
PEDRO GABRIELLE VIEIRA

**EFEITO DO ESCOTOMA TEMPORAL CAUSADO PELO PISCAR NA
ATIVIDADE DOS NEURÔNIOS DO WULST VISUAL DA CORUJA
BURAQUEIRA (*Athene cunicularia*)**



Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Agosto de 2014

PEDRO GABRIELLE VIEIRA

**EFEITO DO ESCOTOMA TEMPORAL CAUSADO PELO PISCAR NA
ATIVIDADE DOS NEURÔNIOS DO WULST VISUAL DA CORUJA
BURAQUEIRA (*Athene cunicularia*)**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas -
Fisiologia e Farmacologia do Instituto
de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Minas Gerais, como
requisito para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas.**

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Jerome Baron

Instituto de Ciências Biológicas

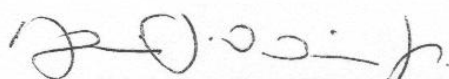
Universidade Federal de Minas Gerais

Agosto de 2014

**"EFEITO DO ESCOTOMA TEMPORAL CAUSADO PELO PISCAR
NA ATIVIDADE DOS NEURÔNIOS DO WULST VISUAL DA
CORUJA BURAQUEIRA (*ATHENE CUNICULARIA*)"**

PEDRO GABRIELLE VIEIRA

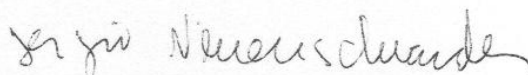
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **08 de agosto de 2014**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. MARIO FIORANI JUNIOR
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



PROF. DR. MÁRCIO FLÁVIO DUTRA MORAES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. SERGIO NEUENSCHWANDER
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE



PROF. DR. THEO ROLLA PAULA MOTA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. JEROME PAUL ARMAND LAURENT BARON
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 08 de agosto de 2014

Esta tese foi realizada no Laboratório de Neurodinâmica da Visão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. Jérôme Baron, e contou com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*À minha querida esposa Regiana, pelo
companheirismo, paciência e apoio, sempre.*

*À minha família pelo apoio incondicional
em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

“... porque não há felicidade quando nos encontramos, seja onde for, sem a presença daqueles que sempre compartilham conosco as alegrias e dificuldades” (Manoel P. Miranda).

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador Prof. Jerome Baron pela paciência, confiança e inúmeros ensinamentos tanto no âmbito profissional quanto no pessoal. Agradeço a todos os velhos e novos colegas e amigos do Laboratório de Neurodinâmica, em especial ao Adriano, Claudiana, Cintia, Fabrício Almeida, Fabrício Assis, João Paulo, Marco e Rafael pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Ao Lucas “Google” Pinto por sempre atender prontamente aos meus pedidos de artigos indisponíveis. Obrigado a todos os professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia.

À minha família: considerem essa vitória a de vocês, pois sem vocês nada disso seria possível.

À minha esposa Regiana, pelo companheirismo, paciência e por me ajudar inúmeras vezes na execução desse projeto. Em você encontrei a força, as palavras encorajadoras de incentivo e carinho, que foram necessárias para que eu continuasse sem desanimar.

À minha irmã Amanda por estar sempre presente nos momentos que precisei.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram de alguma forma para a efetivação deste trabalho. Meu sincero MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| LISTA DE ABREVIACÕES | 3 |
| LISTA DE FIGURAS | 4 |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 6 |
| 1.1. A visão e as interrupções transitórias | 6 |
| 1.2. O piscar: definição e nomenclatura | 7 |
| 1.3. O impacto do piscar sobre a visão | 9 |
| 1.3.1. Impacto óptico | 9 |
| 1.3.2. Supressão visual | 10 |
| 1.3.3. Correlatos neuronais | 11 |
| 1.4. Relação entre o piscar e o movimento sacádico | 13 |
| 1.5. Descargas corolárias | 14 |
| 1.6. A coruja como modelo experimental | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 2.1. Objetivo Geral | 19 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 19 |
| 3. METODOLOGIA GERAL | 20 |
| 3.1. Cuidado com os animais e preparação para os registros | 20 |
| 3.2. Visão geral do setup experimental | 22 |
| 3.3. O sistema de aquisição de imagem (pupilômetro) | 24 |
| 3.4. O soprador de ar | 26 |
| 3.5. Registro da atividade extracelular | 28 |
| 3.5.1. Dispositivo multieletrodo | 28 |
| 3.5.2. Registro dos sinais neuronais | 29 |
| 3.6. Estimulação visual | 29 |
| 3.7. Estatística geral | 31 |
| 4. O REFLEXO PUPILAR À LUZ NA CORUJA BURQUEIRA | 32 |
| 4.1. Introdução | 32 |
| 4.2. Metodologia | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.1. Protocolos experimentais | 34 |
| 4.2.2. Análise de dados | 34 |
| 4.2.3. Validação das medidas pupilométricas | 41 |
| 4.3. Resultados | 44 |
| 4.3.1. Adaptação ao escuro | 44 |
| 4.3.2. Piscar reflexivo à luz | 45 |
| 4.3.3. Reflexo pupilar à luz | 46 |
| 4.3.3.1. Efeitos dos níveis de luminância no diâmetro pupilar | 47 |
| 4.3.3.2. Efeitos dos níveis de luminância nas latências de constrição e redilatação pupilar | 48 |
| 4.3.3.3. Efeitos dos níveis de luminância nos períodos de constrição e dilatação pupilar | 49 |
| 4.3.3.4. Efeitos dos níveis de luminância nas velocidades de constrição dilatação pupilar | 51 |
| 4.3.4. Estabilidade do reflexo pupilar durante longo período de estimulação | 52 |
| 4.3.5. Registros binoculares versus registros monoculares | 54 |
| 4.4. Discussão | 56 |
| 4.4.1. Considerações metodológicas | 56 |
| 4.4.2. O piscar evocado pela luz | 58 |
| 4.4.3. Parâmetros do reflexo pupilar à luz | 58 |
| 4.4.4. Implicações para o controle de ganho | 63 |
| 4.4.5. A resposta consensual em aves | 64 |
| 5. CARACTERIZAÇÃO CINEMÁTICA DO PISCAR ESPONTÂNEO E REFLEXIVO NA CORUJA BURAQUEIRA | 66 |
| 5.1. Introdução | 66 |
| 5.2. Metodologia | 67 |
| 5.2.1. Análise dos vídeos | 68 |
| 5.3. Resultados | 69 |
| 5.3.1. Caracterização qualitativa do piscar | 69 |
| 5.3.2. Caracterização quantitativa do piscar | 70 |
| 5.3.3. Piscar espontâneo versus reflexivo | 72 |
| 5.4. Discussão | 78 |
| 5.4.1. Considerações metodológicas | 78 |

| | |
|---|------------|
| 5.4.2. O piscar em aves versus mamíferos | 80 |
| 5.4.3. Movimentos pupilares e o piscar | 82 |
| 6. EFEITO DO PISCAR SOBRE A ATIVIDADE DOS NEURÔNIOS DO WULST VISUAL | 85 |
| 6.1. Introdução | 85 |
| 6.2. Metodologia | 87 |
| 6.2.1. Registro do piscar durante os protocolos de estimulação visual | 87 |
| 6.2.2. Estímulos visuais e protocolos experimentais | 87 |
| 6.2.3. Análise dos dados | 91 |
| 6.2.3.1. Separação dos potenciais de ação (spike sorting) | 91 |
| 6.2.3.2. Pré-análise | 91 |
| 6.2.3.3. Análise geral do efeito do piscar | 92 |
| 6.3. Resultados | 94 |
| 6.3.1. Informações preliminares | 94 |
| 6.3.2. Efeito do piscar sobre a resposta neuronal durante a estimulação visual com a grade senoidal | 94 |
| 6.3.3. Efeito do piscar versus interrupções transientes | 98 |
| 6.3.4. Diferenças entre o piscar espontâneo e o reflexivo sobre a resposta neuronal durante estimulação visual com a grade senoidal | 102 |
| 6.3.5. O sinal extra retinal associado ao piscar | 105 |
| 6.4. Discussão | 110 |
| 6.4.1. Efeito do piscar na atividade neuronal | 110 |
| 6.4.2. O wulst visual da coruja | 114 |
| 7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVA | 115 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 117 |
| 9. ANEXOS | 135 |

RESUMO

Nós fechamos e reabrimos nossos olhos várias vezes por minuto. Esse comportamento conhecido como piscar é essencial para a saúde da superfície da córnea e proteger contra agentes externos potencialmente perigosos. Entretanto, o piscar também acarreta em uma interrupção transiente da visão. Curiosamente, nós não vivenciamos conscientemente essas interrupções, apesar de alterações similares da imagem que atinge a retina, realizadas por fontes externas, serem rapidamente percebidas. Quais são os mecanismos neuronais envolvidos na continuidade perceptual durante o piscar? Como o cérebro distinguir estímulos visuais produzidos por nosso próprio movimento daqueles produzidos por eventos de origem exógena com características similares? Essas questões nortearam o objetivo principal desta tese que se baseou em examinar especificamente como a atividade neuronal do wulst visual da coruja buraqueira é modulada pelo piscar. Inicialmente, um sistema de aquisição de vídeo, originalmente desenvolvido para pupilometria em humanos, foi adaptado para as necessidades do modelo animal. Em seguida, um estudo pupilométrico foi realizado para obter uma melhor compreensão da sensibilidade da retina à mudanças de intensidade luminosa. Os resultados dessa análise mostraram que o reflexo pupilar é aproximadamente sete vezes mais rápido do que em primatas e pode causar uma redução de quase 5 vezes no fluxo de luz que atinge a retina. Em seguida, realizamos um estudo da cinemática do piscar reflexivo (evocado por um sistema de estimulação por ar) e espontâneo, o qual mostrou que as fases de subida e descida da pálpebra possuem menor tempo de duração para o primeiro do que para o segundo. Além disso, foi observada a falta de oclusão total da pupila pela pálpebra para ambos os tipos de piscada. De forma contra-intuitiva, o tamanho da pupila tende a diminuir durante o fechamento palpebral. Por fim, o efeito de ambos os tipos de piscar foi estudado em 58 neurônios isolados do wulst visual da coruja buraqueira. Em geral, o piscar reflexivo e o espontâneo acarretam em uma redução da atividade neuronal durante a estimulação sustentada com grade senoidal. Entretanto, um aumento na frequência de disparos de potencias de ação foi encontrado para algumas células durante o piscar espontâneo. Ainda, simulando um piscar por meio de um decaimento rápido da luminância do monitor por um curto período gera uma diminuição na atividade neuronal ainda maior. Quando realizado no escuro, somente o piscar espontâneo está associado com um aumento robusto da atividade neuronal que começa antes do início do movimento de descida da pálpebra. Dessa forma, concluímos que nossos resultados são compatíveis com a ideia de que o piscar modula em parte a atividade dos neurônios do wulst visual por meio de um sinal extra retinal. Esse sinal pode estar associado com uma via de disparos corolários operando no wulst visual de corujas.

Palavras chave: Coruja buraqueira, telencéfalo visual de aves, piscar, descargas corolárias, reflexo pupilar à luz, cinemática do piscar.

ABSTRACT

Several times a minute, we rapidly close and reopen our eyelids. This behaviour, known as blinking, is essential, among other things, to keep the corneal surface healthy and free from potentially hazardous external agents. However, it also transiently disrupts patterned vision. Yet, intriguingly, we usually do not consciously experience such disruptions, even though comparable alterations of the retinal image due to external sources are readily noticeable. What are the neural mechanisms responsible for perceptual continuity during blinks? How does the brain distinguish visual stimuli produced by the own movement of the beholder from stimuli of similar physical characteristics but of exogenous origin? The aim of this thesis is to address these entirely opened issues by specifically examining how ongoing neuronal activity in the visual wulst of the awake burrowing owl (*Athene cucularia*) is modulated by blinks. First, a camera-video acquisition system, originally developed for human pupillometry, was adapted to the experimental requirements of our animal model. A thorough pupillometric study was then undertaken to gain a better understanding of the retinal sensitivity to changes in light intensities. The results of this analysis show that the pupillary reflex is about seven times faster than that seen in primates and may cause an almost 5-fold reduction in retinal illuminance. Subsequently, a kinematic analysis of the owl's reflex (evoked by an air-puff stimulation system) and spontaneous eyeblinks was performed, showing that the closing and opening phases of the former has shorter time duration than the latter. Moreover, a lack of complete closure of the pupil by the eyelid was found in both types of eyeblinks. Counterintuitively, a reduction in pupil size during the early phase of the eyelid closure was also observed. Finally, the effects of both types of eyeblinks were studied in 58 single neurons recorded from the visual wulst of the awake burrowing owl. In general, during sustained stimulation with sinusoidal gratings both reflex and spontaneous eyeblinks cause a reduction in the neuronal activity. However, an increase in spike discharge was also found in some cells during spontaneous blinks. In addition, simulating an eyeblink by instantly decreasing the monitor luminance for a brief period, diminishes the neuronal activity even further. When executed in the dark, only spontaneous eyeblinks are associated with a robust increase of neuronal activity, which starts before the onset of the eyelid movement. We conclude that our results are compatible with the idea that eyeblinks in part modulate the activity of neurons in the visual wulst through an extra-retinal signal. This signal may be associated with a corollary discharge pathway incorporating the visual wulst in owls.

Keywords: Burrowing owl, avian visual telencephalon, blink, corollary discharge, pupillary light reflex, blink kinematics

LISTA DE ABREVIACOES

ANOVA – análise de variância anova

AVI – audio vídeo interleave

CRT – tubo de raio catódico

FEF – campo ocular frontal

ISI – intervalo entre disparos

LP – músculo levantador da pálpebra superior

MUA – atividade multiunitária

NGL – núcleo geniculado lateral

OO – músculo orbicular

RGB – sistema de cor

ROI – região de interesse

RPL – reflexo pupilar à luz

SEF - campo ocular suplementar

SUA – atividade unitária

TDMS – technical data management streaming

TI – músculo tarsal inferior

TTL – lógica transistor-transistor

V1 – córtex visual primário

V2 – rea visual do córtex extra-estriado

V3 – rea visual do córtex extra-estriado

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1: Visão geral do setup experimental | 23 |
| Figura 2: Cabine de registro com a disposição do equipamento de aquisição de imagem | 25 |
| Figura 3: Soprador de ar utilizado para evocar o piscar | 27 |
| Figura 4: Representação esquemática do dispositivo multieletrodo | 28 |
| Figura 5: Precisão temporal da apresentação do estímulo | 31 |
| Figura 6: Fluxograma do algoritmo de segmentação da pupila | 36 |
| Figura 7: Fluxograma dos dois algoritmos utilizados na estimação do tamanho da pupila | 37 |
| Figura 8: Exemplos representativos da estimação da pupila em diferentes condições | 39 |
| Figura 9: Parâmetros derivados da curva do reflexo pupilar | 41 |
| Figura 10: Comparação entre a área da pupila estimada por um círculo e por uma elipse | 42 |
| Figura 11: Comparação entre a área da pupila calculada automaticamente e manualmente | 43 |
| Figura 12: Exemplo representativo da curva de adaptação ao escuro | 44 |
| Figura 13: Efeito da intensidade luminosa sobre o piscar | 45 |
| Figura 14: Diâmetro da pupila em função do nível de luminância | 47 |
| Figura 15: Tempos de latência para início da constrição e redilatação da pupila | 49 |
| Figura 16: Duração do tempo de constrição e dilatação da pupila | 50 |
| Figura 17: Velocidades de constrição e redilatação da pupila | 51 |
| Figura 18: Exemplo representativo do reflexo pupilar gravado durante um longo período de estimulação | 52 |
| Figura 19: Comparação entre os parâmetros obtidos durante estimulação monocular e binocular | 55 |
| Figura 20: Comparação do reflexo pupilar à luz na coruja buraqueira e em mamíferos | 61 |
| Figura 21: Exemplos representativos do piscar | 70 |
| Figura 22: Dinâmica geral do piscar | 71 |
| Figura 23: As duas fases do movimento de subida da pálpebra | 72 |
| Figura 24: Dinâmica do piscar espontâneo e do reflexivo evocado por um sopro de ar | 73 |
| Figura 25: O movimento de subida da pálpebra dividida em duas fases para o piscar espontâneo e o reflexivo | 74 |
| Figura 26: Porcentagem de oclusão da pupila pela pálpebra | 75 |
| Figura 27: Quantidade de piscadas monoculares e binoculares | 76 |
| Figura 28: Efeito do piscar sobre a pupila | 77 |

| | |
|---|------------|
| Figura 29: Condições experimentais utilizadas no estudo dos efeitos causados pelo piscar e por mudanças transientes de luminância na resposta dos neurônios do wulst | 89 |
| Figura 30: Exemplos representativos do efeito do piscar sobre a atividade neuronal sustentada | 95 |
| Figura 31: Efeito do piscar sobre a população de células | 97 |
| Figura 32: Comparação entre a atividade sustentada obtida antes do piscar e 400 ms após o início da estimulação com os valores determinados pelo <i>Shuffling</i> | 98 |
| Figura 33: Comparação entre o efeito do piscar e o efeito gerado pelo escurecimento global | 99 |
| Figura 34: Comparação do efeito do piscar com o GAP e o escurecimento local | 100 |
| Figura 35: Exemplos representativos dos efeitos gerados pelos diferentes tipos de interrupções | 102 |
| Figura 36: Exemplos representativos do efeito do piscar reflexivo e do piscar espontâneo na atividade neuronal sustentada | 104 |
| Figura 37: Exemplos representativos do efeito do piscar na atividade espontânea dos neurônios do wulst visual | 106 |
| Figura 38: Exemplos representativos do efeito do piscar reflexivo e espontâneo na atividade espontânea dos neurônios do wulst visual | 108 |

1. Introdução geral

1.1. A visão e as interrupções transitórias

A visão é o sentido que nos permite interpretar e processar informações que estão contidas nas cenas visuais que presenciamos no dia a dia. Para o correto processamento dessas cenas, o sistema visual deve detectar e discriminar uma variedade de atributos como direção do movimento, contraste e textura, os quais permitem construir representações adequadas do mundo. Esse processamento é desempenhado, pelo menos no que concerne aos primatas e carnívoros, principalmente pela via retino-geniculado-cortical que tem início na retina, passa pelo núcleo geniculado lateral (NGL) e ascende para o córtex visual primário (V1) (Livingstone e Hubel, 1988; Nassi e Callaway, 2009).

A menos que ocorra alguma interferência externa, a captura de informações pelo sistema visual não é contínua, sendo interrompida várias vezes por minuto devido a comportamentos transitórios com duração na ordem de milissegundos (ms). Os comportamentos endógenos responsáveis por essas “perturbações” nas imagens que atingem a retina estão relacionados, principalmente, com movimentações do campo visual gerados por rápidos movimentos oculares e pelo bloqueio da informação visual ocasionado pelo ato reflexo de piscar. Apesar do possível efeito deletério que esses comportamentos poderiam gerar, as estimulações visuais transitórias são essenciais. De fato, sem essas mudanças transientes, a cena visual tenderia a se desvanecer e a percepção visual ficaria comprometida (Ditchburn e Ginsborg 1952).

Os dois principais tipos de movimentos oculares mais frequentes são as sacadas e os movimentos oculares lentos (*smooth pursuit*; Orban de Xivry e Lefèvre, 2007). As sacadas são movimentos rápidos que são utilizados para redirecionar a região de maior resolução da retina (fóvea) em direção a diferentes estímulos presentes em uma cena visual. Em mamíferos, esse tipo de movimento pode atingir uma velocidade de 200 a 500 graus por segundo (Gandhi, 2012), e ocorre a uma frequência na ordem de dezenas de vezes por minuto, variando em velocidade e duração conforme a tarefa

desempenhada (Hayhoe e Ballard, 2005; Land e Hayhoe, 2001). Por outro lado, os movimentos oculares lentos são responsáveis por rastrear e estabilizar um objeto em movimento na fóvea e apresentam uma velocidade máxima de aproximadamente 100 graus por segundo (Meyer et al., 1985). A velocidade dos movimentos lentos tende a variar dependendo das características espaço-temporais dos estímulos que são rastreados (Buizza e Schmid, 1986). Em relação às sacadas, a alta velocidade de movimentação dos olhos acarreta na perda de informação visual, principalmente pela deterioração da resolução espacial (Land, 1999), o que gera ruído nas imagens que atingem a retina e conseqüentemente, no sinal que é encaminhado por ela para as áreas que realizam processamentos visuais mais complexos.

Por meio da interrupção transitória da estimulação visual, o piscar, assim como as sacadas, gera efeitos deletérios. O piscar é um ato reflexo que protege nossos olhos de danos potenciais que podem ser causados por objetos externos como insetos, cílios e outros corpos estranhos. No homem, o ato de piscar ocorre espontaneamente entre 10 e 15 vezes por minuto para a lubrificação e oxigenação da córnea e dura entre 250 a 300 ms (VanderWerf et al., 2002). Durante esse tempo, a luz que atinge a retina diminui sua intensidade em cerca de 100 vezes (Burr, 2005) ocasionando uma interrupção brutal da estimulação visual durante 250-300 ms a cada 4-6 s. Contudo, tanto a diminuição brusca da luminância causada pela pálpebra, como as movimentações oculares rápidas geradas pelas sacadas, não são habitualmente percebidos, ou seja, temos uma percepção contínua do mundo visual. Como o sistema visual lida com essas interrupções rotineiras? Mais precisamente, qual é o mecanismo neuronal responsável por manter nossa continuidade perceptual durante o piscar? Essas são as questões gerais, e ainda abertas, que motivaram a realização do presente estudo.

1.2. O piscar: definição e nomenclatura

O piscar é o ato reflexo que envolve a movimentação da pálpebra sobre a superfície do globo ocular e tem como função essencial oxigenar, umidificar e proteger a córnea. Em primatas e carnívoros, o declínio e a elevação da pálpebra são controlados por três músculos principais: os dois primeiros são estriados e conhecidos como músculo orbicular (músculo OO) e o levantador da pálpebra superior (músculo LP). O terceiro é composto por fibras musculares lisas e é conhecido como músculo tarsal inferior (músculo TI). O músculo OO é responsável por fechar a pálpebra, enquanto o LP, juntamente com o TI, é responsável por sua elevação e manutenção da abertura

(Bour et al., 2000; Evinger et al., 1991). Para gerar esses movimentos, o sistema nervoso diminui temporariamente a atividade tônica do músculo LP e aumenta a atividade do músculo OO levando a um rápido fechamento da pálpebra. Durante a elevação, o músculo OO cessa a atividade enquanto o LP retoma sua atividade tônica (Bour et al., 2002; Evinger et al., 1991; VanderWerf et al., 2003). O piscar pode ser classificado em ao menos três tipos: (i) espontâneo, realizado várias vezes por minuto para lubrificação da córnea; (ii) reflexo, gerado por estimulações peri-orbitais e irritações na córnea; e (iii) voluntário, iniciado conscientemente (Peshori et al., 2001; VanderWerf et al., 2003). Cada tipo de piscada apresenta características peculiares e são desencadeados por vias neuronais diferentes, apesar de utilizarem áreas em comum (Smit, 2008).

O piscar espontâneo é o responsável por espalhar o filme lacrimal, que lubrifica e umidifica a córnea. O filme lacrimal tem importante papel na proteção do olho, servindo como barreira química contra patógenos (vírus e bactérias) e traumas mecânicos (Dartt, 2004), além de desempenhar importante papel na manutenção da qualidade óptica do olho (Montés-Micó et al., 2010). Em humanos, o tempo de duração desse tipo de piscar é de aproximadamente 334 ms, sendo que a fase de descida é mais rápida do que a fase de subida (Evinger et al., 1991; Sun et al., 1997; VanderWerf et al., 2003). Entretanto, essas características podem variar frente a uma série de fatores endógenos e exógenos. Por exemplo, estudos realizados por Schellini e colaboradores (2005) e por Sun e colaboradores (1997), mostraram que indivíduos com idade avançada possuem o tempo de duração da piscada mais longo e com velocidades menores do que indivíduos jovens. Além disso, outros fatores como períodos do dia (Barbato et al., 2000), variação da umidade relativa do ar (Wolkoff et al., 2006), modificação dos estado central (por ex. sonolência), execução de atividades rotineiras (por ex. leitura e conversação; Karson et al., 1981; Doughty, 2001) e até mesmo estados patológicos como esquizofrenia e Parkinson (Karson et al., 1986; Korosec et al., 2006) geram mudanças no comportamento do piscar, especialmente na frequência em que ocorrem. A dinâmica do piscar também varia em diferentes espécies de vertebrados (Blount, 1927; Kirsten e Kirsten, 1983; Tada et al., 2013). Por exemplo, roedores, cachorros e gatos piscam menos (3 eventos por minuto) que primatas (10 eventos por minuto). Um estudo realizado na coruja buraqueira (*Athene cunicularia*) mostrou que a frequência de piscadas nessa ave é de aproximadamente 4 eventos por minuto, podendo variar durante a execução de tarefas visuais (Dias, 2013).

O piscar por reflexo é todo aquele evocado por estímulo externo, como por exemplo, por sopradores de ar, estimulação elétrica e até mesmo pelo som. Dependendo do tipo de estímulo, o piscar por reflexo pode ser evocado por diferentes vias. Por exemplo, estímulos como sopros de ar e estimulação mecânica evocam o piscar reflexo através de circuitos que envolvem o nervo trigêmio (Esteban, 1999; Peshori et al., 2001). Já o gerado por som depende do nervo vestibulococlear e o facial (Koch e Schnitzler, 1997). Por utilizar diferentes nervos como efetadores, o piscar reflexo é muito utilizado para detectar distúrbios no sistema nervoso central (Esteban et al., 1981; Kazem e Behzad, 2006; Kimura, 1975; Torres, 2002; Mikropoulos et al., 2010). Em geral, a dinâmica desse tipo de piscar difere do espontâneo por possuir fases de descida e subidas mais rápidas e, conseqüentemente, uma menor duração (Evinger, et al., 1984; VanderWerf et al., 2003).

O piscar voluntário é aquele realizado conscientemente. Ele é usado para expressar emoções e até mesmo para comunicação, como por exemplo, em pacientes com paralisia motora (Hori et al., 2004). Dos três tipos de piscadas, a voluntária é o que apresenta menor duração.

1.3. O impacto do piscar sobre a visão

1.3.1. Impacto óptico

A movimentação da pálpebra sobre a pupila gera uma diminuição significativa na intensidade de luz que atinge a retina em aproximadamente 100 vezes (Volkman, 1980). Tanto estudos psicofísicos (Ando e Kripke, 1996) como de aferição direta por um dispositivo (Bierman et al., 2011; Robinson et al., 1991) mostram que essa diminuição é acompanhada por uma alteração da composição espectral da luz, de modo que a pálpebra atua como um filtro que permite a passagem de comprimentos de onda de aproximadamente 600 nm (vermelho). Além disso, a espessura da pálpebra, a densidade de queratinócitos (células responsáveis pela produção de queratina), colágeno e gordura afetam diretamente a transmitância da luz pela pálpebra (Bierman et al., 2011). Além dessa filtragem espectral, o piscar gera a quebra da estrutura espacial da imagem (Pelah et al., 2009).

Outro fator que impacta diretamente na qualidade da imagem é o filme lacrimal espalhado sobre a córnea durante o piscar (Montés-Micó et al., 2010). Estudos psicofísicos mostram que a qualidade da imagem é degradada durante longos períodos sem piscar (Tutt et al., 2000), principalmente pela aumento significativo de aberrações

de alta ordem (Koh et al., 2002). Estudos clínicos mostram ainda que pacientes com deficiência na produção do filme lacrimal, condição conhecida como síndrome do olho seco, apresentam algumas alterações visuais como, por exemplo, redução da acuidade e visão embaçada (Goto et al., 2002; Himebaugh et al., 2003). Dessa forma, a manutenção do filme lacrimal pelo piscar parece ser essencial para que uma imagem com alta qualidade atinja a retina.

1.3.2. Supressão visual

Os primeiros relatos acerca do efeito do piscar sobre o sistema visual são derivados de estudos psicofísicos realizados a partir da década de 80 (Manning et al., 1983; Ridder e Tomlinson, 1995; Ridder e Tomlinson, 1997; Riggs et al., 1981; Volkmann et al., 1980; Volkmann, 1986). Esses estudos mostram que o piscar gera uma diminuição na sensibilidade visual. Por exemplo, Volkmann e colaboradores (1980) realizaram um estudo psicofísico em humanos através de um paradigma de escolha forçada. Os observadores tinham os olhos tampados por um óculos e a retina mantida sob iluminação constante através de uma técnica conhecida como iluminação transpalatina. Essa técnica utiliza uma sonda de fibra óptica que é inserida na boca e orientada para o palato a fim de manter a retina sob iluminação constante, mesmo durante o piscar, eliminando possíveis efeitos orgânicos da retina. Os observadores deveriam julgar, enquanto realizavam piscadas voluntárias, quando ocorria um decaimento na iluminação. Os resultados mostraram que antes da piscada, o decaimento no nível de iluminação foi constantemente percebido. Entretanto, durante a piscada esse nível de decaimento na iluminação teve que ser muito maior para que fosse relatado pelos observadores. Dessa forma, os autores mostraram que durante o piscar ocorre uma supressão da sensibilidade visual, a qual teria o papel de evitar a percepção da interrupção visual. Devido à supressão visual ocorrer mesmo com a retina sobre constante iluminação, foi sugerido que esse efeito é causado por mecanismos corticais e não está relacionado simplesmente pela interrupção da estimulação visual pela pálpebra.

Esse fenômeno perceptual também está ligado à dinâmica da pálpebra. Ao que parece, a intensidade da supressão é dependente da amplitude do movimento palpebral, de tal forma que quanto maior a amplitude do movimento maior o nível de supressão (Stevenson et al., 1986). Além disso, essa diminuição na sensibilidade visual parece ocorrer antes do início da piscada e persiste somente pelo tempo de descida da pálpebra (Volkmann et al., 1982; Volkmann, 1986). Esse efeito também se mantém frente a

diferentes tipos de piscadas. Manning e colaboradores (1983) mediram a sensibilidade visual durante o piscar reflexivo (evocado por um sopro de ar) e demonstraram que a sensibilidade visual fica comprometida, como foi observado no piscar voluntário. Todas essas observações levaram a uma busca dos possíveis mecanismos neuronais envolvidos nessa supressão da sensibilidade visual pelo piscar.

1.3.3. Correlatos neuronais

O processamento visual é realizado em primatas e carnívoros principalmente pela via retino-geniculo-cortical, a qual abrange a retina, o núcleo geniculado lateral e o córtex visual (Nassi e Callaway, 2009). O núcleo geniculado lateral recebe a maioria da informação visual que deixa a retina através das células ganglionares, encaminhando-a para o córtex visual primário. No córtex visual primário emerge a representação de outros atributos visuais como orientação de contorno, direção do movimento e binocularidade (Hubel e Wiesel 1959; Livingstone e Hubel, 1988). O efeito do piscar nessa via tem sido estudado utilizando-se técnicas eletrofisiológicas (Buisseret e Maffei, 1983; Gawne e Martin, 2000 e 2002) e de neuroimagem funcional (Berman et al., 2012; Bristow et al., 2005a e 2005b; Guipponi et al., 2014; Hupé et al., 2012; Tse et al., 2010; Tsubota et al., 1999). Entretanto, o repertório literário se encontra mais voltado para a segunda técnica do que para a primeira.

O principal efeito do piscar parece ser uma supressão da atividade neuronal de áreas visuais (Buisseret e Maffei, 1983; Burr, 2005; Gawne e Martin, 2002). Dados eletrofisiológicos obtidos em macacos *rhesus* mostram que o piscar por reflexo (evocado por um sopro de ar) provoca uma supressão da atividade de neurônios do córtex visual primário (V1), além de outras áreas visuais (V2, V3 e V4), e que essa diminuição é maior do que quando simplesmente a luz externa é apagada (Gawne e Martin, 2000 e 2002). Dessa forma, sugeriu-se que o piscar utiliza um mecanismo ativo que gera uma supressão na resposta celular. Por sua vez, Bristow e colaboradores (2005a) realizaram um estudo de neuroimagem funcional em humanos, utilizando a mesma técnica de iluminação transpalatina desenvolvida por Volkmann e colaboradores (1980). Assim, foi possível isolar o efeito da piscada em si do efeito da queda na iluminação provocada por ela, demonstrando que apesar de a retina estar continuamente iluminada, a piscada acarreta em uma diminuição do nível de ativação de V3. Um fato interessante é a presença de uma redução na ativação em regiões extra-visuais (córtex parietal e frontal), muitas delas descritas em estudos de correlatos neurais da

consciência. Os autores sugerem que tal supressão é originária de sinais motores relacionados às piscadas os quais seriam utilizados para atenuar suas consequências sensoriais (Bristow et al. 2005a), visto que áreas envolvidas com o movimento palpebral (campo ocular frontal – FEF e campo ocular suplementar – SEF) também eram ativadas durante o movimento palpebral. Assim, os apagões provocados pelas piscadas parecem ser ativamente suprimidos pela atividade motora. Na mesma época, outro estudo realizado por Bristow e colaboradores (2005b) encontrou uma região do córtex parietal-ocipital medial que aumenta a sua atividade somente quando o piscar acontece durante a estimulação visual, sugerindo um papel dessa área na manutenção da continuidade perceptual durante o piscar. No entanto, estudos recentes de ressonância magnética funcional relataram resultados contrários aos apresentados acima. Por exemplo, um estudo realizado em humanos por Tse e colaboradores (2010) e outro por Hupé e colaboradores (2012) mostrou que o piscar gera um grande aumento na atividade do córtex visual primário e áreas extra-estriadas (V2/V3) quando realizado durante estimulação visual. Além disso, os autores não encontraram ativações nas áreas envolvidas no controle motor (FEF e SEF) e nem em áreas envolvidas com consciência. Segundo esses pesquisadores, a explicação para esses resultados controversos reside no tipo de piscada utilizada no estudo: voluntária (Bristow et al., 2005a, 2005b) e espontânea (Hupé et al., 2012; Tse et al., 2010). Recentemente, os mesmos resultados foram encontrados em um estudo de ressonância magnética em macaco *rhesus*, o qual também utilizou o piscar espontâneo (Guipponi et al., 2014).

Alguns estudos mostram ainda que não há modulação significativa no núcleo geniculado lateral durante o piscar frente à estimulação visual (Bristow et al., 2005a; Buisseret e Maffei, 1983; Lo e Zhu, 1997). Buisseret e Maffei (1983) sugeriram que a falta de supressão nessa área definiria a supressão vista em V1 como sendo causado por um efeito a nível cortical. Por outro lado, Bristow e colaboradores (2005a) encontraram um sinal positivo (aumento na resposta) no núcleo geniculado lateral quando o piscar era evocado no escuro, o que poderia sugerir a presença de um sinal extra-retinal presente também nessa área.

De acordo com os expostos acima, a existência e a manifestação neuronal dos mecanismos subjacentes à supressão neuronal e a continuidade perceptual durante o piscar ainda são pouco compreendidos e controversos. Entretanto, inúmeras evidências mostram que o piscar pode dividir os mesmos mecanismos de supressão da atividade neuronal que os movimentos sacádicos (Ridder e Tomlinson, 1993 e 1997; Volkman,

1986), os quais também causam perturbações da imagem retinal que não são conscientemente percebidas. Dessa forma, entender como os movimentos sacádicos modulam a resposta neuronal também pode ajudar na compreensão dos efeitos neuronais do piscar.

1.4. Relação entre o piscar e o movimento sacádico

Assim como o piscar, o movimento sacádico gera perturbações nas informações que atingem a retina. Várias evidências comportamentais, psicofísicas e eletrofisiológicas sugerem que o efeito do piscar e o da sacada compartilham um mesmo mecanismo. Aparentemente, há uma associação temporal entre esses dois movimentos, isto é, quando um ocorre, há uma grande probabilidade do outro também ser desencadeado. Essa associação comportamental foi demonstrada em algumas espécies de mamíferos (Evinger et al., 1984; Riggs et al., 1987) e também em aves (Dias., 2013). Por exemplo, um estudo realizado por Evinger e colaboradores (1994) em humanos mostrou que 97% das sacadas acima de 33 graus são acompanhadas por um piscar simultâneo. O estudo de Dias (2013) também mostrou uma associação parecida na coruja buraqueira, onde 85% das piscadas ocorriam concomitantemente com as sacadas (movimentos rápidos da cabeça). É importante notar que essa associação não parece estar ligada a uma estimulação da córnea gerada pela sacada ou pelo movimento de cabeça, no caso da coruja buraqueira, o que desencadearia um piscar reflexivo devido ao deslocamento de ar (Dias, 2013; Evinger et al., 1994). Outros trabalhos mostram que durante o movimento palpebral, ocorrem também movimentos oculares simultâneos em direção a região nasal (Evinger et al., 1984 – para revisão, ver Leigh e Zee, 1999) e que esses dois eventos modulam áreas corticais em comum (Bodis-Wollner, 1999).

Estudos da atividade neuronal mostram que as sacadas também geram uma supressão da atividade dos neurônios de V1 quando estes estão sobre estimulação visual (Kowler, 2011; Leopold e Logothetis, 1998; Sylvester et al., 2005) e uma ativação quando esse movimento é realizado no escuro (Barlett et al., 1976). Essas características também foram encontradas a nível do núcleo geniculado lateral (Jeannerod e Putkonen, 1971; Lee e Malpeli, 1998; Reppas et al., 2002; Sylvester et al., 2005; Sylvester e Rees, 2006). Além desses efeitos (para revisão, ver Ibbotson e Kregelberg, 2011) as sacadas ainda geram fenômenos perceptuais, como por exemplo, o deslocamento de campo receptivo. Através de registros eletrofisiológicos em macacos *rhesus*, Duhamel e colaboradores (1992) mostraram que os neurônios do córtex parietal possuem a

capacidade de deslocar o seu campo receptivo para um local determinado pelo movimento sacádico antes desse movimento ocorrer. Mais precisamente, quando olhamos para um ponto em uma cena visual, um determinado neurônio está sendo estimulado por uma pequena região dessa cena que está dentro de seu campo receptivo. Se movermos nossos olhos para outro local, o campo receptivo desse neurônio também se deslocará para uma nova posição. O que acontece é que, antes do movimento sacádico ocorrer, o campo receptivo desse neurônio já é responsivo para a nova posição imposta pela sacada (Wurtz, 2008). Essa propriedade parece ocorrer também em várias áreas extra-estriadas, como V2, V3 e V4 (Nakamura e Colby, 2001; Tolia et al., 2001). Estudos psicofísicos demonstram ainda que as sacadas geram uma compressão da percepção de tempo e espaço (Morrone et al., 2005; Yarrow et al., 2001). Morrone e colaboradores (2005) apresentaram um par de barras, separadas por um intervalo de 100 ms e pediram para voluntários julgarem qual seria a separação temporal percebida entre essas barras. Esses voluntários fizeram esse julgamento antes, durante e depois de realizarem longos movimentos sacádicos (30°). Foi mostrado que, bem antes e depois da sacada, os observadores conseguiram realizar um correto julgamento do tempo de separação das barras. Entretanto, quando o teste foi realizado pouco antes da sacada, o intervalo aparente entre as barras ficou muito menor (aproximadamente 50 ms). Dessa forma, os autores sugeriram que a sacada gera uma compressão na percepção de tempo. O mesmo parece ocorrer com a noção de espaço (Morrone et al., 1997; Ross et al., 1997; para revisão ver Burr et al., 2010).

Todas essas características comportamentais, psicofísicas e eletrofisiológicas apresentadas acima são necessárias para manter a estabilidade visual durante as sacadas (Burr et al., 2010; Wurtz et al., 2008). Entretanto, para gerar essa estabilidade, o sistema visual precisa saber quando as mudanças nas imagens que chegam até a retina são resultantes de um movimento da cena visual ou de uma sacada. Tanto para essa função, como para as modulações nas respostas neuronais, é gerado um sinal derivado de regiões motoras, conhecido como descargas corolárias.

1.5. Descargas corolárias

As descargas corolárias são sinais encaminhados por áreas motoras até as áreas sensoriais e que tem o papel de sinalizar ao sistema a ocorrência de um evento. O termo descarga corolária foi cunhado por Roger Wolcott Sperry em 1950. Através da rotação em 180° do olho de uma espécie de peixe, Sperry (1950) observou que esse animal

nadava em círculos. Em seus experimentos, ele concluiu que conforme um peixe se movimenta para frente, um sinal corolário indica que, de fato, o movimento está ocorrendo para frente e compensa o sinal de movimento contrário que chega ao cérebro pela imagem que se forma na retina. No caso do peixe com os olhos virados em 180°, enquanto ele se move para frente, o sinal corolário continua o mesmo, só que a sensação de movimento transmitida ao cérebro pela retina também é de movimentação para frente. Assim, todos esses sinais combinados levariam o peixe a movimentar-se em círculos. Após a década de cinquenta, sua existência foi comprovada em diversos animais, desde nematódeos, insetos e até primatas (Crapse e Sommer, 2008).

As descargas corolárias também estão presentes nos efeitos modulatórios causado pelas sacadas na atividade neuronal. Por exemplo, o mecanismo de deslocamento do campo receptivo é dependente desse tipo de sinal, porque é preciso que o sistema visual sinalize para as células neuronais para deslocar seu campo receptivo antes do evento ocorrer. Ao que parece, esse sinal corolário vem do colículo superior, área responsável por gerar os movimentos oculares em mamíferos (Gandhi e Katnani, 2011). Os neurônios dessa área projetam para o núcleo medial dorsal do tálamo que, por sua vez, projetam para o campo ocular frontal (Sommer e Wurtz, 2002, 2004a, 2004b; Wurtz et al., 2011). Sommer e Wurtz (2008) mostraram que o sinal encaminhado por essas áreas é responsável pelo deslocamento do campo receptivo dos neurônios antes da efetuação do movimento ocular, o que gera um aumento na descarga de potenciais de ação aproximadamente 70 ms antes do evento. Através da inativação do núcleo medial dorsal do tálamo, esses autores mostraram que a atividade neuronal passa a não aumentar mais antes da sacada, e o efeito de deslocamento do campo receptivo se perde (Sommer e Wurtz, 2006).

Os efeitos modulatórios das sacadas sobre o córtex visual primário e o núcleo geniculado lateral de macacos e gatos também foram avaliados (Adey e Noda, 1973; Duffy e Burchfiel, 1975; Toyama et al., 1984; Wurtz, 1969). Tais estudos reportam a presença de uma supressão nos disparos de potenciais de ação dos neurônios dessas áreas. Esses efeitos também parecem ser modulados por descargas corolárias, já que ocorrem sem a presença de estimulação visual (no escuro) e até mesmo no caso onde o movimento ocular foi paralisado por meio de anestesia retrobulbar, de modo que a simples tentativa de realizar o movimento gera tais efeitos modulatórios (Toyama et al., 1984). Em um estudo realizado em pombos, Yang e colaboradores (2008) mostraram que os efeitos das sacadas sobre as respostas das células do núcleo geniculado lateral e

do telencéfalo (wulst) também são moduladas por descargas corolárias. Utilizando registros extracelulares, esses autores comparam os padrões de respostas das células dessas áreas e demonstraram a existência de uma diminuição dos potenciais de ação durante as sacadas. Um resultado interessante foi o de que essa diminuição começava a ocorrer em aproximadamente 73 ms antes do início do movimento, o que caracterizou a presença de uma descarga corolária. Ainda, através da desativação de áreas motoras, eles demonstraram que esse sinal corolário que chega até as células do telencéfalo, passando pelo NGL, vinham das áreas envolvidas na geração de nistagmo optocinético (responsável por estabilizar a imagem na retina).

Dessa forma, uma questão interessante a se avaliar seria a real existência de um sinal corolário associada também ao piscar como proposto no estudo de Bristow e colaboradores (2005a e 2005b). Essa questão vem à tona por dois principais motivos: (i) o sistema visual precisa discriminar as interrupções visuais causadas pelo piscar das causadas por eventos externos; (ii) várias evidências apontadas acima mostram que o piscar e o movimentos sacádicos compartilham os mesmos mecanismos. Assim, pensar na existência desse sinal associado ao piscar se torna plausível, principalmente em aves, cujas células do telencéfalo visual (wulst) parecem ser ativamente moduladas pelas sacadas. Nesse caso, é importante ressaltar a existência de outras duas hipóteses que também podem contribuir para a discriminação de eventos endógenos e exógenos (revisadas em Wurtz, 2008 e Wurtz et al., 2011). A primeira seria uma reafirmação visual: durante a movimentação dos olhos o campo visual é deslocado na retina, sendo que essa informação seria utilizada como um indicador de movimentação endógena. No caso do piscar, podemos pensar que a queda de iluminação gerada pela pálpebra poderia ser utilizada como tal fonte de informação. A segunda está relacionada com a propriocepção, onde a informação utilizada para discriminação seria proveniente dos proprioceptores dos músculos oculares responsáveis pelo movimento dos olhos e das pálpebras.

Outra hipótese interessante a ser explorada e que pode explicar a percepção contínua da imagem frente ao piscar é a de Billock (1997), a qual propõe que circuitos reverberantes tálamo-corticais podem ser importantes para a manutenção da informação perceptual na memória de curta duração, realizando o que ele chama de preenchimento (*filling-in*) do escotoma (escuridão) temporal. Dessa forma, durante o apagão gerado pelo piscar, a informação perceptual imediatamente antecedente ao fechamento da pálpebra seria mantida no circuito tálamo-córtico-talâmico até o levantamento da

pálpebra. Contudo, apesar de interessante, essa hipótese nunca foi comprovada. Ainda assim, algumas evidências corroboram a idéia de que o núcleo geniculado lateral do tálamo possui um papel importante no processo de preenchimento do escotoma temporal, o que contraria a visão clássica de que ele seria apenas uma estação de relé entre a retina e o córtex visual primário. Em primeiro lugar, enquanto apenas 10% das aferências que chegam nesse núcleo vêm das células ganglionares da retina, cerca de 30% são aferências de retroalimentação que vêm da camada VI do córtex estriado (Sillito e Jones, 2004). Além disso, estudos demonstraram que essa retroprojeção córtico-talâmica tem um papel importante na modulação das respostas das células do NGL a estímulos visuais, particularmente de dois modos: o primeiro é mudando o padrão de disparo dessas células entre “tônico” e “em salvas” (*bursts*) (Wang et al., 2006), o que provavelmente altera o tipo de informação que é veiculada ao córtex (Sherman, 2001). O segundo modo é modulando as propriedades espaciais dos campos receptores dessas células, principalmente reforçando os mecanismos de supressão da periferia do campo, o que aumenta a saliência dos estímulos (Sillito e Jones, 2004).

1.6. A coruja como modelo experimental

Uma das maiores dificuldades em estudar os efeitos neuronais do piscar em mamíferos e, em particular, os efeitos da diminuição brusca de luminância causada por ele, é o fato de que, durante as piscadas, ocorrem movimentos oculares simultâneos (Evinger et al., 1984), os quais alteram a atividade neuronal em vários níveis do sistema visual (Gawne e Martin, 2002; Martinez-Conde et al., 2000;). Separar os efeitos desses movimentos e das piscadas é difícil do ponto de vista técnico, já que, em grande parte, as mesmas áreas corticais são moduladas nesses dois movimentos (Bodis-Wollner, 1999). Para resolver esse empecilho, propomos a utilização de um modelo experimental alternativo: a coruja. Essa ave oferece uma oportunidade única para realizar essa separação metodológica, já que possui movimentos oculares extremamente reduzidos (Knudsen, 1982; Pettigrew e Konishi, 1976; Steinbach e Money, 1973), chegando a um máximo de 0,5° na coruja buraqueira (Cooper e Pettigrew, 1979). Apesar dessa diferença, o sistema visual da coruja possui diversas analogias com o dos primatas. Seu wulst visual, região do telencéfalo que recebe projeções da via retino-genicular (Karten et al., 1973; Nieder e Wagner, 2000, 2001; Pettigrew e Konishi, 1976; Pettigrew, 1979; Wagner e Frost, 1993), exibe uma organização topográfica precisa, respostas seletivas à orientação e direção de movimento e a contornos ilusórios (Nieder e Wagner, 1999;

Pettigrew e Konishi 1976; Pettigrew 1979). Há também evidências que uma representação ordenada de disparidade e orientação está presente nessa estrutura (Liu e Pettigrew, 2003; Wagner e Frost, 1993). Além disso, evidências recentes obtidas por nosso grupo demonstram a existência de grandes semelhanças no processamento do movimento de estímulos visuais, das características de filtragem espaço-temporais e da resposta ao contraste (Baron et al., 2007, Pinto e Baron, 2009; Vieira et al., 2009). É importante ressaltar ainda que o wulst da coruja é particularmente desenvolvido, ocupando quase um quarto do volume do cérebro (Iwaniuk e Hurd, 2005; Iwaniuk e Wylie, 2006). Ademais, na coruja buraqueira, a via retino-genicular, que é a entrada principal para o wulst, é conhecida por incorporar a maioria das saídas de sinais da retina (Bravo e Pettigrew, 1981), uma característica que, em aves com olhos laterais, é usualmente atribuída à via tectofugal (Remy e Güntürkün, 1991). Todas essas evidências mostram que o wulst da coruja parece ser mais desenvolvido do que em outras aves.

Finalmente, o wulst também possui neurônios da sua camada de saída que projetam de volta para o núcleo geniculado lateral (Bravo e Pettigrew, 1981). Apesar de essa projeção ser pouco estudada e de não haver dados quantitativos a seu respeito, é provável que ela constitua uma alça wulst-geniculado, à semelhança do que ocorre em mamíferos, embora essa hipótese ainda necessite de comprovação experimental. Tomados em conjunto, os resultados acima expostos sugerem que o wulst visual da coruja pode ser considerado funcionalmente análogo ao córtex visual primário de carnívoros e primatas, muito embora essas estruturas tenham origens evolutivas independentes (Shimizu e Bowers, 1999). Tudo isso torna a coruja um excelente modelo para o estudo dos mecanismos subjacentes à continuidade perceptual relacionada ao ato de piscar e, conseqüentemente, dos efeitos neuronais causados pela diminuição transiente de luminância na retina.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar os efeitos causados pelo piscar e por mudanças transientes na estimulação visual (controladas experimentalmente), nos neurônios do wulst visual da coruja, com o intuito de fornecer novos achados acerca dos mecanismos envolvidos na continuidade perceptual durante o piscar.

2.2. Objetivos Específicos

1. Adaptar um pupilômetro, primariamente desenvolvido para humanos, para análise do piscar em coruja, sendo esse um passo imprescindível para a realização do presente estudo;
2. Caracterizar a dinâmica do reflexo pupilar na coruja buraqueira;
3. Caracterizar a dinâmica temporal do piscar na coruja em situação de registro eletrofisiológico (com cabeça imobilizada);
4. Caracterizar os efeitos das piscadas sobre a atividade de neurônios individuais do telencéfalo visual da coruja, por meio de registros eletrofisiológicos extracelulares.

3. Metodologia geral

3.1. Cuidado com os animais e preparação para os registros

Todos os resultados apresentados neste estudo foram obtidos a partir de experimentos conduzidos em corujas buraqueiras (*Athene cunicularia*). As aves utilizadas foram doadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e mantidos em um dos aviários semi-cobertos, localizados nas dependências do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esse conjunto de aviários é cadastrado no IBAMA como *Criadouro Científico de Fauna Silvestre para Fins de Pesquisa*. Devido a uma mudança na legislação, o status do cadastro foi alterado no decorrer do projeto conforme apresentado nos documentos em anexo (ANEXO IA e B). Todos os procedimentos experimentais adotados neste trabalho foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (Protocolo 41/2011, vide ANEXO II). O respeito dos princípios éticos preconizados internacionalmente para a experimentação animal norteou todas as fases de desenvolvimento deste trabalho.

Todos os procedimentos para obtenção dos dados foram realizados em animais com a cabeça presa. Essa condição foi bem aceita pelas corujas depois de algumas semanas de adaptação. Para tanto, as corujas foram inicialmente socializadas através de manuseio diário por um período médio de quatro semanas. São utilizadas técnicas padrão de falcoaria, de acordo com as quais as corujas são carregadas e mantidas no laboratório, de modo a se acostumarem com a presença de pessoas e com os sons habituais do local. Além disso, as corujas que foram objeto de nosso estudo foram frequentemente deixadas na cabine experimental, onde muitas vezes foram alimentadas, o que funcionou como um reforço positivo. Após esse período de adaptação, os animais foram submetidos à cirurgia de implante da câmara de registro, a qual é utilizada para fixação da cabeça do animal, seguido de um período de recuperação de pelo menos dois dias. Somente então deu-se início ao treinamento para aceitação da imobilização corporal e fixação da cabeça. Para tal, os animais foram colocados sobre um poleiro e presos a ele por alças de Velcro®, sendo parcialmente envolvidos por uma jaqueta de couro que impede o movimento das asas. Após uma semana de treinamento em tais

condições o animal não oferecia mais sinais de resistência, como vocalizações e tentativas de desvencilhamento. Os procedimentos de instalação dos dispositivos de restrição e fixação de cabeça eram executados rapidamente, com pouco ou nenhum estresse para os animais, e, no decorrer do registro, esses permaneceram quietos e sem sinais de aversão. Assim que sinais de cansaço ou inquietude eram notados nos animais, os registros eram interrompidos. Isso tipicamente ocorria 4 a 5 horas após o início do experimento, durante o qual os animais eram constante e cuidadosamente monitorados pelo experimentador.

A câmara de registro utilizada para imobilizar a cabeça do animal e dar acesso à craniostomia durante os registros eletrofisiológicos consistiu em um pequeno cilindro metálico com um diâmetro interno de 10 mm, altura de 8 mm, espessura de 1,5 mm e massa de 1 g (~ 0.7% do peso do animal). A cirurgia para implante dessa câmara foi realizada sob anestesia geral utilizando Zoletil® 50 (uma mistura de 1:1 de tiletamina e zolazepam, Virbac, Carros, França), administrado por via intramuscular em uma dose de 20 mg/kg (e meia dose para manutenção). Após a perda dos reflexos, o crânio foi exposto através de uma incisão na pele com 25 a 30 mm de comprimento, e a posição da craniotomia foi marcada sobre a superfície óssea de acordo com coordenadas estereotáxicas definidas em nosso laboratório. A câmara foi centrada nesse ponto de referência e fixada ao crânio com resina odontológica (Vitro Fil®, DFL, Rio de Janeiro, Brasil) de modo a permitir que os eletrodos entrassem perpendicularmente ao cérebro. Previamente à fixação, pequenos buracos foram feitos no crânio para permitir uma melhor aderência da resina. Ao final do procedimento foi realizada uma craniotomia circular (diâmetro aproximado de 3 mm) por dentro do cilindro, a qual dava acesso à área de interesse (Wulst). As cirurgias tiveram duração média de 2 horas e foram realizadas sobre condições assépticas. Após cada cirurgia, foram administrados, intramuscularmente, um antibiótico de largo espectro (50 mg/kg de Terramicina®, Pfizer, São Paulo, Brasil) e um analgésico/anti-inflamatório (2 mg/kg de Ketofen® 1%, Merial, São Paulo, Brasil). Para prevenir o desenvolvimento de fibrose na dura-máter, foi aplicada topicamente uma gota de Nepodex® (Latinofarma, São Paulo, Brasil), um colírio que associa um corticoide (dexametasona 1mg/mL) com antibióticos (neomicina mg/mL e polimixina B 6000UI/mL). Essa aplicação tópica foi realizada também após cada sessão de limpeza da craniotomia.

3.2. Visão geral do setup experimental

Todos os experimentos foram conduzidos em uma cabine com dimensões de 68 cm de profundidade, 50 cm de largura e 80 cm de altura. Dentro da cabine foram posicionados partes dos seguintes dispositivos de registro utilizados: (i) o sistema de aquisição de imagem, (ii) o sistema de aquisição da atividade extracelular e (iii) o tubo flexível do soprador de ar. Internamente, a cabine é forrada com tecido preto, a fim de tirar qualquer reflexão da luz produzida pelo monitor. Durante os registros, a cabine permaneceu totalmente fechada, e a única fonte de luz presente foi a do monitor de estimulação. O material de construção dessa cabine também permite a atenuação de sons externos.

A figura 1 mostra o esquema geral do setup experimental utilizado durante os registros. As informações captadas pelos dispositivos internos da cabine experimental são encaminhadas a diferentes dispositivos de processamento. Primeiramente, o sinal proveniente dos eletrodos é amplificado e filtrado através de um pré-amplificador (Plexon®, Texas, USA). Do pré-amplificador, o sinal neuronal condicionado vai para duas caixas de conexão onde diversos tipos de sinais (E/S digital codificando cada condição experimental, TTL para disparar a aquisição) são centralizados antes de serem enviados ao computador de aquisição (*Alba* PC), responsável por digitalizar e armazenar os dados. Um segundo computador é responsável por apresentar os protocolos experimentais (*Tyto-2* PC) e por encaminhar o sinal TTL utilizado para sincronização entre os dispositivos (soprador de ar, sistemas de aquisição de imagem e o sistema de registro eletrofisiológico). Esse último computador ainda é responsável pelo envio das informações referentes aos protocolos experimentais que serão apresentados, como por exemplo, o tipo de estímulo e o tempo de apresentação. O computador de estimulação visual é ainda controlado por outro terminal (*Pulsatrix* PC) para a realização do controle geral do experimento, o qual envolve o mapeamento manual dos campos receptivos dos neurônios e o controle da apresentação dos protocolos experimentais. Um quarto computador (*Choliba* PC) é responsável por controlar a câmera, armazenar e analisar os vídeos transmitidos por ela. Por fim, todos os dados adquiridos durante uma sessão de registro são armazenados em um quinto computador (*Glaucidium* PC) para análise posterior. A interconexão entre computadores é realizada por meio de uma rede local baseada em uma arquitetura ethernet.

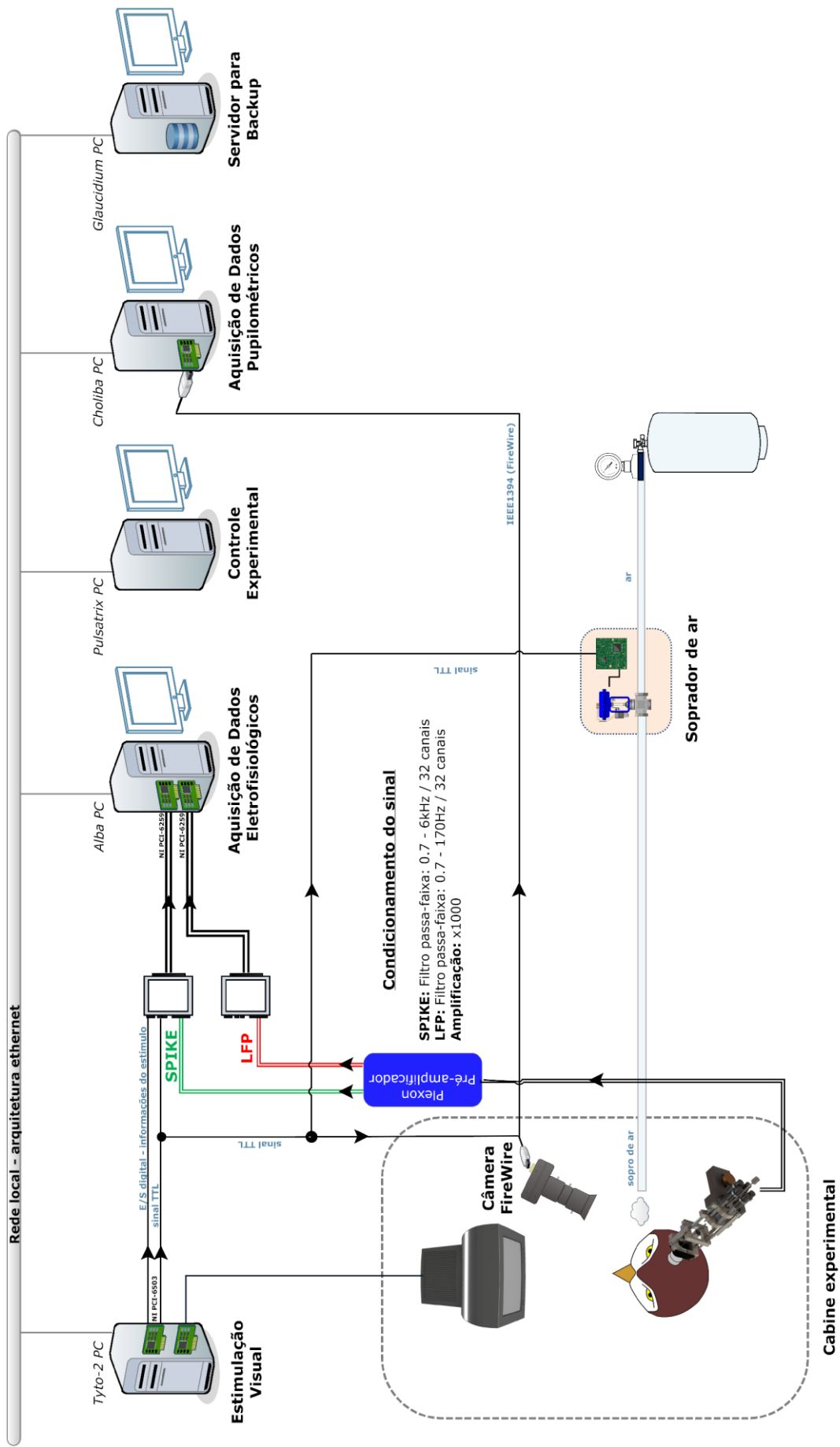


Figura 1: Visão geral do setup experimental. Todos os dispositivos utilizados para aquisição de dados (soprador de ar, aquisição de imagem e registro eletrofisiológico) são sincronizados via sinal TTL. A interconexão entre computadores é feita por meio de uma rede local.

3.3. O sistema de aquisição de imagem (pupilômetro)

Para os registros do reflexo pupilar e do movimento palpebral foi utilizado um sistema de aquisição de imagem inicialmente desenvolvido para pupilometria no homem (Souza et al., 2013) em colaboração com o Núcleo de Estudos e Pesquisas em Engenharia Biomédica (NEPEB – UFMG). Minha contribuição nesse projeto limitou-se a adaptar, aperfeiçoar e validar o sistema para a coruja. Esse trabalho foi realizado em parceria com John Kennedy Schettino de Souza, o qual era, nessa época, aluno de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da UFMG.

Uma câmera digital FireWire (Fig. 2A; FireFly® MV, Point Grey Research, Richmond, Canadá, EUA), equipada com uma lente de zoom ajustável (Fig. 2B; OVD®, 5-100 mm, F1.8, íris manual; dois anéis de extensão) foi utilizada para capturar imagens ampliadas do olho direito do animal. Um ângulo de cerca de 30° entre o eixo longitudinal da câmara e o plano sagital da cabeça da coruja foi mantido, de modo que permitia um alinhamento tão perto quanto possível em relação ao eixo óptico do olho, sem obstruir o campo de visão referente ao monitor CRT (Fig. 2D). O olho foi iluminado por um emissor de luz infravermelha (IR-LED – potência = 5W), montado sobre um pequeno tripé (Fig. 2C), posicionado lateralmente a uma distância aproximadamente a 9 cm da córnea. Dado que a câmera e a fonte de luz não foram dispostas coaxialmente, a pupila revelou-se como um disco saliente de cor mais escura. A relação entre o tamanho da imagem em pixels e o tamanho métrico real da pupila foi determinada por uma régua padrão no fim de cada sessão de gravação.

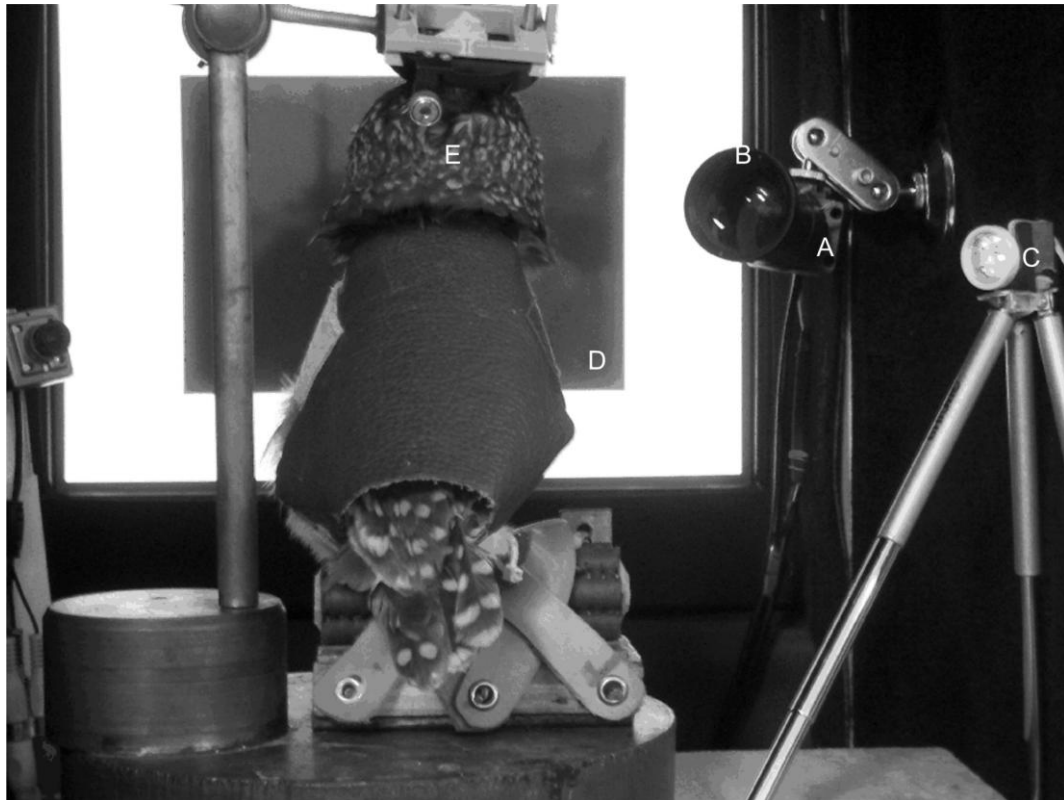


Figura 2: Cabine de registro com a disposição do equipamento de aquisição de imagem (pupilometria). (A) Câmera fireFly® MV. (B) Lente intercambiável com ajuste de foco e abertura. (C) Fonte de iluminação infravermelha. (D) Monitor CRT utilizado para estimulação visual. (E) Coruja buraqueira com cabeça fixa.

A operabilidade da câmera e aquisição de imagens foram controladas por um software desenvolvido em um ambiente de programação gráfica de alto nível, LabVIEW 8.5 (National Instruments, Texas, EUA). Dois componentes de software desenvolvidos pela National Instruments (NI) foram também utilizados, a saber: o Módulo de Desenvolvimento Visual 8.5, que consiste em uma abrangente biblioteca de rotinas de processamento de imagens digitais; e o pacote de drivers NI-IMAQdx responsável por realizar a interface entre a câmera e o programa de aquisição. Um computador de bancada com sistema operacional Microsoft Windows XP (processador Intel ® Core i5 750 MHz, 2 GB de RAM) foi empregado para executar o programa de aquisição de imagens. A câmera foi regulada para uma resolução espacial de 320X240 e uma frequência de amostragem de 120 Hz. A aquisição de imagens foi disparada por um pulso TTL enviado pelo computador de estimulação visual por intermédio de uma placa digital I/O PCI-6503 (National Instruments). Uma limitação inerente a essa abordagem é que o sinal TTL pode acontecer em qualquer momento durante a gravação do primeiro quadro, introduzindo assim uma incerteza no que diz respeito à

sincronização entre o início do estímulo visual e tempo de resposta da câmera. As sequências de vídeos gravadas foram armazenadas no formato de arquivo AVI. Ressalta-se que a transferência de dados pelo padrão IIDC-IEEE1394a da câmera permitiu uma transmissão de imagem em tempo real, sem a necessidade de uma placa de captura ou de outra interface. Dados sobre o tempo de ocorrência (“*timestamps*”) de cada quadro capturado, inseridos como uma sequência de caracteres, foram salvos separadamente no formato *Technical Data Management streaming* (TDMS) desenvolvido pela National Instruments. Essa informação foi posteriormente recuperada para verificar se houve eventuais perdas de frames durante as gravações.

3.4. O soprador de ar

Para evocar o piscar na coruja foi empregada uma metodologia clássica que é a utilização de um sopro de ar para estimulação monocular. O soprador de ar (Fig. 3A) foi construído no laboratório com a colaboração dos professores Marcos Antônio da Silva Pinto (CEFET – MG) e João Paulo Machado de Souza (CEFET – MG; atual aluno do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da UFMG). O soprador de ar (Fig. 3A) é composto por uma válvula solenóide controlada eletronicamente e um circuito eletrônico (Fig. 3B) responsável pelo controle da liberação do ar por meio de um sinal TTL. Um tubo plástico fino e flexível acoplado à saída de ar é responsável por canalizar o ar para a córnea e região periorbital.

A duração do sopro de ar é controlada por meio de um potenciômetro que foi ajustado para 20 ms. A pressão de ar utilizada foi o menor valor que evocava o piscar com maior frequência, mas sem causar desconforto para o animal. Caso fosse percebida qualquer reação da coruja, a pressão era imediatamente diminuída. A liberação do ar foi controlada eletronicamente através de um circuito integrado multivibrador monoestável duplo (CD4528B). Esse circuito recebia um sinal de controle TTL oriundo do computador responsável pela estimulação e realizava a abertura da válvula para liberação do ar (Fig. 3B). O tempo de abertura da válvula depende do ajuste de uma resistência variável (potenciômetro – 100K Ω) e de um capacitor (2,2 μ F). O sinal TTL disparado pelo computador de estimulação visual também foi utilizado para a sincronização do dispositivo com o sistema de aquisição de imagem e o sistema de registro eletrofisiológico. Importante salientar que toda vez que o sopro de ar era acionado, o sistema de registro armazenava em um arquivo o momento em que o sinal TTL foi disparado em relação ao início da estimulação visual.

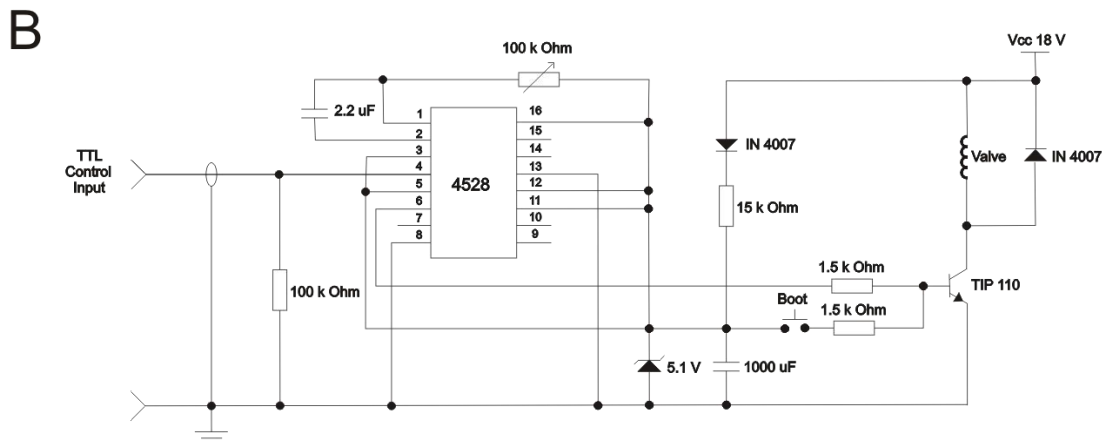
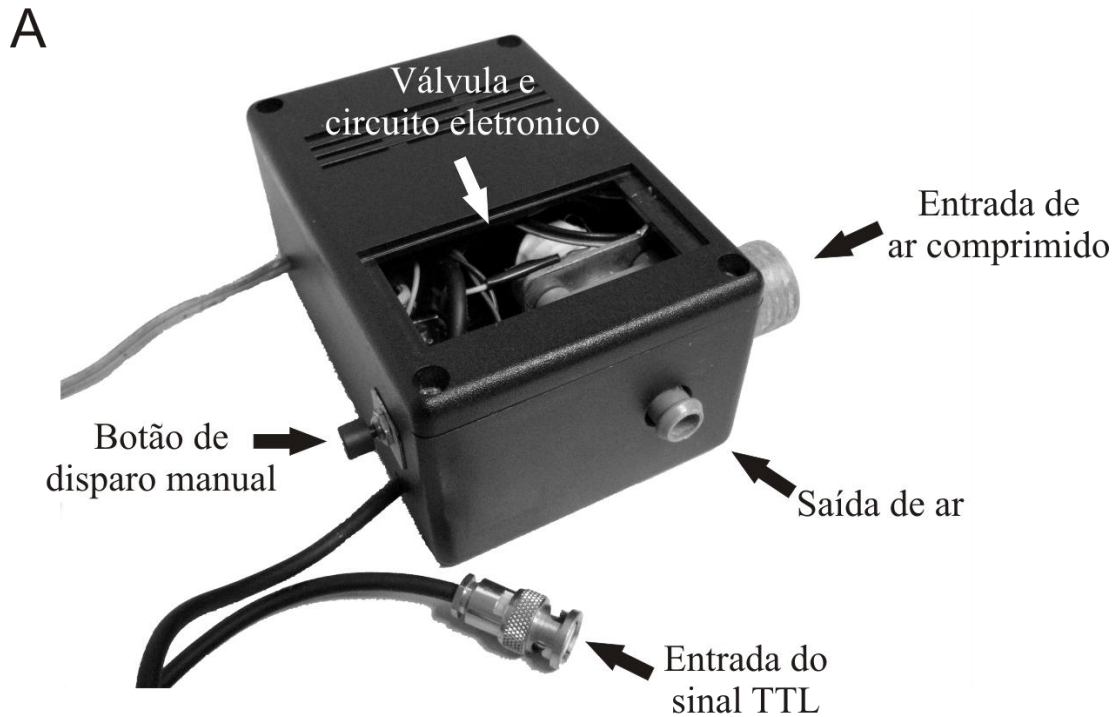


Figura 3: Soprador de ar utilizado para evocar o piscar. (A) O soprador é constituído por uma válvula controlada eletronicamente e um circuito eletrônico (B) responsável por controlar a duração do pulso de ar e a sincronização (através de um pulso TTL) com o sistema de registro.

Assim, foi possível distinguir o piscar evocado do piscar espontâneo. É importante salientar que o sopro de ar gera a movimentação das penas dispostas em torno do olho da coruja. Isso possibilitou que durante as análises dos vídeos essa movimentação fosse utilizada para diferenciar e confirmar os tipos de piscadas.

3.5. Registro da atividade extracelular

3.5.1. Dispositivo multieletrodo

Os registros eletrofisiológicos foram realizados com um dispositivo multieletrodo desenvolvido no Instituto Max-Planck pelo Dr. Sergio Neuenschwander e mostrado na figura 4. Os eletrodos ($n = 2-3$; Thomas Recording, Alemanha; diâmetro do corpo: $80 \mu\text{m}$; diâmetro da ponta: $\sim 2 \mu\text{m}$) foram montados dentro de microtubos guia equidistantes e cada um deles foi acoplado a micromanipuladores hidráulicos de precisão (Narishige, Japão).

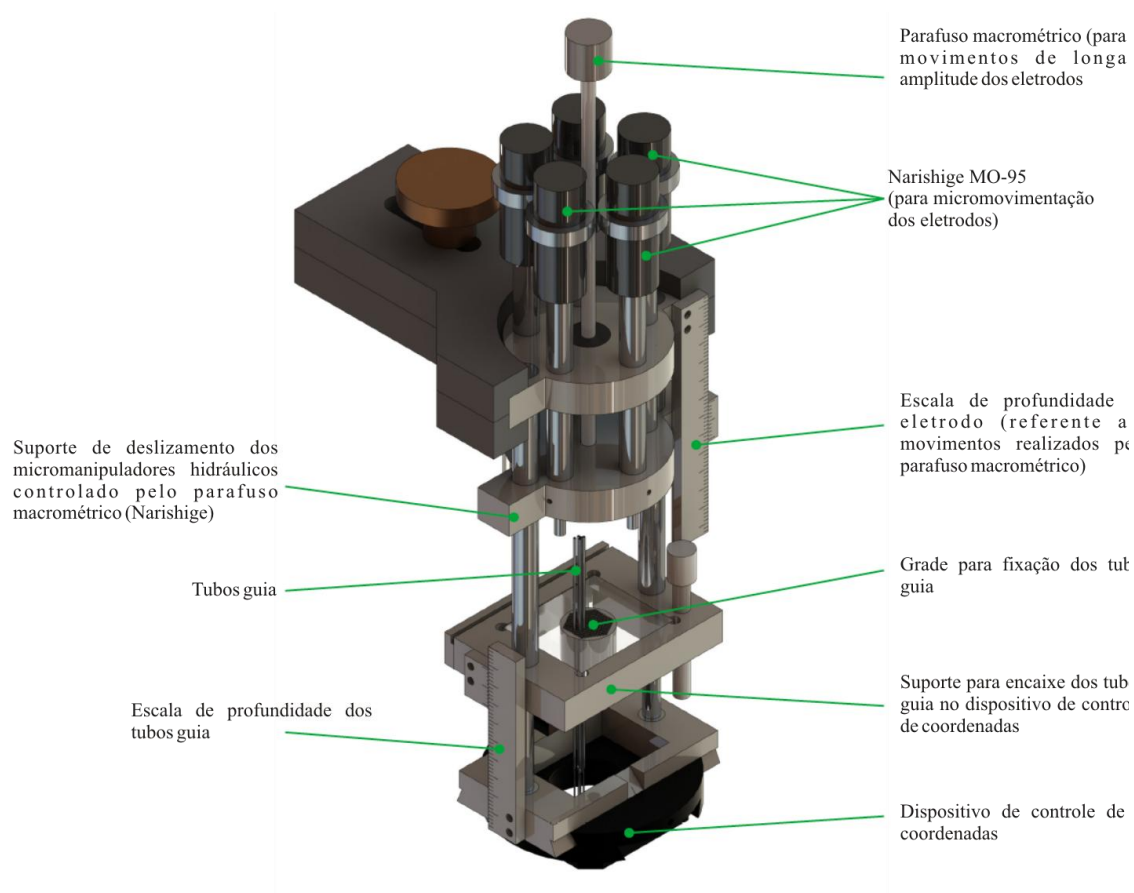


Figura 4: Representação esquemática do dispositivo multieletrodo baseado nos micromanipuladores hidráulicos e uma mesa X-Y para controle de coordenadas (partes do kit MO-95, Narishige, Japão). Projetado por Sérgio Neuenschwander no Instituto *Max-Planck for Brain Research*, Frankfurt, 2005. Simulação realizada por Heitor de Oliveira, Instituto do Cérebro – UFRN, Natal. Cortesia do Dr. Sergio Neuenschwander.

Esse dispositivo permitiu um posicionamento preciso e independente de um pequeno grupo de eletrodos, o que viabiliza a aquisição simultânea do sinal de múltiplas células em diferentes sítios de registro, durante uma sessão experimental. O dispositivo é preso ao cilindro de registro por meio de um adaptador metálico parafusado a ele e

mantido estável por um braço metálico para minimizar os movimentos relativos entre os eletrodos e a cabeça do animal. O sistema em questão já foi utilizado em outros estudos (Baron et al., 2007; Pinto e Baron 2009, 2010), e proporciona uma excelente estabilidade de registro.

3.5.2. Registro dos sinais neuronais

Os sinais da atividade neuronal captados pelos eletrodos foram amplificados ($\times 10000$) e filtrados (Headset HST/16o25, Caixa pré-amplificadora de 32 canais, Plexon Inc., Texas). Dois tipos de sinal extracelular foram obtidos durante o registro: o primeiro é o sinal multiunitário, o qual é proveniente de neurônios isolados (filtrado na faixa de 0,7kHz – 7kHz); o segundo é o potencial de campo local (LFP, filtrado na faixa de 1kHz – 170kHz), proveniente de oscilações no potencial de membrana de uma população de neurônios em torno do eletrodo. Apesar de adquirido, esse segundo sinal não foi analisado no presente trabalho. A digitalização do sinal foi realizada com uma frequência de amostragem de 32 kHz, por uma placa A/D de 16 bits de resolução, com recursos de trigger e timer (PCI-6259, National Instruments, Austin, Texas, EUA). Os dados foram adquiridos, processados e armazenados em um PC AMD Athlon de 2 GHz, sobre o controle do sistema de programas computacionais SPASS, implementado em LabView (National Instruments, Texas, EUA), desenvolvido no Instituto *Max-Planck for Brain Research* em Frankfurt, pelo Dr. Sérgio Neuenschwander.

3.6. Estimulação visual

Para a estimulação visual foi utilizado um monitor CRT de 19 polegadas (Samsung SyncMaster 997MB), com uma resolução de 1024 x 768 pixels e uma taxa de renovação de quadro de 100 Hz. Foi utilizada uma escala RGB de 8-bits com correção gama para produzir um comportamento linear da luminância apresentada no monitor. Para realizar essa correção, primeiro foi medido a luminância de vários tons da escala de cinza (52 tons, variando de 1 a 256 em passos de 5) produzidos pelo monitor, utilizando o medidor de luminância ColorCal (Cambridge Research Systems, UK). Em seguida, as medidas foram plotadas e uma função de ajuste matemático foi calculada ($y=x^{\text{gama}}$; onde x = tons da escala de cinza e y = valores de luminância para cada tom) estimando-se assim, o valor de gama (*Fit Toolbox* do Matlab, MathWorks, USA). Uma vez calculado o valor gama, gerou-se uma função inversa ($y=x^{1/\text{gama}}$) a partir da qual foi gerada uma nova tabela de cores. O efeito final foi uma relação linear entre cor e

luminância, já que as funções inversas do monitor e da tabela de cores se anulam. Medidas fotométricas foram realizadas rotineiramente com o medidor de luminância (ColorCal - Cambrigde Research Systems, UK) a fim de verificar a estabilidade da calibração do monitor.

Os estímulos foram preparados como sequências de imagens *bitmap*, apresentadas com grande exatidão temporal, pelo pacote ActiveStim (www.activestim.com). Essa exatidão temporal foi constantemente verificada através de um dispositivo construído no laboratório que capta mudanças de intensidade luminosa do monitor por meio de uma fotocélula, o qual converte a intensidade luminosa em tensão. Importante ressaltar que a fotocélula utilizada possui um comportamento linear na conversão de intensidade luminosa em tensão. Por meio desse dispositivo foi possível verificar a precisão na apresentação de cada condição dos protocolos experimentais utilizados neste trabalho. Um exemplo dos dados gravados durante os testes pode ser apreciado na figura 5, para uma condição com duração de 7 s. Como pode ser observado, o estímulo (grade senoidal de baixo contraste) foi apresentado exatamente 1s após o início da estimulação visual (linhas verticais cinzas). Após 2 s do aparecimento da grade ocorreu uma interrupção da estimulação por 0.5s, com posterior reaparecimento da grade por mais 2,5 s. No gráfico ainda é possível perceber dois níveis de oscilação nos valores de tensão: uma rápida, referente à taxa de atualização do monitor (100Hz), e uma lenta (representada pela linha cinza abaixo das setas pretas), relacionado ao movimento das barras que formam a grade senoidal. A partir desse tipo de dado foi possível detectar e corrigir eventuais inexatidões na apresentação dos protocolos experimentais.

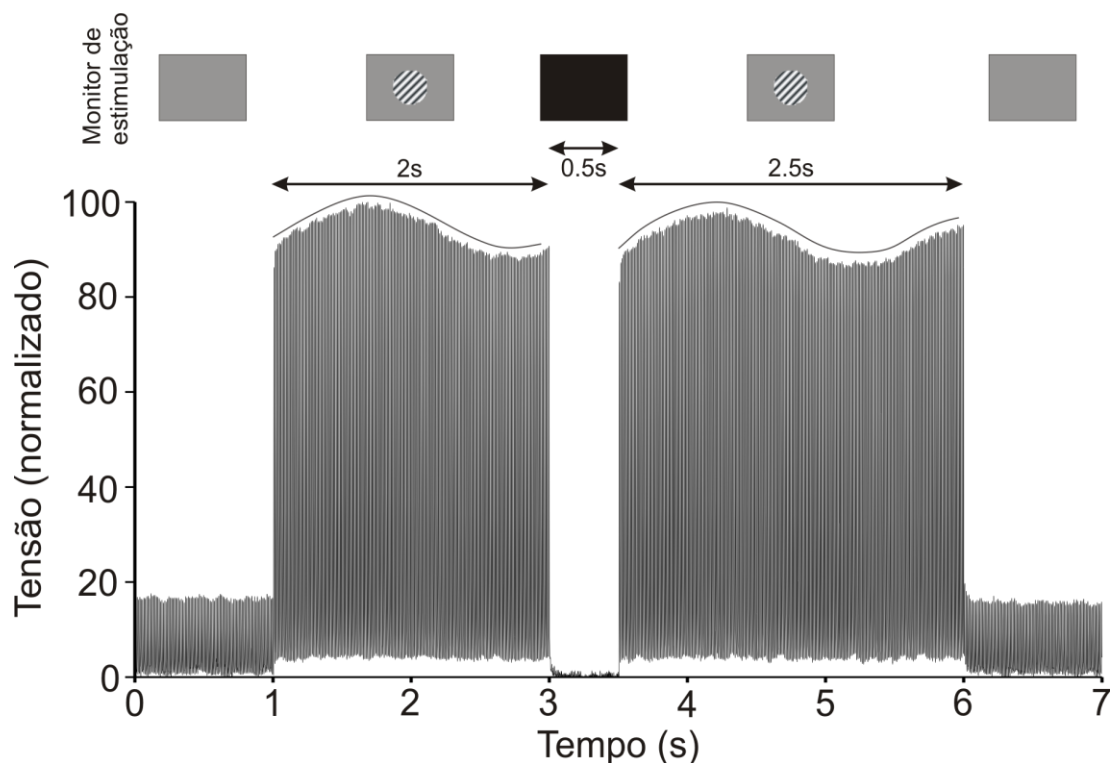


Figura 5: Precisão temporal da apresentação dos protocolos experimentais pelo pacote ActiveStim. Após 1 s do início da estimulação, é apresentada uma grade senoidal por 2 s. Após esse tempo ocorre a interrupção da estimulação por 0.5 s, com posterior reaparecimento da grade senoidal por mais 2.5 s. As setas pretas indicam a duração da apresentação da grade senoidal e da interrupção. A linha cinza abaixo da seta preta mostra a oscilação lenta proveniente do movimento da grade senoidal. As oscilações rápidas são derivadas da taxa de atualização do monitor (100Hz). As linhas verticais em cinza demarcam o exato tempo de apresentação da grade senoidal e da interrupção.

3.7. Estatística geral

A normalidade de distribuição das amostras foi sistematicamente verificada utilizando-se a modificação de Lilliefors do teste de Kolmogorov-Smirnov. Caso a normalidade tenha sido verificada, foi utilizado o teste t para avaliar diferenças estatísticas entre a média de duas populações ou o teste ANOVA para mais de duas. Caso o princípio de normalidade tenha sido violado, o que foi constatado para a grande maioria das amostras, tanto provenientes de dados comportamentais quanto dos neuronais, foram escolhidos os testes de Wilcoxon Signed-Rank e o de Friedmann, equivalentes aos testes paramétricos apresentados acima. Caso outro teste estatístico tenha sido utilizado, esse será especificado no momento apropriado. O nível de significância considerado foi de 5%. Dado o exposto acima, as medidas de tendências centrais foram apresentadas como mediana e o 25° e 75° percentil como uma medida da dispersão populacional.

4. O reflexo pupilar à luz na coruja buraqueira

4.1. Introdução

Como um primeiro passo para estudar o efeito do piscar sobre a atividade dos neurônios do wulst da coruja buraqueira, foi realizado uma adaptação de um pupilômetro primariamente desenvolvido para humanos (ver Capítulo 3, ítem 3.3). Esse objetivo metodológico exigiu esforços não negligenciáveis, mas foi de primeira importância, pois é por meio do dispositivo adaptado que foi possível analisar precisamente, em uma escala temporal da ordem de milissegundos, a relação entre as piscadas e a atividade neuronal no wulst visual. Em paralelo e com o intuito de validar tecnicamente a adaptação do sistema de pupilometria para a coruja, foi realizado também um estudo do reflexo pupilar à luz. No entanto, os motivos que levaram a iniciar esse estudo foram também de ordem científica. Usando a pupila como marcador não invasivo, visou-se entre outros: (i) avaliar a sensibilidade e adaptabilidade da retina a variações de intensidade luminosa, na faixa de valores que provavelmente acompanha o piscar; (ii) fornecer informações para melhor dissociar efeitos retiniais dos extra-retiniais relacionados ao processamento neuronal durante piscar; (iii) evidenciar a possível existência de um piscar reflexivo foto-dependente e, no caso, determinar seu limiar e faixa de saturação.

O tamanho da pupila é um parâmetro fundamental para a regulação do grau de iluminação da retina e que tem um impacto significativo sobre as aberrações ópticas e a profundidade do foco ocular. Assim como o mecanismo de adaptação presente nos primeiros estágios do sistema visual (para revisão ver Baccus e Meister, 2002; Mante et al, 2005; Shappley e Enroth-Cugell, 1984), a constrição e a dilatação pupilar afetam a informação visual de diferentes maneiras. Quando exposta à luz fraca, o tamanho da pupila aumenta, permitindo que mais luz entre no olho, aumentando, assim, a captura de fótons pela retina, logo, a sua sensibilidade. Em contra partida, a constrição pupilar diminui a sensibilidade retinal à luz em níveis elevados de iluminação, o que garante uma adaptação ao escuro mais rápido no momento em que os níveis de luminosidade

são diminuídos (Woodhouse e Campbell, 1975). Consequentemente, o tamanho da pupila ajuda a controlar o nível de adaptação da retina à luz (também conhecido como controle de ganho de luz), o que ajuda a evitar a saturação da resposta celular.

Pelo menos alguns desses mecanismos de controle devem operar rapidamente, uma vez que os olhos tendem a escanear o ambiente até várias vezes por segundo (Land, 1999), o que provoca, a cada ponto de fixação, alterações transientes de intensidade da luz na retina (variação maior que um fator de 10, ver Frazor e Geisler, 2006). De fato, as células da retina são capazes de ajustar sua sensibilidade a intervalos de aproximadamente 200 ms entre as sacadas, por meio de um mecanismo específico presente nos fotorreceptores do tipo cone (Schneeweis e Schapf, 1999; Valeton e Norren, 1983) e, também, através da circuitaria pós-receptor, a qual se beneficia da convergência dos sinais advindos de vários fotorreceptores (Dunn et al., 2007). Em mamíferos, os movimentos da pupila não são adequados para compensar esta variação rápida da intensidade de luz. A latência da resposta pupilar é longa, alcançando um valor médio em torno de 200ms, e a execução do reflexo é relativamente lenta, podendo atingir valores de até 1s, dependendo da intensidade da luz (Ellis, 1981; Feinberg e Podolak, 1965; Lowenstein e Loewenfeld, 1950; Pong e Funchs, 2000). Assim, os movimentos da pupila parecem exercer uma pequena contribuição no controle rápido de ganho de luz nessa classe de vertebrados.

O cenário acima descrito pode ser potencialmente diferente ao considerarmos outra classe de vertebrados: as aves. Ao contrário da musculatura lisa dos mamíferos, a musculatura da íris das aves é constituída principalmente por células estriadas (Mann, 1931). Devido a essa constituição muscular, os períodos de contração e dilatação pupilar diminuem e a velocidade dos movimentos pupilares aumenta (Barbur et al., 2002). Essas características sugerem que nas aves, a pupila pode participar de forma mais dinâmica no processo de controle de ganho de luz, contribuindo, assim, para facilitar o processo de adaptação da retina. Dessa forma, o estudo do comportamento da pupila em função da variação de intensidade de luz, chamado de reflexo pupilar à luz (RPL), pode fornecer pistas importantes para estudar mecanismos adaptativos na visão. No entanto, até agora, apenas alguns estudos apresentaram dados sobre RPL em aves, como a coruja suindara (Schaeffel e Wagner, 1992), corujinha do mato (Bishop e Stark, 1965), pombos (Alexandridis, 1967), e galinhas (Barbur et al., 2002). Entretanto, esses estudos se limitam a avaliações de somente alguns parâmetros do reflexo pupilar (por ex.,

latência e contração máxima), pois tais estudos não tiveram como objetivo principal a mensuração do RPL. Dessa forma, foram obtidos dados quantitativos do reflexo pupilar em 3 corujas buraqueiras a partir dos quais o estudo da modulação neuronal pelo piscar poderá ser melhor planejada e posteriormente interpretada.

4.2. Metodologia

4.2.1. Protocolos experimentais

Os estímulos visuais utilizados foram campos uniformes retangulares de luz acromática. A coruja foi posicionada a 35 centímetros do monitor de estimulação, sendo o ângulo visual subentendido pelo estímulo igual a $39,4^\circ$ de largura x $26,6^\circ$ de comprimento. Antes do início da estimulação propriamente dita, as corujas foram adaptadas ao escuro por vinte minutos. Como mostrado na seção Resultados, esse tempo foi suficiente para garantir a dilatação máxima da pupila de forma estável. Para avaliação quantitativa do reflexo pupilar à luz, foram utilizados dez valores de luminância que variaram de 3,2 a 160 cd/m^2 , apresentados de forma monocular ou binocular. Dois protocolos foram usados para acessar o reflexo pupilar: o primeiro protocolo consistiu em dez níveis de luminância (3,2, 6,2, 9, 15,5, 31,1, 47,9, 65,3, 98,2, $129,2, 160,0 \text{ cd/m}^2$) apresentados durante 100 ms; o segundo protocolo foi delineado para avaliar mudanças na estabilidade do diâmetro pupilar, o qual consistia em seis níveis de luminância (3,2, 15,5, 31,1, 65,3, $129,2, 160,0 \text{ cd/m}^2$) apresentados durante 20 s. Para ambos os protocolos, cada repetição consistia na apresentação de uma tela escura ($0,7 \text{ cd/m}^2$) durante 1s, seguido por uma exibição breve (100 ms) ou longa (20 s) do estímulo. Um intervalo de 9 segundos entre os estímulos foi adotado a fim de permitir a recuperação completa da pupila até o seu estado basal (dilatação máxima no escuro). Cada condição de estimulação foi apresentada 15 vezes, de forma pseudo-randômica.

4.2.2. Análise de dados

Embora não tenha sido detectada a perda de quadros em nosso conjunto de dados (vídeos), é importante lembrar que isso pode ocorrer devido ao sistema operacional (Windows XP) utilizado pelo programa de aquisição de vídeo não operar em tempo real. Por essa razão, uma averiguação sistemática da perda de frames foi realizada, a fim de assegurar que todos os valores de intervalo entre os tempos de

ocorrência de quadros consecutivos correspondiam ao valor do intervalo esperado pela frequência de amostragem nominal da câmara (isto é, 8,33 ms à 120 Hz).

Um conjunto de software implementado no LabVIEW 8.5 foi utilizado para extrair automaticamente estimativas do tamanho pupilar de todas as imagens concernentes a cada repetição durante o registro (Souza et al., 2013). Primeiramente, as bordas da pupila foram segmentadas, como ilustrado na figura 6. Para aumentar a velocidade de processamento, a imagem de entrada (Fig. 6A) foi reduzida, inicialmente, a uma região retangular de interesse (ROI, Fig. 6B), cujo tamanho foi estabelecido em função dos valores do centro da pupila e raio obtidos no frame anterior. Como resultado, a imagem da pupila era automaticamente centralizada, sendo essa etapa de processamento atualizada dinamicamente. Outras melhorias em relação ao ruído do sinal foram obtidas cortando a ROI em forma circular (Fig. 6C), o que efetivamente removeu a maior parte dos pixels de baixa intensidade, geralmente agrupados nos cantos da ROI. Em seguida, um histograma da imagem resultante foi gerado em escala de cinza (Fig. 6D). Devido à forte resposta da íris da coruja buraqueira à iluminação infravermelha, esse histograma tipicamente mostrou um pico correspondente a pupila (formado pelos pixels de baixa intensidade). Um filtro de média móvel ($n = 7$ bins) foi aplicado sobre o histograma para suavizar os picos e vales ruidosos. Em seguida, a derivada do histograma suavizado foi calculada (Fig. 6E) e a segunda passagem pelo zero da curva resultante foi adotada como limiar para a segmentação da pupila. Imagens binárias foram então obtidas, fixando todos os pixels abaixo do limiar em 1, e todos os pixels restantes em zero (Fig. 6F).

Após o processo de segmentação, uma combinação de técnicas de processamento de imagem foi adotada para estimar o centro e diâmetro da pupila. Como mostrado na figura 7, essa parte do procedimento envolveu dois algoritmos simultâneos. Do primeiro algoritmo obteve-se o cálculo da centroide da pupila na imagem binária (Fig. 7A, assim como a Fig. 6F).

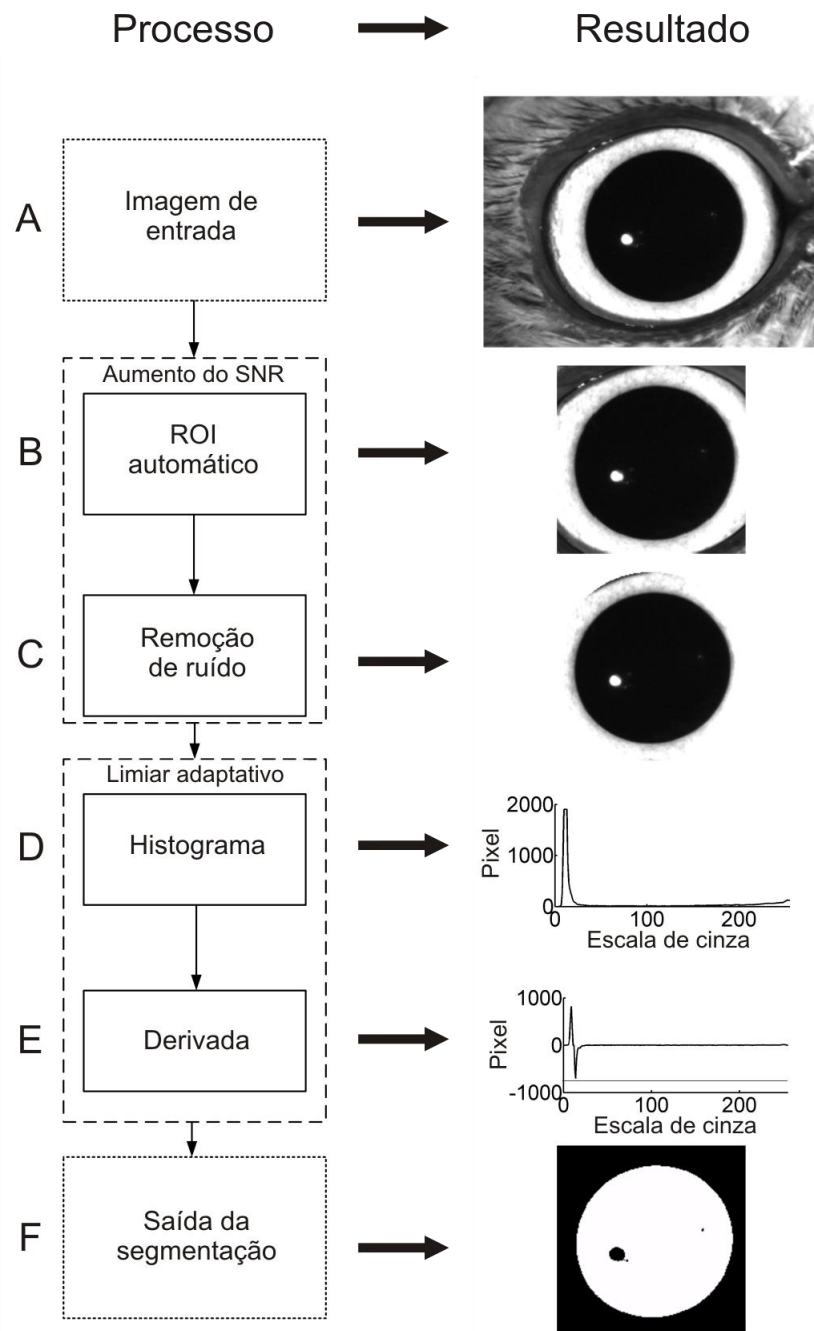


Figura 6: Fluxograma do algoritmo de segmentação da pupila. O processamento começa pelo carregamento de um arquivo AVI, e é realizado para cada quadro do vídeo (A). A imagem de entrada é reduzida para uma região de interesse (B) e cortada em um formato circular (C) para aumentar a relação sinal-ruído. Posteriormente é gerado um histograma dos valores de cinza dos pixels da imagem (D), cuja derivada (E) é utilizada para determinar o limiar de segmentação da pupila. Esse limiar é utilizado para criar imagens binárias (F).

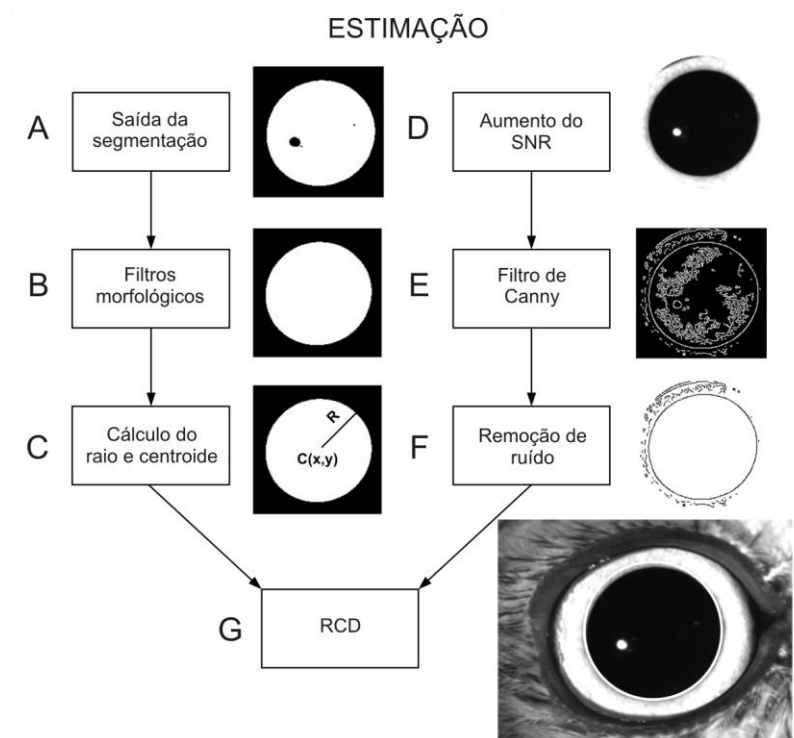


Figura 7: Fluxograma dos dois algoritmos utilizados na estimação do tamanho da pupila. (A-C) O primeiro utiliza operados morfológicos para remover artefatos e fornecer um valor de centróide e raio da pupila. (D-F) O segundo utiliza um filtro de Canny para estimar um mapa da bordas a partir da imagem ROI. (G) As saídas desses dois algoritmos alimentam uma versão modificada do programa Randomize Circle Detect (RCD), o qual realiza uma medida precisa do diâmetro da pupila.

Previamente, o algoritmo removia pixels ruidosos, usando dois filtros morfológicos, conhecidos como erosão e dilatação (Fig. 7B). A centroide e o raio (Fig. 7C) estimados foram utilizados como parâmetros de entrada para um algoritmo mais robusto de ajuste de círculo (Detector Randômico de Círculo) descrito no próximo parágrafo. O segundo algoritmo, utilizado para estimar o tamanho pupilar, produziu um mapa de borda da imagem em escala de cinza, obtida antes da binarização (ver Fig. 7D, mesmo que Fig. 6C). Um operador de Canny foi utilizado para produzir esse mapa, que destacou com precisão os limites da pupila (Fig. 7E). Os pixels ruidosos dentro da área circunscrita da pupila foram removidos por meio da aplicação de uma operação lógica no mapa de borda binário. Esse último foi criado através da inversão da polaridade do contraste das imagens binárias obtidas após a aplicação das operações morfológicas (Fig. 7B). Como pode ser observado na figura 7F, o resultado final são as bordas da pupila bem delineadas englobando uma região livre de ruído.

Após a utilização desses algoritmos, um círculo foi ajustado aos pontos característicos da pupila, usando uma versão modificada do Detector Randômico de Círculo descrito por Chen e Chung (2001). Resumidamente, essa abordagem utiliza três pontos, P1 (x1, y1), p2 (X2, Y2) e P3 (x3, y3), ao longo das bordas detectadas pelo filtro de Canny e define o centro da circunferência como:

$$a_{123} = \frac{\begin{vmatrix} x_2^2 + y_2^2 - (x_1^2 + y_1^2) & 2(y_2 - y_1) \\ x_3^2 + y_3^2 - (x_1^2 + y_1^2) & 2(y_3 - y_1) \end{vmatrix}}{4((x_2 - x_1)(y_3 - y_1) - (x_3 - x_1)(y_2 - y_1))}$$

$$b_{123} = \frac{\begin{vmatrix} 2(x_2 - x_1) & (x_2^2 + y_2^2) - (x_1^2 + y_1^2) \\ 2(x_3 - x_1) & (x_3^2 + y_3^2) - (x_1^2 + y_1^2) \end{vmatrix}}{4((x_2 - x_1)(y_3 - y_1) - (x_3 - x_1)(y_2 - y_1))}$$

e o raio como:

$$r_{123} = \sqrt{(x_1 - a_{123})^2 + (y_1 - b_{123})^2}$$

A validação da circunferência é realizada calculando a distância entre um quarto ponto P4 (x4, y4) e o centro da circunferência (A123, B123), que pode ser matematicamente formulada como:

$$d_{4 \rightarrow 123} = \left| \sqrt{(x_4 - a_{123})^2 + (y_4 - b_{123})^2} - r_{123} \right|$$

Assim, p4 pertencerá à circunferência se, e apenas se, a distância d4-> 123 for zero, ou próximo de zero, visto que a largura da borda da pupila é maior do que um único pixel.

Devido ao grande número de pixels que constituem as imagens filtradas pelo método de Canny e o processo de seleção aleatória realizado pelo algoritmo de RCD, a velocidade de processamento mostrou-se bastante lenta para calcular a circunferência da pupila quando milhares de quadros são considerados. A fim de contornar esse problema, o algoritmo RCD foi modificado para fazer a busca de pontos nas bordas da pupila de

forma não-aleatória. A centroide estimada na imagem binarizada e morfologicamente filtrada foi utilizada como o ponto de origem para essa pesquisa. A partir desse ponto, o software realizou uma varredura pixel a pixel nos doze pontos cardeais até que uma borda fosse encontrada. Dentre todos os conjuntos de pontos quádruplos, o algoritmo então selecionava um conjunto que permitia o melhor ajuste do círculo na pupila (menor $d_4 \rightarrow 123$). Um exemplo do círculo que melhor se ajustou à pupila, derivado a partir dos passos do algoritmo acima, pode ser visto na figura 8. As informações derivadas desse algoritmo são utilizadas na detecção do piscar e ainda podem fornecer a estimativa da cinemática do movimento palpebral, utilizando para isso os mapas de área da pupila (Fig. 8F – J) juntamente com os valores da centróide e pontos cardeais que são escolhidos baseados na condição ocular. Entretanto, a extração automática da cinemática palpebral ainda não foi implementada.

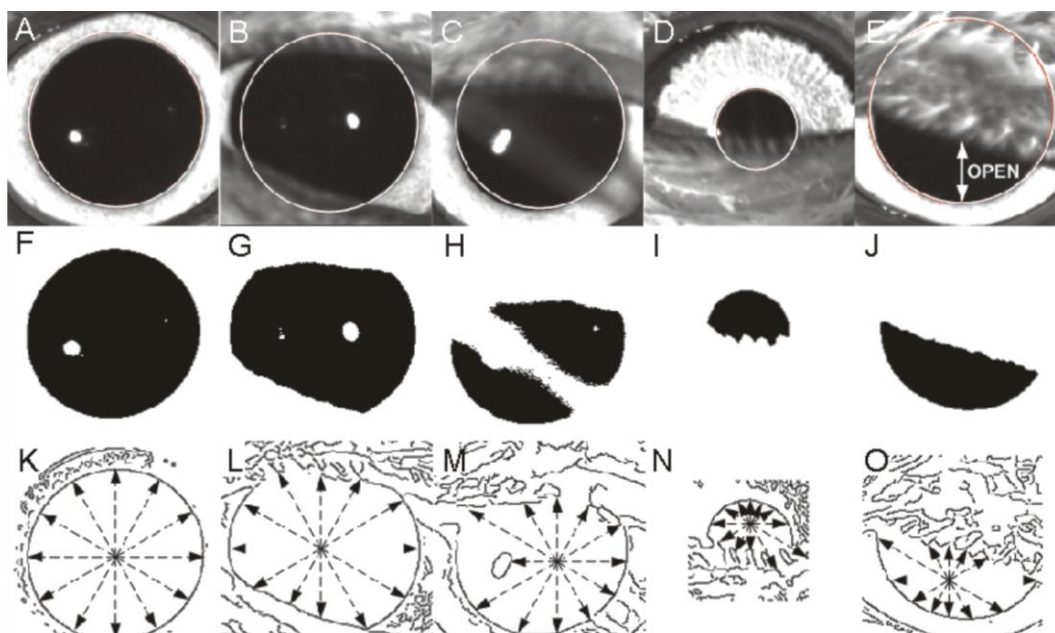


Figura 8: Exemplos representativos da estimação da pupila em diferentes condições. A primeira linha mostra imagens reais da pupila sobreposta pela circunferência derivada do algoritmo RCD. A segunda linha mostra o resultado dos processos de binarização e filtragem morfológica da imagem. Os mapas de bordas derivados do processamento pelo filtro de Canny são mostrados na terceira linha. As setas pretas apontam para os doze pontos que podem ser utilizados pelo RCD para estimar a pupila, os quais são escolhidos baseado na condição ocular.

A análise automática acima gerou curvas de reflexo pupilar baseadas em estimativas do diâmetro da pupila, as quais foram posteriormente analisadas em Matlab® (MathWorks, EUA). As curvas foram suavizadas, ao longo do tempo, por

meio de uma média móvel (largura da janela: 24,99 ms; passos de 8,33 ms). A Figura 9 mostra um exemplo típico de tal curva obtida em resposta a um flash de 100 ms de luz com uma intensidade de 160 cd/m². A figura 9 ainda mostra todos os parâmetros extraídos a partir da curva de resposta, a saber: (i) **Linha de base da pupila**, o diâmetro médio da pupila 1 s antes da apresentação do estímulo; (ii) **Latência de constrição**, o tempo entre o início do estímulo e o valor mínimo da aceleração da pupila (segunda derivada) como sugerido por Bergamin e Kardou (2003); (iii) **Velocidade máxima de constrição**, o ponto em que a primeira derivada da pupila é maximamente negativa; (iv) **Amplitude da constrição**, a diferença entre o diâmetro da pupila na linha de base e o diâmetro da pupila no final do período de estimulação; (v) **Amplitude de constrição máxima**, a diferença entre o diâmetro da pupila na linha de base e o valor de menor diâmetro da pupila após o início da estimulação; (vi) **Tempo máximo de constrição**, o intervalo de tempo entre o início da estimulação e a amplitude da constrição máxima; (vii) **Latência de redilatação**, o intervalo de tempo entre o desaparecimento do estímulo e a constrição máxima; (viii) **Latência de redilatação à 90% do diâmetro pupilar basal**, o intervalo de tempo entre a máxima constrição e a volta do diâmetro pupila em 90% do diâmetro inicial da pupila; (ix) **Velocidade de redilatação**, o ponto em que a primeira derivada da pupila é maximamente positiva.

Todos os ensaios da série temporal que apresentaram piscadas e/ou uma instabilidade no tamanho pupilar foram descartadas. As piscadas foram automaticamente detectadas pelo programa de extração do tamanho pupilar, descrito acima. A instabilidade do tamanho pupilar foi determinada pela verificação da taxa de variação da curva da pupila um segundo antes do início da estimulação (linha de base da pupila) e nos últimos 3 segundos da repetição. Se a variância da derivada fosse maior do que um limiar pré-determinado (0.3mm), o ensaio era excluído. Esse valor limiar foi escolhido baseado em análises preliminares. Devido à aplicação dos critérios de exclusão acima, o número de repetições de ensaios por condição diferiram entre corujas. No entanto, as tendências centrais reportadas para cada coruja tiveram como base um mínimo de 27 repetições de ensaios válidos por condição.

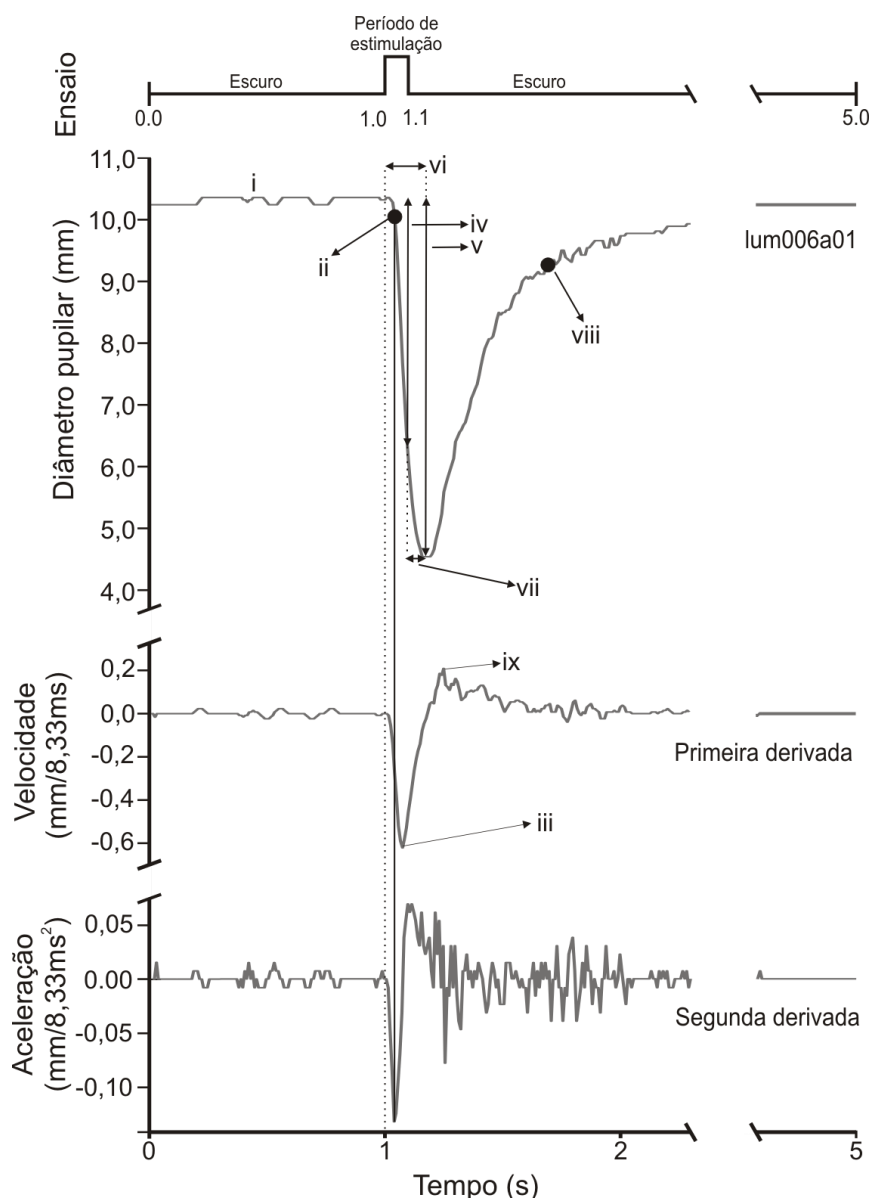


Figura 9: Parâmetros derivados da curva do reflexo pupilar. A primeira derivada da curva fornece a velocidade de constrição e de dilatação, e a segunda derivada provê a latência. (i) Diâmetro da pupila adaptada ao escuro; (ii) latência de constrição; (iii) velocidade máxima de constrição; (iv) amplitude de constrição; (v) Amplitude máxima de constrição; (vi) duração do período de constrição; (vii) latência de redilatação; (viii) duração do período de redilatação da pupila (90% do diâmetro inicial); (ix) velocidade de redilatação.

4.2.3. Validação das medidas pupilométricas:

Antes da extração de parâmetros pupilares, foram realizados diversos testes preliminares a fim de garantir que as medidas pupilares feitas pelos algoritmos estavam precisas. Embora as corujas sejam conhecidas por apresentarem pupilas circulares (Lind

et al., 2008), a posição angular da lente da câmera em relação ao olho da coruja (aproximadamente 30 graus) pode causar distorção geométrica durante o registro pupilar. Para verificar essa questão, foi testado se a estimativa do tamanho pupilar sofria mudanças significativas ao usar uma forma elíptica em vez de uma forma circular. Para tanto, a área do círculo estimada automaticamente pelo algoritmo foi comparada com uma área elíptica estimada manualmente usando o programa de processamento de imagens ImageJ 1,44 (NIH), disponível gratuitamente no endereço eletrônico <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Importante salientar que essa análise foi realizada em uma sub-amostra dos dados, formada por 130 quadros escolhidos aleatoriamente dos vídeos registrados. Como mostrado na figura 10, houve uma boa concordância entre essas duas medidas (teste de correlação de Spearman, $\rho = 0,88$, $p \ll 0,0001$).

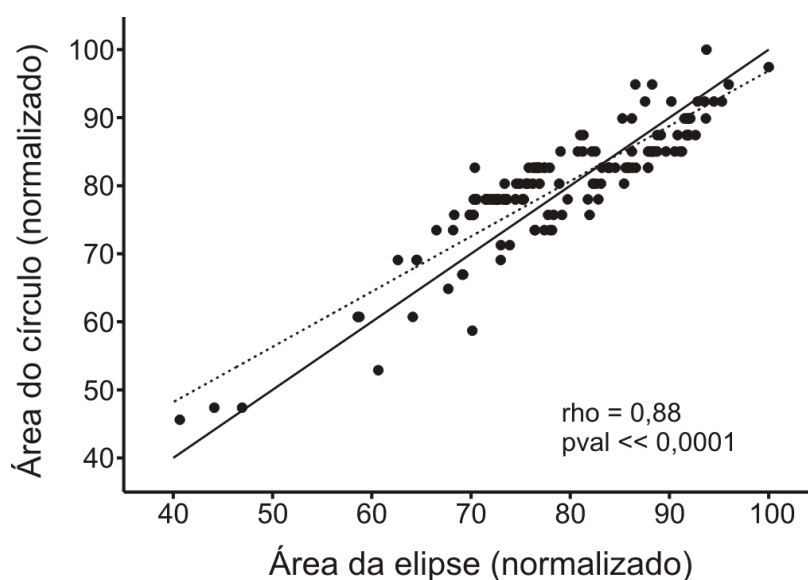


Figura 10: Comparação entre a área da pupila estimada por um círculo e por uma elipse. A linha sólida corresponde a $x=y$, e a pontilhada indica a inclinação do ajuste linear. ρ = coeficiente de correlação de Spearman. $n = 130$

Os pares de pontos ficaram distribuídos perto da linha de igualdade (linha contínua), o que indica um alto nível de consistência entre as duas formas geométricas. A inclinação da linha de regressão (linha pontilhada) foi de 0,81, com um intervalo de confiança de 95% entre 0,74 e 0,88. Diferenças significativas não foram encontradas entre a área derivada das duas formas geométricas ($n = 135$; Wilcoxon teste Signed-Rank, $p \gg 0,05$).

Para avaliar a precisão do ajuste circular computado pelo algoritmo, um segundo teste foi realizado. Claramente, as medidas automáticas do diâmetro da pupila

reduziram o tempo global de análise, o que não aconteceria se a análise fosse realizada manualmente. Ainda, a ausência de movimento ocular é uma característica vantajosa, contribuindo significativamente para a localização e extração precisa do tamanho pupilar. No entanto, esse fator não é completamente isento a erros de estimação: a iluminação não homogênea e a oclusão da pupila pela pálpebra ou pela membrana nictitante podem, de fato, levar a estimativas erradas no diâmetro. Por esta razão, a confiabilidade da estimativa pupilar automática foi testada por meio de um ajuste manual de um círculo na pupila em 130 quadros escolhidos aleatoriamente a partir de sequências de vídeo obtidos em três corujas. Os diâmetros foram avaliados por intermédio do gráfico de Bland-Altman. A figura 11 mostra a comparação entre estimativa do tamanho pupilar automática e manual obtida através do próprio algoritmo (no modo manual - Fig. 11A). A mesma comparação foi realizada entre a medida automática e um ajuste manual obtido através do software ImageJ (Fig. 11B). Em ambos os gráficos, é possível observar que as medidas automáticas são apenas ligeiramente menores do que as medidas manuais. Aproximadamente, 98% dos pontos estão dentro do intervalo de confiança de 95% (linhas tracejadas na fig. 11A e B).

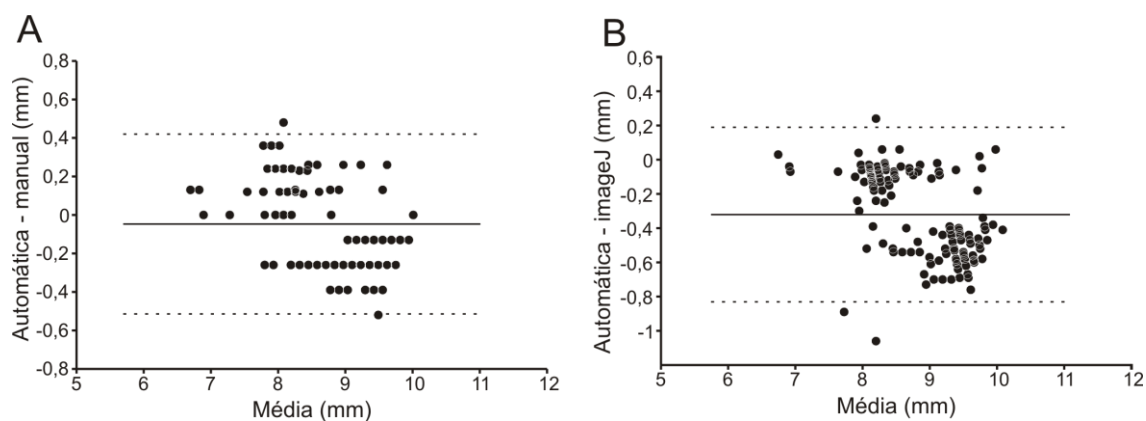


Figura 11: Gráficos de Bland-Altman utilizado para comparação entre o diâmetro da pupila calculado automaticamente (algoritmo de estimação) e manualmente com o próprio algoritmo (A) e com o ImageJ 1.44 (B). A linha sólida e as tracejadas indicam a diferença média e os limites de confiança (95%), respectivamente.

Essa diferença entre as medidas também foi observada por Lu et al. (2008). Utilizando sete observadores treinados foi medida a área da pupila em setenta e duas imagens, oriundas de um experimento de RPL em camundongos. Uma pequena diferença entre as formas geométricas foi, então, constatada. Presumiu-se que essa pequena diferença não

era necessariamente um erro do método automático, mas uma inconsistência nas medições manuais. Dessa forma, a chance do mesmo ter ocorrido neste trabalho não pode ser descartada, uma vez que o mesmo baseou-se em uma análise feita por três observadores. Entretanto, a diferença média encontrada para ambos os casos, são pequenas (Fig. 11 – linhas contínuas), sendo a maioria dos pontos restritos ao intervalo de confiança de 95%, o que indica uma boa estimativa do diâmetro pupilar pelo algoritmo.

4.3. Resultados

4.3.1. Adaptação ao escuro

Primeiramente, foi analisado o período de tempo necessário para a pupila atingir a sua dilatação máxima no escuro. A figura 12 mostra um exemplo representativo da curva obtida para uma coruja (média de sete repetições). Após um período preliminar de dez minutos de adaptação à luz com intensidade de 160 cd/m^2 (apenas os últimos três minutos são mostrados no gráfico), o monitor CRT foi desligado, e a dilatação progressiva da pupila foi gravada continuamente durante os dez minutos seguintes. O desligamento do monitor produziu uma dilatação pupilar rápida, com duração de $4,7 \pm 1,24 \text{ s}$ (média de duas corujas). Após esse período, a pupila atingiu sua dilatação máxima. Portanto, considerou-se que um período de adaptação ao escuro de 20 minutos é mais do que suficiente para garantir a dilatação máxima da pupila.

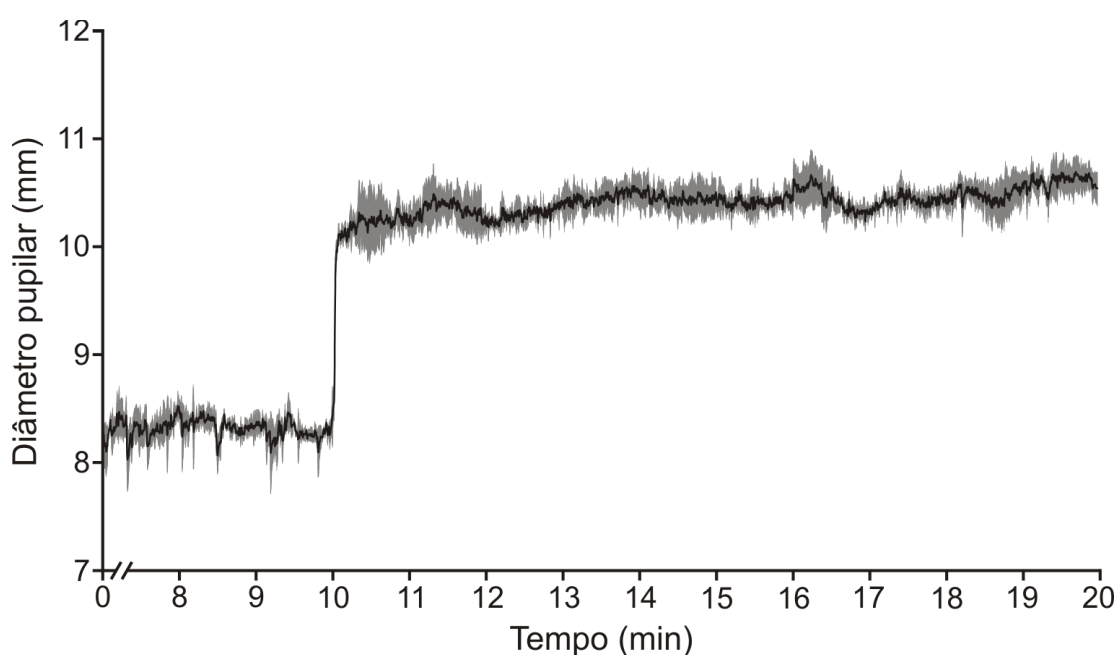


Figura 12: Exemplo representativo da curva de adaptação ao escuro derivada da média de sete repetições para uma coruja. Após a adaptação à luz (160 cd/m^2), o monitor CRT foi desligado e a pupila foi gravada por dez minutos. A curva é composta por uma fase rápida antes de alcançar o patamar estável. A sombra cinza mostra o desvio padrão da curva derivado de sete repetições.

4.3.2. Piscar reflexivo à luz

O piscar reflexivo pode ser evocado por uma série de estímulos externos, como por exemplo, sopradores de ar, estimulação elétrica, som e luz. Dessa forma, com o intuito de verificar a possível existência de um piscar reflexivo evocado por variações na intensidade luminosa na coruja buraqueira, foram inspecionadas as curvas do reflexo pupilar derivadas de todas as repetições de todas as condições utilizadas. Só foram consideradas as piscadas que ocorreram até 1s após a apresentação do flash de luz. O resultado dessa análise pode ser visto na figura 13. Essa análise revelou um aumento significativo ($p < 0,01$) na quantidade de piscadas durante a estimulação com intensidades luminosas iguais ou maiores que 31 cd/m^2 . Entretanto, esse aumento foi claramente observado em apenas um animal (AC1008) dos três utilizados no estudo. Para essa coruja, intensidades luminosas menores ou igual a $15,5 \text{ cd/m}^2$ tendem a gerar um piscar reflexivo em apenas 4% [2,5 – 5,4] do total de repetições ($n = 120$), enquanto que intensidades maiores elevam a porcentagem de piscadas para 33% [31,8 – 37,5]. Esse resultado sugere que valores de luminância maiores que $15,5 \text{ cd/m}^2$ podem contribuir para evocar um piscar reflexivo em alguns indivíduos.

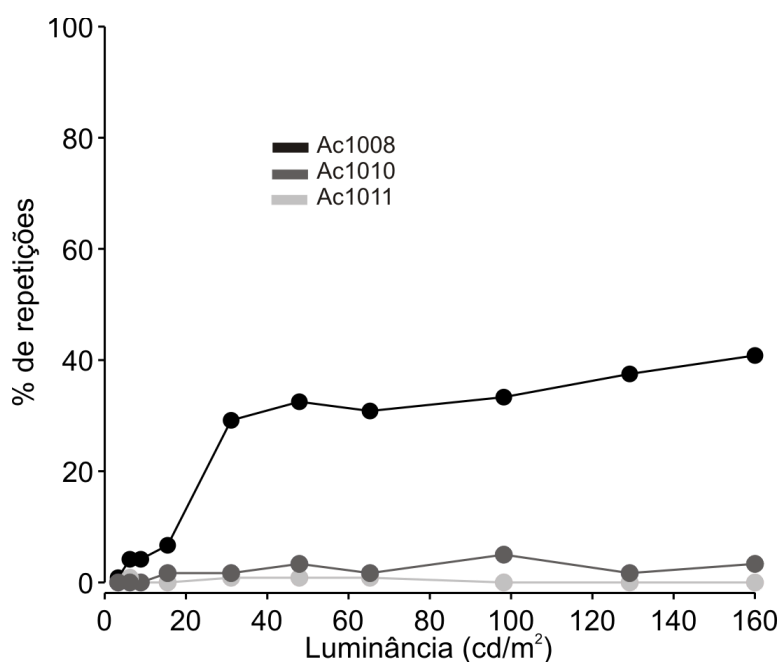


Figura 13: Efeito da intensidade luminosa sobre o piscar. Luminâncias maiores que $15,5 \text{ cd/m}^2$ parecem contribuir para a geração de uma piscada reflexiva. Esse resultado foi encontrado somente para um dos animais utilizados (AC1008).

4.3.3. Reflexo pupilar à luz

Todos os dados descritos nesta seção foram obtidos sobre estimulação binocular. Uma comparação entre as condições mono- e binocular será apresentada em uma seção posterior. A tabela 1 apresenta as tendências centrais de todos os parâmetros, extraídos para os níveis mínimo e máximo de luminância adotados. De uma maneira geral, essas tendências centrais são apresentadas como mediana e, como medida de dispersão da amostra o 25° e 75° percentil. É importante lembrar que a frequência de amostragem nominal da câmera (120 Hz) foi utilizada para a aquisição de todos os dados. Dessa forma o sistema pupilométrico obtinha um quadro a cada 8,33ms.

| Parâmetros | AC1008 | | AC1010 | | AC1011 | |
|---|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| | 3,2 cd/m ² | 160,0 cd/m ² | 3,2 cd/m ² | 160,0 cd/m ² | 3,2 cd/m ² | 160,0 cd/m ² |
| Linha de base da pupila no escuro (mm) | 10,2 [9,8 – 10,4] | | 9,2 [9,4 – 8,7] | | 10,3 [9,9 – 10,5] | |
| Latência de constrição (ms) | 42 [42 – 50] | 42 [42 – 42] | 50 [42 – 50] | 42 [42 – 50] | 50 [42 – 50] | 50 [50 – 50] |
| Velocidade de constrição (mm/s) | 41,3 [38,9 – 46,6] | 74,6 [71,6 – 77,5] | 29,1 [22,7 – 39,2] | 66,4 [62,6 – 74,4] | 31,5 [29,4 – 36,3] | 69,7 [67,0 – 71,3] |
| Amplitude de constrição (mm) | 1,8 [1,7 – 2,1] | 3,7 [3,5 – 3,9] | 1,1 [0,9 – 1,7] | 3,3 [3,1 – 3,6] | 1,1 [0,9 – 1,2] | 3,2 [3,1 – 3,4] |
| Amplitude de constrição máxima (mm) | 3,4 [3,1 – 3,8] | 5,8 [5,6 – 6,1] | 1,9 [1,5 – 2,5] | 4,8 [4,6 – 5,0] | 2,2 [1,7 – 2,5] | 5,3 [5,1 – 5,8] |
| Amplitude de constrição máx. relativa (%) | 33,8 [30,1 – 37,2] | 57,5 [41,8 – 43,0] | 19,8 [15,7 – 26,9] | 52,5 [51,6 – 54,2] | 21,9 [17,4 – 23,8] | 52,3 [51,3 – 54,9] |
| Tempo de constrição máximo (ms) | 158 [158 – 167] | 200 [192 – 217] | 167 [158 – 167] | 200 [192 – 221] | 158 [150 – 167] | 200 [183 – 233] |
| Latência de redilatação (ms) | 58 [50 – 67] | 100 [92 – 108] | 50 [42 – 58] | 96 [67 – 108] | 58 [58 – 67] | 100 [83 – 112] |
| Tempo de redilatação para 90% (ms) | 250 [208 – 308] | 720 [650 – 808] | 179 [133 – 200] | 750 [654 – 800] | 133 [108 – 225] | 754 [691 – 803] |
| Velocidade de redilatação (mm/s) | 17,5 [15,7 – 19,4] | 18,2 [16,9 – 21,7] | 12,9 [8,7 – 16,9] | 15,5 [12,5 – 21,1] | 12,4 [9,7 – 14,2] | 18,2 [15,9 – 19,8] |

Tabela 1: Tendências centrais dos parâmetros extraídos do reflexo pupilar indicados na figura 4. Os valores são apresentados como mediana, com 25° e 75° percentil como uma medida de dispersão da amostra.

4.3.3.1. Efeitos dos níveis de luminância no diâmetro pupilar

A resposta pupilar à estimulação com flashes de 100 ms foi caracterizada por uma constrição rápida seguida de uma fase lenta de dilatação (Fig. 14A, D e G), ambas mostrando uma dependência dos níveis de luminância. A constrição iniciava-se após uma curta latência, e durava mais tempo que o período de estimulação (Fig. 14C, F e I). O valor mínimo de luminância utilizada ($3,2 \text{ cd/m}^2$) foi suficiente para provocar uma diminuição no tamanho da pupila em cerca de 80% do seu máximo para as corujas AC1010 (Fig. 14E) e AC1011 (Fig. 14H) e cerca de 65% para a coruja AC1008 (Fig. 14B).

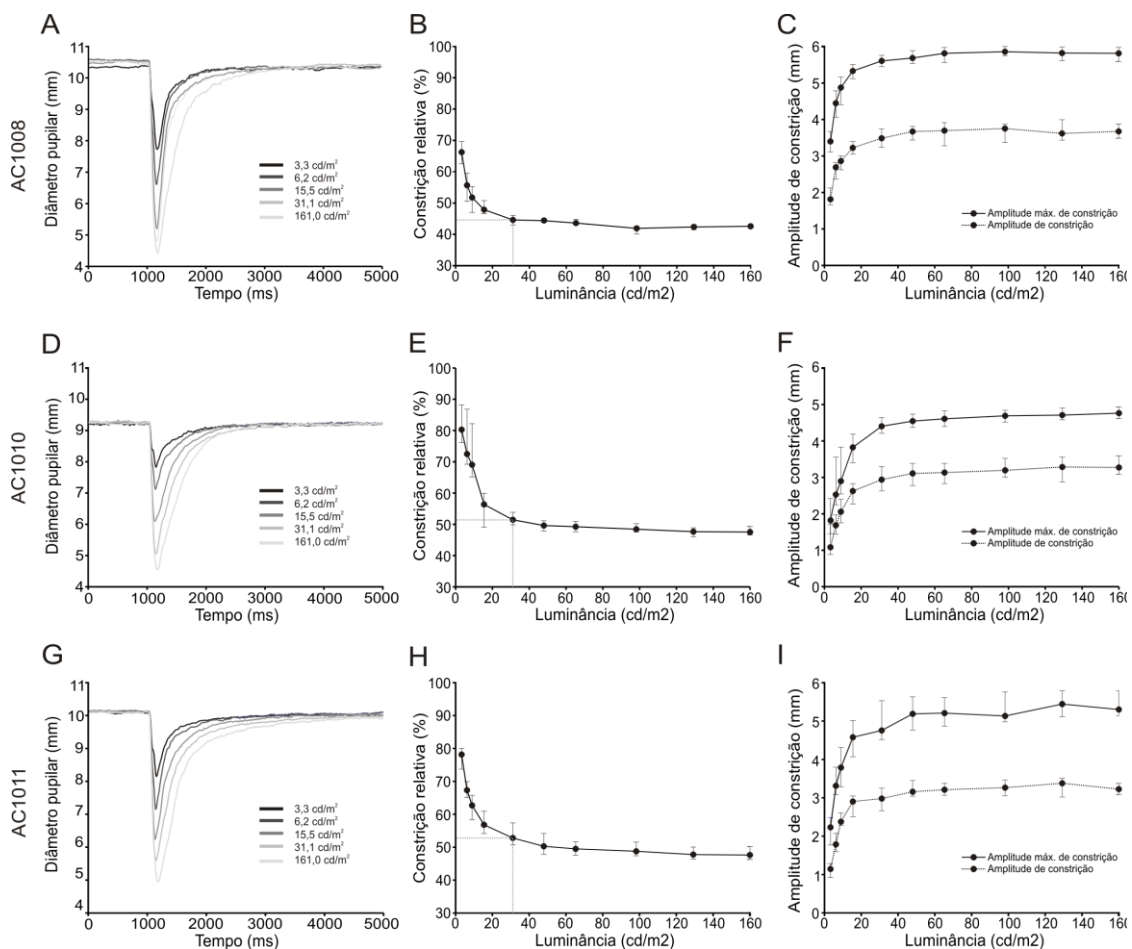


Figura 14: Diâmetro da pupila em função do nível de luminância. (A, D e G) Curvas brutas do reflexo pupilar para vários níveis de luminância. (B, E e H) Nível de constrição relativo da pupila. (C, F e I) Nível de constrição absoluto. As linhas pontilhadas nas figuras B, E e H indicam a saturação da resposta (acima de 30 cd/m^2).

À medida que a luminância do estímulo aumenta, o diâmetro da pupila tende a diminuir até atingir um ponto de saturação, que ocorreu para valores de luminância maiores que 31 cd/m^2 (veja as linhas pontilhadas na figura. 14B, E e H). Acima do ponto de saturação da resposta, o tamanho pupilar foi menor que 50% do tamanho da pupila adaptada ao escuro. Essa grande redução no tamanho da pupila causa, em média, uma redução de 4,8 vezes na iluminação que atinge a retina.

4.3.3.2. Efeitos dos níveis de luminância nas latências de constrição e redilatação pupilar

A latência de constrição pupilar (Fig. 15; parâmetro 2 na Fig. 9), ao contrário do que é comumente relatado em mamíferos (Ellis, 1981; Pong e Fuchs, 2000), exibiu uma variação restrita, indo de 33 a 58 ms, e com uma dependência pequena dos níveis de luminância do estímulo. Essa peculiaridade é facilmente percebida na figura 15A, na qual estão representadas as latências estimadas para todas as repetições de todas as condições em função dos níveis de luminância. A maioria dos valores são iguais a 42 ou 50 ms em todas as condições. No entanto, observou-se uma inversão da proporção desses dois valores em função da luminância: para $3,2 \text{ cd/m}^2$, 34% das repetições apresentaram uma latência de constrição de 42 ms e 64% das repetições exibiram uma latência de 50 ms; para 160 cd/m^2 , a maior parte das repetições (65%) apresentaram valores de latência de 42 ms, enquanto que apenas uma pequena porcentagem (29%) mostraram valores iguais a 50 ms (Fig. 15B). As repetições com valores de latência iguais a 33 ms também tendem a aumentar conforme o aumento no nível de luminância (barras pretas na Fig. 15A). Embora esse resultado indique que a latência tende a diminuir com o aumento na luminância, é importante salientar que essa diferença é causada apenas por um quadro (8,33 ms) de diferença. Dessa forma, é importante considerar a possibilidade de que essa pequena diferença seja resultado do sincronismo entre o início da repetição de uma determinada condição e o início da aquisição da imagem, a qual pode ocorrer entre 0 e 8,33 após o começo da estimulação (ver o subitem 4.4.1 – considerações metodológicas). Assim, deve ser considerada a possibilidade da latência ser igual para todos os níveis de luminância testados. Em relação à latência de redilatação (Fig. 15C; Parâmetro vii na Fig. 9), observou-se um aumento em função do nível de luminância. A análise das curvas brutas revelou que esse parâmetro não exibe uma saturação acentuada, pois as curvas se tornam um pouco

mais suaves ao se aproximarem da amplitude de constrição máxima em altos níveis de luminância.

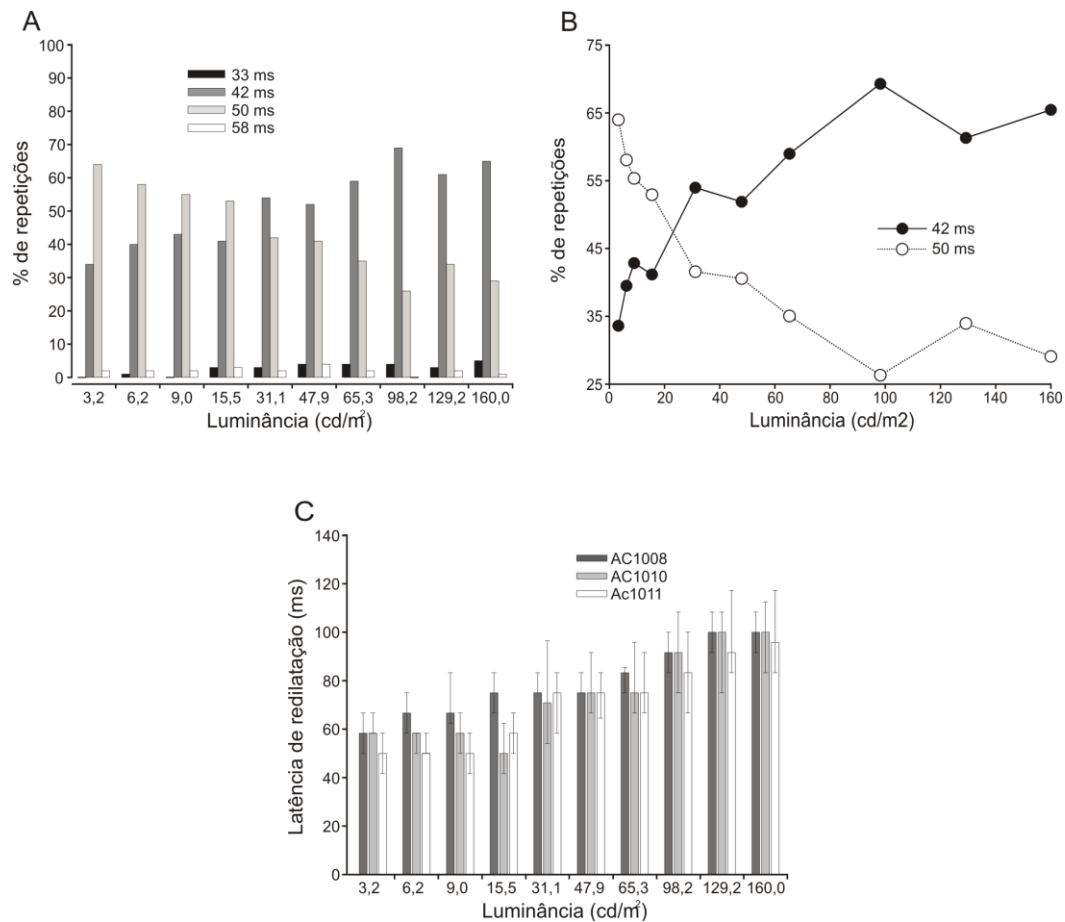


Figura 15: Tempos de latência para início da constrição e redilatação da pupila. (A) Histograma de todos os valores de latência para o início da constrição, obtidos em todos os *trials* de todas as corujas utilizadas. (B) Conforme a luminância aumenta a porcentagem de *trials* com valores de latência iguais a 50ms tende a diminuir, enquanto que os valores iguais a 42ms tendem a aumentar. (C) Histograma mostrando os valores medianos da latência para início da redilatação em cada nível de luminância.

4.3.3.3. Efeitos dos níveis de luminância nos períodos de constrição e dilatação pupilar

De maneira geral, o período de constrição tende a aumentar com a luminância (Fig. 16A, C e E; parâmetro vi na Fig. 9). O período de constrição variou entre 150 ms e 158 ms, para a menor luminância testada e 190 ms e 200 ms para a luminância máxima (ver tabela 1 para a dispersão da amostra). Para extrair o período de redilatação (Fig. 16B, D e F; parâmetros viii na Fig. 9), foi calculado o intervalo de tempo entre a constrição máxima e a o retorno da pupila para 90% do seu tamanho no escuro (linha de

base da pupila). Para o menor nível de luminância, foi encontrado períodos de dilatação que variam de 133 ms a 250 ms, bem como 721 ms a 753 ms para a maior luminância. Portanto, para os baixos níveis de luminância os períodos de dilatação são semelhantes à constrição, enquanto que, para os valores de alta intensidade luminosa, foi encontrado um período de dilatação em média 3,8 vezes maior do que a constrição.

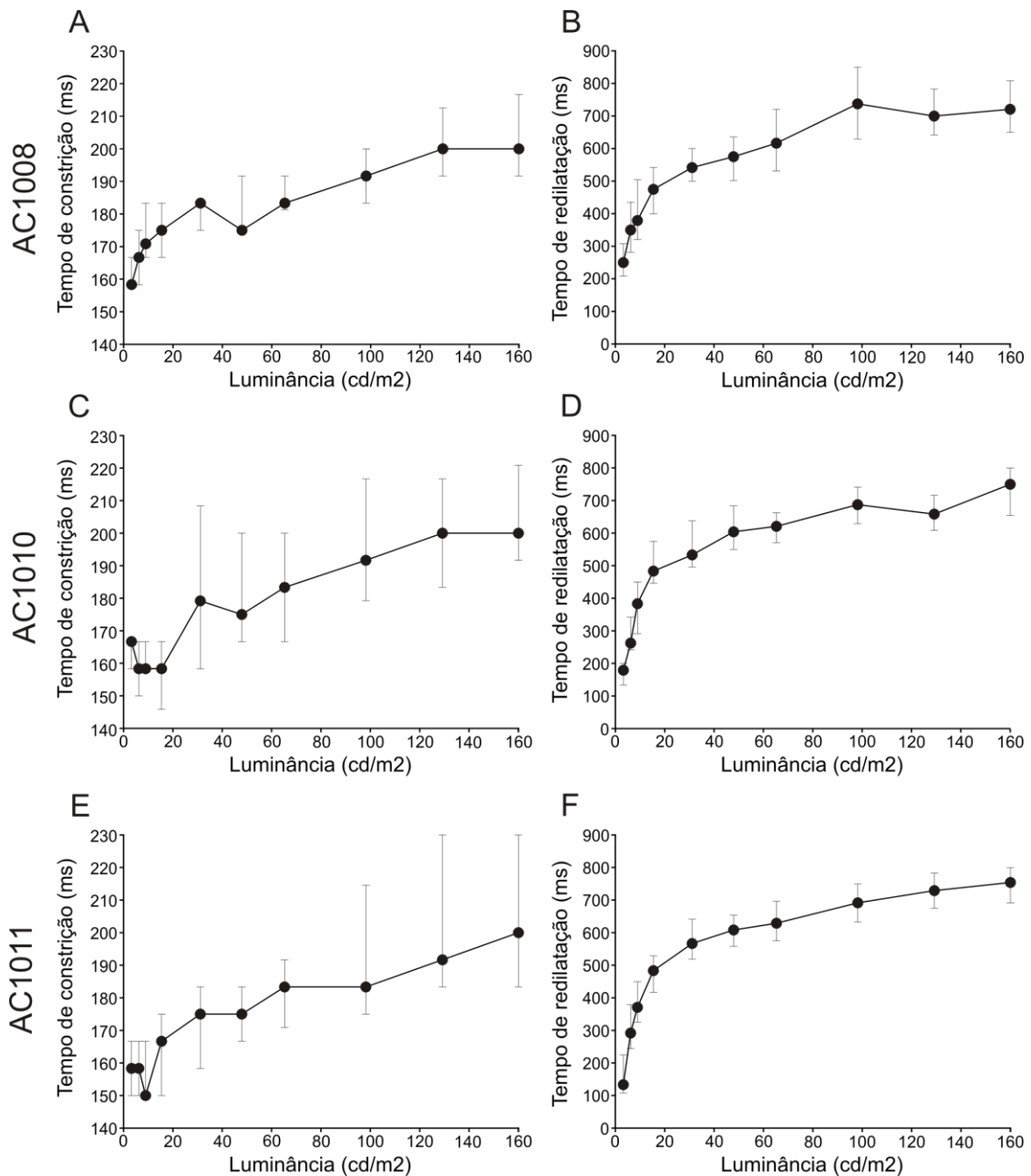


Figura 16: Duração do tempo de constrição e dilatação em função dos níveis de luminância. A coluna da esquerda mostra os períodos de constrição (A, C e E) ao passo que a coluna da direita refere-se ao período de dilatação (B, D e E) para as três corneas. Note que os valores de ambos tendem a saturar em estimulações acima de 30 cd/m².

4.3.3.4. Efeitos dos níveis de luminância nas velocidades de constrição e dilatação pupilar

Como pode ser visto na figura 17, as velocidades de constrição e dilatação exibiram uma saturação para estímulos com níveis de luminância acima de 30 cd/m^2 . Encontramos uma pequena diminuição na velocidade de dilatação para níveis de luminância acima de 50 cd/m^2 para as corujas AC1008 (Fig. 17A) e AC1010 (Fig. 17B). Para as três corujas, os valores da velocidade de constrição variaram de 30 mm/s a 40 mm/s para o estímulo de menor luminância e entre 66 mm/s a 75 mm/s para o estímulo com nível mais alto de luminância. Como esperado, as velocidades de dilatação foram inferiores às de constrição pupilar, sendo a velocidade de dilatação em média 2,3 vezes mais lenta que a velocidade de constrição para a menor luminância e 4,1 vezes mais lenta quando comparada a luminância máxima (ver tabela 1 para valores precisos). Esse resultado indica que o reflexo pupilar à luz na coruja buraqueira é extremamente rápido quando comparado a mamíferos (ver discussão).

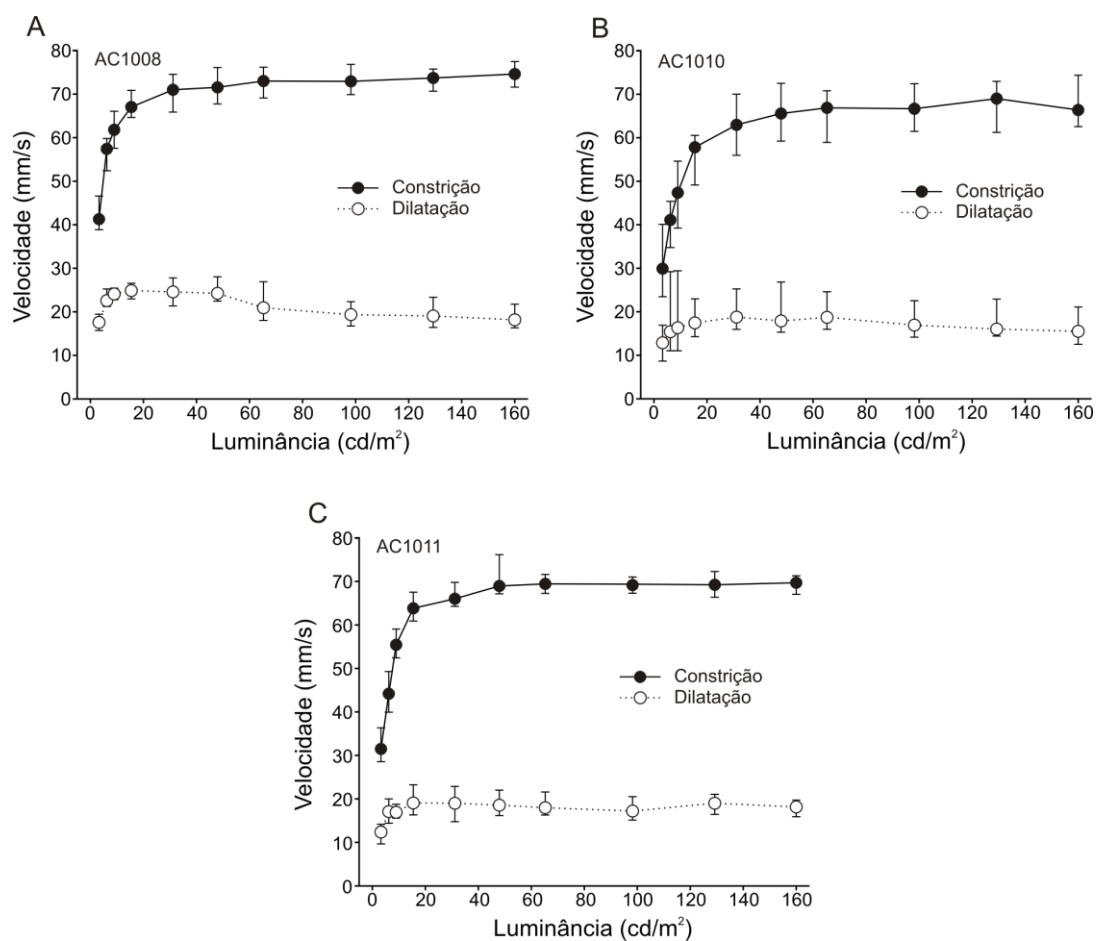


Figura 17: Velocidades de constrição (linha sólida) e redilatação (linha tracejada) em função da luminância. Cada gráfico exhibe os valores de uma coruja.

4.3.4. Estabilidade do reflexo pupilar durante longo período de estimulação

Para caracterizar o componente tônico da resposta pupilar frente a estimulação com diferentes intensidades luminosas, o diâmetro da pupila foi gravado por 20 s em função de 6 níveis de luminância.

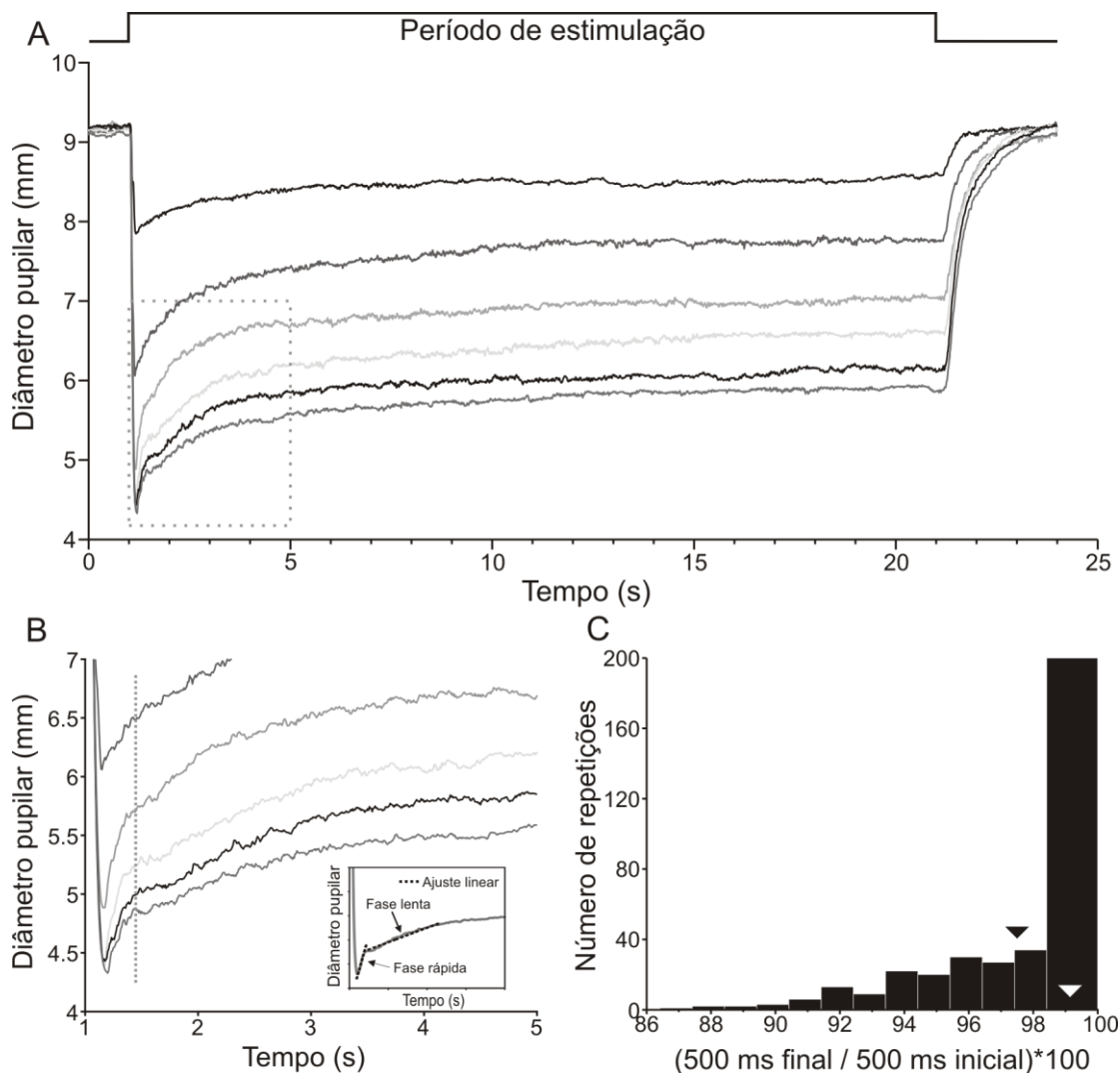


Figura 18: Exemplo representativo do reflexo pupilar gravado durante um longo período de estimulação. (A) Curvas derivadas de seis níveis de luminância (ver metodologia). Após alcançar a constrição máxima, o diâmetro pupilar aumenta (escape pupilar) até alcançar o patamar de estabilidade. (B) O detalhamento de quatro segundos de gravação, após o início da estimulação, evidenciando a fase rápida (antes da linha pontilhada) e a fase lenta. O inserto mostra o ajuste linear derivado de ambas as fases (ver texto para detalhes). (C) Foi observado o retorno do diâmetro pupilar para o tamanho inicial (adaptado ao escuro) após o final da estimulação para a maioria das repetições gravadas. As pontas de seta aberta e fechada indicam a distribuição da mediana e média, respectivamente.

Como ilustrado no exemplo da figura 18A, o diâmetro pupilar tende a diminuir rapidamente, apresentando um aumento lento (escape pupilar) até atingir um platô. Ao observar os primeiros cinco segundos de estimulação (Fig. 18B), nota-se que o escape pupilar é composto por duas fases: (i) uma fase rápida (antes da linha cinza tracejada na Fig. 18B) e (ii) uma fase lenta (após a linha cinza pontilhada) anterior ao platô. Esse comportamento se torna mais evidente para intensidades de luz maiores que 65 cd/m^2 . Para quantificar essas fases, foi ajustada uma função linear em cada segmento da curva (inserto na figura 18B). Independentemente da intensidade do estímulo, o primeiro segmento (rápido) exibiu um aumento significativo ($p < 0,001$; Wilcoxon signed-rank) e uma maior inclinação (mediana = 2,6 [2,2 – 3,5]) do que o segundo segmento (lento; mediana = 0,36 [0,3 – 0,4]). Observou-se um pequeno aumento na inclinação do ajuste na primeira fase em função do nível de luminância, entretanto, sem diferença significativa ($p = 0,072$; Wilcoxon signed-rank). Essa relação também é válida para a segunda fase, porém uma diferença estatística significativa foi confirmada ($p < 0,001$; Wilcoxon signed-rank) ao comparar as duas primeiras condições (baixa luminância) com as outras (alta luminância). Após a extinção da estimulação, observou-se um rápido retorno do diâmetro da pupila ao seu estado inicial (adaptado ao escuro). Esse retorno se inicia após uma latência de 216,7 ms [183,3 – 243,7] para a luminância mais baixa e 249,9 ms [227,8 – 272,91] para a mais alta. A diferença entre as latências de todas as condições não foram significativas ($p=0,09$). A velocidade encontrada foi de 1,8 mm/s [1,6 – 3,9] e 7,4 mm/s [5,7 – 8,6] para o menor e o maior valor de luminância utilizado, respectivamente. Após 500 ms a partir do período de latência, a pupila dilata para 98% [67,4 – 100,0] do seu tamanho adaptado ao escuro na menor intensidade luminosa e para 58,3% [57,2 – 70,3] na maior intensidade. Para verificar o retorno da pupila a seu estado inicial ao final de cada repetição de cada condição, foi calculada a razão entre a média dos valores dos diâmetros obtidos a partir dos primeiros 500 ms e dos últimos 500 ms para todas as repetições. Os resultados estão representados na figura 18C, a qual mostra que os valores variam aproximadamente de 88% a 100%, com uma mediana de 99% [96-100].

Um resultado intrigante foi encontrado quando se comparou os parâmetros extraídos a partir da curva de RPL obtida durante a estimulação transitória (flashes de 100 ms) com os extraídos da estimulação durante 20s. A princípio, não se esperava encontrar diferenças significativas entre os valores dos parâmetros, porque o desenho

experimental (tempo no escuro antes de estimulação / distância da tela) e os níveis de luminância foram os mesmos para ambos os protocolos. Contudo, as análises dos dados populacionais revelaram que as curvas referentes à estimulação estável apresentaram menores valores para a amplitude da constrição ($p < 0,02$; Wilcoxon signed-rank - para luminâncias abaixo de 129 cd/m^2), a amplitude de constrição máxima ($p < 0,01$; Wilcoxon signed-rank - luminância abaixo 31 cd/m^2) e a velocidade de constrição ($p < 0,01$; Wilcoxon signed-rank - luminância abaixo de 31 cd/m^2). Outras medidas como latência de constrição e tempo máximo de constrição não apresentaram diferenças significativas.

4.3.5. Registros binoculares versus registros monoculares

A figura 19 mostra os resultados populacionais para os parâmetros mensurados de forma monocular e binocular. A amplitude da constrição (Fig. 19A) e a velocidade (Fig. 19E, linhas contínuas) medidas de forma monocular, exibiram valores mais baixos para todos os níveis de luminância abaixo de $129,0 \text{ cd/m}^2$ ($p < 0,01$; Wilcoxon signed-rank). A amplitude de constrição máxima (Fig. 19B), a latência de redilatação à 90% (Fig. 19D) e a velocidade de redilatação (Fig. 19E, linhas tracejadas) também apresentaram valores mais baixos para os registros monoculares, porém apenas para os baixos níveis de luminância (abaixo de $9,0 \text{ cd/m}^2$ para os primeiros dois parâmetros e abaixo de $15,5 \text{ cd/m}^2$ para o terceiro) uma diferença estatística foi encontrada ($p < 0,02$; Wilcoxon signed-rank). Ao contrário dos outros indicadores, o período de constrição máxima (Fig. 19C) e a latência de redilatação (Fig. 19F) mostraram um aumento significativo ($p < 0,02$; Wilcoxon signed-rank) para estímulos com intensidade menor que $15,5 \text{ cd/m}^2$. Não foi constatada nenhuma diferença estatística para a latência de constrição ($p > 0,05$; Wilcoxon signed-rank). Esses resultados sugerem que a oclusão de um olho interfere, mesmo que minimamente, na resposta pupilar do outro olho.

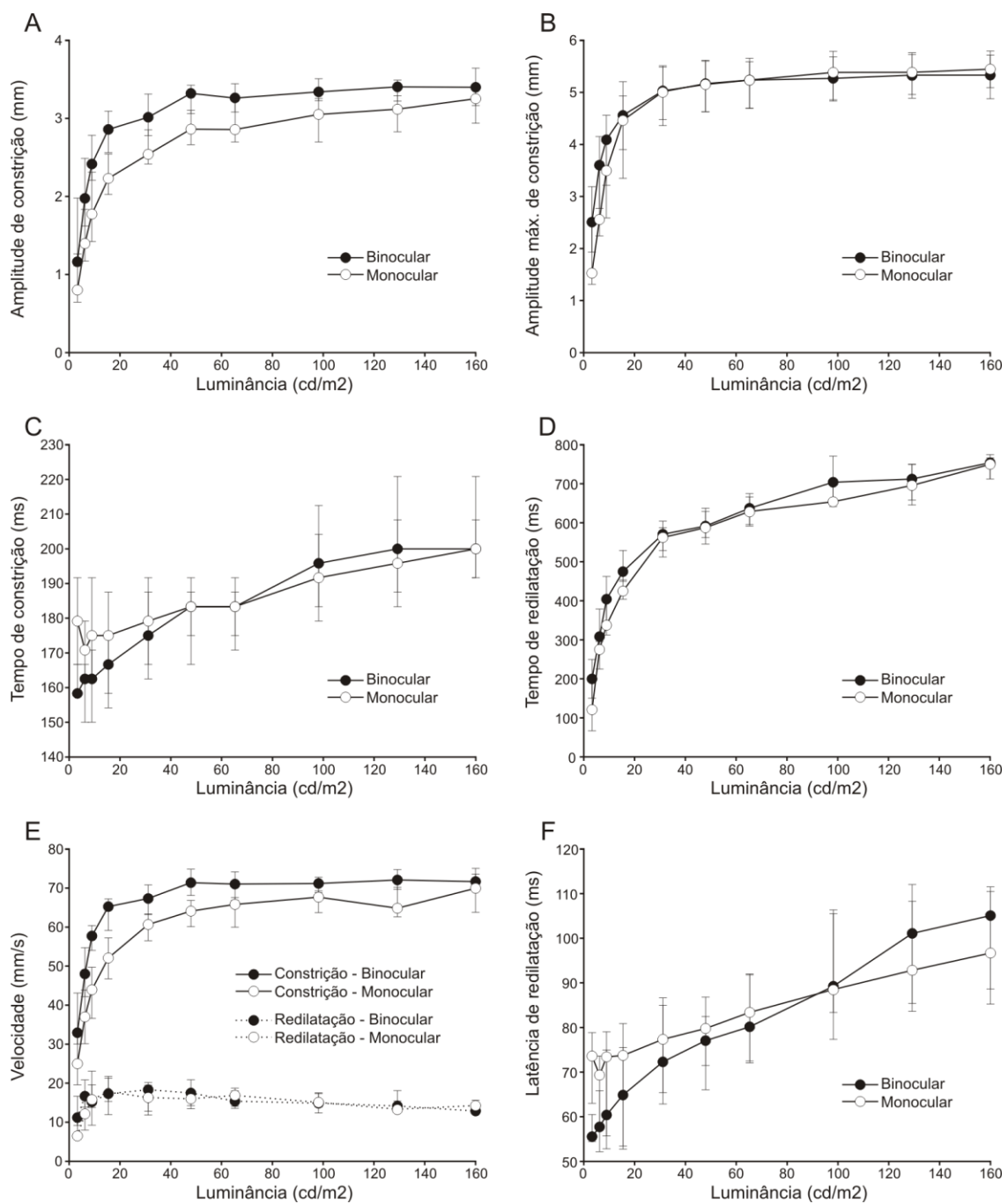


Figura 19: Comparação entre as medidas monoculares e binoculares. (A) Amplitude da constrição. (B) Amplitude de constrição máxima. (C) Tempo para constrição máxima. (D) Tempo de redilatação. (E) Velocidades de constrição e dilatação. (F) Latência de redilatação. Círculos fechados e abertos indicam as medidas binoculares e monoculares, respectivamente. Linhas contínuas e pontilhadas em E indicam as velocidades de constrição e dilatação, respectivamente.

4.4. Discussão

O escopo dos experimentos acima descritos foi a caracterização quantitativa da resposta pupilar de corujas buraqueira em função da luminância. Os principais achados deste trabalho podem ser resumidos da seguinte forma: 1) as curvas de adaptação ao escuro mostram um rápido aumento no diâmetro pupilar; 2) quando estimulada por breves flashes de luz (100 ms), a pupila tende a contrair após um período de latência muito curto (~ 45 ms), a qual parece ser levemente afetado por variações na intensidade de luz, ao menos dentro da faixa escolhida neste trabalho; 3) Em comparação aos mamíferos, as fases de constrição e a de dilatação pupilar apresentam uma alta velocidade resultando em curtos períodos de tempo para ambas as fases; 4) a constrição máxima da pupila, obtida após a adaptação ao escuro, promove uma redução na iluminação que atinge a retina de aproximadamente 5 vezes; 5) estimulação por períodos prolongados (20 s) produz um decréscimo rápido no tamanho pupilar seguido por duas fases, uma rápida e uma mais lenta, antes de atingir um platô, definidas por meio de um ajuste com uma função linear em cada uma das fases. Além disso, o tempo de latência para início da dilatação após estimulação foram maiores (~ 216,7 ms) do que os apresentados na dilatação durante a estimulação com flash. Ainda, a pupila tende a retornar para aproximadamente 65% do seu tamanho adaptado após um período de 500 ms contados a partir do final do tempo de latência. Além disso, para uma mesma intensidade luminosa, foi observada uma miose pupilar mais pronunciada frente à estimulação com o flash (100ms) quando comparado àquela derivada da estimulação durante um período mais longo (20s); 6) As medidas binoculares e monoculares apresentam diferenças significativas, sugerindo que a resposta de um olho depende, mesmo que minimamente, do outro olho.

4.4.1. Considerações metodológicas

O sistema pupilométrico foi inicialmente desenvolvido para a aquisição de dados em seres humanos (Souza et al., 2013). Contudo, ele também mostrou-se eficaz na extração de informações pupilométricas de corujas. É importante considerar que algumas características do olho da coruja contribuem positivamente para uma estimativa robusta da dinâmica pupilar. De fato, a ausência de movimentos oculares e ausência de limbo corneal (borda formada pela íris e a esclera) na imagem capturada garantiram que apenas um círculo (pupila) fosse identificado. Em relação ao sistema pupilométrico,

uma questão importante a salientar é que o início da aquisição de dados pode ocorrer em qualquer ponto entre os primeiros 0 e 8,33 ms do tempo de gravação do vídeo. Isso ocorre porque o sinal TTL que informa ao sistema de aquisição de vídeo para começar a gravação, pode chegar a um momento em que a câmera está processando um quadro do vídeo. Dessa forma, o início da gravação depende do termino desse processamento que leva 8,33 ms na resolução utilizada (120Hz). Essa questão pode ter contribuído para as alterações observadas, por exemplo, nos valores de latências de constrição, os quais mostraram diferenças de praticamente um quadro (8,33ms).

Outro ponto interessante a se considerar reside na resolução temporal utilizada no presente estudo (120Hz). Para avaliações no homem, essa resolução revela-se bastante apropriada, uma vez que a latência de resposta é muito mais lenta (Ellis, 1981; Lowenstein e Loewenfeld de 1950, para macacos ver Pong e Fuchs, 2000) do que aquela encontrada para corujas buraqueiras. Para o estudo em corujas, um aumento da resolução temporal do sistema de aquisição seria recomendável para assim obter uma avaliação ainda mais precisa de algumas medidas do RPL, especialmente no que diz respeito à latência. Entretanto, ressalta-se que a taxa de amostragem utilizada neste trabalho é razoável, para sistemas baseados em aquisição de imagem, quando comparado com a maioria dos equipamentos disponíveis (Bitsios et al., 2006; Hachol et al., 2007; Kraemer et al., 2000; Nakayama et al., 2008; Wilhelm et al., 2009), os quais, geralmente, funcionam abaixo de 100 Hz. Além disso, devido à versatilidade do equipamento, é possível a utilização de outro modelo de câmera digital FireWire (com conexões de controle) capaz de capturar quadros em uma taxa mais elevada, sem qualquer modificação do software de aquisição. É interessante mencionar ainda que, apesar de ter sido originalmente desenvolvido como um sistema monocular, o pupilômetro pode ser modificado para suportar uma segunda câmera. Essa mudança exige somente pequenas modificações no programa de aquisição de imagem e a instalação de uma nova placa PCI FireWire. Essa configuração já foi testada e não foram observadas diferenças significativas no desempenho quando comparado ao sistema monocular.

Os algoritmos de automatização da análise pupilométrica também são capazes de lidar com as conspicuidades morfológicas do olho da ave. Como mostrado na figura 8, mesmo frente à movimentação parcial da pálpebra e da membrana nictitante o sistema consegue estimar o tamanho da pupila e ainda detectar a ocorrência desses

eventos. As imagens binarizadas derivadas do processamento para extração do diâmetro pupilar (Fig. 8F – J) podem ainda ser utilizadas pelo sistema como referências para a realização de uma estimativa automática da cinemática do movimento da pálpebra e da membrana nictitante durante o piscar. Essa funcionalidade será implementada e validada em trabalhos futuros.

4.4.2. O piscar evocado pela luz

O piscar reflexivo é todo aquele evocado por estímulo externo, como por exemplo, por sopradores de ar, estimulação elétrica, som e luz (Esteban, 1999). O piscar reflexivo por luz tem sido utilizado para a detecção de anormalidade no sistema nervoso central (Hackley e Johnson, 1996; Nakamura, 1996; Yates e Brown, 1981) e em estudos de mecanismos neuronais envolvidos com aprendizagem associativa e memória por meio do condicionamento clássico do piscar, conhecido como “*eyeblink conditioning*” (Clark, 2011; Villarreal e Steinmetz, 2005; Weiss e Disterhoft, 2011;). No presente estudo, foi observado um aumento no número de piscadas frente à estimulação com intensidades luminosas maiores que $15,5\text{cd/m}^2$, o que indica a presença desse tipo de piscada reflexiva em aves. Entretanto, esse resultado foi encontrado somente para um animal da amostra. Uma possível explicação seria o fato de que o piscar é influenciado por vários fatores como, por exemplo, idade, períodos do dia e estados centrais (Barbato et al., 2000; Cruz et al., 2011; Ichikawa e Ohira, 2004; Siegle et al., 2008). Como esses fatores não foram sistematicamente controlados, eles podem ter influenciado de alguma forma a ocorrência do piscar reflexivo evocado por luz na coruja em questão.

4.4.3. Parâmetros do reflexo pupilar à luz

Os parâmetros derivadas das curvas do reflexo pupilar apresentaram resultados interessantes, até mesmo surpreendentes. A dilatação pupilar revelou-se extremamente rápida para o protocolo de adaptação ao escuro (Fig. 12), quando comparada a outros vertebrados, os quais levam em geral cerca de 30 minutos (Homem: Alpern e Campbell, 1962; Lagartixa: Denton, 1956; Peixe teleósteo: Douglas et al., 1998; Pombo: Blough, 1956; Tartaruga: Granda et al., 1995; Tubarão e raia: Kuchnow, 1971). Esse longo período de dilatação covaria com o tempo necessário para a regeneração da rodopsina (Alpern e Ohba, 1972; Fulton e Baker, 1984; Hansen e Fulton, 1986) após a fotodegradação, durante um determinado período de exposição à luz. Nesse sentido, a

rápida dilatação pupilar, observada na curva de adaptação ao escuro da coruja, poderia ser explicada por uma rápida regeneração do fotopigmento devido a um mecanismo ainda não conhecido. É importante notar que a intensidade de luz máxima utilizada neste trabalho ($2,2 \log \text{ cd/m}^2$) não é capaz de causar uma fotólise completa da rodopsina, que ocorre em intensidades de luz maior do que $3,8 \log \text{ cd/m}^2$ em os seres humanos (Alpern, 1971; Hansen e Fulton 1986).

Ainda, na curva de adaptação ao escuro não foi observada uma dependência entre a dilatação pupilar e as diferentes classes de fotorreceptores. Alguns estudos mostram que as curvas de adaptação ao escuro não são suaves, isto é, elas apresentam diferentes fases com constantes de tempo específicas, o que reflete a sensibilidade diferencial dos cones e bastonetes. Por exemplo, Granda e colaboradores (1995) mediram a dilatação da pupila de tartarugas durante 40 minutos, depois de um período de adaptação a luz. Esses autores mostraram que as curvas de adaptação ao escuro apresentam três fases com constantes de tempo específicas, cada uma refletindo a sensibilidade de um tipo de fotorreceptor: as duas constantes com tempo mais curto indicam a recuperação dos cones vermelhos e verdes, enquanto a mais longa refere-se aos bastonetes. Estudos psicofísicos em humanos também demonstraram que a dilatação da pupila segue inicialmente a recuperação dos cones (mais rápida) e depois a dos bastonetes (mais lenta; Alpern e Campbell, 1962; Alpern et al, 1959; Lowenstein e Loewenfeld, 1959; Ohba e Alpern, 1972). No entanto, a fase de transição entre os tipos de fotorreceptores, nomeada de “rod-cone break”, não é tão aparente (Ohba e Alpern, 1972) quanto a demonstrada na tartaruga (Granda et al., 1995)

Na coruja, mais especificamente em nossos experimentos, essa troca de função visual entre fotorreceptores também não é evidente. Isso pode ser explicado pela proporção relativa de bastonetes e cones na retina da coruja. A retina das corujas noturnas apresenta bastonetes, cones individuais e cones duplos, com uma relação aproximadamente de 30:1:2, respectivamente (Braekevelt, 1993; Braekevelt et al, 1996; Harmening e Wagner, 2011). Um estudo morfológico realizado por Sales (1990) mostra que, embora as corujas buraqueiras sejam conhecidas por terem hábito diurno/crepuscular, sua retina também exibe uma maior concentração de bastonetes na fóvea e uma área periférica dominada por essa classe de fotorreceptores. Essa dominância de bastonetes na retina pode ter mascarado essa troca funcional entre fotorreceptores. Contudo, protocolos delineados especificamente para estudar a

sensibilidade dos fotorreceptores a diferentes comprimentos de onda, podem levar a resultados diferentes. Dodt (1967) e Jacobs e colaboradores (1993), investigaram a sensibilidade dos bastonetes e dos cones de filhotes de galago (*Galagocramicmdatus*) e de macaco-coruja (*Aotus trivirgatus*), respectivamente, utilizando a técnica de eletrorretinografia. Os pesquisadores descobriram a presença dessa troca em ambos os animais, apesar de suas retinas apresentarem praticamente só bastonetes. Portanto, pode-se inferir a possibilidade de que a coruja também apresente essa troca funcional entre cones e bastonetes, porém, difícil de capturar com base apenas em uma análise pupilométrica.

Outro achado interessante está relacionado com os valores de latência para o início da constrição pupilar. A faixa de valores encontrados para esse parâmetro apresentou uma pequena variação (de 33ms a 58ms) sendo que a grande maioria das repetições apresentou valores iguais a 42ms e 50 ms, independentemente da intensidade de luz na qual eles foram calculados (ver. Fig. 15). Esses curtos valores de latência podem ser explicados pela musculatura do esfíncter da íris, que nas aves é composta principalmente por células estriadas (Mann, 1931; Neuhuber e Schroll, 2011; Oliphant et al, 1983). Surpreendentemente, esses valores foram encontrados para todos os níveis de luminância testados (fotópicos), ao contrário do que é relatado na literatura, isto é, a latência sendo inversamente proporcional à luminosidade (Alexandridis 1967; Ellis, 1981; Pong e Fuchs, 2000). Gamlin e colaboradores (1998) mediram as respostas pupilares a diferentes estímulos em macacos *rhesus*. Apesar da íris do macaco *rhesus* ser composta por músculos lisos, eles encontraram valores de latência 80 a 100 ms menores que em seres humanos. Tal estudo sugeriu que o músculo dilatador do macaco *rhesus* pode participar de forma mais vigorosa no reflexo pupilar, isto é, relaxando ativamente durante a fase de constrição e contraindo durante a fase de dilatação. Portanto, um balanço entre os músculos esfíncter e o dilatador aliado aos aspectos morfológicos da íris das corujas podem explicar os valores de baixa latência para todos os níveis de luminância.

Estímulos com luminância acima de 30 cd/m² já são capazes de induzir constrição pupilar máxima, gerando uma redução de aproximadamente 55% no tamanho da pupila (Fig. 14). Um estudo realizado por Barbur e colaboradores (2002), mostrou uma saturação acima de 50 cd/m² em galinhas e humanos (estimada a partir da figura do artigo), bem como uma redução de 24% e 53%, respectivamente, no tamanho da pupila

(medido à 90 cd/m^2). Esses resultados sugerem uma alta sensibilidade à luz do reflexo pupilar em corujas. Os períodos de constrição e dilatação em resposta à estimulação com flashes de 100 são semelhantes ao que foi o relatado para outros animais, mostrando assimetrias entre a constrição (rápida) e a redilatação (lenta; Fig. 16). Apesar dessa semelhança, as velocidades de ambas (fases de constrição e dilatação) são aproximadamente sete vezes mais rápidas (Fig. 17) do que as relatadas em macacos (Pong e Fuchs, 2000) e humanos (Ellis, 1981), mesmo em níveis de luminância mais baixos. Essas peculiaridades podem ser explicadas novamente pela morfologia dos músculos do esfíncter que, como já dito, são compostos principalmente por células estriadas (Oliphant et al., 1983). Para mostrar as diferenças entre os parâmetros do reflexo pupilar derivados deste estudo e os de trabalhos com mamíferos (Lowenstein e Friedman, 1942; Lowenstein e Loewenfeld, 1950), foram geradas cinco curvas de reflexo pupilar normalizadas (Fig. 20) obtidas na mesma intensidade de luz ($\sim 160 \text{ cd/m}^2$ ou 15 candelas-pés). Como pode ser observado, o reflexo na coruja é, sem sombras de dúvida, mais rápido do que em mamíferos.

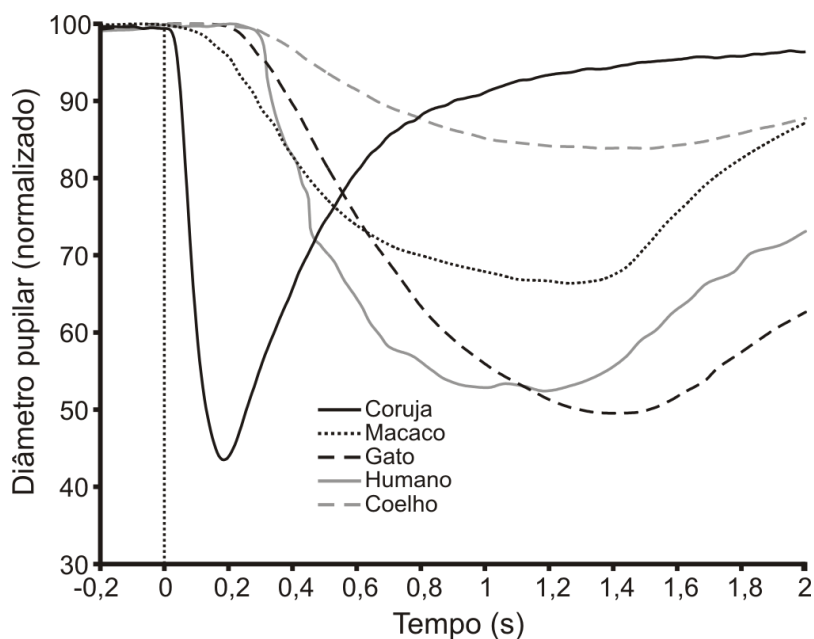


Figura 20: Comparação do reflexo pupilar à luz em corujas buraqueiras (linha preta contínua) e cinco espécies de mamíferos: macaco¹ (linha preta pontilhada), gato¹ (linha preta tracejada), humano² (linha cinza contínua) e coelho¹ (linha cinza tracejada). Todas as curvas foram obtidas para estímulos com intensidade em torno de 160 cd/m^2 (15 pés-candelas). 1- Lowenstein and Loewenfeld (1950); 2 - Lowenstein and Friedman (1942).

Finalmente, para longos períodos de estimulação (20s) foram observadas propriedades diferentes para alguns parâmetros extraídos quando comparado à estimulação transitória (100 ms), sendo que os parâmetros no estado estável apresentaram valores mais baixos do que para o estado transitório. Até agora, nenhuma explicação clara foi encontrada para esse resultado. A carência de informação sobre o reflexo pupilar em aves, se comparada à extensiva literatura disponível sobre mamíferos, limita as inferências sensatas que podemos fazer a respeito dessa questão. Mesmo assim, pode-se sugerir que diferentes tipos funcionais de neurônios possam estar relacionados com essas diferenças. Em um estudo realizado em macacos *rhesus*, Pong e Fuchs (2000) descreveram padrões de descarga dos neurônios no núcleo olivar pretectal (PON). Esse núcleo é considerado como a porta de entrada dos sinais relativos ao reflexo pupilar e parece ser responsável pelo controle desse reflexo (Clarke e Ikeda, 1985; Distler e Hoffman, 1989; Gamlin et al., 1995). Dois tipos de neurônios foram encontrados: (i) “burst-sustained”, o qual exhibe um aumento de disparos logo após o início da estimulação com luz, seguido por uma resposta sustentada que dura enquanto existir estimulação; e (ii) transiente, o qual exhibe um aumento na taxa de disparo somente no início e no final da estimulação. Esses pesquisadores mostraram que tanto a atividade espontânea quanto a frequência de disparos desses neurônios é modulada em função da intensidade luminosa e que essas modulações estão correlacionadas com parâmetros pupilares (amplitude e velocidade de constrição). Ainda, essa correlação foi encontrada somente para alguns neurônios do tipo “burst-sustained”, sugerindo que nem todos os neurônios desse núcleo contribuem para a modulação da pupila. Esses autores sugeriram ainda que os parâmetros de constrição pupilar podem ser mais afetados por padrões de descarga de células presentes no núcleo Edinger-Westphal o qual também contém esses dois tipos de neurônios (Laursen e Rekling, 2006). Corroborando com esses dados, Gamlin e colaboradores (1995) demonstraram, em pombos, a existência de relações entre a taxa de disparo de neurônios pretectais e a constrição pupilar, assim como uma relação entre a descarga de neurônios do núcleo Edinger-Westphal e a acomodação ocular. Baseado nessas informações e no fato de que a via central do reflexo pupilar é anatomicamente semelhante em primatas e aves (Gamlin et al., 1984), podemos sugerir que talvez as alterações observadas nos parâmetros extraídos durante a estimulação transitória e por longos períodos de tempo, reflitam diferentes modulações da atividade de neurônios que compõem a via do reflexo pupilar, causadas por exemplo,

por um certo nível de adaptação da resposta neuronal frente a estimulação com luz durante um tempo mais prolongado (20s).

Após a constrição inicial da pupila e antes de alcançar um platô, é possível derivar duas fases distintas (Fig. 18B): uma fase rápida seguida de outra mais lenta até o platô. Lowenstein e Loewenfeld (1950) também mostraram a presença de duas fases na dilatação da pupila em humanos: uma chamada de redilatação primária (onda D) e uma de redilatação secundária (onda E). Lesões experimentais em gatos, macacos e coelhos demonstraram que a onda D acontece predominantemente em função do relaxamento parassimpático, enquanto a onda E depende, principalmente, da via simpática. Oliphant e colaboradores (1983), com base em um estudo da morfologia da íris de corujas, propuseram que a fase de dilatação é atribuível a um mioepitélio radial bem desenvolvido, ao passo que um músculo liso anelar desempenha uma função importante na manutenção do estado miótico por longos períodos de tempo. Tendo em vista tais resultados, pode-se inferir que a primeira fase (rápida) é derivada do relaxamento do músculo do esfíncter (células estriadas) o qual é inervado pela via parassimpática, enquanto a segunda fase pode ser controlada, principalmente, pelo músculo liso anelar o qual poderia manter o platô durante longos períodos de estimulação.

4.4.4. Implicações para o controle de ganho

Os parâmetros relatados neste trabalho indicam um rápido controle no tamanho pupilar. A coruja pode chegar a uma constrição pupilar máxima em menos de 150 ms, com um período de latência muito curto. Medidas similares em mamíferos mostram valores de latência de aproximadamente 200 ms, (medida em altos níveis de luminância), com um tempo de contração de aproximadamente 500 ms (Clark et al, 2003; Ellis, 1981; Lowenstein e Loewenfeld 1950; Pong e Fuchs, 2000). Essas características indicam que o reflexo pupilar na coruja pode ser utilizado como mecanismo para uma rápida adaptação à luz. Nossos resultados corroboram com a ideia de que, em aves, o controle de ganho para luz pode ser exercido pela pupila durante inspeções da cena visual, a qual contribuiria para a facilitação dos mecanismos de adaptação à luz presentes na retina. Diz-se facilitação porque esse reflexo pode diminuir a iluminação que atinge a retina apenas meia ordem de magnitude, enquanto que a variação em imagens naturais atinge cerca de uma ordem de magnitude (Frazor e Geisler, 2006; Mante et al., 2005). Dessa forma, um sistema visual pode se beneficiar

tendo um reflexo pupilar rápido, associado a um rápido mecanismo de controle de ganho, de modo que a pupila reduziria drasticamente a intensidade luminosa e ajudaria os mecanismos de adaptação à luz presentes na retina (Fain et al., 2001) a ajustar a sensibilidade das células à intensidade luminosa global evitando, assim, a saturação neuronal. Em conjunto, esses mecanismos seriam capazes de manter a cascata de transdução de sinal dentro de uma larga faixa de intensidades luminosas, até mesmo durante os rápidos movimentos de cabeça que modificam os níveis de luminância que atingem a retina várias vezes por segundo.

4.4.5. A resposta consensual em aves

Em geral, mamíferos apresentam resposta consensual da pupila, isto é, a estimulação luminosa de somente um olho causa também uma constrição no olho oposto. No entanto, a existência da dependência entre os dois olhos frente à estimulação luminosa em aves tem sido debatido desde a década de cinquenta. Levine (1955) argumenta que estudos passados que mostram a presença de resposta consensual em pombos não se tratavam de um reflexo verdadeiro e ocorria porque a luz que entra por um olho atinge a retina do outro devido aos eixos ópticos altamente divergentes. Assim, a luz é capaz de passar através das finas estruturas que dividem os dois olhos estimulando ambas as retinas, o que promoveria uma resposta consensual "artificial". Schaeffel e Wagner (1992) confirmaram a independência dos dois olhos em aves, usando a coruja suindara (*Tyto alba*) como modelo experimental. Como corujas possuem olhos posicionados frontalmente e um eixo óptico pouco divergente quando comparado a pombos, o efeito apresentado por Levine não ocorria nessa ave. Um estudo anatômico realizado por Gamlin e colaboradores (1984) em pombos mostrou ainda a natureza unilateral da via do reflexo pupilar o que explicaria a independência de ambos os olhos. No entanto, por meio de corte transversal do nervo óptico, Li e colaboradores (1999) demonstraram a presença de uma resposta consensual verdadeira em galinhas. Nossos resultados mostram algumas diferenças nas curvas de reflex para medidas monoculares e binoculares, principalmente em condições de luminância abaixo do ponto de saturação (31 cd/m²). Essas diferenças são explicadas pelo fato de que a resposta binocular produz velocidades de constrição maiores do que a monocular, gerando um impacto direto sobre os outros parâmetros analisados, exceto para a latência de constrição. Esses achados sugerem que um olho parece influenciar na resposta do

outro. Dessa forma, a existência de uma resposta consensual verdadeira em aves é uma questão que ainda permanece em aberto.

5. Caracterização da cinemática do piscar espontâneo e reflexivo na coruja buraqueira

5.1. Introdução

As piscadas possuem um importante papel na lubrificação, oxigenação e proteção da córnea contra danos potenciais que podem ser causados por objetos externos. Em mamíferos, o piscar pode ser dividido em três principais tipos: (i) espontâneo, (ii) reflexo e (iii) voluntário. Cada tipo de piscar possui características cinemáticas próprias que podem ser alteradas frente a vários fatores como idade, patologias, estada central e tipos de estímulos externos (revisado em Cruz et al., 2011).

Estudos cinemáticos detalhados do piscar são o ponto de partida essencial para desvendar os mecanismos neuronais subjacentes a este comportamento. Estudos desse tipo foram realizados no homem bem como em diversas espécies de mamíferos (por exemplo, Evinger et al., 1984; Evinger et al., 1991; Gruart et al., 1995, 2000; Koekkoek et al., 2002; Trigo et al., 2003; VanderWerf et al., 2003). Entretanto, até o momento não há estudos equivalentes em aves. Existe apenas uma literatura parcimoniosa focalizada na taxa de ocorrência do piscar. O estudo de Blount (1927) descreve a frequência de piscadas em várias espécies de animais, incluindo 4 espécies de aves (2 corujas) e conclui que essas aves piscam rapidamente ou lentamente variando em relação ao ambiente que estão inseridos. Um relato de Mowrer (1933) abordou movimentos da membrana nictitante em aves e seu papel como uma estrutura utilizada para a limpeza da córnea e que evitaria também a percepção do deslocamento da imagem da retina durante os movimentos oculares ou de cabeça. Posteriormente, o trabalho de Kirsten e Kirsten (1983) estudou o piscar em 24 espécies de aves e mostrou que animais com hábitos diurnos piscam mais do que os de hábitos noturnos. Além disso, esses pesquisadores não encontraram diferenças na frequência de piscadas quando expuseram as aves a diferentes intensidades de luz e sugeriram que a frequência do piscar não está diretamente associado com a foto-estimulação da retina. Recentemente, Marzluff e colaboradores (2012) relacionaram o desempenho de tarefas comportamentais com a frequência de ocorrência do piscar. Eles mostraram que ocorre uma diminuição na

frequência do piscar em corvos americanos quando esses reconhecem uma face ameaçadora. Ainda, esses autores demonstraram que essa redução está relacionada com um aumento da atividade do tronco cerebral e outras áreas conhecidas por regular a percepção, atenção, medo e comportamento de fuga em aves.

Recentemente, uma dissertação de mestrado, realizada no Laboratório de Neurodinâmica do ICB-UFMG pelo Marcelo Dias em corujas buraqueiras mostrou que a frequência do piscar nessa ave está relacionada ao seu estado comportamental: se o animal encontra-se em tarefa visual, a frequência e a duração das piscadas são menores do que quando ela está em repouso. Outra relação interessante encontrada pelo mesmo autor foi a de que movimentos sacádicos nessa ave, os quais são realizados pelo movimento da cabeça, estão altamente correlacionados com o piscar, de modo que 85% das piscadas eram concomitantes com movimentos da cabeça. Aves também são conhecidas pela sua capacidade de realizar diversos comportamentos oculomotores não conjugados (Martin, 2009). No caso das corujas buraqueiras, o piscar conjugado ocorre com maior frequência (95%) do que o piscar monocular (5%) quando o animal está em repouso. Em tarefa visual, a frequência de piscadas monoculares tende a aumentar (Dias, 2013). Esse dado pode ser interpretado como uma estratégia para preservar a entrada de informações visuais sem gerar problemas para a manutenção ocular.

Apesar dos estudos acima referidos, há uma deficiência em informações sobre a cinemática do movimento palpebral em aves. Dessa forma, o presente capítulo tem como objetivo caracterizar o piscar na coruja buraqueira, animal experimental alvo deste trabalho. É importante salientar que essa caracterização foi feita sobre situação de registro, isto é, com cabeça imobilizada. Dois tipos de piscadas foram avaliados: (i) o piscar espontâneo e (ii) o piscar reflexivo, o qual foi evocado por um sopro de ar. Essa avaliação é um passo importante antes de se estudar os correlatos neuronais do piscar no wulst visual da coruja buraqueira, apresentado no capítulo 6.

5.2. Metodologia

O movimento palpebral foi obtido durante os protocolos experimentais utilizados para o estudo eletrofisiológico apresentado no Capítulo 6. Cada vídeo analisado possui uma resolução de 320x240 pixels, amostrado a uma taxa de 120 Hz, e obtido somente para o olho direito. Entretanto, o outro olho foi constantemente monitorado pelos experimentadores. Esse monitoramento consistiu na observação e anotação dos movimentos palpebrais capturados por uma segunda câmera (mini câmera;

sensor de 1/4; taxa de atualização: 60Hz) com foco ajustável (lente de 3.6 mm) posicionada próximo ao olho, cujas informações eram enviadas a um monitor LCD. As imagens dessa câmera não foram gravadas em disco.

5.2.1. Análise dos vídeos

A cinemática palpebral foi analisada manualmente utilizando o software de processamento de imagem ImageJ 1.44 (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Esse software foi escolhido por ser de acesso livre e permitir uma análise detalhada, quadro a quadro, dos vídeos gravados. Nesse ponto, é importante ressaltar que o programa de análise pupilométrica descrito no Capítulo 4 detecta automaticamente as ocorrências de piscadas. Mas, como discutido em Souza et al., (2013, ver também a Fig. 14 deste trabalho), o programa não calcula precisamente a posição palpebral. Um dos objetivos deste trabalho era o de implementar algoritmos mais sofisticados para estimar automaticamente o movimento da pálpebra superior e a proporção do globo ocular coberta pelas pálpebras em função do tempo. Entretanto, dada a necessidade de um período de tempo maior para a implementação dos algoritmos, optou-se por fazer a análise de todos os dados manualmente.

Cada vídeo foi analisado da seguinte forma: uma vez aberto o arquivo, era realizada uma busca a fim de localizar precisamente os eventos. Uma vez localizado, eram extraídos os valores do tempo de ocorrências em 4 posições diferentes da pálpebra durante o piscar: (i) o **início do movimento** (tempo “zero”), o qual foi determinado verificando-se o quadro em que a pálpebra iniciou o movimento de descida; (ii) o **tempo final da descida** da pálpebra; (iii) o **tempo estático**, o qual é o período entre o final da descida e o início da subida da pálpebra; (iv) o **tempo de desocclusão de meia pupila** durante a subida da pálpebra. A metade da pupila foi determinada ajustando-se manualmente um pequeno ponto no centro da pupila o qual foi utilizado como referência. Caso o movimento de descida da pálpebra não fosse suficiente para ocluir meia pupila, essa posição não era computada; (v) o **tempo entre o restante da desocclusão da pupila** e o final do movimento. Devido ao fato de que a pálpebra nem sempre retorna a sua posição original e, o final do movimento ascendente não é sempre estável, a definição do final do movimento de subida foi escolhido como o momento em que a pálpebra parava completamente a sua movimentação. Foram calculadas as durações entre os tempos acima citados e a porcentagem de oclusão da pupila, através da razão entre a área da pupila no início do movimento e a área pupilar descoberta no

final do movimento de descida. Essas duas áreas foram definidas manualmente pelo experimentador demarcando-se a borda descoberta da pupila com o software ImageJ, o qual calcula automaticamente a área da forma demarcada.

A definição das piscadas como monoculares ou binoculares foi realizada durante as sessões de registro através da observação pelo experimentador de dois monitores adjacentes (um ligado ao sistema de aquisição de imagem e outro na segunda câmera de monitoramento). Caso surgissem dúvidas a cerca dessa definição, a piscada não era classificada. Todas as métricas apresentadas foram extraídas para cada piscada registrada. Eventos cujo início do movimento não foi capturado (início da gravação durante uma piscada) foram excluídos das análises.

5.3. Resultados

Os dados apresentados nesse estudo foram obtidos em quatro corujas buraqueiras e abrange um total de 3307 eventos. O número de eventos registrados por coruja foi de 132 (4%), 198 (6%), 959 (29%) e 2018 (61%). Com o intuito de se obter o comportamento geral do piscar nessa ave, a análise foi realizada abrangendo o total de eventos e não foi separado por indivíduo. Ainda, essa opção foi escolhida porque a maioria dos eventos ficaram concentrados em somente dois animais. A não ser que seja especificado no texto, os valores de tendência central são apresentados como medianas, com o 25° e 75° percentil como uma medida de dispersão da amostra.

5.3.1. Caracterização qualitativa do piscar

Pelo menos duas características interessantes do piscar na coruja buraqueira merecem ser inicialmente destacadas e podem ser observadas na figura 21. A primeira, é que a pálpebra inferior se mantém estável durante todo o movimento da pálpebra superior, tanto no piscar espontâneo quanto no reflexivo. Isso não ocorre em todo o reino animal. Em primatas, por exemplo, mesmo que totalmente passiva, a pálpebra inferior se movimenta, apesar de muito mais sutilmente, do que a pálpebra superior (Malbouisson et al., 2005). Essa pequena movimentação é totalmente passiva, e ocorre durante a movimentação ocular que acompanha o piscar (Hawes e Dortzbach, 1982). A falta de movimentação da pálpebra inferior na coruja pode refletir, portanto, o fato de que nessa ave os movimentos oculares são extremamente reduzidos.

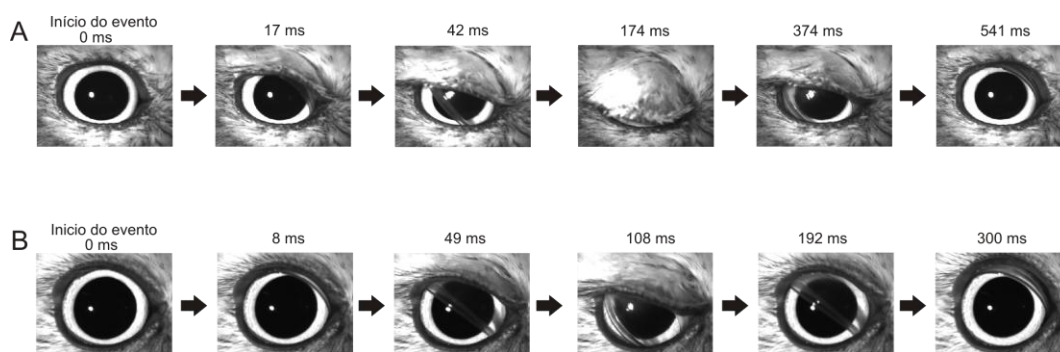


Figura 21: Exemplos representativos do piscar na coruja buraqueira. (A) Sequência de quadros obtidos pelo pupilômetro, demonstrando um evento com tempo de duração maior e oclusão total da pupila. (B) Mesmo que A, mas agora com tempo de duração menor e oclusão parcial da pupila. Observe que a pálpebra inferior permanece estável durante todo o movimento e que a pálpebra superior e a membrana nictitante apresentam uma movimentação no sentido temporal-ventral.

A segunda característica do piscar na coruja buraqueira é a movimentação da membrana nictitante, a qual é utilizada para limpeza, lubrificação e proteção da córnea. Apesar de não termos medido a cinemática dessa membrana, observações dos vídeos mostram que a nictitante acompanha e inicia o seu movimento juntamente com a pálpebra, tanto durante a descida como na subida. Entretanto, a membrana nictitante tende sempre a varrer totalmente o globo ocular, independentemente da pálpebra ter ou não ocluído totalmente a pupila. Além disso, acompanhando-se o movimento da membrana nictitante e da pálpebra à medida que deslizam sobre a superfície ocular, fica evidente que o movimento descrito para ambas as estruturas não é vertical, mas sim temporal-ventral, sendo o da primeira mais temporal que a segunda.

5.3.2. Caracterização quantitativa do piscar

A figura 22 mostra os resultados gerais obtidos quando todos os tipos de eventos (tanto evocado quanto espontâneo) são analisados em conjunto. O tempo de duração total do piscar (Fig. 22A) ficou em torno de 600 ms [400 – 927,08]. A fase de descida (Fig. 22B) mostrou-se relativamente constante dentro de uma faixa mais estreita de valores, com uma mediana de 116,7 ms [75 – 141,7]. É interessante notar que o histograma da figura 22B apresentou um grande número de piscadas com valores de fase de descida entre 30 e 50 ms. Após um período estático (Fig. 22C) de aproximadamente 8,33 ms [8,33 – 16,66] a pálpebra iniciou o movimento de retorno da

pálpebra. Diferentemente da fase de descida, os tempos obtidos para a subida (Fig. 22D) apresentaram uma maior variabilidade, com uma tendência central de 458,33 ms [300 – 800].

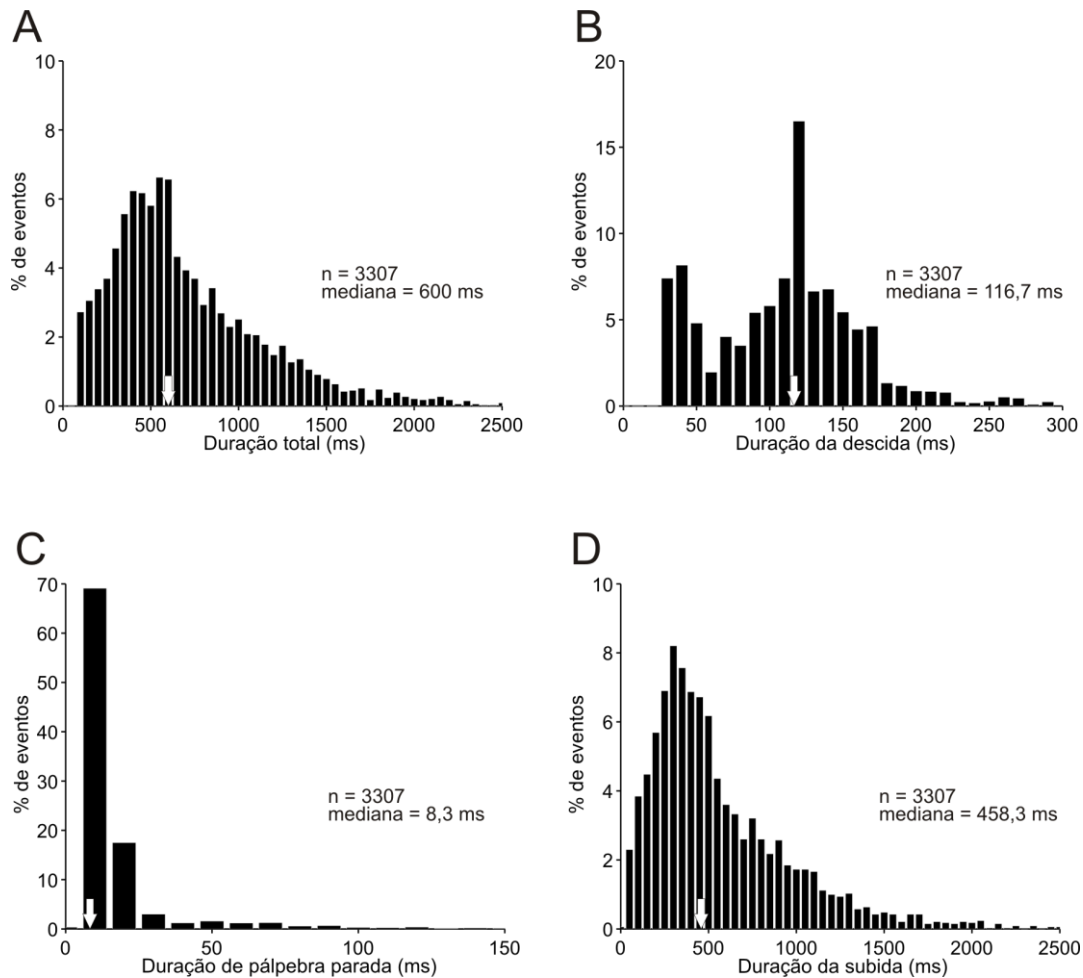


Figura 22: Dinâmica geral do piscar na coruja buraqueira. Os histogramas mostram a duração total dos eventos (A), a duração do tempo de descida (B), a duração do tempo estático (C) e a duração do tempo de subida (D). As setas brancas indicam a tendência central.

Durante as análises do piscar, foi observado que a subida da pálpebra começava com um movimento mais rápido, ficando mais lento no final. Dessa forma, separamos o movimento de subida da pálpebra em duas etapas distintas a fim de detectar uma possível variação ao longo do movimento. A primeira etapa foi definida pelo tempo decorrido entre o início da subida da pálpebra até atingir metade da pupila (Fig. 23A) e a segunda pelo restante do movimento (Fig. 23B). Como pode ser observado, a primeira etapa foi significativamente ($p < 0.001$; Wilcoxon signed-rank) mais curta (150 ms [66,7 – 275,0]) do que a segunda (258,3 ms [175 – 433,3]). Isso sugere que o

movimento de subida da pálpebra tem um comportamento exponencial, isto é, mas rápido no início e mais lento no final.

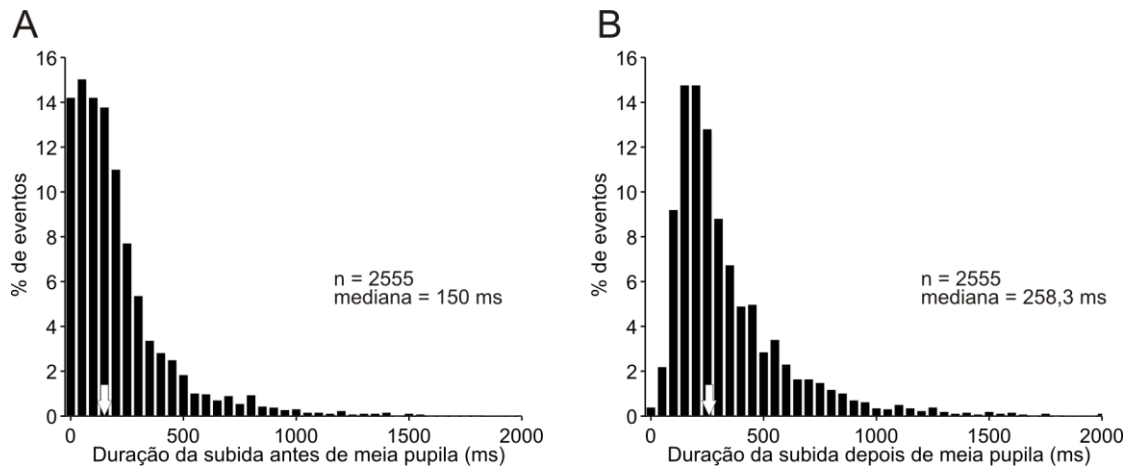


Figura 23: O movimento de subida da pálpebra dividida em duas fases. O histograma em A mostra os tempos de duração do movimento de subida da pálpebra até a metade da pupila, para todos os eventos. O histograma em B mostra a duração do restante do movimento. As setas brancas indicam a mediana.

5.3.3. Piscar espontâneo versus reflexivo

O piscar espontâneo representa aproximadamente 63% do total dos eventos registrados (2102/3307). A duração total encontrada (Fig. 24A – histograma preto) para o piscar espontâneo foi de 691,7 ms [508,6 – 1025,0]. As fases de descida (Fig. 24B – histograma preto) e de subida (Fig. 24D – histograma preto) apresentaram uma duração de 125,0 ms [108,3 – 150] e de 533,3 ms [383,3 – 891,7], respectivamente, com um tempo estático entre fases de 8,33 ms [8,33 – 16,7] (Fig 24C – histograma preto). Esse resultado mostra que a fase de descida é aproximadamente 4,5 vezes mais curta do que a de subida.

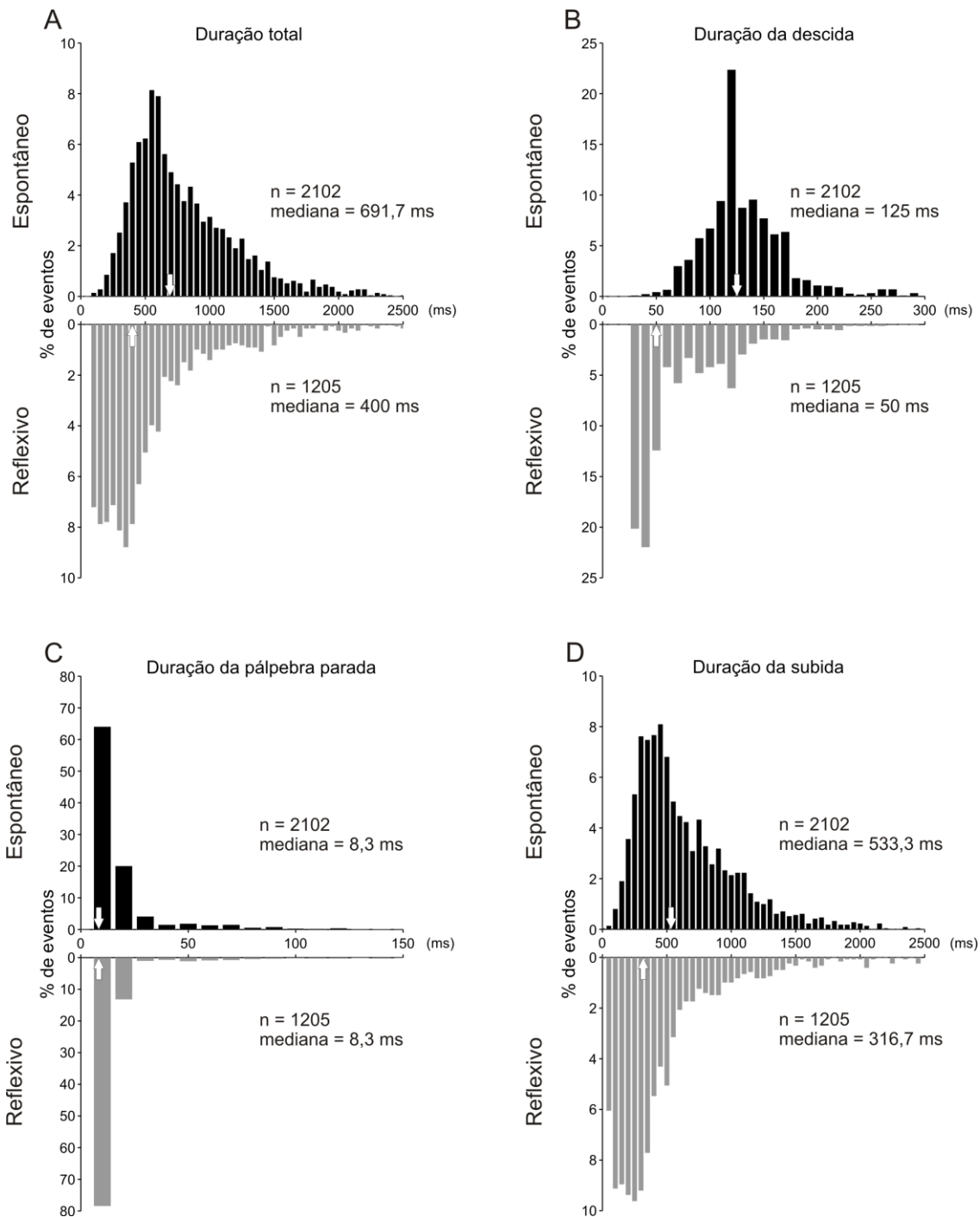


Figura 24: Dinâmica do piscar espontâneo e do reflexivo evocado por um sopro de ar na coruja buraqueira. Os histogramas mostram a duração total dos eventos (A), a duração do tempo de descida (B), a duração do tempo estático (C) e a duração do tempo de subida (D). Os histogramas de cor preta e cinza se referem ao piscar espontâneo e reflexivo, respectivamente. Os valores obtidos para o piscar reflexivo são significativamente menores ($p < 0,001$; Wilcoxon Rank-Sum) que o do piscar espontâneo, exceto para a duração do tempo estático. As setas brancas indicam a tendência central.

No caso do piscar reflexivo, foram analisados 1205 eventos (37% da amostra total) provocados por um sopro de ar. Esse tipo de piscada mostrou uma duração total (400 ms [250 – 658]; Fig 24A – histograma cinza) significativamente mais curta do que o piscar espontâneo ($p << 0,001$; Wilcoxon Rank-Sum), o que acarretou diretamente em fases de subida (Fig 24B – histograma cinza) e descida (Fig 24D – histograma cinza) também mais curtas, com valores de 50 ms [41,67 – 100] e 316,7 ms [200 – 558,3], respectivamente ($p << 0,001$; Wilcoxon Rank-Sum). A tendência central do tempo estático entre as fases de descida e subida mostrou-se igual ao do piscar espontâneo (8,33 ms [8,33 – 16,7]; Fig 24D – histograma cinza).

A divisão do movimento da subida em duas etapas (Fig. 25), como mostrado na análise geral, também apresentou uma duração mais curta para a primeira etapa (espontâneo = 183,3 [100,0 – 308,3]; evocado = 83,3 [25,0 – 191,7]; Fig. 25A) do que para a segunda (espontâneo = 300 [208,3 – 475]; evocado = 191,7 [133,3 – 325]; Fig. 25B) nos dois tipos de piscadas, indicando que o comportamento exponencial desse movimento é uma característica intrínseca do piscar.

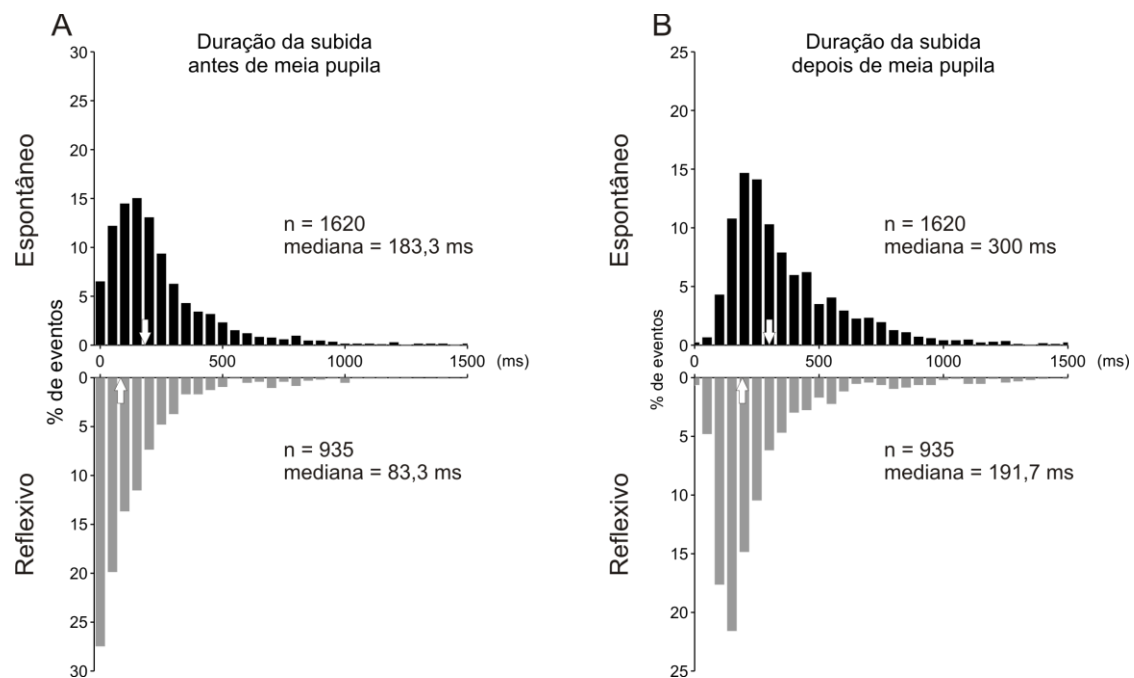


Figura 25: O movimento de subida da pálpebra foi dividido em duas fases para o piscar espontâneo e o reflexivo. O histograma em A mostra os tempos de duração do movimento de subida da pálpebra até a metade da pupila. O histograma em B mostra a duração do restante do movimento. Os histogramas de cor preta e cinza se referem ao piscar espontâneo e reflexivo, respectivamente. As setas brancas indicam a mediana.

Durante as análises foi encontrado também a falta de uma oclusão pupilar completa para grande parte dos eventos (Fig. 26). Essa característica pode ser observada novamente na figura 21, onde no painel superior está representado um exemplo onde a pupila é totalmente ocluída (Fig. 21A), e no inferior um exemplo em que a pupila é somente parcialmente ocluída (Fig. 21B). Dessa forma, a quantificação dessa particularidade é importante porque pode influenciar diretamente nas propriedades ópticas da imagem que atinge a retina (intensidade luminosa, estrutura espacial e composição espectral) e, conseqüentemente, na atividade dos neurônios do wulst.

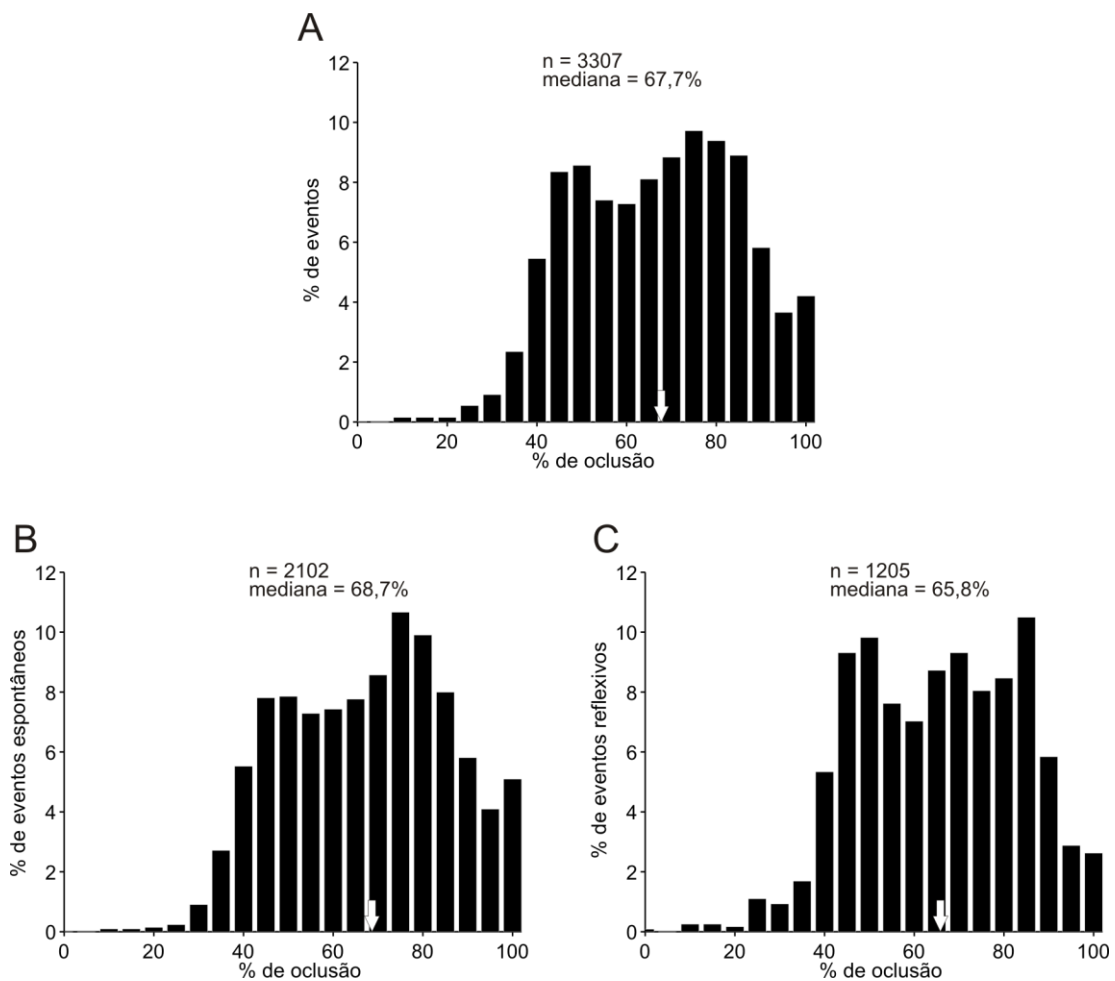


Figura 26: Porcentagem de oclusão da pupila pela pálpebra. Cada histograma mostra as porcentagens encontradas considerando todos os eventos (A), somente o piscar espontâneo (B) e somente o reflexivo (C). Não foi encontrada diferença significativa quando os dois tipos de piscadas são comparadas.

Em geral, a pálpebra tende a ocluir 67,7% [51,1 – 81,0] da pupila (Fig. 26A). Essa porcentagem sofre uma variação mínima quando observada separadamente para o piscar espontâneo (68,7% [52,1 – 81,2]; Fig 26B) e o reflexivo (65,5% [50,2 – 80,7];

Fig 26C) e não apresenta diferença estatística significativa ($p > 0,05$; Wilcoxon Rank-Sum). Esses resultados, aliado ao fato de que o piscar reflexivo possui uma duração mais curta que o espontâneo, sugere que o primeiro é mais rápido do que o segundo.

Outra diferença encontrada para esses dois tipos de piscadas é que a grande maioria dos eventos espontâneos foram binoculares enquanto que os reflexivos foram monoculares. Como pode ser observado na figura 27, do total de piscadas espontâneas em que foram monitorados os dois olhos ($n = 1709$), aproximadamente 83% (1419/1709) foram binoculares e somente 17% (290/1709) monoculares. No caso do piscar reflexivo ($n = 1046$), foram obtidos 22% (230/1046) de eventos binoculares, contra 78% (816/1046) de monoculares. Realizando um teste categórico entre as frequências de ocorrência de cada tipo de evento, obteve-se um resultado estatístico significativo (χ^2 ; graus de liberdade = 1; $p < 0,001$).

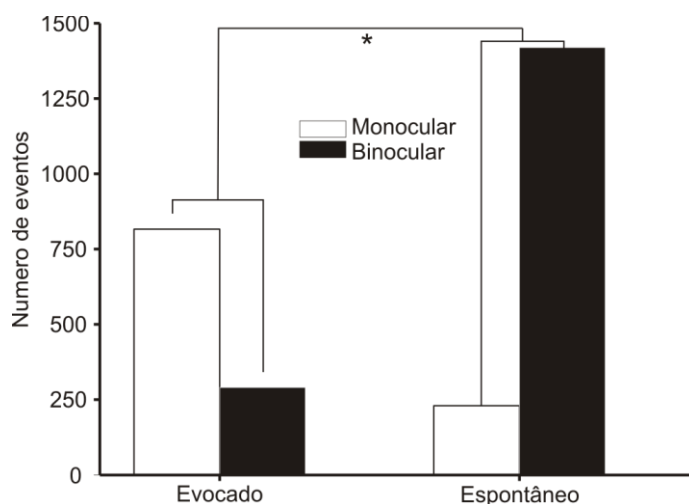


Figura 27: O gráfico de barras mostra a quantidade de eventos monoculares e binoculares para os dois tipos de piscadas. O piscar espontâneo provoca uma quantidade maior de eventos binoculares. Por outro lado, as piscadas evocadas apresentam predominantemente eventos monoculares. * $p < 0,001$.

Um efeito interessante observado durante a análise dos vários eventos coletados foi uma diminuição da pupila durante um número expressivo de piscadas (Fig. 28A). Essa característica só foi passível de ser observada quando uma piscada não apresentava uma oclusão total da pupila.

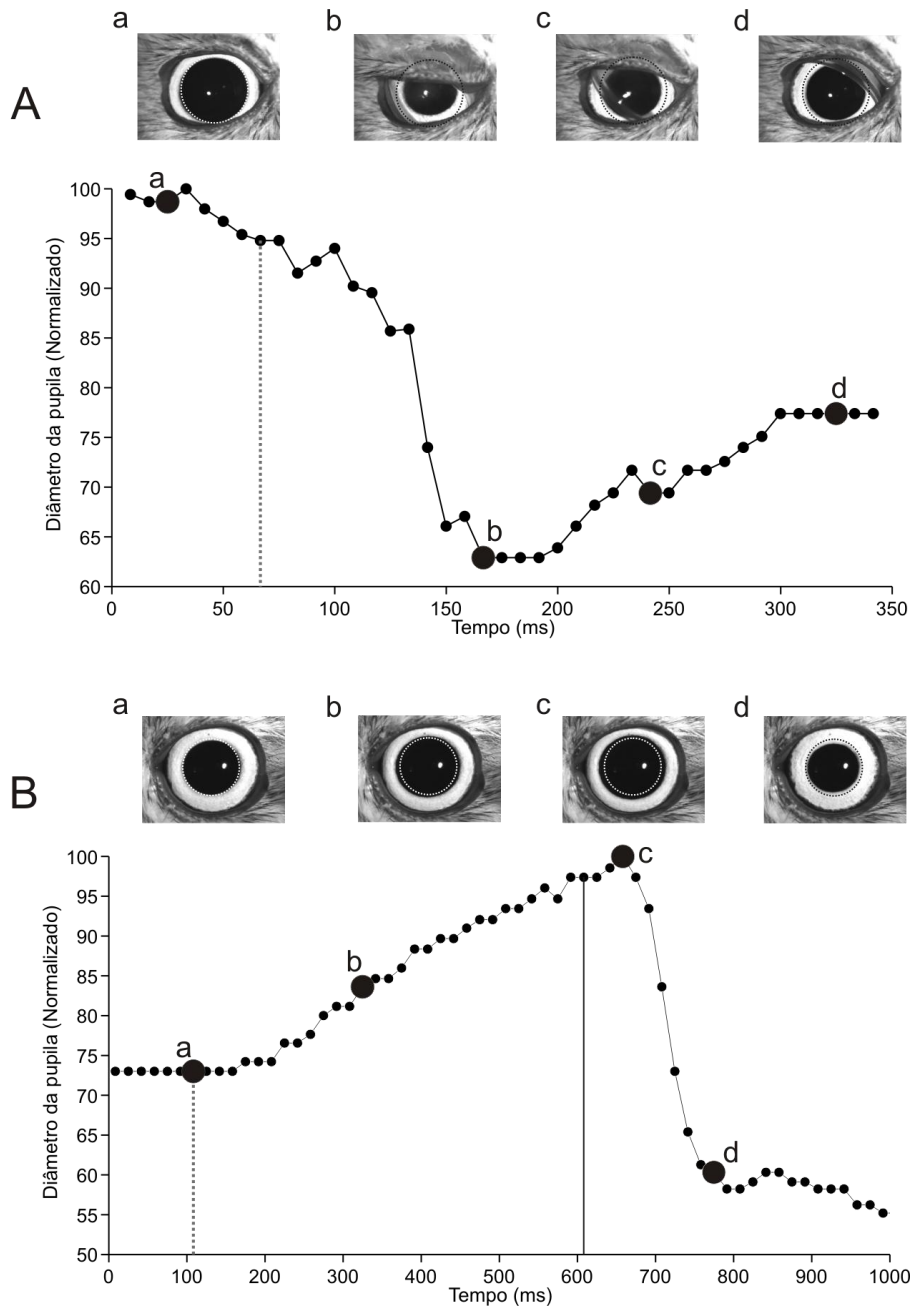


Figura 28: Exemplo representativo do efeito do piscar sobre a pupila. (A) Conforme o movimento da pálpebra se inicia, a pupila tende a diminuir o seu tamanho, retornando ao seu estado inicial depois do final do evento. (B) Simulando o piscar por meio do escurecimento da tela por 500 ms, o efeito observado é uma dilatação da pupila. As imagens mostram alguns quadros do vídeo de onde as curvas de diâmetro da pupila em função do tempo foram obtidas. Os círculos desenhados nas figuras indicam o tamanho inicial da pupila. As linhas verticais pontilhadas indicam o início do piscar (A) e o início do escurecimento da tela (B); a linha vertical sólida em B demarca o final do escurecimento da tela.

Para quantificar essa questão, escolhemos aleatoriamente 327 piscadas (235 espontâneas e 92 evocadas) que não apresentavam oclusão total da pupila e obtidas nos

protocolos experimentais em que o monitor apresentava uma grade senoidal (32% – 105/327), com iluminação constante (47% – 153/327) ou no escuro (21% – 69/327; condições 1, 2 e 3 do paradigma 2 apresentado no capítulo 6). Em 62% (145/235) dos eventos espontâneos e 35% (32/92) dos eventos reflexivos foi observada uma diminuição da pupila (Fig. 28A). Essa característica foi encontrada, independentemente da condição em que o piscar foi adquirido. Entretanto, um número maior de diminuições foi observado durante o piscar na tela com iluminação constante (61% – 94/153) e com a grade senoidal (59% – 62/105). No escuro, somente 35% (21/69) da amostra apresentou diminuição. O tempo médio para o início da diminuição pupilar foi de 50 ms [8,3 – 125] depois do começo da descida da pálpebra, com uma porcentagem de diminuição mediana de 13,9% [8,2 – 23] relativo ao seu tamanho antes do evento. Para verificar o resultado esperado pela queda de iluminação causada pela pálpebra, simulamos o piscar por meio do escurecimento do monitor de estimulação durante 500 ms. Foi observado o efeito contrário e esperado: uma dilatação da pupila (Fig. 28B), com características semelhantes ao apresentado no capítulo 4 (item 4.3.4). Assim, esse resultado sugere que o piscar gera modulações na pupila independentes da variação de intensidade luminosa causada pela pálpebra.

5.4. Discussão

Os principais achados desse capítulo podem ser resumidos da seguinte forma: (i) o piscar na coruja buraqueira em situação de registro (cabeça imobilizada), tem uma duração total em torno de 600 ms, sendo que a fase de subida contribui para a maior parte desse tempo; (ii) o piscar espontâneo tem maior duração que o piscar reflexivo, tanto no tempo total quanto nas diferentes fases; (iii) a porcentagem de oclusão da pupila é muito variada, independentemente do tipo de piscar, sendo que, para grande parte dos eventos registrados, ocorre somente uma oclusão parcial da mesma pela pálpebra; (iv) contra-intuitivamente, uma diminuição da pupila tende a acompanhar a fase inicial de descida da pálpebra.

5.4.1. Considerações metodológicas

Medir a cinemática do movimento palpebral não é uma tarefa trivial, já que o movimento ocorre muito rápido. Sob a influência de uma série de características e fatores intrínsecos e extrínsecos, o piscar pode durar menos de 200 ms. Várias metodologias foram desenvolvidas ao longo dos anos com o intuito de calcular a

dinâmica do movimento palpebral (Evinger et al., 1994; Kennard e Glaser, 1964; Vandermeer e Amsel, 1952; VanderWerf et al., 2003). Para isso, uma das técnicas mais utilizadas é o método do sensor magnético (MSC, do inglês “magnetic search coil”; Evinger et al., 1991; Guitton et al., 1991; Gruart et al., 1995; Malbouisson et al., 2010; VanderWerf et al., 2003). Nessa técnica, o objeto de estudo é colocado dentro de uma cabine com campo magnético oscilatório e um pequeno sensor é preso na superfície da pálpebra ou implantado cirurgicamente (ver, por exemplo, Gruart et al., 2000). Conforme a pálpebra se movimentar ocorre uma variação no campo magnético e uma corrente é induzida dentro desse sensor, a qual é utilizada para gerar as curvas que descrevem o movimento palpebral (Guitton et al., 1991; Robinson, 1963). Esse mesmo sistema é ainda utilizado em estudos relacionados à movimentação ocular, e uma de suas vantagens reside na alta resolução temporal utilizada na aquisição dos dados (na ordem de KHz; Malbouisson et al., 2010; Rimmel, 1984;).

No presente estudo, a dinâmica do piscar foi caracterizada utilizando-se um sistema de aquisição baseado em vídeo. Nosso sistema apresenta algumas vantagens, tanto para o estudo do piscar, como também de movimentos oculares. A primeira é o fato desse método não ser invasivo e nem haver necessidade de prender um objeto à pálpebra (piscar) ou à esclera (movimento ocular), o que diminui a possibilidade de introduzir efeitos deletérios no movimento, associado, por exemplo, com stress e a carga mecânica dos dispositivos implantados (Bracha et al., 2003). Outra vantagem única do sistema é a possibilidade de medir simultaneamente o movimento tanto da pálpebra superior como o da inferior e, no caso do presente projeto, da membrana nictitante. Apesar de não ter sido realizado no presente estudo, os vídeos contendo toda a dinâmica da nictitante podem ser analisados novamente e utilizados em projetos futuros.

Apesar do sistema de aquisição de imagem apresentar uma resolução temporal (8,33 ms – 120Hz) bem inferior quando comparado ao MSC, ela se mostrou suficiente para o estudo dos tipos de piscadas no presente trabalho. Esse valor de resolução também foi utilizado com sucesso em outro estudo em mamíferos (Bracha et al., 2003). Entretanto, Bracha e colaboradores (2003) discutem se uma resolução temporal de 8,33 ms é suficiente para se examinar as correlações entre o movimento palpebral e a atividade neuronal. Esses pesquisadores sugeriram que um sistema adequado para esse fim deveria possuir uma resolução mínima de 1 ms. Esse é um ponto interessante a se considerar, principalmente porque no presente projeto foi realizado um correlato

neuronal do efeito do piscar (adquirido a 120Hz) sobre a atividade dos neurônios do wulst (capítulo 6). No entanto, a resolução temporal da câmera é maior do que a da apresentação de estímulo pelo monitor (taxa de atualização = 100Hz), o que garante a realização de uma boa correlação temporal entre a atividade neuronal e o piscar. Baseado ainda nessa questão, é interessante salientar a possibilidade da implementação de novos algoritmos capazes de extrair automaticamente a cinemática do movimento palpebral no software do sistema pupilométrico. Por meio dessa extração automática quadro a quadro, seria possível determinar outras características relacionadas ao piscar, como a amplitude e a velocidade do movimento.

5.4.2. O piscar em aves versus mamíferos

A dinâmica do piscar em mamíferos foi estudada em várias espécies, como primatas, gatos, coelhos e até porquinhos da índia (Evinger e al., 1984; Evinger et al., 1991; Gruart et al., 1995, 2000; Koekkoek et al., 2002; Trigo et al., 2003; VanderWerf et al., 2003). Esses trabalhos mostram que a dinâmica do piscar é composta por uma fase de descida da pálpebra mais rápida e uma fase de subida mais lenta. Ainda, Evinger e colaboradores (1984) mostraram que a fase de subida pode ser dividida em dois estágios, uma fase inicial mais rápida seguida por uma fase mais lenta.

Os parâmetros obtidos no presente estudo mostram que a coruja buraqueira apresenta um comportamento similar na dinâmica palpebral. Os valores para a fase de descida, tanto para o piscar espontâneo (mediana = 125 ms) como para o piscar reflexivo (mediana = 50 ms) são próximos, apesar de um pouco maiores, do que os obtidos em mamíferos (Evinger, 1984; Stava et al., 1994; Sun et al., 1997; VanderWerf et al., 2003). Entretanto, para a fase de subida, os valores obtidos na coruja buraqueira para os dois tipos de piscadas é aproximadamente 1,8 vezes maior que o de descida. Um resultado similar foi obtido por Evinger e colaboradores (1984) em coelhos, onde o movimento de descida era bem mais curtos (89 ms) do que o de subida (563 ms). Esses autores mostraram que essa característica está ligada a um comportamento exponencial de subida da pálpebra, isto é, mais rápida no início do movimento e mais lenta no final. O mesmo resultado foi obtido no presente estudo para a coruja, onde a diferença no tempo médio entre o primeiro estágio de subida e o segundo foi em torno de 100 ms. Evinger e colaboradores (1991) sugeriram que esse comportamento exponencial no tempo de subida pode estar associado com o padrão de atividade dos músculos que controlam o movimento da pálpebra. No caso da fase de descida, ocorre uma

diminuição da atividade do músculo levantador da pálpebra, enquanto é gerado um rápido aumento (“*burst*”) na atividade do músculo orbicular (OO). No caso da subida da pálpebra, o músculo OO cessa a atividade e o músculo levantador da pálpebra (LP) mostra um padrão denominado “*burst-tonic*”, isto é, geração de um rápido aumento na atividade (“*burst*”), seguida por um platô (“*tonic*”). Dessa forma, a pálpebra iniciaria um movimento de subida mais rápida no início, devido ao padrão que eleva rapidamente a resposta a níveis mais altos (“*burst*”) e um mais lento no final, devido à diminuição da atividade até atingir um nível sustentado (“*tonic*”). Portanto, sugere-se a existência de um mesmo padrão de controle neuromuscular do movimento palpebral na coruja. Entretanto, é preciso notar que outros fatores como viscosidade e rigidez palpebral também podem influenciar (Evinger et al., 1984; Evinger et al., 1991; Hung et al., 1977). Ainda, na coruja, um grande número de eventos não é acompanhado pela oclusão total da pupila, ocasionando uma menor amplitude de movimento. Esse fato também torna o movimento de subida mais curto na primeira etapa do que na segunda, influenciando nos resultados obtidos.

A falta de oclusão total da pupila observada em grande parte dos eventos pode estar ligada ao fato de que aves possuem a membrana nictitante para realizar a lubrificação e limpeza da córnea, sem a necessidade de varrer todo o globo ocular com a pálpebra (Stibb, 1928; Fig. 21B). Essa pode ser uma estratégia para manter, mesmo que parcialmente, a visão durante o piscar já que essa membrana é translúcida. Entretanto, segundo o efeito proposto por Stiles e Crawford (1933), a periferia da pupila é menos sensível à luz do que o centro, o que significa que uma queda significativa na iluminação da retina deve ocorrer quando a pálpebra atinge o centro da pupila. Dessa forma, como a maioria dos eventos registrados ocluíram mais que 50% da pupila, podemos sugerir que a queda na iluminação da retina para esses eventos é similar àquela causada pela oclusão total da pupila. No entanto, é importante ressaltar que o efeito Stiles-crawford ocorre devido ao posicionamento (direcionado para o centro da pupila) e de características morfológicas dos fotorreceptores (Snyder e Pask, 1973; revisado em Westheimer, 2008). Assim, apesar da estrutura geral dos fotorreceptores ser conservada nas diferentes classes de vertebrados (Lamb, 2009), a presença desse efeito para aves ainda deve ser avaliado, principalmente no que se refere ao posicionamento e as características peculiares (Braekevelt, 1993; Braekevelt et al., 1996) dessas células.

Assim como demonstrado em mamíferos, há diferenças na dinâmica do piscar espontâneo, quando comparado ao reflexivo na coruja buraqueira (VanderWerf et al.,

2003). No caso de humanos, tomando como referencia o estudo de VanderWerf e colaboradores (2003), o piscar espontâneo gera um movimento total de 334 ms, e o reflexivo de 304 ms. Segundo os autores, essa diferença ocorre devido a fatores neuronais, no qual o complexo trigeminal (utilizado na via do piscar reflexivo) afeta a área mesencefálica pré-motora onde são encontrados os motoneurônios responsáveis pelo levantamento da pálpebra (Horn et al., 2000; Ndiaye et al., 2002). No caso da coruja, encontramos valores ainda mais discrepantes entre o piscar espontâneo (mediana = 691,7 ms) e o piscar reflexivo (mediana = 404,2 ms), com uma diferença de quase 300 ms. Até que ponto essa grande dissimilaridade pode ser explicada somente por fatores neuronais é uma pergunta que ainda precisa ser respondida.

Finalmente, apesar de realizar uma comparação entre os valores obtidos para mamíferos e os do presente trabalho, é importante salientar que grande parte da diferença encontrada entre os tempos de duração do piscar nesses dois grupos pode ter sido ocasionada por diferentes fatores. Primeiramente, é importante considerar a relação entre a duração do piscar e do movimento da cabeça na coruja (Dias, 2013). Dessa forma, a fixação da cabeça durante a aquisição dos dados pode ter influenciado de alguma maneira no piscar. Um segundo fator que deve ser levado em consideração é a cirurgia para implante da câmara de registro. Como a câmara é posicionada próximo a órbita, a sutura posterior da pele em torno do cilindro pode ter gerado uma pequena tensão sobre a pálpebra o que pode ter contribuído para estereotipar o movimento. O terceiro fator, pode estar relacionado com algum nível de stress imposto pela condição de registro (cabeça fixa), apesar desse fator ter sido minimizado pelo treinamento dos animais antes do início das sessões experimentais. Dessa forma, seria importante conduzir experimentos para verificar até que ponto as hipóteses expostas acima são verdadeiras. É importante salientar neste momento que o trabalho desenvolvido por Dias (2013) mediu a duração das piscadas espontâneas de corujas mantidas em cativeiro e encontrou valores muito próximos (média = 260 ms) ao do obtido em mamíferos. No entanto, nesse estudo foi utilizado uma câmera com baixa taxa de amostragem (25Hz) e os animais foram filmados a distâncias mais longas, o que dificulta uma estimativa precisa da duração do piscar.

5.4.3. Movimentos pupilares e o piscar

Um resultado interessante obtido foi a alteração do tamanho da pupila durante o piscar. Em um primeiro momento, é de se esperar a ocorrência de algum tipo de

modulação no tamanho da pupilar porque a pálpebra gera uma brusca diminuição da intensidade luminosa. Dessa forma, seria esperada uma dilatação da pupila durante a descida da pálpebra e uma miose após a subida, já que a desocclusão da pupila equivaleria a um flash de luz. Em um trabalho realizado em humanos, Hupé e colaboradores (2009) reportaram o estado da pupila durante o piscar. Eles demonstraram que logo após o término da piscada ocorre a miose da pupila, a qual era similar à obtida durante experimentos de reflexo pupilar a luz. Entretanto, não foram encontrados indícios de dilatação durante o fechamento palpebral, o qual foi explicado pelo fato de que a duração do piscar é relativamente curta (menor que 500 ms) não sendo suficiente para evocar a dilatação da pupila. No caso do presente trabalho foi observada uma diminuição da pupila durante o piscar, um efeito contrário ao esperado. Entretanto, simulando uma redução da intensidade luminosa gerada pelo piscar durante 500 ms, encontrou-se uma dilatação perceptível da pupila. Esse resultado sugere que o piscar parece modular o estado da pupila independentemente da variação de intensidade luminosa causada pela pálpebra. É importante lembrar que o controle da pupila envolve tanto vias simpáticas como parassimpáticas. Portanto, qualquer alteração nesses dois sistemas pode afetar o tamanho da pupila. De fato, vários estudos sugerem a utilização da pupila como marcadores de distúrbios como Parkinson (Giza et al., 2011; Hori et al., 2008;), esclerose múltipla (Frauscher et al., 2005; Surakka et al., 2008), desordem do pânico (Kojima et al., 2004), autismo (Fan et al., 2009; Martineau et al., 2011), e até mesmo de variações no estado central como fadiga e sonolência (Bitsios et al., 2006; Caffier et al., 2003). Ainda, a modulação da pupila depende de vários parâmetros de estimulação como intensidade luminosa, contraste, cor e duração do estímulo (Barbur et al., 1992; ; Barbur et al., 2002; Gamlin et al., 1998).

É sabido que tanto a pupila quanto o piscar estão correlacionados como eficientes marcadores no processamento de informações: no caso da pupila, o que parece ocorrer é um aumento em seu diâmetro quando em tarefas que exigem, por exemplo, atenção, memória e raciocínio (Beatty, 1982). No caso do piscar, é sugerido que a frequência na ocorrência desses eventos aumenta logo após o processamento de informações. Por exemplo, o estudo de Siegle e colaboradores (2008) mostrou a relação entre esses dois movimentos durante aumento na carga cognitiva. Utilizando diferentes situações que exigiam demandas cognitivas diferentes, esses autores demonstraram que a frequência do piscar e movimentos pupilares (no caso dilatação) estão correlacionados, isto é, logo após o início da tarefa, ocorre uma dilatação da pupila, a

qual é precedida por um aumento na frequência do piscar. Dessa forma, é plausível que realmente haja uma modulação da pupila pelo ato de piscar. Baseado nas características encontradas no presente estudo (oclusão parcial da pupila), a coruja pode se tornar um modelo experimental interessante para estudos nessa área.

6. Efeito do piscar sobre a atividade dos neurônios do wulst visual

6.1. Introdução

No capítulo anterior avaliamos a dinâmica do movimento palpebral na coruja buraqueira em situação de registro eletrofisiológico. Nesse capítulo será abordada a questão do efeito do piscar sobre a atividade dos neurônios do wulst visual dessa ave. Fenomenologicamente, nós humanos geralmente não temos consciência das interrupções visuais transientes e recorrentes causadas pelo movimento da pálpebra sobre a pupila. Por outro lado, se uma interrupção de mesma duração e intensidade que a provocada pelo piscar, derivada de alguma parte da cena visual for gerada, ela seria rapidamente notada. Como reportado por Moses (1975, citado em Riggs et al., 1981), 30 ms de “apagão” luminoso do ambiente visual já é suficiente para ser percebido. Não é o caso para um piscar espontâneo, mesmo sendo até 6 vezes mais demorado.

Não se sabe, e talvez nunca se saberá (Nagel, 1974), se a coruja vivencia a mesma experiência consciente de continuidade durante um piscar. Não se sabe ainda, se psicofisicamente, as aves demonstram, de algum modo, uma supressão visual (ver Capítulo 1) quando piscam ou efetuam movimentos rápidos dos olhos e/ou da cabeça. Entretanto, ter a capacidade de determinar a origem de um estímulo sensorial, ou mais especificamente, discriminar se um estímulo é gerado (ou alterado) pelo seu próprio comportamento motor ou se, ao contrário, ele provém de agentes externos, parece ser de importância fundamental para a adaptação e sobrevivência do animal. (Crapse e Sommer, 2008). Os mecanismos neuronais subjacentes a essa capacidade são provavelmente múltiplos, conforme ao princípio de redundância característica dos sistemas dinâmicos inteligentes (vide Pfeifer e Bongard, 2007). Um deles, bastante pesquisado em diversos modelos experimentais, baseia-se essencialmente no envio de uma “cópia” do comando motor a ser executado para um ou múltiplos centros de processamento sensorial no intuito de abalizar o estímulo sensorial produzido ou alterado pela efetiva realização do comando motor. Algumas evidências sugerem que em primatas humanos e não-humanos, esse tipo de mecanismo está provavelmente

envolvido com a minimização do efeito deletério das sacadas oculares sobre a resolução da imagem retinal (Sommer e Wurtz, 2002; Sommer e Wurtz, 2006; Wurtz, 2008).

Com relação ao piscar, estudos buscando caracterizar o seu efeito no sistema visual são muito mais parcimoniosos e predominantemente reportam dados obtidos, no homem, pela técnica de ressonância magnética funcional (Berman et al., 2012; Bristow et al., 2005a e 2005b; Hupé et al. 2012; Tse et al., 2010; Tsubota et al., 1999). A diversidade dos desenhos experimentais empregados nesses estudos dificulta a comparação direta dos resultados obtidos. No entanto, pelo menos dois grupos publicaram evidências nitidamente compatíveis com a ideia de um sinal extra-retinal piscar-dependente no córtex visual. Inicialmente, os trabalhos de Bristow e colaboradores (2005a e 2005b) mostraram que o piscar voluntário gera um aumento do sinal dependente de nível de oxigenação sanguínea (em inglês, "BOLD") quando realizado no escuro. Esse aumento está presente em vários níveis da via visual, desde o núcleo geniculado lateral e o córtex visual primário até áreas extra-estriadas (V2 e V3) e motoras (FEF e SEF). Baseado nesses resultados foi especulado que esse aumento pode representar um sinal motor associado ao piscar e ligado a uma via de descargas corolárias. Como esses achados são similares ao que ocorrem durante o movimento sacádico (Lee e Malpeli, 1998; Leopold e Logothetis, 1998; Sylvester et al., 2005), a hipótese de uma via de disparos corolários atuando também durante o piscar se torna plausível. Por outro lado, estudos recentes realizados em macacos *rhesus* (Guipponi et al., 2014) e humanos (Hupé et al., 2012; Tse et al., 2010) mostraram a ocorrência de um aumento da atividade de V1 e V2/V3 frente ao piscar espontâneo durante estimulação visual estática, mas sem nenhuma ativação de áreas motoras (FEF e SEF), sugerindo que o tipo de piscar gera modulações diferentes na atividade neuronal e que a ocorrência de um sinal corolário encaminhado especificamente por essas áreas motoras é improvável.

Para explorar essa hipótese e tentar fornecer novas evidências referentes ao efeito do piscar sobre a atividade neuronal, foram obtidas amostras de respostas neuronais extracelulares no wulst da coruja buraqueira frente a várias condições de estimulação e durante dois tipos de piscadas (reflexiva e espontânea). Nesse sentido, podemos citar ao menos três motivos que tornam interessante a utilização da coruja como modelo animal: (i) estudos apontam que seu wulst visual pode ser considerado funcionalmente análogo ao córtex visual primário de mamíferos (Baron et al., 2007;

Nieder e Wagner, 1999; Pettigrew 1979; Pettigrew e Konishi 1976; Pinto e Baron, 2009, 2010; Wagner e Frost, 1993); (ii) foi demonstrada a presença de uma via de disparos corolários na mesma área em pombos, a qual atua durante os movimentos sacádicos (Yang et al., 2008); (iii) parece existir uma associação entre sacadas e o piscar, de modo que, quando um ocorre, há uma grande probabilidade do outro também ser desencadeado (Dias et al., 2013; Evinger et al., 1984; Riggs et al., 1987).

6.2. Metodologia

6.2.1. Registro do piscar durante os protocolos de estimulação visual

A detecção dos movimentos palpebrais foi realizada através de vídeos capturados pelo sistema de aquisição de imagem (pupilômetro). Os vídeos foram obtidos com uma taxa de amostragem de 120 Hz e uma resolução de 360 x 240. Rapidamente, após o animal ser posicionado na cabine de registro, o tubo de ar do dispositivo responsável por estimular as piscadas foi direcionado à região da córnea direita do animal, iniciando-se em seguida a sessão experimental. Cada ensaio registrado era iniciado por um pulso TTL sincronizador, iniciando simultaneamente o registro da atividade neuronal bem como a aquisição de imagens do olho direito do animal (pupilômetro). Esse pulso foi comandado pelo programa de estimulação (ActiveSTIM) e gerado por uma placa NI PCI-6503 da National Instruments situada no computador de estimulação visual. A liberação do ar comprimido era também controlada por um pulso TTL gerado pelo mesmo sistema. Os tempos de ocorrência deste segundo TTL foram pré-programados em fase com a taxa de atualização vertical do monitor de estimulação visual. O potenciômetro do soprador de ar foi regulado para permitir a saída de ar durante 20 ms por pulso recebido. O olho esquerdo foi constantemente monitorado pelo experimentador via mini-câmera durante toda a sessão experimental.

6.2.2. Estímulos visuais e protocolos experimentais

Durante os experimentos, as respostas de cada célula isolada foram inicialmente avaliadas escutando os disparos de potências de ação por meio de um auto-falante e monitorando visualmente o sinal na tela do computador de aquisição (*PC-Alba*, ver fig. 1 no Capítulo 3). O mapeamento da localização e tamanho dos campos receptores foi realizado utilizando-se o método de campo de resposta mínima (*minimum response field*, Barlow et al., 1967), definido como a área do campo visual onde estímulos

(manuais ou controlado por computador) como pontos e barras luminosas de varias orientações, evocavam disparos neuronais em uma taxa que excedia aquela da atividade espontânea da célula. O procedimento de mapeamento foi realizado separadamente para os olhos ipsilateral e contralateral, permitindo a determinação da dominância ocular do campo receptor. Todas as células encontradas foram binoculares e puderam ser estimuladas por estímulos monoculares apresentados a qualquer um dos olhos. Dessa forma, as medidas dos campos receptores foram realizadas para os dois olhos, mas com a estimulação visual sendo realizada de forma monocular somente para aquele que estava sendo monitorado pelo pupilômetro (olho direito), com o centro do campo receptor aproximadamente no centro da tela do monitor. Dessa forma, durante a execução dos protocolos experimentais o olho esquerdo permaneceu ocluído por um dispositivo no qual a mini-câmera foi acoplada, permitindo seu constante monitoramento.

Antes da realização dos paradigmas experimentais foram avaliados, usando grades senoidais, as preferências de orientação, direção do movimento, frequências espaço-temporais e tamanho do estímulo que evocavam a maior taxa de disparo da célula. Caso fosse isolada mais de uma célula por eletrodo, e essas apresentassem preferências ligeiramente diferentes aos atributos acima citados, os parâmetros eram ajustados de modo a obter uma resposta evocada significativa, entretanto em alguns casos não máxima, de todas as células captadas pelo eletrodo (máximo de 3 unidades por canal). Caso as preferências aos atributos não fossem compatíveis, os parâmetros eram ajustados para cada célula individualmente. Só então procedeu-se a gravação e estimulação com os protocolos apropriados.

Para a avaliação quantitativa do efeito do piscar sobre a atividade neuronal, foram utilizadas oito condições diferentes (Paradigma 1), as quais podem ser apreciadas na figura 29A.

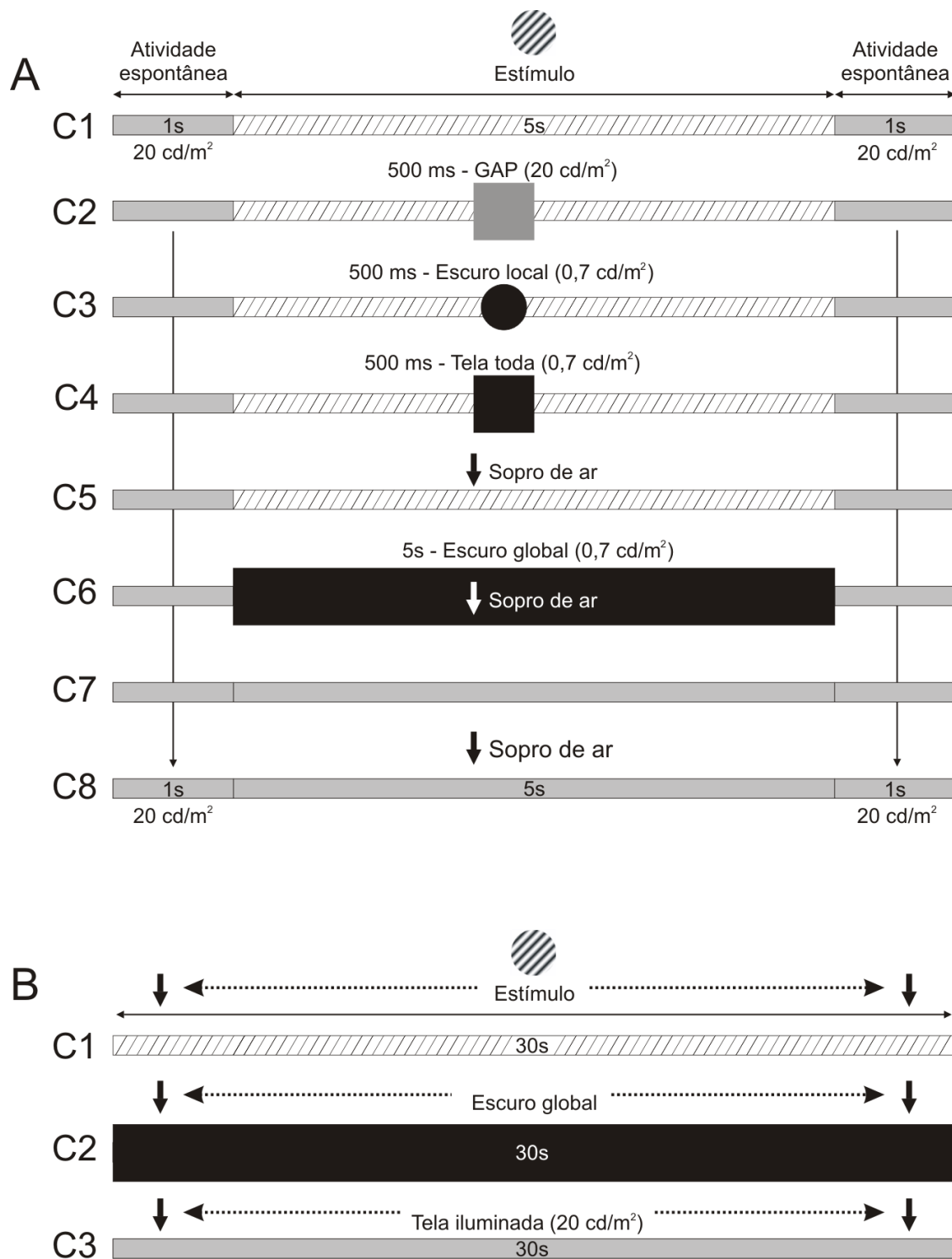


Figura 29: Condições experimentais utilizadas para o estudo dos efeitos causados pelo piscar e por mudanças transitentes de luminância na resposta dos neurônios do wulst. No paradigma 1 (A), foi registrada inicialmente a atividade espontânea (1s), seguida da apresentação do estímulo (5s) e de um inter-estímulo (500 ms). Ao final foi registrada novamente a atividade espontânea (1s). No paradigma 2 (B) os estímulos foram apresentados por 10 minutos (20 repetições de 30 s). Durante essas condições foi disparado um único sopro de ar aleatório durante a apresentação do estímulo.

Os estímulos (grades senoidais), otimizados para todos os atributos citados acima e com contraste máximo, foram apresentados em um fundo cinza com a mesma luminância média da grade senoidal (20 cd/m^2) da seguinte forma: primeiramente foram gravados 1s de atividade espontânea, com posterior apresentação do estímulo durante 5s (Fig. 29A, C1). Em determinadas condições, o estímulo desaparecia (Fig. 29A, C2) ou era substituído por um escurecimento local (Fig. 29A, C3 – somente no campo receptivo) ou de toda a tela do monitor (Fig. 29A, C4 – simulação de uma piscada) por 500 ms, com posterior reaparecimento do estímulo. As outras condições foram destinadas à avaliação do efeito do piscar sobre a atividade celular, tanto durante a estimulação visual (Fig. 29A, C5) quanto na atividade espontânea (Fig. 29A, C6 a C8). Nesse protocolo, o piscar reflexivo foi evocado com um sopro de ar (ver metodologia geral) disparado apenas uma vez (duração = 20ms), e foram utilizadas entre 10 e 15 repetições de cada condição, apresentadas de forma pseudo-aleatória. Como o animal estava livre para piscar, foram registradas ainda piscadas espontâneas aleatórias durante a execução do protocolo. Uma segunda série de protocolos (Paradigma 2, Fig. 29B), destinado à obtenção de um maior número de piscadas espontâneas e evocadas, foi criada com as seguintes condições: grade senoidal (Fig. 29B, C1), luminância homogênea de 20 cd/m^2 (Fig. 29B, C2; mesmo que C7 da Fig. 29A) e um escurecimento global (Fig. 29B, C3; monitor desligado). Cada uma das três condições foi apresentada com um tempo de duração de dez minutos. A fim de se evitar perda de quadros do vídeo capturado pelo pupilômetro (taxa de amostragem = 120Hz), esses dez minutos foram divididos em 20 repetições de 30 segundos. Para cada uma das 20 repetições foi disparado, aleatoriamente (duração = 20ms) e uma única vez, um sopro de ar, o qual gerava um piscar reflexivo em cada repetição. Ainda, para esse protocolo, não houve aleatoriedade nas repetições das três condições, isto é, todas as repetições associadas à determinada condição foram apresentadas continuamente com intervalo de 8 segundos entre elas. Esse intervalo foi necessário para o armazenamento dos vídeos pelo pupilômetro no disco rígido do computador. Novamente, a sincronização entre o sistema de registro da atividade extracelular e o pupilômetro foi realizado através de sinal TTL disparados pelo computador de estimulação (*PC Tyto-2*, ver fig. 1 no Capítulo 3) visual durante a apresentação dos protocolos experimentais.

6.2.3. Análise dos dados

6.2.3.1. Separação dos potenciais de ação (*spike sorting*)

Os registros dos potenciais de ação dos neurônios isolados foram submetidos a um procedimento conhecido como *spike sorting* (para revisão ver Lewicki, 1998), usado para separar os potenciais de ação de células individuais com base nas diferenças das formas de onda adquiridas. Formas de onda provenientes de uma mesma célula tendem a ser semelhantes e por isso tendem a ocupar posições próximas em um espaço paramétrico, formando aglomerados bem definidos. Essas semelhanças são definidas quanto às características das formas de onda, como a amplitude do pico, vale e largura, as quais são extraídas após redução dimensional. Neste trabalho, foi utilizado o programa desenvolvido por Nan-Hui Chen, ex-integrante da equipe de trabalho de Sérgio Neuenschwander no Instituto Max-Planck. Esse programa utiliza o algoritmo de *dynamic template matching*. Tal algoritmo gera modelos de ondas baseado em vários parâmetros, e associa cada potencial de ação a um modelo, que é dinamicamente computado por uma rede neural artificial baseada na Teoria da Ressonância Adaptativa (Carpenter e Grossberg, 1987). A separação dos potenciais de ação foi realizada de forma semi-automática. Primeiramente, foi permitido ao programa encontrar automaticamente as unidades e em seguida, passou-se ao modo manual, onde o experimentador pôde agrupar ou não as classes de potenciais de ação encontrado pelo algoritmo. Para garantir a qualidade da separação, foram utilizados alguns indicadores disponibilizados no programa, dentre os quais podemos citar: um bom agrupamento de escores da análise de componente principal; a não violação de um período refratário absoluto estipulado em 2 ms, segundo verificado no histograma de intervalo inter-disparo; e a estabilidade da amplitude e largura do potencial de ação no decorrer do tempo. Somente os agrupamentos de potenciais de ação que passaram pelos critérios de boa qualidade de separação foram utilizados nas análises posteriores.

6.2.3.2. Pré-análise

Após o procedimento de separação dos potenciais de ação, a resposta de cada unidade isolada foi convertida em histogramas de tempo peri-estímulo (PSTHs) com um bin de 20 ms. Após a remoção da atividade espontânea, foi aplicada em cada histograma a transformada de Fourier para a estimativa da resposta na componente DC (f_0) e na frequência fundamental do estímulo (f_1) ao longo de todo o período de apresentação do estímulo. Células com um índice de modulação (f_1/f_0) maior que 1, para a condição de

estímulo ideal, foram classificadas como simples. As células com índice de modulação menor que 1 foram classificadas como complexas (De Valois et al., 1982; Skottun et al., 1991).

Para garantir a confiabilidade da descrição dos efeitos do piscar nos neurônios do wulst durante estimulação visual, foram descartadas células cuja resposta evocada na primeira condição do paradigma 1 (C1, Fig. 29A) não foi significativamente maior que a atividade espontânea. Mais especificamente, essa avaliação foi realizada através da comparação, para essa condição em particular, da taxa de disparo nos 1000 ms imediatamente anteriores e posteriores ao início do estímulo utilizando o teste pareado de Wilcoxon signed-rank ($p < 0,05$).

6.2.3.3. Análise geral do efeito do piscar

As análises de dados foram realizadas por meio um conjunto integrado de programas computacionais implementados em LabView (National Instruments, EUA) e Matlab (MathWorks, USA). Alguns algoritmos de livre acesso implementados em Matlab também foram utilizados. Esses programas fazem parte do pacote de processamento de sinal, chamado Chronux (disponível em <http://chronux.org>), o qual é um conjunto de rotinas desenhadas para análise de dados discretos e contínuos. Esse pacote foi utilizado para gerar as funções de densidade de disparos (largura de banda fixa = 150ms) apresentadas nas figuras, bem como recortar os trechos de interesse das trilhas de potenciais de ação utilizados nas análises.

Para a análise do efeito do piscar e das interrupções transientes de luminância foi calculada a média da atividade neuronal nas trilhas de potenciais de ação em um determinado período. Tendo como base análises pilotos e a dinâmica do movimento palpebral, o período escolhido para isso foi de 120 ms antes (utilizado como “controle” do nível de resposta sustentada frente a estimulação) e 120 ms depois do início do evento. É importante ressaltar que o cálculo da atividade nesse período só foi iniciado após 70 ms do início do piscar e 200 ms do início das interrupções artificiais. Esse procedimento minimiza a probabilidade de se calcular a atividade em um momento em que a modulação neuronal pelas interrupções ainda não tenha acontecido.

Apesar da utilização do sopro de ar para evocar as piscadas, essas não ocorriam precisamente no mesmo tempo. Além disso, as piscadas espontâneas ocorreram aleatoriamente. Devido a isso para gerar os gráficos de densidade de disparos e raster, os trechos das trilhas de potenciais de ação contendo as piscadas foram cortados em

períodos de 2 segundos, com o início do piscar centrado nesse período. Assim, todos os eventos ocorridos foram alinhados e as análises realizadas. Só foram consideradas na análise as piscadas realizadas no período que se segue após 2s do início de uma repetição de uma dada condição e 2s antes do seu término. É interessante salientar que a contagem de disparos realizada nos períodos estipulados acima foi realizada para cada piscada ou interrupção individualmente. Dessa forma, as análises foram divididas em duas amostras, uma contendo o nível de resposta evocada sustentada (120 ms antes do piscar) e outra contendo a atividade durante o piscar (120 ms depois do piscar), para cada célula e cada condição. Esse procedimento permitiu a análise estatística célula a célula.

Outra análise realizada foi o procedimento de *shuffling* da atividade do neurônio (Rivlin-Etzion et al., 2006). Sobre estimulação, a atividade das células visuais tende a aumentar, mas seu disparo não é constante no tempo, o que pode gerar a presença de flutuações temporais na resposta. Essas flutuações podem ocorrer frente a propriedades intrínsecas da célula (por exemplo, a célula do tipo simples) ou por características relacionadas ao estímulo utilizado. Dessa forma, esse procedimento tem o intuito de minimizar uma possível confusão entre as flutuações na resposta neuronal causada pela estimulação e o que é atribuído, de fato, às modulações geradas pelo piscar e pelas interrupções artificiais. Para a realização do *shuffling* procede-se da seguinte forma: primeiramente, foram calculadas as diferenças no tempo (ISI) entre disparos adjacentes em uma trilha de potenciais de ação obtida com uma repetição de uma determinada condição. Após, realizou-se uma permutação aleatória dessas diferenças e uma nova trilha de disparos foi gerada baseada no novo ISI. Essa operação de permutação aleatória foi realizada n vezes para a repetição em questão. Após, foi gerado um histograma de tempo peri-estímulo (PSTH) sobre as n trilhas de potenciais de ação. Esse mesmo processo foi realizado para cada uma das 15 repetições associadas a uma condição. Ao final, realizou-se uma nova promediação sobre todos os PSTH ($n = 15$) e, a partir do resultado, calculou-se o valor médio e o desvio padrão (DP) da atividade. A partir desses valores foi gerado um limiar ($média \pm 2 * DP$), o qual foi utilizado como uma referência de que uma determinada mudança na atividade neuronal foi provavelmente causada pelo piscar. O processo de *shuffling* foi calculado para cada célula e cada uma das condições associadas a ela.

6.3. Resultados

6.3.1. Informações preliminares

As respostas de 71 neurônios foram inicialmente selecionadas, porém 13 desses neurônios foram desconsiderados depois da utilização do critério de exclusão (ver Material e Métodos). Portanto, os resultados apresentados neste estudo são baseados em dados obtidos a partir de 58 neurônios individuais, amostrados em um total de 36 sítios de registro no wulst visual de quatro corujas-buraqueiras.

As células foram classificadas de acordo com seu nível de modulação de resposta (simples ou complexa), permitindo investigar possíveis diferenças nos efeitos do piscar sobre a atividade dessas categorias celulares. Dentre o total de células, 86% (50/58) foram classificadas como complexas com base no índice de modulação ($f1/f0$), enquanto que uma minoria (14% - 8/58) foram classificadas como simples. Essa porcentagem de classes encontradas foi semelhante ao reportado em estudos anteriores (Baron et al., 2007; Pinto e Baron, 2009, Vieira e Baron, 2014 – *em preparação*).

6.3.2. Efeito do piscar sobre a resposta neuronal durante a estimulação visual com a grade senoidal

Para essa análise foram utilizadas as 50 células classificadas como complexas. Essa ação se justifica pelo fato de que as células simples sofrem variações em sua atividade dependendo da fase do estímulo. Isso ocorre porque as células simples possuem partes excitatórias e inibitórias bem definidas em seu campo receptivo. Dessa forma, conforme as barras que formam a grade senoidal se movimentam pelas regiões do campo receptivo dessa classe de célula, é provocada uma excitação ou uma supressão na sua atividade. Assim, não é possível distinguir precisamente se o efeito do piscar sobre a atividade das células simples é causado pelo ato de piscar propriamente dito ou pela modulação gerada pelo estímulo. Nessa análise foram utilizadas as respostas neuronais obtidas através da utilização do paradigma 1 (Fig. 29A).

Das 50 células complexas isoladas, 75% (37/50) apresentaram uma diminuição de sua atividade durante o piscar. Entretanto, somente 45% (17/37) das células desse subgrupo apresentaram uma diminuição significativa da resposta ($p < 0,03$; Wilcoxon Signed-Rank) quando comparada à atividade sustentada estimada antes do piscar, apresentando uma porcentagem de diminuição de aproximadamente 70% [64,5 – 86,5]. Exemplos representativos dessas células são mostrados na figura 30A e B. O restante do

subgrupo (55% - 20/37) também apresentou uma redução na atividade (37% [24,1 – 54,9]), entretanto, sem significância estatística (Fig. 30C).

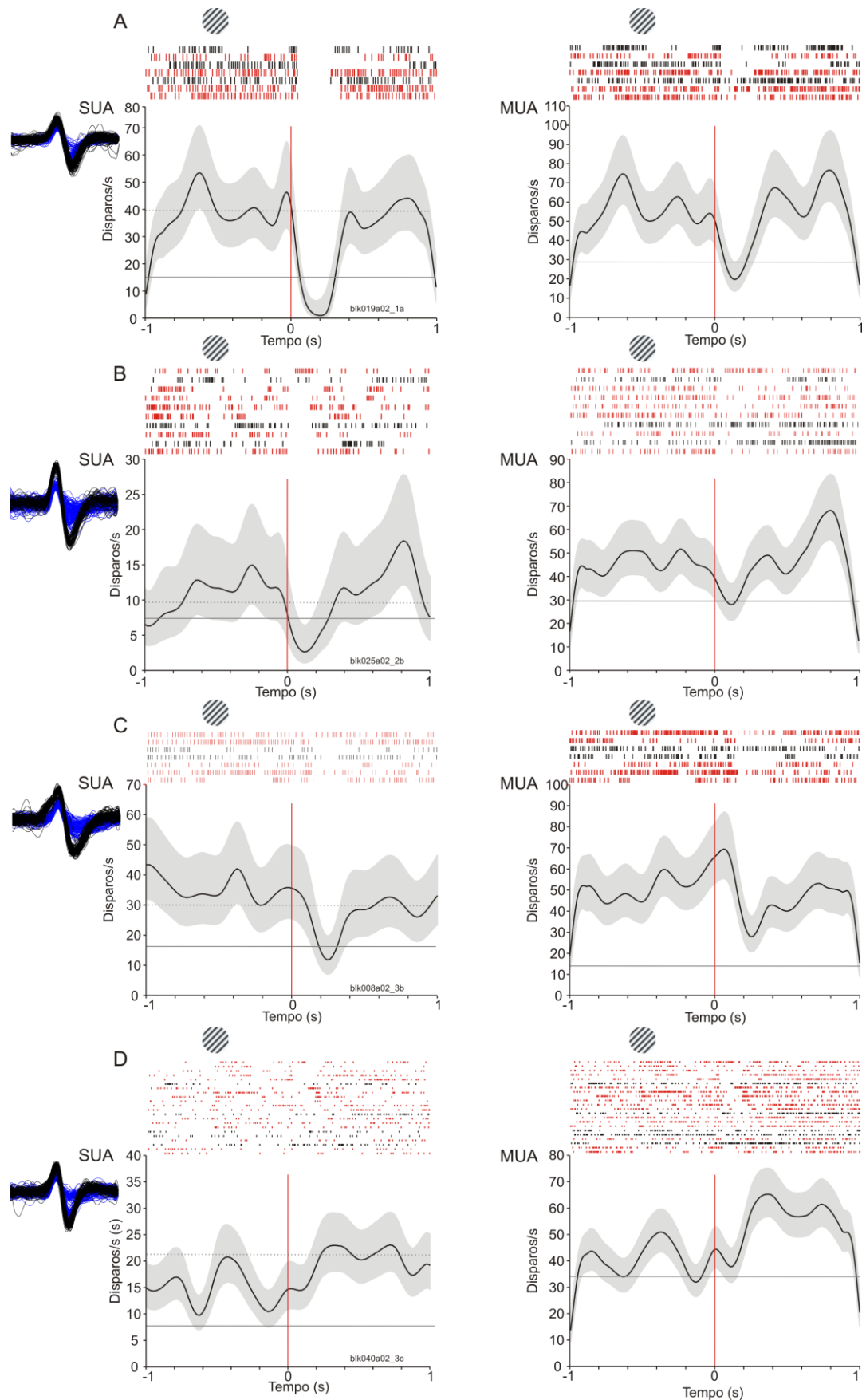


Figura 30: Exemplos representativos do efeito do piscar sobre a atividade neuronal durante estimulação visual com uma grade senoidal. (A – B) Os histogramas de densidade de disparos e gráficos do tipo raster mostram duas células isoladas (SUA) em que o piscar causou uma redução significativa da atividade. (C – D) Algumas células isoladas apresentaram ainda uma redução da atividade, entretanto, sem significância estatística. Cada gráfico da célula isolada é acompanhado do efeito gerado também na atividade multiunitária (MUA – atividade geral captada pelo eletrodo), representada nos gráficos do lado direito. Ao lado esquerdo é mostrado em preto e azul os formatos dos potenciais de ação de cada célula isolada e da MUA, respectivamente. As sombras cinza que acompanha as linhas pretas nos gráficos indicam o intervalo de confiança (95%) do cálculo dos histogramas de densidade de disparos. A linha vertical vermelha e as horizontais cinzas indicam o início do piscar, a atividade espontânea da célula (linha sólida) e o limiar calculado pelo método de *shuffling* (média-2*DP; linha pontilhada), respectivamente. As cores vermelha e preta nas trilhas do raster se referem ao piscar reflexivo e o espontâneo, respectivamente.

É importante ressaltar que, apesar do nível de significância não ter sido atingido, a diminuição da atividade foi abaixo do nível definido pelo método de *shuffling* (média – 2*DP; calculado sobre 1000 repetições). Para o restante da amostra (26% - 13/50) não foram encontrados modulações significativas na atividade para a maioria das células (Fig 30D; $p > 0,05$), sendo que para 4 unidades foi observado um aumento na resposta, o qual foi maior do que o limiar estabelecido pelo *shuffling* (média+2*DP). Entretanto, somente uma dessas células apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p = 0,03$; Wilcoxon Signed-Rank). Na figura 30 (lado direito) são mostradas as modulações causadas pelo piscar em toda a atividade celular registrada pelo eletródio (atividade multiunitária – MUA). Como observado, as modulações tendem a acompanhar o efeito observado nas células isoladas (atividade unitária – SUA). Realizando uma comparação entre o nível de diminuição da atividade celular das células isoladas (SUA) e da atividade nos canais (MUA), observa-se que a SUA apresenta uma diminuição significativamente maior (50% [10 – 65]) do que a MUA (15,1% [25 – 37]; $p < 0,001$; Wilcoxon Signed-Rank). Esse resultado sugere que o piscar modifica a atividade das células próximas de forma ligeiramente diferente.

A tendência central da diminuição de resposta causado pelo piscar para a população de células pode ser apreciada na figura 31A. Observa-se que o piscar causa uma redução significativa ($p < 0,001$; Wilcoxon Signed-Rank) da atividade neuronal (8,1 disparos/s [3,4 – 11,6]) quando comparado à atividade sustentada (15,4 disparos/s [6,7 – 24,3]). Um ponto importante a ser observado, é a relação entre a modulação da resposta neuronal pelo piscar e a porcentagem de oclusão da pupila. Como mostrado no capítulo

anterior, a coruja não ocluiu toda a pupila em muitos eventos e essa característica pode ter influência no nível de diminuição da resposta, de modo que, quanto maior a oclusão, maior é a diminuição da atividade neuronal. Para responder essa questão, foi correlacionada a porcentagem de supressão causada pelo piscar com a porcentagem de oclusão da pupila para todas as células (Fig. 31B). Não foi encontrada correlação entre essas duas variáveis (ρ : -0,05; $p = 0,88$; correlação de Spearman), indicando que a diminuição observada na resposta independe do nível de oclusão. Esse resultado também sugere que, apesar de não ter realizado um mapeamento da posição do campo receptivo do neurônio em relação à pupila, a oclusão parcial da mesma pela pálpebra parece ter sido suficiente para bloquear a estimulação neuronal.

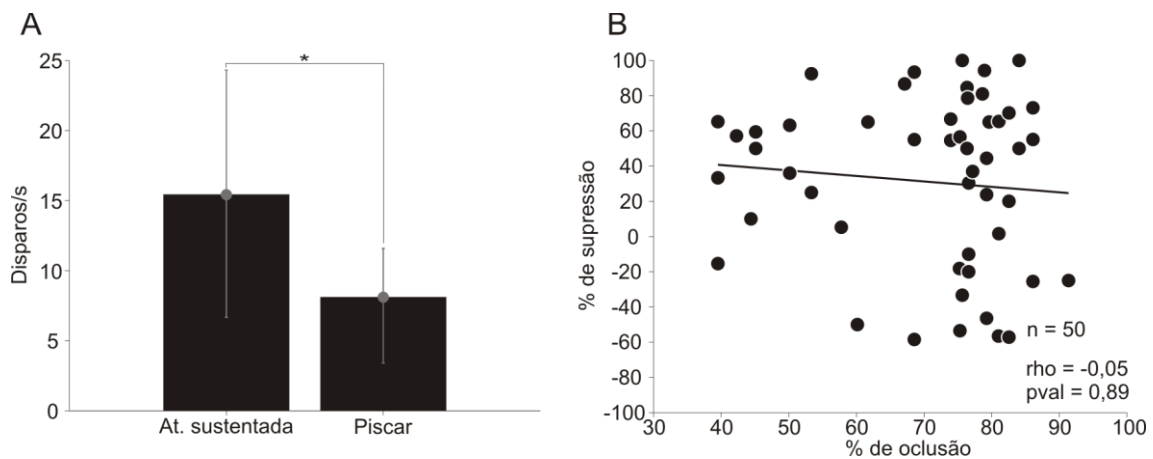


Figura 31: Efeito do piscar sobre a população de células. (A) Comparação entre a atividade obtida 120 ms antes (atividade sustentada) e 120 ms após o início da piscada de todas as células analisadas. (B) Correlação entre a porcentagem de supressão gerada pelo piscar e a porcentagem de oclusão da pupila para cada célula. Os valores negativos de supressão indicam que o efeito do piscar sobre a atividade neuronal resultou em um aumento da atividade e não uma diminuição. Não foi encontrada uma correlação significativa entre essas duas variáveis. * = $p < 0,01$.

Para fornecer indícios de que o nível de atividade sustentada calculada em 120 ms antes do piscar reflete o nível médio da atividade evocada pelo estímulo, foi realizada uma comparação entre o número médio de disparos obtidos nesse período com o calculado pelo processo de *shuffling* para todas as células avaliadas. Como pode ser observado no gráfico de Bland-Altman da figura 32A, os valores obtidos 120 ms antes do piscar são praticamente iguais aos gerados pelo processo de *shuffling* (a diferença entre as duas medidas fica distribuída em torno de zero – linha sólida),

indicando que as duas medidas são equivalentes. Além disso, aproximadamente 96% (48/50) dos pontos estão distribuídos dentro de um intervalo de confiança de 95% (linha pontilhada no gráfico). Estatisticamente, as duas medidas não apresentaram diferença (atividade sustentada = 15,2 disparos/s [6,1 – 24,3]; *shuffling* = 15,0 disparos/s [9,2 – 23,8]; $p = 0,70$; Wilcoxon Signed-Rank). A título de comparação, também foram obtidos controles 400 ms após o início da estimulação sustentada. Realizando novamente a comparação (Fig. 32B), fica claro que a retirada do controle do início da estimulação gera valores maiores (25,3 [14,4 – 42,7]), e estatisticamente significativos ($p < 0,001$; Wilcoxon Signed-Rank), do que o outro método. Portanto, a utilização da atividade antes do piscar como controle parece ser a mais correta, apesar do estudo apresentado por Gawne e Martin (2000) ter utilizado o início da estimulação para comparação.

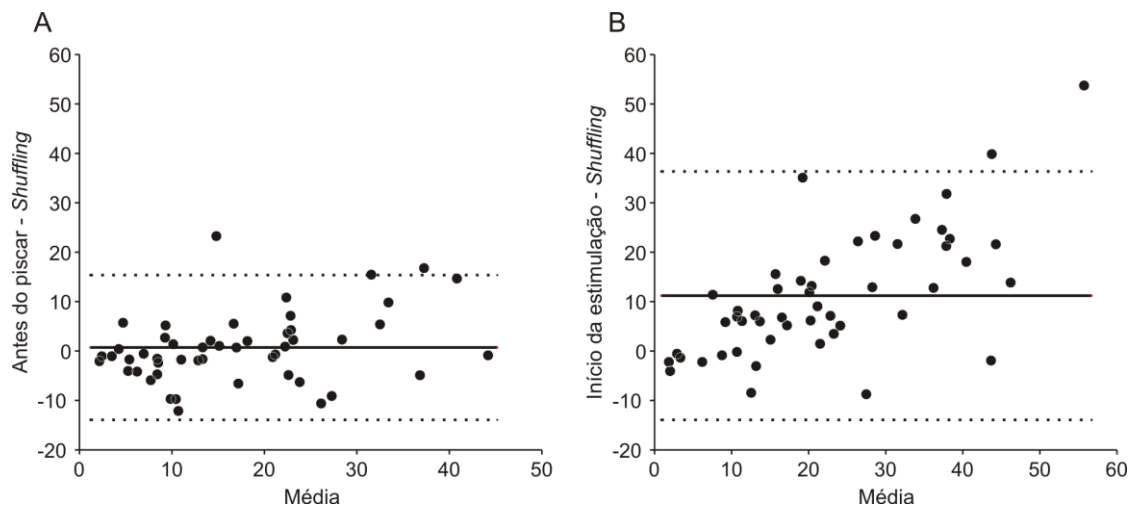


Figura 32: Gráficos de Bland-Altman dos controles obtidos antes do piscar (A) e 400 ms após o início da estimulação com a grade senoidal (B). A linha sólida e as linhas pontilhadas em ambos os gráficos indicam a média da diferença entre valores e os limites do intervalo de confiança de 95%, respectivamente.

6.3.3. Efeito do piscar versus interrupções transientes

Através dos resultados expostos acima, não é possível afirmar se a diminuição da atividade neuronal causada pelo piscar está associada à diminuição da intensidade luminosa gerada pela oclusão da pupila pela pálpebra. Para esclarecer essa dúvida, comparamos o efeito gerado pelo piscar com o gerado pelo escurecimento global da tela do monitor de estimulação por um breve período (500 ms) durante a estimulação visual com a grade senoidal (C4 na Fig. 29A).

O escurecimento global acarreta em uma redução da atividade em 80% (44/50) das células registradas, sendo que dessas, 68% (30/44) apresentaram significância estatística ($p < 0,05$; Wilcoxon Signed-Rank). Todo o subgrupo (44/50) apresentou diminuição abaixo do nível estabelecido pelo *shuffling* (média-2*DP). O restante da amostra não apresentou modulação significativa ($p > 0,05$; Wilcoxon Signed-Rank). Para obter uma comparação direta entre a redução na atividade gerada pelo piscar e pelo escurecimento global, foi gerado um gráfico de dispersão (Fig. 33A) onde cada ponto representa um par de valores médios de disparos de potenciais de ação, um proveniente do piscar e outro do escurecimento global.

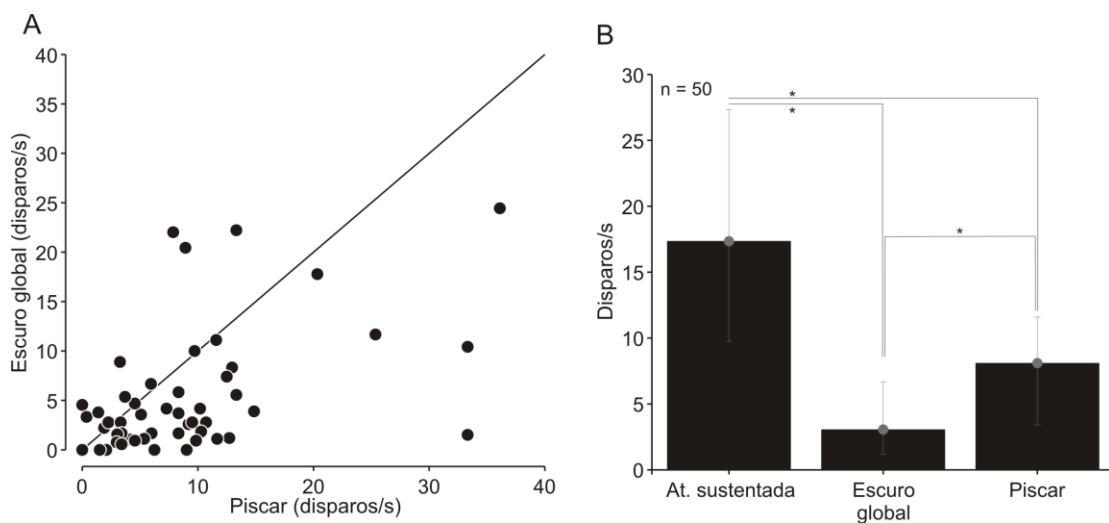


Figura 33: Comparação entre o efeito do piscar e o efeito gerado pelo escurecimento global (mimetizando o piscar). (A) Cada ponto no gráfico representa um par de valores, um derivado da atividade neuronal durante o escurecimento da tela e outro durante o piscar. Um ponto abaixo da linha que divide o gráfico de dispersão indica que o escurecimento da tela gera uma redução maior na atividade neuronal que o piscar. Como pode ser visto, foi o que ocorreu para a maioria das células. (B) Comparação da atividade mediana obtida no controle, durante o escurecimento da tela e durante o piscar para toda a amostra. Apesar de ambos gerarem diminuições da atividade neuronal em relação ao controle, o escurecimento da tela gera uma redução mais intensa que o piscar. * = $p < 0,05$.

Como pode ser observado na figura 33A, para a maioria das células (38/50), escurecer a tela causa uma redução maior na atividade neuronal do que o piscar. Entretanto, comparando célula a célula, essa diferença é significativa somente para 32% da amostra (16/50), sendo uma célula com atividade menor para o piscar e o restante para o escurecimento da tela. Considerando a tendência central da população (Fig 33B), o escurecimento gera uma diminuição significativamente maior ($p < 0,001$; Wilcoxon

Signed-Rank) do que o piscar, apresentando valores de 3,0 disparos/s [1,2 – 6,7] e 8,1 disparos/s [3,4 – 11,6], respectivamente.

Ainda, foram comparados outros dois tipos de interrupção. O primeiro, chamado de “GAP” (C2 na Fig. 29A), é simplesmente a retirada e o reaparecimento do estímulo por 500 ms. A segunda (C3 na Fig. 29A), chamada de escurecimento local é a substituição da grade senoidal por um círculo escuro (0,7 cd/m²) do mesmo tamanho da grade, por 500 ms. Essa condição tem o intuito de simular a diminuição de luminosidade causada pelo piscar somente dentro do campo receptivo do neurônio. A interrupção causada pelo GAP e pelo escurecimento local, como esperado, também acarretam em uma diminuição na resposta para a maioria dos neurônios (GAP – 40/50 células; escurecimento local – 37/50 células). As figuras 34 A e B deixam claro que o GAP diminui a atividade neuronal para níveis mais baixos que o piscar para a maioria das células (30/50), enquanto que o escurecimento local apresentou maior nível de diminuição somente para metade da amostra, quando comparado ao piscar.

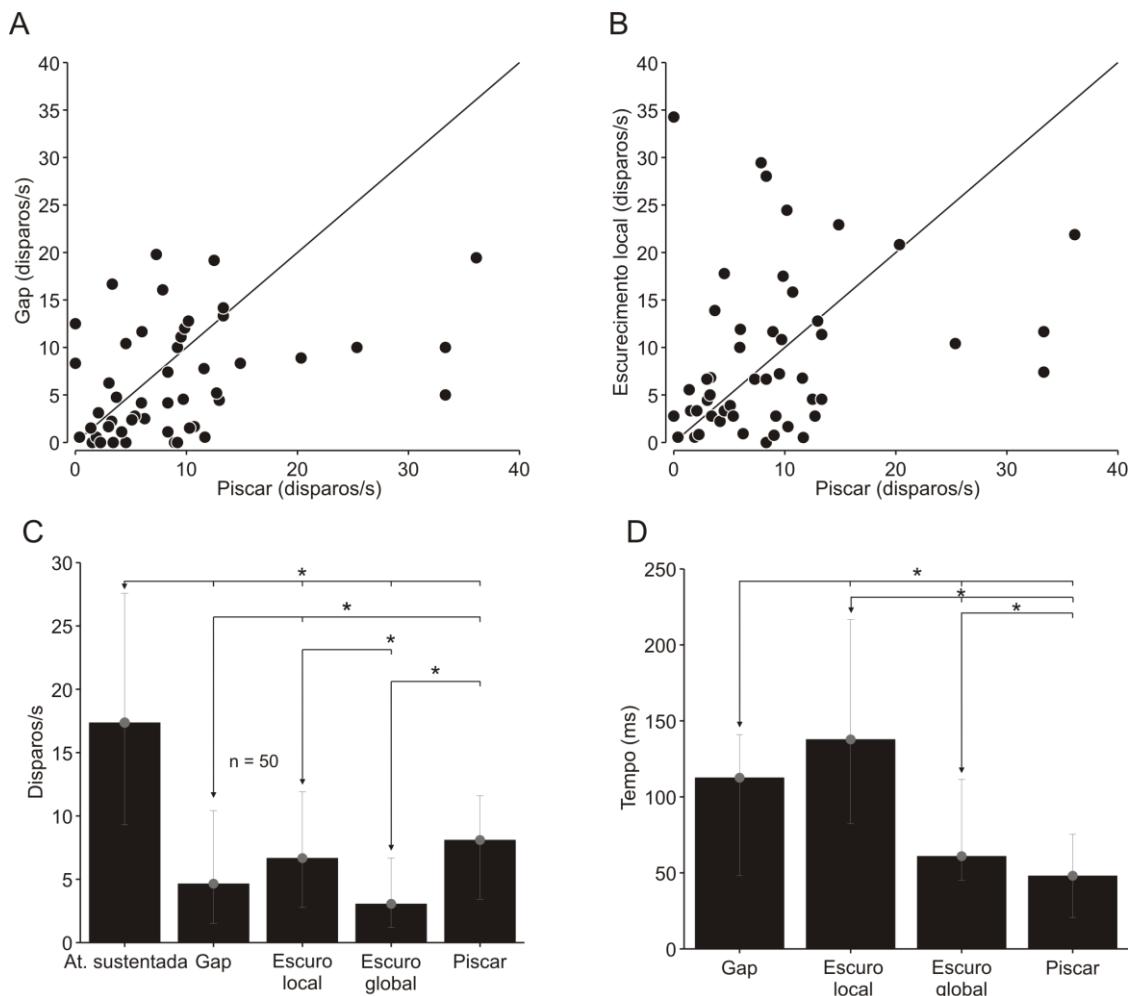


Figura 34: Comparação do efeito do piscar com outros dois tipos de interrupções realizadas: retirada do estímulo (A) e substituição do estímulo por um círculo preto de

mesmo tamanho (B). Novamente, cada ponto nos gráficos representa um par de valores, um derivado da atividade neuronal durante as interrupções e outro durante o piscar. (C) Comparação da atividade mediana obtida no controle, durante as interrupções e durante o piscar. Todas as interrupções geram diminuição na atividade, entretanto, em diferentes níveis. (D) Tempo necessário para que a atividade sustentada seja reduzida em 50% para cada uma das interrupções. * = $p < 0,05$.

Fazendo-se uma comparação entre o nível médio de atividade em cada tipo de interrupção para toda a amostra de células (Fig. 34C), observamos que o piscar é o que menos causa diminuição na atividade neuronal quando comparado ao GAP ($p = 0,02$) e ao escurecimento total da tela ($p < 0,001$; teste de Friedman; post-hoc: Wilcoxon Signed-Rank). No entanto, apesar do escurecimento local apresentar também uma maior diminuição, ela não é significativa quando comparado ao piscar ($p = 0,7$; Wilcoxon Signed-Rank).

Apesar de todas as interrupções gerarem uma redução similar na resposta, a dinâmica dessa diminuição é diferente para cada uma delas. Para mostrar essa questão, foi comparado o tempo necessário para que a atividade sustentada fosse reduzida a 50% por cada uma das interrupções (Fig 34D). Observamos que o piscar apresenta um tempo menor para atingir metade da resposta sustentada (48,1 [20,5 – 75,4]), quando comparado ao GAP (112,6 ms [48,2 – 140,9]), ao escurecimento local (137,8 ms [82,4 – 216,6]) e ao escurecimento global (61,0 ms [45,1 – 111,50]). Todos os valores encontrados apresentam diferença estatística significativa ($p < 0,01$; Kruskal-Wallis; post-hoc: Wilcoxon Rank-Sum) e são semelhantes ao que foi encontrado em primatas (Gawne e Martin, 2000). Uma melhor apreciação das diferenças entre interrupções pode ser observada na figura 35, onde são apresentados os histogramas de densidade de disparos de duas células representativas. A atividade multiunitária, assim como mostrado acima, também parece acompanhar as modulações apresentadas pela atividade do neurônio isolado (Fig. 35 – lado esquerdo). Entretanto, diferentemente do que foi mostrado para o piscar, a MUA apresenta o mesmo nível de redução na atividade frente as interrupções quando comparado à SUA ($p > 0,05$; Wilcoxon Signed-Rank).

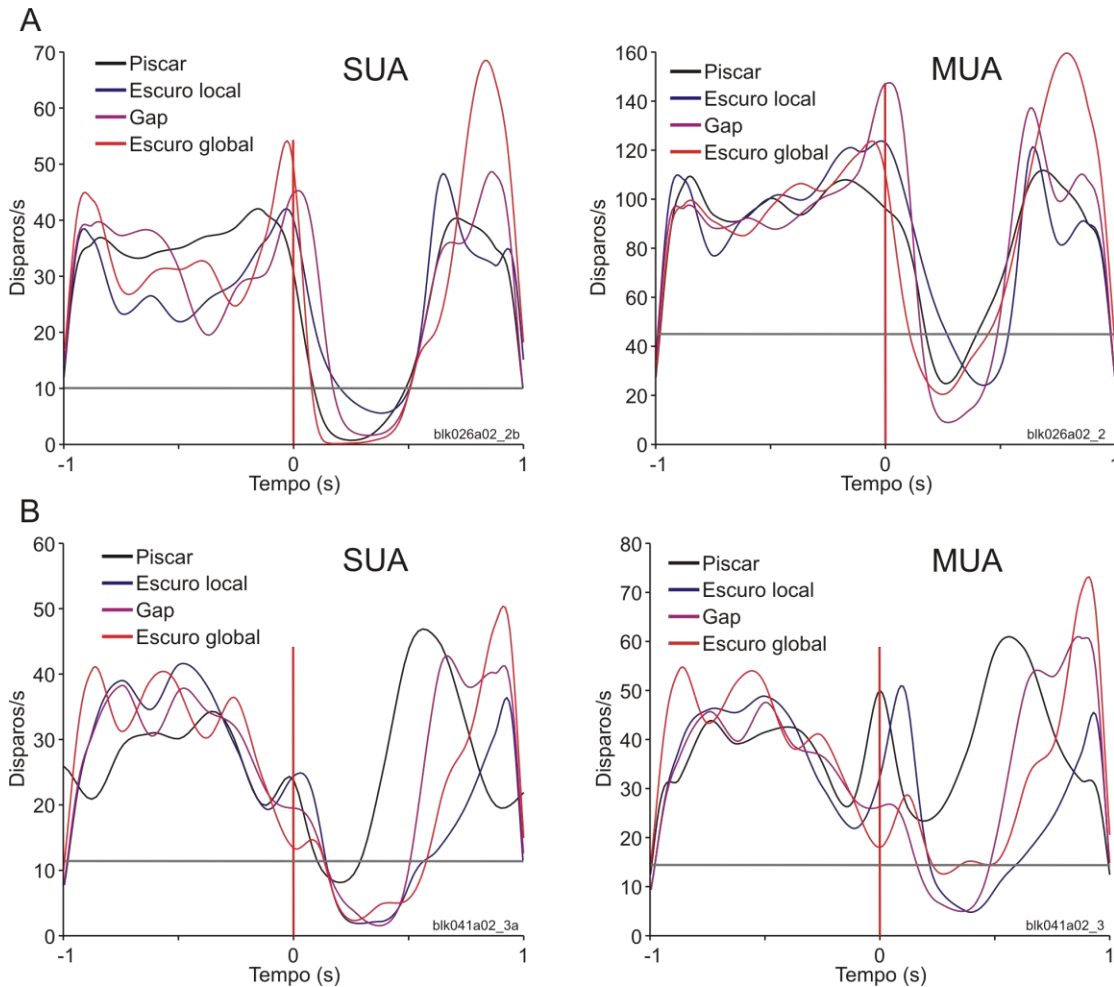


Figura 35: Comparação dos efeitos gerados pelas interrupções em duas células (A e B). Do lado esquerdo é representado o efeito nas células isoladas (SUA). Do lado direito é representada atividade multiunitária originada do canal em que a célula isolada foi registrada. A linha vertical vermelha e horizontal cinza indica o início do piscar e a atividade espontânea da célula, respectivamente.

6.3.4. Diferenças entre o piscar espontâneo e o reflexivo sobre a resposta neuronal durante estimulação visual com a grade senoidal

Durante os registros eletrofisiológicos foram obtidos dois tipos de piscadas: espontâneas e reflexivas. Para saber o efeito de cada uma sobre a atividade neuronal sustentada, foram gerados histogramas de densidade de disparos para cada tipo de evento. Essa análise foi realizada em 50% do total de células (25/50), cujas piscadas reflexivas e espontâneas foram adquiridas durante longos períodos de estimulação (paradigma 2 – Fig. 29B). Essa ação foi adotada porque o número de eventos espontâneos no paradigma 1 é pequeno em relação ao outro, dado que o animal precisa piscar precisamente em uma determinada condição apresentada por um período curto.

Dessa forma, as estimulações durante longos períodos de tempo (Fig. 29B) maximizaram a chance na obtenção de eventos espontâneos.

Exemplos representativos do efeito dos dois tipos de piscada podem ser observados na figura 36. Para o piscar reflexivo, 85% das células utilizadas (21/25) mostraram uma diminuição da resposta (Fig. 36A a C: linha vermelha), sendo 32% (8/25) significativas ($p < 0,001$). Para o restante da amostra (4/25), não foi observada modulação na atividade. No caso do piscar espontâneo, aproximadamente 48% (12/25) das células apresentaram o mesmo efeito do piscar reflexivo (Fig 36A – linha preta). No entanto, comparando-se o número de disparos obtidos em cada tipo de evento, obteve-se uma diminuição significativamente menor ($p = 0,005$; Wilcoxon Signed-Rank) para o piscar espontâneo (11,1 disparos/s [5,9 – 20,2]) quando comparado ao piscar reflexivo (5,1 disparos/s [2,9 – 12,1]). Comparando o nível de atividade desses dois tipos de piscadas com o encontrado no escurecimento global da tela (3,0 [1,2 – 6,7]), uma diferença significativa ($p < 0,001$; Wilcoxon Signed-Rank) só é encontrada em relação ao piscar espontâneo. Um resultado interessante foi obtido para o outro montante de células (13/25) durante o piscar espontâneo: um aumento significativo ($p < 0,01$; Wilcoxon Signed-Rank) da atividade durante a ocorrência do evento para 46% (6/13) das células (Fig 36B e C – linha preta). Dessa forma, observa-se que os dois tipos de piscadas geram modulações diferentes (às vezes antagônicas) na atividade do neurônio durante estimulação visual. Esse resultado indica que o piscar causa alterações na resposta neuronal que não estão associadas somente à queda de iluminação causada pela pálpebra e sugere a presença de um efeito extra-retinal associado ao piscar nos neurônios do wulst visual.

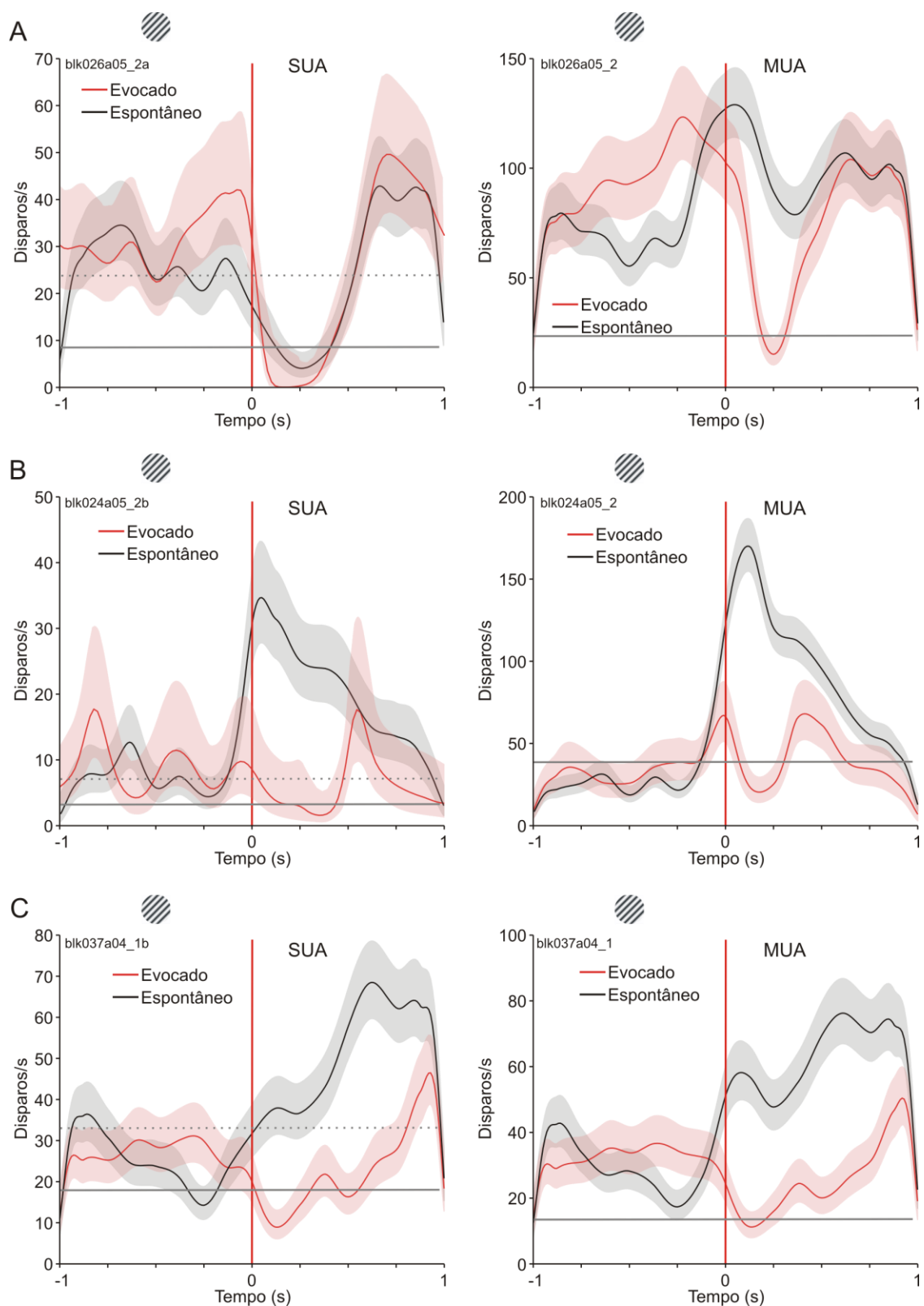


Figura 36: Exemplos representativos do efeito do piscar reflexivo e do piscar espontâneo na atividade neuronal durante estimulação visual. O piscar evocado gera somente uma diminuição da atividade (A – C, linhas vermelhas), enquanto o espontâneo gera uma diminuição (A, linha preta) ou um aumento (B e C, linhas pretas). Novamente, é apresentada a atividade unitária (SUA – lado esquerdo) e a multi-unitária (MUA –

lado direito), mostrando que o efeito se mantém nos dois casos. A linha vertical vermelha e a horizontal cinza contínua e cinza pontilhada indicam o início do piscar e a atividade espontânea da célula e o limiar calculado pelo método de *shuffling* (média+2*DP), respectivamente. As linhas sombreadas representam os histogramas de densidade de disparos e os intervalos de confiança (95%) derivada do cálculo do histograma.

6.3.5. O sinal extra retinal associado ao piscar

Para verificar a existência de um sinal que não depende da estimulação da retina, verificou-se a ocorrência de uma possível modulação na atividade celular durante o piscar em um ambiente totalmente escuro. Em um primeiro momento, essa questão foi analisada sem discriminação do tipo de piscar para 91% das células (53/58). A quantidade de células foi reduzida porque em 5 casos não ocorrem piscadas durante a permanência da coruja no escuro. Desse total, 85% são do tipo complexas (45/53) e 15% do tipo simples (8/53). É importante salientar que as análises foram realizadas utilizando-se as condições do paradigma 1 (C6 a C8) para 38% (20/53) das células e paradigma 2 (C2 e C3) para o restante das unidades (62% - 33/53).

A figura 37(A – D) mostra 4 exemplos representativos do efeito do piscar no escuro. Do montante total de células, 66% (35/53) apresentaram um aumento na resposta (Fig. 37A a C). Desse subgrupo, 45% (16/35) foram significativos ($p < 0,001$; Wilcoxon Signed-Rank; Fig. 37A – C). O restante das células não apresentou modulação significativa (Fig. 37 D). Esse mesmo efeito foi observado durante o piscar com o monitor emitindo uma intensidade luminosa de 20 cd/m^2 (Fig. 37E – H). Nesse caso, 70% das células (37/53) apresentaram aumento na resposta, com 21 unidades significativas ($p < 0,05$; Wilcoxon Signed-Rank; Fig. 37E – G). O restante também não apresentou nenhum tipo de modulação (Fig. 37H). Tanto no escuro, como na tela iluminada, o aumento da atividade gerado pelo piscar foi maior que o limite estabelecido pelo método de *shuffling* (média+2*DP – linha cinza pontilhada na figura 37). Esse efeito foi comprovado tanto para as células complexas como para as simples.

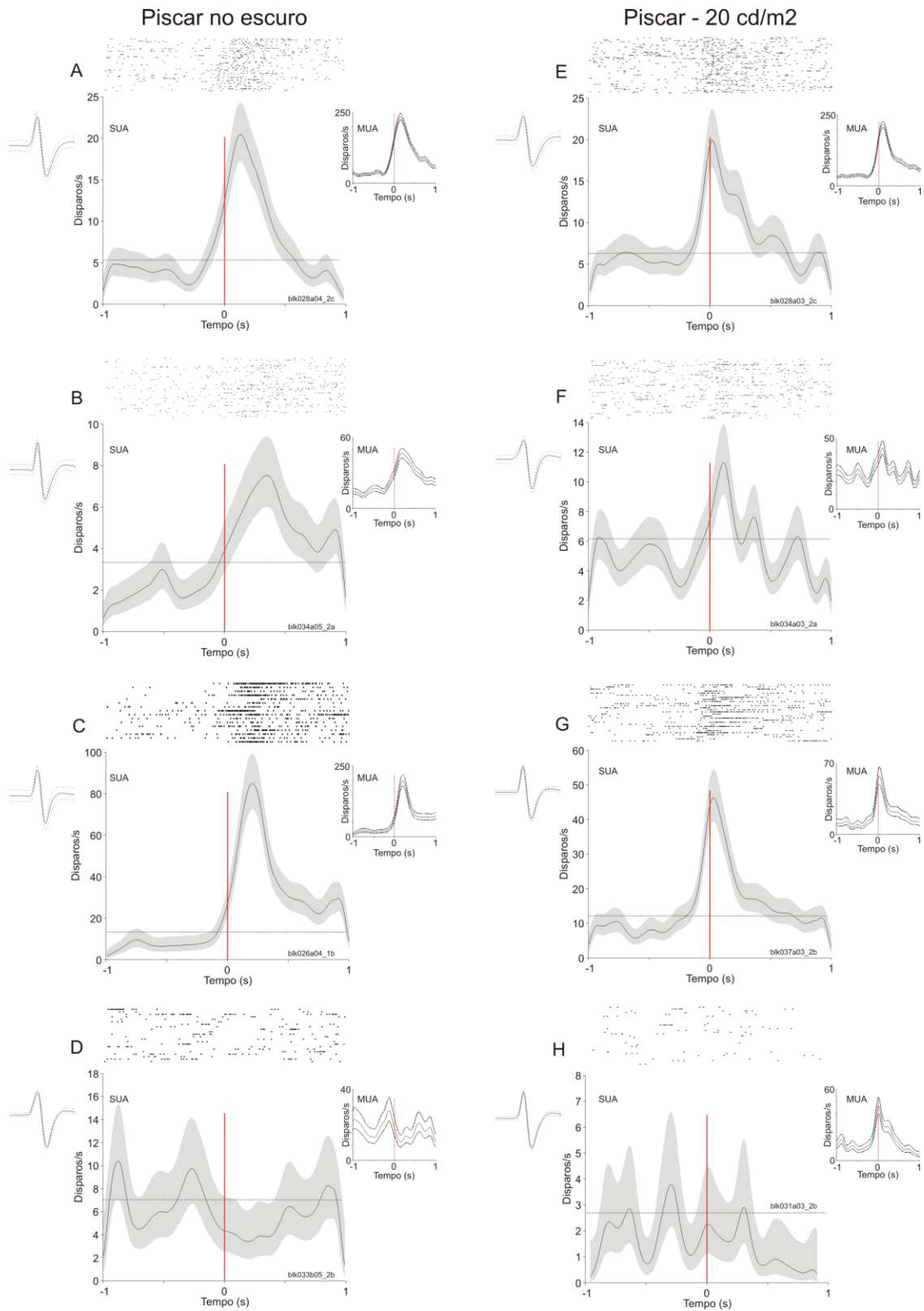


Figura 37: Exemplos representativos do efeito do piscar na atividade espontânea dos neurônios do wulst visual. Esse efeito foi verificado tanto durante o piscar no escuro total (A-D), quanto na tela iluminada (E-H). Em todos os gráficos são apresentados os histogramas de densidade de disparo (linha preta contínua) bem como o raster referentes as células isoladas (SUA). Ao lado esquerdo e direito de cada gráfico são mostrados as

formas de onda e a atividade multiunitária (MUA), respectivamente. As sombras em cinza indicam o intervalo de confiança (95%) derivada do cálculo do histograma. A linha vermelha vertical e a cinza horizontal indicam o início do piscar e o limiar calculado pelo método de *shuffling* (média+2*DP), respectivamente. Nesse caso o valor do *shuffling* é igual à atividade espontânea da célula.

Uma característica interessante que pode ser observada ainda na figura 37, é o fato de que o aumento da atividade neuronal inicia-se antes do começo do piscar. De fato, a atividade começa a se elevar 121,0 ms [66,7 – 149,5] antes do piscar quando esse é realizado no escuro e 92,0 ms [82,5 – 148,3] quando realizado na tela iluminada. Não há diferença estatística entre os dois valores ($p=0,37$). Em resumo, do total de células analisadas, 49% (26/53) apresentaram aumento significativo da atividade, sendo que 11 apresentaram essa característica em ambas as condições.

Para eliminar a possibilidade de que o aumento da atividade neuronal observado durante o piscar na tela iluminada, tenha sido causado por uma atividade transiente proveniente da mudança de luminância causado pela pálpebra, foi analisada a atividade celular durante a variação da luminosidade do monitor entre cinza (20 cd/m^2) e preto ($0,7 \text{ cd/m}^2$). Essa análise mostrou que 7% (4/53) das unidades tiveram um aumento significativo ($p<0,008$; Wilcoxon Signed-Rank) da atividade enquanto a luminância foi trocada de níveis mais altos (cinza) para os mais baixos (preto). Esse pequeno grupo está incluso no montante de células que apresentou aumento significativo durante o piscar na tela iluminada. Entretanto, a elevação da atividade frente ao piscar começa antes do movimento palpebral e a elevação causada pela alteração da luminosidade do monitor começa depois que a troca é realizada, indicando que o piscar modula de forma única a atividade neuronal.

Analisando separadamente o piscar reflexivo e o espontâneo (Fig. 38), obtidos durante as condições C2 (escuro) e C3 (tela iluminada) do paradigma 2 (Fig. 29B), observa-se que o segundo é o responsável por provocar o aumento na resposta (linhas pretas contínuas nos gráficos), tanto para a condição do piscar no escuro (Fig. 38A – C), como na tela iluminada (Fig. 38D – F).

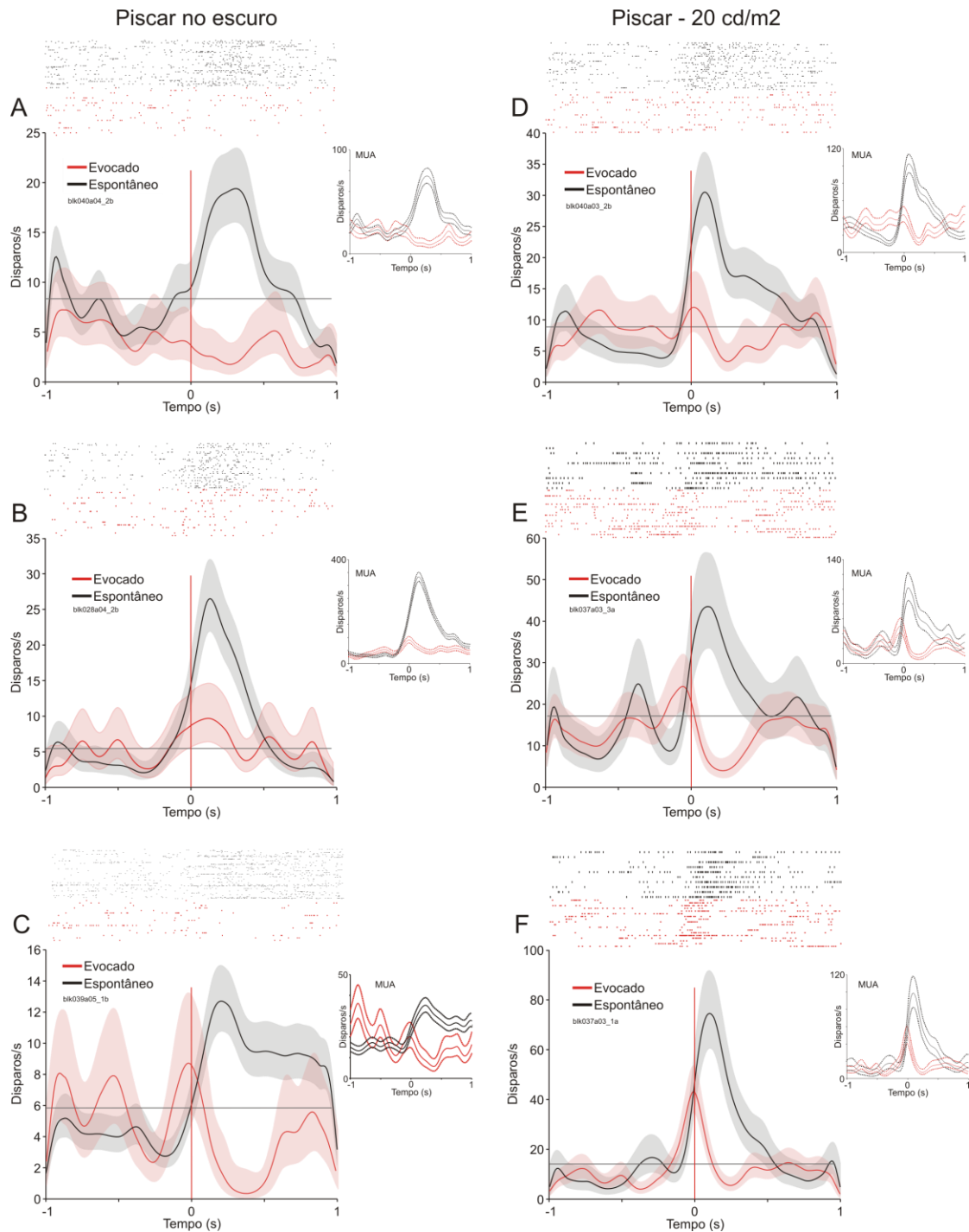


Figura 38: Exemplos representativos do efeito do piscar reflexivo e espontâneo na atividade espontânea dos neurônios isolados do wulst visual, obtidos durante a ocorrência do evento no escuro total (A-C) e na tela iluminada (D-F). Como pode ser observado, há um aumento da resposta somente para o piscar espontâneo (linha preta). Entretanto, para duas células, observou-se também um aumento da resposta para o piscar evocado (linha vermelha em F). As sombras indicam o intervalo de confiança (95%) do cálculo da função de densidade de disparos. Acima de cada gráfico é mostrado o raster referente ao piscar espontâneo (preto) e evocado (vermelho). Em menor tamanho estão representados os efeitos dos tipos de piscadas na atividade multiunitária (MUA). A linha vermelha vertical e a cinza horizontal indicam o início do

piscar e o limiar calculado pelo método de *shuffling* (média+2*DP), respectivamente. Nesse caso o valor do *shuffling* é igual à atividade espontânea da célula.

Em relação ao escuro, das 33 células registradas nenhuma célula apresentou elevação significativa na atividade durante o piscar reflexivo (linhas vermelhas contínuas na Fig. 38A – C). Por outro lado, foi observada uma inibição na atividade de base em 12% das células (4/33 – linha vermelha na Fig. 38C). Ao contrário, para o piscar espontâneo, 51% das células (17/33) apresentaram uma elevação significativa ($p < 0,04$; Wilcoxon Signed-Rank) da atividade (Fig. 38A – C; linhas pretas contínuas). Para a condição em que a tela permaneceu iluminada foi verificado os mesmo resultados apresentados acima (Fig. 38D – F), com diferentes proporções: no piscar reflexivo, 24% (8/33) das células apresentaram diminuição significativa da resposta (Fig. 38E; linha vermelha contínua). Entretanto, para 2 unidades foi observado um aumento na atividade, mas sem significância estatística (Fig. 38F; linha vermelha contínua). No caso do piscar espontâneo, 57% (19/33) mostraram aumento significativo ($p < 0,03$; Wilcoxon Signed-Rank) da atividade (Fig. 38D – F; linhas pretas contínuas). Para as duas condições, os aumentos registrados foram maiores que o limiar determinado pelo *shuffling* (média+2*DP). Esse resultado indica que o piscar espontâneo parece ser o responsável por gerar o sinal extra-retinal observado na resposta. O fato de o piscar reflexivo não alterar de forma expressiva a atividade sugere também que esse sinal não foi causado por mecanismos proprioceptivos associados somente à movimentação da pálpebra.

Foi avaliado ainda, se o mesmo resultado mantinha-se quando separado os tipos de piscadas em binocular e monocular. Como visto no capítulo 5, a coruja tende a apresentar grandes quantidades de eventos monoculares quando evocados pelo sopro de ar e grande quantidade de eventos binoculares quando o piscar é espontâneo. Entretanto, o número de piscadas reflexivas binoculares e espontâneas monoculares é baixa, o que impossibilita uma análise estatística para a grande maioria das células. Por esse motivo, foram agrupados todos os eventos reflexivos monoculares e todos os reflexivos binoculares de todas as células em duas amostras diferentes. Assim, cada amostra continha pares de valores, um derivado da atividade sustentada e outro do efeito do piscar. O mesmo foi realizado para o piscar espontâneo. Não foram encontrados efeitos significativos do piscar reflexivo binocular (atividade basal = $8,26 \pm 13,17$ disparos/s;

piscar = $7,28 \pm 14,2$ disparos/s) sobre a atividade celular ($p = 0,35$; t-student). Entretanto, para o piscar reflexivo monocular encontramos uma diminuição (atividade basal = $11,97 \pm 16,50$ disparos/s; piscar = $4,2 \pm 8,8$ disparos/s) significativa da atividade basal dos neurônios ($p < 0,01$; t-student). O cenário foi diferente para o piscar espontâneo, o qual mostrou que tanto a piscada binocular (atividade basal = $6,32 \pm 11,89$ disparos/s; piscar = $18,5 \pm 23,5$ disparos/s) como a monocular (atividade basal = $7,05 \pm 12,03$ disparos/s; piscar = $14,4 \pm 20,2$ disparos/s) geraram aumentos significativos da atividade neuronal ($p < 0,001$; t-student). Esse resultado confirma o achado anterior de que o piscar espontâneo parece ser o responsável por gerar o sinal extra-retinal observado na resposta.

6.4. Discussão

Os principais achados desse capítulo podem ser resumidos da seguinte forma: (i) o piscar gera uma diminuição da atividade evocada sustentada em grande parte dos neurônios do wulst, sendo que a intensidade dessa diminuição não está correlacionada com a porcentagem de oclusão da pupila; (ii) quando analisados separadamente, o piscar evocado gera uma diminuição na frequência de disparos de potenciais de ação para grande maioria das células; entretanto, o piscar espontâneo acarreta tanto em uma diminuição (menos intensa do que o evocado) para algumas unidades, quanto em um aumento para outras; (iii) quando realizadas no escuro ou com uma tela iluminada, as piscadas geram um aumento no nível de atividade celular, o qual está relacionado somente com o piscar espontâneo. Esse resultado indica a presença de um sinal independente da estimulação da retina. (v) Esse aumento na atividade ocorre antes do início do movimento palpebral, o que indica a influência de descargas corolárias no wulst visual da coruja buraqueira.

6.4.1. Efeito do piscar na atividade neuronal

O efeito do piscar na atividade neuronal vem sendo estudado desde a década de 80 por vários grupos através de métodos psicofísicos (Manning et al., 1983; Volkman et al., 1980), eletrofisiológicos (Buisseret e Maffei, 1983; Gawne e Martin, 2000 e 2002) e por ressonância magnética funcional (Berman et al., 2012; Bristow et al., 2005a e 2005b; Hupé et al. 2012; Tse et al., 2010; Tsubota et al., 1999). A partir desses trabalhos, foram relatados uma série de efeitos possíveis do piscar sobre a atividade neuronal. Estudos eletrofisiológicos mostram que o piscar reflexivo gera uma

diminuição na atividade das células encontradas no córtex visual primário e áreas extra-estriadas (Buisseret e Maffei, 1983; Gawne e Martin, 2000 e 2002) e que essa diminuição é maior do que quando simplesmente a luz externa é apagada. Esse fato sugere que o piscar acarreta em uma supressão ativa da atividade neuronal. Indo de encontro a esses resultados, o estudo realizado em humanos por Bristow e colaboradores (2005a) por meio da técnica de ressonância magnética funcional, mostrou que o piscar voluntário gera uma diminuição significativa somente em uma área extra-estriada (V3). Entretanto, quando realizado no escuro, observa-se um aumento no sinal “BOLD” no córtex visual primário, córtex extra-estriado (V2,V3) e áreas motoras (FEF, SEF). Dessa forma, foi especulado que esse aumento na atividade pode representar um sinal motor associado ao piscar, possivelmente encaminhado pelo FEF e SEF, e que pode estar ligado a uma via de descargas corolárias. Por outro lado, estudos recentes de ressonância magnética funcional em macacos *rhesus* (Guipponi et al., 2014) e humanos (Hupé et al., 2012; Tse et al., 2010) mostraram resultados contrários, ou seja, a ocorrência de um aumento de atividade de V1 e V2/V3 durante o piscar espontâneo e nenhuma ativação de áreas motoras (FEF e SEF).

Os achados do presente capítulo mostram algumas características descritas no parágrafo acima. Por exemplo, foi observada uma diminuição na frequência de disparos durante o piscar para um número considerável de células do wulst. Essa característica foi observada tanto em macacos (Gawne e Martin, 2000 e 2002) como em gatos (Buisseret e Maffei, 1983). No entanto, diferentemente do que foi reportado por Gawne e Martin (2000, 2002) essa diminuição não foi maior que a gerada pelo escurecimento da tela. Uma possível explicação para esse achado respalda-se no fato de que diferentes tipos de piscadas geram, muitas vezes, efeitos antagônicos: o reflexivo gera somente uma diminuição na frequência de disparos de potenciais de ação, enquanto o espontâneo ou gera uma diminuição (menor que o reflexivo) ou um aumento. Indo em direção a essa hipótese, a comparação estatística dos valores das frequências de disparo obtidos nos dois tipos de piscadas com os valores obtidos no escurecimento global, mostra que não há diferença significativa entre a redução da atividade causada pelo piscar reflexivo e a causada pelo escurecimento global. O fato do piscar espontâneo não gerar uma diminuição maior ou igual ao escurecimento da tela, sugere a presença de um sinal associado diretamente à execução do movimento palpebral, o qual pode ser originário diretamente de áreas corticais.

Para tentar confirmar o exposto acima, foi estudada a modulação da atividade neuronal durante a condição em que a retina não seria estimulada (no escuro), de modo que qualquer diferença observada na atividade estaria associada provavelmente a sinais enviados diretamente de áreas corticais. De fato, nossos resultados, corroboram com essa hipótese, já que a atividade neuronal de algumas células aumenta durante o ato de piscar no escuro (Fig. 37 e 38, lado esquerdo). Ainda, o mesmo resultado foi obtido utilizando-se uma condição em que a retina permaneceu iluminada, mas não foi apresentado nenhum estímulo capaz de evocar um aumento significativo na frequência de disparos dos neurônios (Fig. 37 e 38, lado direito). Dessa forma, mostrou-se que esse aumento ocorre independentemente da estimulação da retina. O aumento da atividade celular também foi demonstrado em mamíferos durante o piscar no escuro. Através de um estudo de imagem funcional em humanos, Bristow e colaboradores (2005a) encontraram esse aumento nos neurônios do núcleo geniculado lateral, córtex visual primário e áreas extra-estriadas (V2 e V3) durante o piscar voluntário no escuro. Aparentemente, esse aumento seria fruto de um sinal motor, derivado de uma via de disparos corolários que operariam durante as piscadas, diminuindo suas consequências sensoriais (Bristow et al., 2005b). De acordo com nossos dados, essa via de disparos corolários também pode existir ao nível do wulst visual da coruja.

Um achado que vai de encontro com a existência dessa via no wulst visual da coruja, é o fato de que o aumento da resposta encontrado durante o piscar no escuro, ocorre aproximadamente 105 ms antes do início do evento. Essa é uma propriedade importante para inferir a presença de disparos corolários em uma determinada região (Sommer e Wurtz, 2008; Wurtz, 2008; Wurtz et al., 2011). Em mamíferos e aves a presença de vias de descargas corolárias foi demonstrada principalmente durante o movimento sacádico (Yang et al., 2008; Sommer e Wurtz, 2002; Wurtz et al., 2011), no qual o aumento da atividade também ocorre em torno de 100 ms antes da sacada (Wurtz, 2008). Através de registros eletrofisiológicos em neurônios do telencéfalo (wulst) de pombo, Yang e colaboradores (2008) demonstraram a existência de uma diminuição dos potenciais de ação durante as sacadas e que essa diminuição começava a ocorrer em aproximadamente 73 ms antes do início do movimento. Essa queda antecipada da resposta caracterizou a presença de uma descarga corolária. Ainda, através da desativação de áreas motoras, eles demonstraram que esse sinal corolário que chega até as células do telencéfalo passando pelo NGL, vinham de áreas envolvidas na geração de nistagmo optocinético (responsável por estabilizar a imagem na retina).

Como várias evidências apontam que o movimento sacádico e o piscar devem compartilhar um mesmo mecanismo (Bodis-Wollner, 1999; Dias, 2013; Evinger et al., 1984; Riggs et al., 1987), o aumento da atividade observado nos neurônios do wulst visual da coruja durante o piscar pode ser originário de uma via corolária parecida com a descrita por Yang e colaboradores (2008). Entretanto, os movimentos sacádicos na coruja são realizados com a movimentação da cabeça (Ohayon et al., 2008), já que essa ave não possui movimentos oculares. Dessa forma, seria interessante procurar a via responsável por essas descargas em núcleos motores responsáveis pela movimentação da cabeça. Um potencial candidato seria a área denominada archistriatum, a qual participa do movimento da cabeça em corujas (Knudsen et al., 1995), juntamente com o teto óptico (Grobstein, 1988). Essas duas áreas são homólogas ao campo frontal ocular e o colículo superior respectivamente (Knudsen et al., 1995), que, em mamíferos, são áreas conhecidas por compor a via de descargas corolárias que operam durante os movimentos sacádicos (Sommer e Wurtz, 2008; Wurtz et al., 2011).

Até o presente momento, estudos eletrofisiológicos considerando o efeito de diferentes tipos de piscadas (reflexivo e espontâneo) na atividade neuronal não foram realizados. Em geral, os estudos eletrofisiológicos utilizam o piscar reflexivo, evocado por um sopro de ar (Buisseret e Maffei, 1983; Gawne e Martin, 2000 e 2002). Talvez a escolha desse tipo de piscada ocorra pela necessidade de realizá-las em um determinado momento durante a estimulação visual e porque o sopro de ar utilizado é muito suave e, muitas vezes, nem é percebido (Gawne e Martin, 2002). Por outro lado, estudos realizados por meio da técnica da ressonância magnética funcional utilizam o piscar voluntário (Bristow et al., 2005 a e 2005b) ou o espontâneo (Berman et al., 2012; Guipponi et al., 2014; Hupé et al. 2012; Tse et al., 2010). Interessantemente, esses estudos reportam efeitos contrários no córtex visual primário e áreas extra-estriadas: os que utilizam o piscar voluntário reportam uma diminuição na atividade dessas áreas durante estimulação visual, enquanto os que utilizam o espontâneo relatam um aumento. Assim, fica claro perceber que, de fato, tipos de piscadas diferentes geram efeitos diferentes. Os resultados apresentados neste estudo também corroboram com essa ideia, já que o piscar espontâneo acarreta em efeitos diferentes (muitas vezes contrários) ao do piscar reflexivo, tanto durante uma estimulação visual ótima com grades senoidal, como nas condições em que somente a atividade basal da célula é considerada. Essa diferença pode estar associada às vias neuronais e aos geradores dos diferentes tipos de piscadas. No caso de humanos, o piscar reflexivo parece envolver o colículo superior, e pode ser

afetado pelo cerebelo e formação reticular (Chen e Evinger, 2006; Dauvergne e Evinger, 2007; Powers et al., 1997). O piscar espontâneo parece surgir a partir da atividade de um gerador de piscar endógeno que é modulado, por exemplo, pelo nível de dopamina, e estados cognitivos. Entretanto, as propriedades do circuito de controle para o piscar espontâneo ainda não foram precisamente caracterizadas e a sua localização é desconhecida (Kaminer et al., 2011). Dessa forma, seria interessante conduzir experimentos eletrofisiológicos em mamíferos considerando também o piscar espontâneo e verificar a possibilidade da existência de diferentes efeitos dependendo do tipo de piscar.

6.4.2. O wulst visual da coruja

Estudos anatômicos e eletrofisiológicos, realizados a partir da década de 70 (Pettigrew 1979; Pettigrew e Konishi 1976), vem estabelecendo uma interessante analogia funcional entre o wulst visual da coruja e o córtex visual primário de mamíferos. Entretanto, alguns estudos mostraram que os neurônios da camada superior do wulst, região principal das projeções eferentes desta área, apresentam propriedades de respostas mais elaboradas, que são geralmente atribuídas a regiões extra-estriadas em mamíferos (Liu e Pettigrew, 2003; Nieder e Wagner, 1999, 2000; Pettigrew, 1979). Por exemplo, o estudo realizado por Liu e Pettigrew (2003) mostrou a presença de domínios de iso-orientação na *Tyto Alba* similares àqueles encontrados na área V2 do córtex visual de gatos e macacos. Outro estudo realizado por Vieira e Baron (2014 – em preparação) mostrou que as propriedades de respostas dos neurônios do wulst visual ao contraste acromático são mais parecidas com o que é observado no núcleo geniculado lateral de gatos e primatas. O resultado deste trabalho mostrou ainda, a presença de descargas corolárias a nível do wulst, as quais parecem estar presentes somente no córtex extra-estriado de primatas e são raramente encontradas no córtex visual primário (Dicke et al., 2008; Jeannerod et al., 1979; Wurtz, 2008). Todos esses resultados sugerem que o wulst não pode ser tido, somente, como uma área funcionalmente análoga a V1, mas sim, como uma área que engloba vários níveis de processamento.

7. Conclusão e perspectiva

Por meio da estimulação com variações transientes de intensidade luminosa, foi demonstrado que o reflexo pupilar na coruja é extremamente rápido e com baixa latência, podendo contribuir ativamente com os mecanismos de adaptação à luz presentes na retina a fim de evitar a saturação neuronal. Assim como variações na intensidade luminosa, o piscar também parece gerar uma modulação da pupila, a qual parece não estar relacionada somente com a variação de luminância causada por ele. Além disso, foi demonstrado que a atividade neuronal a nível do wulst visual da coruja buraqueira, é ativamente modulada pelo piscar. Essa modulação parece estar associada a dois principais fatores: (i) uma diminuição do nível da iluminação retinal causado pela oclusão da pupila pela pálpebra; (ii) a presença de um sinal ligado a esse movimento. Dessa forma, concluímos que nossos resultados são compatíveis com a ideia de que o piscar modula em parte a atividade dos neurônios do wulst visual por meio de um sinal extra retinal. Esse sinal pode estar associado a uma via de disparos corolários operando no wulst visual de corujas, o qual atuaria na discriminação entre o escotoma temporal causado pelo piscar e os causados por eventos externos, constituindo parte de um mecanismo responsável pela continuidade perceptual.

É importante salientar que outros tópicos relacionados ao presente estudo também serão investigados em trabalhos futuros. O primeiro respalda-se no fato de que os resultados sobre o efeito modulatório do piscar foram obtidos através do estudo da frequência dos disparos de potenciais de ação. No entanto, seria interessante avaliar também a estrutura temporal desses disparos, principalmente durante a execução do piscar. Por meio dessa análise seria possível, por exemplo, detectar a presença de um código temporal nas descargas de potenciais de ação associado ao piscar. Um método interessante e muito utilizado para abordar essa questão é conhecido como espaços métricos (Victor e Purpura, 1996). Esse método é baseado na teoria da informação e calcula até que ponto conjuntos de trilhas de potenciais de ação, obtidas durante estimulações distintas diferem umas das outras. O cálculo é baseado em função da

dissimilaridade (também chamada de “distância”) entre essas trilhas e leva em consideração tanto o número, quanto o tempo de ocorrência, dos disparos de potenciais de ação. Dessa forma, é possível determinar a quantidade de informação que é transmitida durante a ocorrência de determinado estímulo (nesse caso o piscar) e se essa informação está contida somente no número de potenciais de ação disparado ou também na precisão temporal em que esses ocorrem. Essa análise vem sendo utilizada com sucesso por outros grupos para estudar o código temporal de neurônios presentes em vários sistemas sensoriais, como o visual (Keat et al., 2001; Reinagel e Reid, 2002), olfativo (MacLeod et al., 1998), gustatório (Di Lorenzo e Victor, 2003) e auditivo (Huetz et al., 2006).

Um segundo tópico seria a análise das informações contidas no potencial de campo local (LFP). O LFP é um sinal proveniente de oscilações no potencial de membrana de uma população de neurônios que está distribuída em um raio de aproximadamente 200 μm em torno do eletrodo. Esse tipo de sinal captura processos sinápticos que não podem ser medidos na análise dos disparos de potenciais de ação de neurônios individuais e é utilizado no estudo de mecanismos corticais envolvidos no processamento sensorial, planejamento motor e processos cognitivos como atenção e memória (revisado em Einevoll et al., 2013). No presente trabalho, o LFP poderia fornecer informações sobre a sincronização da atividade de neurônios durante a ocorrência do piscar em uma frequência oscilatória específica, podendo fornecer indícios sobre os mecanismos que atuam na continuidade perceptual. Por exemplo, um estudo de encefalografia realizado por Bonfiglio e colaboradores (2011) mostrou um aumento nas oscilações alpha (8 a 13 Hz) alguns milissegundos antes e durante o piscar. Como essa faixa de oscilação está relacionada com a manutenção da memória de trabalho (Bonnefond e Jensen, 2012), esses autores sugerem que esse aumento pode servir para suprir a perda de estimulação visual ocasionada pelo fechamento da pálpebra, por meio do preenchimento do escotoma temporal com informações visuais adquiridas previamente à ocorrência do piscar.

8. Referências bibliográficas

- ADEY, W. R. & NODA, H. 1973. Influence of eye movements on geniculo-striate excitability in the cat. *J Physiol*, 235, 805-21.
- ALEXANDRIDIS, E. 1967. [Pupillographic study of the retinal sensitivity of the pigeon's eye]. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*, 172, 139-51.
- ALPERN, M. 1971. Rhodopsin kinetics in the human eye. *J Physiol*, 217, 447-71.
- ALPERN, M. & CAMPBELL, F. W. 1962. The spectral sensitivity of the consensual light reflex. *J Physiol*, 164, 478-507.
- ALPERN, M., KITAI, S. & ISAACSON, J. D. 1959. The dark-adaptation process of the pupillomotor photoreceptors. *Am J Ophthalmol*, 48(5)Pt 2, 583-93.
- ALPERN, M. & OHBA, N. 1972. The effect of bleaching and backgrounds on pupil size. *Vision Res*, 12, 943-51.
- ANDO, K. & KRIPKE, D. F. 1996. Light attenuation by the human eyelid. *Biol Psychiatry*, 39, 22-5.
- BACCUS, S. A. & MEISTER, M. 2002. Fast and slow contrast adaptation in retinal circuitry. *Neuron*, 36, 909-19.
- BARBATO, G., FICCA, G., MUSCETTOLA, G., FICHELE, M., BEATRICE, M. & RINALDI, F. 2000. Diurnal variation in spontaneous eye-blink rate. *Psychiatry Res*, 93, 145-51.
- BARBUR, J. L., PRESCOTT, N. B., DOUGLAS, R. H., JARVIS, J. R. & WATHES, C. M. 2002. A comparative study of stimulus-specific pupil responses in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) and the human. *Vision Res*, 42, 249-55.
- BARLOW, H. B., BLAKEMORE, C. & PETTIGREW, J. D. 1967. The neural mechanism of binocular depth discrimination. *J Physiol*, 193, 327-42.
- BARON, J., PINTO, L., DIAS, M. O., LIMA, B. & NEUENSCHWANDER, S. 2007. Directional responses of visual wulst neurones to grating and plaid patterns in the awake owl. *Eur J Neurosci*, 26, 1950-68.
- BARTLETT, J. R., DOTY, R. W., LEE, B. B., SR. & SAKAKURA, H. 1976. Influence of saccadic eye movements on geniculostriate excitability in normal monkeys. *Exp Brain Res*, 25, 487-509.

-
- BEATTY, J. 1982. Phasic not tonic pupillary responses vary with auditory vigilance performance. *Psychophysiology*, 19, 167-72.
- BEATTY, J. 1982. Task-evoked pupillary responses, processing load, and the structure of processing resources. *Psychol Bull*, 91, 276-92.
- BERGAMIN, O. & KARDON, R. H. 2003. Latency of the pupil light reflex: sample rate, stimulus intensity, and variation in normal subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 1546-54.
- BERMAN, B. D., HOROVITZ, S. G., MOREL, B. & HALLETT, M. 2012. Neural correlates of blink suppression and the buildup of a natural bodily urge. *Neuroimage*, 59, 1441-50.
- BIERMAN, A., FIGUEIRO, M. G. & REA, M. S. 2011. Measuring and predicting eyelid spectral transmittance. *J Biomed Opt*, 16, 067011.
- BILLOCK, V. A. 1997. Very short-term visual memory via reverberation: a role for the cortico-thalamic excitatory circuit in temporal filling-in during blinks and saccades? *Vision Res*, 37, 949-53.
- BISHOP, L. G. & STARK, L. 1965. Pupillary Response of the Screech Owl, *Otus asio*. *Science*, 148, 1750-2.
- BITSIOS, P., SCHIZA, S. E., GIAKOUMAKI, S. G., SAVIDOU, K., ALEGAKIS, A. K. & SIAFAKAS, N. 2006. Pupil miosis within 5 minutes in darkness is a valid and sensitive quantitative measure of alertness: application in daytime sleepiness associated with sleep apnea. *Sleep*, 29, 1482-8.
- BLOUGH, D. S. 1956. Dark adaptation in the pigeon. *J Comp Physiol Psychol*, 49, 425-30.
- BLOUNT, W. P. 1927. Studies of the movements of the eyelids of animals: blinking. *Experimental Physiology*, 8, 14.
- BODIS-WOLLNER, I., BUCHER, S. F. & SEELOS, K. C. 1999. Cortical activation patterns during voluntary blinks and voluntary saccades. *Neurology*, 53, 1800-5.
- BONFIGLIO, L., SELLO, S., CARBONCINI, M. C., ARRIGHI, P., ANDRE, P. & ROSSI, B. 2011. Reciprocal dynamics of EEG alpha and delta oscillations during spontaneous blinking at rest: a survey on a default mode-based visuo-spatial awareness. *Int J Psychophysiol*, 80, 44-53.
- BONNEFOND, M. & JENSEN, O. 2012. Alpha oscillations serve to protect working memory maintenance against anticipated distracters. *Curr Biol*, 22, 1969-74.
- BOUR, L., ONGERBOER DE VISSER, B., ARAMIDEH, M. & SPEELMAN, J. 2002. Origin of eye and eyelid movements during blinking. *Mov Disord*, 17 Suppl 2, S30-2.
-

-
- BOUR, L. J., ARAMIDEH, M. & DE VISSER, B. W. 2000. Neurophysiological aspects of eye and eyelid movements during blinking in humans. *J Neurophysiol*, 83, 166-76.
- BRACHA, V., NILAWEERA, W., ZENITSKY, G. & IRWIN, K. 2003. Video recording system for the measurement of eyelid movements during classical conditioning of the eyeblink response in the rabbit. *J Neurosci Methods*, 125, 173-81.
- BRAEKEVELT, C. R. 1993. Fine structure of the retinal photoreceptors of the great horned owl (*Bubo virginianus*). *Histol Histopathol*, 8, 25-34.
- BRAEKEVELT, C. R., SMITH, S. A. & SMITH, B. J. 1996. Fine structure of the retinal photoreceptors of the barred owl (*Strix varia*). *Histol Histopathol*, 11, 79-88.
- BRAVO, H. & PETTIGREW, J. D. 1981. The distribution of neurons projecting from the retina and visual cortex to the thalamus and tectum opticum of the barn owl, *Tyto alba*, and the burrowing owl, *Speotyto cunicularia*. *J Comp Neurol*, 199, 419-41.
- BRISTOW, D., HAYNES, J. D., SYLVESTER, R., FRITH, C. D. & REES, G. 2005a. Blinking suppresses the neural response to unchanging retinal stimulation. *Curr Biol*, 15, 1296-300.
- BRISTOW, D., FRITH, C. & REES, G. 2005b. Two distinct neural effects of blinking on human visual processing. *Neuroimage*, 27, 136-45.
- BUISSERET, P. & MAFFEI, L. 1983. Suppression of visual cortical activity following tactile periorbital stimulation; its role during eye blinks. *Experimental Brain Research*, 51, 463-466.
- BUIZZA, A. & SCHMID, R. 1986. Velocity characteristics of smooth pursuit eye movements to different patterns of target motion. *Exp Brain Res*, 63, 395-401.
- BURR, D. 2005. Vision: in the blink of an eye. *Curr Biol*, 15, R554-6.
- BURR, D. C., ROSS, J., BINDA, P. & MORRONE, M. C. 2010. Saccades compress space, time and number. *Trends Cogn Sci*, 14, 528-33.
- CAFFIER, P. P., ERDMANN, U. & ULLSPERGER, P. 2003. Experimental evaluation of eyeblink parameters as a drowsiness measure. *Eur J Appl Physiol*, 89, 319-25.
- CARPENTER, G. A. & GROSSBERG, S. 1987. Discovering order in chaos: stable self-organization of neural recognition codes. *Ann NY Acad Sci*, 504, 33-51.
- CHEN, F. P. & EVINGER, C. 2006. Cerebellar modulation of trigeminal reflex blinks: interpositus neurons. *J Neurosci*, 26, 10569-76.
- CLARK, R. E. 2011. Eyeblink conditioning and systems consolidation: an ironic yet powerful pairing. *Neurobiol Learn Mem*, 95, 118-24.
-

-
-
- CLARKE, R. J. & IKEDA, H. 1985. Luminance and darkness detectors in the olivary and posterior pretectal nuclei and their relationship to the pupillary light reflex in the rat. I. Studies with steady luminance levels. *Exp Brain Res*, 57, 224-32.
- CLARKE, R. J., ZHANG, H. & GAMLIN, P. D. 2003. Characteristics of the pupillary light reflex in the alert rhesus monkey. *J Neurophysiol*, 89, 3179-89.
- CRAPSE, T. B. & SOMMER, M. A. 2008. Corollary discharge across the animal kingdom. *Nat Rev Neurosci*, 9, 587-600.
- CRUZ, A. A., GARCIA, D. M., PINTO, C. T. & CECHETTI, S. P. 2011. Spontaneous eyeblink activity. *Ocul Surf*, 9, 29-41.
- DARTT, D. A. 2004. Control of mucin production by ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res*, 78, 173-85.
- DAUVERGNE, C. & EVINGER, C. 2007. Experiential modification of the trigeminal reflex blink circuit. *J Neurosci*, 27, 10414-22.
- DE VALOIS, R. L., ALBRECHT, D. G. & THORELL, L. G. 1982. Spatial frequency selectivity of cells in macaque visual cortex. *Vision Res*, 22, 545-59.
- DENTON, E. J. 1956. The responses of the pupil of *Gekko gekko* to external light stimulus. *J Gen Physiol*, 40, 201-16.
- DI LORENZO, P. M. & VICTOR, J. D. 2003. Taste response variability and temporal coding in the nucleus of the solitary tract of the rat. *J Neurophysiol*, 90, 1418-31.
- DIAS, M. O. 2013. *Estudo do comportamento de restreamento visual na coruja buraqueira*. Dissertation, Universidade Federal de Minas Gerais.
- DISTLER, C. & HOFFMANN, K. P. 1989. The pupillary light reflex in normal and innate microstrabismic cats, II: Retinal and cortical input to the nucleus praetectalis olivaris. *Vis Neurosci*, 3, 139-53.
- DITCHBURN, R. W. & GINSBORG, B. L. 1952. Vision with a stabilized retinal image. *Nature*, 170, 36-7.
- DODT, E. 1967. Purkinje-shift in the rod eye of the bush-baby, *Galago crassicaudatus*. *Vision Res*, 7, 509-17.
- DOUGHTY, M. J. 2001. Consideration of three types of spontaneous eyeblink activity in normal humans: during reading and video display terminal use, in primary gaze, and while in conversation. *Optom Vis Sci*, 78, 712-25.
- DOUGLAS, R. H., HARPER, R. D. & CASE, J. F. 1998. The pupil response of a teleost fish, *Porichthys notatus*: description and comparison to other species. *Vision Res*, 38, 2697-710.
-

-
- DUFFY, F. H. & BURCHFIELD, J. L. 1975. Eye movement-related inhibition of primate visual neurons. *Brain Res*, 89, 121-32.
- DUHAMEL, J. R., COLBY, C. L. & GOLDBERG, M. E. 1992. The updating of the representation of visual space in parietal cortex by intended eye movements. *Science*, 255, 90-2.
- DUNN, N. A., CONERY, J. S. & LOCKERY, S. R. 2007. Circuit motifs for spatial orientation behaviors identified by neural network optimization. *J Neurophysiol*, 98, 888-97.
- EINEVOLL, G. T., KAYSER, C., LOGOTHETIS, N. K. & PANZERI, S. 2013. Modelling and analysis of local field potentials for studying the function of cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*, 14, 770-85.
- ELLIS, C. J. 1981. The pupillary light reflex in normal subjects. *Br J Ophthalmol*, 65, 754-9.
- ESTEBAN, A. 1999. A neurophysiological approach to brainstem reflexes. Blink reflex. *Neurophysiol Clin*, 29, 7-38.
- ESTEBAN, A., MATEO, D. & GIMENEZ-ROLDAN, S. 1981. Early detection of Huntington's disease. Blink reflex and levodopa load in presymptomatic and incipient subjects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 44, 43-8.
- EVINGER, C., MANNING, K. A., PELLEGRINI, J. J., BASSO, M. A., POWERS, A. S. & SIBONY, P. A. 1994. Not looking while leaping: the linkage of blinking and saccadic gaze shifts. *Exp Brain Res*, 100, 337-44.
- EVINGER, C., MANNING, K. A. & SIBONY, P. A. 1991. Eyelid movements. Mechanisms and normal data. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32, 387-400.
- EVINGER, C., SHAW, M. D., PECK, C. K., MANNING, K. A. & BAKER, R. 1984. Blinking and associated eye movements in humans, guinea pigs, and rabbits. *J Neurophysiol*, 52, 323-39.
- FAIN, G. L., MATTHEWS, H. R., CORNWALL, M. C. & KOUTALOS, Y. 2001. Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev*, 81, 117-151.
- FAN, X., MILES, J. H., TAKAHASHI, N. & YAO, G. 2009. Abnormal transient pupillary light reflex in individuals with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 39, 1499-508.
- FEINBERG, R. & PODOLAK, E. 1965. Latency of pupillary reflex to light stimulation and its relationship to aging. *Behavior, aging, and the nervous system*.
- FRAUSCHER, B., EGG, R., BRANDAUER, E., ULMER, H., BERGER, T., POEWE, W. & HOGL, B. 2005. Daytime sleepiness is not increased in mild to moderate multiple sclerosis: a pupillographic study. *Sleep Med*, 6, 543-7.
-

-
- FRAZOR, R. A. & GEISLER, W. S. 2006. Local luminance and contrast in natural images. *Vision Res*, 46, 1585-98.
- FULTON, A. B. & BAKER, B. N. 1984. The relation of retinal sensitivity and rhodopsin in developing rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 25, 647-51.
- GAMLIN, P. D., REINER, A., ERICHSEN, J. T., KARTEN, H. J. & COHEN, D. H. 1984. The neural substrate for the pupillary light reflex in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol*, 226, 523-43.
- GAMLIN, P. D., ZHANG, H. & CLARKE, R. J. 1995. Luminance neurons in the pretectal olivary nucleus mediate the pupillary light reflex in the rhesus monkey. *Exp Brain Res*, 106, 169-76.
- GAMLIN, P. D., ZHANG, H., HARLOW, A. & BARBUR, J. L. 1998. Pupil responses to stimulus color, structure and light flux increments in the rhesus monkey. *Vision Res*, 38, 3353-8.
- GANDHI, N. J. 2012. Interactions between gaze-evoked blinks and gaze shifts in monkeys. *Exp Brain Res*, 216, 321-39.
- GANDHI, N. J. & KATNANI, H. A. 2011. Motor functions of the superior colliculus. *Annu Rev Neurosci*, 34, 205-31.
- GAWNE, T. J. & MARTIN, J. M. 2000. Activity of primate V1 cortical neurons during blinks. *J Neurophysiol*, 84, 2691-4.
- GAWNE, T. J. & MARTIN, J. M. 2002. Responses of primate visual cortical neurons to stimuli presented by flash, saccade, blink, and external darkening. *J Neurophysiol*, 88, 2178-86.
- GIZA, E., FOTIOU, D., BOSTANTJOPOULOU, S., KATSAROU, Z. & KARLOVASITOU, A. 2011. Pupil light reflex in Parkinson's disease: evaluation with pupillometry. *Int J Neurosci*, 121, 37-43.
- GOTO, E., YAGI, Y., MATSUMOTO, Y. & TSUBOTA, K. 2002. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol*, 133, 181-6.
- GRANDA, A. M., DEARWORTH, J. R., JR., KITTLA, C. A. & BOYD, W. D. 1995. The pupillary response to light in the turtle. *Vis Neurosci*, 12, 1127-33.
- GROBSTEIN, P. 1988. Between the retinotectal projection and directed movement: topography of a sensorimotor interface. *Brain Behav Evol*, 31, 34-48.
- GRUART, A., BLAZQUEZ, P. & DELGADO-GARCIA, J. M. 1995. Kinematics of spontaneous, reflex, and conditioned eyelid movements in the alert cat. *J Neurophysiol*, 74, 226-48.

-
- GRUART, A., SCHREURS, B. G., DEL TORO, E. D. & DELGADO-GARCIA, J. M. 2000. Kinetic and frequency-domain properties of reflex and conditioned eyelid responses in the rabbit. *J Neurophysiol*, 83, 836-52.
- GUIPPONI, O., ODOUARD, S., PINEDE, S., WARDAK, C. & BEN HAMED, S. 2014. fMRI Cortical Correlates of Spontaneous Eye Blinks in the Nonhuman Primate. *Cereb Cortex*.
- GUITTON, D., SIMARD, R. & CODERE, F. 1991. Upper eyelid movements measured with a search coil during blinks and vertical saccades. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32, 3298-305.
- HACHOL, A., SZCZEPANOWSKA-NOWAK, W., KASPRZAK, H., ZAWOJSKA, I., DUDZINSKI, A., KINASZ, R. & WYGLEDOWSKA-PROMIENSKA, D. 2007. Measurement of pupil reactivity using fast pupillometry. *Physiol Meas*, 28, 61-72.
- HACKLEY, S. A. & JOHNSON, L. N. 1996. Distinct early and late subcomponents of the photic blink reflex: response characteristics in patients with retrogeniculate lesions. *Psychophysiology*, 33, 239-51.
- HANSEN, R. M. & FULTON, A. B. 1986. Pupillary changes during dark adaptation in human infants. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 27, 1726-9.
- HARMENING, W. M. & WAGNER, H. 2011. From optics to attention: visual perception in barn owls. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 197, 1031-42.
- HAWES, M. J. & DORTZBACH, R. K. 1982. The microscopic anatomy of the lower eyelid retractors. *Arch Ophthalmol*, 100, 1313-8.
- HAYHOE, M. & BALLARD, D. 2005. Eye movements in natural behavior. *Trends Cogn Sci*, 9, 188-94.
- HIMEBAUGH, N. L., WRIGHT, A. R., BRADLEY, A., BEGLEY, C. G. & THIBOS, L. N. 2003. Use of retroillumination to visualize optical aberrations caused by tear film break-up. *Optom Vis Sci*, 80, 69-78.
- HODOS, W. & BONBRIGHT, J. C. 1974. Intensity difference thresholds in pigeons after lesions of the tectofugal and thalamofugal visual pathways. *J Comp Physiol Psychol*, 87, 1013-31.
- HODOS, W. & KARTEN, H. J. 1970. Visual intensity and pattern discrimination deficits after lesions of ectostriatum in pigeons. *J Comp Neurol*, 140, 53-68.
- HORI, J., SAKANO, K. & SAITOH, Y. 2004. Development of communication supporting device controlled by eye movements and voluntary eye blink. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 6, 4302-5.
-

-
-
- HORI, N., TAKAMORI, M., HIRAYAMA, M., WATANABE, H., NAKAMURA, T., YAMASHITA, F., ITO, H., MABUCHI, N. & SOBUE, G. 2008. Pupillary supersensitivity and visual disturbance in Parkinson's disease. *Clin Auton Res*, 18, 20-7.
- HORN, A. K., BUTTNER-ENNEVER, J. A., GAYDE, M. & MESSOUDI, A. 2000. Neuroanatomical identification of mesencephalic premotor neurons coordinating eyelid with upgaze in the monkey and man. *J Comp Neurol*, 420, 19-34.
- HUBEL, D. H. & WIESEL, T. N. 1959. Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *J Physiol*, 148, 574-91.
- HUETZ, C., DEL NEGRO, C., LEBAS, N., TARROUX, P. & EDELINE, J. M. 2006. Contribution of spike timing to the information transmitted by HVC neurons. *Eur J Neurosci*, 24, 1091-108.
- HUNG, G., HSU, F. & STARK, L. 1977. Dynamics of the human eyeblink. *Am J Optom Physiol Opt*, 54, 678-90.
- HUPE, J. M., BORDIER, C. & DOJAT, M. 2012. A BOLD signature of eyeblinks in the visual cortex. *Neuroimage*, 61, 149-61.
- HUPE, J. M., LAMIREL, C. & LORENCEAU, J. 2009. Pupil dynamics during bistable motion perception. *J Vis*, 9, 10.
- IBBOTSON, M. & KREKELBERG, B. 2011. Visual perception and saccadic eye movements. *Curr Opin Neurobiol*, 21, 553-8.
- ICHIKAWA, N. & OHIRA, H. 2004. Eyeblink activity as an index of cognitive processing: temporal distribution of eyeblinks as an indicator of expectancy in semantic priming. *Percept Mot Skills*, 98, 131-40.
- JACOBS, G. H., DEEGAN, J. F., 2ND, NEITZ, J., CROGNALE, M. A. & NEITZ, M. 1993. Photopigments and color vision in the nocturnal monkey, *Aotus*. *Vision Res*, 33, 1773-83.
- JEANNEROD, M. & PUTKONEN, P. T. 1971. Lateral geniculate unit activity and eye movements: saccade-locked changes in dark and in light. *Exp Brain Res*, 13, 533-46.
- KAGA, K., NAKAMURA, M., FURUYA, N. & SHINDO, M. 2001. Analysis of optokinetic nystagmus in patients with lesions on the left unilateral parietal lobe or the entire left hemisphere. *Acta Otolaryngol Suppl*, 545, 166-9.
- KAMINER, J., POWERS, A. S., HORN, K. G., HUI, C. & EVINGER, C. 2011. Characterizing the spontaneous blink generator: an animal model. *J Neurosci*, 31, 11256-67.
- KARSON, C. N., BERMAN, K. F., DONNELLY, E. F., MENDELSON, W. B., KLEINMAN, J. E. & WYATT, R. J. 1981. Speaking, thinking, and blinking. *Psychiatry Res*, 5, 243-6.
-

-
- KARSON, C. N., GOLDBERG, T. E. & LELESZI, J. P. 1986. Increased blink rate in adolescent patients with psychosis. *Psychiatry Res*, 17, 195-8.
- KARTEN, H. J., HODOS, W., NAUTA, W. J. & REVZIN, A. M. 1973. Neural connections of the "visual wulst" of the avian telencephalon. Experimental studies in the pigeon (*Columba livia*) and owl (*Speotyto cunicularia*). *J Comp Neurol*, 150, 253-78.
- KAZEM, S. S. & BEHZAD, D. 2006. Role of blink reflex in diagnosis of subclinical cranial neuropathy in diabetic mellitus type II. *Am J Phys Med Rehabil*, 85, 449-52.
- KEAT, J., REINAGEL, P., REID, R. C. & MEISTER, M. 2001. Predicting every spike: a model for the responses of visual neurons. *Neuron*, 30, 803-17.
- KENNARD, D. W. & GLASER, G. H. 1964. An Analysis of Eyelid Movements. *J Nerv Ment Dis*, 139, 31-48.
- KIMURA, J. 1975. Electrically elicited blink reflex in diagnosis of multiple sclerosis. Review of 260 patients over a seven-year period. *Brain*, 98, 413-26.
- KIRSTEN, S. J. & KIRSTEN, E. B. 1983. Spontaneous blink rates of birds. *Condor*, 85, 92-93.
- KNUDSEN, E. I. 1982. Auditory and visual maps of space in the optic tectum of the owl. *J Neurosci*, 2, 1177-94.
- KNUDSEN, E. I., COHEN, Y. E. & MASINO, T. 1995. Characterization of a forebrain gaze field in the archistriatum of the barn owl: microstimulation and anatomical connections. *J Neurosci*, 15, 5139-51.
- KOCH, M. & SCHNITZLER, H. U. 1997. The acoustic startle response in rats--circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav Brain Res*, 89, 35-49.
- KOEKKOEK, S. K., DEN OUDEN, W. L., PERRY, G., HIGHSTEIN, S. M. & DE ZEEUW, C. I. 2002. Monitoring kinetic and frequency-domain properties of eyelid responses in mice with magnetic distance measurement technique. *J Neurophysiol*, 88, 2124-33.
- KOH, S., MAEDA, N., KURODA, T., HORI, Y., WATANABE, H., FUJIKADO, T., TANO, Y., HIROHARA, Y. & MIHASHI, T. 2002. Effect of tear film break-up on higher-order aberrations measured with wavefront sensor. *Am J Ophthalmol*, 134, 115-7.
- KOJIMA, M., SHIOIRI, T., HOSOKI, T., KITAMURA, H., BANDO, T. & SOMEYA, T. 2004. Pupillary light reflex in panic disorder. A trial using audiovisual stimulation. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 254, 242-4.
- KOROSEC, M., ZIDAR, I., REITS, D., EVINGER, C. & VANDERWERF, F. 2006. Eyelid movements during blinking in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*, 21, 1248-51.
- KOWLER, E. 2011. Eye movements: the past 25 years. *Vision Res*, 51, 1457-83.
-

-
- KRAEMER, S., DANKER-HOPFE, H., DORN, H., SCHMIDT, A., EHLERT, I. & HERRMANN, W. M. 2000. Time-of-day variations of indicators of attention: performance, physiologic parameters, and self-assessment of sleepiness. *Biol Psychiatry*, 48, 1069-80.
- KREIMAN, G., KRAHE, R., METZNER, W., KOCH, C. & GABBIANI, F. 2000. Robustness and variability of neuronal coding by amplitude-sensitive afferents in the weakly electric fish *eigenmannia*. *J Neurophysiol*, 84, 189-204.
- KUCHNOW, K. P. 1971. Elasmobranch Pupillary Response. *Vision Research*, 11, 1395-&.
- LAMB, T. D. 2009. Evolution of vertebrate retinal photoreception. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364, 2911-24.
- LAND, M. F. 1999. Motion and vision: why animals move their eyes. *J Comp Physiol A*, 185, 341-52.
- LAND, M. F. & HAYHOE, M. 2001. In what ways do eye movements contribute to everyday activities? *Vision Res*, 41, 3559-65.
- LAURSEN, M. & REKLING, J. C. 2006. The Edinger-Westphal nucleus of the juvenile rat contains transient- and repetitive-firing neurons. *Neuroscience*, 141, 191-200.
- LEE, D. & MALPELI, J. G. 1998. Effects of saccades on the activity of neurons in the cat lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol*, 79, 922-36.
- LEIGH, R. J. & ZEE, D. S. (eds.) 1999. *The Neurology of Eye Movements*, New York: Oxford University Press.
- LEOPOLD, D. A. & LOGOTHETIS, N. K. 1998. Microsaccades differentially modulate neural activity in the striate and extrastriate visual cortex. *Exp Brain Res*, 123, 341-5.
- LEVINE, J. 1955. Consensual pupillary response in birds. *Science*, 122, 690.
- LEWICKI, M. S. 1998. A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Network*, 9, R53-78.
- LI, T. & HOWLAND, H. C. 1999. A true neuronal consensual pupillary reflex in chicks. *Vision Res*, 39, 897-900.
- LIND, O. E., KELBER, A. & KROGER, R. H. 2008. Multifocal optical systems and pupil dynamics in birds. *J Exp Biol*, 211, 2752-8.
- LIU, G. B. & PETTIGREW, J. D. 2003. Orientation mosaic in barn owl's visual Wulst revealed by optical imaging: comparison with cat and monkey striate and extra-striate areas. *Brain Res*, 961, 153-8.
- LIVINGSTONE, M. & HUBEL, D. 1988. Segregation of form, color, movement, and depth: anatomy, physiology, and perception. *Science*, 240, 740-9.
-

-
- LO, F. S. & ZHU, J. J. 1997. Lack of visual suppression in the rabbit lateral geniculate nucleus during blink reflex. *Brain Res*, 767, 176-9.
- LOWENSTEIN, O. & FRIEDMAN, E. D. 1942. Pupillographic Studies: I. Present State of Pupillography; its Method and Diagnostic Significance. *ARCHIVES OF OPHTHALMOLOGY*, 27, 969-993.
- LOWENSTEIN, O. & LOEWENFELD, I. E. 1950. Mutual role of sympathetic and parasympathetic in shaping of the pupillary reflex to light; pupillographic studies. *Arch Neurol Psychiatry*, 64, 341-77.
- LOWENSTEIN, O. & LOEWENFELD, I. E. 1959. Influence of retinal adaptation upon the pupillary reflex to light in normal man. Part I. Effect of adaptation to bright light on the pupillary threshold. *Am J Ophthalmol*, 48(5)Pt 2, 536-50.
- LOWENSTEIN, O. & LOEWENFELD, I. E. 1959. Scotopic and photopic thresholds of the pupillary light reflex in normal man. *Am J Ophthalmol*, 48, 87-98.
- LU, W., TAN, J., ZHANG, K. & LEI, B. 2008. Computerized mouse pupil size measurement for pupillary light reflex analysis. *Comput Methods Programs Biomed*, 90, 202-9.
- MACLEOD, K., BACKER, A. & LAURENT, G. 1998. Who reads temporal information contained across synchronized and oscillatory spike trains? *Nature*, 395, 693-8.
- MALBOUISSON, J. M., AA, E. C., MESSIAS, A., LEITE, L. V. & RIOS, G. D. 2005. Upper and lower eyelid saccades describe a harmonic oscillator function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 857-62.
- MALBOUISSON, J. M., MESSIAS, A., GARCIA, D. M., CECHETTI SDE, P., BARBOSA, J. C. & CRUZ, A. A. 2010. Modeling upper eyelid kinematics during spontaneous and reflex blinks. *J Neurosci Methods*, 191, 119-25.
- MANN, I. 1931. Iris pattern in the Vertebrates. *The Transactions of the Zoological Society of London*, 21.
- MANNING, K. A., RIGGS, L. A. & KOMENDA, J. K. 1983. Reflex eyeblinks and visual suppression. *Percept Psychophys*, 34, 250-6.
- MANTE, V., FRAZOR, R. A., BONIN, V., GEISLER, W. S. & CARANDINI, M. 2005. Independence of luminance and contrast in natural scenes and in the early visual system. *Nat Neurosci*, 8, 1690-7.
- MARTIN, G. R. 2009. What is binocular vision for? A birds' eye view. *J Vis*, 9, 14 1-19.
- MARTINEAU, J., HERNANDEZ, N., HIEBEL, L., ROCHE, L., METZGER, A. & BONNET-BRILHAULT, F. 2011. Can pupil size and pupil responses during visual scanning

-
- contribute to the diagnosis of autism spectrum disorder in children? *J Psychiatr Res*, 45, 1077-82.
- MARTINEZ-CONDE, S., MACKNIK, S. L. & HUBEL, D. H. 2000. Microsaccadic eye movements and firing of single cells in the striate cortex of macaque monkeys. *Nat Neurosci*, 3, 251-8.
- MARZLUFF, J. M., MIYAOKA, R., MINOSHIMA, S. & CROSS, D. J. 2012. Brain imaging reveals neuronal circuitry underlying the crow's perception of human faces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 15912-7.
- MEYER, C. H., LASKER, A. G. & ROBINSON, D. A. 1985. The upper limit of human smooth pursuit velocity. *Vision Res*, 25, 561-3.
- MIKROPOULOS, E. H., PAPATHANASIOU, A. A., HADJIGEORGIOU, G., TSIRONI, E. & PAPADIMITRIOU, A. 2010. Supratentorial multiple sclerosis lesions affect the blink reflex test. *Open Neurol J*, 4, 92-9.
- MONTES-MICO, R., CERVINO, A., FERRER-BLASCO, T., GARCIA-LAZARO, S. & MADRID-COSTA, D. 2010. The tear film and the optical quality of the eye. *Ocul Surf*, 8, 185-92.
- MORRONE, M. C., ROSS, J. & BURR, D. 2005. Saccadic eye movements cause compression of time as well as space. *Nat Neurosci*, 8, 950-4.
- MORRONE, M. C., ROSS, J. & BURR, D. C. 1997. Apparent position of visual targets during real and simulated saccadic eye movements. *J Neurosci*, 17, 7941-53.
- MOWRER, O. H. 1933. A comparison of the visual function of nictitation and blinking. *Journal of Comparative Psychology*, 15, 75-95.
- NAGEL, T. 1974. What Is It Like to Be a Bat? *The Philosophical Review*, 83, 435-450.
- NAKAMURA, K. & COLBY, C. L. 2002. Updating of the visual representation in monkey striate and extrastriate cortex during saccades. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4026-31.
- NAKAMURA, M., SEKIYA, Y. & YAMAMOTO, M. 1996. Preservation of photic blink reflex in Leber's hereditary optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37, 2736-43.
- NAKAYAMA, M., YAMAMOTO, K. & KOBAYASHI, F. 2008. Estimation of Sleepiness using Frequency Components of Pupillary Response. *Biomedical Circuits and Systems Conference*, 357-360.
- NASSI, J. J. & CALLAWAY, E. M. 2009. Parallel processing strategies of the primate visual system. *Nat Rev Neurosci*, 10, 360-72.
-

-
- NDIAYE, A., PINGANAUD, G., BUISSERET-DELMAS, C., BUISSERET, P. & VANDERWERF, F. 2002. Organization of trigeminocollicular connections and their relations to the sensory innervation of the eyelids in the rat. *J Comp Neurol*, 448, 373-87.
- NEUHUBER, W. & SCHRODL, F. 2011. Autonomic control of the eye and the iris. *Auton Neurosci*, 165, 67-79.
- NIEDER, A. & WAGNER, H. 1999. Perception and neuronal coding of subjective contours in the owl. *Nat Neurosci*, 2, 660-3.
- NIEDER, A. & WAGNER, H. 2000. Horizontal-disparity tuning of neurons in the visual forebrain of the behaving barn owl. *J Neurophysiol*, 83, 2967-79.
- NIEDER, A. & WAGNER, H. 2001. Hierarchical processing of horizontal disparity information in the visual forebrain of behaving owls. *J Neurosci*, 21, 4514-22.
- OHAYON, S., HARMENING, W., WAGNER, H. & RIVLIN, E. 2008. Through a barn owl's eyes: interactions between scene content and visual attention. *Biol Cybern*, 98, 115-32.
- OHBA, N. & ALPERN, M. 1972. Adaptation of the pupil light reflex. *Vision Res*, 12, 953-67.
- OLIPHANT, L. W., JOHNSON, M. R., MURPHY, C. & HOWLAND, H. 1983. The musculature and pupillary response of the great horned owl iris. *Exp Eye Res*, 37, 583-95.
- ORBAN DE XIVRY, J. J. & LEFEVRE, P. 2007. Saccades and pursuit: two outcomes of a single sensorimotor process. *J Physiol*, 584, 11-23.
- PASTERNAK, T. & HODOS, W. 1977. Intensity difference thresholds after lesions of the visual Wulst in pigeons. *J Comp Physiol Psychol*, 91, 485-97.
- PELAH, A., LIU, S., GILBERT, M., HOCK, H. & JEPSON, P. 2009. Reflections on the Eyelid: Experiencing Structured Light through Closed Eyes. *Journal of Vision*, 9, 761-761.
- PESHORI, K. R., SCHICATANO, E. J., GOPALASWAMY, R., SAHAY, E. & EVINGER, C. 2001. Aging of the trigeminal blink system. *Exp Brain Res*, 136, 351-63.
- PETTIGREW, J. D. 1979. Binocular visual processing in the owl's telencephalon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 204, 435-54.
- PETTIGREW, J. D. & KONISHI, M. 1976. Neurons selective for orientation and binocular disparity in the visual Wulst of the barn owl (*Tyto alba*). *Science*, 193, 675-8.
- PFEIFER, R. & BONGARD, J. 2006. *How the Body Shapes the Way We Think: A New View of Intelligence*, A Bradford Book.
- PINTO, L. & BARON, J. 2009. Spatiotemporal frequency and speed tuning in the owl visual wulst. *Eur J Neurosci*, 30, 1251-68.
- PINTO, L. & BARON, J. 2010. Spatiotemporal frequency tuning dynamics of neurons in the owl visual wulst. *J Neurophysiol*, 103, 3424-36.
-

-
-
- PONG, M. & FUCHS, A. F. 2000. Characteristics of the pupillary light reflex in the macaque monkey: discharge patterns of pretectal neurons. *J Neurophysiol*, 84, 964-74.
- PONG, M. & FUCHS, A. F. 2000. Characteristics of the pupillary light reflex in the macaque monkey: metrics. *J Neurophysiol*, 84, 953-63.
- POWERS, A. S., SCHICATANO, E. J., BASSO, M. A. & EVINGER, C. 1997. To blink or not to blink: inhibition and facilitation of reflex blinks. *Exp Brain Res*, 113, 283-90.
- REINAGEL, P. & REID, R. C. 2002. Precise firing events are conserved across neurons. *J Neurosci*, 22, 6837-41.
- REMMEL, R. S. 1984. An inexpensive eye movement monitor using the scleral search coil technique. *IEEE Trans Biomed Eng*, 31, 388-90.
- REPPAS, J. B., USREY, W. M. & REID, R. C. 2002. Saccadic eye movements modulate visual responses in the lateral geniculate nucleus. *Neuron*, 35, 961-74.
- RIDDER, W. H., 3RD & TOMLINSON, A. 1993. Suppression of contrast sensitivity during eyelid blinks. *Vision Res*, 33, 1795-802.
- RIDDER, W. H., 3RD & TOMLINSON, A. 1995. Spectral characteristics of blink suppression in normal observers. *Vision Res*, 35, 2569-78.
- RIDDER, W. H., 3RD & TOMLINSON, A. 1997. A comparison of saccadic and blink suppression in normal observers. *Vision Res*, 37, 3171-9.
- RIGGS, L. A., KELLY, J. P., MANNING, K. A. & MOORE, R. K. 1987. Blink-related eye movements. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 28, 334-42.
- RIGGS, L. A., VOLKMANN, F. C. & MOORE, R. K. 1981. Suppression of the blackout due to blinks. *Vision Res*, 21, 1075-9.
- RIVLIN-ETZION, M., RITOV, Y., HEIMER, G., BERGMAN, H. & BAR-GAD, I. 2006. Local shuffling of spike trains boosts the accuracy of spike train spectral analysis. *J Neurophysiol*, 95, 3245-56.
- ROBINSON, D. A. 1963. A Method of Measuring Eye Movement Using a Scleral Search Coil in a Magnetic Field. *IEEE Trans Biomed Eng*, 10, 137-45.
- ROBINSON, J., BAYLISS, S. C. & FIELDER, A. R. 1991. Transmission of light across the adult and neonatal eyelid in vivo. *Vision Res*, 31, 1837-40.
- ROSS, J., MORRONE, M. C. & BURR, D. C. 1997. Compression of visual space before saccades. *Nature*, 386, 598-601.
- SALES, F. C. 1990. *Morfologia dos Fotorreceptores da coruja buraqueira (Speotyto cunicularia)*. Unifesp.

-
-
- SCHAEFFEL, F. & WAGNER, H. 1992. Barn owls have symmetrical accommodation in both eyes, but independent pupillary responses to light. *Vision Res*, 32, 1149-55.
- SCHELLINI, S. A., SAMPAIO, A. A., JR., HOYAMA, E., CRUZ, A. A. & PADOVANI, C. R. 2005. Spontaneous eye blink analysis in the normal individual. *Orbit*, 24, 239-42.
- SCHNEEWEIS, D. M. & SCHNAPF, J. L. 1999. The photovoltage of macaque cone photoreceptors: adaptation, noise, and kinetics. *J Neurosci*, 19, 1203-16.
- SHAPLEY, R. & ENROTH-CUGELL, C. 1984. Visual Adaptation and Retinal Gain Controls. *Progress in retinal research* 3.
- SHERMAN, S. M. 2001. Tonic and burst firing: dual modes of thalamocortical relay. *Trends Neurosci*, 24, 122-6.
- SHIMIZU, T. & BOWERS, A. N. 1999. Visual circuits of the avian telencephalon: evolutionary implications. *Behav Brain Res*, 98, 183-91.
- SIEGLE, G. J., ICHIKAWA, N. & STEINHAEUER, S. 2008. Blink before and after you think: blinks occur prior to and following cognitive load indexed by pupillary responses. *Psychophysiology*, 45, 679-87.
- SILLITO, A. M. & JONES, H. E. 2004. Feedback systems in visual processing. In: CHALUPA, L. M. & WERNER, J. S. (eds.) *The visual neurosciences*. Cambridge: MIT Press.
- SKOTTUN, B. C., DE VALOIS, R. L., GROSOFF, D. H., MOVSHON, J. A., ALBRECHT, D. G. & BONDS, A. B. 1991. Classifying simple and complex cells on the basis of response modulation. *Vision Res*, 31, 1079-86.
- SMIT, A. E. 2008. *Blinking and the Brain: Pathways and Pathology*. Dissertation, Erasmus University Rotterdam.
- SNYDER, A. W. & PASK, C. 1973. The Stiles-Crawford effect--explanation and consequences. *Vision Res*, 13, 1115-37.
- SOMMER, M. A. & WURTZ, R. H. 2002. A pathway in primate brain for internal monitoring of movements. *Science*, 296, 1480-2.
- SOMMER, M. A. & WURTZ, R. H. 2004. What the brain stem tells the frontal cortex. I. Oculomotor signals sent from superior colliculus to frontal eye field via mediodorsal thalamus. *J Neurophysiol*, 91, 1381-402.
- SOMMER, M. A. & WURTZ, R. H. 2004. What the brain stem tells the frontal cortex. II. Role of the SC-MD-FEF pathway in corollary discharge. *J Neurophysiol*, 91, 1403-23.
- SOMMER, M. A. & WURTZ, R. H. 2006. Influence of the thalamus on spatial visual processing in frontal cortex. *Nature*, 444, 374-7.
-

-
- SOMMER, M. A. & WURTZ, R. H. 2008. Visual perception and corollary discharge. *Perception*, 37, 408-18.
- SOUZA, J. K., PINTO, M. A., VIEIRA, P. G., BARON, J. & TIERRA-CRIOLLO, C. J. 2013. An open-source, FireWire camera-based, Labview-controlled image acquisition system for automated, dynamic pupillometry and blink detection. *Comput Methods Programs Biomed*, 112, 607-23.
- SPERRY, R. W. 1950. Neural basis of the spontaneous optokinetic response produced by visual inversion. *J Comp Physiol Psychol*, 43, 482-9.
- STAVA, M. W., HUFFMAN, M. D., BAKER, R. S., EPSTEIN, A. D. & PORTER, J. D. 1994. Conjugacy of spontaneous blinks in man: eyelid kinematics exhibit bilateral symmetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35, 3966-71.
- STEINBACH, M. J. & MONEY, K. E. 1973. Eye movements of the owl. *Vision Res*, 13, 889-91.
- STEVENSON, S. B., VOLKMANN, F. C., KELLY, J. P. & RIGGS, L. A. 1986. Dependence of visual suppression on the amplitudes of saccades and blinks. *Vision Res*, 26, 1815-24.
- STIBBE, E. P. 1928. A Comparative Study of the Nictitating Membrane of Birds and Mammals. *J Anat*, 62, 159-76.
- STILES, W. S. & CRAWFORD, B. H. 1933. The Luminous Efficiency of Rays Entering the Eye Pupil at Different Points. *Proceedings of the Royal Society*, 112, 428-450.
- SUN, W. S., BAKER, R. S., CHUKE, J. C., ROUHOLIMAN, B. R., HASAN, S. A., GAZA, W., STAVA, M. W. & PORTER, J. D. 1997. Age-related changes in human blinks. Passive and active changes in eyelid kinematics. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38, 92-9.
- SURAKKA, J., RUUTIAINEN, J., ROMBERG, A., PUUKKA, P., KRONHOLM, E. & KARANKO, H. 2008. Pupillary function in early multiple sclerosis. *Clin Auton Res*, 18, 150-4.
- SYLVESTER, R., HAYNES, J. D. & REES, G. 2005. Saccades differentially modulate human LGN and V1 responses in the presence and absence of visual stimulation. *Curr Biol*, 15, 37-41.
- SYLVESTER, R. & REES, G. 2006. Extraretinal saccadic signals in human LGN and early retinotopic cortex. *Neuroimage*, 30, 214-9.
- TADA, H., OMORI, Y., HIROKAWA, K., OHIRA, H. & TOMONAGA, M. 2013. Eye-blink behaviors in 71 species of primates. *PLoS One*, 8, e66018.
- TOLIAS, A. S., MOORE, T., SMIRNAKIS, S. M., TEHOVNIK, E. J., SIAPAS, A. G. & SCHILLER, P. H. 2001. Eye movements modulate visual receptive fields of V4 neurons. *Neuron*, 29, 757-67.
-

-
- TORRES, S. A. 2002. *The blink reflex: comparative electrophysiologic study in the domestic species*. Universitat Autònoma de Barcelona.
- TOYAMA, K., KIMURA, M. & KOMATSU, Y. 1984. Activity of the striate cortex cells during saccadic eye movements of the alert cat. *Neurosci Res*, 1, 207-22.
- TSE, P. U., BAUMGARTNER, F. J. & GREENLEE, M. W. 2010. Event-related functional MRI of cortical activity evoked by microsaccades, small visually-guided saccades, and eyeblinks in human visual cortex. *Neuroimage*, 49, 805-16.
- TSUBOTA, K., KWONG, K. K., LEE, T. Y., NAKAMURA, J. & CHENG, H. M. 1999. Functional MRI of brain activation by eye blinking. *Exp Eye Res*, 69, 1-7.
- TUTT, R., BRADLEY, A., BEGLEY, C. & THIBOS, L. N. 2000. Optical and visual impact of tear break-up in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 4117-23.
- VALETON, J. M. & VAN NORREN, D. 1983. Light adaptation of primate cones: an analysis based on extracellular data. *Vision Res*, 23, 1539-47.
- VANDERMEER, S. & AMSEL, A. 1952. Work and rest factors in eyelid conditioning. *J Exp Psychol*, 43, 261-73.
- VANDERWERF, F., BRASSINGA, P., REITS, D., ARAMIDEH, M. & ONGERBOER DE VISSER, B. 2003. Eyelid movements: behavioral studies of blinking in humans under different stimulus conditions. *J Neurophysiol*, 89, 2784-96.
- VANDERWERF, F., BUISSERET-DELMAS, C. & BUISSERET, P. 2002. Afferent innervation of eyelids and their connections to the superior colliculus. *Mov Disord*, 17 Suppl 2, S8-11.
- VICTOR, J. D. & PURPURA, K. P. 1996. Nature and precision of temporal coding in visual cortex: a metric-space analysis. *J Neurophysiol*, 76, 1310-26.
- VIEIRA, P. G. & BARON, J. 2014. Contrast response function in the owl visual wulst: A single-unit study. *Journal of Neurophysiology*.
- VILLARREAL, R. P. & STEINMETZ, J. E. 2005. Neuroscience and learning: lessons from studying the involvement of a region of cerebellar cortex in eyeblink classical conditioning. *J Exp Anal Behav*, 84, 631-52.
- VOLKMANN, F. C. 1962. Vision during voluntary saccadic eye movements. *J Opt Soc Am*, 52, 571-8.
- VOLKMANN, F. C. 1986. Human visual suppression. *Vision Res*, 26, 1401-16.
- VOLKMANN, F. C., RIGGS, L. A. & MOORE, R. K. 1980. Eyeblinks and visual suppression. *Science*, 207, 900-2.
- WAGNER, H. & FROST, B. 1993. Disparity-sensitive cells in the owl have a characteristic disparity. *Nature*, 364, 796-8.
-

-
- WANG, W., JONES, H. E., ANDOLINA, I. M., SALT, T. E. & SILLITO, A. M. 2006. Functional alignment of feedback effects from visual cortex to thalamus. *Nat Neurosci*, 9, 1330-6.
- WEISS, C. & DISTERHOFT, J. F. 2011. Exploring prefrontal cortical memory mechanisms with eyeblink conditioning. *Behav Neurosci*, 125, 318-26.
- WESTHEIMER, G. 2008. Directional sensitivity of the retina: 75 years of Stiles-Crawford effect. *Proc Biol Sci*, 275, 2777-86.
- WILHELM, B. J., WIDMANN, A., DURST, W., HEINE, C. & OTTO, G. 2009. Objective and quantitative analysis of daytime sleepiness in physicians after night duties. *Int J Psychophysiol*, 72, 307-13.
- WOLKOFF, P., NOJGAARD, J. K., FRANCK, C. & SKOV, P. 2006. The modern office environment desiccates the eyes? *Indoor Air*, 16, 258-65.
- WOODHOUSE, J. M. & CAMPBELL, F. W. 1975. The role of the pupil light reflex in aiding adaptation to the dark. *Vision Res*, 15, 649-53.
- WURTZ, R. H. 1969. Response of striate cortex neurons to stimuli during rapid eye movements in the monkey. *J Neurophysiol*, 32, 975-86.
- WURTZ, R. H. 2008. Neuronal mechanisms of visual stability. *Vision Res*, 48, 2070-89.
- WURTZ, R. H., JOINER, W. M. & BERMAN, R. A. 2011. Neuronal mechanisms for visual stability: progress and problems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 366, 492-503.
- YANG, Y., CAO, P. & WANG, S. R. 2008. Corollary discharge circuits for saccadic modulation of the pigeon visual system. *Nat Neurosci*, 11, 595-602.
- YARROW, K., HAGGARD, P., HEAL, R., BROWN, P. & ROTHWELL, J. C. 2001. Illusory perceptions of space and time preserve cross-saccadic perceptual continuity. *Nature*, 414, 302-5.
- YATES, S. K. & BROWN, W. F. 1981. Light-stimulus-evoked blink reflex: methods, normal values, relation to other blink reflexes, and observations in multiple sclerosis. *Neurology*, 31, 272-81.

9. Anexos

Anexo IA

| Ministério do Meio Ambiente Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais | | | |
|---|----------------|--|-------------|
|  | |  | |
| Renováveis CADASTRO TÉCNICO FEDERAL CERTIFICADO DE REGULARIDADE | | | |
| Nr. de Cadastro: | CPF/CNPJ: | Emitido em: | Válido até: |
| 3076223 | 015.692.686-57 | 18/11/2011 | 18/02/2012 |
| Nome/Razão Social/Endereço Jerome Paul Armand Baron Rua Paulo Afonso, 441/701 Santo Antônio BELO HORIZONTE/MG | | | |
| Este certificado comprova a regularidade no Cadastro de Atividades Potencialmente Poluidoras Atividades diversas / Análises laboratórias Uso de Recursos Naturais / Criadouro científico de fauna silvestre para fins de pesquisa | | | |
| Observações: 1 - Este certificado não habilita o interessado ao exercício da(s) atividade(s) descrita(s), sendo necessário, conforme o caso de obtenção de licença, permissão ou autorização específica após análise técnica do IBAMA, do programa ou projeto correspondente: 2 - No caso de encerramento de qualquer atividade especificada neste certificado, o interessado deverá comunicar ao IBAMA, obrigatoriamente, no prazo de 30 (trinta) dias, a ocorrência para atualização do sistema. 3 - Este certificado não substitui a necessária licença ambiental emitida pelo órgão competente. 4 - Este certificado não habilita o transporte de produtos ou subprodutos florestais e faunísticos. | | A inclusão de Pessoas Físicas e Jurídicas no Cadastro Técnico Federal não implicará por parte do IBAMA e perante terceiros, em certificação de qualidade, nem juízo de valor de qualquer espécie. Autenticação xp5h.fblu.vfk4.32i8 | |

Anexo IB



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
DIRETORIA DE USO SUSTENTAVEL DA BIODIVERSIDADE E FLORESTAS COORDENAÇÃO
DE GESTÃO DO USO DE ESPÉCIES DA FAUNA



AUTORIZAÇÃO DE MANEJO DA FAUNA SILVESTRE Nº 3106.6995/2012-MG

FICA AUTORIZADO USO E MANEJO DA FAUNA SILVESTRE DAS ATIVIDADES DO EMPREENDIMENTO ABAIXO DESCRITO, DE ACORDO COM AS ESPECIFICAÇÕES CONSTANTES DA DOCUMENTAÇÃO/ PROJETO APRESENTADA E APROVADA.

1 - IDENTIFICAÇÃO DO EMPREENDIMENTO

| | |
|--|---------------------------------|
| 1.1 - Empreendimento: CRIATÓRIO CIENTIFICO DE FAUNA SILVESTRE ICB-UFMG | |
| 1.2 - Empreendedor: INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/UFMG | |
| 1.3 - C.P.F./C.N.P.J.: 17.217.985/0013-48 | 1.4 - CTF Nº: 2043710 |

2 - DESCRIÇÃO DA ATIVIDADE

| | |
|---|--|
| 2.1 - Categoria: 20.45 - CRIADOURO CIENTÍFICO DE FAUNA SILVESTRE PARA FINS DE PESQUISA | |
| 2.2 - SubCategoria: CRIADOUROS DE ESPÉCIES DA FAUNA SILVESTRE, NATIVA E EXÓTICA PARA FINS CIENTÍFICOS (VINCULADO A INSTITUIÇÕES PÚBLICAS DE PESQUISA) | |
| 2.3 - Finalidade: ----- | |
| 2.4 - Espécie(s): (Em anexo) | 2.5 - Condicionantes: (Em anexo) |

3 - ENDEREÇO

| |
|---|
| 3.1 - Endereço: Av. Antônio Carlos 6627 |
| 3.2 - Bairro: Pampulha |
| 3.3 - Município/UF: BELO HORIZONTE/MG |

DATA DO DEFERIMENTO

DATA DA EMISSÃO 04/10/2012

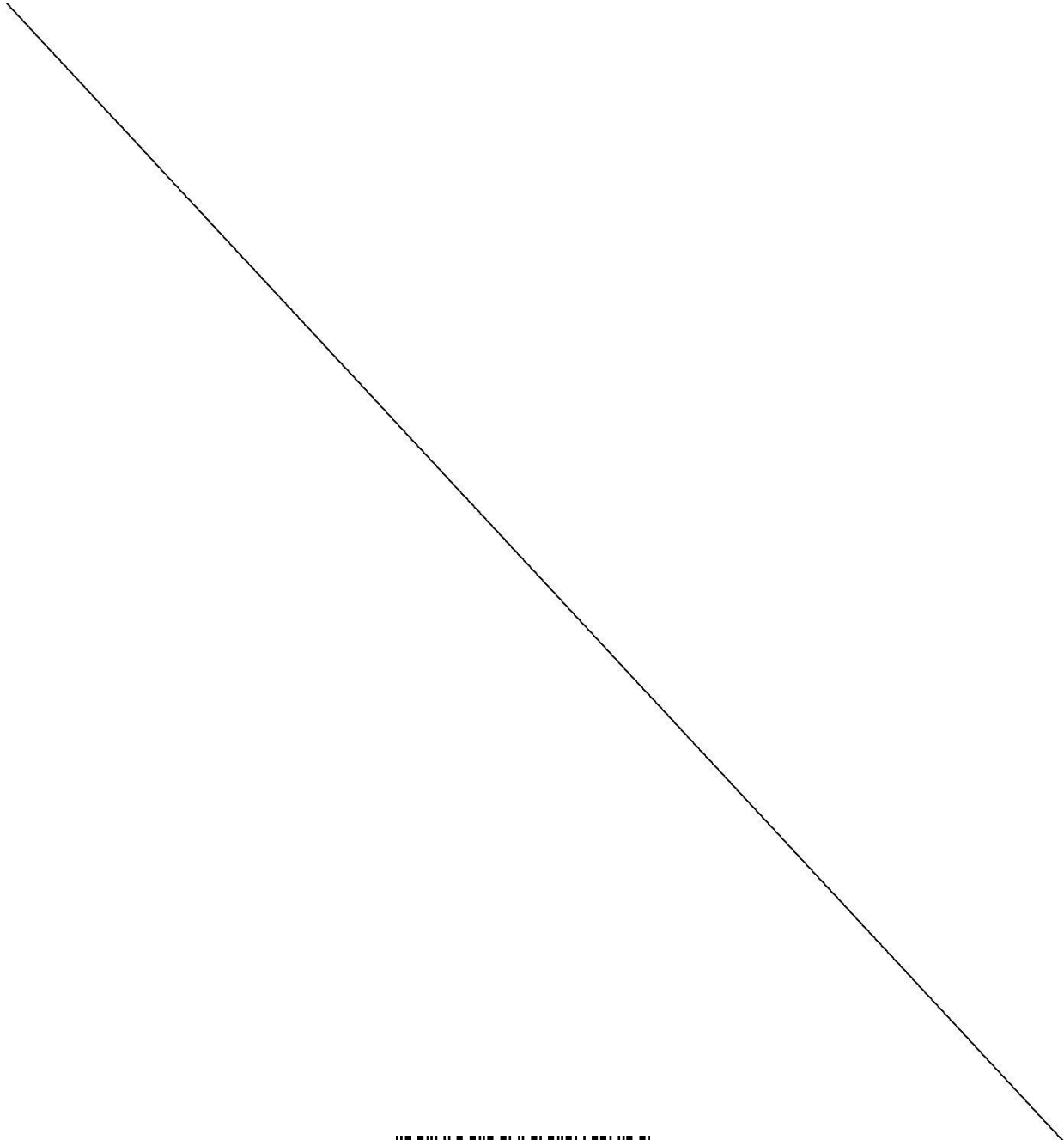


Autorização de Uso e Manejo Nº 3106.6995/2012-MG - Pág 1/3



ESPÉCIE(S):

Asio clamator, Asio stygius, Athene cunicularia, Buteo albicaudatus, Buteo magnirostris, Callithrix aurita, Callithrix flaviceps, Callithrix geoffroyi, Callithrix jacchus, Callithrix kuhlii, Falco femoralis, Falco sparverius, Megascops atricapilla, Megascops choliba, Speotyto cunicularia, Tyto alba. #####
#####





CONDICIONANTES DA AUTORIZAÇÃO PARA MANEJO DA FAUNA SILVESTRE

1. Quaisquer alterações quanto à documentação/projeto do empreendimento deverão ser precedidas de anuência do Ibama.
2. Em caso de ampliação das instalações ou de inclusão de nova espécie da fauna silvestre no plantel do empreendimento, o interessado deverá solicitar outra autorização prévia e autorização de instalação.
 - 2.1- Ao concluir as novas obras conforme planta aprovada, deverá ser solicitada vistoria dos recintos e inclusão da nova espécie na autorização de manejo da fauna silvestre já emitida.
 - 2.2- Em caso de exclusão de espécie já autorizada, o interessado deverá comunicar ao Ibama, que providenciará a retirada da espécie da autorização de manejo da fauna silvestre silvestre já emitida.
3. O desligamento do responsável técnico deverá ser oficializado ao Ibama, devendo o empreendedor apresentar, no prazo de 15 (quinze) dias, a partir do desligamento, cópia do contrato de assistência profissional ou da Anotação de Responsabilidade Técnica do novo técnico.
4. O Ibama, mediante decisão motivada, poderá modificar as condicionantes e as medidas de controle e adequação, suspender ou cancelar esta autorização, caso ocorra:
 - 4.1- Violação ou inadequação de quaisquer condicionantes ou norma legal;
 - 4.2- Omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição da autorização; ou
 - 4.3- Superveniência de graves riscos ambientais e da saúde pública.
5. O Ibama e os órgãos ambientais estadual, distrital ou municipal deverão ser comunicados, imediatamente, em caso de ocorrência de qualquer acidente que venha causar dano ambiental.
6. Os custos de construção, manutenção das instalações, manejo e alimentação dos espécimes da fauna silvestre serão de total responsabilidade do empreendedor, sem ônus de suas atividades ao Ibama.
7. A soltura, introdução, reintrodução ou translocação de espécimes da fauna silvestre na natureza, por pessoa física ou jurídica, somente poderá ocorrer mediante anuência do Ibama, desde que previsto em plano de manejo de fauna ou projeto de pesquisa aprovado e em concordância com norma específica.
8. Espécimes da fauna silvestre exótica ou híbridos de qualquer natureza não poderão, sob hipótese alguma, serem destinados para soltura.



Anexo II

From: CEUA <ceua@prpq.ufmg.br>
Subject: Decisão do CEUA
Date: 22 Nov 2012 17:11:12 GMT+01:00
To: jbaron@icb.ufmg.br



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Jerome Baron ,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto INVESTIGAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO PAPEL DOS CIRCUITOS TÁLAMO-TELENCEFÁLICOS NO PREENCHIMENTO DO ESCOTOMA TEMPORAL CAUSADO PELO PISCAR , submetido a esta comissão pelo protocolo 41 / 2011, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado com ressalva no dia 21/11/2012. Este Comitê entendeu que o descarte e o destino das carcaças será o mesmo informado (na resposta à diligência enviada por email) para os dejetos.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>
Belo Horizonte, 22/11/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br