



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

IVANIRA AMARAL DIAS

**PLASTICIDADE DE MODALIDADE CRUZADA EM CÓRTICES SENSORIAIS
ADULTO**

BELÉM
2018

IVANIRA AMARAL DIAS

**PLASTICIDADE DE MODALIDADE CRUZADA EM CÓRTICES SENSORIAIS
ADULTO**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título doutor em Neurociências.

Área de concentração: Neurociências

Linha de Pesquisa: Neuroplasticidade

Orientadores: Prof. Dr. Antonio Pereira Júnior e
Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia

Co-orientador: Prof. Dr. Eliã Pinheiro Botelho

BELÉM
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará gerada
automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pela autora.**

D541p DIAS, Ivanira Amaral
Plasticidade de modalidade cruzada em córtices sensoriais adulto/ Ivanira Amaral Dias-
2018
85 f. : il. color

Orientador: Prof. Dr. Antonio Pereira Junior
Coorientador: Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Neurciências e Biologia Celular,
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical,
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2018.

1. Córtex cerebral. 2. Neuroplasticidade. 3. Privação sensorial. 4. Córtex sensorial.
I. Título.

CDD 574.4

**PLASTICIDADE DE MODALIDADE CRUZADA EM CÓRTICES SENSORIAIS
ADULTO**

Belém (PA) 21 de dezembro de 2018

Banca avaliadora:

Prof. Dr. Antonio Pereira Junior - Orientador

Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia - Orientador

Profa. Dr. Givago Silva Souza - Membro Titular

Profa. Dra. Adelaide da Conceição Passos - Membro Titular

Profa. Dra. Lucília Fonseca Santiago - Membro Titular

Profa. Dra. Vânia Castro Correa – Membro Suplente

DEDICATÓRIAS

À meus pais, meus irmãos
e minhas filhas Emanuelle e
Isabelle.

AGARDECIMENTOS

Uma missão tão difícil e desafiadora como escrever uma Tese de doutorado, foi a de colocar em poucas linhas o meu agradecimento e gratidão as pessoas que estiveram e estão ao meu lado nesta jornada.

A Deus, força divina que me auxiliou nesta jornada todos os dias.

A meus pais e irmãos, pelo apoio e incentivo dedicados em todos os momentos de minha vida, por me acalantar em meus momentos de angústias e aflição e vibrarem com as minhas conquistas.

A Minhas filhas Emanuelle e Isabelle, por serem minha força diária e tornarem minha vida mais feliz.

Ao Prof. Dr. Antonio Pereira Junior, pela orientação, parceria e paciência. Conheci a pesquisa científica pelas suas mãos e, hoje, sei que fazer ciência exige dedicação, compromisso e amor pela descoberta.

Ao Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia, pela orientação, parceira, incentivo e a preocupação demonstrada, ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr Eliã Pinheiro Botelho, pela orientação, paciência e forma amiga e generosa com que sempre me incentivou e ajudou.

Aos meus professores por terem me ensinado a sempre questionar, a duvidar e a pensar que os desafios podem ser oportunidades disfarçadas.

Aos amigos, pelas palavras de apoio, pelos ouvidos sempre atentos e pelo abraço de conforto.

Aos Membros do Laboratório de Neuroplasticidade (LNP) do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, pelo o bom convívio e, a alegria que por vezes se instalava no ambiente do LNP.

A toda equipe de professores (Ana Lúcia, Andrea, Claudia, Fernanda Rosa), nutricionista Luisa e alunos do Centro Colaborador em Alimentação e Nutrição Escolar (CECANE) da Universidade Fedaral do Pará, por me receberem como membro da equipe, pelo apoio, confiança e oportunidade de aprender com vocês.

When it comes to the development of the young brain, “The only constant is change”, Heraclitus of Ephesus a Greek philosopher (c.535 BC - 475 BC

RESUMO

A circuitaria neural do Sistema Nervoso Central (SNC) é altamente dinâmica e pode ser modificada continuamente pela experiência sensorial, num processo que chamamos de neuroplasticidade, que confere ao SNC a capacidade de adaptação às mudanças na periferia sensorial e/ou em resposta à estímulos ambientais. Essa capacidade do SNC permanece por toda a vida, embora seja mais intensa durante etapas precoces do desenvolvimento, principalmente durante o período crítico de plasticidade. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da privação sensorial bilateral na neuroplasticidade de modalidade cruzada nos córtices sensoriais após período crítico de plasticidade. Animais adultos (*Rattus norvegicus*) foram divididos em três grupos experimentais (CEUA/UFPA: 141-13). O grupo controle (CTL), o grupo privado (DEP) o qual os animais foram submetidos a privação visual por enucleação bilateral e o grupo duplo privado (DDEP) o qual os animais foram submetidos a privação visual por enucleação bilateral e somestésica por vibrissetomia bilateral. Após 60 dias de privação sensorial, os ratos foram perfundidos e os encéfalos eram microcortados no plano coronal e posteriormente processados para imunohistoquímica para marcação de genes imediatos c-Fos. Os resultados mostraram que a privação sensorial visual bilateral reduziu o número total de neurônios c-Fos⁺ no córtex visual (**p < 0,0056), aumentou no córtex auditivo (**p < 0,0099) e no córtex somestésico não apresentou diferenças significativas. A privação visual bilateral associada com a vibrissetomia reduziu o número de neurônios c-Fos⁺ no córtex visual (*p < 0,0268) e não apresentou diferenças significativas nos córtices somestésico e auditivo.

Palavras chaves:

Córtex cerebral, neuroplasticidade neural, privação sensorial, córtex sensorial

ABSTRACT

The central nervous system (CNS) neural circuitry is highly dynamic and is continuously modified by sensory experience, in a process we call neuroplasticity, which gives the CNS the ability to adapt to changes in the sensory periphery and / or in response to environmental stimuli . This ability of the CNS remains lifelong, although it is more intense during early stages of development, especially during the critical plasticity period. The main goal of the present work was to evaluate the effects of bilateral sensory deprivation on cross modal neuroplasticity in the visual, somatosensory, and auditory primary cortices of adult rats. Animals (*Rattus norvegicus*) (authorization CEUA/UFPA: 141-13) were divided into three experimental groups: a control group (CTL), an unimodal deprivation group (DEP), in which the animals were subjected to visual deprivation by bilateral enucleation, and a bimodal deprivation group (DDEP), whose animals were submitted to both visual and whisker deprivation bilaterally. After 60 days of sensory deprivation, the rats were perfused and the brains were sectioned in the coronal plane for immunohistochemistry procedures aimed at revealing the activation of immediate early genes (c-Fos). The results showed that after bilateral visual deprivation the number of c-Fos⁺ neurons decreased in the visual cortex (** p < 0.0056), increased in the auditory cortex (** p < 0.0099), and had no effect in the somatosensory cortex. Bilateral visual and whisker deprivation decreased the number of c-Fos⁺ neurons in the visual cortex (* p < 0.0268) but did not have any effect in the somatosensory and auditory cortices.

Keywords:

Cerebral cortex, neural neuroplasticity, sensory deprivation, sensory cortex

SUMÁRIO

1	CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	13
2	INTRODUÇÃO.....	15
2.1	NEUROPLASTICIDADE: Uma janela de oportunidade para reorganização do Sistema Nervoso Central - SNC.....	15
2.1.2	Neuroplasticidade de modalidade cruzada.....	19
2.2	PRIVAÇÃO SENSORIAL E OS GENES IMEDIATOS.....	24
2.3	MODELOS DE PRIVAÇÃO SENSORIAL.....	26
2.3.1	Privação Visual.....	26
2.3.2	Privação somestésica.....	29
2.4	JUSTIFICATIVA.....	30
2.6	HIPÓTESE EXPERIMENTAL.....	32
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.1.2	Objetivos específicos.....	33
4	METODOLOGIA.....	34
4.1	ANIMAIS.....	34
4.1.1	Grupos experimentais.....	34
4.2	PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO SENSORIAL.....	35
4.2.1	Procedimento cirúrgico para indução de privação visual experimental.....	35
4.2.2	Procedimento cirúrgico para indução de privação somestésica experimental.....	36
4.3	PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO SENSORIAL.....	36
4.4	PERFUSÃO, CRANIOTOMIA E MICROTOMIA.....	38
4.5.1	Imunohistoquímica para c-Fos.....	39
4.5.2	Desidratação e montagem.....	39
4.6	ANÁLISE DE DADOS.....	40
4.6.1	CONTAGEM DOS ELEMENTOS CELULARES MARCADOS COM O GENE IMEDIATO c-Fos.....	41
4.6.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	DISTRIBUIÇÃO DE NEURÔNIOS c-Fos ⁺ NO CÓRTICES SENSORIAIS ADULTO...	43
5.2	EFEITO DA PRIVAÇÃO DE UMA MODALIDADE SENSORIAL (ENUCLEAÇÃO BINOCULAR) NOS CÓRTICES SENSORIAIS ADULTOS.....	47
5.2.1	Efeito da enucleação binocular no córtex visual.....	47

5.2.2 Efeito da enucleação binocular no córtex somestésico	49
5.2.3 Efeito da enucleação binocular no córtex auditivo	52
5.3 EFEITO DA PRIVAÇÃO BI-MODAL (ENUCLEAÇÃO BINOCULAR E VIBRISSECTOMIA BILATERAL) NOS CÓRTICES SENSORIAIS ADULTOS.....	54
5.3.1 Efeito da privação bi-modal no córtex visual	54
5.3.2 Efeito da privação simultânea de duas modalidades sensoriais no córtex somestésico	56
5.3.3 Efeito da privação bi-modal no córtex auditivo	59
5.4 COMPARAÇÃO INTERGRUPO DA PRIVAÇÃO SENSORIAL BILATERAL APÓS O FECHAMENTO DO PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE.....	61
5.4.2 Efeito no córtex somestésico	63
5.4.3 Efeito no córtex auditivo	65
6 DISCUSSÃO	67
6.1 PLASTICIDADE DE MODALIDADE CRUZADA NO CORTEX VISUAL	68
6.1.3 Circuitos neurais cortico-corticais	71
6.2 PLASTICIDADE DE MODALIDADE CRUZADA NOS CÓRTICES SOMESTÉSICO E AUDITIVO	72
6.3 PLASTICIDADE DE MODALIDADE CRUZADA COM PRIVAÇÃO DE DUAS MODALIDADES SENSORIAIS.	73
6.4 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS.....	75
7 CONCLUSÃO	77
BIBLIOGRAFIA	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Período crítico de plasticidade de sistemas sensoriais, linguagem e cognição superior.....	16
Figura 2: Período crítico de neuroplasticidade no córtex visual do camundongo	17
Figura 3: Reorganização doas projeções tálamo-corticais após privação sensorial durante o desenvolvimento pós-natal de <i>Monodelphis marsupialis</i>	20
Figura 4: Representação esquemática da reorganização no córtex auditivo após privação sensorial	22
Figura 5: Representação esquemática da reorganização nos córtices não-deaferentados somestésico e visual primário após privação auditiva.	24
Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental	35
Figura 7: Diagrama esquemático do protocolo de estimulação sensorial	38
Figura 8: Desenho esquemático do protocolo experimental	40
Figura 9: Método de contagem de células por estereologia.....	41
Figura 10: Distribuição de neurônios c-Fos ⁺ nos córtices visual,somestésico e auditivo.	43
Figura 11: Distribuição de neurônios c-Fos ⁺ no córtex visual.	44
Figura 12: Distribuição de neurônios c-Fos ⁺ no córtex somestésico.	45
Figura 13: Distribuição de neurônios c-Fos ⁺ no córtex auditivo.	46
Figura 14: Efeito da enucleação binocular no córtex visual.	47
Figura 15: Efeito da enucleação binocular nas camadas do córtex visual.....	48
Figura 16: Efeito da enucleação binocular no córtex somestésico.	50
Figura 17: Efeito da enucleação nas camadas do córtex somestésico.	51
Figura 18: Efeito da enucleação binocular no córtex auditivo.	52
Figura 19: Efeito da enucleação binocular nas camadas do córtex auditivo.	53
Figura 20: Efeito da privação bi-modal no córtex visual.....	54
Figura 21:Efeito da privação bi-modal nas camadas do córtex visual	54
Figura 22: Efeito da enucleação binocular e da vibrissetomia no córtex somestésico.	57
Figura 23: Efeito da enucleação binocular e da vibrissetomia bilateral nas camadas do córtex somestésico.	58
Figura 24: Efeito da enucleação binocular e da vibrissetomia bilateral no córtex auditivo.	59
Figura 25: Efeito da enucleação binocular e da vibrissetomia bilateral no córtex auditivo.	60
Figura 26: Comparação intergrupos do efeito da privação sensorial no córtex visual.	61
Figura 27: Comparação intergrupos do efeito da privação sensorial nas camadas do córtex visual.	62
Figura 28: Comparação intergrupos do efeito da privação sensorial no córtex no córtex somestésico.	63
Figura 29: Comparação intergrupos do efeito da privação sensorial nas camadas do córtex somestésico.	64
Figura 30: Comparação intergrupos do efeito da privação sensorial no córtex auditivo.	65
Figura 31: Comparação intergrupos do efeito da privação sensorial nas camadas do córtex auditivo.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de neurônios c-Fos+ nos córtices sensoriais dos animais dos grupos controle e DEP.....	49
Tabela 2: Número de neurônios c-Fos+ nos córtices sensoriais dos animais dos grupos controle e DDEP.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SNC	Sistema nervoso central
CTL	Controle
DEP	Privação por enucleação bilateral
DDEP	Privação por enucleação bilateral e vibrisssectomia bilateral
DO	Dominância ocular
IC	Intra cortical
IEGs	Genes imediato
C IV	Camada cortical IV
CI/III	Camadas corticais II e III
PV	Privação visual
PC	Período crítico
S	Córtex somestésico
A	Córtex auditivo
V	Córtex visual
V1	Córtex visual primário
A1	Córtex auditivo primário
S1	Córtex somestésico primário
VP	Núcleo ventral posterior do tálamo
VL	Núcleo ventrolateral do tálamo
VPM	Núcleo ventro posteromedial do tálamo
LGD	Núcleo geniculado lateral dorsal
LD	Núcleo latero-dorsal
TC	Tálamo cortical
CT	Área temporo-caudal
ER	Córtex entorrinal
AV	Núcleo ventral anterior
AD	Núcleo dorsal anterior
<i>ip</i>	intra peritoneal
TTX	Tetrodotóxina
P	Pos natal
SB	Substância branca

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Os circuitos neurais do Sistema Nervoso Central (SNC) são altamente dinâmicos e podem ser modificados continuamente pela experiência sensorial, num processo que chamamos de neuroplasticidade (ou plasticidade neuronal) (Bavelier e Neville 2002). A capacidade plástica do SNC permanece por toda a vida, embora seja mais intensa durante as etapas precoces do desenvolvimento ontogenético e período inicial do desenvolvimento pós-natal, principalmente durante os chamados **períodos críticos** de plasticidade (Pascual-Leone, Amedi et al. 2005; Desgent e Ptito 2012; Sammons e Keck 2015). No entanto, várias evidências experimentais tem demonstrado a presença de neuroplasticidade também na fase adulta em decorrência de privação sensorial (Newton, Sikes et al. 2002; Pascual-Leone, Amedi et al. 2005; Allman, Keniston et al. 2009; Van Brussel, Gerits et al. 2011; Meredith, Keniston et al. 2012; Maslin, Munro et al. 2013; Nys, Scheyltjens et al. 2015). Em humanos cegos adultos, por exemplo, os neurônios do córtex visual passam a ser ativados em resposta a estímulos sensoriais de outras modalidades (p.ex. auditivos e/ou somestésico) (Sadato, Pascual-Leone et al. 1996). Provavelmente em decorrência disso, algumas pessoas cegas demonstram ter habilidades sensoriais superiores em outras modalidades, como por exemplo, melhor localização sonora quando comparadas com pessoas com visão normal (Voss, Gougoux et al. 2008). Essa plasticidade pode estar relacionada ao “desmascaramento” de sinapses silenciosas e/ou reforço de conexões no córtex visual deafferentado e nos córtices auditivo e/ou somestésico não deafferentados (Lee e Whitt 2015). Portanto, para compreender como o SNC se adapta após privação sensorial é importante entender a natureza dinâmica da arquitetura dos circuitos sensoriais corticais.

Apesar dos esforços para compreender os mecanismos celulares responsáveis pelas mudanças plásticas que ocorrem no SNC após perda/privação sensorial, a abordagem experimental da maioria dos estudos tem se restringido à privação de apenas uma modalidade sensorial durante as fases iniciais do desenvolvimento do SNC (Lund, Cunningham et al. 1973; Toldi, Farkas et al. 1994; Arckens, Eysel et al. 1998; Piche, Chabot et al. 2007; Van Brussel, Gerits et al. 2011; Nys, Aerts et al. 2014). No presente trabalho, pela primeira vez, avaliaremos como a perda simultânea de duas modalidades sensoriais pode afetar a organização do SNC na vida adulta, após o fechamento do período crítico de plasticidade. Os desdobramentos futuros deste

estudo podem contribuir para o desenvolvimento de novas terapias voltadas para a recuperação funcional após lesões no SNC adulto.

2 INTRODUÇÃO

2.1 NEUROPLASTICIDADE: Uma janela de oportunidade para reorganização do Sistema Nervoso Central - SNC.

O SNC é um órgão caracterizado pela grande capacidade de rearranjo da sua arquitetura sináptica sob a influência do ambiente (Pascual-Leone, Amedi et al. 2005). É a partir dessa interação com o ambiente que o cérebro se adapta às contingências ambientais específicas de cada indivíduo, incluindo o ambiente social. A interação entre fatores genéticos, epigenéticos, e ambientais influenciam as etapas de desenvolvimento do SNC (Bavelier e Neville 2002; Westermann, Mareschal et al. 2007; Merabet e Pascual-Leone 2010).

Durante as etapas de desenvolvimento pós-natal e até a chegada da idade adulta, o SNC apresenta maior capacidade plástica de reorganizar suas conexões neurais e remodelar suas sinapses frente às demandas do ambiente externo (van Versendaal e Levelt 2016). Essa capacidade é mais evidente durante os chamados **períodos críticos de (neuro)plasticidade** e, para cada modalidade sensorial, existe um período crítico específico, com início e duração diferenciados (Levelt e Hubener 2012) (ver Figura 1). Durante os períodos críticos de plasticidade, o SNC é particularmente sensível à estimulação ambiental e vulnerável a condições adversas, como estresse crônico (de Araujo Costa Folha, Bahia et al. 2017) e injúria (Merabet e Pascual-Leone 2010).

Figura 1: Período crítico de plasticidade de sistemas sensoriais, linguagem e cognição superior

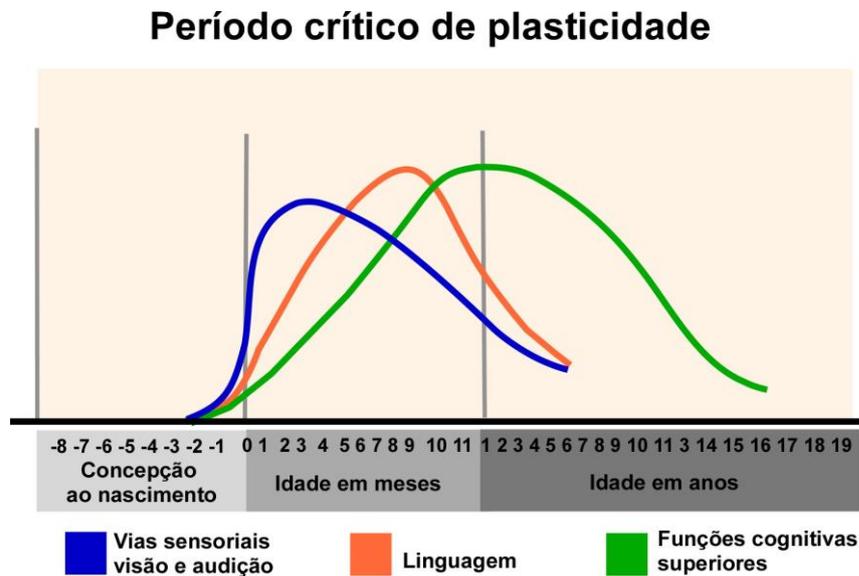
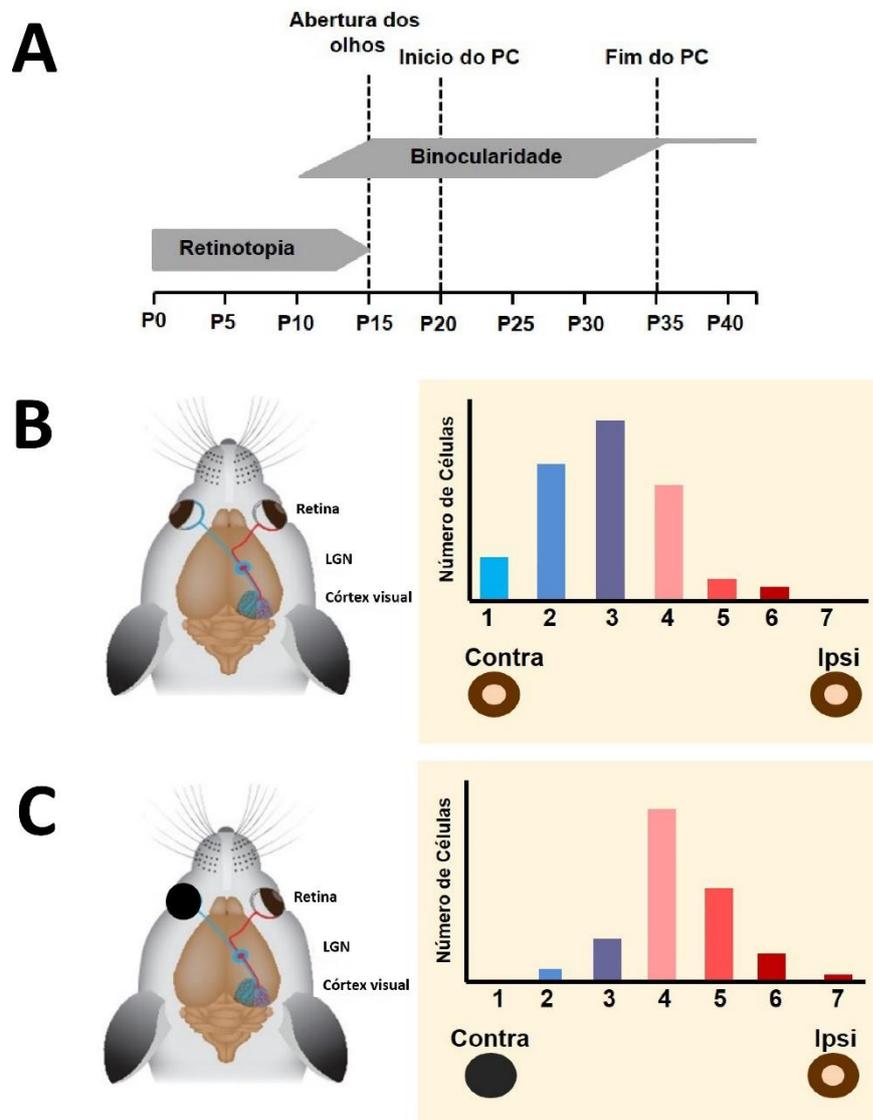


Diagrama representando o desenvolvimento das vias sensoriais (audição e visão) (linha azul), linguagem (linha laranja), e funções cognitivas (linha verde). Observe que as vias sensoriais apresentam uma “janela” máxima de plasticidade nos meses iniciais da primeira infância e, ao longo do desenvolvimento infantil, a plasticidade vai diminuindo. O pico de plasticidade para linguagem é defasado com relação às vias sensoriais, enquanto o pico máximo para funções cognitivas acontece mais tardiamente. Adaptado de Nelson. C.A: in From neurons to neighborhoods. The Science of Early Childhood Development (2000).

No córtex visual de camundongos, por exemplo, o período crítico de plasticidade termina por volta da quarta semana pós natal (Levelt e Hubener 2012). Na primeira semana pós-natal, o desenvolvimento do córtex visual primário (V1) é influenciado pela atividade elétrica (potenciais de ação) espontânea proveniente dos aferentes retinianos que, em conjunto com mecanismos de sinalização celular e molecular, são essenciais para a formação dos circuitos retino-talâmicos, tálamo-corticais e cortico-corticais (Figura 2 A). Após a abertura dos olhos dos camundongos, por volta de P15 (15 dias pós-natal), as informações sensoriais provenientes de ambos os olhos passam a refinar os circuitos neurais em V1 (Espinosa e Stryker 2012) (Figura 2B). A oclusão de um olho (privação monocular) durante o período crítico de plasticidade afeta as características de resposta dos neurônios em V1, com uma diminuição da efetividade do olho afetado em modificar a atividade das células nessa região (Espinosa e Stryker 2012; Levelt e Hubener 2012) (Figura 2 C). Essa mudança ocorre em consequência do rearranjo das projeções tálamo-corticais para V1 e cortico-corticais a partir de V1, com expansão tanto em área quanto em volume das projeções provenientes do olho não-afetado e retração daquelas que se originam no

olho afetado (Levelt e Hubener 2012). Esse rearranjo foi denominado de plasticidade de dominância ocular (Wiesel e Hubel 1965).

Figura 2: Período crítico de neuroplasticidade no córtex visual do camundongo



A, Linha do tempo do desenvolvimento do sistema visual do camundongo apresentando alguns eventos importantes. Em B, representação esquemática do percurso da informação visual (Linha azul e vermelha) capturada pelas células ganglionares da retina e enviada até o córtex visual. Em C, desenho esquemático exemplificando a plasticidade de dominância ocular (DO) em V1 de camundongo após privação monocular. Adaptado de Espinosa & Stryker 2012 e Levelt e & Hubener 2012. Para siglas, ver lista de abreviações.

Em seres humanos, a importância do período crítico de plasticidade para o desenvolvimento do sistema visual pode ser exemplificada pela condição denominada ambliopia (também chamada de “olho preguiçoso”) que atinge cerca de 1-5% da população mundial e consiste na diminuição da acuidade visual de um dos olhos

provocada por uma experiência visual incorreta nos primeiros meses ou anos de vida (Zhou, Thompson et al. 2013; Sale e Berardi 2015). A ambliopia causa uma reorganização nos circuitos de V1, especificamente das colunas de dominância ocular, e precisa ser corrigida o mais rápido possível, de preferência aproveitando a janela de oportunidade do período crítico de plasticidade de V1.

Atualmente a literatura científica descreve inúmeros fatores celulares e moleculares que podem atuar para determinar o início e o término do período crítico de plasticidade. Entre esses fatores destacam-se o equilíbrio entre excitação e inibição nos circuitos corticais (Takesian e Hensch 2013) e moléculas da matriz extracelular, como os proteoglicanos contendo sulfato de condroitina (PGSC) (Kwok, Warren et al. 2012). Além disso, é durante os períodos críticos que a bainha de mielina se forma e amadurece nos tratos axonais que compõem a substância branca cortical (Lyckman, Horng et al. 2008).

Nos últimas décadas, algumas evidências experimentais têm sugerido que o SNC adulto possui capacidade especial de se reorganizar após privação/lesão de vias sensoriais (Van Brussel, Gerits et al. 2011; Nys, Aerts et al. 2014; Fu, Kaneko et al. 2015; Sammons e Keck 2015; Schormans, Typlt et al. 2016). Por exemplo, em um estudo conduzido em camundongos adultos, a enucleação monocular provocou reorganização e expansão na zona binocular em V1 após sete semanas de privação, começando pelas camadas supragranulares e seguindo mais lentamente nas camadas infragranulares (Van Brussel, Gerits et al. 2011). Recentemente, outro estudo com primatas mostrou que a enucleação binocular causou reorganização dos circuitos nos córtices sensoriais visual e auditivo, caracterizado pelo aumento na ativação do número de neurônios c-Fos+ em todas as camadas dessas regiões (Wang, Wu et al. 2017), com diferença entre os hemisférios direito e esquerdo. Pernia e colaboradores (2017) demonstraram em ratos adultos que a privação sensorial bilateral auditiva (surdez experimental) promoveu aumento significativo no número de neurônios c-Fos+ no córtex visual dos ratos surdos, além de ativar neurônios c-Fos+ do córtex auditivo (Pernia, Estevez et al. 2017). Esses resultados demonstram que o SNC apresenta capacidade de reorganizar seus circuitos neurais após privação sensorial, mesmo na fase adulta (Van Brussel, Gerits et al. 2011; Pernia, Estevez et al. 2017).

2.1.2 Neuroplasticidade de modalidade cruzada

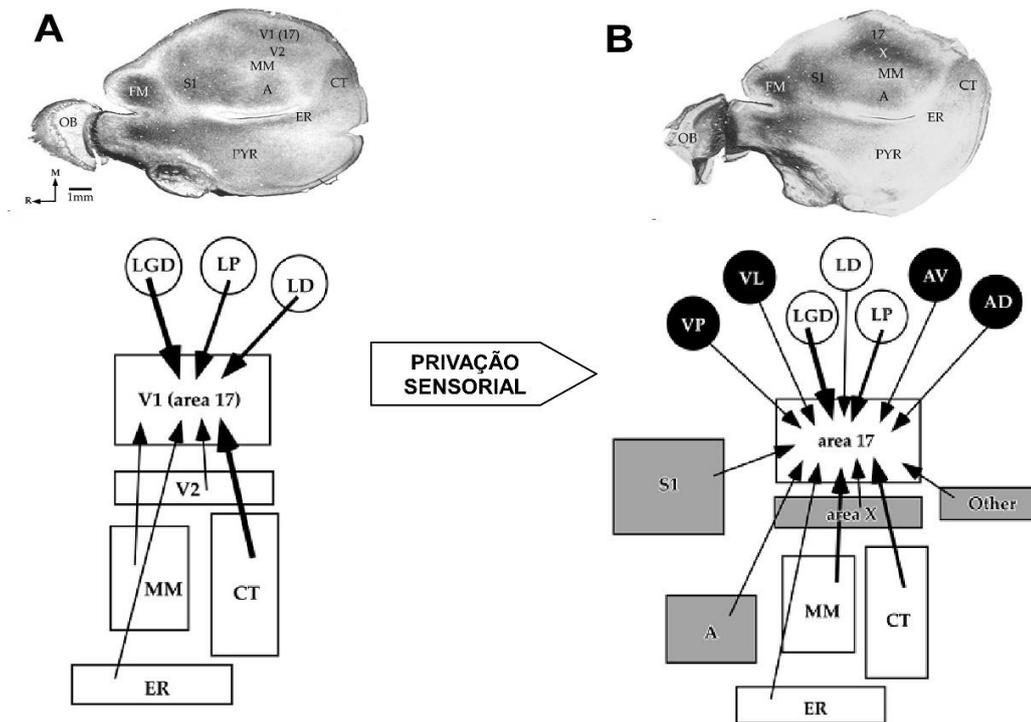
Indivíduos cegos congênitos desenvolvem habilidades especiais no uso dos sentidos remanescentes que resultam na compensação da modalidade sensorial perdida e na manutenção da atividade funcional na área cortical cerebral privada (Sadato, Pascual-Leone et al. 1996; Bavelier e Neville 2002; Piche, Chabot et al. 2007; Petrus, Isaiah et al. 2014). A atividade dos córtices sensoriais primários é influenciada por *inputs* neuronais de modalidades distintas (Ghazanfar e Schroeder 2006). Essa interação multimodal cortical é um dos substratos para a reorganização do sistema nervoso (SN) e compensação funcional após a perda de uma modalidade sensorial (Van Brussel, Gerits et al. 2011; Lee e Whitt 2015). Estudos de neuroimagem realizados em indivíduos cegos demonstram uma ativação robusta de regiões do córtex visual deafferentado enquanto os mesmos realizavam diversas tarefas não-visuais, como por exemplo, leitura em Braille (Sadato, Pascual-Leone et al. 1996; Burton, Snyder et al. 2002), localização espacial de fonte sonora (Voss, Gougoux et al. 2008), assim como tarefas cognitivas de ordem superior, como processamento de linguagem (Bedny, Pascual-Leone et al. 2011) e recordação de memória verbal (Amedi, Raz et al. 2003).

O rearranjo estrutural e funcional que ocorre em áreas do SNC que foram deafferentadas e passam a responder a estímulos de outras modalidades sensoriais é chamado de **neuroplasticidade de modalidade cruzada** e, nas últimas décadas, vem atraindo bastante interesse clínico e científico (Arckens, Eysel et al. 1998; Arckens, Van Der Gucht et al. 2000; Chabot, Robert et al. 2007; Karlen e Krubitzer 2009; Merabet e Pascual-Leone 2010; Van Brussel, Gerits et al. 2011; Desgent e Ptito 2012; Meredith, Keniston et al. 2012; Nys, Aerts et al. 2014; Qi, Kaas et al. 2014; Lee e Whitt 2015; Pernia, Estevez et al. 2017; Wang, Wu et al. 2017).

Quando a privação sensorial ocorre ainda dentro do período crítico de neuroplasticidade, as adaptações/modificações do SNC são mais evidentes (Karlen e Krubitzer 2009; Desgent e Ptito 2012). Por exemplo, a enucleação bilateral em marsupiais no quarto dia de vida pós-natal (P4) causa reorganização de plasticidade cruzada nos circuitos talâmicos e corticais (Karlen, Kahn et al. 2006) (ver Figuras 3A e 3B). A cegueira experimental precoce nesses animais promove a formação de conexões “aberrantes” para núcleos talâmicos somestésicos (núcleo ventral posterior - VP), auditivos (núcleo geniculado medial - NGM), motores (núcleo ventro lateral – VL), do sistema límbico/hipocampal (núcleos dorsal e ventral anterior) e o surgimento de uma

nova área cortical cerebral com características multimodais (Kahn e Krubitzer 2002; Mezzera e Lopez-Bendito 2015), apesar das projeções tálamo-corticais visuais terem sido mantidas (Karlen, Kahn et al. 2006) (Ver Figura 3B).

Figura 3: Reorganização das projeções tálamo-corticais após privação sensorial durante o desenvolvimento pós-natal de *Monodelphis marsupialis*



A, mieloarquitetura do córtex de animal controle e representação esquemática do padrão de conexões talano-corticais (círculos) e córtico-corticais (caixas) de V1. Em B, mieloarquitetura das áreas corticais após privação sensorial e representação esquemática da reorganização cortical. Note que a privação sensorial durante o desenvolvimento ocasionou mudanças no padrão de conectividade dos animais enucleados. A espessura das setas demonstra a densidade das conexões. Adaptado de Karlen, Kahn et al. 2006. Para siglas ver lista de abreviações.

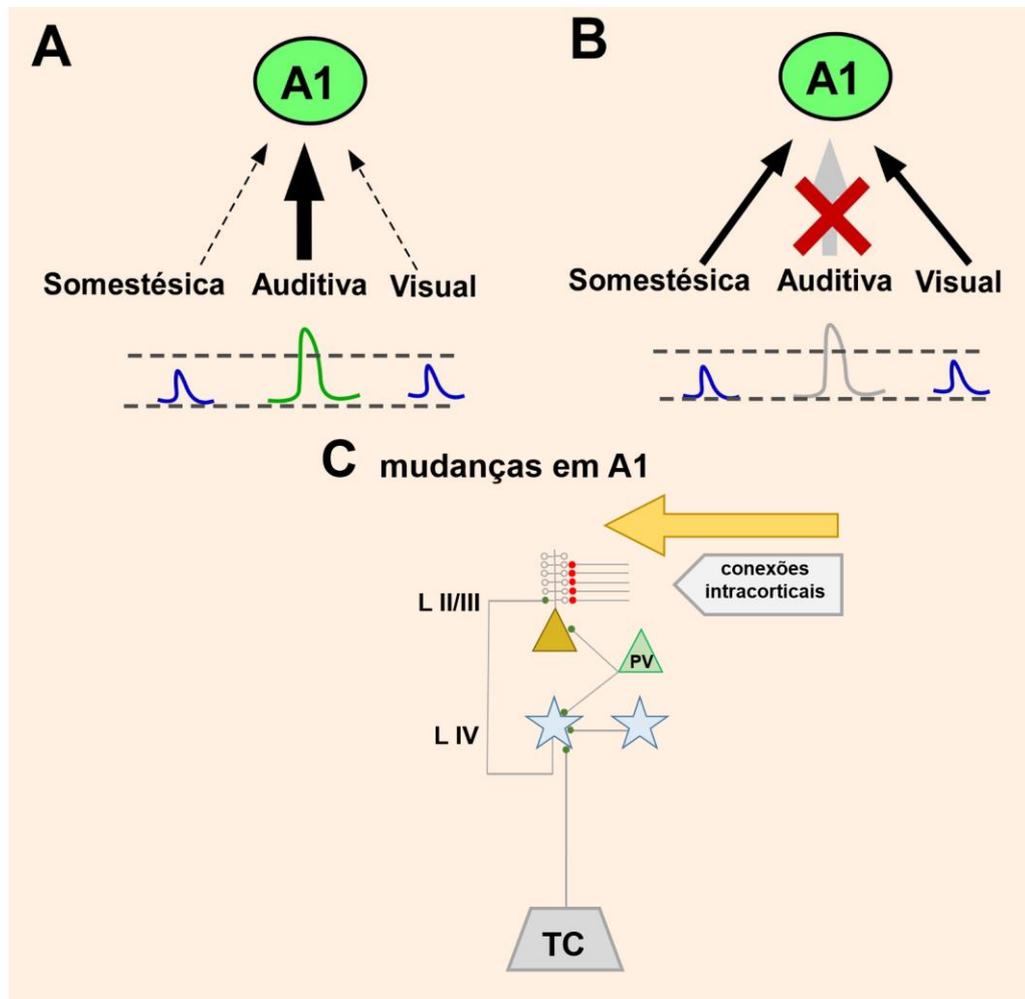
Em consequência da reorganização das estruturas subcorticais após privação sensorial precoce, os córtices sensoriais também reorganizam seus circuitos de modo que, quando ocorre a privação de uma modalidade sensorial, acontece um rearranjo cruzado que resulta na manutenção da atividade elétrica e funcional da área cortical deafferentada e uma reorganização funcional nas áreas corticais não deafferentadas (Sammons e Keck 2015).

2.1.2.1 Recrutamento de modalidade cruzada

As áreas sensoriais primárias recebem informações sensoriais de múltiplas modalidades, estabelecendo circuitos neurais caracterizados pela integração multisensorial (Ghazanfar e Schroeder 2006; Stehberg, Dang et al. 2014), especialmente nas camadas supragranulares (Lee e Whitt 2015). Os neurônios das camadas supragranulares são os mais rápidos a mudar suas propriedades de resposta para mudanças nos inputs sensoriais (Huang, Armstrong-James et al. 1998) e um estudo recente também indica que são alvo de mudanças sinápticas decorrentes de plasticidade de modalidade cruzada (Clemo, Lomber et al. 2016). Essa modificação na densidade de espinhas dendríticas nas camadas supragranulares pode ser explicada pela (re)ativação de sinapses sublimiáres visuais e/ou somatossensoriais (Chabot, Robert et al. 2007; Petrus, Isaiah et al. 2014; Sammons e Keck 2015). A perda da aferência sensorial periférica primária promove redução significativa do neurotransmissor ácido gama aminobutírico – GABA no córtex sensorial afetado (van Versendaal, Rajendran et al. 2012; Sammons e Keck 2015). Isso propicia o ambiente mais favorável ao fortalecimento de sinapses sublimiáres dos circuitos córtico-corticais, principalmente nas camadas supragranulares do córtex auditivo, que passam a responder mais vigorosamente aos estímulos sensoriais de outras modalidades (Lee e Whitt 2015; Petrus, Rodriguez et al. 2015; Sammons e Keck 2015).

Esse recrutamento de modalidade cruzada, a partir de outras modalidades sensoriais, pode representar um dos mecanismos celulares para as mudanças observadas no SNC subjacentes à reorganização funcional de áreas corticais sensoriais após a perda da aferência periférica sensorial (Figura 4 A e B).

Figura 4: Representação esquemática da reorganização no córtex auditivo após privação sensorial



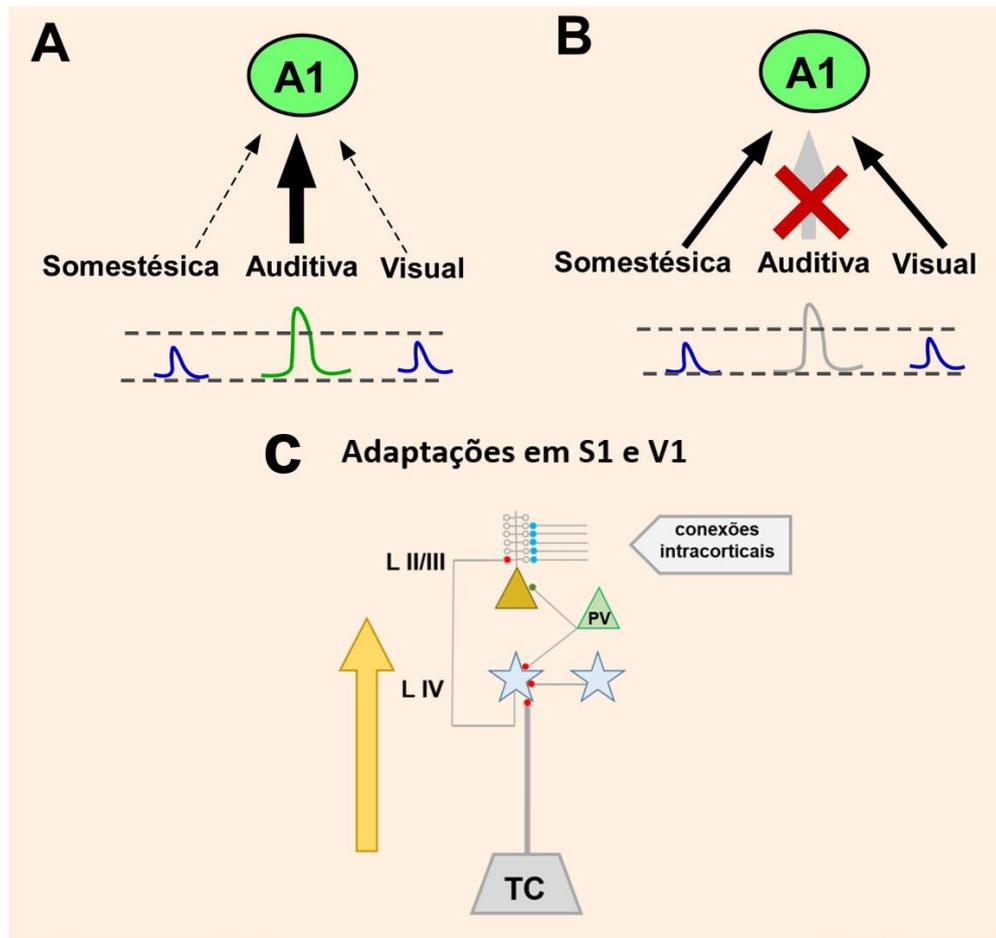
A, Aferências sensoriais multimodais para circuitos corticais em A1. Em B, efeitos da privação sensorial auditiva. A linha azul representa o potencial excitatório pós-sináptico intracortical e a linha verde o potencial evocado. As linhas pontilhadas cinza representam o potencial de repouso e o limiar do potencial de ação. Em C desenho esquemático da reorganização intracortical no córtex deafferentado. A privação sensorial diminui o gradiente de inibição proporcionando ambiente mais favorável ao fortalecimento de sinapses sublimiares córtico-corticais, principalmente nas camadas supragranulares, que passam a responder mais vigorosamente aos estímulos sensoriais de outras modalidades, aqui apresentado na figura por córtices somestésico e visual primário. Círculo vermelho: conexões sinápticas fortalecidas; círculo verde: conexões sinápticas sem mudança de força; seta laranja: potenciação do fluxo da informação baseada na força sináptica Adaptado de Lee e Whitt 2015 e Petrus, Rodriguez et al. 2015. Para siglas, ver lista de abreviações.

2.1.2.2 Plasticidade compensatória

Após lesão sensorial periférica, os córtices sensoriais não deafferentados se reorganizam e compensam a perda da informação sensorial (Van Brussel, Gerits et al. 2011; Nys, Aerts et al. 2014; Lee e Whitt 2015). Por exemplo, a privação de

estímulos visuais em camundongos adultos resulta em mudanças compensatórias no córtex auditivo primário (A1) que incluem, por exemplo, melhor seletividade neuronal para a frequência e intensidade de sons (Bavelier e Neville 2002; Petrus, Isaiah et al. 2014). Essa compensação pode ocorrer devido ao fortalecimento das aferências tálamo-corticais para camada granular de A1 (Petrus, Isaiah et al. 2014) e ao refinamento e fortalecimento das conexões intracorticais entre a camada granular e as camadas supragranulares do córtex auditivo primário (Lee e Whitt 2015; Meng, Kao et al. 2015) (Figura 5). Esses resultados demonstram que a reorganização funcional que ocorre no SNC adulto após privação sensorial parece ser impulsionada por mudanças tanto na conectividade subcortical quanto cortico-cortical (Kahn e Krubitzer 2002; Lee e Whitt 2015).

Figura 5: Representação esquemática da reorganização nos córtices não-deaferentados somestésico e visual primário após privação auditiva.



A, Aferências sensoriais multimodais para circuitos corticais em A1. Em B, desenho esquemático de privação sensorial auditiva. A linha azul representa o potencial excitatório pós-sináptico intracortical e a linha verde o potencial evocado. As linhas pontilhadas cinza representam o potencial de repouso e o limiar do potencial de ação. Em C, desenho esquemático da reorganização talamo-cortical e intracortical no córtex não deaferentado. Círculo vermelho: conexões sinápticas fortalecidas; círculo verde: conexões sinápticas sem mudança de força; círculo azul: conexões sinápticas enfraquecidas; seta laranja: potenciação do fluxo da informação baseada na força sináptica. Observe que após privação sensorial, as conexões talamo-corticais e da camada IV para as camadas supragranulares II e III se fortalecem. Adaptado de Lee e Whitt 2015 e Petrus, Rodriguez et al. 2015. Para siglas, ver lista de abreviações.

2.2 PRIVAÇÃO SENSORIAL E OS GENES IMEDIATOS

Os genes de ativação imediata ou “immediate early genes” (IEGs) são descritos como uma classe de genes expressados de forma rápida e transitória, passíveis de serem induzidos em células estimuladas, sem a necessidade de utilizar o processo de síntese de novas proteínas (Herdegen e Zimmermann 1995). Esses genes aparentemente são expressados diferentes áreas do SNC, após estimulação específica. Os produtos proteicos resultantes da atividade dos genes imediatos são

expressos após atividade elétrica da célula (potencial de ação) e têm sido utilizado como marcadores importantes para o mapeamento da atividade funcional em diferentes sistemas sensoriais (Oh, Kim et al. 2007; Okuno 2011; Kaliszewska, Bijata et al. 2012; Pernia, Estevez et al. 2017; Wang, Wu et al. 2017). A marcação da expressão de genes imediatos (p. ex. *zif*, *c-Fos*, *arc*) é uma ferramenta importante em estudos de plasticidade de modalidade cruzada, pois reflete a ativação neuronal simultaneamente em várias áreas corticais cerebrais (Harris 1998; Oh, Kim et al. 2007; Okuno 2011; Kaliszewska e Kossut 2015; Pernia, Estevez et al. 2017; Wang, Wu et al. 2017).

Quando um neurônio cortical é ativado eletricamente ocorre um aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{++} que funcionam como segundo-mensageiros para a expressão de proteínas (Bading, Ginty et al. 1993). Em seguida, algumas proteína kinases (como por exemplo a proteína kinase A e kinase IV dependente de cálcio/calmodulina) regulam a expressão de genes nucleares a partir da ativação de fatores de transcrição nucleares como, por exemplo, *c-Fos*, que codifica uma proteína nuclear (*c-Fos*) que se liga em uma sequência de nucleotídeos regulatórios específicos de genes de expressão tardia (Perez-Cadahia, Drobnic et al. 2011).

Em camundongos adultos, a remoção unilateral das vibrissas de um lado da face do animal causa ativação de neurônios *c-Fos*⁺ no hemisfério cerebral contralateral em praticamente todas as camadas corticais cerebrais da área somestésica primária (S1), embora o aumento mais significativo ocorra nas camadas granulares (Kaliszewska, Bijata et al. 2012). Recentemente, Wang e colaboradores (2017) demonstraram que em macacos com cegueira experimental precoce bilateral ocorre um aumento no número de células *c-Fos*⁺ nos córtices visual e auditivo primários. Entretanto, esse efeito era mais significativo no hemisfério direito quando comparado com o hemisfério esquerdo. Outro estudo conduzido por Pernia e colaboradores (2017) mostrou, através da ativação de neurônios *c-Fos*⁺, evidências de reorganização de modalidade cruzada no córtex visual e auditivo em ratos surdos precoce. Esses resultados indicam a ocorrência de plasticidade de modalidade cruzada após privação sensorial e demonstram a utilidade da marcação de genes imediatos, tal qual o *c-Fos*, como marcadores de mudanças na atividade elétrica neuronal associadas com a plasticidade em modelos de privação sensorial.

2.3 MODELOS DE PRIVAÇÃO SENSORIAL

2.3.1 Privação Visual

O sistema visual de muitos mamíferos tem sido estudado por muitas décadas com o objetivo de entender os mecanismos do seu desenvolvimento, fisiologia e neuroplasticidade (Jeffery 1984; Kaas, Krubitzer et al. 1990; Arckens, Eysel et al. 1998; van Versendaal, Rajendran et al. 2012; Kuhlman, Olivas et al. 2013; Botelho, Ceriatte et al. 2014; van Versendaal e Levelt 2016). Como a experiência visual atua como um guia para moldar e refinar os circuitos do sistema visual durante o desenvolvimento pós-natal, diferentes manipulações experimentais da experiência visual em diferentes modelos animais têm ajudado a entender os detalhes desses mecanismos (Espinosa e Stryker 2012). Devido à sua acessibilidade, o sistema visual é um excelente modelo para estudos dos mecanismos envolvidos na reorganização do SN durante as fases iniciais do desenvolvimento e no adulto e tem sido bastante utilizado como modelo experimental em estudos de neuroplasticidade (Karlen, Kahn et al. 2006; Maffei e Turrigiano 2008; He, Petrus et al. 2012; Botelho, Ceriatte et al. 2014; Nys, Aerts et al. 2014; Laskowska-Macios, Zapasnik et al. 2015; Sammons e Keck 2015; Wang, Wu et al. 2017; Pernia, Estevez et al. 2017).

Atualmente, existem vários modelos não-invasivos de privação visual, tal como a criação em ambiente escuro (Morales, Choi et al. 2002; Kreczko, Goel et al. 2009; Duffy e Mitchell 2013; Petrus, Isaiah et al. 2014) ou o uso de máscaras para vedar os olhos (Zapasnik e Burnat 2013; Laskowska-Macios, Zapasnik et al. 2015). Outros modelos experimentais usam métodos invasivos como a sutura da pálpebra (Levelt e Hubener 2012), a secção do nervo óptico (Guillemot, Paradis et al. 1993), injeção intraocular de tetrodotoxina (TTX) (Maffei e Turrigiano 2008), lesão focal na retina (Keck, Scheuss et al. 2011; Botelho, Ceriatte et al. 2014), ou enucleação visual (Karlen e Krubitzer 2009; Van Brussel, Gerits et al. 2011; Nys, Aerts et al. 2014). A vantagem dos modelos invasivos permanentes, tal como a secção do trato/nervo óptico e a enucleação, é que eliminam a atividade elétrica espontânea que é gerada na retina e transferida para V1 (Lee e Whitt 2015; Nys, Scheyltjens et al. 2015). Entretanto, os trabalhos disponíveis na literatura e que avaliam os efeitos da privação visual na plasticidade cortical adulta realizam a remoção cirúrgica de apenas um dos olhos (enucleação monocular) (ver quadro 1). Além disso, nenhum outro estudo avaliou os

efeitos da privação bilateral de duas modalidades sensoriais na reorganização dos circuitos do córtex visual adulto.

Quadro 1: Resumo dos principais estudos usando modelos de privação visual por enucleação monocular ou bilateral.

Enucleação	Especie	Idade	Principal resultado	Referencia
Monocular	Rato	P0-P100	Alteração nas vias retino-geniculado e retino coliculares	Lund et al., 1973
	Camundongo	P0		Godement et al., 1980
	Marsupial	P23-P38		Lent and Mendez-Otero, 1980
	Hamster	P0-P32		Hsiao, 1984
	Rato	P0	Alterações nas projeções aferentes talamo-corticais	Jeffery, 1984
	Hamster	P0		Trevelyan and Thompson, 1999
	Marsupial	P2	Alterações nas projeções cortico-tectal	Djavadian et al, 2001
	Hamster	P0	Alteração na conexões calosas	O'Brien and Olavarria, 1995
	Rato	P1-P100	Diminuição do volume do núcleo talâmico geniculado lateral	Lund et al., 1973
	Hamster	P0		Trevelyan and Thompson, 1995
	Rato	P0	Ativação do cortex visual por outras modalidades	Toldi et al., 1994 Piché et al., 2007
	Camundongo	P45-P120	A reativação e expansão do território binocular Córtex visual ativado por outras modalidades sensoriais (S1 e A1)	Van Brussel, Gerits et al. 2011 Nys et al., 2015
Bilateral	Rato	P0	Mantido o padrão normal de conexão	Negyessy et al., 2000
	Hamster	P0		Izaelly et al., 2002
	Camundongo	P0	Alteração na conectividade calosa	Olavarria and van Sluyters, 1994
	Rato	P0		Olavarria and Li, 1995
	camundongo	P0	Invasão do geniculado dorso-lateral por aferentes de outras modalidades sensoriais	Asanuma and Stanfield, 1990 Izaelly et al., 2002
	camundongo	P1	Alteração nas vias aferentes retino-geniculado e retino coliculares Ativação do cortex visual por outras modalidades Diminuição do volume do núcleo talâmico geniculado lateral	Chabot et al., 2007
	hamster	P0	Córtex visual ativado por outras modalidades sensoriais Diminuição do volume do núcleo talâmico geniculado lateral	Izaelly et al., 2002
	marsupial	P4		Kahn and Krubitzer, 2002 Karlen et al., 2006
	Primata	P7	Córtex visual ativado por estímulo auditivo	Wang, Wu et al. 2017

2.3.2 Privação somestésica

O córtex somatossensorial ou somestésico primário (S1) é a área cortical cerebral responsável por processar informação sensorial capturada por receptores distribuídos pela periferia corporal (Kaas, 1983). Nos pequenos roedores, como rato e camundongo, as grandes vibrissas mistaciais são importantes receptores sensoriais periféricos e a informação tátil proveniente desses órgãos é conduzida transinapticamente até o campo de barris no córtex somestésico primário (S1) (Woolsey and Van der Loos 1970; WOOLSEY e LOOS 1970). Os barris são estruturas anatômicas tridimensionais compostas por agregados de células granulares presentes na camada IV de S1 e que possuem relação topográfica precisa com as grandes vibrissas mistaciais do focinho do animal (WOOLSEY e LOOS 1970; Dawson and Killackey 1985). Cada barril do subcampo posteromedial (PMBSF do acrônimo inglês *Postero Medial Barrel Subfield* recebe aferências de uma única vibrissa do focinho contralateral do animal (Woolsey e Van der Loos 1970). O córtex de barris dos pequenos roedores é um dos modelos experimentais mais usados para estudos do processamento de informação em circuitos neurais corticais (Lubke and Feldmeyer 2007), desenvolvimento pós natal (Bahia, Houzel et al. 2008), regeneração e plasticidade SNC (Fox 2002; Chu, Yen et al. 2013), porque apresenta arquitetura colunar clara e fácil de definir por métodos histológicos simples como a técnica de Nissl, impregnação pela prata e/ou através de reações histoquímicas tais como citocromo oxidase, desidrogenase succínica, ou NADPH-diaforase (Wallace 1987; Franca e Volchan 1995; Pereira, Freire et al. 2000). Por exemplo, em um estudo realizado por Lee e colaboradores (2009), ocorreu uma alteração significativa no tamanho dos barris, assim como na morfologia e densidade das espinhas dendríticas nos neurônios do PMBSF, após o corte de todas as vibrissas de ambos os lados da face de ratos entre as idades P0-P3. Deste modo, a retirada das vibrissas da face apresenta-se com um excelente modelo para verificar alterações estruturais, funcionais e morfológicas em S1 (Fox 2002; Lee, Chen et al. 2009; Chu, Yen et al. 2013).

2.4 JUSTIFICATIVA

A grande capacidade de reorganização dos circuitos neurais do SNC após a perda de funções sensoriais específicas (por exemplo, visão) e seu potencial adaptativo tem desafiado o entendimento da comunidade científica. A perda de uma modalidade sensorial pode alterar a organização funcional e a conectividade de estruturas corticais e sub-corticais associadas tanto com a modalidade perdida quando a(s) modalidade(s) preservada(s) (Karlen e Krubitzer 2009; Lee e Whitt 2015; Nys, Scheytljens et al. 2015). A capacidade de reorganização cortical após a perda de aferências sensoriais de modalidades específicas é mediada pela existência de conexões intracorticais e subcorticais entre os córtices sensoriais primários (Henschke, Noesselt et al. 2015). Essas conexões suportam o processamento multimodal de informações sensoriais em indivíduos íntegros e também formam a base das modificações associadas com a plasticidade cruzada multimodal observada em pacientes com lesões periféricas unimodais (Bauer, Hirsch et al. 2017). Por exemplo, a enucleação monocular em roedores adultos resulta na diminuição da atividade neural na zona monocular de V1 após 15 dias de enucleação visual (Van Brussel, Gerits et al. 2011). Entretanto, após 90 dias de enucleação, a atividade elétrica celular retornou gradualmente para níveis normais em V1, começando inicialmente nas camadas supragranulares, seguido por uma recuperação lenta nas camadas infra granulares (Van Brussel, Gerits et al. 2011).

Apesar dos esforços para entender as mudanças plásticas que ocorrem no SNC, os mecanismos subjacentes a esta remodelação adaptativa ainda permanecem pouco compreendidos. O ineditismo do presente trabalho reside em duas propostas complementares: 1) verificar o papel da privação bilateral de uma modalidade sensorial no padrão de atividade celular nas camadas do córtex sensorial adulto e 2) analisar o efeito da privação bilateral de duas modalidades sensoriais no padrão de atividade celular nas camadas dos córtices deaferentado e aferentado no animal adulto.

Escolhermos o **rato** como modelo experimental porque além das vantagens nos procedimentos histológicos e imunohistoquímicos decorrentes do fato de possuírem cérebro pequeno e lisencefálico, esse animal é um modelo experimental consagrado na literatura, com vários trabalhos descrevendo seu comportamento e suas áreas

sensoriais corticais cerebrais já foram previamente mapeadas e delimitadas anatomicamente (Paxinos, 2005).

2.6 HIPÓTESE EXPERIMENTAL

H1: Após a remoção completa de '*inputs*' visuais, os '*inputs*' sensoriais remanescentes passam a ativar o córtex visual mesmo após o fechamento do período crítico de plasticidade.

H2: Após a remoção simultânea dos inputs sensoriais visuais e somestésicos, após o período crítico de plasticidade, os inputs sensoriais das modalidades remanescentes recrutam os circuitos corticais deafferentados e contribuem para a readaptação do animal às novas contingências ambientais

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da privação sensorial bilateral na neuroplasticidade de modalidade cruzada no sistema nervoso central após o período crítico de plasticidade.

3.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da privação sensorial bilateral visual na neuroplasticidade de modalidade cruzada no córtex visual, somestésico e auditivo do rato adulto.
- Analisar os efeitos da privação bilateral visual associada com a privação bilateral somestésica na neuroplasticidade de modalidade cruzada nos córtices visual, somestésico e auditivo do rato adulto.
- Comparar os efeitos da privação bilateral visual associada com a vibrisectomia bilateral na neuroplasticidade nos córtices somestésico e auditivo do rato adulto.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) adultos da linhagem Wistar, de ambos os sexos (n=16), com massa corporal variando entre 0,250-0,300 kg provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sob condições ambientais controladas de temperatura ($27 \pm 2^\circ\text{C}$), com luminosidade controlada (12h de claro e 12h de escuro) e acesso à água e comida (Labina-Purina) *ad libitum*. O uso e os cuidados na manipulação dos animais seguiram as normas estabelecidas pela Society for Neuroscience (Handbook for Use of Animals in Neuroscience Research. Washington, D.C.: SFN, 1991. <http://www.sfn.org>) e foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais da UFPA (CEUA/UFPA) (permissão 141-13).

4.1.1 Grupos experimentais

Para avaliar o efeito da privação sensorial, os animais foram divididos em três grupos experimentais, conforme descrito abaixo (Figura 6).

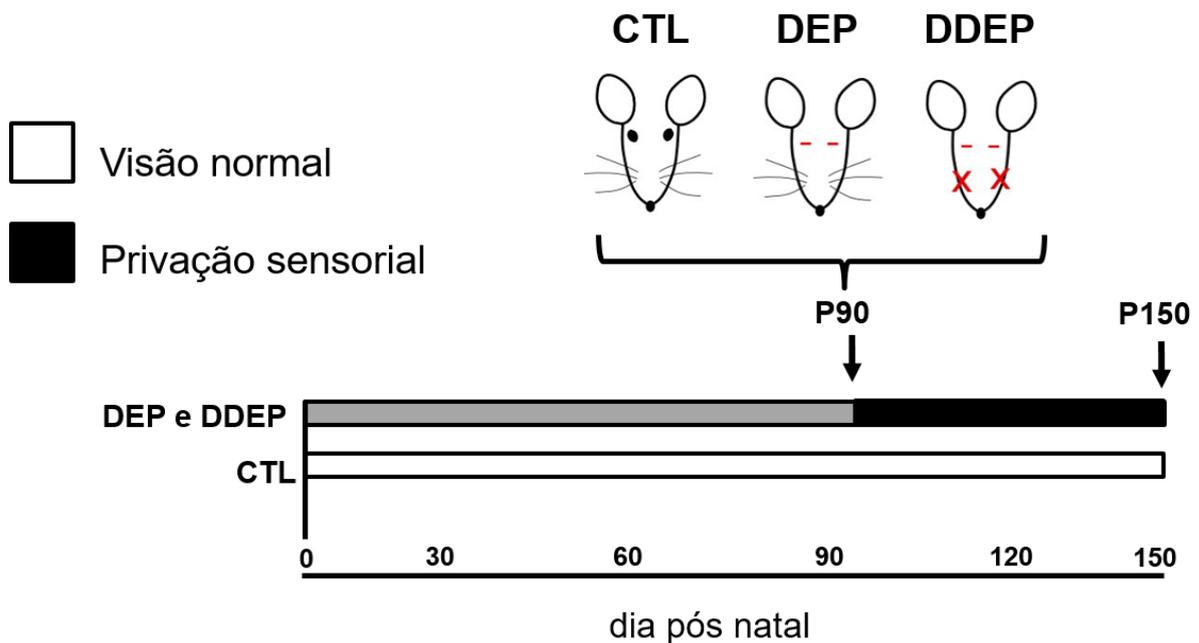
Grupo controle (CTL): os animais não foram submetidos a privação sensorial.

Grupo privação visual (DEP): os animais foram submetidos a privação visual por enucleação bilateral e a um protocolo especial de estimulação sensorial (ver adiante).

Grupo dupla-privação (DDEP): os animais foram submetidos a privação visual por enucleação bilateral e somestésica por vibrissotomia bilateral e a um protocolo especial de estimulação sensorial.

Após a cirurgia de indução de privação sensorial, os animais foram devolvidos às suas gaiolas individuais para uma sobrevivência de 60 dias. O acesso à água e comida durante este período foi *ad libitum*.

Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental



As barras horizontais ilustram o curso temporal das condições experimentais. A barra branca ilustra o grupo controle com visão normal. A barra cinza representa o grupo dos animais submetidos a privação sensorial com 90 dias pós-natal. A porção preta da barra cinza representa o período pós privação dos grupos. Para siglas ver lista de abreviações. As setas indicam o dia de realização da cirurgia de indução de privação sensorial (P90) e o último dia (P150) de privação sensorial.

4.2 PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO SENSORIAL

4.2.1 Procedimento cirúrgico para indução de privação visual experimental

Para a realização da enucleação binocular (Desgent e Ptito 2012), os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (*i.p*) de uma mistura de cloridrato de cetamina (30 mg/ Kg) e Xilazina (5 mg/ Kg). Os animais foram submetidos aos testes de reflexos neurológicos evocados por estimulação da córnea e pelo pinçamento das patas (ou da cauda) antes de serem posicionados no aparelho estereotáxico (Insight, Brasil). Com auxílio de uma lupa cirúrgica (DVF UM-M19), o nervo óptico de ambos os olhos foi pinçado e cortado com tesoura oftálmica *Castroviejo* curva (PETROVICH INSTRUMENTOS CIRURGICOS LTDA). Os olhos foram removidos e no local foi aplicado uma pomada bactericida e cicatrizante (Vetaglós - ETNIL). Ao final da cirurgia de indução de privação sensorial, os animais

receberam uma dose de 0,33 ml de antibiótico de largo espectro (Pentabiótico, ROCHE) para prevenir infecções. Após recuperação da anestesia, os animais foram devolvidos às suas respectivas gaiolas individuais e monitorados diariamente.

4.2.2 Procedimento cirúrgico para indução de privação somestésica experimental

Para a indução da privação somestésica experimental, foi realizada a cauterização das vibrissas mistaciais de ambos os lados da face do animal (região do focinho). Os animais foram previamente anestesiados com uma injeção intraperitoneal (*i.p*) de uma mistura de cloridrato de cetamina (30 mg/ Kg) e Xilazina (5 mg/ Kg). Antes iniciar o procedimento de cauterização das vibrissas mistaciais, foram testados os reflexos neurológicos evocados por estimulação da córnea e pelo pinçamento das patas ou da cauda. Com auxílio de uma lupa cirúrgica (DVF UM-M19) e bisturi elétrico (MEDCIR – BM560 BR), as vibrissas mistaciais de ambos os lados da face foram cauterizadas para remoção completa do folículo piloso. Após a retirada de todas as fileiras das vibrissas, foi aplicada uma pomada bactericida e cicatrizante (Vetaglós - VETNIL) em ambos os lados da face do animal. Posteriormente, os animais receberam uma dose de 0,33 ml de antibiótico de largo espectro (Pentabiótico, ROCHE) para prevenir infecções. Após recuperação do estado anestésico, os animais foram devolvidos às suas respectivas gaiolas individuais e monitorados diariamente.

4.3 PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO SENSORIAL

Os grupos descritos acima foram submetidos a protocolos distintos de estimulação sensorial, conforme descrito abaixo:

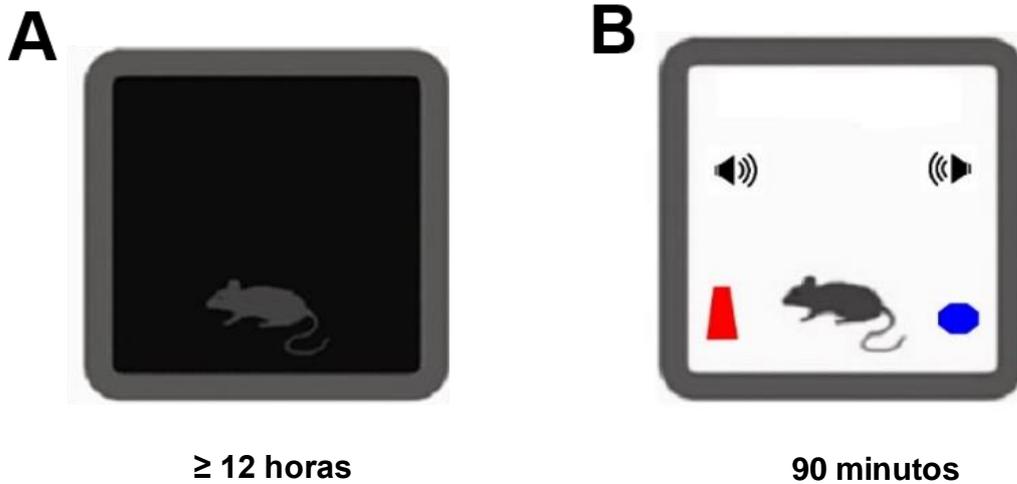
Grupo controle (CTL): os animais não foram submetidos a privação sensorial e eram submetidos a estimulação sensorial. O protocolo de estimulação sensorial consistia em acondicionar o animal em gaiola individual (40 X 32 X 16 cm) que possuía um sistema de som que emitia sons na faixa de 4 a 40 KHz e também continha objetos de diferentes texturas, tamanhos e formas durante 60 dias. Estes objetos foram substituídos a cada 7 dias (Figura 7 B). No dia anterior à perfusão, a gaiola com animais foi transferida para uma caixa (60 X 40 X 25 cm) com isolamento acústico e luminoso (Figura 7A). A gaiola com os animais foi mantida dentro da caixa em completo silêncio e sem luz por 12 horas, para retornar a expressão do genes

imediatos c-Fos nas áreas de interesse a níveis basais (Van Der Gucht, Vandebussche et al. 2000). Após 12 horas dentro da caixa, os animais foram retirados e imediatamente estimulados durante 90 minutos com estímulos sonoros (sons com frequência entre 4 a 40 KHz) e somestésicos (exploração de objetos novos; ver Figura 7 B).

Grupo com privação visual (DEP): grupo de animais submetido à 60 dias de enucleação bilateral. Neste período, os animais eram submetidos a estimulação sensorial (ver descrição anterior). No dia anterior à perfusão, a gaiola com o animal foi transferida para uma caixa (60 X 40 X 25 cm) com isolamento acústico e luminoso (Figura 7A). A gaiola com o animal era mantidas dentro da caixa em completo silêncio e sem luz por 12 horas, para retornar a expressão do genes imediatos c-Fos nas áreas de interesse a níveis basais (Van Der Gucht, Vandebussche et al. 2000). Após 12 horas dentro da gaiola, os animais foram retirados e imediatamente estimulados durante 90 minutos com estímulos sonoros (sons com frequência entre 4 a 40 KHz) e somestésicos (exploração de objetos novos; ver Figura 7B).

Grupo com privação visual e somestésica (DDEP): grupo de animais submetido à 60 dias de privação visual e somestésica bilaterais. Neste período, os animais eram submetidos a estimulação sensorial (ver descrição anterior). No dia anterior à perfusão, a gaiola com o animal foi transferida para uma caixa (60 X 40 X 25 cm) com isolamento acústico e luminoso (Figura 7A). A gaiola com o animal eramantidas dentro da caixa em completo silêncio e sem luz por 12 horas, para retornar a expressão do genes imediatos c-Fos nas áreas de interesse a níveis basais (Van Der Gucht, Vandebussche et al. 2000). Após 12 horas dentro da gaiola, os animais foram retirados e imediatamente estimulados durante 90 minutos com estímulos sonoros (sons com frequência entre 4 a 40 KHz) e somestésicos (exploração de objetos novos; ver Figura 7B)

Figura 7: Diagrama esquemático do protocolo de estimulação sensorial



A, caixa de isolamento sensorial. B, caixa de estimulação sensorial com diferentes estímulos somestésicos (objetos com formas, tamanho e texturas diferentes) e auditivos (caixas sonoras).

4.4 PERFUSÃO, CRANIOTOMIA E MICROTOMIA

Para fixação do tecido nervoso, os animais foram anestesiados com cloridato de cetamina (72 mg/Kg) e xilazina (9 mg/Kg), via IP, e após verificar a completa ausência de respostas à estimulação dolorosa, perfundidos com solução tampão fosfato (0,1M) e salina (0,9%) seguida de solução de paraformaldeído 4% em PB. Foi realizada uma ampla abertura torácica seguida de obliteração da aorta descendente (usando uma pinça hemostática). A perfusão se iniciava com uma injeção intraventricular de 0,20ml de Heparina sódica (Hemofol). Com um cateter acoplado a uma bomba peristáltica (MILAN), a cânula foi posicionada no ventrículo esquerdo e prosseguia-se com a perfusão de 300ml de tampão fosfato (0,1M) e salina 0,9% (PBS; pH 7,4) seguido de 300ml de paraformaldeído tamponado 4% (PFA, Sigma). Após a perfusão, os encéfalos foram retirados da caixa craniana e guardados em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2 – 7,4) a 4 °C. Posteriormente, os encéfalos foram cortados no plano coronal, a 50 µm de espessura num vibrátomo (Vibratome Serie 1000 - Ted Pella Inc, USA). Todos os cortes eram recolhidos em solução de PB 0,1M e pH 7,2 – 7,4.

4.5 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

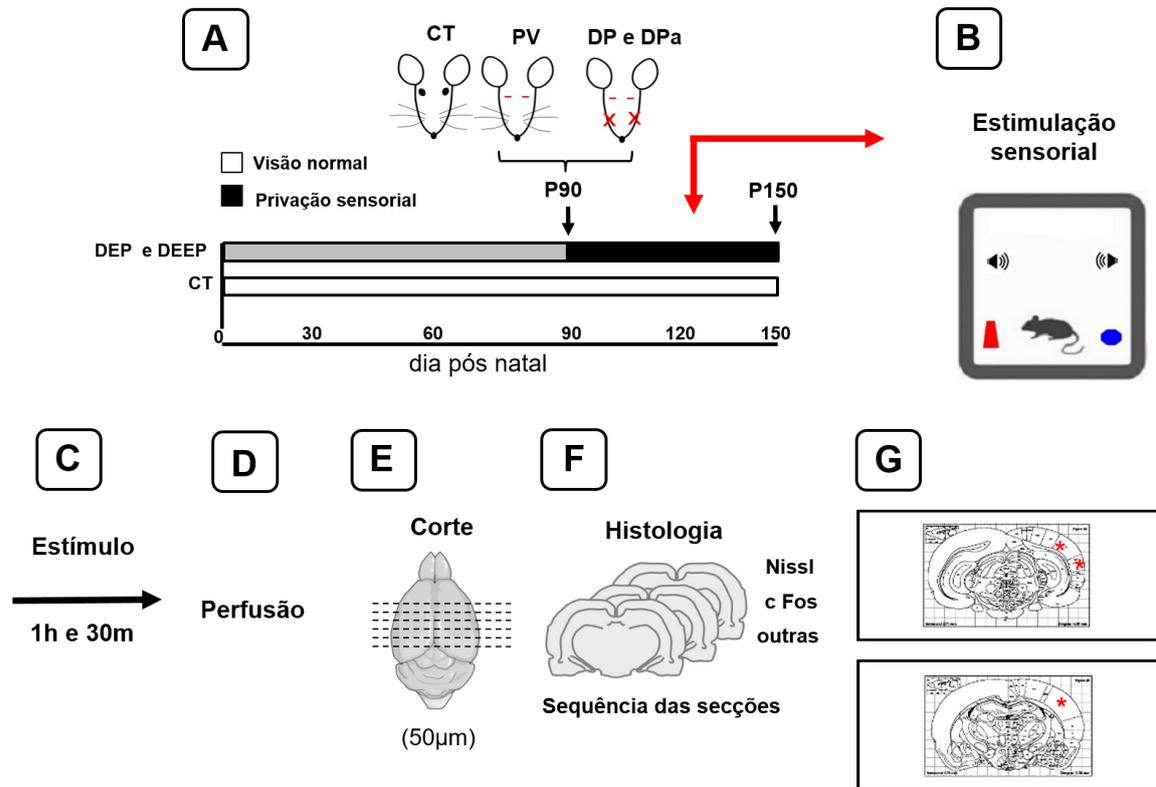
4.5.1 Imunohistoquímica para c-Fos

As secções coronais dos encéfalos foram lavadas três vezes em tampão fosfato 0,1M (PB 0,1M), por 5 minutos, para retirada do excesso do fixador. Posteriormente, foram incubadas por 15 minutos em peróxido de hidrogênio seguido de quatro lavagens em tampão fosfato (PB) 0,1M por 5 minutos cada lavagem. Em seguida, as secções foram incubadas em solução contendo anticorpo primário anti-c-Fos - 1:6000 (Anti-c-Fos (Ab-5) Rabbit pA (PC38-100ul - Santa Cruz Biotechnology, Inc), soro normal correspondente ao anticorpo (Sigma-Aldrich, Inc), soro albumina bovina a 10% (Sigma-Aldrich, Inc), triton x-100, 3% (T8787 - Sigma-Aldrich, Inc), por pelo menos 18 horas. No dia seguinte, as secções foram retiradas da solução contendo o anticorpo primário, novamente lavadas em PB 0,1M por 5 minutos e incubadas em anticorpo secundário biotilado (anti-rabbit IgG H + L, BA-1000; Vector, Burlingame, CA) por 2 horas. Após nova lavagem, as secções foram incubadas em solução contendo o complexo avidina-biotina (kit ABC PK-4000, Vector, Burlingame, CA) por 1 hora. Em seguida, foram submetidos a nova lavagem e à reação para revelação da peroxidase. O cromógeno utilizado para revelar o produto da reação foi o DAB (diaminobenzidina – Sigma-Aldrich, Inc). Na sequência, as secções foram lavadas em PB 0,1M, desidratadas, diafanizadas e montadas.

4.5.2 Desidratação e montagem

Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secados em temperatura ambiente durante oito horas e desidratados em bateria de álcool com concentração crescentes de 50%, 70%, 80%, 90% e a 100%, durante 3 minutos cada e clareadas duas vezes em xileno por 3 minutos cada vez. Em seguida, as lâminas histológicas foram cobertas com lamínula com o auxílio de um meio de inclusão (Entellan, Sigma-Aldrich, Inc).

Figura 8: Desenho esquemático do protocolo experimental.



A, a representação dos grupos experimentais. Em B, protocolo de estimulação sensorial. Em C, tempo de exposição aos estímulos para ativação do gene imediato. Em D, perfusão para fixação do tecido nervoso. Em E, ilustração esquemática do encéfalo; as linhas pontilhadas representam o plano de corte (50µm de espessura). Em F, desenho esquemático do processamento histológico e histoquímico. Em G representação do mapa estereotático. O asterisco vermelho representa região de contagem das células c-Fos⁺.

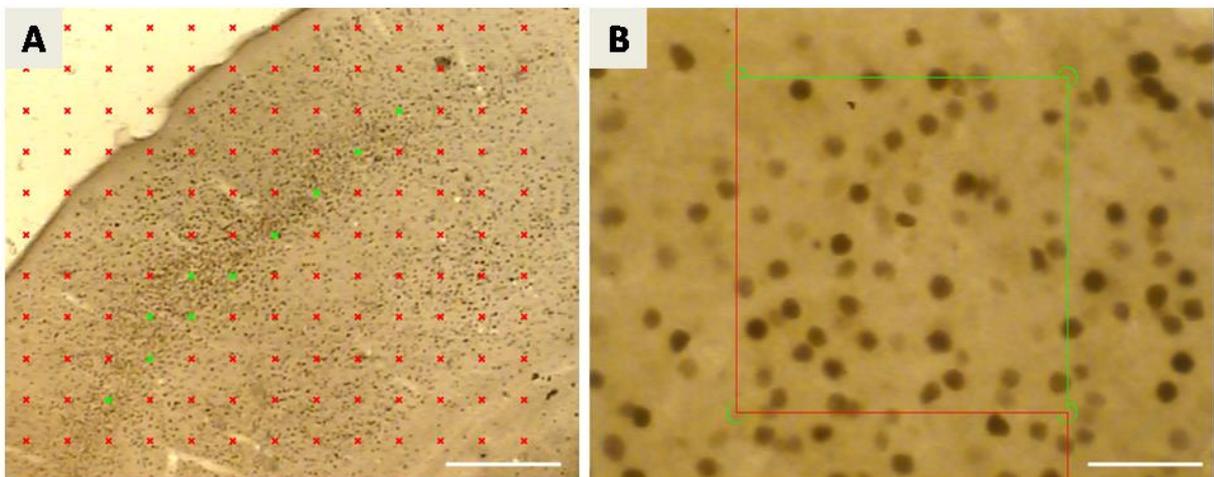
4.6 ANÁLISE DE DADOS

Para análise dos dados, consideramos como córtex visual, somestésico e auditivo a associação de áreas primárias e secundárias dessas modalidades sensoriais. Denominamos de camadas supragranulares o conjunto das camadas I, II, e III; de camada granular a camada IV, e de camadas infragranulares as camadas V e VII. Os limites das áreas corticais foram definidos de acordo com o atlas de Paxinos (2005) através da técnica de coloração de Nissl. Todos os nossos resultados são expressos em valores absolutos (número total de células marcadas) por animal.

4.6.1 CONTAGEM DOS ELEMENTOS CELULARES MARCADOS COM O GENE IMEDIATO c-Fos

O sistema stereoinvestigador (Stereologer2000®) foi utilizado para quantificação do número total de células marcadas para o gene imediato c-Fos. Foi utilizado o método do fracionador óptico, que consiste em determinar a população total de células de uma região a partir de uma estimativa imparcial e sistemática de uma amostra aleatória (West, Slomianka et al. 1991). A estimativa de células foi realizada usando caixas de contagem com área de $1500 \mu\text{m}^2$ para os córtices visual, somestésico e auditivo. Foram analisadas 10 caixas de contagem para cada camada do córtex cerebral em cada uma das três áreas citadas, em três secções histológicas sequenciais por animal. O contorno das áreas analisadas foi feito com objetiva de 2x e a contagem das células com a objetiva de 20x. A espessura do tecido utilizado para análise esterológica foi de $50\mu\text{m}$. O sistema Stereoinvestigador delimita a área de contagem com linhas vermelhas e verdes, sendo que a linha vermelha delimita a área de exclusão e as linhas verdes as áreas de inclusão (Figura 9 B). O coeficiente de erro foi mantido menor que 0,1 (Figura 9 A e B).

Figura 9: Método de contagem de células por estereologia.



A usando lentes objetivas 2X, as cruces verdes delimitam a área de contagem. Barra de escala 2mm. B usando objetiva de 20X, a delimitação da caixa de contagem representada pelas linhas verdes e vermelhas. As linhas vermelhas delimitam a área de exclusão, as células que tocam a linha não são incluídas na contagem. As linhas verdes delimitam as áreas de inclusão de contagem, as células que tocam a linha são incluídas na contagem. Barra de escala 0,5mm.

4.6.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tendo em vista a normalidade na distribuição dos dados, verificada com o teste Lilliefors, a quantidade de células totais em todos os grupos experimentais, assim como o número total de células nos córtices visual, somestésico e auditivo para as diferentes condições experimentais, foram comparados usando análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de $\alpha=0,05$. Quando a comparação era entre apenas dois grupos, utilizamos teste t de Student.

A construção de gráficos e a análise estatística foram realizadas com o *GraphPad Prism 6.0* (GraphPad Software, Inc).

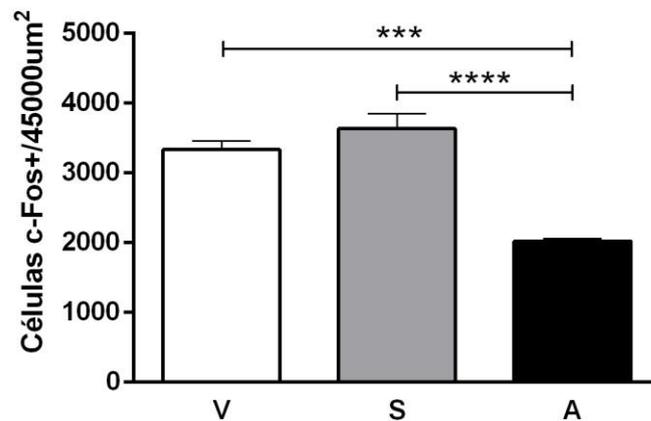
5 RESULTADOS

5.1 DISTRIBUIÇÃO DE NEURÔNIOS c-Fos⁺ NO CÓRTICES SENSORIAIS ADULTO

Para descrever o padrão de marcação de neurônios c-Fos⁺ nos córtices sensoriais de animais adultos, realizamos a imunohistoquímica para marcação da proteína expressada pelo gene imediato c-Fos e quantificamos o número de células marcadas nos córtices sensoriais visual, somestésico e auditivo em ratos adultos

Os resultados demonstraram diferenças significativas (**** $p < 0,0001$) na distribuição do número total de neurônios c-Fos⁺ nos córtices visual (3.334,00 ± 127,00), somestésico (3.637,00 ± 215,50) e auditivo (2.021,00 ± 33,20) de animais adultos. Não houve diferenças significativas no número total de neurônios marcados entre o córtex visual e o córtex somestésico (ver tabela 1).

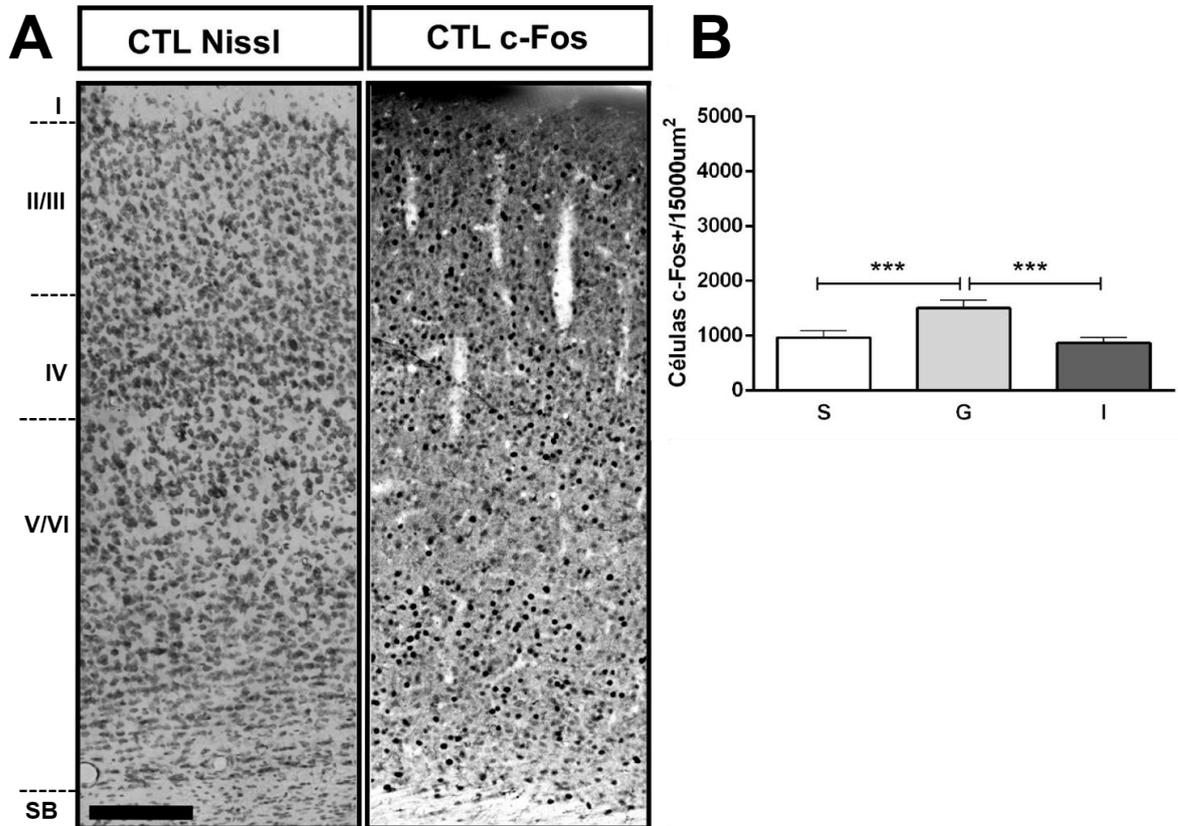
Figura 10: Distribuição de neurônios c-Fos⁺ nos córtices visual, somestésico e auditivo.



Histograma comparando número total de neurônios c-Fos⁺ no grupo CTL. Observe que o número total de neurônios c-Fos⁺ é maior (** $p < 0,0001$) nos córtices visual e somestésico quando comparado com o córtex auditivo. Para siglas, ver lista de abreviações.

No córtex visual dos animais do grupo CTL, o número de neurônios c-Fos⁺ na camada granular foi maior (1.459,00 ± 77,80; *** $p < 0,0001$) do que nas camadas supragranulares (966,00 ± 63,10) e das camadas infragranulares (867,50 ± 48,70) (Figura 11 B; Ver Tabela 1).

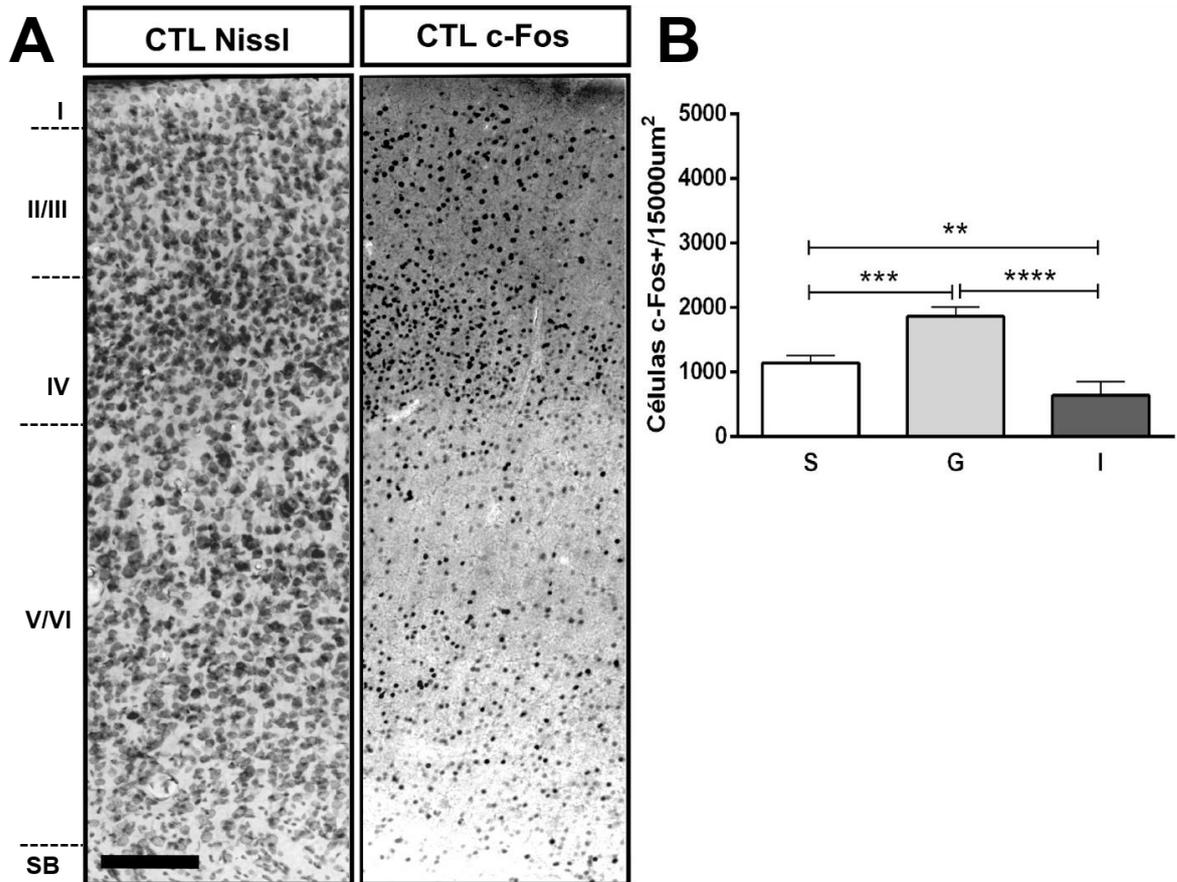
Figura 11: Distribuição de neurônios c-Fos⁺ no córtex visual.



A, fotomicrografia de secção coronal das camadas do córtex visual de animais do grupo CTL coradas pela técnica de Nissl (esquerda) e imunomarcadas para c-Fos (direita). Em B, histograma representando o número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados nas camadas do córtex visual. Observe que o número de neurônios c-Fos⁺ foi maior na camada granular (***) quando comparados com as camadas supra e infragranulares. Barra de escala 100μ. Para siglas, ver lista de abreviações.

Na camada granular do córtex somestésico, o número de neurônios c-Fos⁺ ($1.859,00 \pm 72,90$) foi maior (***) do que nas camadas supragranulares ($1.140,00 \pm 57,60$) e infragranulares ($818,80 \pm 52,30$) (Figura 12 B). O número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares foi maior ($1.859,00 \pm 72,90$, ***) do que nas camadas infragranulares ($818,80 \pm 52,30$) (Figura 12 B, ver tabela 1).

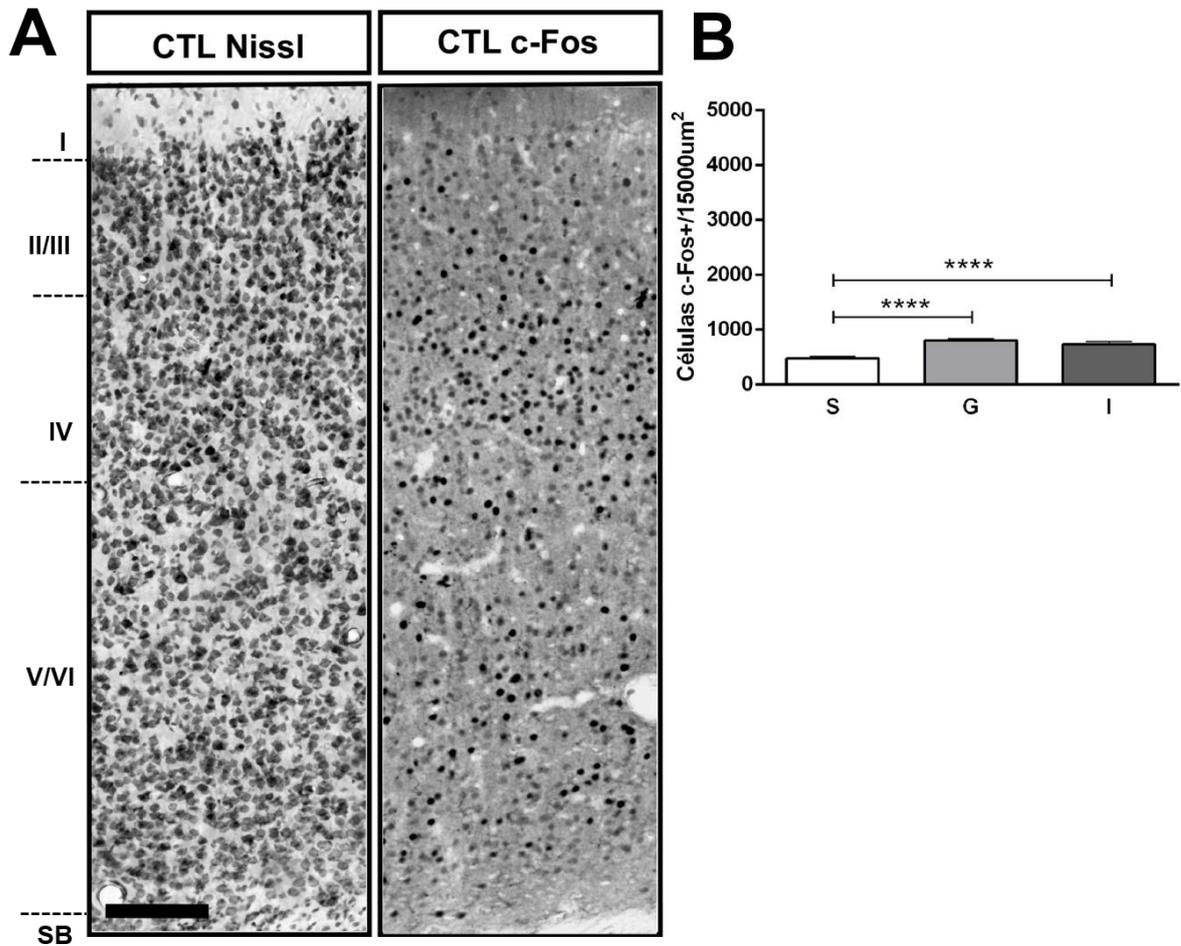
Figura 12: Distribuição de neurônios c-Fos⁺ no córtex somestésico.



A, fotomicrografia de secção coronal das camadas do córtex somestésico de animais do grupo CTL coradas pela técnica de Nissl (esquerda) e imunomarcadas para c-Fos (direita). Em B, histograma representando o número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados nas camadas do córtex somestésico. Observe que na camada granular do córtex o número de neurônios c-Fos⁺ foi maior quando comparado com as camadas supra e infragranulares ($p < 0,0001$). Adicionalmente, o número de neurônios das camadas supragranulares foi maior quando comparado com os da camada infragranulares Barra de escala 100μ. Para siglas, ver lista de abreviações.

No córtex auditivo, o número de neurônios c-Fos⁺ na camada granular ($804,80 \pm 18,79$) e camadas infragranulares ($736,50 \pm 23,12$) foi maior ($p < 0.0001$) quando comparado com as camadas supragranulares ($479,80 \pm 20,33$) (Figura 13 B). Ver Tabela 1.

Figura 13: Distribuição de neurônios c-Fos⁺ no córtex auditivo.



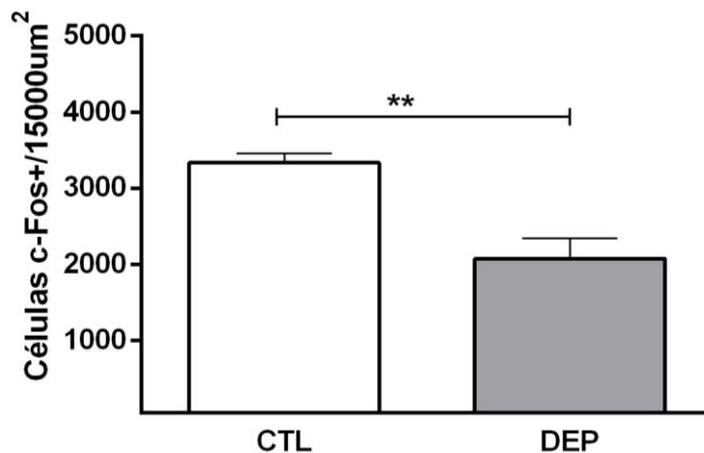
A, fotomicrografia de secção coronal das camadas do córtex auditivo de animais do grupo CTL coradas pela técnica de Nissl (esquerda) e imunomarcadas para c-Fos (direita). Em B, histograma representando o número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados nas camadas do córtex auditivo. Note que as camadas granular e infragranulares do córtex auditivo apresentam um número maior de neurônios c-Fos⁺ quando comparadas com as camadas supragranulares ($p < 0,0001$). Barra de escala 100μ. Para siglas, ver lista de abreviações.

5.2 EFEITO DA PRIVAÇÃO DE UMA MODALIDADE SENSORIAL (ENUCLEAÇÃO BINOCULAR) NOS CÓRTICES SENSORIAIS ADULTOS

5.2.1 Efeito da enucleação binocular no córtex visual

A privação bilateral de uma modalidade sensorial (enucleação bilateral) promoveu alterações significativas no número total de neurônios c-Fos⁺ no córtex visual do rato adulto. Nos animais do grupo enucleado bilateral (DEP), os resultados demonstraram redução significativa no número total de neurônios c-Fos⁺ quando comparado com o grupo CTL ($t= 4.214$; $df=6$; $**p= 0,0056$; Figura 14, ver Tabela 1).

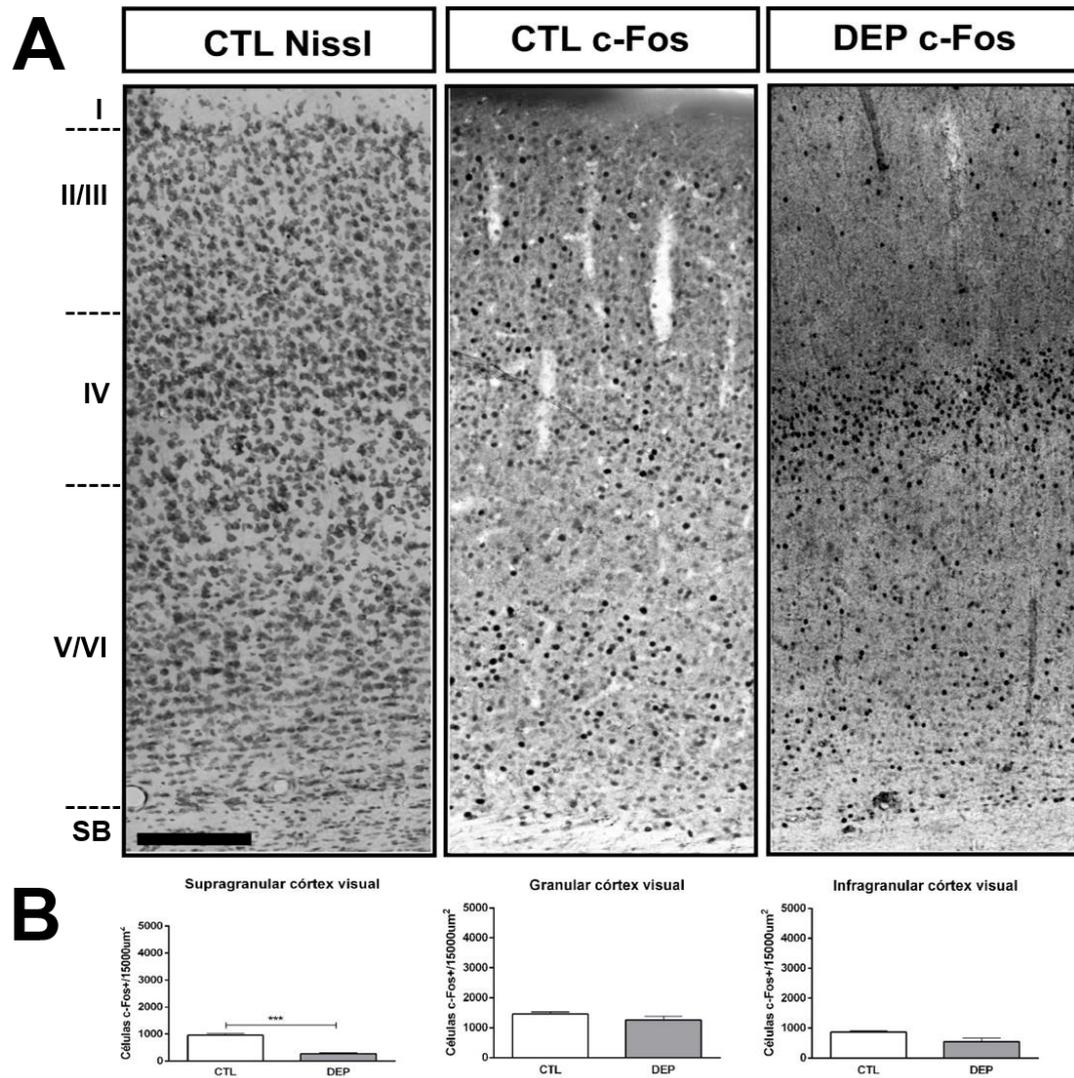
Figura 14: Efeito da enucleação binocular no córtex visual.



Histograma comparando número total de neurônios c-Fos⁺ nos grupos CTL e DEP. Observe que houve redução significativa ($**p < 0,0056$) no número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados nos animais DEP. Para siglas, ver lista de abreviações.

A diminuição no número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados também foi observada nas camadas supragranulares do córtex visual dos animais DEP quando comparados com camadas supragranulares corticais dos animais CTL ($t= 1.331$ $df=6$; $***p < 0,0001$, ver Tabela 1) (Figura 15 A e B). Na camada granular dos animais do grupo DEP, a quantificação do número total de neurônios c-Fos⁺ não demonstrou diferenças estatísticas quando comparado com a camada granular nos animais CTL ($t=1.331$ $df=6$; Figura 15 A e B, ver Tabela 1). Nas camadas infragranulares, os resultados também demonstraram que não houve diferenças significativas entre o número total de neurônios c-Fos⁺ nos animais do grupo DEP e CTL ($t= 2.354$ $df=6$; Figura 15 A e B, ver Tabela 1).

Figura 15: Efeito da enucleação binocular nas camadas do córtex visual.



A, fotomicrografia de secção coronal das camadas do córtex visual de animais CTL e DEP coradas pela técnica de Nissl (esquerda) e imunomarcadas para c-Fos (centro e direita). Em B, histogramas representando o número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados nas camadas do córtex visual. Observe que houve uma redução (***) no número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados nas camadas supragranulares. Nas camadas granular e infragranulares não houve diferenças no número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados. Barra de escala 100μ. Para siglas, ver lista de abreviações.

Tabela 1: Número de neurônios c-Fos+ nos córtices sensoriais dos animais dos grupos controle e DEP.

Região cortical	Grupos		
	CTL	DEP	P
VISUAL	3.334,00 ± 127,00	2.076,00 ± 270,10	0,0056**
Camadas supragranulares	966,00 ± 63,10	268,00 ± 46,00	0,0001***
Camada granular	1.459,00 ± 77,80	1.256,00 ± 131,10	
Camadas infragranulares	867,50 ± 48,70	552,00 ± 124,90	
SOMESTÉSICA	3.637,00 ± 215,50	4.234,00 ± 143,90	
Camadas supragranulares	1.140,00 ± 57,60	797,80 ± 27,90	0,0018**
Camada granular	1.859,00 ± 72,90	2.452,00 ± 149,10	0,0117*
Camadas infragranulares	818,80 ± 52,30	985,00 ± 48,20	0,0248 *
AUDITIVA	2.021,00 ± 33,20	3.291,00 ± 340,30	0,0099**
Camadas supragranulares	479,80 ± 20,33	809,00 ± 75,04	0,0055**
Camada granular	804,80 ± 18,79	1.276,00 ± 190,70	0,0491*
Camadas infragranulares	736,50 ± 23,12	791,80 ± 35,16	

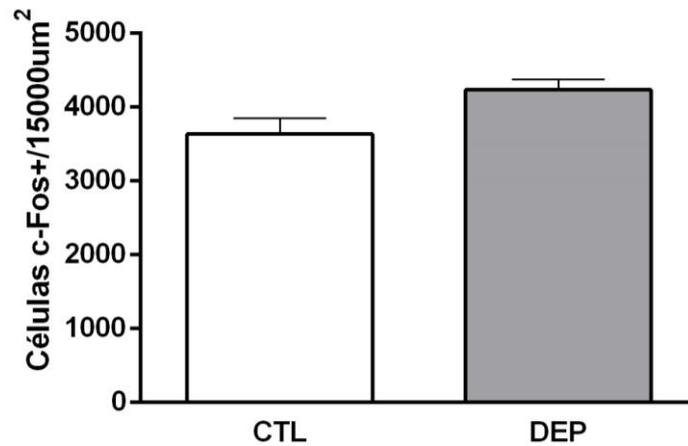
Nota: Grupo CTL = grupo controle; grupo DEP = grupo enucleado bilateral; VISUAL = córtex visual; SOMESTÉSICA = córtex somestésico; AUDITIVA = córtex auditivo.

5.2.2 Efeito da enucleação binocular no córtex somestésico

No córtex somestésico, a enucleação binocular também alterou significativamente o número de neurônios c-Fos⁺.

Nos animais do grupo DEP, não houve diferença estatística significativa no número de neurônios c-Fos⁺ quando comparados com animais do grupo CTL ($t=2.306$ df=6; Figura 16, ver Tabela 1). Entretanto, quando quantificamos o número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas do córtex somestésico, encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os animais dos grupos DEP e CTL. Houve redução significativa no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares do córtex somestésico do grupo DEP quando comparados com os animais do grupo CTL ($t= 5.339$ df=6; ** $p < 0,0018$; Figura 17 A e B, ver Tabela 1).

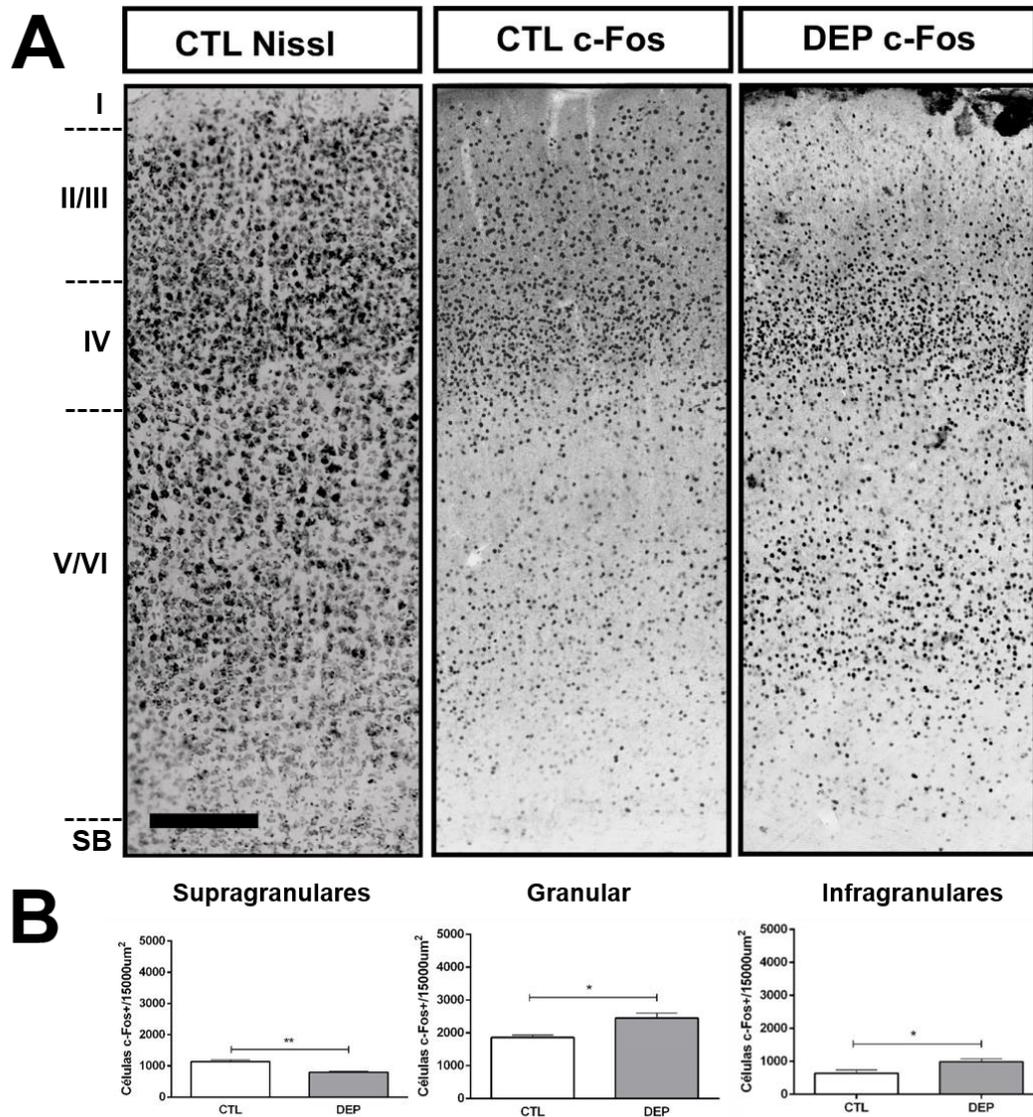
Figura 16: Efeito da enucleação binocular no córtex somestésico.



Histograma comparando número total de neurônios c-Fos⁺ nos grupos CTL e DEP. Não houve diferença significativa no número de neurônios c-Fos⁺ entre os grupos. Para siglas, ver lista de abreviações.

Na camada granular, os resultados demonstram que houve aumento no número de neurônios c-Fos⁺ nos animais DEP quando comparados com os animais do grupo CTL ($t = 3.573$ $df=6$; $*p=0,0117$; Figura 17A e B; ver tabela 1). Esse aumento significativo no número de neurônios c-Fos⁺ também foi observado nas camadas infragranulares dos animais DEP quando comparados com os animais CTL (Figura 17 A e B ver Tabela 1).

Figura 17: Efeito da enucleação nas camadas do córtex somestésico.

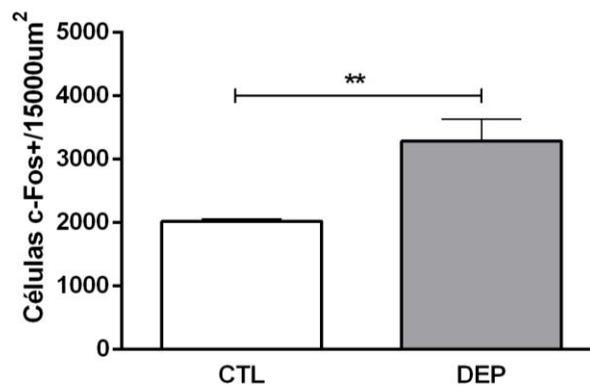


A, fotomicrografia de secção coronal do córtex somestésico de animais do grupo CTL e animais do grupo DEP coradas pela técnica de Nissl (esquerda) e imunomarcadas para c-Fos (centro e direita). Em B, histograma representando o número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados nas camadas do córtex somestésico. Observe que nas camadas granular ($*p < 0,0117$) e camadas infragranulares ($*p < 0,0248$) houve aumento significativo nos neurônios c-Fos⁺ quando comparados com os animais CTL. Nas camadas supragranulares houve uma redução ($**p < 0,0018$) significativa no número de neurônios c-Fos⁺ quando comparados com os animais CTL. Barra de escala 100 μ . Para siglas, ver lista de abreviações.

5.2.3 Efeito da enucleação binocular no córtex auditivo

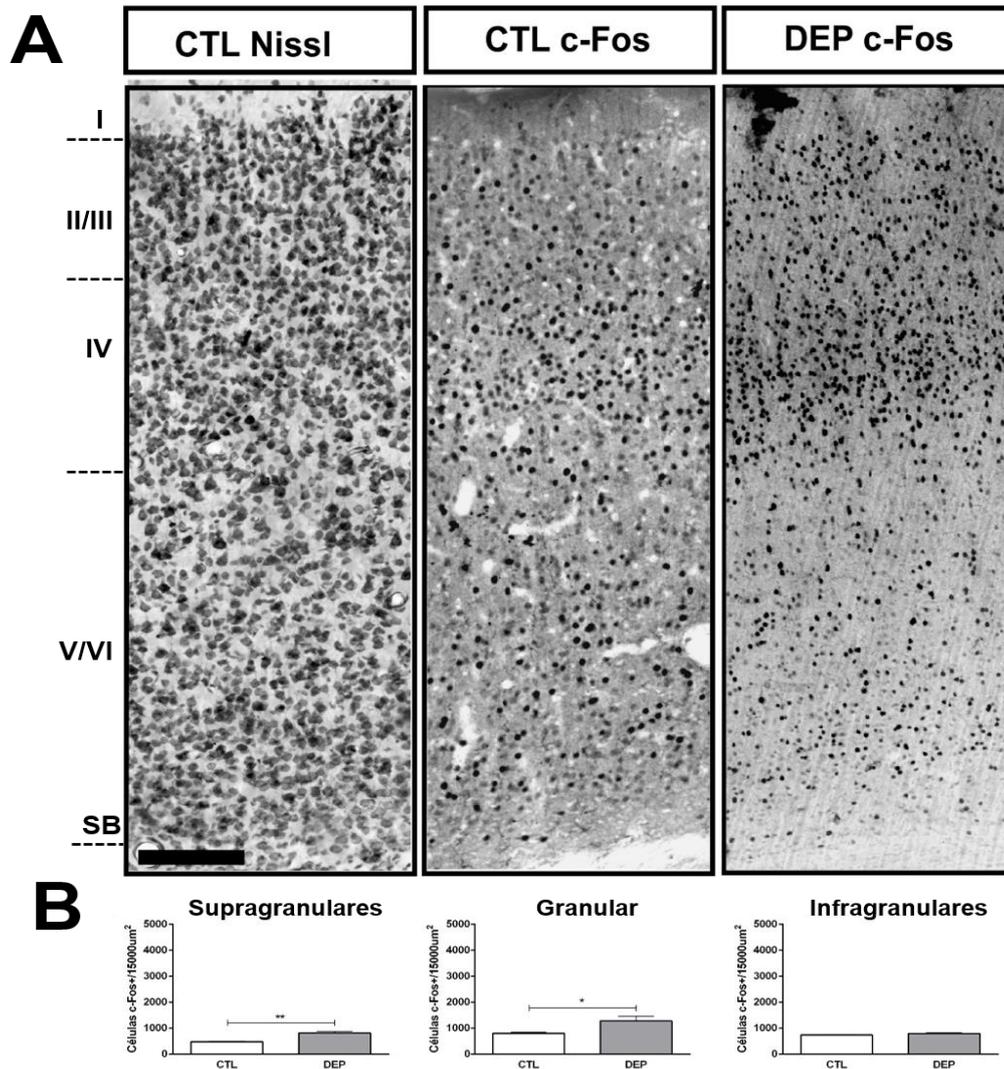
No córtex auditivo, os resultados demonstraram que a enucleação binocular alterou o número de neurônios c-Fos⁺ de forma significativa. Nos animais do grupo DEP, houve aumento significativo no número de neurônios c-Fos⁺ quando comparados com animais do grupo CTL ($t= 3.714$ $df=6$; $**p< 0,0099$; Figura 18, ver Tabela 1). Esse aumento no número de neurônios c-Fos⁺ também foi observado nas camadas supragranulares do córtex auditivo dos animais do grupo DEP quando comparados com os animais do grupo CTL ($t= 4.235$ $df=6$; $**p< 0,0055$; Figura 19 A e B, ver Tabela 1). Na camada granular dos animais do grupo DEP, os resultados da contagem de neurônios c-Fos⁺ demonstraram que houve aumento significativo no número de neurônios c-Fos⁺ quando comparados com os animais do grupo CTL ($t= 2.460$ $df=6$; $*p< 0,0491$, Figura 19 A e B, ver Tabela 1). Enquanto, nas camadas infragranulares do córtex auditivo não houve diferenças estatísticas significativas entre os animais do grupo DEP quando comparado com os animais do grupo CTL (Teste $t=1.313$ $df=6$; Figura 19 A e B, ver Tabela 1).

Figura 18: Efeito da enucleação binocular no córtex auditivo.



Histograma comparando número de neurônios c-Fos⁺ nos grupos CTL e DEP. Observe que houve aumento significativo ($**p< 0,0099$) no número de neurônios c-Fos⁺ no córtex auditivo dos animais do grupo DEP. Para siglas, ver lista de abreviações.

Figura 19: Efeito da enucleação binocular nas camadas do córtex auditivo.



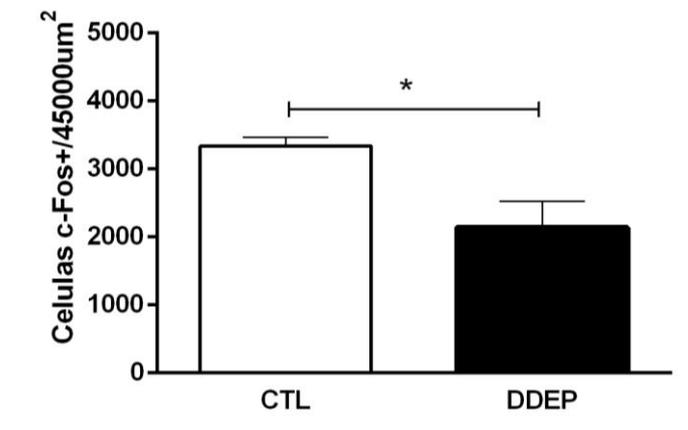
A, fotomicrografia de secção coronal do córtex auditivo de animais do grupo CTL e animais do grupo DEP coradas pela técnica de Nissl (esquerda) e imunomarcadas para c-Fos (centro e direita). Em B, histograma representando o número de neurônios c-Fos⁺ ao longo das camadas do córtex auditivo. Observe que nos animais do grupo DEP houve aumento significativo no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares (**p< 0,0055) e camada granular (*p< 0,0491). Barra de escala 100µ. Para siglas, ver lista de abreviações.

5.3 EFEITO DA PRIVAÇÃO BI-MODAL (ENUCLEAÇÃO BINOCULAR E VIBRISSECTOMIA BILATERAL) NOS CÓRTICES SENSORIAIS ADULTOS

5.3.1 Efeito da privação bi-modal no córtex visual

A privação de duas modalidades sensoriais promoveu alteração no número de neurônios c-Fos⁺ no córtex visual dos animais enucleados e vibrissectomizados bilateralmente (DDEP). Houve uma diminuição significativa no número total de neurônios c-Fos⁺ nos animais do grupo DDEP quando comparado com os animais do grupo CTL ($t = 2.916$ $df=6$; $*p < 0,0268$, Figura 20, ver tabela 1).

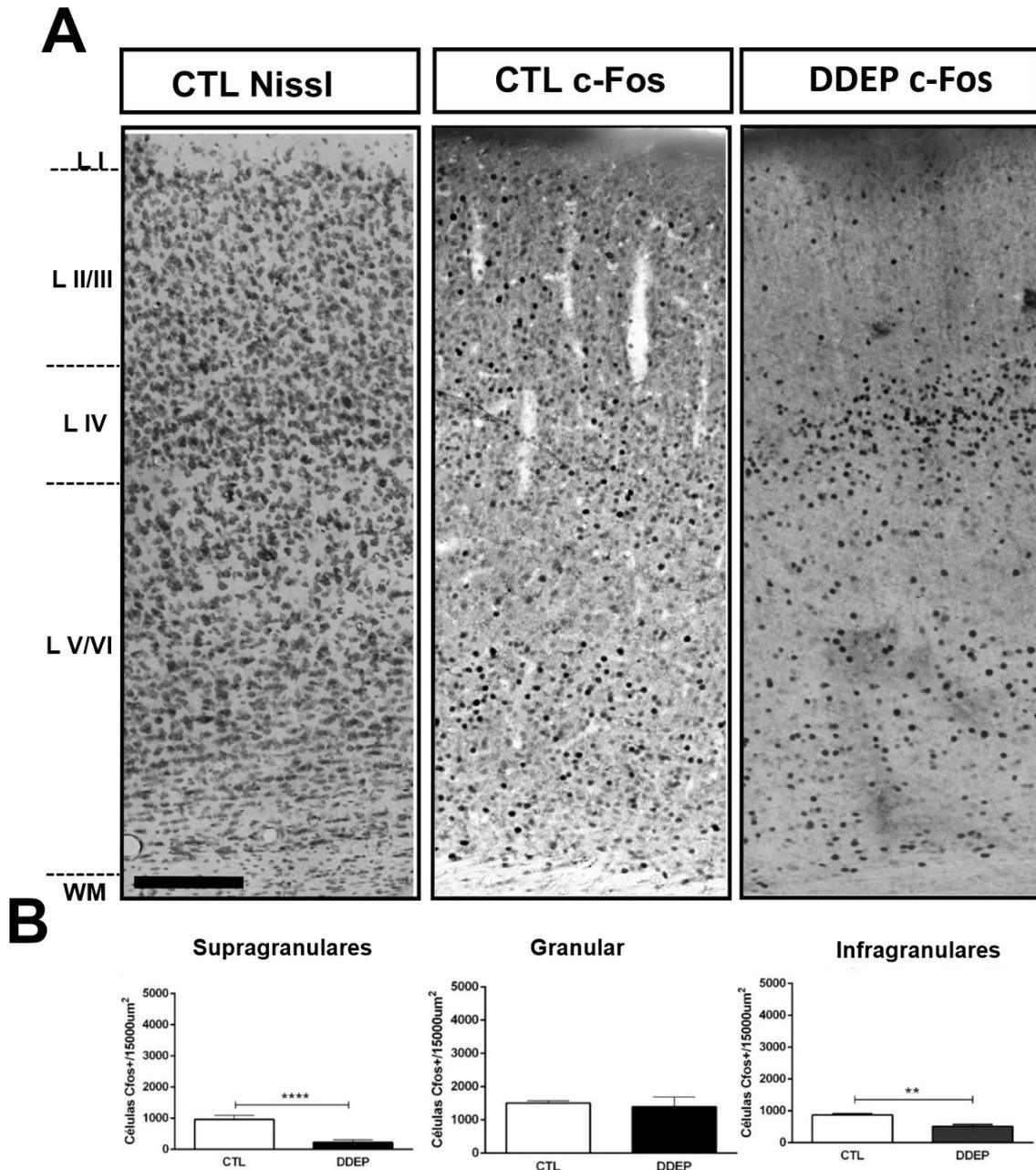
Figura 20: Efeito da privação bi-modal no córtex visual.



Histograma comparando número total de neurônios c-Fos⁺ nos grupos CTL e DDEP. Observe que houve diminuição ($*p < 0,0268$) significativa no número de neurônios c-Fos⁺ animais DDEP. Para siglas, ver lista de abreviações.

Essa redução no número total de neurônios c-Fos⁺ apresentou diferenças significativas ao longo das camadas do córtex visual. Houve redução no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares do córtex visual dos animais do grupo DDEP quando comparados com os animais do grupo CTL ($t = 9.988$ $df=6$; $****p < 0,0001$; Figura 21 A e B; ver Tabela 2; Figura 21 A e B). Em relação a camada granular, não houve diferença do número de neurônios c-Fos⁺ no córtex visual dos animais do grupo DDEP quando comparado com os animais do grupo CTL ($t = 0.3375$ $df=6$; Figura 21 A e B, ver Tabela 2). Finalmente, nas camadas infragranulares, os resultados demonstraram que houve redução no número de neurônios c-Fos⁺ no córtex visual dos animais do grupo DDEP quando comparado com os animais do grupo CTL ($t = 4.592$ $df=6$; $**p < 0,0037$; Figura 21 A e B, ver Tabela 2).

Figura 21: Efeito da privação bi-modal na citoarquitetura das camadas do córtex visual



A, fotomicrografia de secção coronal das camadas do córtex visual de animais do grupo CTL e grupo DDEP coradas pela técnica de Nissl (esquerda) e imunomarcadas para c-Fos (centro e direita). Em B, histograma representando o número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas do córtex visual. Observe que após privação bilateral de duas modalidades sensoriais houve redução significativa no número de neurônios imunomarcados para c-Fos nas camadas supragranulares (**** $p < 0,0001$) e infragranulares (** $p < 0,0037$) do córtex visual. Na camada granular não houve diferença significativa. Barra de escala 100 μ . Para siglas, ver lista de abreviações.

Tabela 2: Número de neurônios c-Fos⁺ nos córtices sensoriais dos animais dos grupos CTL e DDEP.

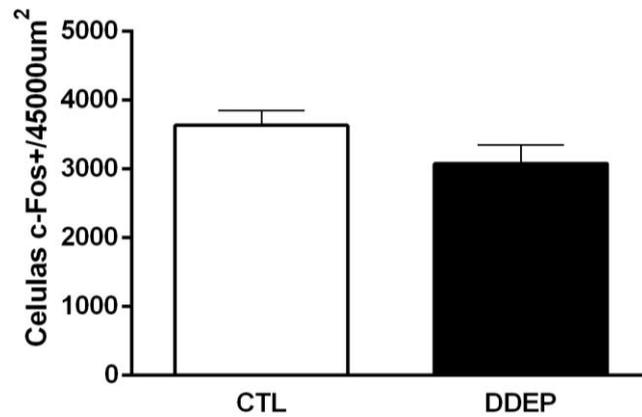
Região cortical	Grupos		
	CTL	DDEP	P
VISUAL	3.334,0 ± 127,00	2.139,0 ± 390,30	0,0268*
Camadas supragranulares	966,00 ± 63,10	231,00 ± 37,80	0,0001****
Camada granular	1.459,00 ± 77,80	1.396,0 ± 300,10	
Camadas infragranulares	867,50 ± 48,70	512,3 ± 60,00	0,0037**
S1 (PMBSF)	3.637,00 ± 215,50	3.079,0 ± 268,00	
Camadas supragranulares	1.140,00 ± 57,60	269,30 ± 5,80	0,0001****
Camada granular	1.859,00 ± 72,90	1.912,00 ± 231,30	
Camadas infragranulares	818,80 ± 52,30	898,50 ± 40,76	
AUDITIVA	2.021,00 ± 33,20	2.710,00 ± 408,90	
Camadas supragranulares	479,80 ± 20,33	564,30 ± 117,00	
Camada granular	804,80 ± 18,79	1.244,00 ± 276,80	
Camadas infragranulares	736,50 ± 23,12	715,00 ± 157,00	

Nota: Ver tabela 1

5.3.2 Efeito da privação simultânea de duas modalidades sensoriais no córtex somestésico

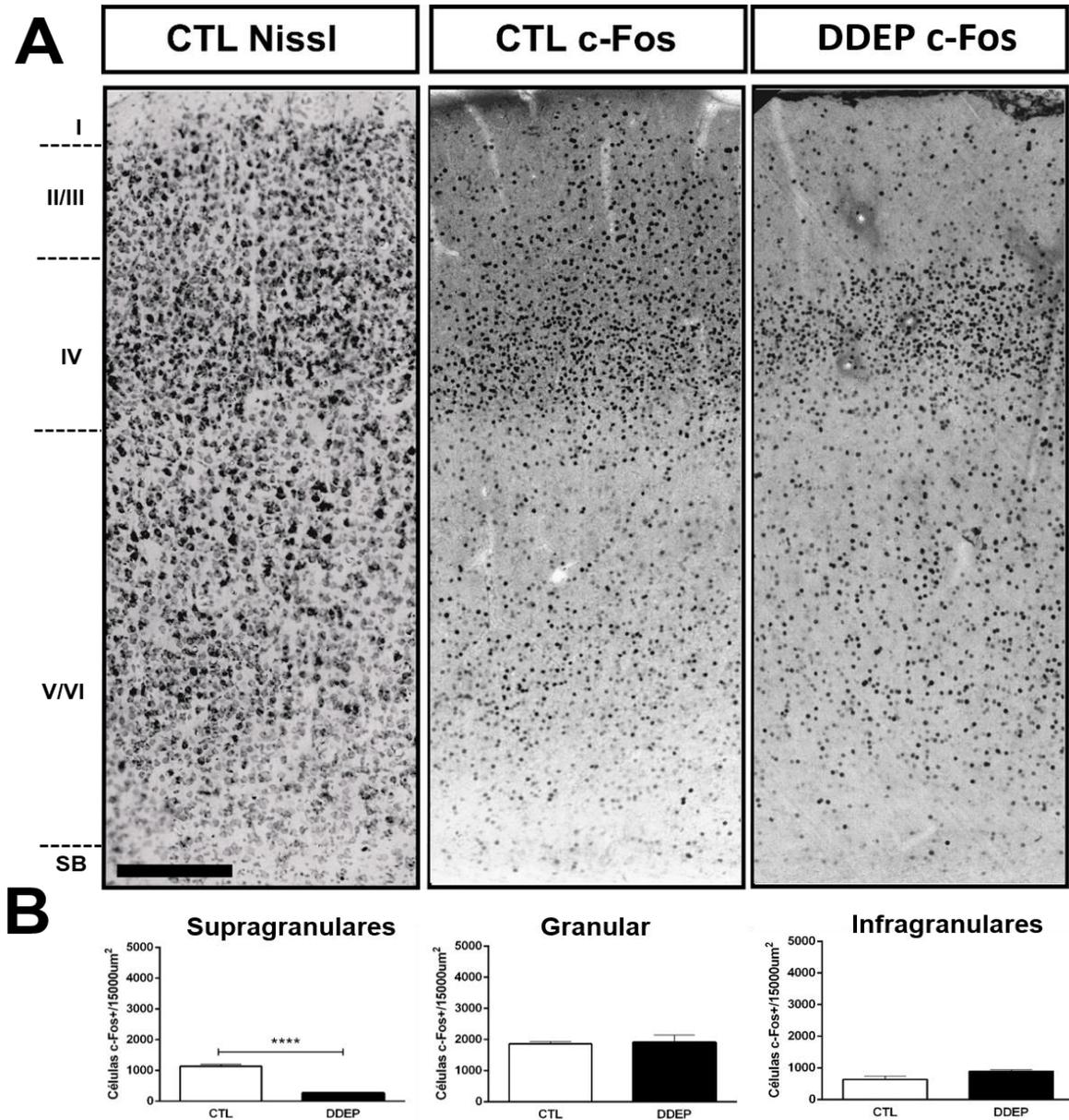
A privação bilateral de duas modalidades sensoriais (enucleação binocular e vibrissotomia) não promoveu alterações significativas no número total de neurônios c-Fos⁺ no córtex somestésico dos animais do grupo DDEP quando comparado com os animais do grupo CTL ($t = 1.621$ $df=6$, Figura 22, ver Tabela 2). Todavia, ocorreram diferenças significativas entre o grupo DDEP e CTL com relação ao número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas do córtex somestésico. Nas camadas corticais supragranulares, ocorreu uma redução significativa no número de neurônios c-Fos⁺ nos animais do grupo DDEP quando comparados com os animais do grupo CTL ($t = 15.02$ $df=6$; **** $p < 0,0001$; Figura 23 A e B, ver Tabela 2). Já na camada granular, não houve diferença no número de neurônios c-Fos⁺ entre os animais do grupo DDEP e CTL ($t = 0.2186$ $df=6$; Figura 23 A e B, ver Tabela 2). Nas camadas infragranulares, assim como na camada granular, também não houve diferença significativa do número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados entre os animais do grupo DDEP e os animais do grupo CTL ($t = 2.290$ $df=6$; Figura 23 A e B, ver Tabela 2).

Figura 22: Efeito da enucleação binocular e da vibrissetomia no córtex somestésico.



Histograma comparando número total de neurônios c-Fos⁺ nos grupos CTL e DDEP. Observe não que houve diferenças significativas no número total de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados no córtex somestésico dos animais do grupo DDEP quando comparado ao número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados no córtex somestésico dos animais do grupo CTL. Para siglas, ver lista de abreviações.

Figura 23: Efeito da enucleação binocular e da vibrissetomia bilateral nas camadas do córtex somestésico.

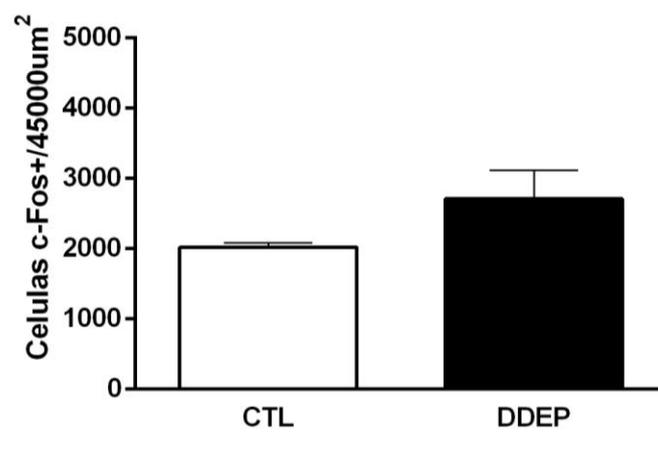


A, fotomicrografia de secção coronal das camadas do córtex somestésico de animais do grupo CTL e grupo DDEP coradas pela técnica de Nissl (esquerda) e imunomarcadas para c-Fos (centro e direita). Em B, histograma representando do número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas do córtex somestésico. Observe que houve uma redução significativa do número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares (**** $p < 0,0001$). Já na camada granular e nas camadas infragranulares não houve diferenças estatísticas significativas no número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados. Barra de escala 100 μ . Para siglas, ver lista de abreviações.

5.3.3 Efeito da privação bi-modal no córtex auditivo

No córtex auditivo, a privação de duas modalidades sensoriais após o fechamento do período crítico de plasticidade não promoveu alterações significativas no número total de neurônios c-Fos⁺ nos animais do grupo DDEP quando comparados com o animais do grupo CTL ($t=1.621$ $df=6$, Figura 24, ver Tabela 2).

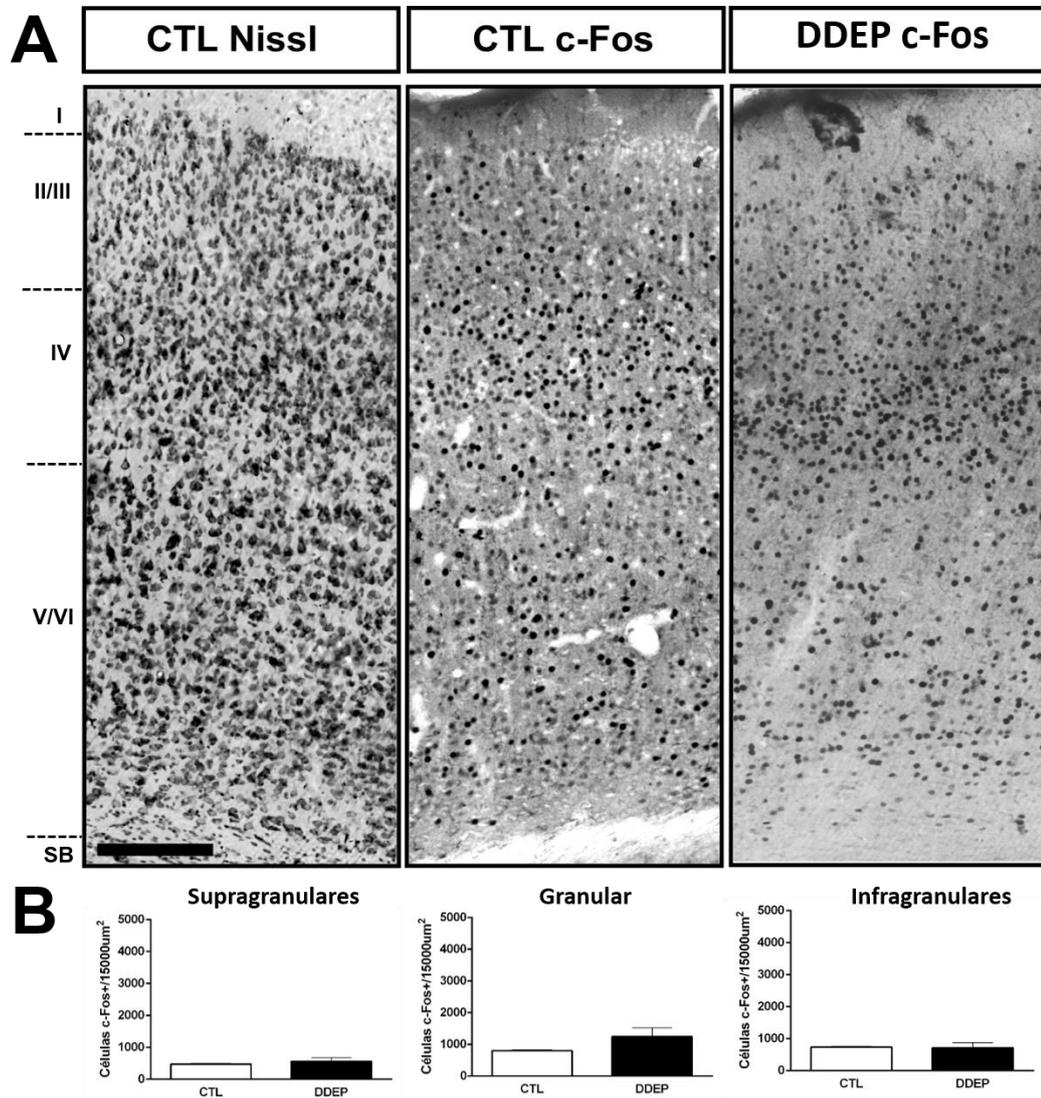
Figura 24: Efeito da enucleação binocular e da vibrissetomia bilateral no córtex auditivo.



Histograma comparando número total de neurônios c-Fos⁺ nos grupos CTL e DDEP. Observe não que houve diferença estatística significativa no número total de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados nos animais do grupo DDEP quando comparado com os resultados dos animais do grupo CTL. Para siglas ver lista de abreviações.

Quando comparamos o número de neurônios Fos⁺ nas camadas do córtex auditivo dos animais do grupo DDEP e do grupo CTL, não houve diferenças significativas nas camadas supragranulares, (Teste $t = 0.7115$ $df=6$, Figura 25 A e B, ver Tabela 2), camada granular ($t= 1.583$ $df=6$, Figura 25 A e B, ver Tabela 2) e camadas infragranulares ($t= 0.1354$ $df=6$, Figura 25 A e B, ver Tabela 2).

Figura 25: Efeito da enucleação binocular e da vibrissectomia bilateral no córtex auditivo.



A, fotomicrografias de secção coronal das camadas do córtex auditivo de animais do grupo CTL e DDEP coradas pela técnica de Nissl (esquerda) e imunomarcadas para c-Fos (centro e direita). Em B, histogramas representando o número de neurônios c-Fos+ nas diferentes camadas do córtex auditivo. Observe que não há diferença entre os grupos. Barra de escala 100 μ . Para siglas, ver lista de abreviações.

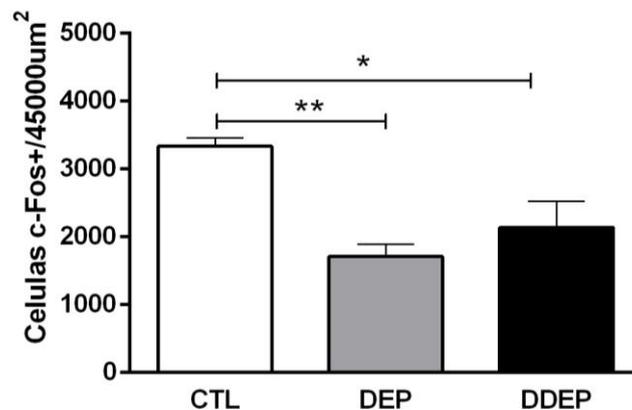
5.4 COMPARAÇÃO INTERGRUPO DA PRIVAÇÃO SENSORIAL BILATERAL APÓS O FECHAMENTO DO PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE.

Após identificar os impactos da privação sensorial bilateral individualmente nos córtices sensoriais visual, somestésico e auditivo, comparamos os grupos DEP e DDEP para verificar se existem diferenças ativação de neurônios c-Fos⁺ quando duas modalidades sensoriais são deaferentadas.

5.4.1 Efeito no córtex visual

Os resultados demonstraram que a privação visual bilateral, assim como a vibrisssectomia bilateral após o fechamento do período crítico de plasticidade, reduziu significativamente ($F_{(2,9)} = 10.49$ e $*p < 0,0045$), o número de neurônios c-Fos⁺ no córtex visual adulto quando comparado com os animais do grupo CTL (Figura 26).

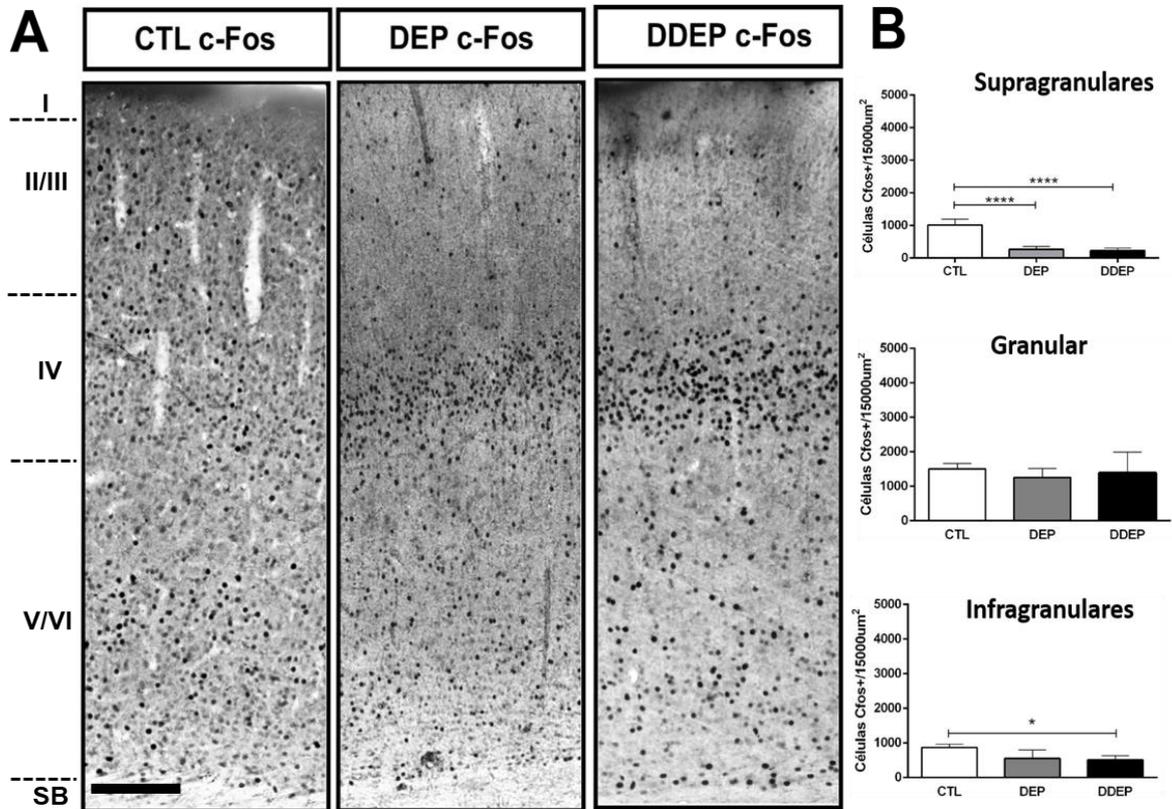
Figura 26: Comparação intergrupos do efeito da privação sensorial no córtex visual.



Histograma comparando número total de neurônios c-Fos⁺ nos grupos CTL, DEP e DDEP. Observe que quando comparamos os grupos experimentais DEP e DDEP com o grupo CTL, a redução no números de neurônios c-Fos⁺ é mais significativa no grupo DEP.

Essa redução no número de neurônios c-Fos⁺ também foi observada nas diferentes camadas do córtex visual. Nas camadas supragranulares, por exemplo, a redução no número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados foi significativa ($F_{(2,9)} = 50.57$ e $*p < 0,0001$) no grupo de animais DEP, bem como nos animais do grupo DDEP quando comparado com os animais do grupo CTL (Figura 27).

Figura 27: Comparação intergrupos do efeito da privação sensorial nas camadas do córtex visual.



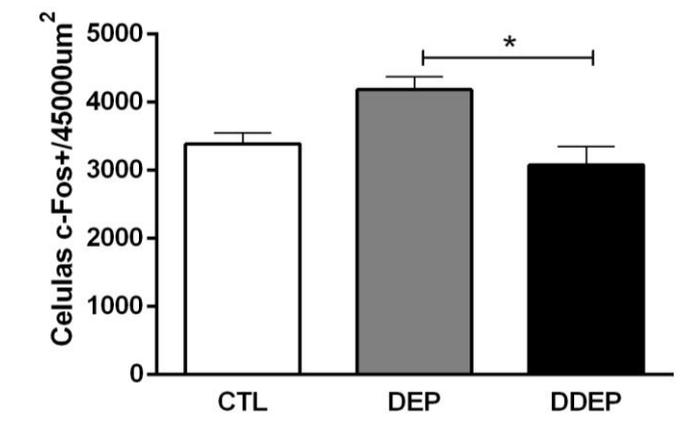
A, fotomicrografias de secção coronal das camadas do córtex visual de animais do grupo CTL, DEP e DDEP coradas pela técnica de Nissl (esquerda) e imunomarcadas para c-Fos (centro e direita). Em B, histograma representando o número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados nas diferentes camadas do córtex visual. Observe que a redução significativa ($*p < 0,0001$) no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares nos grupos experimentais DEP e DDEP quando comparado com o grupo CTL, enquanto na camada granular, não houve diferenças entre os grupos experimentais. Nas camadas infragranulares somente no grupo DDEP a redução foi significativa ($*p < 0,0307$) quando comparado com o grupo CTL. Barra de escala 100 μ . Para siglas, ver lista de abreviações.

Na camada granular, a privação sensorial bilateral não alterou o número de neurônios c-Fos⁺ nos animais dos grupos DEP e nem nos animais do grupo DDEP (Figura 28). Nas camadas infragranulares do córtex visual dos animais do grupo DDEP, a privação sensorial diminuiu significativamente o número de neurônios c-Fos⁺ ($F_{(2,9)} = 50.57$ e $*p < 0,0307$) quando comparados com os animais do grupo CTL (Figura 27).

5.4.2 Efeito no córtex somestésico

No córtex somestésico, os resultados demonstraram que o grupo DDEP apresentou uma redução no número de neurônios c-Fos⁺ quando comparado com o grupo DEP ($F_{(2,9)} = 7.186$ e $*p < 0,0136$) (Figura 28).

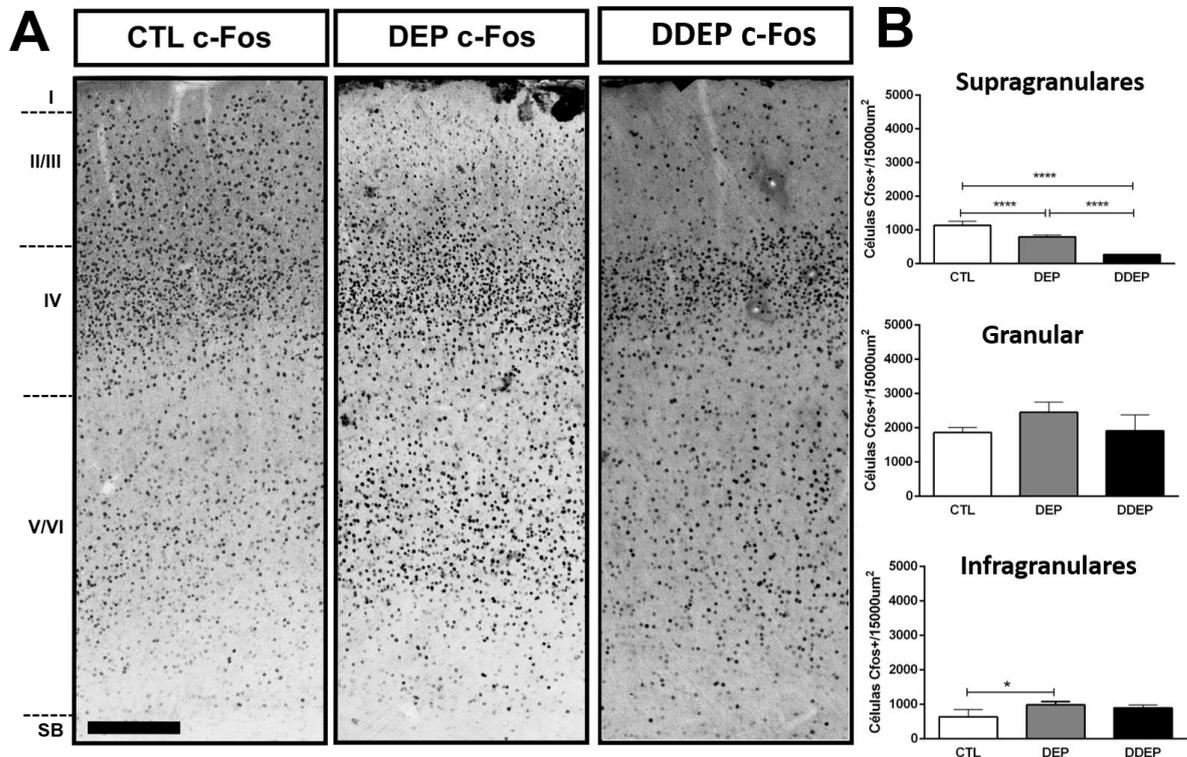
Figura 28: Comparação intergrupos do efeito da privação sensorial no córtex no córtex somestésico.



Histograma comparando número total de neurônios c-Fos⁺ nos grupos CTL, DEP e DDEP. Observe que a redução no números de neurônios c-Fos⁺ é significativa quando comparamos o grupo experimental DEP com o DDEP, entretanto, quando comparamos os dois grupos experimentais com o grupo CTL, não houve diferenças no números de neurônios c-Fos⁺ no córtex somestésico.

Ao longo das camadas do córtex somestésico, a privação sensorial também promoveu alterações significativas no número de neurônios c-Fos⁺. Na comparação do grupo DEP e DDEP, houve uma redução significativa ($F_{(2,9)} = 139,3$ e $****p < 0,0001$) no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares quando comparados com o grupo CTL, assim como quando comparamos os grupos DEP e DDEP (Figura 29 B).

Figura 29: Comparação intergrupos do efeito da privação sensorial nas camadas do córtex somestésico.



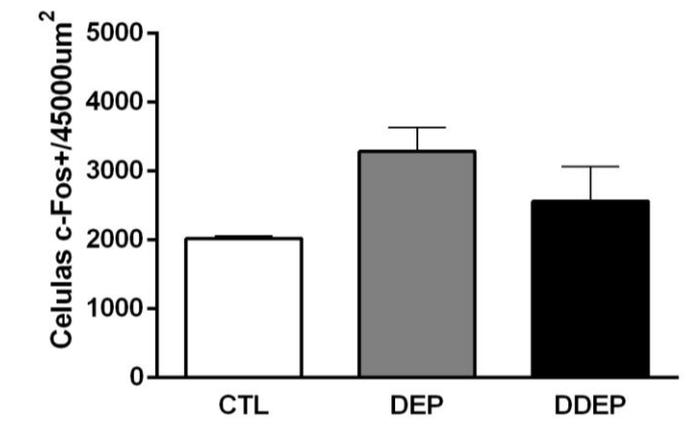
A, fotomicrográficas de secção coronal das camadas do córtex somestésico de animais do grupo CTL, DEP e DDEP coradas pela técnica de Nissl (esquerda) e imunomarcadas para c-Fos (centro e direita). Em B, histograma representando o número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados nas diferentes camadas do córtex somestésico. Observe a redução significativa ($****p < 0,0001$) no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares nos grupos experimentais DEP e DDEP quando comparado com o grupo CTL. Na camada granular, não houve diferenças entre os grupos experimentais CTL, DEP e DDEP, enquanto, nas camadas infragranulares no grupo DEP, houve aumento significativo ($*p < 0,018$) no número de neurônios c-Fos⁺ quando comparado com o grupo CTL. Barra de escala 100µ. Para siglas, ver lista de abreviações.

Não houve diferença no número de neurônios c-Fos⁺ na camada granular do córtex somestésico dos animais do grupo DEP e grupo DDEP quando comparados com o grupo CTL (Figura 29 B). Entretanto, nas camadas infragranulares do córtex somestésico, o número de neurônios c-Fos⁺ foi maior nos animais do grupo DEP ($F_{(2,9)} = 6.413$ e $*P = < 0.0186$) do que noCTL (Figura 29 B).

5.4.3 Efeito no córtex auditivo

A privação sensorial não alterou o número de total de neurônios c-Fos⁺ no córtex auditivo de animais dos grupo DEP e DDEP (Figura 30).

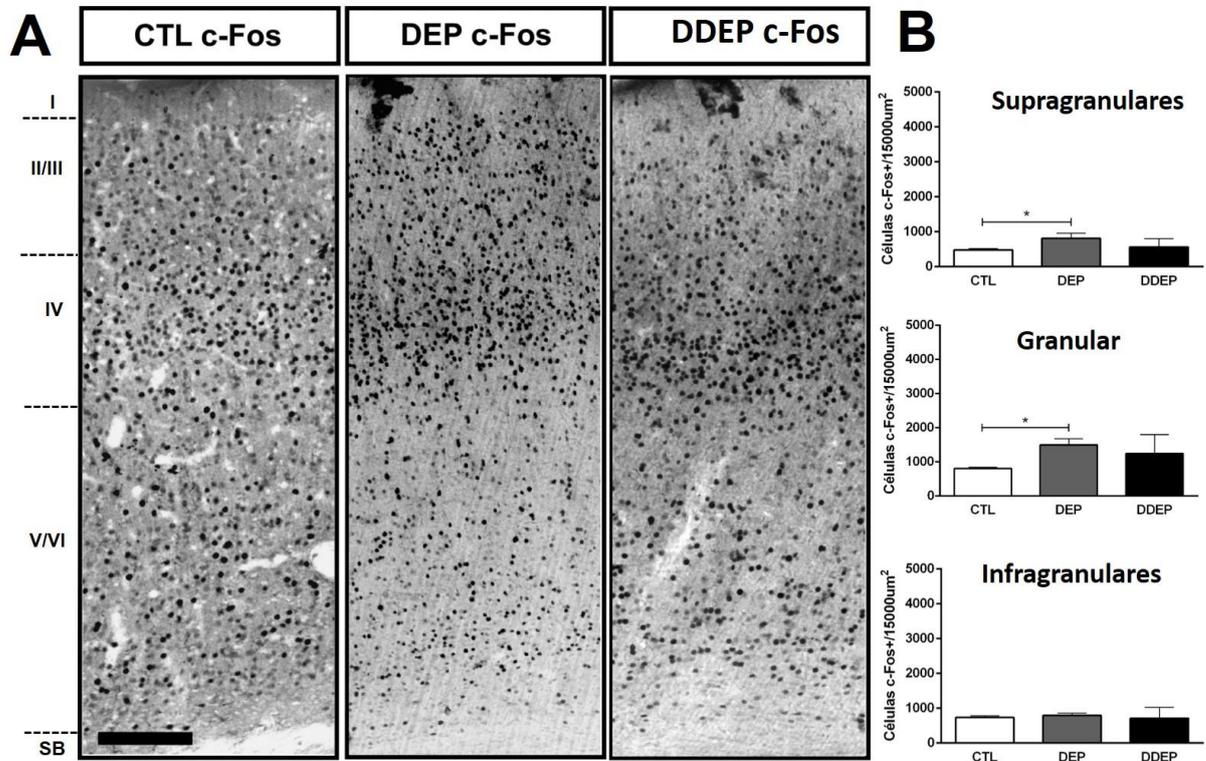
Figura 30: Comparação intergrupos do efeito da privação sensorial no córtex auditivo.



Histograma comparando número total de neurônios c-Fos⁺ nos grupos CTL, DEP e DDEP. Observe que não houve diferenças no número de neurônios c-Fos⁺ no córtex auditivo entre os grupos experimentais DEP e DDEP quando comparados com o grupo CTL.

Entretanto, a privação sensorial alterou o número de neurônios c-Fos⁺ ao longo das camadas supragranulares e granular do córtex auditivo do grupo DEP. Nas camadas supragranulares ($F_{(2,9)}=4.445$ e $*P < 0,0454$) e camada granular ($F_{(2,9)}=4.313$ e $*p < 0,0486$) do córtex auditivo do grupo DEP, a privação sensorial aumentou o número de neurônios c-Fos⁺ quando comparado ao grupo CTL (Figura 31 B). Nas camadas infragranulares não houve diferenças entre os grupos experimentais.

Figura 31: Comparação intergrupos do efeito da privação sensorial nas camadas do córtex auditivo.



A, fotomicrográficas de secção coronal das camadas do córtex auditivo de animais do grupo CTL, DEP e DDEP coradas pela técnica de Nissl (esquerda) e imunomarcadas para c-Fos (centro e direita). Em B, histograma representando o número de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados nas diferentes camadas do córtex auditivo. Observe que o aumento significativo no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares ($*P < 0,0454$) e granular ($*p < 0,0486$) foi observado somente no grupo experimental DEP quando comparado com o grupo controle, enquanto, nas camadas infragranulares não houveram diferenças estatísticas no número de neurônios c-Fos⁺ entre os grupos experimentais. Barra de escala 100 μ . Para siglas, ver lista de abreviações.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, demonstramos que a privação sensorial bilateral causa reorganização cruzada nos córtices sensoriais de ratos adultos. A reorganização cruzada foi evidenciada a partir do padrão de ativação neuronal revelada com a marcação para proteínas expressas pelo gene imediato c-Fos.

Alguns genes imediatos (p. ex. c-Fos) vêm sendo largamente estudados em estudos de neuroplasticidade nos últimos anos, pois sua expressão reflete a atividade funcional dos córtices visual (Takahata e Kaas 2017; Pereira, Freire et al. 2018) somestésico (Kaliszewska, Bijata et al. 2012; Kaliszewska e Kossut 2015) e auditivo (Pernia, Estevez et al. 2017; Wang, Wu et al. 2017). Esses resultados demonstram a utilidade da marcação de genes imediatos, como o c-Fos, como marcadores de mudanças na atividade elétrica neuronal associadas com a neuroplasticidade em modelos de privação sensorial.

Os nossos resultados demonstram que o córtex visual de ratos adultos, após 60 dias de enucleação binocular, sofre reorganização sináptica evidenciada pela diminuição no número de neurônios c-Fos⁺, principalmente nas camadas supragranulares (Figura 15 B). As camadas supragranulares abrigam os neurônios de origem das conexões intercorticais e a perda dos *inputs* visuais causa uma diminuição da atividade neuronal dessa camada. No córtex somestésico, também ocorre uma diminuição no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares. Entretanto, essa diminuição é menos pronunciada do que no córtex visual e é compensada por um aumento no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas granular e infragranular. A camada granular é o alvo das aferências talâmicas nos córtices primários, enquanto as camadas infragranulares contêm os neurônios de origem das conexões cortico-talâmicas. No córtex auditivo, a enucleação binocular causa um aumento no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares e camada granular (Figura 19). Esse padrão de reorganização dos circuitos laminares nas áreas sensoriais primárias do rato adulto em decorrência da enucleação binocular reflete o rearranjo funcional para compensação da perda sensorial restrita à modalidade visual. Como o rato (*Rattus norvegicus*) é um animal de hábitos noturnos, cujo comportamento depende bastante da função somestésica, os rearranjos compensatórios cruzados são mais evidentes no córtex primário associado com essa modalidade. O aumento no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas granular e infragranulares provavelmente reflete um

reforço nas conexões com núcleos talâmicos envolvidos com o processamento de informações somestésicas. A participação do córtex auditivo na compensação funcional em decorrência da perda dos aferentes visuais parece ser secundária, tendo em vista o padrão laminar dos rearranjos nos circuitos desta área sensorial demonstrado em nossos resultados.

Para verificar com mais detalhes o padrão diferencial de rearranjo de circuitos dependente de privação sensorial, um grupo de animais foi enucleado e vibrissectomizado bilateralmente. Os resultados demonstram uma diminuição substancial no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares do córtex visual, concomitante a uma diminuição no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas infragranulares. Também ocorre uma diminuição substancial no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares do córtex somestésico, mas nenhuma diferença significativa nas camadas corticais de córtex auditivo. Os resultados com privação simultânea de duas modalidades sugerem: 1) a deaferentação sensorial causa uma queda abrupta na atividade de neurônios localizados nas camadas supragranulares na área primária afetada, normalmente associados com conexões intercorticais com outras áreas; 2) a deaferentação sensorial causa um aumento no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas granulares de áreas sensoriais primárias não afetadas diretamente pela deaferentação, provavelmente associado com o papel compensatório assumido por essas áreas; 3) Os perfis opostos de variação na atividade de neurônios localizados nas camadas supragranulares dos córtices somestésico e auditivo após deaferentação visual sugere que o perfil compensatório dessas áreas é diferente e, provavelmente, está relacionado com o tipo de informação sensorial processada em seus circuitos: tanto o córtex auditivo como córtex visual processam informações com origem alocêntrica, diferente do córtex somestésico que processa sinais sensoriais idiocêntricos; 4) O SNC adulto mantém a capacidade de reorganização cruzada dos córtices sensoriais, e, este mecanismo pode refletir um ajuste do SNC para compensar a falta da aferência sensorial periférica.

6.1 PLASTICIDADE DE MODALIDADE CRUZADA NO CORTEX VISUAL

6.1.1 Os Circuitos Neurais Intralaminares

Goel e colaboradores (2006) demonstraram em camundongos que a privação visual por restrição de luminosidade durante 7 dias aumentou a transmissão sináptica

excitatória mediada pelo receptor AMPA (AMPA) no córtex visual primário (V1). Entretanto, nesse mesmo trabalho, os autores mostraram nos córtices somestésico primário (S1) e auditivo primário (A1) uma redução da transmissão sináptica excitatória (Goel et al., 2006). Em V1, o reforço nas sinapses excitatórias pode contribuir para o processamento de *inputs* subliminares de outras modalidades sensoriais, como por exemplo, somestésica e auditiva, enquanto em S1 e A1 a diminuição nos níveis de excitação em circuitos intrínsecos contribui para aprimorar as propriedades do campo receptor e refinar o processamento do impulso sensorial em curso (Goel et al., 2006). O desequilíbrio na relação excitação/inibição causada pela privação sensorial parece proporcionar um ambiente favorável à mudanças sinápticas nos circuitos do córtex visual (Sammons e Keck 2015) contribuindo para o desmascaramento de aferentes provenientes de córtices vizinhos (Toldi, Rojik et al. 1994; Lam e Sherman 2010; Petrus, Rodriguez et al. 2015). Essas alterações no equilíbrio excitação/inibição nos circuitos do córtex cerebral (Keck, Mrsic-Flogel et al. 2008; Desgent e Ptito 2012) podem explicar a reorganização observada no córtex visual em nosso trabalho, após enucleação bilateral. Nossos resultados demonstram que a enucleação bilateral reduziu significativamente o número de neurônios c-Fos⁺ ativados nas camadas supragranulares (Figura 15 B). Essas camadas recebem projeções de *feedback* de outras áreas visuais de processamentos superiores (e também de outros córtices sensoriais) (De Pasquale e Sherman 2011), portanto, é possível que a ativação dos neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares do córtex visual tenha sido em decorrência do “desmascaramento” de conexões cortico-corticais laterais preexistentes das camadas II e III que são formadas durante o desenvolvimento e transportam informações de outras modalidades sensoriais, como por exemplo, auditivas e/ou somestésicas, e são refinadas e fortalecidas em condições de privação sensorial (Iurilli, Ghezzi et al. 2012; Lee e Whitt 2015).

6.1.2. Circuitos Neurais Subcorticais

Uma outra hipótese para ativação de neurônios c-Fos⁺ observada no córtex visual dos ratos adultos bilateralmente enucleados em nosso trabalho pode ser em decorrência de mudanças no padrão de projeção nas vias subcorticais após privação sensorial (Toldi, Rojik et al. 1994; Karlen, Kahn et al. 2006; Mezzera e Lopez-Bendito 2016). O tálamo é um importante centro de retransmissão aferentes de *inputs*

provenientes da periferia sensorial e envia eferentes para o córtices sensoriais primários. Por exemplo, o núcleo geniculado lateral (NGL), o núcleo talâmico relé visual, retransmite os sinais visuais oriundo da retina para o córtex (V1); o núcleo geniculado medial (NGM) é o relé talâmico “auditivo” que liga o colículo inferior (IC) e o córtex auditivo primário (A1) e o núcleo ventral posterior – medial e lateral (VP) é o relé talâmico “somestésico” que recebe sinais táteis e os transmite para o córtex somestésico primário (S1) (Henschke, Noesselt et al. 2015). Os nossos resultados com enucleação bilateral demonstraram um aumento compensatório no número de neurônios c-Fos⁺ na camada granular dos córtices sensoriais somestésico e auditivo (Figuras 17 e 19 B), sugerindo uma maior atividade nas vias tálamo-corticais para essas regiões. Nos experimentos com privação bi-modal, ocorreu um aumento (sem significância estatística, entretanto) na camada granular do córtex auditivo, a única área das 3 estudadas a permanecer com aferentes periféricos.

Além disso, o tálamo também pode receber projeções de *feedback* do córtex cerebral através de projeções cortico-talâmicas (Cudeiro e Sillito 2006; Lam e Sherman 2010). Estudos morfológicos usando injeção de neurorastreadores retrogradados demonstraram a existência de núcleos sensoriais talâmicos que projetam para dois ou mais córtices sensoriais primários (Henschke, Noesselt et al. 2015), além da existência de uma rede de conexões corticais interconectadas (Gamanut, Kennedy et al. 2018). Em nossos resultados, o padrão de ativação de neurônios c-Fos⁺ na camada granular do córtex visual (Figura 21) sugere que a ativação desses neurônios pode ser, pelo menos em parte, resultado da reorganização das projeções provenientes de núcleos talâmicos, como foi demonstrado em outros estudos (Qin e Yu 2013; Henschke, Noesselt et al. 2015). Logo, é provável que a neuroplasticidade adaptativa observada na camada granular após 60 dias de enucleação bilateral no córtex visual adulto em nosso trabalho, tenha sido, pelo menos em parte, decorrência do rearranjo das vias tálamo-corticais que se projetam aos córtices sensoriais primários (Qin e Yu 2013; Henschke, Noesselt et al. 2015; Wang, Wu et al. 2017), somado a reorganização dos circuitos intralaminar nas camadas corticais (Chabot, Robert et al. 2007; Petrus, Rodriguez et al. 2015).

Neste trabalho, não usamos neurotraçadores para identificar rearranjos nas vias de projeção aferente e eferente para as áreas afetadas (ver considerações técnicas). Porém, o padrão de ativação dos neurônios c-Fos⁺ nas camadas corticais apresentados corrobora os achados de outros trabalhos (Bavelier e Neville 2002;

Piche, Chabot et al. 2007) que demonstraram ativação de neurônios c-Fos⁺ no córtex visual após privação visual bilateral (Wang, Wu et al. 2017; Pereira, Freire et al. 2018).

6.1.3 Circuitos neurais cortico-corticais

Um outro mecanismo, sem excluir os outros já citados acima, que também pode estar envolvido nas mudanças plásticas de modalidade cruzada observadas em nosso trabalho são as modificações que ocorrem no circuitos córtico-corticais após privação sensorial.

Quando ocorre a perda do *input* da periferia sensorial (como na cegueira ou surdez, por exemplo), as modalidades sensoriais “intactas” que não perderam a aferência sensorial podem fortalecer suas conexões para compensar a perda sensorial, bem como recrutar os neurônios das áreas que perderam a aferência para o processamento de informações de outras modalidades sensoriais (Goel, Jiang et al. 2006; Nys, Scheytjens et al. 2015). Esse fenômeno demonstra que os córtices sensoriais primários não funcionam isoladamente, mas são influenciados por outros córtices (com diferentes funções sensoriais, motoras e/ou cognitivas) e recebem aferências de outras áreas do sistema nervoso central (Ghazanfar e Schroeder 2006; Henschke, Noesselt et al. 2015).

Essa hipótese é reforçada por um estudo recente envolvendo privação sensorial bilateral auditiva (surdez experimental) em ratos adultos (Pernia et al., 2017). Neste estudo, os autores demonstraram aumento significativo no número total de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares II, III, camada granular e camada infragranular VI do córtex visual dos ratos surdos. Ao mesmo tempo, neurônios do córtex auditivo destes ratos também foram ativados para processamento da informação sensorial (Pernia, Estevez et al. 2017).

Os nossos resultados corroboram achados de outros trabalhos que demonstraram que, após enucleação bilateral, os neurônios do córtex visual adulto são recrutados para o processamento de informações sensoriais de outras modalidades sensoriais, constituindo assim, um dos substrato para a neuroplasticidade de modalidade cruzada (Piche, Chabot et al. 2007; Van Brussel, Gerits et al. 2011; Pernia, Estevez et al. 2017; Wang, Wu et al. 2017). Entretanto, mais estudos necessitam ser realizados para identificar as implicações fisiológicas e funcionais destes achados.

6.2 PLASTICIDADE DE MODALIDADE CRUZADA NOS CÓRTICES SOMESTÉSICO E AUDITIVO

A plasticidade de modalidade cruzada demonstrada em nossos resultados permite-nos assumir que o córtex somestésico e/ou o córtex auditivo podem estar recrutando os neurônios c-Fos⁺ do córtex visual (Figura 14 e 15 B) para processamento de informação sensorial, como mostrou Chabot e colaboradores (2007) em um trabalho de privação visual. Nesse trabalho os autores mostraram que neurônios c-Fos⁺ foram ativados nas camadas supragranulares e granular do córtex visual dos camundongos enucleados bilateral e na camada granular de camundongos mutantes ZRDCT (anafitálmico), bem como em todas as camadas do córtex auditivo.

Essa neuroplasticidade de modalidade cruzada, onde a área cortical cerebral associada à modalidade sensorial deaferentada passa a responder a estímulos associados as modalidades sensoriais remanescentes pode refletir um ajuste do SN para compensar a falta da aferência sensorial periférica (Bavelier e Neville 2002), e vem sendo confirmada por vários trabalhos.

Recentemente, Pernia e colaboradores (2017) demonstraram em ratos adultos que após 90 dias de privação auditiva bilateral, houve ativação de neurônios c-Fos⁺ no córtex deaferentado (auditivo) e um aumento no número total de neurônios c-Fos⁺ imunomarcados em todas as camadas do córtex aferentado (visual). Em nosso trabalho, os resultados também demonstraram ativação de neurônios c-Fos⁺ no córtex deaferentado (visual) (Figura 14) e um aumento no número de neurônios c-Fos⁺ ativados nas camadas dos córtices aferentados (Figuras 16 e 18). Entretanto, diferente do trabalho de Pernia e colaboradores (2017), que quantificou o número de neurônios c-Fos⁺ apenas no córtex sensorial aferentado (visual), em nosso trabalho quantificamos o número de neurônios c-Fos⁺ em dois córtices sensoriais aferentados (somestésico e auditivo) e demonstramos que houve uma redução no número de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares do córtex aferentado (somestésico) dos ratos enucleados (Figura 17 B). Essa redução nas camadas supragranulares do córtex somestésico pode ser em consequência da redução da transmissão sináptica excitatória mediada pelo receptor AMPA (AMPA) da camada granular para as camadas supragranulares, como mostrou Nakajima e colaboradores (2016). em células do PMBSF de ratos após privação visual. Em nosso trabalho, o córtex auditivo dos animais enucleados, os resultados mostraram aumento no número de neurônios

c-Fos⁺ nas camadas supragranulares e granular (Figura 19 B) que pode ser devido ao fortalecimento sináptico das aferências tálamo-corticais para camada granular de A1 (Petrus, Isaiah et al. 2014) somado ao refinamento e fortalecimento das conexões entre a camada granular e as camadas supragranulares do córtex auditivo primário (Lee e Whitt 2015; Meng, Kao et al. 2015).

Os ajustes sinápticos em conexões intercorticais não é necessariamente o único mecanismo para compensação sensorial frente a falta da aferência sensorial periférica. A compensação pode envolver uma combinação de recrutamento do córtex deaferentado pelos córtices sensoriais aferentados e a reorganização de estruturas corticais e subcorticais associadas com os córtices sensoriais aferentados.

6.3 PLASTICIDADE DE MODALIDADE CRUZADA COM PRIVAÇÃO DE DUAS MODALIDADES SENSORIAIS.

Os nossos resultados demonstram que após privação visual bilateral os circuitos do córtex visual de animais adultos passa por modificações plásticas, demonstrada pela ativação de neurônios c-Fos⁺ nas camadas do córtex visual mesmo após fechamento do período crítico de neuroplasticidade. A hipótese é que essas modificações compensatórias decorrem pelo menos em parte de modificações sinápticas em aferentes intercorticais provenientes de áreas sensoriais associadas com outras modalidades. Estudos anteriores com privação visual em ratos neonatos demonstraram expansão na representação das vibrissas mistaciais no córtex somestésico (Toldi, Farkas et al. 1994; Thinus-Blanc e Gaunet 1997) provocando um aumento compensatório do papel do sistema somestésico na percepção sensorial. A questão a ser respondida agora é: ao eliminar também os *inputs* da modalidade somestésica, o que ocorre na reorganização do córtex visual privado de aferentes sensoriais?

Para isto, combinamos a privação visual bilateral com a inativação de uma segunda modalidade sensorial, retirando por cauterização todas as vibrissas de ambos os lados face dos animais enucleados. As vibrissas são órgãos táteis muito importantes no comportamento de roedores e são utilizados da mesma maneira que os dedos de humanos para localização espacial e identificação de objetos. Nossos resultados demonstraram ativação de neurônios c-Fos⁺ em todas as camadas dos córtex visual após privação simultânea de duas modalidades sensoriais (Figura 21 B).

O padrão de marcação evidenciado nas camadas do córtex visual pode ser consequência de modificações estruturais das projeções tálamo-corticais para o córtex visual, uma vez que a camada granular é o alvo primário das projeções oriundas dos núcleos talâmicos visuais. Estudos anatômicos dão suporte a esta hipótese quando demonstram a existência de núcleos sensoriais talâmicos que se projetam para dois ou mais córtices sensoriais primários (Henschke, Noesselt et al. 2015). Portanto, a ativação dos neurônios c-Fos⁺ na camada granular do córtex visual após privação de duas modalidades pode ser, pelo menos em parte, em decorrência da reorganização das projeções provenientes desses núcleos talâmicos.

6.4 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS

Os estudos modernos de plasticidade cruzada iniciaram na década de 1970, quando foi demonstrado em gatos surdos congênitos que neurônios do córtex auditivo eram ativados por estímulos visuais e somestésicos (Rebillard et al., 1977). De lá até os dias atuais, vários outros estudos foram realizados em diferentes modelos experimentais para compreender os mecanismos que podem estar atuando para neuroplasticidade adulta, camundongo (Petrus, Rodriguez et al. 2015); rato (Pernia, Estevez et al. 2017); hamster (Izraeli, Koay et al. 2002); gerbil (Henschke, Noesselt et al. 2015); gato (Clemo, Lomber et al. 2016); macaco (Wang, Wu et al. 2017); humano (Sadato, Pascual-Leone et al. 1996). Entretanto, ainda existem controvérsias em relação aos mecanismos que desencadeiam essas mudanças plásticas no SNC. Isso se deve, em parte, à utilização de modelos experimentais distintos e/ou ao estágio do desenvolvimento do animal quando é submetido à perda sensorial e/ou aos diferentes paradigmas de privação sensorial.

Neste projeto buscamos investigar quais os efeitos da privação sensorial bilateral de duas modalidades sensoriais na neuroplasticidade cruzada após período crítico de plasticidade nos córtices sensoriais visual, somestésico e auditivo. Para isto, realizamos a privação sensorial bilateral (visual e somestésica), fazendo transecção do nervo óptico e retirando por cauterização todas as vibrissas mistaciais face dos animais em P90. Posteriormente realizamos a imunohistoquímica para gene imediato c-Fos, uma técnica imunohistoquímica muito utilizada em estudo de neuroplasticidade cortical (Piche, Chabot et al. 2007; Pernia, Estevez et al. 2017; Wang, Wu et al. 2017)

Nosso projeto é pioneiro, porque é o primeiro estudo que busca identificar os mecanismos subjacentes da neuroplasticidade de modalidade cruzada nos três córtices sensoriais visual, somestésico e auditivo adulto e associando duas técnicas de privação sensorial experimental (enucleação por transecção do nervo óptico e vibrissectomia das vibrissas da face). As técnicas de privação sensorial utilizadas no presente estudo eliminam toda atividade espontânea dos receptores periféricos e são bastante utilizados em estudos de neuroplasticidade cruzada (Van Brussel, Gerits et al. 2011; Nys, Aerts et al. 2014; Nys, Scheyltjens et al. 2015; Wang, Wu et al. 2017).

Uma limitação técnica do nosso trabalho é que os efeitos funcionais da privação sensorial foram estudados de forma indireta, através da imunohistoquímica para o gene imediato c-Fos, que apresenta inúmeras vantagens como marcador neuronal e

atualmente vem sendo bastante utilizada em estudos de plasticidade (Piche, Chabot et al. 2007; Pernia, Estevez et al. 2017; Wang, Wu et al. 2017). A marcação imunohistoquímica com genes imediatos reflete a atividade imediata de um neurônio a um evento sensorial ou motor (Van Der Gucht, Vandenbussche et al. 2000). Entretanto, é importante confirmar os resultados apresentados neste trabalho utilizando outras técnicas de avaliação da atividade neuronal, como o registro eletrofisiológico com eletrodos intracorticais.

A continuação do projeto será a realização de injeções de neurorastreadores anterógrados nos córtices sensoriais para identificar a localização exata dos corpos celulares dos neurônios que estão se projetando aos córtices sensoriais, bem como, investigar como as estruturas subcorticais estão organizadas em animais deafferentados bi-modais e, através de experimentos comportamentais, examinar como esta reorganização afeta funções comportamentais específicas.

7 CONCLUSÃO

A privação sensorial bilateral visual altera o número total de neurônios c-Fos⁺ no córtex visual, não altera o número total de neurônios c-Fos⁺ no córtex somestésico e aumenta o número total de neurônios c-Fos⁺ no córtex auditivo. A privação visual bilateral induz arranjos compensatórios no córtex auditivo. Ambos córtices sensoriais (visual e auditivo) são importantes para estratégias de navegação alotética, baseada em pistas sensoriais oriundas de fontes externas ao animal.

A privação sensorial simultânea de duas modalidades (visual e somestésica) bilateral altera o número total de neurônios c-Fos⁺ no córtex visual, não altera o número total de neurônios c-Fos⁺ no córtices somestésico e auditivo. A privação de duas modalidades não induz rearranjo compensatório no córtex auditivo. Provavelmente, isso decorre da necessidade de otimizar os recursos metabólicos para priorizar os rearranjos plásticos necessários para a compensação somestésica intrínseca decorrente da perda das aferências das vibrissas através do uso de outros sensores somestésicos espalhados pelo corpo (dígitos, face, etc.).

A privação sensorial bilateral de uma modalidade sensorial: 1) diminui o número total de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares dos córtices visual e somestésico, 2) não altera o número de neurônios na camada granular do córtex visual e nas camadas infragranulares dos córtices visual e auditivo, 3) aumenta o número de neurônios nas camadas supragranulares do córtex auditivo, na camada granular dos córtices somestésico e auditivo e nas camadas infragranulares do córtex somestésico.

A privação sensorial bilateral de duas modalidades sensoriais: 1) diminui o número total de neurônios c-Fos⁺ nas camadas supragranulares dos córtices visual e somestésico e também nas camadas infragranulares do córtex visual, 2) não altera o número de neurônios nas camadas supragranulares do córtex auditivo, na camada granular dos córtices visual, somestésico e auditivo, e também nas camadas infragranulares dos córtices somestésico e auditivo.

Possivelmente, essas alterações intralaminares no número total de neurônios c-Fos⁺ decorre de rearranjos locais estruturais (sinapses) e moleculares (PGSC, BDNF, NGF, GDNF, parvalbumina, GAD65) nas camadas corticais que ocorrem após privação sensorial no SNC adulto.

BIBLIOGRAFIA

- Allman, B. L., L. P. Keniston, et al. (2009). "Adult deafness induces somatosensory conversion of ferret auditory cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(14): 5925-5930.
- Amedi, A., N. Raz, et al. (2003). "Early 'visual' cortex activation correlates with superior verbal memory performance in the blind." Nat Neurosci **6**(7): 758-766.
- Arckens, L., U. T. Eysel, et al. (1998). "Effect of sensory deafferentation on the GABAergic circuitry of the adult cat visual system." Neuroscience **83**(2): 381-391.
- Arckens, L., E. Van Der Gucht, et al. (2000). "Investigation of cortical reorganization in area 17 and nine extrastriate visual areas through the detection of changes in immediate early gene expression as induced by retinal lesions." J Comp Neurol **425**(4): 531-544.
- Bading, H., D. D. Ginty, et al. (1993). "Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways." Science **260**(5105): 181-186.
- Bahia, C. P., J. C. Houzel, et al. (2008). "Spatiotemporal distribution of proteoglycans in the developing rat's barrel field and the effects of early deafferentation." J Comp Neurol **510**(2): 145-157.
- Bauer, C. M., G. V. Hirsch, et al. (2017). "Multimodal MR-imaging reveals large-scale structural and functional connectivity changes in profound early blindness." PLoS One **12**(3): e0173064.
- Bavelier, D. and H. J. Neville (2002). "Cross-modal plasticity: where and how?" Nat Rev Neurosci **3**(6): 443-452.
- Bedny, M., A. Pascual-Leone, et al. (2011). "Language processing in the occipital cortex of congenitally blind adults." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(11): 4429-4434.
- Botelho, E. P., C. Ceriatte, et al. (2014). "Quantification of early stages of cortical reorganization of the topographic map of V1 following retinal lesions in monkeys." Cereb Cortex **24**(1): 1-16.
- Burton, H., A. Z. Snyder, et al. (2002). "Adaptive changes in early and late blind: a fMRI study of Braille reading." J Neurophysiol **87**(1): 589-607.
- Chabot, N., S. Robert, et al. (2007). "Audition differently activates the visual system in neonatally enucleated mice compared with anophthalmic mutants." Eur J Neurosci **26**(8): 2334-2348.
- Chu, Y. F., C. T. Yen, et al. (2013). "Neonatal whisker clipping alters behavior, neuronal structure and neural activity in adult rats." Behav Brain Res **238**: 124-133.
- Clemo, H. R., S. G. Lomber, et al. (2016). "Synaptic Basis for Cross-modal Plasticity: Enhanced Supragranular Dendritic Spine Density in Anterior Ectosylvian Auditory Cortex of the Early Deaf Cat." Cereb Cortex **26**(4): 1365-1376.

Cudeiro, J. and A. M. Sillito (2006). "Looking back: corticothalamic feedback and early visual processing." Trends Neurosci **29**(6): 298-306.

Dawson, D. R. and H. P. Killackey (1985). "Distinguishing topography and somatotopy in the thalamocortical projections of the developing rat." Development Brain Research **17**(1-2): 309-313.

de Araujo Costa Folha, O. A., C. P. Bahia, et al. (2017). "Effect of chronic stress during adolescence in prefrontal cortex structure and function." Behav Brain Res **326**: 44-51.

De Pasquale, R. and S. M. Sherman (2011). "Synaptic properties of corticocortical connections between the primary and secondary visual cortical areas in the mouse." J Neurosci **31**(46): 16494-16506.

Desgent, S. and M. Ptito (2012). "Cortical GABAergic interneurons in cross-modal plasticity following early blindness." Neural Plast **2012**: 590725.

Duffy, K. R. and D. E. Mitchell (2013). "Darkness alters maturation of visual cortex and promotes fast recovery from monocular deprivation." Curr Biol **23**(5): 382-386.

Espinosa, J. S. and M. P. Stryker (2012). "Development and plasticity of the primary visual cortex." Neuron **75**(2): 230-249.

Fox, K. (2002). "Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex." Neuroscience **111**(4): 799-814.

Franca, J. G. and E. Volchan (1995). "NADPH diaphorase histochemistry as a marker for barrels in rat somatosensory cortex." Braz J Med Biol Res **28**(7): 787-790.

Fu, Y., M. Kaneko, et al. (2015). "A cortical disinhibitory circuit for enhancing adult plasticity." Elife **4**: e05558.

Gamanut, R., H. Kennedy, et al. (2018). "The Mouse Cortical Connectome, Characterized by an Ultra-Dense Cortical Graph, Maintains Specificity by Distinct Connectivity Profiles." Neuron **97**(3): 698-715 e610.

Ghazanfar, A. A. and C. E. Schroeder (2006). "Is neocortex essentially multisensory?" Trends Cogn Sci **10**(6): 278-285.

Goel, A., B. Jiang, et al. (2006). "Cross-modal regulation of synaptic AMPA receptors in primary sensory cortices by visual experience." Nat Neurosci **9**(8): 1001-1003.

Guillemot, J. P., M. C. Paradis, et al. (1993). "Binocular interaction and disparity coding in area 19 of visual cortex in normal and split-chiasm cats." Exp Brain Res **94**(3): 405-417.

Harris, J. A. (1998). "Using c-fos as a neural marker of pain." Brain Res Bull **45**(1): 1-8.

Henschke, J. U., T. Noesselt, et al. (2015). "Possible anatomical pathways for short-latency multisensory integration processes in primary sensory cortices." Brain Struct Funct **220**(2): 955-977.

Herdegen, T. and M. Zimmermann (1995). "Immediate early genes (IEGs) encoding for inducible transcription factors (ITFs) and neuropeptides in the nervous system: functional network for long-term plasticity and pain." Prog Brain Res **104**: 299-321.

Huang, W., M. Armstrong-James, et al. (1998). "Contribution of supragranular layers to sensory processing and plasticity in adult rat barrel cortex." J Neurophysiol **80**(6): 3261-3271.

Iurilli, G., D. Ghezzi, et al. (2012). "Sound-driven synaptic inhibition in primary visual cortex." Neuron **73**(4): 814-828.

Izraeli, R., G. Koay, et al. (2002). "Cross-modal neuroplasticity in neonatally enucleated hamsters: structure, electrophysiology and behaviour." Eur J Neurosci **15**(4): 693-712.

Jeffery, G. (1984). "Transneuronal effects of early eye removal on geniculo-cortical projection cells." Brain Res **315**(2): 257-263.

Kaas, J. H., L. A. Krubitzer, et al. (1990). "Reorganization of retinotopic cortical maps in adult mammals after lesions of the retina." Science **248**(4952): 229-231.

Kahn, D. M. and L. Krubitzer (2002). "Massive cross-modal cortical plasticity and the emergence of a new cortical area in developmentally blind mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11429-11434.

Kaliszewska, A., M. Bijata, et al. (2012). "Experience-dependent plasticity of the barrel cortex in mice observed with 2-DG brain mapping and c-Fos: effects of MMP-9 KO." Cereb Cortex **22**(9): 2160-2170.

Kaliszewska, A. and M. Kossut (2015). "Npas4 expression in two experimental models of the barrel cortex plasticity." Neural Plast **2015**: 175701.

Karlen, S. J., D. M. Kahn, et al. (2006). "Early blindness results in abnormal corticocortical and thalamocortical connections." Neuroscience **142**(3): 843-858.

Karlen, S. J. and L. Krubitzer (2009). "Effects of bilateral enucleation on the size of visual and nonvisual areas of the brain." Cereb Cortex **19**(6): 1360-1371.

Keck, T., T. D. Mrsic-Flogel, et al. (2008). "Massive restructuring of neuronal circuits during functional reorganization of adult visual cortex." Nat Neurosci **11**(10): 1162-1167.

Keck, T., V. Scheuss, et al. (2011). "Loss of sensory input causes rapid structural changes of inhibitory neurons in adult mouse visual cortex." Neuron **71**(5): 869-882.

- Kreczko, A., A. Goel, et al. (2009). "Visual deprivation decreases somatic GAD65 puncta number on layer 2/3 pyramidal neurons in mouse visual cortex." Neural Plast **2009**: 415135.
- Kuhlman, S. J., N. D. Olivas, et al. (2013). "A disinhibitory microcircuit initiates critical-period plasticity in the visual cortex." Nature **501**(7468): 543-546.
- Kwok, J. C., P. Warren, et al. (2012). "Chondroitin sulfate: a key molecule in the brain matrix." Int J Biochem Cell Biol **44**(4): 582-586.
- Lam, Y. W. and S. M. Sherman (2010). "Functional organization of the somatosensory cortical layer 6 feedback to the thalamus." Cereb Cortex **20**(1): 13-24.
- Laskowska-Macios, K., M. Zapasnik, et al. (2015). "Zif268 mRNA Expression Patterns Reveal a Distinct Impact of Early Pattern Vision Deprivation on the Development of Primary Visual Cortical Areas in the Cat." Cereb Cortex **25**(10): 3515-3526.
- Lee, H. K. and J. L. Whitt (2015). "Cross-modal synaptic plasticity in adult primary sensory cortices." Curr Opin Neurobiol **35**: 119-126.
- Lee, L. J., W. J. Chen, et al. (2009). "Neonatal whisker trimming causes long-lasting changes in structure and function of the somatosensory system." Exp Neurol **219**(2): 524-532.
- Levelt, C. N. and M. Hubener (2012). "Critical-period plasticity in the visual cortex." Annu Rev Neurosci **35**: 309-330.
- Lubke, J. and D. Feldmeyer (2007). "Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex." Brain Struct Funct **212**(1): 3-17.
- Lund, R. D., T. J. Cunningham, et al. (1973). "Modified optic projections after unilateral eye removal in young rats." Brain Behav Evol **8**(1): 51-72.
- Lyckman, A. W., S. Horng, et al. (2008). "Gene expression patterns in visual cortex during the critical period: synaptic stabilization and reversal by visual deprivation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(27): 9409-9414.
- Maffei, A. and G. G. Turrigiano (2008). "Multiple modes of network homeostasis in visual cortical layer 2/3." J Neurosci **28**(17): 4377-4384.
- Maslin, M. R., K. J. Munro, et al. (2013). "Evidence for multiple mechanisms of cortical plasticity: a study of humans with late-onset profound unilateral deafness." Clin Neurophysiol **124**(7): 1414-1421.
- Meng, X., J. P. Kao, et al. (2015). "Visual Deprivation Causes Refinement of Intracortical Circuits in the Auditory Cortex." Cell Rep **12**(6): 955-964.
- Merabet, L. B. and A. Pascual-Leone (2010). "Neural reorganization following sensory loss: the opportunity of change." Nat Rev Neurosci **11**(1): 44-52.

- Meredith, M. A., L. P. Keniston, et al. (2012). "Multisensory dysfunction accompanies crossmodal plasticity following adult hearing impairment." Neuroscience **214**: 136-148.
- Mezzerà, C. and G. Lopez-Bendito (2015). "Cross-modal plasticity in sensory deprived animal models: From the thalamocortical development point of view." J Chem Neuroanat.
- Mezzerà, C. and G. Lopez-Bendito (2016). "Cross-modal plasticity in sensory deprived animal models: From the thalamocortical development point of view." J Chem Neuroanat **75**(Pt A): 32-40.
- Morales, B., S. Y. Choi, et al. (2002). "Dark rearing alters the development of GABAergic transmission in visual cortex." J Neurosci **22**(18): 8084-8090.
- Newton, J. R., R. W. Sikes, et al. (2002). "Cross-modal plasticity after monocular enucleation of the adult rabbit." Exp Brain Res **144**(4): 423-429.
- Nys, J., J. Aerts, et al. (2014). "The cross-modal aspect of mouse visual cortex plasticity induced by monocular enucleation is age dependent." J Comp Neurol **522**(4): 950-970.
- Nys, J., I. Scheyltjens, et al. (2015). "Visual system plasticity in mammals: the story of monocular enucleation-induced vision loss." Front Syst Neurosci **9**: 60.
- Oh, S. H., C. S. Kim, et al. (2007). "Gene expression and plasticity in the rat auditory cortex after bilateral cochlear ablation." Acta Otolaryngol **127**(4): 341-350.
- Okuno, H. (2011). "Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers." Neurosci Res **69**(3): 175-186.
- Pascual-Leone, A., A. Amedi, et al. (2005). "The plastic human brain cortex." Annu Rev Neurosci **28**: 377-401.
- Pereira, A., Jr., M. A. Freire, et al. (2000). "The barrel field of the adult mouse Sml cortex as revealed by NADPH-diaphorase histochemistry." Neuroreport **11**(9): 1889-1892.
- Pereira, C. M., M. A. M. Freire, et al. (2018). "Non-visual exploration of novel objects increases the levels of plasticity factors in the rat primary visual cortex." PeerJ **6**: e5678.
- Perez-Cadahia, B., B. Drobic, et al. (2011). "Activation and function of immediate-early genes in the nervous system." Biochem Cell Biol **89**(1): 61-73.
- Pernia, M., S. Estevez, et al. (2017). "c-Fos and Arc/Arg3.1 expression in auditory and visual cortices after hearing loss: Evidence of sensory crossmodal reorganization in adult rats." J Comp Neurol **525**(12): 2677-2689.

- Pernia, M., S. Estevez, et al. (2017). "c-Fos and Arc/Arg3.1 expression in auditory and visual cortices after hearing loss: Evidence of sensory crossmodal reorganization in adult rats." J Comp Neurol.
- Petrus, E., A. Isaiyah, et al. (2014). "Crossmodal induction of thalamocortical potentiation leads to enhanced information processing in the auditory cortex." Neuron **81**(3): 664-673.
- Petrus, E., G. Rodriguez, et al. (2015). "Vision loss shifts the balance of feedforward and intracortical circuits in opposite directions in mouse primary auditory and visual cortices." J Neurosci **35**(23): 8790-8801.
- Piche, M., N. Chabot, et al. (2007). "Auditory responses in the visual cortex of neonatally enucleated rats." Neuroscience **145**(3): 1144-1156.
- Qi, H. X., J. H. Kaas, et al. (2014). "The reactivation of somatosensory cortex and behavioral recovery after sensory loss in mature primates." Front Syst Neurosci **8**: 84.
- Qin, W. and C. Yu (2013). "Neural pathways conveying novisual information to the visual cortex." Neural Plast **2013**: 864920.
- Sadato, N., A. Pascual-Leone, et al. (1996). "Activation of the primary visual cortex by Braille reading in blind subjects." Nature **380**(6574): 526-528.
- Sale, A. and N. Berardi (2015). "Active training for amblyopia in adult rodents." Front Behav Neurosci **9**: 281.
- Sammons, R. P. and T. Keck (2015). "Adult plasticity and cortical reorganization after peripheral lesions." Curr Opin Neurobiol **35**: 136-141.
- Schormans, A. L., M. Typlt, et al. (2016). "Crossmodal plasticity in auditory, visual and multisensory cortical areas following noise-induced hearing loss in adulthood." Hear Res.
- Stehberg, J., P. T. Dang, et al. (2014). "Unimodal primary sensory cortices are directly connected by long-range horizontal projections in the rat sensory cortex." Front Neuroanat **8**: 93.
- Takahata, T. and J. H. Kaas (2017). "c-FOS expression in the visual system of tree shrews after monocular inactivation." J Comp Neurol **525**(1): 151-165.
- Takesian, A. E. and T. K. Hensch (2013). "Balancing plasticity/stability across brain development." Prog Brain Res **207**: 3-34.
- Thinus-Blanc, C. and F. Gaunet (1997). "Representation of space in blind persons: vision as a spatial sense?" Psychol Bull **121**(1): 20-42.
- Toldi, J., T. Farkas, et al. (1994). "Neonatal enucleation induces cross-modal changes in the barrel cortex of rat. A behavioural and electrophysiological study." Neurosci Lett **167**(1-2): 1-4.

- Toldi, J., I. Rojik, et al. (1994). "Neonatal monocular enucleation-induced cross-modal effects observed in the cortex of adult rat." Neuroscience **62**(1): 105-114.
- Van Brussel, L., A. Gerits, et al. (2011). "Evidence for cross-modal plasticity in adult mouse visual cortex following monocular enucleation." Cereb Cortex **21**(9): 2133-2146.
- Van Der Gucht, E., E. Vandenbussche, et al. (2000). "A new cat Fos antibody to localize the immediate early gene c-fos in mammalian visual cortex after sensory stimulation." J Histochem Cytochem **48**(5): 671-684.
- van Versendaal, D. and C. N. Levelt (2016). "Inhibitory interneurons in visual cortical plasticity." Cell Mol Life Sci **73**(19): 3677-3691.
- van Versendaal, D., R. Rajendran, et al. (2012). "Elimination of inhibitory synapses is a major component of adult ocular dominance plasticity." Neuron **74**(2): 374-383.
- Voss, P., F. Gougoux, et al. (2008). "Differential occipital responses in early- and late-blind individuals during a sound-source discrimination task." Neuroimage **40**(2): 746-758.
- Wallace, M. N. (1987). "Histochemical demonstration of sensory maps in the rat and mouse cerebral cortex." Brain Res **418**(1): 178-182.
- Wang, R., L. Wu, et al. (2017). "Visual cortex and auditory cortex activation in early binocularly blind macaques: A BOLD-fMRI study using auditory stimuli." Biochem Biophys Res Commun **485**(4): 796-801.
- West, M. J., L. Slomianka, et al. (1991). "Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator." Anat Rec **231**(4): 482-497.
- Westermann, G., D. Mareschal, et al. (2007). "Neuroconstructivism." Dev Sci **10**(1): 75-83.
- Wiesel, T. N. and D. H. Hubel (1965). "Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens." J Neurophysiol **28**(6): 1029-1040.
- Woolsey, T. A. and H. Van der Loos (1970). "The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units." Brain Res **17**(2): 205-242.
- WOOLSEY, T. M. and H. V. D. LOOS (1970). "THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF LAYER IV IN THE SOMATOSENSORY REGION (S I) OF MOUSE CEREBRAL CORTEX." Brain Research **17** 205-242.
- Zapasnik, M. and K. Burnat (2013). "Binocular pattern deprivation with delayed onset has impact on motion perception in adulthood." Neuroscience **255**: 99-109.

Zhou, J., B. Thompson, et al. (2013). "A new form of rapid binocular plasticity in adult with amblyopia." Sci Rep **3**: 2638.