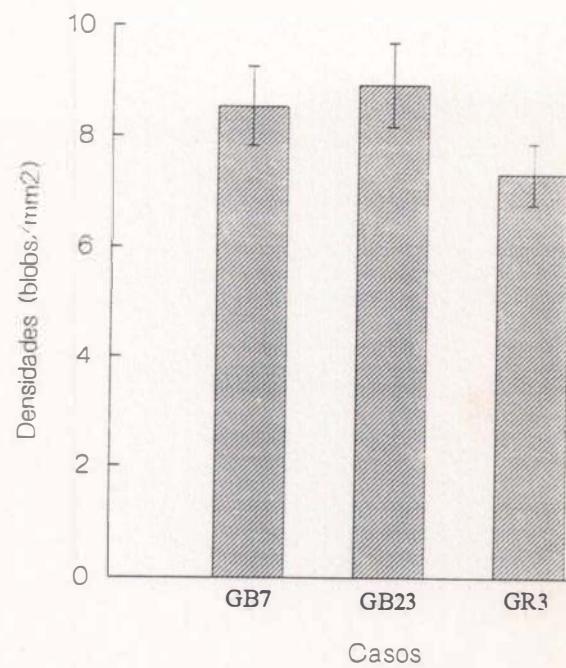
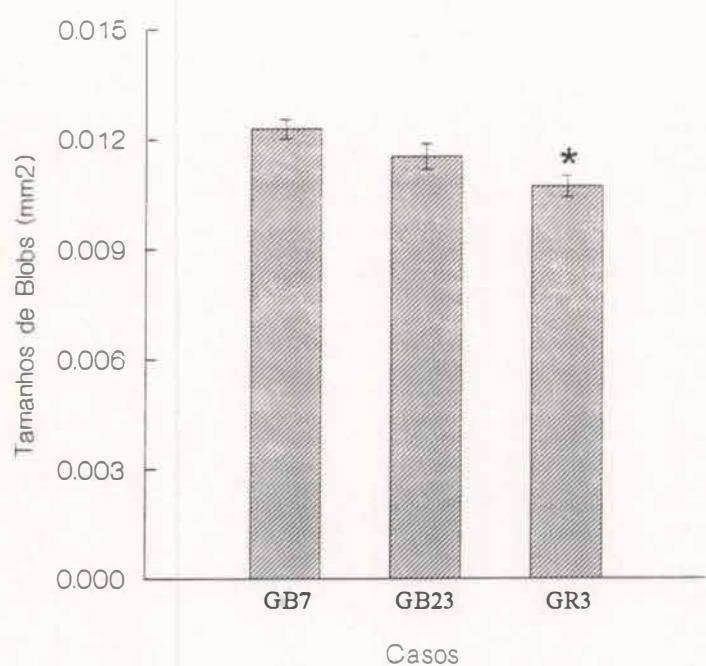


FIGURA 7:HISTOGRAMA DE TAMANHOS MÉDIOS E DENSIDADES MÉDIAS DOS BLOBS DE V1 ILUSTRADOS NA FIGURA 6. O tamanho médio de blobs do GR3 é diferente do tamanho médio de blobs do GB7 ($p<0,05$).

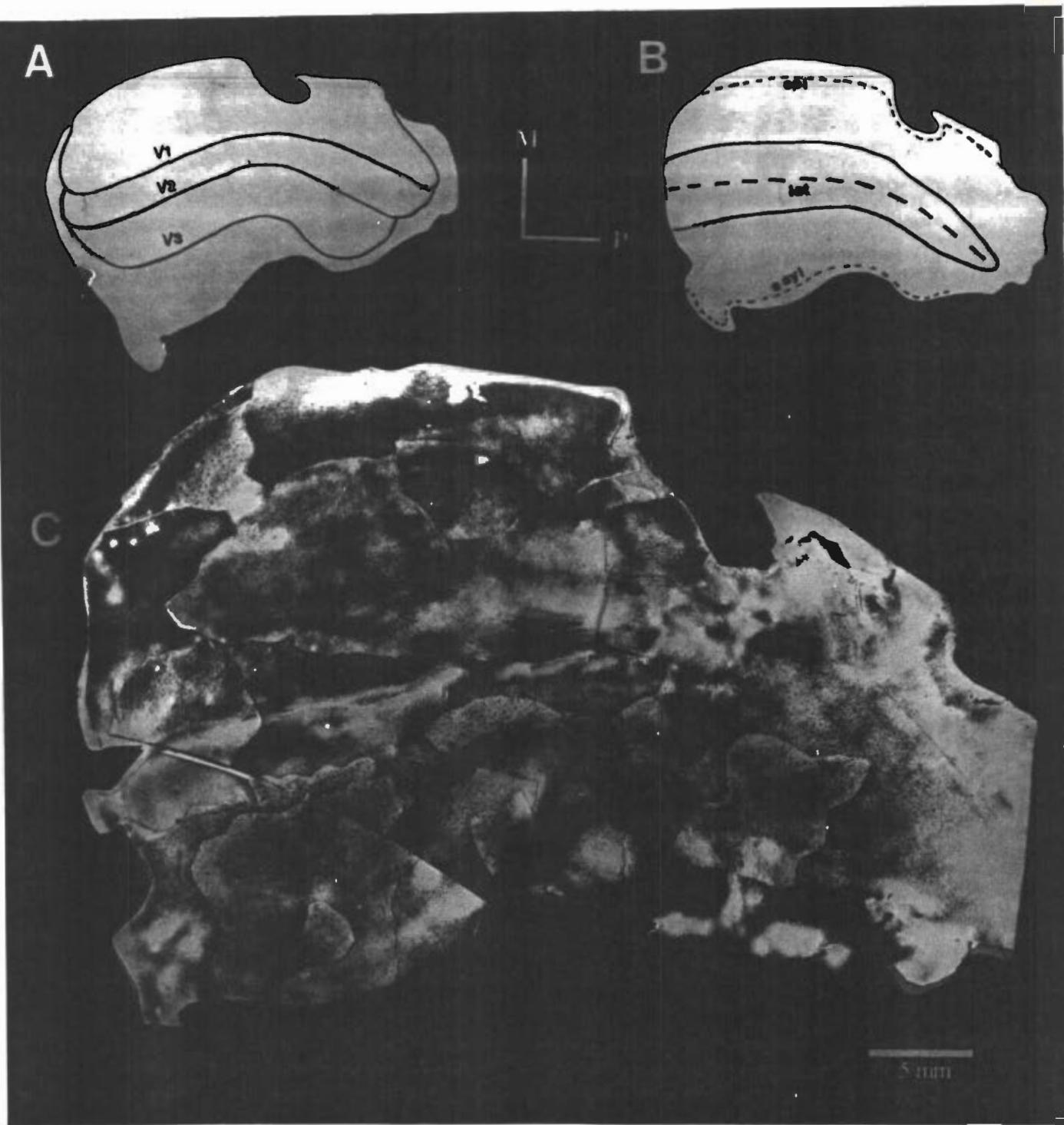


FIGURA 8: DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA DE BLOBS EM CÓRTEX VISUAL DE GATO COM ESTIMULAÇÃO TOTAL DO CAMPO VISUAL. (A) Representação esquemática das áreas V1, V2 e V3; (B) Vista esquemática do córTEX visual aplanado com a indicação de sulcos; (C) Reconstrução tangencial completa da camada III do córTEX visual mostrando o padrão de blobs encontrado em V1, V2 e V3.

As variações dos tamanhos médios de blobs e de suas densidades médias, de acordo com as diversas excentricidades, podem ser observadas nas figuras 9 e 10, respectivamente. Vemos que os blobs de V1, V2 e V3 comportam-se diferentemente entre si quanto aos seus aspectos quantitativos.

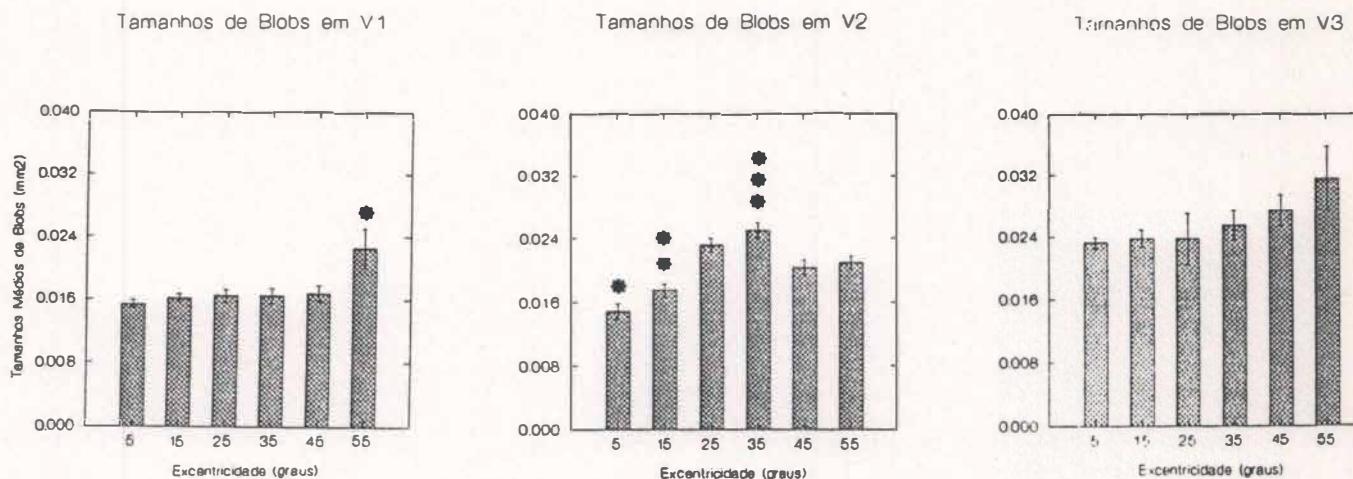


FIGURA 9:DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS MÉDIOS DE BLOBS DE ACORDO COM GRAUS DE EXCENTRICIDADE EM V1, V2 E V3. As excentricidades estão representadas por seus valores intermediários; assim, 5° corresponde ao intervalo de 0° a 10°, 15° ao intervalo de 10° a 20° e assim sucessivamente. Em V1, T(55°) diferente de D(5°) com $p<0,05$. Em V2, T(5°) diferente de T(25°-55°), T(15°) diferente de T(25°-35°), T(35°) diferente de T(45°-55°) com $p<0,05$. ANOVA univariada (Tukey).

Densidade de Blobs em V1

Densidade de Blobs em V2

Densidade de Blobs em V3

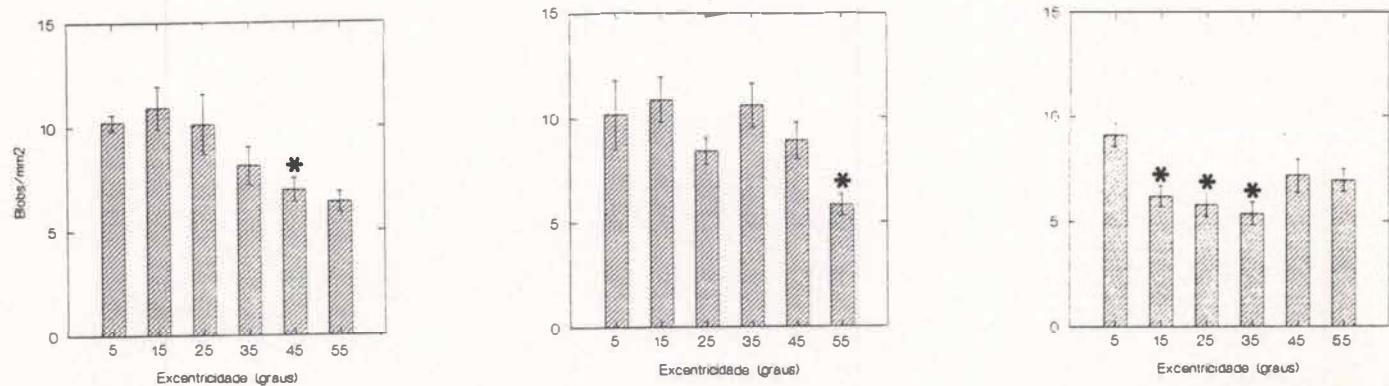


FIGURA 10:DISTRIBUIÇÃO DE DENSIDADES MÉDIAS DE BLOBS DE ACORDO COM GRAUS DE EXCENTRICIDADE EM V1, V2 E V3. As excentricidades estão representadas por seus valores intermediários; assim, 5° corresponde ao intervalo de 0° a 10°, 15° ao intervalo de 10° a 20° e assim sucessivamente. Em V1, D(45°) diferente de D(15°) com p<0,05. Em V2, D(>55°) diferente de D(5°-35°) com p<0,05. Em V3, D(15°-35°) diferentes de D(5°) com p<0,01. ANOVA univariada (Tukey).

Os blobs de V1 possuem tamanho praticamente constante na região binocular do campo visual, medindo cerca de 0,016 mm². Além de 50° de excentricidade ocorre um aumento significativo dos blobs, que passam a ter em média 0,022 mm². Analisando a variação de densidades de blobs, pode-se observar uma tendência sutil de decréscimo com o aumento da excentricidade. Este decréscimo só é estatisticamente significativo entre 40° e 50°, onde a densidade média é de 6,95 blobs/mm². Apesar da densidade média além de

50° ser ainda menor ($6,36 \text{ blobs/mm}^2$), o tamanho pequeno da amostra não torna a diferença significativa ($p=0,07$).

O comportamento de V2 quanto a valores médios de tamanho e densidade de blobs é bastante irregular. Entre 20° e 40° os blobs assumem tamanhos médios de aproximadamente $0,024 \text{ mm}^2$, maiores que os encontrados em outras excentricidades de V2. Além de 40° ocorre uma redução do tamanho médio para valores próximos de $0,020 \text{ mm}^2$, que não se igualam entretanto aos valores encontrados na representação central ($0,014 \text{ mm}^2$). A análise das densidades de blobs em V2 revela um decréscimo significativo dos valores médios na representação periférica ($>50^\circ$), atingindo $5,8 \text{ blobs/mm}^2$. É possível detectar uma oscilação negativa entre 20° e 30° que não chega a ser significativa.

Os blobs em V3 possuem tamanhos estatisticamente homogêneos, embora apresentem uma leve tendência de crescimento com o aumento da excentricidade, variando entre $0,023 \text{ mm}^2$ na representação central e $0,031 \text{ mm}^2$ no crescente monocular. A distribuição de densidades de acordo com a excentricidade se caracteriza por um decréscimo significativo dos valores entre 10° e 40° . Nessas excentricidades a densidade varia entre $6,19 \text{ blobs/mm}^2$ e $5,36 \text{ blobs/mm}^2$, enquanto entre 0° e 10° a densidade é de $9,08 \text{ mm}^2$. Acima de 40° as densidades são superiores a $6,92 \text{ blobs/mm}^2$.

A tendência de crescimento progressivo dos tamanhos de blobs em direção às áreas extra-estriadas pode ser observada na figura 11, onde se verifica que os tamanhos mais frequentes de blobs em V1, V2 e V3 são respectivamente $0,015\text{ mm}^2$, $0,020\text{ mm}^2$ e $0,025\text{ mm}^2$.

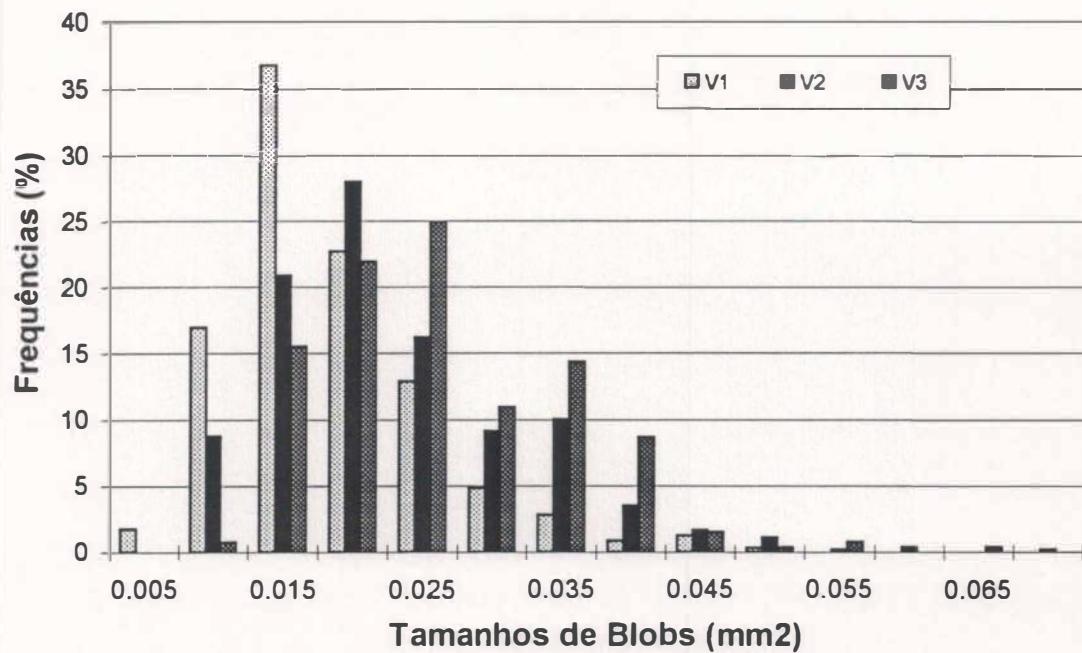


FIGURA 11: COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DE BLOBS EM V1, V2 E V3. O tamanho mais frequente de blobs é crescente de V1 para V2 e de V2 para V3.

3.4 Estimulação monocular do campo visual em *Cebus*.

Verificamos a ocorrência de mobilização rápida de citocromo-oxidase em V1 após estimulação monocular parcial de *Cebus*. A estimulação monocular total de *Cebus* resultou em aumento da atividade de citocromo-oxidase a partir de quinze minutos de estimulação no caso DO1, conforme é possível observar na figura 12. As figuras 13 e 14 demonstram a existência de um pico de estimulação no tempo de 30 minutos, após o qual a ativação enzimática diminui. O caso DO2 (não-ilustrado) não apresentou um padrão colunar inequívoco, razão pela qual optou-se por aumentar a intensidade do estímulo. A utilização de estímulo luminoso por estroboscópio permitiu evidenciar CDO na região topograficamente correspondente à porção do campo visual estimulada, no caso DO3. Pode-se observar o padrão colunar na camada IV (figura 15A), bem como sua continuidade através das camadas infragranulares (figuras 15B,C,D,E). A secção histológica correspondente à figura 15E foi sobrecorada pelo cresil violeta. A fotomicrografia de uma região de fronteira entre colunas clara e escura permite evidenciar a existência de um bordo nítido de atividade de citocromo-oxidase (figura 16).

Cebus V1

Densidade Óptica

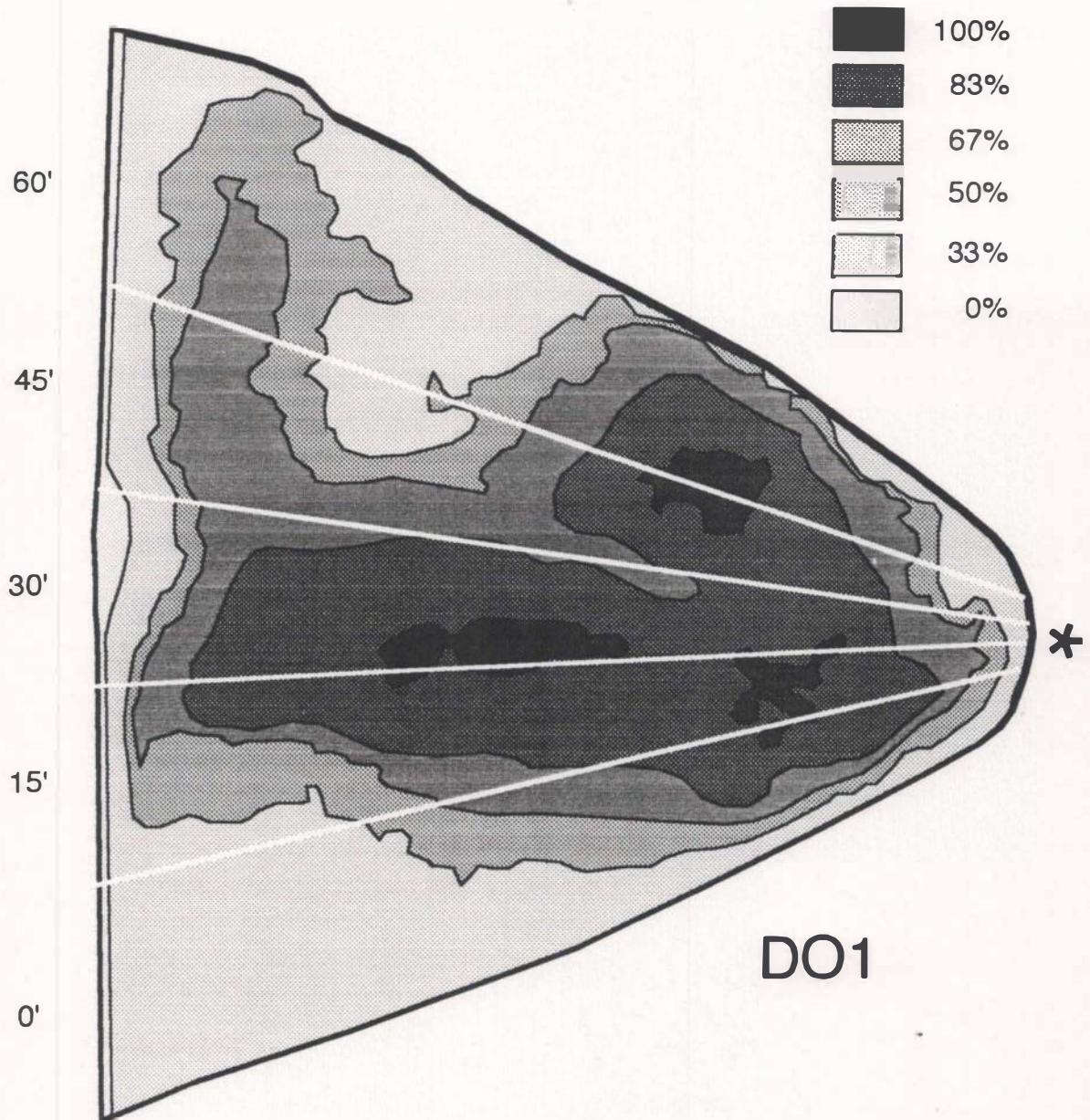


FIGURA 12: ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DA REPRESENTAÇÃO CENTRAL DE VI DO CEBUS (CASO DO1)

Cebus V1 Caso DO1

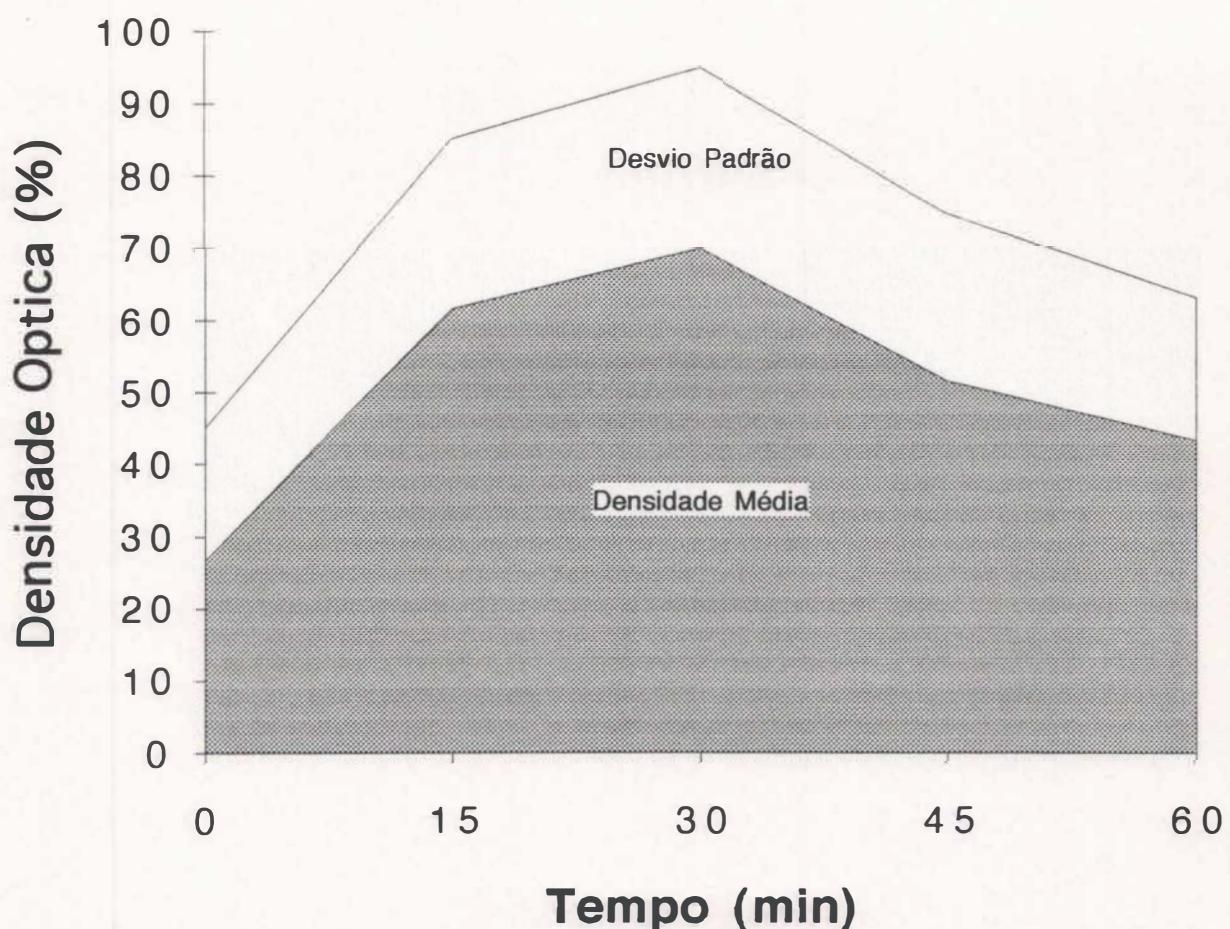


FIGURA 13: HISTOGRAMA DA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DA REPRESENTAÇÃO CENTRAL DE VI DO CEBUS (CASO DO1) EM PORCENTAGEM DE SATURAÇÃO

Cebus V1 Caso DO1

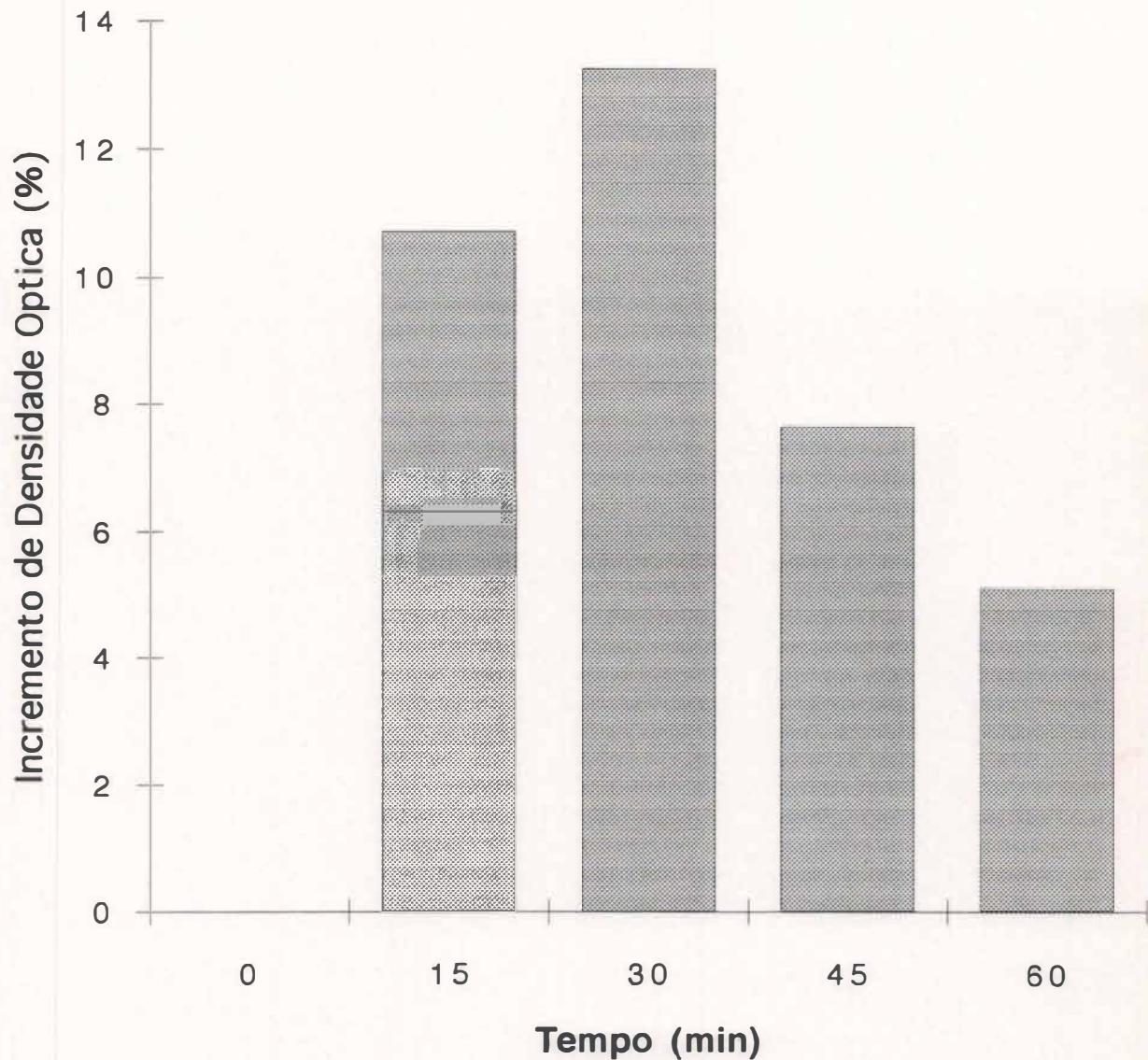


FIGURA 14: HISTOGRAMA DA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DA REPRESENTAÇÃO CENTRAL DE V1 DO CEBUS (CASO DO1) EM INCREMENTOS DE DENSIDADE ÓPTICA ACIMA DO TEMPO ZERO DE ESTIMULAÇÃO

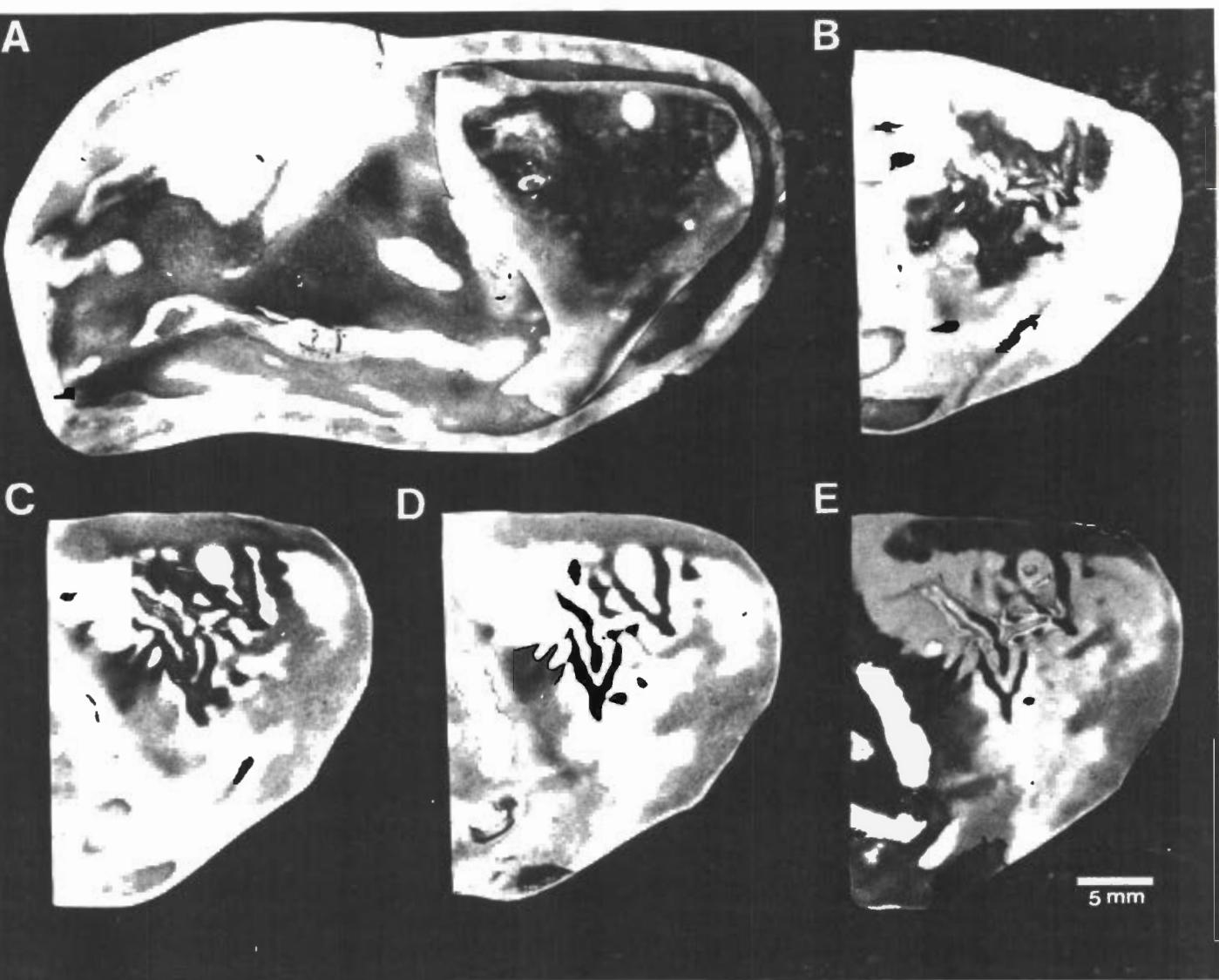


FIGURA 15: SEQUENCIA DE SECÇOES HISTOLOGICAS DE CORTEX VISUAL APLANADO DE *Cebus* DO3 APÓS ESTIMULAÇÃO PARCIAL DO CAMPO VISUAL. PODE-SE OBSERVAR O ASPECTO COLUNAR DO PADRÃO DE CITOCROMO-OXIDASE (A) Camada IV (B, C, D, E) Camadas infragranulares

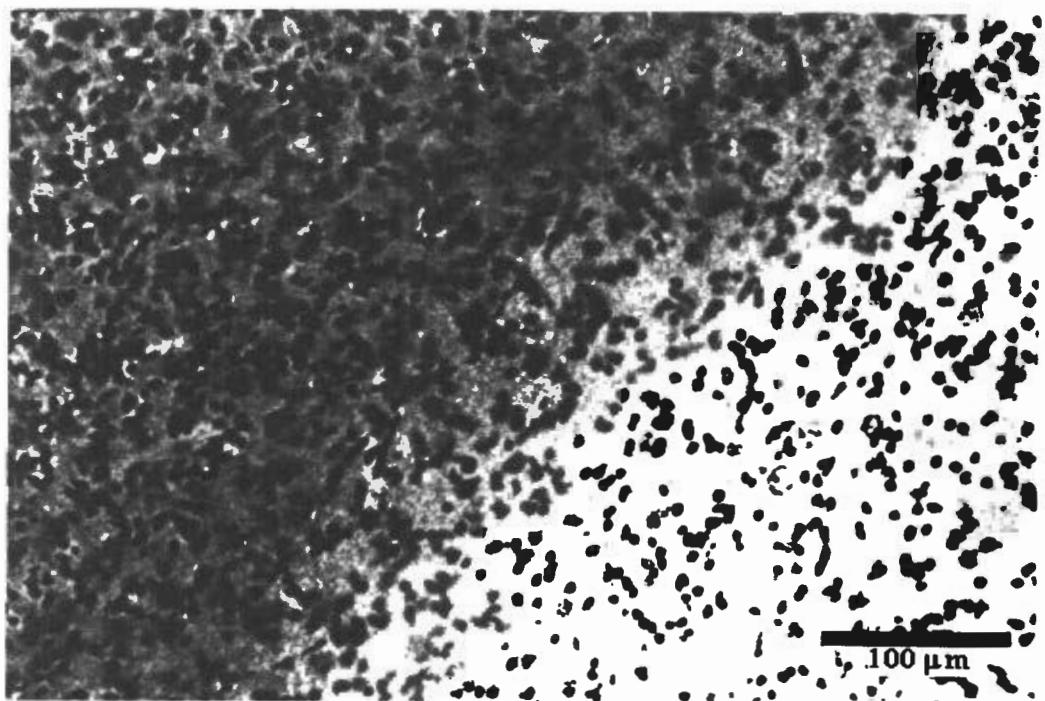


FIGURA 16: FOTOMICROGRAFIA CORADA PARA CITOCHROMO-OXIDASE E SOBRECORADA PELO CRESIL-VIOLETA INDICANDO O LIMITE NITIDO DE REATIVIDADE PARA CITOCHROMO-OXIDASE ENTRE COLUNAS NO CASO DO3.

DISCUSSÃO

4.1 Sobre a existência de blobs no córtex visual de gatos.

Resultados obtidos por nós (Ribeiro *et al.*, 1994), através de histoquímica convencional de citocromo-oxidase, demonstram a existência de estruturas supragranulares ricas nesta enzima dispostas em grumos regularmente espaçados nos córtices estriado e extra-estriado de gatos, cujo aparecimento é dependente de estimulação visual aguda. Murphy e colaboradores (1990, 1991) relatam achados semelhantes na área 17, independentemente de qualquer estimulação visual. A contradição entre os resultados de Murphy e colaboradores (1990, 1991), de um lado, e os estudos originais de Horton e Hubel (1981), de outro, é explicada pelos primeiros em termos de diferenças metodológicas relativas ao plano de microtomia; o advento da técnica de aplanamento do córtex, permitindo cortes tangenciais a sua superfície, seria a explicação para o aparecimento no gato de padrões regulares de citocromo-oxidase, semelhantes aos encontrados em primatas tanto em planos coronais quanto em planos tangenciais. Os blobs dos gatos, menos conspícuos que os dos primatas, seriam de difícil observação em cortes coronais tais como os realizados por Horton e Hubel (1981).

No entanto, não reproduzimos os resultados de Murphy e colaboradores em 5 gatos não-estimulados, mesmo realizando o aplanamento do córtex visual dos animais. Em contraposição, todos os 12 gatos estimulados apresentaram os padrões regulares de

citocromo-oxidase referidos anteriormente (figura 6), indicando a necessidade da estimulação visual para evidenciá-los por histoquímica convencional. Os resultados obtidos nesta tese (figura 5) corroboram tal conclusão, ao demonstrar uma relação topográfica entre a região do campo visual onde foi apresentado o estímulo e as regiões do córtex visual, nas diferentes áreas, onde aparecem as estruturas citadas. Os estímulos utilizados para evidenciar tais padrões são estímulos adequados à ativação de blobs, por serem de baixa frequência espacial, não-orientados e com grandes variações de brilho ou cor (Livingstone & Hubel, 1984; Tootell *et al.*, 1988a, 1988b).

Estudos do córtex visual de gatos por histoquímicas de citocromo-oxidase não-convencionais, suplementadas com imidazol e sais de níquel, revelam padrões enzimáticos idênticos aos relatados aqui (Dick e Cynader, 1993; Boyd & Matsubara, 1994). Tanto a descrição morfológica das estruturas encontradas nesta tese quanto os atributos do estímulo visual capaz de evidenciá-las nos levam a propor que se trata de módulos corticais semelhantes aos blobs encontrados em primatas. Esta proposta implica algumas mudanças nos conceitos de blob e citocromo-oxidase que devem ser explicitadas.

A definição original e até recentemente vigente de blob (Horton & Hubel, 1981) o descreve como uma estrutura tipicamente primata, ausente em outras ordens. Qual é o significado da existência de blobs em uma espécie da ordem **Carnivora**? Gatos são animais de hábitos tanto noturnos quanto diurnos, capazes de atividade de procura de alimento sob forte iluminação e semi-escuridão (Smythe, 1975). É razoável admitir, portanto, que necessitem de um aparato sensorial capaz de processar constância de brilho e cor, tal como sugerido por Allman e Zucker (1990). Assim, a existência de blobs em

gatos, se não pode ser tomada como uma necessidade biológica, se integra consistentemente à ecologia e à etologia destes felinos.

Quanto à filogênese dos blobs, pode-se questionar se sua ocorrência em gatos e primatas constitui uma convergência adaptativa ou se, ao contrário, trata-se de estruturas homólogas originariamente presentes num ancestral comum. **Primates** e **Carnivora** divergiram evolutivamente há cerca de 60 milhões de anos, no começo do Eoceno (figura 17).

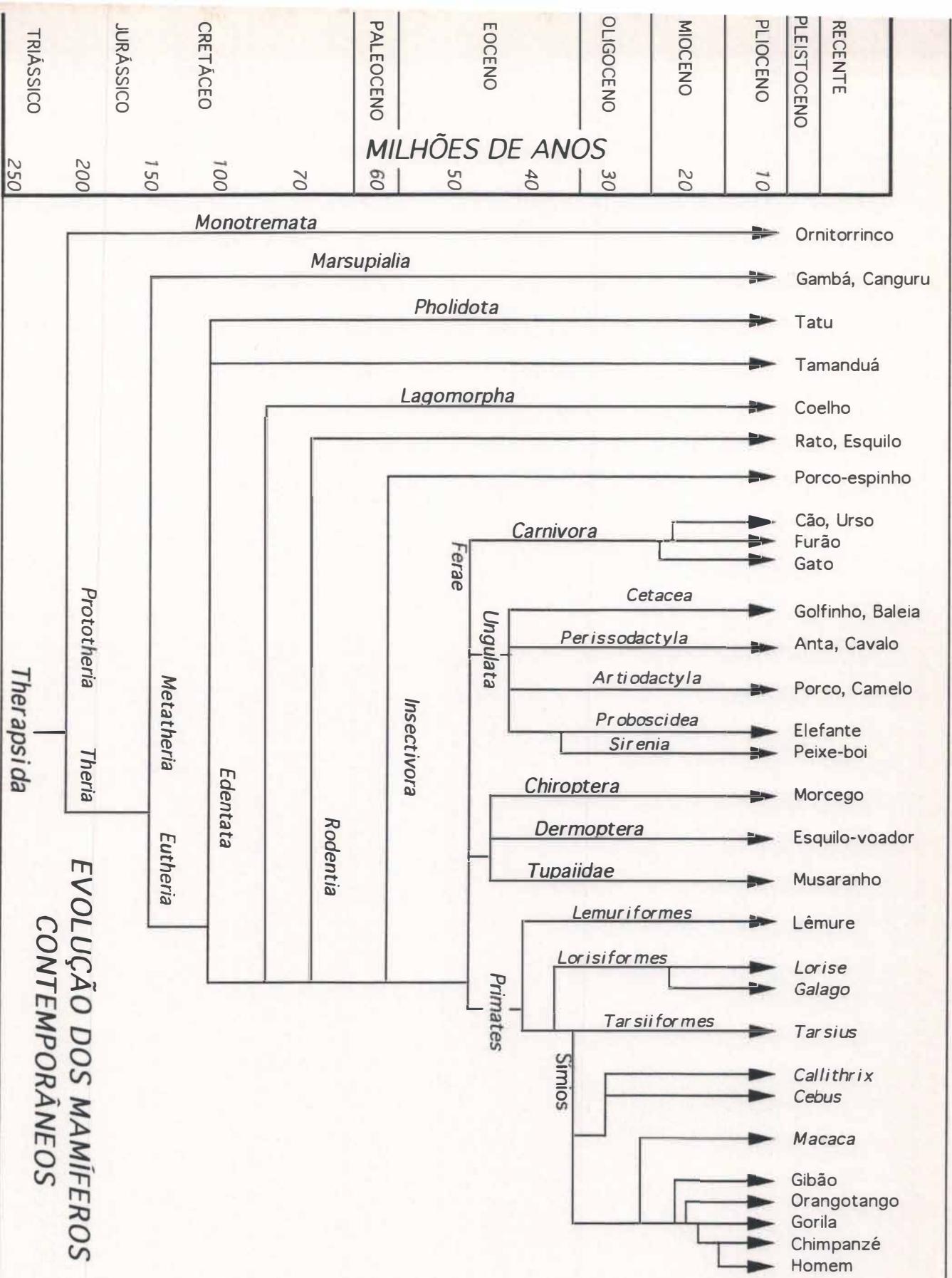


FIGURA 17: Filogenia simplificada mostrando a evolução dos mamíferos contemporâneos (baseada em Eisenberg, 1981).

Caso o módulo blob estivesse presente no seu ancestral comum, seria provável encontrá-lo em outros carnívoros, como canídeos e mustelídeos, e também em espécies de ordens evolutivamente próximas tanto de primatas quanto de carnívoros, como **Insectivora**, **Chiroptera**, **Dermoptera**, **Ungulata** etc. À parte o furão (Cresho *et al.*, 1992) e o gato, pouco se conhece sobre a eventual presença de blobs em espécies de ordens que não **Primates**. Se confirmada em tais grupos a inexistência de blobs, ficará reforçada a hipótese de sua evolução independente em **Carnivora** e **Primates**. No entanto, seria possível argumentar que as espécies atuais de grupos onde blobs são ausentes, especialmente quirópteros, não utilizam a visão como sentido principal, o que poderia ter ocasionado a perda recente destes módulos. Os experimentos contidos nesta tese não permitem propor soluções para tais questões; revigoram, entretanto, a busca de blobs em ordens não-primatas de mamíferos como direção a seguir na investigação do assunto, tendo em vista o novo paradigma experimental aqui apresentado. Em face destes resultados, é necessário rever a ausência de blobs em musaranhos (Horton & Hubel, 1981) e esquilos (Horton, 1984), bem como ampliar a lista de espécies pesquisadas, a fim de elucidar as relações entre blobs de gatos e primatas.

À parte a questão filogenética, outras questões concernentes ao conceito de blob demandam discussão. O blob, tal como foi definido, é uma estrutura cujo aparecimento no córtex visual independe do estado fisiológico imediatamente anterior ao sacrifício do animal. Ele é entendido como uma estrutura estável e fixa, cuja existência é verificada mesmo em estágio neonatal (Tigges & Tigges, 1983; Kennedy *et al.*, 1985; Purves & La-Mantia, 1990; Spatz *et al.*, 1993) e cujas características de forma, tamanho e densidade só podem ser modificadas por processos crônicos de alteração de suas aferências, conforme se verifica em experimentos após vários meses de enucleação (Horton & Hubel, 1981; Horton, 1984; Wong-Riley & Carroll, 1984; Trusk *et al.*, 1990) ou de lesões retinianas (Marcondes *et al.*, 1994).

Ao contrário de tais noções, nossos dados indicam que os blobs de gatos são não apenas sensíveis a alterações fisiológicas agudas imediatamente anteriores ao sacrifício (estimulação visual) como dependentes de tais alterações para serem evidenciados por histoquímica convencional. As características do estímulo visual utilizado sugerem que as células integrantes de blobs de gatos possuem propriedades eletrofisiológicas semelhantes às de neurônios de blobs de primatas. Entretanto, tais células não evoluíram no sentido de possuir, perenemente, grande quantidade de mitocôndrias; em contrapartida, parecem ser capazes de mobilizar citocromo-oxidase (e quiçá outras enzimas da cadeia respiratória) rapidamente, em resposta a uma demanda energética específica e local. O fenômeno acima descrito, a mobilização aguda de citocromo-oxidase por estimulação sensorial, constitui ele mesmo uma negação da noção de que a citocromo-oxidase só pode ter seus níveis de atividade alterados cronicamente. A literatura de neurociências aceita como dogma a

afirmação de que "cytochrome-oxidase, being an integral membranous protein, requires a larger period for turnover and adjustment" (Wong-Riley, 1988). A autora repete pouco depois (Wong-Riley, 1989a) que 'substantial adjustments in activity and amount of enzyme necessitate synthesis, degradation and/or modification of the enzyme that requires hours, if not days, to achieve a new steady-state level that is resolvable histochemically'. Não obstante, Wong-Riley admite na mesma revisão que 'limited acute changes in cytochrome oxidase are detectable by differential reflectance spectrophotometry (Jöbsis *et al.*, 1977)'". Relata ainda um estudo de ratos submetidos a dieta com etanol (Thayer & Rubin, 1986) que indica a ocorrência de formas inativas de citocromo-oxidase em tais animais. Tomados em conjunto, estes resultados permitem a especulação de que mesmo em condições normais existam reservas não-funcionais da enzima passíveis de serem mobilizadas em resposta a uma demanda específica. Além disso, trabalhos publicados na última década apontam para a existência de diversos mecanismos de regulação transcripcional, traducional e pós-traducional da citocromo-oxidase.

Williams (1986) demonstra que células musculares de mamíferos retêm a capacidade de alterar suas taxas de síntese de DNA mitocondrial mesmo após perderem, por diferenciação, a capacidade de replicar o DNA nuclear. Tais resultados sugerem que a amplificação gênica seja um dos principais eventos regulatórios da expressão do genoma mitocondrial em células musculares. Em outro estudo, Williams *et al.* (1987) mostram uma elevação de 200% da atividade da citocromo-oxidase após dez dias de estimulação crônica em fibras musculares esqueléticas de coelhos. Após 21 dias de estimulação, que consistia de pulsos elétricos fracos a 10 Hz aplicados ao nervo peroneal comum de um dos

membros, a atividade de citocromo-oxidase aumentou mais que 400% em relação ao controle. Experimentos de hibridização demonstraram um aumento significativo dos níveis de mRNA da subunidade VI da citocromo-oxidase após a estimulação, produzindo evidências da ocorrência de regulação transcripcional dos níveis de atividade da enzima, seja por crescimento das taxas de transcrição, seja por aumento da estabilidade do mRNA. Contudo, os autores concluem que o aumento da eficiência traducional, o transporte acelerado de polipeptídeos citoplasmáticos para o interior das mitocôndrias e o incremento da estabilidade protéica também devem estar implicados no fenômeno relatado, posto que as alterações nos níveis de mRNA da subunidade VI não alcançam proporcionalmente as mudanças na atividade da citocromo-oxidase.

A existência de diferentes isoformas de algumas das subunidades da citocromo-oxidase codificadas no núcleo (Kuhn-Nentwig & Kadenbach, 1985; Hevner & Wong-Riley, 1991) bem como o papel do oxigênio molecular no controle da síntese (Groot *et al.*, 1972; Mason & Schatz, 1973; Groot & Poyton, 1975; Asson-Batres & Hare, 1991) e da complexação (Asson-Batres & Hare, 1991) das subunidades demonstram a regulação transcripcional e pós-transcripcional da enzima. Hood (1990) descreve a expressão coordenada das subunidades II e VIc em diferentes tecidos de ratos, inclusive no cérebro; em contraste, Luciakova *et al.* (1992) demonstra o oposto para as subunidades I e IV, indicando uma modulação fina de todo o processo. Neste mesmo trabalho, realizado em fibroblastos de camundongos em cultura, os autores descrevem o aumento em cerca de 100% dos níveis de mRNA codificando a subunidade I após 30 minutos de indução do crescimento celular por soro fetal bovino. A expressão atinge seu pico de quase 350% do

controle após 60 minutos de indução e se reduz em seguida, confirmando a possibilidade de alterações bastante rápidas nos níveis de síntese e de “turnover” de citocromo-oxidase.

Em experimentos com cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (Deshaies *et al.*, 1988), verificou-se que a depleção de proteínas de estresse da família ‘heat shock proteins 70’(hsp70) por repressão da expressão gênica causa um acúmulo de precursores polipeptídicos fora das mitocôndrias em menos de uma hora. Estes resultados implicam proteínas de estresse na translocação pós-traducional de precursores protéicos para o interior de mitocôndrias, talvez promovendo o relaxamento de sua estrutura terciária (Eilers & Schatz, 1986); indicam, ainda, altas taxas de “turnover” de polipeptídeos sintetizados no citoplasma e importados para mitocôndrias.

Finalmente, em experimentos polarográficos e fotométricos da cinética da citocromo-oxidase em presença de diversos ânions polivalentes, Hüther e Kadenbach (1986) demonstraram o aumento significativo do K_m da enzima quando ligada a ATP; Bisson *et al.* (1987) confirmaram a redução da afinidade pelo substrato da citocromo-oxidase em presença de ATP, identificando sítios alostéricos específicos nas subunidades IV e VIII. Os autores postulam que as mudanças conformacionais promovidas pelo ATP na citocromo-oxidase provoquem efeitos drásticos no metabolismo celular, uma vez que mesmo “small changes in the enzyme affinity for the substrate may have important consequences on reaction rates” (Bisson *et al.*, 1987).

Em resumo, as diversas indicações da possibilidade de alteração aguda nos níveis de atividade da citocromo-oxidase não deveriam ter permitido descartar tal hipótese *a priori*. Os resultados aqui apresentados argumentam em seu favor de forma direta.

4.2 Comparação morfométrica entre blobs de gatos e primatas.

Não encontramos variação substantiva de densidades e tamanhos médios de blobs entre os casos GB7, GB23 e GR3. A única diferença estatisticamente significativa ocorre entre os tamanhos de blobs dos casos GB7 e GR3 (figura 7). É possível que esta diferença se deva às diferenças entre os estímulos apresentados aos animais. Todavia, são necessários experimentos complementares que investiguem com precisão as relações entre tipos de estimulação e parâmetros quantitativos de blobs obtidos após estímulo. Decidimos realizar a análise morfométrica com o caso GB7, por ter sido estimulado em todo o campo visual com cores. Ainda que seja certo que blobs não são estruturas para cor, nossa escolha se baseou na resposta seletiva a cor de cerca de 75% dos blobs de primatas (Wong-Riley *et al.*, 1989b).

A despeito da distância evolutiva entre felídeos e primatas, seus cérebros têm em comum o neocôrte x bastante expandido em relação a outros mamíferos (Kaas, 1988). Apresentam ainda grande número de áreas corticais funcionalmente distintas, com várias homologias (Campbell & Hodos, 1970). Especialmente no que diz respeito à organização do córtex visual, gatos e macacos (Lund *et al.*, 1979; Van Essen, 1985; Ungerleider & Desimone; 1986, Kaas, 1988) possuem homologia das áreas visuais primária (V1), secundária (V2) e terciária (V3). Contudo, distintamente do que ocorre em primatas, encontramos blobs não só em V1 como também em V2, V3 e outras regiões extra-estriadas posteriores (figura 8).

Sob aparente contradição, nossos resultados são em realidade coerentes com a literatura sobre módulos corticais visuais. Experimentos de injeção monocular de ^3H -prolina em gatos demonstram um mosaico de bandas de dominância ocular nas áreas 17, 18, 19, 21a e talvez VLS (Löwel & Singer, 1987; Anderson *et al.*, 1988). A existência de blobs e bandas extra-estriadas no gato parece advir do padrão de aferências do GLd, que neste animal atinge todas as áreas citadas (Tretter *et al.*, 1974; LeVay & Gilbert, 1976). Anderson *et al.* (1988) corroboram observações anteriores (Schatz *et al.*, 1977) de que as CDO encontradas em V2 são mais largas que em V1, o que provavelmente resulta das maciças projeções extra-estriadas de camadas do GLd inervadas por células Y (Stone & Dreher, 1973). Os blobs médios de gatos (figuras 9) medem entre um terço (V1) e metade (V3) dos blobs encontrados em *Cebus* (Rosa *et al.*, 1991). Como provável consequência do aumento progressivo da largura das CDO nas áreas laterais a V1, encontramos variações análogas nos tamanhos médios de blobs em V1, V2 e V3 do gato (figura 11).

A tentativa de relacionar as variações interespécificas de tamanho médio de blobs e de densidades de blobs resultou na constatação da existência de relações alométricas entre estes parâmetros. Equações alométricas são relações de proporcionalidade não entre as taxas de variação de duas grandezas (isometria) mas entre suas taxas específicas de variação (Pirlot, 1969; Gould, 1977). Assim, para constantes A, B, C e para grandezas x, y, temos que

$$1) \frac{1}{y}(\partial y/\partial t) = A(1/x)(\partial x/\partial t); \text{ integrando e simplificando,}$$

$$2) \Delta y/y = A(\Delta x/x); \text{ fazendo o limite,}$$

$$3) \partial y/y = A(\partial x/x); \text{ integrando,}$$

$$4) \ln y = A(\ln x) + C, \text{ que é o mesmo que}$$

$$5) y = Bx^A.$$

A equação 5) exprime uma relação linear de primeiro grau entre os logaritmos das grandezas em questão. Isto significa que grandezas correlacionadas alometricamente, quando representadas em escala bilogarítmica, geram uma reta de coeficiente angular A e intercepto B. De fato, é o que se pode observar para tamanho e densidade de blobs nas diferentes espécies primatas e carnívora (figura 18).

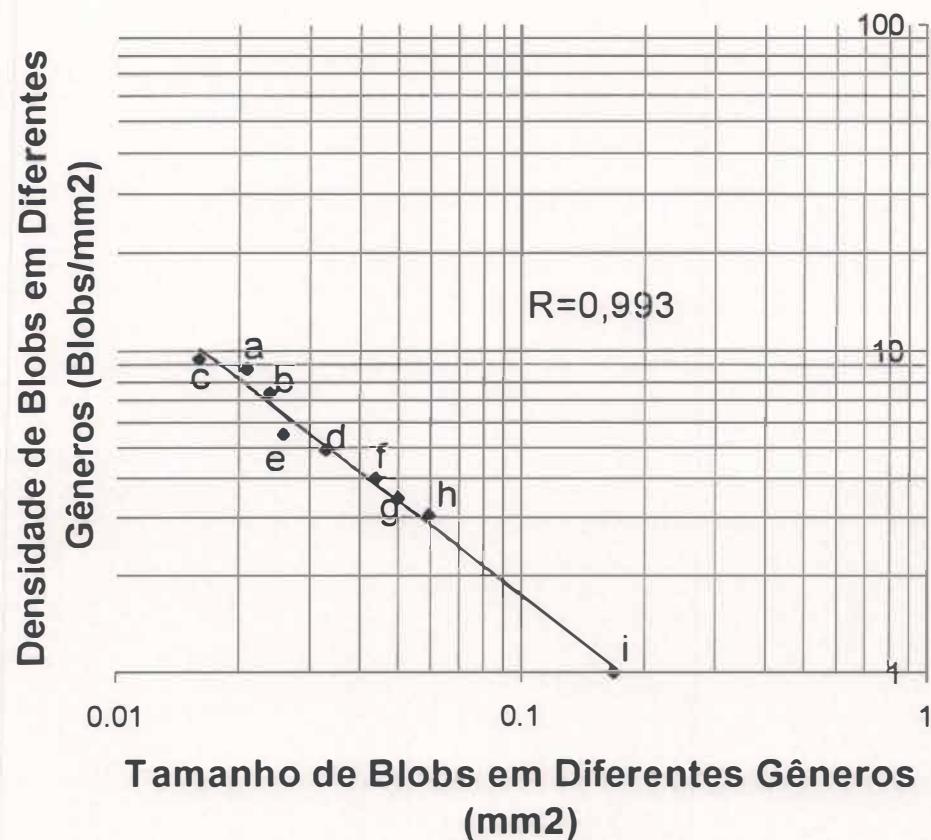


FIGURA 18: Correlação entre valores médios de tamanho (T) e densidade (D) de blobs entre gatos e diversas espécies de primatas, mostrando a relação linear entre os logaritmos de T e D. (a) *Felis/V2*; (b) *Felis/V3*; (c) *Felis/V1*; (d) *Galago/V1* (Condo & Casagrande, 1990); (e) *Callithrix/V1* (Pessoa et al., 1992); (f) *Cebus/V1* (Rosa et al., 1991); (g) *Cebus/V1* (Hess & Edwards, 1987); (h) *Macaca/V1* (Farias et al., 1994); (i) *Homo/V1* (Moura et al., 1990 apud Gattass et al., 1990b).

A equação da reta ajustada ($R=0,993$) aos valores de densidade espacial média de blobs (D) e seu tamanho médio (T) é:

$$D = 0,188113 T^{-0,96606}$$

A interpretação da equação acima revela que, para tamanhos pequenos de blobs, a densidade média de blobs varia muito mais rapidamente que o tamanho médio de blobs (figura 18) O inverso ocorre para valores pequenos de D, nos quais pequenas variações resultam em grande alteração de T. Em termos matemáticos, para ∂t expressando variação entre gêneros, temos que:

- 1) $(\partial D / \partial t) >> (\partial T / \partial t)$ para valores pequenos de T e;
- 2) $(\partial D / \partial t) << (\partial T / \partial t)$ para valores pequenos de D.

As desigualdades podem ser desfeitas se cada membro for multiplicado pelo inverso de sua variável, tomando a forma 1) $(1/D)(\partial D / \partial t) = A(1/T)(\partial T / \partial t) + C$, que como vimos expressa uma relação alométrica.

Relações alométricas descrevem tipicamente o crescimento de duas grandezas biológicas (tamanhos de órgãos, de células, de organelas, de moléculas) de magnitudes diferentes onde as taxas absolutas de variação não são constantes mas a taxa relativa de variação é a mesma para ambas as grandezas. Isto significa que uma das grandezas cresce (ou decresce) mais rapidamente que outra, o que implica a existência de um fator restritivo que as limita diferencialmente.

A extensão de uma área visual ocupada por blobs em relação à extensão total desta área é um índice útil para melhor compreender o significado da relação entre densidade espacial média de blobs (D) e seu tamanho médio (T); tal índice é obtido pelo produto DT. Cotejando os DT de gatos com DT de primatas (figura 19), verificamos que a região ocupada por blobs varia entre 14% e 18% da área total, independentemente do gênero ou da ordem estudada.

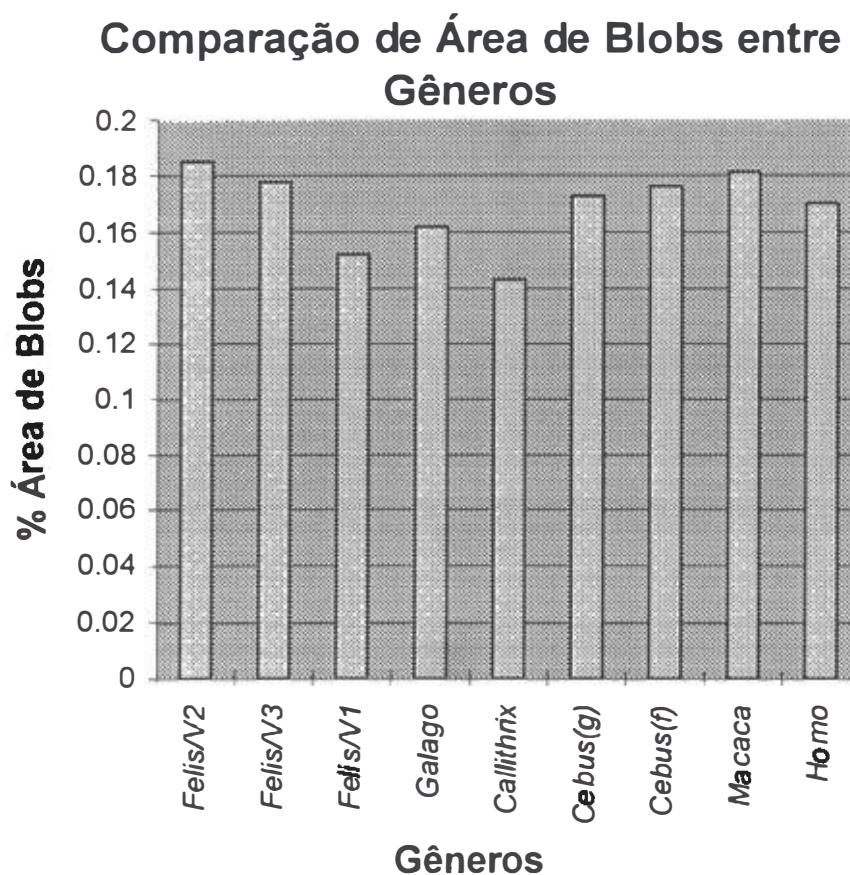


FIGURA 19: Porcentagem da área visual ocupada por blobs em primatas e no gato. *Galago/V1* (Condo & Casagrande, 1990); *Callithrix/V1* (Pessoa *et al.*, 1992); *Cebus(f)/V1* (Rosa *et al.*, 1991); *Cebus(g)/V1* (Hess & Edwards, 1987); *Macaca/V1* (Farias *et al.*, 1994); *Homo/V1* (Moura *et al.*, 1990 apud Gattass *et al.*, 1990b).

Pirlot (1969), a propósito de variações alométricas filogenéticas, comenta que estas tendem a ocorrer em função da manutenção de certas características fundamentais, “d'où une croissance phylogénétique ne peut être harmonieuse sans certaine ajustements compensatoires et complexes” (pp364). Embora o tamanho do blob decresça à medida em que decresce o tamanho da área cortical da área visual dos gêneros estudados, parece haver um limite inferior que restringe tal tendência (figura 20).

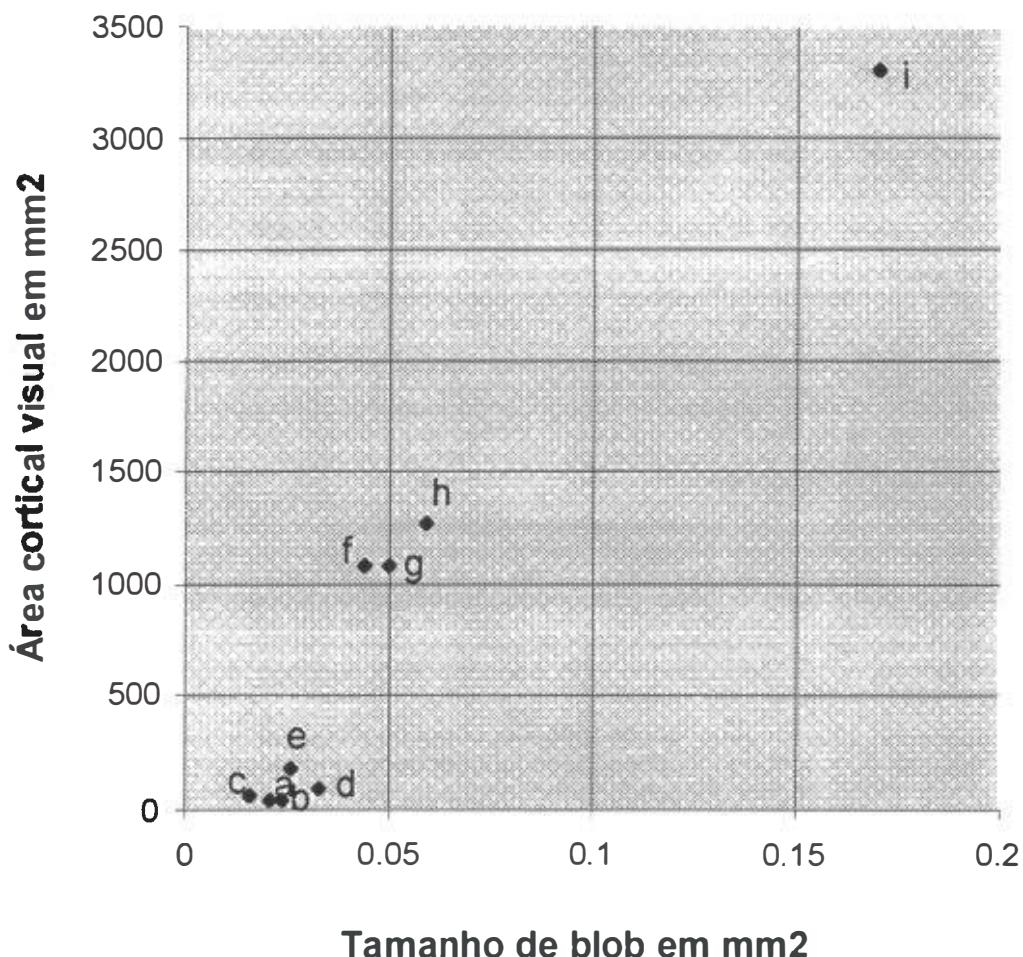


FIGURA 20: Tamanho médio de blobs em relação a tamanho de áreas corticais visuais de gato e primatas. (a) *Felis*/V2; (b) *Felis*/V3; (c) *Felis*/V1; (d) *Galago*/V1 (Condo & Casagrande, 1990); (e) *Callithrix*/V1 (Pessoa *et al.*, 1992); (f) *Cebus*/V1 (Rosa *et al.*, 1991); (g) *Cebus*/V1 (Hess & Edwards, 1987); (h) *Macaca*/V1 (Farias *et al.*, 1994); (i) *Homo*/V1 (Moura *et al.*, 1990 apud Gattass *et al.*, 1990b).

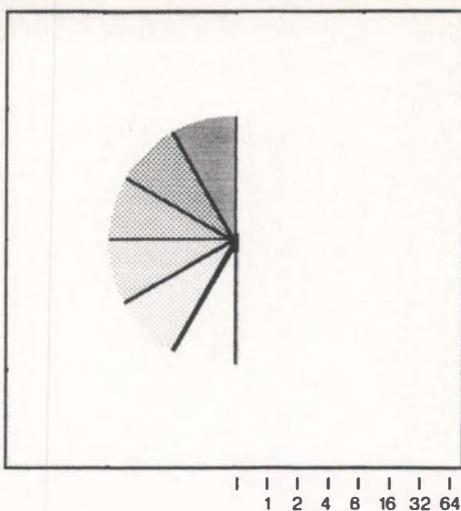
Generalizando o fato de que a densidade neuronal entre áreas corticais visuais de *Macaca* e *Felis* parece variar proporcionalmente à variação dos respectivos tamanhos médios de blobs (Beaulieu & Colonnier, 1983, 1987; Peters *et al.*, 1985), tal limite deve decorrer do requerimento de um número mínimo de neurônios no blob para manutenção da funcionalidade modular, tal como foi sugerido por Gattass e colaboradores (1990b). Isto faz com que a relação D/T deixe de ser isométrica para tornar-se alométrica. Propomos que as restrições morfogenéticas neste caso, os “temas” em torno dos quais ocorrem as “variações”, sejam o *limite inferior do tamanho de blobs* e a *constância da proporção de área cortical visual ocupada por blobs*.

4.3 Sobre a mobilização rápida de citocromo-oxidase em primatas:um fenômeno geral? Revelação de CDO *Cebus*

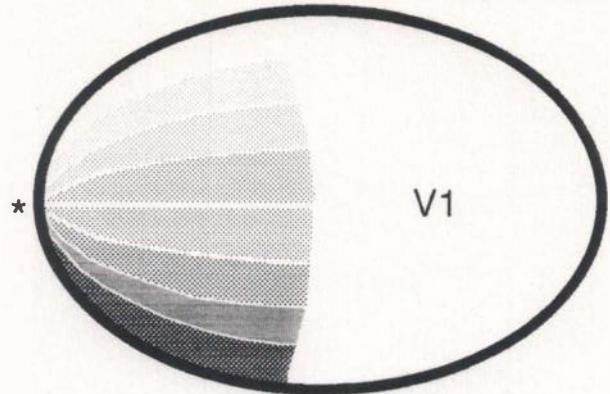
O experimento de estimulação monocular parcial em *Cebus* (caso DO1) revela a existência de alterações densitométricas em regiões estimuladas; o aumento densitométrico mais pronunciado se dá na região do córtex estriado estimulada por 30 minutos, ocorrendo um decréscimo paulatino nos tempos superiores (figuras 12, 13 e 14). Utilizando luz estroboscópica para a estimulação visual monocular parcial de macacos, constatamos a ocorrência de mobilização rápida de citocromo-oxidase revelando CDO na representação cortical correspondente aos 5º a 10º centrais segundo mapa retinotópico publicado por Gattass e colaboradores (1987). A figura 21A representa o estímulo oferecido corrigido pelo fator de magnificação cortical. Assim, o aparecimento das CDO correlacionou-se topograficamente com as regiões do campo visual estimuladas. É possível conceber ao menos três alternativas de cinética da mobilização rápida. A mais simples seria expressa por um sistema linear de mobilização, sem limiar máximo. Neste caso, o resultado esperado é um gradiente crescente de ativação histoquímica (figura 21B). Uma segunda possibilidade seria um sistema cumulativo com limiar onde a atividade de citocromo-oxidase estaria limitada superiormente (figura 21C). Finalmente, uma terceira alternativa consistiria de um sistema com ao menos duas fases opostas. A fase inicial seria de ativação enzimática, seguida de uma fase de desativação ou extinção (figuras 21D,E). Nossos resultados (figura 15A) parecem se adequar a este último modelo, posto que o pico de atividade não se encontra na região topograficamente

correspondente ao estímulo de sessenta minutos (figura 2). Além disso, o gradiente temporal de estimulação não resultou em um gradiente equivalente de coloração; ao contrário, existe um bordo nítido entre 15 e 30 minutos de estimulação (figuras 2 e 15A), o que tomado em conjunto com o resultado do DO1 indica que o fenômeno seja fásico. Todavia, uma vez que os animais não foram paralisados, pode-se supor que os resultados encontrados se devam a uma rotação do olho estimulado (figura 21F), de modo a retirar o estímulo mais longo (60 minutos) da vizinhança do meridiano vertical. Portanto, a confirmação do caráter binário ou fásico da ativação rápida de citocromo-oxidase depende de experimentos com a estimulação em intervalos menores na faixa de tempo entre 15 e 30 minutos. Informações precisas que elucidem o curso temporal das alterações agudas dos níveis de citocromo-oxidase podem fornecer pistas relevantes para a postulação de seus mecanismos.

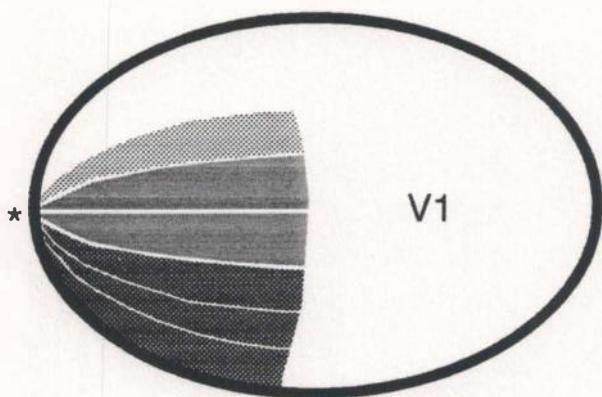
A Tela Proporcional ao FMC



B Resultado Esperado para um Sistema Linear



C Resultado Esperado para um Sistema Cumulativo com Limiar



D Resultado Esperado para um Sistema Fásico com Dois Componentes

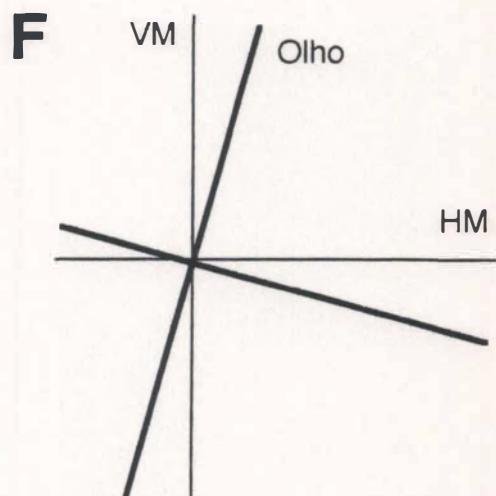
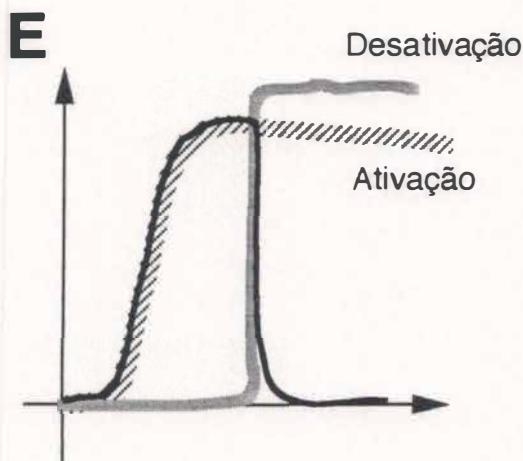
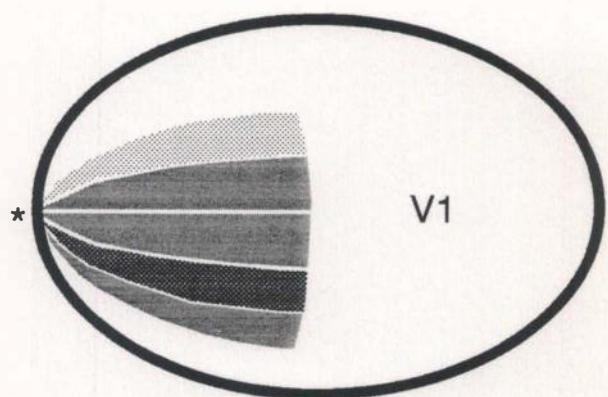


FIGURA 21: PROPOSTAS EXPLICATIVAS PARA OS RESULTADOS OBTIDOS APÓS ESTIMULAÇÃO PARCIAL DO CÓREX VISUAL DO CASO DO3 EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO ESTÍMULO. Vide texto.

O aparecimento de um padrão colunar infragranular demanda alguma discussão, uma vez que as CDO evidenciadas por deprivação monocular e histoquímica de citocromo-oxidase se restringem à camada IV, a despeito da existência de neurônios com resposta à estimulação monocular nas camadas supra e infragranulares (Hubel & Wiesel, 1968, Rosa *et al.*, 1992). O padrão colunar infragranular aqui descrito pode decorrer da mobilização de citocromo-oxidase em neurônios infragranulares monoculares, em neurônios infragranulares conectados intrinsecamente a neurônios da camada IV, ou ainda em fibras aferentes provenientes do GLd que atravessam as camadas V e VI com destino à camada IV. Nossos experimentos não permitem avançar além de suposições a este respeito.

Não chega a ser surpreendente que neurônios de gatos e macacos compartilhem a capacidade de mobilizar citocromo-oxidase rapidamente em resposta a estimulação sensorial. Conforme mencionado no item 1.4, a conservação evolutiva das subunidades mitocondriais é alta. Por outro lado, as subunidades nucleares não variam em número entre mamíferos, além de possuírem homologias importantes entre sequências de aminoácidos (Bibb *et al.*, 1981; Anderson *et al.*, 1982; Parimoo *et al.*, 1984; Ruvolo *et al.*, 1991; Adkins & Honeycutt, 1991; Volloch *et al.*, 1991).

Da mesma forma, a observação dessas alterações em módulos corticais diferentes (blobs e CDO) também era esperada, uma vez que estas se baseiam num mesmo princípio. Com efeito, resultados não apresentados nesta tese mostram, por estimulação aguda, a revelação de CDO em gatos. Já em *Cebus*, verificamos alterações nos padrões de blobs após estimulação monocular, com o aparecimento de fileiras ('rows') de blobs

características de animais submetidos a enucleação monocular. Nos mesmos animais existem sugestões de módulos de binocularidade nas faixas finas de V2, conforme sugerido por Gattass e colaboradores (1990a).

A mobilização rápida de citocromo-oxidase, em se confirmando um fenômeno geral, pode se constituir a base de um método rápido, eficiente, de baixo custo e independente de auto-radiografia para a investigação morfológica de módulos sensoriais. Neste sentido, projeto em colaboração com Antônio Pereira Júnior e Dra. Eliane Volchan está em curso, a fim de verificar os efeitos da estimulação visual aguda nos padrões de citocromo-oxidase do córtex de gambá (*Didelphis marsupialis aurita*).

4.4 Possíveis mecanismos de mobilização rápida de citocromo-oxidase.

A verificação, nesta tese, da mobilização rápida de citocromo-oxidase no tecido cortical por estimulação visual talvez provoque mais perguntas que respostas. Entre as questões colocadas, algumas das mais inquietantes se referem aos mecanismos bioquímicos responsáveis pelo fenômeno da mobilização rápida. Como exatamente é possível aumentar, no curto espaço de tempo de 45 minutos, os níveis de atividade da citocromo-oxidase? Que eventos moleculares regulam estes níveis?

Não é objetivo desta tese oferecer respostas experimentais a tais indagações. Pretendo, contudo, discutir algumas hipóteses não excludentes entre si que, submetidas a testes, podem vir a explicar a mobilização rápida de citocromo-oxidase. Pretendo, ainda, propor estratégias para abordar cada uma destas hipóteses.

- **Hipótese I: a mobilização rápida de citocromo-oxidase se dá por ativação imediata de um ou mais dos genes das suas subunidades.**

A contínua capacidade de modificação do sistema nervoso em resposta a estímulos externos parece ser um aspecto fundamental de sua função (Berry *et al.*, 1980; Cotman & Nieto-Sampedro, 1984; Purves *et al.*, 1987). Neste sentido, entre os diversos aspectos moleculares considerados recentemente, grande atenção tem sido depositada num grupo de genes denominados primários ou imediatos. A principal característica comum aos genes imediatos (GI's) é o não requerimento de síntese protéica *de novo* para sua indução. Tais

genes são capazes de responder direta, rápida e transitoriamente a sinais como despolarização de membranas, fatores de crescimento e soro (Bartel *et al.*, 1989; Ginty *et al.*, 1992; Morgan & Curran, 1989; Sheng & Greenberg, 1990).

Vários GI's determinam produtos que desempenham funções regulatórias (McMahon e Monroe 1992). Entre estes encontram-se aqueles que codificam proteínas "DNA-binding" de várias classes (Miller *et al.*, 1985; Milbrandt 1987; Gibson *et al.*, 1988; Landschultz *et al.*, 1988; Milbrandt, 1988; Christy & Nathans, 1989; Vinson *et al.*, 1989; Lemaire *et al.*, 1990; Crosby *et al.*, 1991; McMahon & Monroe, 1992), que provavelmente coordenam a expressão de outros genes, chamados secundários ou funcionais. A ativação desta hierarquia gênica pode ser um fator crucial para a deflagração de um programa molecular capaz de gerar mudanças morfológicas e fisiológicas nas células, tais como alterações de tamanho, forma, tipos de canais iônicos expressos, perfil de neurotransmissores etc (Goelet *et al.*, 1986; Nishikura & Murray, 1987; Sheng & Greenberg, 1990; Kovary & Bravo, 1991).

Acredita-se atualmente que respostas celulares a estímulos externos consistem de uma cascata de sinais que envolvem em geral 1) interação de receptores de membrana ou citoplasmáticos com o sinal primário; 2) geração de um segundo mensageiro por modificações bioquímicas rápidas; 3) indução de GI's; 4) regulação da expressão de genes secundários pelos produtos protéicos de GI's e; 5) resposta celular (fenotípica) causada pelas proteínas codificadas por genes secundários. Os GI's seriam portanto responsáveis pelo acoplamento entre as respostas bioquímicas citoplasmáticas, de curto prazo, e as respostas gênicas tecido- ou estímulo-específicas, de longo prazo (McMahon & Monroe,

1992). Alguns GI's, entretanto, codificam proteínas que possuem função estrutural dentro da célula, como actina e miosina (Greenberg *et al.*, 1986).

Vários estudos recentes demonstram a regulação por estímulo sensorial de fatores de transcrição codificados por GI's no sistema nervoso central de aves e mamíferos (Hunt *et al.*, 1987; Dragunow & Robertson 1987; Sagar *et al.*, 1988; Rusak et al., 1990; Sagar & Sharp, 1990; Bullit, 1990; Anokhin *et al.*, 1991; Rose, 1991; Mello *et al.* 1992).

Worley *et al.* (1991) verificaram que a expressão constitutiva do fator de transcrição *zif268* no córtex visual de ratos é diminuída 30 minutos após injeção monocular de tetrodotoxina, sendo abolida após duas horas no hemisfério contralateral. A adaptação ao escuro por vários dias também reduz consideravelmente a expressão do *zif268*, que retorna ao normal após 30 minutos de exposição à luz. Duas horas de experiência visual monocular, após adaptação de 24 horas ao escuro, são suficientes para revelar CDOs no córtex visual de macacos por imunohistoquímica anti-*zif268* (Chauduri & Cynader, 1993). Rosen e colaboradores (1992) demonstram, em gatos mantidos desde o nascimento no escuro, que 60 minutos de exposição à luz são capazes de induzir transientemente a expressão dos genes imediatos *c-fos*, *egr1* e *junB* no córtex visual mas não no córtex frontal. Pesquisando a área 17 de gatos estimulados visualmente por uma a duas horas, Beaver e colaboradores (1992) encontraram um padrão periódico de expressão supragranular de *c-fos* formando manchas semelhantes a blobs.

Conforme mencionado anteriormente, Luciakova e colaboradores (1992) mostram a indução rápida e transitória, por estímulo trófico, do gene da subunidade I da citocromo-oxidase. Com base na literatura, é concebível que a estimulação visual de 45 minutos

cause a indução imediata deste e de outros genes que codificam subunidades da citocromo-oxidase. Um efeito imediato na regulação gênica da enzima poderia resultar tanto em maior quantidade de moléculas presentes nas mitocôndrias quanto na alteração do perfil das isoformas constituintes das proteínas integrais, gerando moléculas de citocromo-oxidase cineticamente mais ativas. Uma vez que o “turnover” protéico no interior de mitocôndrias parece ser bastante rápido (Deshaines *et al.*, 1988), é razoável admitir efeitos precoces das alterações postuladas. A hipótese acima apresentada parece ser mais provável e econômica que a suposição de um aumento da biogênese mitocondrial, causando a replicação acelerada destas organelas. Esta possibilidade não pode ser, entretanto, descartada. Experimentos de remoção da cóclea em pintos (Hyde & Durham, 1994) resultam em aumento marcante da proliferação mitocondrial de neurônios do núcleo magnocelular contralateral à deafferentação. Seis horas após a cirurgia o número de mitocôndrias chega a cerca de 153% do controle.

Um primeiro passo para testar a relação entre regulação gênica e mobilização rápida de citocromo-oxidase consiste em verificar se o fenômeno se mantém sob inibição da síntese protéica. Os antibióticos anisomicina e cloramfenicol podem ser usados para este propósito, inibindo respectivamente as sínteses protéicas nuclear e mitocondrial quando injetados sistemicamente (Sande & Mandell, 1990 apud Hyde & Durham, 1994). Caso os tratamentos afetem a mobilização de citocromo-oxidase, deve-se proceder a ensaios de hibridização com sondas marcadas complementares aos mRNAs das diversas subunidades e seus subtipos, tanto após fracionamento de mRNA total em gel de agarose (“northern blot”) quanto *in situ*. O desenho dos oligonucleotídeos a serem utilizados como

sondas deve se basear nas sequências conhecidas de genes de subunidades mitocondriais (Bibb *et al.*, 1981; Anderson *et al.*, 1982; Ruvolo *et al.*, 1991; Adkins & Honeycutt, 1991; Volloch *et al.*, 1991) e nucleares (Parimoo *et al.*, 1984). Estudos de microscopia eletrônica podem ajudar a explorar a hipótese da multiplicação mitocondrial acelerada.

- **Hipótese II: a mobilização rápida de citocromo-oxidase se deve ao aumento da atividade da enzima por queda nos níveis de ATP intramitocondrial.**

O cérebro de mamíferos depende quase que totalmente do aporte externo de glicose para produzir energia (Sokoloff, 1977), sendo desprezível a participação de corpos cetônicos, ácidos graxos (Siesjö, 1978 apud Silver & Erecinska, 1994) e glicogênio (Watanabe & Passonneau, 1973; Sagar *et al.*, 1987). O transporte de glicose através da barreira hemato-encefálica e da membrana plasmática é facilitado (Crone, 1965). Não obstante, atualmente se admite que a glicólise aeróbica no cérebro pode ser limitada tanto por transporte quanto por fosforilação intracelular (Robinson & Rapoport, 1986; Furler *et al.*, 1991). Monitorando concentrações extracelulares de glicose através de microeletródios substrato-específicos em diferentes condições de glicemia sanguínea, Silver & Erecinska (1994) demonstram que os níveis de glicose extracelular, quando perturbados, chegam a tardar 15 minutos para retornar aos valores normais.

Assim, é possível formular a hipótese de que ocorra, durante a estimulação visual, um desequilíbrio temporário entre o consumo elevado de ATP e a captação e fosforilação de glicose pelos neurônios. A elevação do consumo de ATP seria produto da ativação de $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPases, aceleração da formação de vesículas sinápticas, síntese aumentada de neurotransmissores etc, em função do considerável aumento da frequência de disparos das células de blobs durante a estimulação visual. Se de fato tal modulação da homeostase ocorrer, mesmo pequenas quedas dos níveis de ATP intracelular devem ter efeitos sensíveis sobre a cinética da cadeia respiratória (Hüther & Kadenbach 1986, Bisson *et al.*,

1987). Transcorrido algum tempo, a atividade aumentada de citocromo-oxidase deveria repor os níveis fisiológicos de ATP intramitocondrial, gerando um fenômeno uni- ou multimodal. Nossos resultados mostram um pico de mobilização enzimática entre 30 e 45 minutos de estimulação, e dados preliminares não relatados aqui sugerem o retorno aos níveis basais de citocromo-oxidase após 75 minutos, o que se coaduna com a previsão teórica em questão.

A abordagem experimental da hipótese descrita acima pode se iniciar pela observação de possíveis alterações da cinética da mobilização rápida de citocromo-oxidase em condições de depleção ou excesso de glicose na circulação, respectivamente obtidas por jejum prolongado do animal e por injeção endovenosa de soro glicosado. As condições hiper e hipoglicêmicas podem ser provocadas ainda por injeção endovenosa de glucagon e insulina. A injeção de análogos não-metabolizáveis de glicose, como a 2-deoxiglicose, também pode fornecer pistas importantes para desvendar o envolvimento de ATP na mobilização rápida de citocromo-oxidase. Um grau mais profundo de investigação seria alcançado se fossem feitos experimentos com análogos lipossolúveis de ATP.

- **Hipótese III: a mobilização rápida de citocromo-oxidase se deve à migração de mitocôndrias para terminais de (ou anexos a) regiões estimuladas.**

A exportação de organelas sintetizadas no corpo celular para axônios e terminais dendríticos depende essencialmente de transporte anterógrado rápido, realizado sobre trilhos de microtúbulos de forma saltatória (Shnapp *et al.*, 1986, Azhderian *et al.*, 1994). Em neurônios de mamíferos, a velocidade de transporte de mitocôndrias excede 16mm/hora (Schwartz, 1991). Considerando que tal transporte está diretamente correlacionado com a demanda metabólica (Hevner & Wong-Riley 1990; Hevner & Wong-Riley 1991), é razoável especular que os padrões de blobs e CDO observados após estimulação visual aguda se devam a um rearranjo da distribuição mitocondrial nas células integrantes de tais módulos ou nos terminais adjacentes a eles.

A possibilidade de mobilização rápida de citocromo-oxidase nas aferências do GLd (figura 15E), revelando padrões colunares supostamente gerados pela segregação binocular destas projeções, se coaduna com a hipótese acima. Esta pode ser testada pela observação da eventual diminuição da mobilização rápida de citocromo-oxidase em animais tratados com drogas anti-microtúbulos, como colchicina, podofilotoxina e vimblastina; tais tratamentos causam a interrupção do transporte anterógrado de organelas pela destruição da estrutura quaternária dos microtúbulos (Luduena *et al.*, 1986). Em contraposição, experimentos realizados em animais submetidos a dieta parcial de água pesada (D_2O) devem resultar na aceleração da mobilização de citocromo-oxidase, uma vez que a substituição das pontes de hidrogênio por pontes de deutério estabiliza a estrutura

quaternária de proteínas, em geral, e de microtúbulos, em particular (Gross & Spindel, 1960; Inoué *et al.*, 1965). Além da histoquímica para citocromo-oxidase e de controles histológicos usuais, os experimentos devem incluir colorações histológicas específicas para mitocôndrias, como os métodos de Altmann e de Cowdry (Romeis, 1924). Observações ao microscópio eletrônico são necessárias para localizar e quantificar mitocôndrias no interior das células.

CONCLUSÕES

- 1) A citocromo-oxidase de neurônios do córtex visual de gatos e macacos pode ser mobilizada rapidamente (30 a 45 minutos) em resposta a um estímulo visual imediatamente anterior ao sacrifício. A elevação dos níveis de atividade guarda relações topográficas com a região do campo visual onde foi apresentado o estímulo, e tem um caráter bifásico, que pode ser devido à soma de dois componentes: um de acumulação e um outro de extinção.
- 2) A histoquímica convencional de citocromo-oxidase, quando precedida de estimulação visual, pode ser utilizada como método de mapeamento metabólico agudo. Este procedimento permitiu a visualização, nesta tese, de CDO em *Cebus* e de blobs em gatos.
- 3) Observamos blobs em V1, V2 e V3 de gatos com estimulação total do campo visual. Os blobs variam em tamanho entre as áreas, tendendo a aumentar de V1 para V2 e de V2 para V3. Os blobs de gatos são menores que os blobs observados em primatas, e se apresentam com maior densidade espacial.
- 4) Observamos CDO nas camadas IV, V e VI do córtex estriado de *Cebus* submetidos a estimulação visual monocular aguda.
- 5) O fenômeno de mobilização rápida de citocromo-oxidase pode provir da ativação imediata de um ou mais genes que codificam suas subunidades, de interações alostéricas com ATP ou da redistribuição local de mitocôndrias.

BIBLIOGRAFIA*

- ADAMS, J.C. (1981) Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. *J. Histochem. Cytochem.* v. 29, p. 775.
- ADKINS, R.M.; Honeycutt, R.L. (1991) Molecular phylogeny of the superorder Archonta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 88, p. 10317-10321.
- ADLER, R.O. (1904) *Biol. Z.* v. 1, p. 59.
- ALLMAN, J.; ZUCKER, S. (1990) Cytochrome oxidase and functional coding in primate striate cortex: a hypothesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* v. 55, p. 979-982.
- ALLMAN, J. (1977) Evolution of the visual system in the early primates. *Prog. Psychobiol. Physiol. Psychol.* v. 7, p. 1-53.
- ALMANN, J.; MCGUINNESS, E. (1988) Visual cortex in primates. *Comp. Primate Biol.* v. 4, p. 279-326.
- ANDERSON, P.A.; OLAVARRIA, J.; VAN SLUYTERS, R.C. (1988) The overall pattern of ocular dominance bands in cat visual cortex. *J. Neurosci.* v. 8, p. 2183-2200.
- ANDERSON, S.; DE BRUIJN, M.H.L.; COULSON, A.R.; EPERON, I.C.; SANGER, F.; YOUNG, I.G. (1982) Complete sequence of bovine mitochondrial DNA: conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* v. 156, p. 683-717.

* As referências bibliográficas estão apresentadas segundo as regras da ABNT. NBR 6023. Referências Bibliográficas, de agosto de 1989.

ANOKHIN, K.V.; MILEUSNIC, R.; SHAMAKHINA, I.; ROSE, S.P.R. (1991) Effects of early experience on c-fos gene expression in the chick forebrain. **Brain Res.**, v. 544, p. 101-107.

ASSON-BATRES, M.A.; HARE, J.F. (1991) Effect of oxygen on the synthesis and assembly of mitochondrial encoded subunits of cytochrome oxidase and cytochrome bc₁ in mouse embryo fibroblasts. **J. Biol. Chem.** v. 266, p. 9932-9938.

AZHDERIAN, E.M.; HEFNER, D.; LIN, C-H.; KACZMAREK, L.K.; FORSCHER, P. (1994) Cyclic AMP modulates fast axonal transport in aplysia bag cell neurons by increasing the probability of single organelle movement. **Neuron**. v. 12, p. 1223-1233.

BARTEL, D.P.; SHENG, M.; LAU, L.F.; GREENBERG, M.E. (1989) Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. **Genes Dev.** v. 3, p. 304-313.

BARTFELD, E.; GRINVALD, A. (1992) Relationships between orientation-preference pinwheels, cytochrome-oxidase blobs, and ocular-dominance columns in primate striate cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 89, p. 11905-11909.

BEAULIEU, C.; COLONNIER, M. (1983) The number of neurons in the different laminae of the binocular and monocular regions of area 17 in the cat. **J. Comp. Neurol.** v. 217, p. 337-344.

BEAVER, C.; MURPHY, K.M.; MITCHELL, D.E. (1992) Patchy expression of *c-fos* in area 17 of kittens. **Soc. Neurosci. Abstr.** v. 18, p. 1307.

- BERRY, M.P.; MCCONNELL, P.; SIEVERS, J. (1980) Dendritic growth and the control of neuronal form. *Curr. Top. in Dev. Biol.* v. 15, p. 67-101.
- BIBB, M.J.; VAN ETEN, R.A.; WRIGHT, C.T.; WALBERG, M.W.; CLAYTON, D.A. (1981) Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*. v. 26, p. 167-180.
- BISSON, R.; SCHIAVO, G.; MONTECUCCO, C. (1987) ATP induces conformational changes in mitochondrial cytochrome c oxidase: effect on the cytochrome c binding site. *J. Biol. Chem.*. v. 262, p. 5992-5998.
- BLASDEL, G.G. (1992) Orientation selectivity, preference, and continuity in monkey striate cortex. *J. Neurosci.*. v. 12, p. 3139-3161.
- BLASDEL, G.G.; SALAMA, G. (1986) Voltage-sensitive dyes reveal a modular organization in monkey striate cortex. *Nature*. v. 321, p. 579-585.
- BONHOEFFER, T.; GRINVALD, A. (1991) Iso-orientations domains in cat visual cortex are arranged in pinwheel-like patterns. *Nature*. v. 353, p. 429-431.
- BOYD, J.; MATSUBARA, J. (1994) Tangential organization of callosal connectivity in the cat's visual cortex. *J. Comp. Neurol.* v. 347, p. 197-210.
- BRODMANN, K. (1905) Beiträge zur histologischen lokalisierung der grosshirnrinde. Dritte mitteilung: die rindenfelder der niederen affen. *J. Psychol. Neurol. Lpz.* v. 4, p. 177-226.
- BULLIT, E. (1990) Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* v. 296, p. 517-530.

- CABRAL, F.; SOLIOZ, M.; RUDIN, Y.; SCHATZ, G.; CLAVILIER, L.; SLONIMSKI, P.P. (1978) Identification of the structural gene for yeast cytochrome c oxidase subunit II on mitochondrial DNA. **J. Biol. Chem.** v. 253, p. 297-304.
- CAMPBELL, C.B.G.; HODOS, W. (1970) The concept of homology and the evolution of the nervous system. **Brain Behav. Evol.** v. 3, p. 353-367.
- CARROLL, E.W.; WONG-RILEY, M.T.T. (1984) Quantitative light and electron microscopic analysis of cytochrome oxidase-rich zones in the striate cortex of the squirrel monkey. **J. Comp. Neurol.**, v. 222, p. 1-17.
- CASAGRANDE, V.A. (1994) A third parallel visual pathway to primate area V1. **TINS**. v. 17, p. 305-310.
- CASAGRANDE, V.A.; CONDO, G.J. (1988) The effect of altered neuronal activity on the development of layers in the lateral geniculate nucleus. **J. Neurosci.** v. 8, p. 395-416.
- CELIO, M.R.; SCHÄRER, L.; MORRISON, J.H.; NORMAN, A.W.; BLOOM, F.E. (1986) Calbindin immunoreactivity alternates with cytochrome c-oxidase-rich zones in some layers of the primate visual cortex. **Nature**. v. 323, p. 715-717.
- CHAUDHURI, A.; CYNADER, M.S. (1993) Activity-dependent expression of the transcription factor Zif268 reveals ocular dominance columns in monkey visual cortex. **Brain Res.** v. 605, p. 349-353.
- CHRISTY, B.; NATHANS, D. (1989) DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 86, p. 8737-8741.

- CONDO, G.J.; CASAGRANDE, V.A. (1990) Organization of cytochrome oxidase staining in the visual cortex of nocturnal primates (*Galago crassicaudatus* and *Galago senegalensis*): adult patterns. **J. Comp. Neurol.** v. 293, p. 632-645.
- COTMAN, C.W.; NIETO-SAMPEDRO, M. (1984) Cell biology of synaptic plasticity. **Science**. v. 225, p. 1287-1294.
- CRESHO, H.S.; RASCO, L.M.; ROSE, G.H.; CONDO, G.J. (1992) Blob-like pattern of cytochrome oxidase staining in ferret visual cortex. **Soc. Neurosci. Abstr.** v. 18, p. 298.
- CRONE, C. (1965) Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue. **J. Physiol. (Lond)**. v. 181, p. 103-113.
- CROSBY, S.D.; PUETZ, J.J.; SIMBURGER, K.S.; FAHRNER, T.J.; MILBRANDT, J. (1991) The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCAGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. **Mol. Cell. Biol.** v. 11, p. 3835-3841.
- CYNADER, M.; TIMNEY, B.N.; MITCHELL, D.E. (1980) Period of susceptibility of kitten visual cortex to the effects of monocular deprivation extends beyond six months of age. **Brain Res.** v. 91, p. 545-550.
- DA FRANCA, J.G. (1993) NADPH-diaforase no córtex visual do macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*): atividade histoquímica nas áreas 17 e 18. Tese de mestrado submetida ao IBCCF^º, UFRJ.

- DESHAIES, R.J.; KOCH, B.D.; WERNER-WASHBURNE, M.; CRAIG, E.A.; SCHEKMAN, R. (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. **Nature**. v. 332, p. 800-805.
- DE YOE, E.A.; VAN ESSEN, D.C. (1988) Concurrent processing streams in monkey visual cortex. **TINS**. v. 5, p. 219-226.
- DICK, R.H.; CYNADER, M.S. (1993) An interdigitated columnar mosaic of cytochrome oxidase, zinc, and neurotransmitter-related molecules in cat and monkey visual cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 90, p. 9066-9069.
- DRAGUNOW, M; ROBERTSON, HA (1987) Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. **Nature**. v. 329, p. 441-442.
- EBNER, E.; MENNUCCI, L.; SCHATZ, G. (1973) Mitochondrial assembly in respiration-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: effect of nuclear mutations on mitochondrial protein synthesis. **J. Biol. Chem.**. v. 248, p. 5360-5368.
- EILERS, M.; SCHATZ, G. (1986) Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. **Nature**. v. 322, p. 228-232.
- EISENBERG, J.F. (1981) The mammalian radiations: an analysis of trends in evolution, adaptation and behavior, University of Chicago Press, Chicago.
- FARIAS, M.; FIORANI JR., M.; THEME, V.R.; GATTASS, R.; PIÑON, M.C.G. (1994) Distribution of cytochrome oxidase-rich patches in the primary visual cortex of macaque monkeys. Resumo apresentado à IX Reunião anual da Fed. Soc. Biol. Exp. (FESBE), p. 207.

- FLORENCE, S.L.; KAAS, J.H. (1992) Ocular dominance columns in area 17 of Old World macaque and talapoin monkeys: complete reconstructions and quantitative analyses. *Vis. Neurosci.* v. 8, p. 449-462.
- FURLER, S.M.; JENKINS, A.B.; STORLIEN, L.H.; KRAEGEN, E.W. (1991) *In vivo* location of the rate-limiting step of hexose uptake in muscle and brain tissue of rats. *Am. J. Physiol.* v. 261, p. E337-E347.
- GATTASS, R.; GROSS, C.G. (1981) Visual topography of the striate projection zone in the posterior superior temporal sulcus (MT) of the macaque. *J. Neurophysiol.* v. 46, p. 621-638.
- GATTASS, R.; ROSA, M.G.P.; SOUSA, A.P.B.; PIÑON, M.C.G.; FIORANI JR., M.; NEUENSCHWANDER, S. (1990a) Cortical streams of visual information processing in primates. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 23, p. 375-393.
- GATTASS, R.; ROSA, M.G.P.; SOUSA, A.P.B.; PIÑON, M.C.G.; FIORANI JR., M.; NEUENSCHWANDER, S.T.; MOURA, M.M.; ABRAHÃO, J.C.H.; SARAIVA, P.E.S. (1990b) Visual topography and modular organization of cortical areas in primates. In: IWAI E. e MISHKIN M. (ed) **Vision, Memory and the Temporal Lobe**. Nova Iorque, Amsterdam, Londres: Elsevier, p. 355-367.
- GATTASS, R.; SOUSA, A.P.B.; ROSA, M.G.P. (1987) Visual topography of V1 in the *Cebus* monkey. *J. Comp. Neurol.* v. 259, p. 529-548.
- GIBSON, T.J.; POSTMA, J.P.; BROWN, R.S.; ARGOS, P. (1988) A model for the tertiary structure of the 28 residue DNA-binding motif ('zinc-finger') common to many eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Protein Eng.* v. 2, p. 209-218.

- GINTY, D.D.; BADING, H.; GREENBERG, M.E. (1992) Trans-synaptic regulation of gene expression. **Curr. Opinion in Neurobiol.** v. 2, p. 312-316.
- GOELET, P.; CASTELUCCI, V.; SCHACHER, S.; KANDEL, E. (1986) The long and the short of long-term memory - a molecular framework. **Nature.** v. 332, p. 419-422.
- GOLDMAN, P.S.; NAUTA, W.J.H. (1977) Columnar distribution of cortico-cortical fibers in the frontal association, limbic, and motor cortex of the developing *Rhesus* monkey. **Brain Res.** v. 122, p. 393-413.
- GOULD, S.J. (1977) A metric for dissociation. In: GOULD S.J. (ed), **Ontogeny and Phylogeny**. Cambridge Londres: The Belknap Press of The Harvard University Press, p. 238-244.
- GRAHAM, R.C.; KARNOVSKY, M.J. (1966) The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. **J. Histochem. Cytochem.** v. 14, p. 291-302.
- GREENBERG, M.E.; ZIFF, E.B.; GREENE, L.A. (1986) Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. **Science.** v. 234, p. 80-83.
- GRINVALD, A.; LIEKE, E.; FROSTIG, R.D.; GILBERT, C.D.; WIESEL T.N. (1986) Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. **Nature.** v. 324, p. 361-364.
- GROOT, G.S.P.; POYTON, R.O. (1975) Oxygen control of cytochrome c oxidase synthesis in isolated mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature.** v. 255, p. 238-240.

GROOT, G.S.P.; ROUSLIN, W.; SCHATZ, G. (1972) Promitochondria of anaerobically grown yeast: effect of oxygen on promitochondrial protein synthesis. **J. Biol. Chem.**. v. 247, p. 1735-1742.

GROSS, P.R.; SPINDEL, W. (1960) Mitotic arrest by deuterium oxide. **Science**. v. 131, p. 37-39.

HASELTINE, E.C.; DEBRUYN, E.J.; CASAGRANDE, V.A. (1979) Demonstration of ocular dominance columns in Nissl-stained sections of monkeys visual cortex following enucleation. **Brain Res.** v. 176, p. 153-158.

HAYASHI, K.; KENYON, K.R. (1988) Increased cytochrome oxidase activity in alkali-burned corneas. **Curr. Eye Res.** v. 7, p. 131-137.

HENDRICKSON, A.E.; HUNT, S.P.; WU, J.Y. (1981) Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxilase in monkey striate cortex. **Nature**. v. 292, p. 605-607.

HENDRICKSON, A.E.; TIGGES, M. (1985) Enucleation demonstrates ocular dominance columns in Old World macaque but not in New World squirrel monkey visual cortex. **Brain Res.** v. 333, p. 340-344.

HENDRICKSON, A.E.; WILSON, J.R.; OGREN, M.P. (1978) The neuroanatomical organization of pathways between the dorsal geniculate nucleus and the visual cortex in Old World and New World primates. **J. Comp. Neurol.** v. 182, p. 123-136.

HENDRY, S.H.C.; JONES, E.G. (1986) Reduction in number of immunostained GABAergic neurons in deprived-eye dominance columns of monkey area 17. **Nature**. v. 320, p. 750-753.

- HENDRY, S.H.C.; JONES, E.G.; BURSTEIN, N. (1988) Activity-dependent regulation of tachykinin-like immunoreactivity in neurons of monkey visual cortex. *J. Neurosci.* v. 8, p. 1225-1238.
- HESS, D.T.; EDWARDS, M.A. (1987) Anatomical demonstration of ocular segregation in the retinogeniculocortical pathway of the New World capuchin monkey (*Cebus apella*). *J. Comp. Neurol.* v. 264, p. 409-420.
- HEVNER, R.F.; WONG-RILEY, M.T.T. (1990) Regulation of cytochrome oxidase protein levels by functional activity in the macaque monkey visual system. *J. Neurosci.* v. 10, p. 1331-1340.
- HEVNER, R.F.; WONG-RILEY, M.T.T. (1991) Neuronal expression of nuclear and mitochondrial genes for cytochrome oxidase (CO) subunits analyzed by *in situ* hybridization: comparison with CO activity and protein. *J. Neurosci.* v. 11, p. 1942-1958.
- HITCHCOCK, P.F.; HICKEY, T.L. (1980) Ocular dominance columns: evidence for their presence in humans. *Brain Res.* v. 182, p. 176-179.
- HOOD, D.A. (1990) Co-ordinate expression of cytochrome c oxidase subunit III and IVc mRNAs in rat tissues. *Biochem. J.* v. 269, p. 503-506.
- HORTON, J.C. (1984) Cytochrome oxidase patches: a new cytoarchitectonic feature of monkey cortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (B)*. v. 304, p. 199-253.
- HORTON, J.C.; HEDLEY-WHYTE, T. (1984) Mapping of cytochrome oxidase patches and ocular dominance columns in human visual cortex. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. (B)*. v. 304, p. 255-272.

- HORTON, J.C.; HUBEL, D.H. (1981) Regular patchy distribution of cytochrome oxidase staining in primate visual cortex of macaque monkey. **Nature**. v. 292, p. 762-764.
- HUBEL, D.H.; WIESEL, T.N. (1959) Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. **J. Physiol. (Lond.)**. v. 148, p. 574-591.
- HUBEL, D.H.; WIESEL, T.N. (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. **J. Physiol. (Lond.)**. v. 160, p. 106-154.
- HUBEL, D.H.; WIESEL, T.N. (1963) Shape and arrangement of columns in cat's striate cortex. **J. Physiol. (Lond.)**. v. 165, p. 559-568.
- HUBEL, D.H.; WIESEL, T.N. (1968) Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. **J. Physiol., Lond.** v. 195, p. 215-243.
- HUBEL, D.H.; WIESEL, T.N. (1970) The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. **J. Physiol. (Lond.)**. v. 206, p. 419-436.
- HUBEL, D.H.; WIESEL, T.N. (1972) Laminar and columnar distribution of geniculocortical fibres in the macaque monkey. **J. Comp. Neurol.** v. 146, p. 421-450.
- HUBEL, D.H.; WIESEL, T.N. (1974) Sequence regularity and geometry of orientation columns in monkey striate cortex. **J. Comp. Neurol.** v. 158, p. 267-294.
- HUBEL, D.H.; WIESEL, T.N. (1977) Functional arquitecture of macaque monkey visual cortex: Ferrier Lecture. **Proc. R. Soc. Lond. (B)**. v. 198, p. 1-59.
- HUBEL, D.H.; WIESEL, T.N.; LEVAY, S. (1976) Functional arquitecture of area 17 in normal and monocularly deprived macaque monkeys. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** v. 40, p. 581-589.

- HUBEL, D.H.; WIESEL, T.N.; STRYKER, M.P. (1978) Anatomical demonstration of orientation columns in macaque monkey. **J. Comp. Neurol.** v. 177, p. 361-379.
- HUNT, S.P.; PINI, A.; EVAN, G. (1987) Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature**. v. 328, p. 632-634.
- HÜTHER, F-J.; KADENBACH, B. (1986) Specific effects of ATP on the kinetics of reconstituted bovine heart cytochrome-c oxidase. **FEBS Lett.** v. 207, p. 89-94.
- HYDE, G.E. & DURHAM, D. (1994) Increased deafferentation-induced cell death in chick brainstem auditory neurons following blockade of mitochondrial protein synthesis with cloramphenicol. **J. Neurosci.** v. 14, p. 291-300.
- INOUE, S.; SATO, H.; ASCHER, M. (1965) Counteraction of colcemid and heavy water on the organization of the mitotic spindle. **Biol. Bull.** v. 129, p. 409-410.
- JÖBSIS, F.F.; KEIZER, J.H.; LAMANNA, J.C.; ROSENTHAL, M. (1977) Reflectance spectrophotometry of cytochrome aa₃ *in vivo*. **J. Appl. Physiol: Respirat. Environ. Exercise Physiol.** v. 43, p. 858-872.
- JULESZ, B. (1986) Stereoscopic vision. **Vision Res.** v. 26, p. 1601-1612.
- KAAS, J.H. (1988) The organization and evolution of neocortex. In: WISE S.P. (ed), **Higher brain functions: recent explorations of the brain's emergent properties**. Nova Iorque: John Wiley & sons, p. 347-378.
- KADENBACH, B. (1983) **Anal. Biochem.** v. 129, p. 517-521.
- KADENBACH, B.; MERLE, P. (1981) On the function of multiple subunits of cytochrome c oxidase from higher eukariotes. **FEBS Lett.** v. 135, p. 1-11.

- KANDEL, E.R. (1991) Perception of motion, depth, and form. In: KANDEL E.R.; SCHWARTZ J.H.; JESSELL T.M. (ed) , **Principles of neural sciences**. Nova Iorque, Amsterdam, Londres, Tóquio: Elsevier, p. 440-460.
- KEILIN, D. (1925) On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants. **Proc. R. Acad. Lond. (B)**. v. 98, p. 312-339.
- KEILIN, D.; HARTREE, E.F. (1939) Cytochrome and cytochrome oxidase. **Proc. R. Acad. Lond. (B)**. v. 127, p. 167-191.
- KENNEDY, C.; DES ROSIERS, M.H.; JEHLE, J.W.; REIVICH, M.; SHARPE, F.; SOKOLOFF, L. (1975) Mapping of functional neural pathways by autoradiographic survey of local metabolic rate with 14 C-deoxiglucose. **Science**. v. 187, p. 850-853.
- KENNEDY, H.; BULLIER, J.; DEHAY, C. (1985) Cytochrome oxidase activity in the striate cortex and lateral geniculate nucleus of the newborn and adult macaque monkey. **Brain Res.** v. 61, p. 204-209.
- KLEE, C.B.; SOKOLOFF, L. (1967) Changes in DL- β -Hidroxibutiric dehydrogenase activity during brain maturation in the rat. **J. Biol. Chem.** v. 212, p. 3880-3883.
- KOVARY, K.; BRAVO, R. (1991) The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. **Mol. Cell. Biol.** v. 11, p. 4466-4472.
- KRUBITZER, L.A.; KAAS, J.H. (1989) Cortical integration of parallel pathways in the visual system of primates. **Brain Res.** v. 478, p. 161-165.
- KUGLER, P. (1990) Enzyme histochemical methods applied in the brain. **Eur. J. Morphol.** v. 28, p. 109-120.
- KUHN-NENTWIG, L.; KADENBACH, B. (1985) **Eur. J. Biochem.** v. 149, p. 147-158.

- KULJIS, R.O.; RAKIC, P. (1989) Neuropeptide Y-containing neurons are situated predominantly outside cytochrome oxidase puffs in macaque visual cortex. *Vis. Neurosci.* v. 2, p. 57-62.
- LACHICA, E.A.; CASAGRANDE, V.A. (1992) Direct W-like geniculate projections to the cytochrome oxidase (CO) blobs in primate visual cortex, p. axon morphology. *J. Comp. Neurol.* v. 319, p. 141-158.
- LAND, P.W. (1987) Dependence of cytochrome oxidase activity in the rat lateral geniculate nucleus on retinal innervation. *J. Comp. Neurol.* v. 262, p. 78-89.
- LANDSCHULTZ, W.H.; JOHNSON, P.F.; MCKNIGHT, S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*. v. 240, p. 1759-1764.
- LEMAIRE, P.; VESQUE, C.; SCHMITT, J.; STUNNENBERG, H.; FRANK, R.; CHARNAY, P. (1990) The serum-inducible mouse gene Krox-24 encodes a sequence-specific transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* v. 9, p. 3456-3467.
- LEVAY, S.; CONNOLLY, M.; HOUDE, J.; VAN ESSEN, D.C. (1985) The complete patterns of ocular dominance stripes in the striate cortex and visual field of the macaque monkey. *J. Neurosci.* v. 5, p. 486-501.
- LEVAY, S.; GILBERT, C.D. (1976) Laminar patterns of geniculocortical projection in the cat. *Brain Res.* v. 112, p. 1-19
- LEVAY, S.; HUBEL, D.H.; WIESEL, T.N. (1975) The pattern of ocular dominance columns in macaque visual cortex revealed by a reduced silver stain. *J. Comp. Neurol.* v. 159, p. 559-575.

- LEVAY, S.; STRYKER, M.P.; SHATZ, C. (1978) Ocular dominance columns and their development in layer IV of the cat's visual cortex: a quantitative study. *J. Comp. Neurol.* v. 179, p. 233-244.
- LISON, L. (1936) Ferments: peroxidases et phénolases. In: LISON L. (Ed). *Histo chimie animale: méthodes et problèmes*. Paris: Gauthiers-Villars, p. 263-291.
- LIU, Y.; GU, Q.; CYNADER, M.S. (1993) An improved staining technique for cytochrome c oxidase. *J. Neurosci. Meth.* v. 49, p. 181-184.
- LIVINGSTONE, M.S.; HUBEL, D.H. (1982) Thalamic inputs to cytochrome oxidase-rich regions in monkey visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 70, p. 6098-6101.
- LIVINGSTONE, M.S.; HUBEL, D.H. (1983) Specificity of cortico-cortical connections in monkey visual system. *Nature*. v. 304, p. 531-534.
- LIVINGSTONE, M.S.; HUBEL, D.H. (1984) Anatomy and physiology of a color system in primate visual cortex. *J. Neurosci.* v. 4, p. 309-356.
- LOOP, M.S.; MILLICAN, C.L.; THOMAS, S.R. (1987) Photopic spectral sensitivity of the cat. *J. Physiol. (Lond.)*. v. 382, p. 537-553.
- LORENTE DE NÓ, R. (1922) La corteza cerebral del ratón. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid*. v. 20, p. 41-78.
- LORENTE DE NÓ, R. (1949) Cerebral cortex: arquitecture, intracortical connections, motor projections. In: FULTON J.F. (ed.). *Physiology of the nervous system*. Nova Iorque: Oxford University Press.

- LÖWEL, S.; BISCHOF, H-J.; LEUTENECKER, B.; SINGER, W. (1988) Topographic relations between ocular dominance and orientation columns in the cat striate cortex. *Exp. Brain Res.* v. 71, p. 33-46.
- LÖWEL, S.; SINGER, W. (1987) The pattern of ocular dominance columns in flat-mounts of the cat visual cortex. *Exp. Brain Res.* v. 68, p. 661-666.
- LUCIAKOVA, K.; LI, R.; NELSON, B.D. (1992) Differential regulation of the transcript levels of some nuclear-encoded and mitochondrial-encoded respiratory-chain components in response to growth activation. *Eur. J. Biochem.* v. 207, p. 253-257.
- LUDUENA, R.F.; ANDERSON, W.H.; PRASAD, V.; JORDAN, M.A.; FERRIGNI, K.C.; ROACH, M.C.; HOROWITZ, P.M.; MURPHY, D.B.; FELLOUS, A. (1986) Interactions of vinblastine and maytansine with tubulin. In: SOIFER D. (ed). Dynamic aspects of microtubule biology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 466, p. 718-732.
- LUND, J.S.; HENRY, G.H.; MACQUEEN, C.L.; HARVEY, A.R. (1979) Anatomical organization of the primary visual cortex (area 17) of the cat. A comparison with area 17 of the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* v. 184, p. 599-618.
- MACMUNN, C.A. (1886). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. (B)*. v. 177, p. 267.
- MARCONDES, M.; PARY, L.F.; SADDI, A.M.; GATTASS, R. (1994) Changes in cytochrome oxidase-rich patches in striate cortex of humans with retinal lesions. *Soc. Neurosci. Abstr.* v. 20, p. 1110.
- MARINESCO, M.G. (1919) *Biol.* v. 81.

MARINESCO, M.G. (1922) Du rôle des ferment oxydants dans les phénomènes de la

vie. In: Libro en honor de D.S. Ramón y Cajal, publicaciones de la junta para el homenaje a Cajal, Madrid.

MARTIN, K.A.C. (1988) From enzymes to visual perception: a bridge too far? **TINS**. v. 11, p. 380-387.

MASON, T.L.; SCHATZ, G. (1973) Cytochrome c oxidase from baker's yeast: site of translation of the protein components. **J. Biol. Chem.** v. 248, p. 1355-1360.

MCGUINESS, E.; MACDONALD, C.; SERENO, M.; ALLMAN, J. (1986) Primates without blobs: the distribution of cytochrome oxidase activity in striate cortex of *Tarsius*, *Hapalemur* and *Cheirogaleus*. **Soc. Neurosci. Abstr.** v. 12, p. 130.

MCMAHON, S.B.; MONROE, J.G. (1992) Role of primary response genes in generating cellular responses to growth factors. **FASEB J.** v. 6, p. 2707-2715.

MELLO, C.V.; VICARIO, D.S.; CLAYTON, D.F. (1992) Song presentation induces gene expression in the songbird forebrain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 89, p. 6818-6822.

MILBRANDT, J. (1987) A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. **Science**. v. 238, p. 797-799.

MILBRANDT, J. (1988) Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. **Neuron**. v. 1, p. 183-188.

MILLER, J.; MCLACHLAN, A.D.; KLUG, A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. **EMBO J.** v. 4, p. 1609-1614.

- MITCHELL, P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative phosphorylation. **Glynn Research Ltd**, Bodim, Cornwall.
- MORGAN, J.I.; CURRAN, T. (1989) Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. **TINS**. v. 12, p. 459-462.
- MOUNTCASTLE, V.B. (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. **J. Neurophysiol.** v. 20, p. 424-434.
- MOWER, G.D.; CAPLAN, C.J.; CHRISTEN, W.G.; DUFFY, F.H. (1985) Dark rearing prolongs physiological but not anatomical plasticity of the cat visual cortex. **J. Comp. Neurol.** v. 235, p. 448-466.
- MURPHY, K.M.; VAN SLUYTERS, R.C.; JONES, D.G. (1990) Cytochrome-oxidase activity in cat visual cortex: is it periodic? **Soc. Neurosci. Abstr.** v. 16, p. 292.
- MURPHY, K.M.; VAN SLUYTERS, R.C.; JONES, D.G. (1991) The organization of cytochrome-oxidase blobs in cat visual cortex. **Soc. Neurosci. Abstr.** v. 17, p. 1088.
- NAKAMURA, H.; GATTASS, R.; DESIMONE, R.; UNGERLEIDER, L. (1993) Modular organization of projections from areas V1 and V2 to areas V4 and TEO in macaques. **J. Neurosci.** v. 13, p. 3681-3691.
- NEMAT-GORGANI, M.; JALILVAND, F.; MEISAMI, E. (1984) Deficient lipid-protein interaction in mitochondrial cytochrome oxidase from newborn and old rat brain. **Develop. Brain Res.** v. 12, p. 121-125.
- NISHIKURA, K.; MURRAY, J.M. (1987) Antisense RNA of proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells. **Mol. Cell. Biol.** v. 7, p. 639-649.

OLAVARRIA, J.; VAN SLUYTERS, R.C. (1985) Unfolding and flattening the cortex of gyrencephalic brains. **J. Neurosci. Meth.** v. 15, p. 191-202.

ONODA, N.; IMAMURA, K. (1984) Changes in cytochrome oxidase activity of the rabbit olfactory cortex following unilateral olfactory bulbectomy. **Japan. J. Physiol.** v. 34, p. 933-937.

PARIMOO, S.; SEELAN, R.S.; DESAI, S.; BUSE, G.; PADMANABAN, G. (1984) Construction of a cDNA clone for a nuclear-coded subunit of cytochrome c oxidase from rat liver. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 118, p. 902-909.

PESSOA, V.F.; ABRAHÃO, J.C.H.; PACHECO, R.A.; PEREIRA, L.C.M.; MAHALHÃES-CASTRO, B.; SARAIVA, P.E.S. (1992) Relative sizes of cortical visual areas in marmosets: functional and phylogenetic implications. **Exp. Brain Res.** v. 88, p. 459-462.

PETERS, A.; KARA, D.A.; HARRIMAN, K.M. (1985) The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex: numerical considerations. **J. Comp. Neurol.** v. 238, p. 263-274.

PICANÇO-DINIZ, C.W.; MARTIN, K.A.C.; FRANCA, J.G.; QUARESMA, J.A.S.; DONASCIMENTO, J.L.M.; FRIEDLANDER, M.J. (1992) A new 'blob' system in the visual cortex of the squirrel monkey revealed by nitric oxide synthase. **Soc. Neurosci. Abstr.** v. 18, p. 210.

PIRLOT, P. (1969) Morphologie évolutive des chordés, Montreal: Les Presses de l'Université de Montréal.

- PURVES, D.; LAMANTIA, A-S. (1990) Numbers of blobs in the primary visual cortex of neonatal and adult monkeys. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 87, p. 5764-5767.
- PURVES, D.; RIDDLE, D.R.; LAMANTIA, A-S. (1992) Iterated patterns of brain circuitry (or how the cortex gets its spots). **TINS.** v. 15, p. 362-368.
- PURVES, D.; VOYVODIC, J.T.; MAGRASSI, L.; YAWO, H. (1987) Nerve terminal remodelling visualized in living mice by repeated visualization of the same neuron. **Science.** v. 238, p. 1122-1126.
- RAMÓN Y CAJAL, S. (1909) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*, tomo I, traduzido por L. Azoulay, 2^a ed. (1972). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Instituto Ramón y Cajal.
- RIBEIRO, S.T.G.; MARCONDES, M.; ABRAHÃO, J.C.H.; PESSOA, V.F.; SARAIVA, P.E.S.; GATTASS, R. (1994) Topographic distribution of cytochrome-oxidase patches revealed by brief visual stimulation in cat visual cortex. Resumo apresentado à IX Reunião anual da Fed. Soc. Biol. Exp. (FESBE), p. 207.
- ROMEIS, B. (1924) *Guia-Formulário de Técnica Histológica*, 1^a ed., traduzido da 11^a ed. por Fernandes Galeano. Barcelona: Labor S.A.
- ROSA, M.G.P.; GATASS, R.; FIORANI, JR. M. (1988) Complete pattern of ocular dominance stripes in V1 of a New World monkey, *Cebus apella*. **Exp. Brain Res.** v. 72, p. 645-648.

- ROSA, M.G.P.; GATTASS, R.; SOARES, J.G.M. (1991) A quantitative analysis of cytochrome oxidase-rich patches in the primary visual cortex of *Cebus* monkeys: topographic distribution and effects of late monocular enucleation. **Exp. Brain Res.** v. 84, p. 195-209.
- ROSA, M.G.P.; GATTASS, R.; FIORANI, JR. M.; SOARES, J.G.M. (1992) Laminar, columnar and topographic aspects of ocular dominance in primary visual cortex of *Cebus* monkeys. **Exp. Brain Res.** v. 88, p. 249-264.
- ROSE, S.P.R. (1991) How chicks make memories: the cellular cascade from c-fos to dendritic remodelling. **TINS**. v. 14, p. 390-397.
- ROSEN, K.M.; MCCORMACK, M.A.; VILLA-KOMAROFF, L.; MOWER, G.D. (1992) Brief visual experience induces immediate early gene expression in the cat visual cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 89, p. 5437-5441.
- RUSAK, B.; ROBERTSON, H.A.; WISDEN, W.; HUNT, S.P. (1990) Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. **Science**. v. 248, p. 1237-1240.
- RUVOLO, M.; DISOTELL, T.R.; ALLARD, M.W.; BROWN, W.M.; HONEYCUTT, R.L. (1991) Resolution of the african hominoid trichotomy by use of a mitochondrial gene sequence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 88, p. 1570-1574.
- SAGAR, S.M.; SHARP, F.R. (1990) Light induces a fos-like nuclear antigen in retinal neurons. **Mol. Brain Res.** v. 7, p. 17-21.
- SAGAR, S.M.; SHARP, F.R.; SWANSON, R.A. (1987) The regional distribution of glycogen in rat brain fixed by microwave irradiation. **Brain Res.** v. 417, p. 172-174.

SAGAR, S.M.; SHARP, S.R.; CURRAN, T. (1988) Expression of the c-fos protein in

brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science.** v. 240, p. 1328-1331.

SANDE, M.A.; MANDELL, G.L. (1990) Antimicrobial agents. In: GILMAN A.G.;

RALL T.W.; NIES A.S.; TAYLOR P. (ed). **Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics.** Nova Iorque: Pergamon.

SANDELL, J.H. (1986) NADPH diaphorase histochemistry in the macaque striate cortex.

J. Comp. Neurol. v. 251, p. 338-397.

SCHEIBEL, M.S.; SCHEIBEL, A.B. (1958) Structural substrates for integrative patterns

in the brain stem reticular core. In: JASPER H.H.; PROCTOR L.D.; KNIGHTON

R.S.; NOSHAY W.C.; OSTELLO R.T. (ed). **Reticular formation of the brain.**

Boston, Massachussets: Little, Brown and col., p. 31-55.

SCHILLER, P.H.; LEE, K. (1991) The role of the primate extrastriate area V4 in vision.

Science. v. 251, p. 1251-1253.

SCHNAPP, B.J.; VALE, R.D.; SHEETZ, M.P.; REESE, T.S. (1986) Microtubules and

the mechanism of directed organelle movement. In: SOIFER D. (ed). **Dynamic**

aspects of microtubule biology, **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 466, p. 909-918.

SCHWARTZ, J.H. (1991) Synthesis and trafficking of neuronal proteins. In: KANDEL

E.R.; SCHWARTZ J.H.; JESSELL T.M. (ed). **Principles of neural sciences.** Nova

Iorque, Amsterdam, Londres, Tóquio: Elsevier, p. 57.

SHATZ, C.J.; LINDSTRÖM, S.; WIESEL, T.N. (1977) The distribution of afferents

representing the right and left eyes in the cat's visual cortex. **Brain Res.** v. 131, p.

103-116.

- SHATZ, C.J.; STRYKER, M.P. (1978) Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation. **J. Physiol. (Lond.)**. v. 281, p. 267-283.
- SHENG, M.; GREENBERG, M. (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate-early genes in the nervous system. **Neuron**. v. 4, p. 477-485.
- SIESJÖ, B.K. (1978) **Brain energy metabolism**. Nova Iorque: John Wiley & sons.
- SILVER, I.A.; ERECINSKA, M. (1994) Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hiperglycemic animals. **J. Neurosci.** v. 14, p. 5068-5076.
- SILVERMAN, M.S.; GROSOF, D.H.; DE VALOIS, R.L.; ELFAR, S.D. (1989) Spatial-frequency organization in primate striate cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 86, p. 711-715.
- SILVERMAN, M.S.; TOOTELL, R.B.H. (1987) Modified technique for Cytochrome oxidase histochemistry: increased staining intensity and compatibility with 2-deoxiglucose autoradiography. **J. Neurosci. Meth.** v. 19, p. 1-10.
- SMYTHE, R.H. (1975) **Vision in the animal world**. Londres, Basingstoke: The MacMillan Press Ltd.
- SOKOLOFF, L. (1977) Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system. **J. Neurochem.** v. 29: 13-26.
- SPATZ, W.B. (1989) Loss of ocular dominance columns with maturity in the monkey, *Callithrix jacchus*. **Brain Res.** v. 488, p. 376-380.

- SPERRY, R.W. (1947) Cerebral regulation of motor coordination in monkeys following multiple transection of sensorimotor cortex. *J. Neurophysiol.* v. 10: 275-294.
- SPERRY, R.W.; MINOR, N.; MYERS, R.E. (1955) Visual pattern perception following subpial slicing and tantalum wire implantations in the visual cortex. *J. Comp. Physiol. Psichol.* v. 48, p. 50-58.
- STONE, J.; DREHER, B. (1973) Projection of X- and Y-cells of the cat's lateral geniculate nucleus to areas 17 and 18 of visual cortex. *J. Neurophysiol.* v. 36, p. 551-567.
- STRYKER, M.P. (1982) Role of afferent activity in the development of ocular dominance columns. *Neurosci. Res. Prog. Bull.* v. 20, p. 540-549.
- SWINDALE, N.V. (1980) A model for the formation of ocular dominance stripes. *Proc. R. Soc. Lond. (B)*. v. 213, p. 435-450.
- SWINDALE, N.V. (1981) Absence of ocular dominance patches in dark-reared cats. *Nature*. v. 290, p. 332-333.
- SZENTÁGOTTHAI, J. (1975) The 'module-concept' in cerebral cortex architecture. *Brain Res.* v. 95, p. 475-496.
- SZENTÁGOTTHAI, J. (1985) The neuronal architectonic principle of neocortex. *An. Acad. Brasil. Ciências*. v. 57, p. 249-259.
- T'SO, D.Y.; FROSTIG, R.D.; LIEKE, E.; GRINVALD, A. (1990) Functional organization of primate visual cortex revealed by high resolution optical imaging of intrinsic signals. *Science*. v. 249, p. 417-423.

- T'SO, D.Y.; GILBERT, C.D. (1988) The organization of chromatic and spatial interactions in the primate striate cortex. **J. Neurosci.** v. 8: 1712-1727.
- THAYER, W.S.; RUBIN, E. (1986) Immunochemical evidence for an inactive form of cytochrome oxidase in mitochondrial membranes of ethanol-fed rats. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 849, p. 369-373.
- TIGGES, J.; TIGGES, M. (1979) Ocular dominance columns in the striate cortex of the chimpanzee (*Pan troglodytes*). **Brain Res.** v. 166, p. 386-390.
- TIGGES, J.; TIGGES, M. (1983) Cytochrome oxidase staining pattern in area 17: adult versus neonate monkeys. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** v. 24, p. 229-234.
- TOOTELL, R.B.H.; HAMILTON, S.L.; SILVERMAN, M.S. (1985) Topography of cytochrome oxidase activity in owl monkey cortex. **J. Neurosci.** v. 5, p. 2786-2800.
- TOOTELL, R.B.H.; SILVERMAN, M.S. (1985) Two methods for flat-mounting cortical tissue. **J. Neurosci. Meth.** v. 15, p. 177-190.
- TOOTELL, R.B.H.; SILVERMAN, M.S.; HAMILTON, S.L.; SWITKES, E.; DE VALOIS, R.L. (1988a) Functional anatomy of macaque striate cortex: spatial frequency. **J. Neurosci.** v. 8, p. 1610-1624.
- TOOTELL, R.B.H.; SILVERMAN, M.S.; HAMILTON, S.L.; DE VALOIS, R.L.; SWITKES, E. (1988b) Functional anatomy of macaque striate cortex: color. **J. Neurosci.** v. 8, p. 1569-1593.
- TRETER, F.; CYNADER, M.; SINGER, W. (1975) Cat parastriate cortex: a primary or secondary visual area? **J. Neurophysiol.** v. 38, p. 1099-1113.

- TRUSK, T.C.; KABOORD, W.S.; WONG-RILEY, M.T.T. (1990) Effects of monocular enucleation, tetrodotoxin, and lid suture on cytochrome-oxidase reactivity in supragranular puffs of adult macaque striate cortex. *Vis. Neurosci.* v. 4, p. 185-204.
- TUSA, R.J.; ROSENQUIST, A.C.; PALMER, L.A. (1979) Retinotopic organization of areas 18 and 19 in the cat. *J. Comp. Neurol.* v. 185, p. 657-678.
- UNGERLEIDER, L.G.; DESIMONE, R. (1986) Cortical connections of visual area MT in the macaque. *J. Comp. Neurol.* v. 248, p. 190-222.
- UNGERLEIDER, L.G.; MISHKIN, M. (1982) Two cortical visual systems. In: INGLE D.J.; GOODALE M.A.; MANSFIELD R.J. (ed). *Analysis of visual behavior*. Cambridge: MIT Press.
- VAN ESSEN, D.C. (1985) Functional organization of primate visual cortex. In: PETERS A.; JONES E.G. (ed). *Cerebral cortex*, v. 3. Nova Iorque: Plenum press.
- VAN ESSEN, D.C.; ANDERSON, C.H.; FELLEMAN, D.J. (1992) Information processing in the primate visual cortex: an integrated systems perspectives. *Science*. v. 255, p. 419-423.
- VAN ESSEN, D.C.; GALLANT, J. (1994) Neural mechanisms of form and motion processing in the primate visual system. *Neuron*. v. 13, p. 1-10.
- VINSON, C.R.; SIGLER, P.B.; MCKNIGHT, S.L. (1989) Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*. v. 246, p. 911-922.
- VOLLOCH, V.; SCHWEITZER, B.; ZHANG, X.; RITS, S. (1991) Identification of negative-strand complements to cytochrome oxidase subunit III RNA in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 88, p. 10671-10675.

WARBURG, O. (1930) The enzyme problem and biological oxidations. **Bull. John Hopkins Hosp.** v. 46, p. 341-358.

WATANABE, H.; PASSONEAU, J.V. (1973) Factors affecting the turnover of cerebral glycogen and limit dextrin *in vivo*. **J. Neurochem.** v. 20, p. 1543-1554.

WIESEL, T.N.; HUBEL, D.H.; LAM, D.M.K. (1974) Autoradiographic demonstration of ocular dominance columns in the monkey striate cortex by means of transneuronal transport. **Brain Res.** v. 79, p. 273-279.

WILLIAMS, R.S. (1986) Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle: evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. **J. Biol. Chem.** v. 261, p. 12390-12394.

WILLIAMS, R.S.; GARCIA-MOLL, M.; MELLOR, J.; SALMONS, S.; HARLAN, W. (1987) Adaptation of skeletal muscle to increased contractile activity: expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 2764-2767.

WONG-RILEY, M.T.T.; RILEY, D.A. (1983) The effect of impulse blockage on cytochrome oxidase activity in the cat visual system. **Brain Res.** v. 261, p. 185-193.

WONG-RILEY, M.T.T. (1978) Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with the cytochrome oxidase technique. **Anat. Rec.** v. 190, p. 586.

WONG-RILEY, M.T.T. (1979) Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. **Brain Res.** v. 171, p. 11-28.

WONG-RILEY, M.T.T. (1988) Comparative study of the mammalian primary visual cortex with cytochrome oxidase histochemistry. In: YEN D.T.; SO K.F. e MONG D.S.C. (ed). **Vision: Structure and Function**. New Jersey: World Scientific, p. 450-486.

WONG-RILEY, M.T.T. (1989a) Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. **TINS**. v. 12, p. 94-101.

WONG-RILEY, M.T.T.; CARROLL, E.W. (1984) Effect of impulse blockage on cytochrome oxidase activity in monkey visual system. **Nature**. v. 307, p. 262-264.

WONG-RILEY, M.T.T.; TRIPATHI, S.C.; TRUSK, T.C.; HOPPE, D.A. (1989b) Effect of retinal impulse blockage on cytochrome oxidase-rich zones in the macaque striate cortex: quantitative electron-microscopic analysis of neurons. **Vis. Neurosci.** v. 2, p. 483-497.

WONG-RILEY, M.T.T.; TRUSK, T.C.; TRIPATHI, S.C.; HOPPE, D.A. (1989c) Effect of retinal impulse blockage on cytochrome oxidase-rich zones in the macaque striate cortex: quantitative electron-microscopic analysis of neuropil. **Vis. Neurosci.** v. 2, p. 499-514.

WORLEY, P.F.; CHRISTY, B.A.; NAKABEPPU, Y.; BHAT, R.V.; COLE, A.J.; BARABAN, J.M. (1991) Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 88, p. 5106-5110.

ZEKI, S. (1990) Parallelism and functional specialization in human visual cortex. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** v. 55, p. 651-661.

ZEKI, S. (1993a) The visual association cortex. **Curr. Op. Neurobiol.** v. 3, p. 155-159.

- ZEKI, S. (1993b) **A vision of the brain**. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- ZEKI, S.M. (1974) Functional organization of a visual area in the posterior bank of the superior temporal sulcus of the *Rhesus* monkey. **J. Physiol. (Lond.)**. v. 236, p. 549-573.
- ZEKI, S.M. (1976) The projections to the superior temporal sulcus from areas 17 and 18 in the *Rhesus* monkey. **Proc. R. Soc. Lond. (B)**. v., 193, p. 199-207.
- ZEKI, S.M. (1978) Functional specialization in the visual cortex of the *Rhesus* monkey. **Nature**. v. 274, p. 423-428.
- ZEKI, S.M. (1980) The response properties of cells in the middle temporal area (MT) of owl monkey visual cortex. **Proc. R. Soc. Lond. (B)**. v. 207, p. 239-248.
- ZEKI, S.M. (1983) The distribution of wavelength and orientation selective cells in different areas of monkey visual cortex. **Proc. R. Soc. Lond. (B)**. v. 217, p. 449-470.
- ZIHL, J.; VON CRAMON, D.; MAI, N. (1983) Selective disturbance of movement vision after bilateral brain damage. **Brain**. v. 106, p. 313-340.