UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

**Efeitos do abrasamento elétrico da amígdala
basolateral em padrões oscilatórios durante o sono**

LEONARDO RAKAUSKAS ZACHARIAS

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

LEONARDO RAKAUSKAS ZACHARIAS

Efeitos do abrasamento elétrico da amígdala basolateral em padrões oscilatórios durante o sono

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite

Co-orientador: Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Zacharias, Leonardo Rakauskas

Efeitos do abrasamento elétrico da amígdala basolateral em padrões oscilatórios durante o sono– Ribeirão Preto, 2018

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia, Eletrofisiologia e Comportamento.

Orientador: Leite, João Pereira.

Co-orientador: Lopes-Aguiar, Cleiton.

1. Epilepsia 2. Aprendizado. 3. Sono. 4. Eletrofisiologia. 5. Hipocampo. 6. Córtex pré-frontal. 7. Potenciais locais de campo.

NOME: ZACHARIAS, Leonardo Rakauskas

TÍTULO: Efeitos do abrasamento elétrico da amígdala basolateral em padrões oscilatórios durante o sono

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Neurociências

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. João Pereira Leite, por me aceitar como seu aluno de mestrado e possibilitar a realização deste trabalho. Agradeço ao Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar pelo convite a ingressar no mestrado e participar ativamente na realização deste trabalho, sempre disposto a ensinar e orientar. Este trabalho não seria possível sem a orientação destes dois professores.

Agradeço também aos membros do Laboratório de Investigação em Epilepsia, sempre abertos à discussão e dispostos em contribuir com os trabalhos desenvolvidos no laboratório. Nesse sentido agradeço especialmente ao Lucas Barone Peres e Rafael Naime Ruggiero, que juntamente com o Cleiton participaram ativamente no desenvolvimento técnico e teórico deste trabalho, desde a coleta de dados à discussão e interpretação dos resultados. Gostaria de agradecer também aos eletrofisiologistas Matheus, Danilo, Lézio e Fernando, que contribuíram neste trabalho ensinando e discutindo as melhores técnicas para a realização dos experimentos. Agradeço à Fernanda e Isabella por toda a ajuda nos experimentos comportamentais, e também à Renata e Dani, pelos ensinamentos e proatividade nas análises histológicas. Agradeço ao Renato Meirelles e Marco Antonio, sempre dispostos a resolver qualquer tipo de problema em nossos laboratórios e biotérios. Agradeço também aos colegas do Departamento de Neurologia e Neurociências, principalmente durante as pausas para o cafezinho.

Dos amigos de Ribeirão Preto gostaria de agradecer aos membros do Laboratório de Biomagnetismo, por além de iniciar minha carreira científica ainda manter as portas abertas para discussões e sugestões, mesmo em diferentes áreas de pesquisa. Agradeço especialmente ao Fernando Torrieri, Renan Matsuda, André Salles e Victor Souza por também auxiliar no planejamento técnico e sugestões principalmente em questões experimentais essenciais no desenvolvimento deste trabalho. Também agradeço aos amigos da República da Gruta e do Ribeirão Preto Rugby Clube.

I would like to thank Dr. Marie Carlén for accepting me as a Research Assistant at the Carlén Lab during my master. A special thanks to Nicolas Guyón, Sofie Ährlund, and Hoseok Kim, who dedicated part of their time to including me at

their projects, providing essential knowledge to my scientific development. I want to thank all the other friends at the DMC Lab for the collaboration for my scientific and personal formation.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Swedish Foundation for International Cooperation in Research and Higher Education (STINT), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento necessário ao desenvolvimento deste projeto.

Por ultimo, porém não menos importante, gostaria de agradecer à minha família. Agradeço aos meus pais, Fernando e Shirley, por todo o apoio e compreensão desde meu ingresso no mestrado. Também agradeço aos meus irmãos Ligia, Lucas e Luiz, que sempre me apoiaram em todas as questões necessárias e também compreenderam os momentos de ausência durante esse período. Obrigado a cada um de vocês, pois sem o seu apoio não seria possível a realização deste trabalho.

RESUMO

ZACHARIAS, L.R. **Efeitos do abrasamento elétrico da amígdala basolateral em padrões oscilatórios durante o sono.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018

Na epilepsia do lobo temporal (ELT), alterações morfofuncionais em estruturas límbicas são classicamente acompanhadas de déficits cognitivos. Estudos anteriores revelaram que disfunções eletrofisiológicas em circuitos hipocampo-corticais são observadas durante o sono NREM (*non rapid eye movement*), onde eventos patológicos como *fast ripples* e IEDs (*interictal epileptiform discharges*) substituem gradativamente eventos fisiológicos, como as *sharp-wave ripples* (SWR). Tal substituição pode estar por trás dos prejuízos cognitivos observados tanto nos modelos animais como em pacientes, já que as SWRs são fundamentais para a transferência de informação do hipocampo ao córtex durante a consolidação de memórias. De maneira complementar, o sono REM também parece exercer um papel fundamental em processos mnemônicos, facilitando eventos de plasticidade sináptica e coordenando regiões encefálicas distantes por meio de acoplamento entre diferentes frequências oscilatórias, tais como teta e gama. Entretanto, as alterações no sono REM durante os processos de epileptogênese ainda foram pouco exploradas. Neste trabalho testamos a hipótese de que disfunções na coordenação rítmica durante o sono REM estariam associadas a prejuízos de memória que se manifestam na epileptogênese. Para isso, submetemos ratos Wistar adultos machos a protocolo de abrasamento rápido da amígdala basolateral, possibilitando a avaliação de alterações eletrofisiológicas gradativas durante o processo de epileptogênese. Foram realizados implantes crônicos de eletrodos para registro do potencial local de campo (LFP, *Local Field Potential*) nas regiões de CA1 e do córtex pré-frontal medial (mPFC, *medial prefrontal cortex*), além de eletrodos bipolares para estímulo na amígdala basolateral. Os protocolos de abrasamento foram realizados durante um período de 3 dias, aplicando-se diariamente 10 trens de estímulos a 50 Hz com duração de 10 segundos. Para avaliarmos os prejuízos cognitivos, os animais foram submetidos a testes de reconhecimento de objetos antes do início a após o término dos protocolos de abrasamento. O sono

subsequente às sessões de reconhecimento de objetos e aos protocolos de estimulações foram registrados diariamente. Além do prejuízo no reconhecimento de objetos e alterações eletrofisiológicas durante o sono NREM, como a substituição gradativa de *ripples* por IEDs, os animais submetidos ao abrasamento elétrico apresentaram um aumento na comodulação fase-amplitude entre oscilações teta e gama durante o sono REM após as estimulações, exibindo também uma correlação negativa entre a comodulação e a duração das pós-descargas induzidas pelos estímulos elétricos do abrasamento durante o sono subsequente a aplicação dos protocolos. Nossos achados ampliam a compreensão vigente sobre como alterações de oscilações cerebrais durante o sono, especialmente da fase REM, poderiam estar subjacentes a prejuízos de memória que ocorrem na ELT.

Palavras-chave: epilepsia; epileptogênese; abrasamento elétrico; sono; memória; hipocampo; amígdala; córtex pré-frontal; eletrofisiologia; potenciais de campo locais;

ABSTRACT

ZACHARIAS, L.R. **Effects of basolateral amygdala *kindling* on oscillatory patterns during sleep.** Dissertation (Master Degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018

Morphofunctional changes in limbic structures are classically followed by cognitive deficits in Temporal Lobe Epilepsy (TLE) patients. Previous studies revealed that electrophysiological dysfunctions in hippocampal-cortical circuits are observed during NREM (non-rapid eye movement) sleep, where pathological events such as fast ripples and IEDs (interictal epileptiform discharges) gradually replace physiological events, such as Sharpwave Ripples (SWR). This replacement seems to describe the cognitive impairments observed in animal models and TLE patients since SWRs are fundamental for information transfer from the hippocampus to cortex during memory consolidation. Complementary, REM sleep also plays a significant role in mnemonic processes, facilitating synaptic plasticity events and coordinating distant brain regions by coupling different frequencies, such as theta and gamma. However, alterations in REM sleep during the epileptogenesis processes are poorly investigated. In this study, we tested the hypothesis that dysfunctions on rhythmic coordination during REM sleep would be associated with memory deficits showed during epileptogenesis. For this, we submitted adult Wistar rats to a rapid kindling protocol on basolateral amygdala (BLA), allowing the evaluation of progressive electrophysiological changes during the epileptogenic process. Chronic electrodes were implanted for the local field potentials (LFP) recording in the CA1 and medial prefrontal cortex (mPFC), as well as bipolar electrodes for BLA stimulation. The kindling protocols were performed during three days, applying ten trains of 50 Hz stimulations with ten seconds duration. Object recognition tasks were performed before and after the kindling protocol to evaluate cognitive impairment. Sleep recordings were performed daily after the object recognition or kindling application. Along with object recognition impairment and electrophysiological changes during NREM sleep, such as progressive SWR substitution by IEDs, kindled rats presented an increase in phase-amplitude comodulation between theta and gamma oscillations during REM sleep after stimulation sessions, which also correlates negatively with after-discharges (AD) duration induced by the kindling stimulation. Our findings

expand the comprehension about how changes in brain oscillations during REM sleep underlies observed memory deficits in TLE.

Keywords: epilepsy; epileptogenesis; animal models of epilepsy; electric *kindling*; sleep; memory; hippocampus; amygdala; prefrontal cortex; electrophysiology; local field potentials;

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD - *After Discharges*

AP - ântero-posterior

BLA - *Basolateral Amygdala*

CE - Córtex Entorrinal

CEUA - Comissão de Ética em Uso de Animais

CTRL - Controle (grupo experimental)

DP - Desvio Padrão

DV - Dorso-ventral

ELT - Epilepsia do Lobo Temporal

EMG – Eletromiograma

FRs - *Fast Ripples*

GD - Giro Denteado

HFO - *High Frequency Oscillation*

HG - *High Gamma*

ID - Índice de Discriminação

IEDs - *Interictal Epileptiform Discharges*

KD - *Kindling* (grupo experimental)

LFP - *Local Field Potential*

LG - *Low Gamma*

MI - *Modulation Index*

ML - Médio-lateral

mPFC - *medial Prefrontal Cortex*

NREM - *non-rapid eye movement*

PV+ - Parvalbumina Positivos

REM - *rapid eye movement*

RMS - *Root Mean Square*

SC - Colateral de Schaffer

Septo Medial – SM

SL - Septo Lateral

SM-DB -Septo Medial/Banda Diagonal de Broca

SWR - *Sharpwave Ripples*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3	MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1	ANIMAIS	12
3.2	DESENHO EXPERIMENTAL	13
3.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS	14
3.4	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	14
3.5	RECONHECIMENTO DE OBJETOS	16
3.6	PROTOCOLO DE ABRASAMENTO RÁPIDO	18
3.7	REGISTRO DE SONO	21
3.8	MÉTODOS PARA ANÁLISES ELETROFISIOLÓGICAS	21
3.8.1	<i>Determinação dos estágios de sono</i>	22
3.8.2	<i>Métodos para detecção de eventos eletrofisiológicos durante o sono NREM: Ondas Delta, Spindles, Ripples e IEDs</i>	25
3.8.2.1	Detecção de Ripples e IEDs	26
3.8.2.2	Detecção de Ondas Delta	29
3.8.2.3	Detecção de Spindles	32
3.8.3	<i>Análise da incidência de eventos eletrofisiológicos durante o sono NREM</i>	32
3.8.4	<i>Análise do acoplamento de eventos hipocámpais com eventos corticais durante o sono NREM</i>	32
3.9	SONO REM: ANÁLISES DE DENSIDADES DE POTÊNCIA E COMODULAÇÃO ENTRE OSCILAÇÕES TETA E GAMA	33
3.9.1	<i>Análise da densidade de potência durante sono REM</i>	33
3.9.2	<i>Análise da comodulação entre fase em teta e amplitude em gama</i>	34
3.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
3.10.1	<i>Teste de Mann-Whitney</i>	35
3.10.2	<i>Análise de tendência de Mann-Kendall</i>	35
3.10.3	<i>Análise por reamostragem - Bootstrap</i>	35
3.10.4	<i>Correlação entre os efeitos do abrasamento e alterações em sono NREM e REM</i>	36
3.11	HISTOLOGIA	36
4	RESULTADOS	37
4.1	EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO ABRASAMENTO ELÉTRICO RÁPIDO DA BLA	37
4.2	RECONHECIMENTO DE OBJETOS	38

4.3	EFEITOS DO ABRASAMENTO ELÉTRICO SOBRE O SONO-----	40
4.3.1	<i>Alterações na Arquitetura do Sono durante a aplicação do abrasamento</i> -----	40
4.3.2	<i>Efeitos do abrasamento sobre o sono NREM: substituição de Ripples por IEDs</i> -----	41
4.3.3	<i>Acoplamento hipocampo-cortical: probabilidade de Ondas Delta e Spindles após eventos hipocampais</i>	42
4.4	SONO REM: ALTERAÇÕES NAS OSCILAÇÕES LOCAIS DE CA1-----	45
4.4.1	<i>Potência de oscilações teta e gama</i> -----	45
4.4.1.1	<i>Dinâmica oscilatória: comodulação de fase-amplitude entre teta e gama</i> -----	47
4.5	CORRELAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DO ABRASAMENTO, SONO E MEMÓRIA-----	49
4.6	HISTOLOGIA-----	51
5	DISCUSSÃO -----	52
5.1	VANTAGENS DO MODELO DE ABRASAMENTO RÁPIDO DA AMÍGDALA BASOLATERAL -----	53
5.2	ALTERAÇÕES COGNITIVAS INDUZIDAS PELO ABRASAMENTO ELÉTRICO -----	54
5.3	EFEITOS DO ABRASAMENTO SOBRE EVENTOS ELETROFISIOLÓGICOS DURANTE SONO NREM -----	55
5.4	ALTERAÇÃO DE OSCILAÇÕES TETA E GAMA DURANTE O SONO REM -----	57
5.4.1	<i>Alterações na comodulação de fase-amplitude de oscilações teta e gama</i> -----	59
6	LIMITAÇÕES E POSSIBILIDADES FUTURAS -----	60
7	CONCLUSÕES -----	62
8	REFERÊNCIAS -----	63

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é considerada uma desordem neurológica, afetando aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo o mundo, e é caracterizada pela incidência de duas ou mais crises convulsivas espontâneas. As principais causas da epilepsia estão relacionadas à alteração de estruturas cerebrais tanto durante sua formação (anormalidades genéticas, danos cerebrais durante o desenvolvimento por hipóxia ou crises febris) como também após o amadurecimento do encéfalo, como traumatismos cranioencefálicos graves, acidentes vascular-encefálicos, infecções ou tumores (WHO, 2018), levando a alterações como redução do volume de estruturas subcorticais e atrofia da substância cinzenta em regiões como o neocórtex e o tálamo, assim como também à esclerose hipocampal (WHELAN et al., 2018).

Apesar das crises epiléticas aumentarem os riscos de lesões corporais e mortalidade, as comorbidades psiquiátricas observadas na epilepsia afetam diretamente qualidade de vida dos pacientes, levando a distúrbios psicológicos como ansiedade e depressão (SUURMEIJER; REUVEKAMP; ALDENKAMP, 2002; KANDRATAVICIUS et al., 2012; WHO, 2018) mas também a impactos socioeconômicos relacionados principalmente a prejuízos cognitivos (HERMANN et al., 2008; MELBOURNE CHAMBERS et al., 2014).

Estes prejuízos cognitivos são observados frequentemente na Epilepsia do Lobo Temporal (ELT), o tipo mais comum de epilepsia focal farmacorresistente em adultos. Contudo, ainda não está claro como tais alterações cognitivas estariam relacionadas a padrões de atividade patológicos que ocorrem durante períodos interictais (BRAGIN; PENTTONEN; BUZSÁKI, 1997; KANDRATAVICIUS et al., 2014; GELINAS et al., 2016).

Prejuízos cognitivos estão principalmente relacionados a alterações morfofuncionais, incluindo a perda de neurônios excitatórios e inibitórios em regiões como o hipocampo e o córtex entorrinal (CE) (HOLMES, 2015; JANZ et al., 2017). Juntamente com a perda neuronal, também ocorre a reorganização sináptica dessas redes, com o crescimento aberrante de fibras musgosas na região de CA3 e a ocorrência de neurogênese no giro denteado (GD) (HOLMES, 2015) do hipocampo. Essas alterações hipocampais levam a um aumento da excitabilidade principalmente por vias glutamatérgicas (BARKER-HALISKI; WHITE, 2015), e que através de um

circuito de retroalimentação podem potencializar os danos por excitotoxicidade e as reorganizações sinápticas, exemplificados na Figura 1 (HOLMES, 2015):

Figura 1: Alterações fisiológicas em diferentes intervalos após as crises epiléticas e possíveis mecanismos envolvidos no déficit cognitivo – adaptado de (HOLMES, 2015)

Essa reorganização estrutural leva à alteração dos padrões de atividades eletrofisiológicas no hipocampo e também em suas projeções, como a geração de oscilações patológicas de alta frequência e a redução na precisão de disparos neuronais (FOFFANI et al., 2007; STALEY, 2007).

Para compreender melhor os efeitos de tais mudanças sobre as alterações em estruturas do Lobo Temporal, podemos utilizar modelos animais que não apenas reproduzam as características da ELT, mas que também nos permitam acessar os efeitos durante o período latente, onde ocorrem os processos de epileptogênese (KANDRATAVICIUS et al., 2014). Neste sentido, é possível modelar a epileptogênese através de estimulações elétricas repetitivas sobre estruturas do Lobo Temporal, gerando o acúmulo de disparos epiléticos pós-estímulo e, consequentemente, levando a crises espontâneas e alterações histopatológicas semelhantes aos observados em pacientes (GODDARD, 1967; RACINE, 1972a; KANDRATAVICIUS et al., 2014; MORALES et al., 2014). Esta técnica, conhecida como abrasamento elétrico, é uma potente ferramenta para estudar mecanismos de epileptogênese, reproduzindo os aspectos da alteração da plasticidade sináptica decorrentes da atividade anormal em focos epiléticos e as alterações graduais que

podem levar às crises generalizadas e comorbidades da ELT (GELINAS et al., 2016), além de apresentar prejuízos cognitivos semelhantes aos observados em outros modelos animais e em pacientes de ELT.

Estes prejuízos cognitivos observados emergem em conjunto com eventos patológicos de alta frequência hipocampais, como as Descargas Interictais Epileptiformes (*Interictal Epileptiform Discharges*, IEDs) e as *Fast Ripples* (FRs, 200 – 600 Hz), detectadas principalmente em zonas epileptogênicas e, apesar de comumente associadas à perda neuronal, também foram reportadas mesmo em modelos de ELT não-lesionais, como a infusão de toxina tetânica intrahipocampal (JIRUSKA et al., 2010; LI et al., 2018) ou a aplicação de protocolos de abrasamento sobre a amígdala basolateral (SMITH et al., 2005; MORALES et al., 2014).

Durante o processo de epileptogênese em modelos por infusão de toxina tetânica intrahipocampal (JIRUSKA et al., 2010) e por abrasamento elétrico do hipocampo (GELINAS et al., 2016), a emergência de IEDs e FRs decorre de um processo de substituição de eventos fisiológicos (Figura 2), conhecidos como *Sharpwave Ripples* (SWR, 100 — 200 Hz), que ocorrem na região CA1 do hipocampo durante repouso pós-aprendizado ou sono de ondas lentas (JIRUSKA et al., 2010; BUZSÁKI, 2015; GELINAS et al., 2016).

Figura 2: Substituição de eventos fisiológicos (Ripples - roxo) por eventos patológicos (IEDs - laranja) num modelo de abrasamento elétrico do hipocampo. À esquerda exemplos de Ripples (roxo) e IEDs (laranja) - adaptado de (GELINAS et al., 2016)

As SWR são estruturas eletrofisiológicas de campo altamente precisas, compostas por (1) uma massiva salva de disparos em CA3 e (2) oscilações de alta frequência síncronas (*Ripples*, 100 — 200 Hz), decorrentes de atividade altamente organizada de interneurônios parvalbumina positivos (PV+) presentes em CA1 (BUZSÁKI, 2015). As SWR que ocorrem no sono de ondas lentas ou repouso pós-aprendizado eventualmente aparecem associadas ao *replay* de sequências de disparos exibidas pelas *place-cells* de CA1 durante o comportamento exploratório (ROUX et al., 2017). A reativação de representações espaciais, associada ao alto acoplamento temporal entre eventos de SWR e *spindles* (12 a 18 Hz) tálamo-corticais, parece fundamentar processos que dependam da transferência de informação hipocampo-cortical, como a consolidação de memória espacial (BUZSÁKI, 2015; TAXIDIS et al., 2015; GELINAS et al., 2016). Sendo assim, a substituição gradativa de SWR por FRs e IEDs durante os processos de epileptogênese parece estar subjacente aos mecanismos responsáveis pela manifestação de prejuízos de memória em modelos animais de ELT, pois afeta diretamente processos de transferência de informação hipocampo-cortical (GELINAS et al., 2016).

Porém essas alterações estão relacionadas apenas à atividade eletrofisiológica registrada durante os períodos de repouso ou sono NREM (*non-rapid eye movement*) após o aprendizado. De acordo com as teorias de consolidação sistêmica da memória, outros estágios do sono, como o sono REM, também apresentam aspectos fundamentais na consolidação da memória durante o sono pós aprendizado (DIEKELMANN; BORN, 2010). Nesse sentido, o sono REM atuaria de maneira complementar ao sono NREM na regulação das atividades neuronais, como exemplificado na Figura 3:

Figura 3 - Diferentes estágios da consolidação sistêmica de memórias. Primeiramente as informações adquiridas durante os processos de aprendizado (encoding) são armazenadas tanto no córtex (roxo) quanto nas regiões hipocâmpais (amarelo). Durante o sono NREM, as projeções hipocampo-corticais fortalecem as sinapses desenvolvidas durante o aprendizado através da facilitação sináptica, enquanto que durante o sono REM estes processos aconteceriam de maneira independentes em cada uma das regiões – adaptado de (DIEKELMANN; BORN, 2010).

Marcado principalmente pela presença de oscilações teta e gama, o sono REM promove a diminuição das taxas de disparos durante as transições de episódios de sono NREM (Figura 4), reorganizando a excitabilidade sináptica das regiões hipocâmpais (GROSMARK et al., 2012). Essa reorganização depende também da potência das oscilações teta presentes durante este estágio (MIYAWAKI; DIBA, 2016), com evidências causais de que a diminuição da potência dessas oscilações durante o sono REM pode levar a prejuízos cognitivos (BOYCE et al., 2016).

Figura 4 - Efeitos do sono REM sobre a taxa de disparos neuronais entre dois episódios de sono NREM – adaptado de (GROSMARK et al., 2012)

O acoplamento entre oscilações teta e gama é sugerido como um possível mecanismo de consolidação de memórias, ocorrendo durante os processos de aprendizado e também durante o sono REM (LISMAN; IDIART, 1995; LISMAN; BUZSAKI, 2008; TORT et al., 2009; LISMAN; JENSEN, 2013), onde uma sequência de oscilações gama sincroniza a atividade de diferentes grupos neuronais durante um período das oscilações teta (Figura 5), reaccessando padrões de ativação observados durante o aprendizado.

Figura 5 - Possível mecanismo de consolidação da memória através das oscilações teta e gama. Diferentes padrões de ativação seriam armazenados em cada oscilação gama (A-G), acopladas a fase positiva de teta – adaptado de (LISMAN; BUZSAKI, 2008).

Assumindo este papel complementar entre diferentes estágios do sono na consolidação da memória, podemos sugerir que os prejuízos cognitivos devido a alterações eletrofisiológicas durante o período da epileptogênese não estejam restritos apenas à substituição de SWR por eventos patológicos durante o sono NREM, mas também a alterações nas oscilações teta e gama durante o sono REM, uma vez que a ELT pode levar a mudanças morfológicas e funcionais em estruturas responsáveis pela geração e/ou manutenção destas oscilações (para uma revisão, ver SHUMAN; AMENDOLARA; GOLSHANI, 2017)

Dentro dessas estruturas podemos destacar circuitos osciladores em teta intrahipocampais, como as regiões CA1, CA3 e o GD, e também circuitos extrahipocampais, como o CE e o septo medial (BUZSÁKI, 2002; PATEL et al., 2012; COLGIN, 2016; SHUMAN; AMENDOLARA; GOLSHANI, 2017). As oscilações teta emergem de uma complexa interação entre estes diferentes circuitos osciladores, envolvendo projeções GABAérgicas, glutamatérgicas e colinérgicas dentro de um circuito septo-hipocampo-entorrinal retroalimentável (Figura 6).

Figura 6 – Modelo do circuito septo-hipocampal-entorrinal envolvido na geração e manutenção de teta, exemplificando projeções GABAérgicas (azul), colinérgicas (verde) e glutamatérgicas (vermelho) entre as regiões do Septo Medial/Banda diagonal de Broca (SM-DB), o Septo Lateral (SL), as regiões de CA1 e CA3, conectadas pela via Colateral de Schaffer (SC), o giro denteado (GD) e diferentes camadas do Córtex Entorrinal (CE) – adaptado de (KITCHIGINA et al., 2013).

Neste sistema, o septo lateral aparece como principal coordenador das oscilações teta, e a manipulação das atividades septais ou a perturbação das projeções septo-hipocâmpais podem reduzir a amplitude das oscilações teta registradas no hipocampo durante períodos interictais (COLOM et al., 2006; BUTUZOVA; KITCHIGINA, 2008; KITCHIGINA et al., 2013; BOYCE et al., 2016; SHUMAN; AMENDOLARA; GOLSHANI, 2017).

Em modelos animais de ELT é observado alterações na dinâmica das atividades eletrofisiológicas do septo medial, assim como também sua fisiologia. Enquanto o abrasamento elétrico da Via Perfurante altera os ritmos de ativação neuronal no septo medial e leva a uma sincronização destes disparos com IEDs (KITCHIGINA; BUTUZOVA, 2009), a injeção intraperitoneal de pilocarpina pode levar a perda de neurônios GABAérgicos nessa região, e consequentemente a uma diminuição da potência de oscilações teta registradas no hipocampo (COLOM et al., 2006), como destacado na Figura 7.

Figura 7 - Alterações nos circuitos entre septo medial (SM), septo lateral (SL) e hipocampo (H). Em preto, neurônios GABAérgicos. Em cinza e branco, neurônios colinérgicos e glutamatérgicos, respectivamente. Neurônios piramidais estão representados por triângulos. A perda neuronal de neurônios GABAérgicos e piramidais está representada por neurônios tracejados, enquanto que as fibras musgosas anormais estão representadas pelos traçados finos – adaptado de (COLOM et al., 2006)

Alterações intrahipocámpais também são capazes de modificar as oscilações teta (SHUMAN; AMENDOLARA; GOLSHANI, 2017). Em modelos por injeção intrahipocámpal de ácido caínico é observado uma diminuição da coerência de oscilações teta entre as regiões do CE e do giro denteado no hipocampo, porém com perdas neuronais verificadas apenas na região hipocámpal (FRORIEP et al., 2012), e principalmente nas projeções hipocámpais de CA1 ao CE dorsal (JANZ et al., 2017). Neste mesmo trabalho também foi verificado que as projeções entorrinais ao giro denteado através da via perfurante apresentam alterações morfológicas semelhantes às observadas em estudos de potenciações sinápticas de longa duração, como o aumento do número e tamanho de terminais sinápticos, o que poderia induzir a geração de atividades epileptiformes hipocámpais e também contribuir para a dessincronização das oscilações teta nestas regiões (JANZ et al., 2017). Neste caso, as alterações morfológicas e funcionais dessas estruturas levam a uma dessincronização das oscilações teta, sendo refletida como uma diminuição de sua potência (BUZSÁKI, 2002; SHUMAN; AMENDOLARA; GOLSHANI, 2017).

A interação entre as regiões CA1 e o CE também parecem fundamentais durante o processo de aprendizado de memórias espaciais. O CE, além de atuar como uma das principais interfaces entre o hipocampo e outras regiões corticais, também oferece suporte à codificação das *place cells* hipocâmpais através das *grid cells*, integrando informações espaciais provenientes do córtex. A transferência e consolidação de informações durante o aprendizado entre o CE e o hipocampo ocorre principalmente com a sincronização de disparos neuronais com oscilações gama, induzindo a facilitação sináptica nas projeções CE-CA1 através das via temporoamônica durante o aprendizado (para uma revisão ver NAKAZONO et al., 2018 - Figura 8). Portanto, as alterações na comunicação entre o CE e CA1 poderiam afetar o aprendizado e a consolidação de memórias não somente devido à dessincronização de oscilações teta, mas também à alteração na sincronização dos disparos neuronais com oscilações gama.

Figura 8 - Aumento da sincronia de disparos neuronais com oscilações gama durante o processo de aprendizado, induzindo a facilitação sináptica na via entorrinal-CA1 – adaptado de (NAKAZONO et al., 2018)

Portanto, considerando os possíveis mecanismos de consolidação da memória no sono REM através da interação entre oscilações teta e gama e a alteração nos mecanismos responsáveis por sua geração e manutenção, nossa hipótese é de que o processo de epileptogênese altera também a relação entre essas duas oscilações, acompanhando os prejuízos cognitivos observados.

Para testar esta hipótese, registramos o Potencial de Campo Local (*Local Field Potential* - LFP) nas regiões de CA1 do hipocampo e do córtex pré-frontal medial (*medial prefrontal cortex* – mPFC) durante o sono subsequente a aplicação de protocolos de abrasamento elétrico rápido na amígdala basolateral (*basolateral amygdala* - BLA), verificando possíveis alterações na atividade eletrofisiológica destas áreas durante o sono NREM e sono REM, e se tais alterações são suficientes para induzir déficits cognitivos nos animais durante testes de reconhecimento de objetos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos do abrasamento elétrico sobre padrões oscilatórios e coordenação entre hipocampo e córtex pré-frontal durante diferentes estágios do sono e sua possível relação com a consolidação de memórias de reconhecimento de objetos.

2.2 Objetivos específicos

1. Verificar os efeitos de um modelo de abrasamento elétrico rápido da BLA sobre os processos de consolidação de memória espacial em testes de reconhecimento de objetos;
2. Caracterizar a incidência de eventos eletrofisiológicos e patológicos em sono NREM durante o processo de epileptogênese, identificando e calculando a incidência de IEDs e *ripples* na região CA1 do hipocampo e de Ondas Delta e *Spindles* no mPFC;

3. Caracterizar as alterações nas oscilações teta e gama na região CA1 do hipocampo em sono REM durante o processo de epileptogênese, verificando a densidade de potência relativa destas frequências e também o acoplamento entre fase e amplitude, indicados pelo Índice de Comodulação (*Modulation Index* – MI) (TORT et al., 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar com pesos iniciais entre 200 e 350 gramas (7 a 8 semanas de idade) fornecidos pelo Biotério Central do campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto – SP. Os animais foram habituados ao ambiente do biotério experimental e manipulados durante um período de 7 dias, mantidos em grupos de 2 a 3 animais em caixas de polipropileno (40x33x18 cm) forradas com raspas de madeira, com livre acesso a água e alimentação. O biotério experimental possui alternância de ciclos de claro/escuro com duração de 12 horas, com início de ciclos claros às 7h00 e temperaturas controladas de 23° a 25° C.

Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da FMRP sob o protocolo 016/2016.

3.2 Desenho experimental

A Figura 9 ilustra o desenho experimental realizado neste trabalho.

Figura 9 - Desenho experimental, indicando os testes de reconhecimento de objetos, registro de sono e aplicação dos protocolos de abrasamento elétrico (kindling).

Primeiramente os animais foram submetidos a cirurgia para implante de eletrodos para registro eletrofisiológico crônico do LFP nas regiões do mPFC pré-límbico e CA1 e estimulações elétricas na BLA. Após a cirurgia, os animais passaram por um período de recuperação de 7 dias, sendo mantidos em caixas individuais com grades elevadas para preservar o implante.

O experimento foi conduzido durante um período total de 6 dias após a recuperação cirúrgica, incluindo 3 dias de habituação, onde os animais foram habituados às caixas de registro de sono e a arenas de reconhecimento de objetos. No primeiro dia de experimento foi iniciado o protocolo de reconhecimento de objetos através das sessões de *encoding*, com registros de sono subsequente estendidos até às 19h00. No segundo dia foram realizadas as sessões de *decoding*, seguido pelo início da aplicação dos protocolos de abrasamento rápido, com duração média de 3 horas por dia, durante 3 dias, baseados em (MORALES et al., 2014). As sessões de sono foram registradas após as estimulações, novamente até às 19h00. Nos grupos controle apenas o registro de sono foi realizado durante o período relativo à aplicação do abrasamento.

No quinto e sexto dia foram realizadas novas sessões para o reconhecimento de objeto, com registro de sono subsequente ao *encoding*. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados e perfundidos em soluções de PBS e PFA 4%, com extração dos cérebros para posterior verificação do posicionamento dos eletrodos.

Todos os procedimentos experimentais serão descritos em detalhes nas próximas seções.

3.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 2 grupos principais: grupo KD (*Kindling*, $n = 8$) e grupo CTRL (Controle, $n = 6$), onde apenas os animais do grupo KD foram submetidos a protocolos de abrasamento elétrico rápido.

Cada grupo foi subdividido em 2 novos grupos ('a' e 'b') nos animais dos grupos KD-a ($n = 5$) e CTRL-a ($n = 3$) foram implantados eletrodos de registro monopolares nas regiões do mPFC (1 eletrodo) e CA1 (3 eletrodos), e eletrodos bipolares para estimulação na BLA. Nos grupos KD-b ($n = 3$) e CTRL-b ($n = 3$) foram implantados eletrodos de registro monopolares somente em CA1 (1 eletrodo), e eletrodos bipolares para estimulação na BLA. Em todos os animais foram implantados eletrodos para medir a atividade muscular (eletromiograma - EMG) sob a musculatura da nuca.

Nos primeiros subgrupos (KD-a e CTRL-a) os experimentos foram conduzidos individualmente. Já nos grupos KD-b e CTRL-b, o menor número de canais de registros permitiu a realização de experimentos simultâneos, utilizando diferentes caixas de registro de sono.

Os registros de sono e a aplicação do protocolo de abrasamento foram realizadas na mesma caixa, sem acesso a água e comida durante as sessões de estímulos.

3.4 Cirurgia estereotáxica

Os eletrodos implantados foram construídos manualmente utilizando fios de tungstênio encapados com teflon ($d = 45 \mu\text{m}$; AM-Systems, EUA) soldados em conectores torneados (Figura 10). Quatro microparafusos foram implantados sobre

ossos frontais e parietais para fixação do implante, e um microparafuso fixado sobre o osso occipital para atuar como referência e terra para o registro eletrofisiológico.

Figura 10- Exemplo de eletrodos utilizados nas cirurgias. a) eletrodos de registro monopolar para implante em mPFC. b) Eletrodos bipolares de estímulo para implante na BLA. c) Eletrodos para registro de eletromiograma sob a musculatura da nuca.

Os animais foram anestesiados com injeções de ketamina (100mg/Kg, i.p. em NaCl 0,15M) e xylazina (10mg/Kg, i.p. em NaCl 0,15M), com verificação do grau de anestesia por pinçamento da cauda durante toda a cirurgia. Uma vez anestesiados, animais foram submetidos à tricotomia do escalpo, fixação do crânio em estereotáxico (KOPF; KOPF Instruments; EUA) e assepsia do escalpo com iodo e água oxigenada, seguida de injeção subcutânea de anestésico local (lidocaína 2% em NaCl 0,15M) para incisão do escalpo e então exposição e limpeza da superfície do crânio.

Tomando-se o bregma como referência ântero-posterior (AP) e médio-lateral (ML), foram realizadas craniotomias ipsilaterais nas coordenadas respectivas às regiões de implante indicadas na Tabela 1, baseadas em (PAXINOS; WATSON, 2006; MORALES et al., 2014) e adaptadas de acordo com procedimentos já estabelecidos em nosso laboratório.

Tabela 1 – Coordenadas estereotáticas relativas ao Bregma para implante de eletrodos de registro e estimulação

	mPFC	CA1	BLA
AP (mm)	+3,0	-5,4	-2,5
ML (mm)	-0,5	-4,6	-5,1
DV (mm)	-3,5	-2,5	-7,2

3.5 Reconhecimento de Objetos

O reconhecimento de objetos foi baseado nos procedimentos descritos em (MAINGRET et al., 2016), e tem como objetivo verificar a consolidação de memórias espaciais dependentes do hipocampo (WARBURTON; BROWN, 2015) antes e após a aplicação de protocolos de abrasamento.

Os experimentos foram realizados numa caixa de madeira retangular (40x35x80 cm) ventilada e iluminada, com uma base de borracha (arena) removível para limpeza. O protocolo de reconhecimento de objetos foi dividido em duas sessões: *encoding* e *decoding*, separadas por um período de 24 horas. Durante o *encoding* os animais são colocados na arena, explorando dois objetos idênticos posicionados em cantos adjacentes durante 20 minutos (Figura 11-a). No *decoding*, um dos objetos é posicionado no canto oposto, e os animais podem explorá-los durante um período de 5 minutos (Figura 11-b). Em todos os grupos o teste foi realizado no período da manhã. Todas as sessões foram registradas em vídeo através de câmeras posicionadas dentro da arena, na parte superior.

Figura 11 - a) Representação do animal explorando os objetos durante a sessão de encoding. b) Representação do animal explorando o objeto deslocado, durante a sessão de decoding.

Uma das paredes da caixa conta com uma janela de vidro escurecido, servindo como um marcador espacial para os animais. Para que a exploração seja voltada principalmente aos objetos utilizados, os animais foram habituados à arena durante 3 dias precedendo a primeira sessão de *encoding*, permitindo uma exploração de 20 minutos por dia sem objetos.

Para avaliarmos a eficácia nessa consolidação da memória avaliamos o tempo de exploração despendido pelo animal sobre cada objeto na arena, calculando o Índice de Discriminação (ID), dado por:

$$ID = \frac{tObj2}{(tObj1 + tObj2)}$$

Onde tObj1 e tObj2 corresponde ao tempo total de exploração do Objeto 1 e do Objeto 2, respectivamente. Foram considerados como tempos de exploração situações onde o animal manteve a cabeça orientada ao objeto, numa distância de pelo menos 2 cm. Situações como subir ou sentar-se sobre os objetos não foram contabilizadas como exploração.

Os períodos de exploração dos objetos foram analisados utilizando o software *Open Source BORIS* (FRIARD; GAMBA, 2016), que permite o registro de eventos comportamentais durante análise de vídeos. Dessa maneira, o ID pode ser calculado para cada minuto do experimento.

Caso a consolidação da memória espacial não esteja afetada, é esperado que o tempo de exploração do Objeto 2 seja maior em relação ao Objeto 1, resultando num ID maior que 0,5. Numa situação aonde a consolidação possa ter sido comprometida, os tempos de exploração destes objetos tendem a ser os mesmos, levando a um ID igual a 0,5.

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado precedendo a aplicação do abasamento e no dia seguinte ao término das sessões de estimulação, dividindo as análises em 4 grupos: *Kindling* pré-estimulação (KD-PRE), *Kindling* pós-estimulação (KD-POS), Controle pré-estimulação (CTRL-PRE) e Controle pós-estimulação (CTRL-POS). Os grupos PRÉ e PÓS são compostos pelos mesmos animais, e diferentes objetos foram utilizados nas sessões PRÉ e PÓS.

As comparações de ID entre os grupos foram realizadas utilizando testes não-paramétricos de *Mann-Whitney*, com $n = 8$ animais no Grupo KD e $n = 6$ no Grupo CTRL.

3.6 Protocolo de abrasamento rápido

Para verificarmos os efeitos de oscilações patológicas sobre a consolidação da memória durante o sono utilizamos um modelo de abrasamento rápido sobre a BLA, descrito por (MORALES et al., 2014). O protocolo adotado para o abrasamento rápido consiste em 3 dias de estimulação. Os trens de pulsos (ondas quadradas bifásicas, largura: 1 ms e frequência: 50 Hz) tem duração total de 10 segundos, e são aplicados 10 vezes a cada dia, com intervalo inter-trem de 20 minutos, ilustrado na Figura 12:

Figura 12 - Protocolo de abrasamento rápido, adaptado de (MORALES et al., 2014)

Os limiares de intensidade de estimulação são definidos durante o primeiro dia. Iniciando em 100 μ A, um trem de pulso é aplicado a cada 10 minutos, aumentando-se a corrente num passo de 25 μ A até que ocorram pós-descargas com duração mínima de 5 segundos. Identificadas as pós-descargas, a intensidade de estimulação é então reduzida em 20%, sendo utilizada durante os próximos 3 dias.

Para garantir que não haja o acúmulo de carga sobre os eletrodos de estimulação durante a aplicação do protocolo de abrasamento, os estímulos

elétricos foram gerados por uma unidade isoladora bifásica *SIU-BI* acoplada a um gerador *S88X* (Grass Instruments, EUA).

A progressão dos efeitos convulsivos durante a aplicação dos estímulos abrasivos foi avaliada com base na Escala de Racine (RACINE, 1972b; MORALES et al., 2014), analisando comportamentos característicos após a aplicação de cada trem de pulsos. As respostas foram classificadas posteriormente através da análise dos vídeos registrados, sendo classificadas de acordo com a Tabela 2:

Tabela 2 – Comportamentos característicos em diferentes estágios de Racine

Estágio de Racine	Comportamento observado
R1	Movimentos orofaciais
R2	Movimentos de cabeça
R3	Clonia de patas dianteiras
R4	Levantamento
R5	Levantamento e queda, perda de equilíbrio

Os animais que apresentaram R5 pelo menos 3 vezes foram considerados totalmente abrasados. No entanto, todos os animais foram utilizados para análises comportamentais e eletrofisiológicas.

Juntamente com os efeitos comportamentais relacionados à aplicação dos trens de estímulos, calculamos também a duração das Pós Descargas (AD, de *After Discharges*) geradas após cada estimulação (EBERT; RUNDFELDT; LÖSCHER, 1995; BRAGIN; PENTTONEN; BUZSÁKI, 1997). Para isso calculamos o envelope do LFP (não filtrado) nos períodos pós-estimulação e identificamos automaticamente valores do envelope superiores a duas vezes o RMS do LFP no intervalo de 5 minutos após o início da AD (Figura 13). A duração da AD é calculada como o intervalo entre o início da AD principal (primeira identificada) e o final das AD secundárias (último bloco identificado, exemplo na Figura 14). Junto com o cálculo da duração das AD, também calculamos o número total de descargas ictais (*Spikes*), identificando os picos com amplitudes acima do limiar.

Figura 13 - Exemplo da detecção das AD (vermelho) após as estimulações. O período de estimulação é evidenciado pelo artefato de estímulo presente no registro (preto, -10 a 0 segundos). O envelope (azul) e o limiar para detecção (linha vermelha pontilhada) são calculados relativos ao período de 5 minutos após a estimulação. Em cinza, os Spikes ictais detectados.

Figura 14 – Exemplo de detecção das AD e Spikes com ocorrência de ADs secundárias.

3.7 Registro de sono

Para avaliarmos os efeitos dos protocolos de abrasamento sobre os mecanismos eletrofisiológicos relacionados à consolidação da memória é essencial registrarmos o sono subsequente ao aprendizado e também às estimulações decorrentes do abrasamento. Para isso, o LFP coletado pelos eletrodos de registro foi amplificado 1000 vezes e filtrado analogicamente nas bandas de 0,1 a 1000 Hz, e digitalizado com frequência de 5 kHz (grupos KD-a e CTRL-a) ou 4 kHz (grupos KD-b e CTRL-b).

Nos grupos KD-a e CTRL-a o registro foi realizado utilizando um sistema *Open Ephys* (Open Science Brasil, BR - SIEGLE et al., 2017), juntamente com um *headstage* Intan (Intan Technologies, EUA), que permite a amplificação e digitalização dos dados diretamente sobre a cabeça do animal. Nestes grupos foram registrados os LFPs do mPFC (1 canal) e de CA1 (3 canais), além do registro do EMG e dos acelerômetros incluídos no *headstage*.

Os animais dos grupos KD-b e CTRL-b foram registrados utilizando um amplificador e filtro analógico *A-M Systems 3600* (A-M Systems, EUA) e um digitalizador *PowerLab Daq 16/30* (ADInstruments, NZ). Apesar do primeiro sistema apresentar facilidades, como a digitalização diretamente sobre cabeça do animal e filtros e amplificadores integrados no mesmo sistema, este segundo *setup* possibilitou o registro de 6 animais simultaneamente.

O sono dos animais foi registrado durante o ciclo claro, entre 8h00 e 19h00, visando obter o maior tempo de registro possível após os procedimentos de reconhecimento de objeto e da aplicação dos protocolos de abrasamento. Os registros foram iniciados logo após as sessões de *encoding* do reconhecimento de objetos (8h30) e também após a aplicação dos protocolos de abrasamento (12h00).

3.8 Métodos para análises eletrofisiológicas

Nesta sessão descreveremos os métodos desenvolvidos neste trabalho para a separação de estágios de sono, análises oscilatórias e detecção de eventos eletrofisiológicos durante diferentes estágios de sono. Todas as rotinas foram desenvolvidas em *Matlab* 2015a (MathWorks, EUA).

3.8.1 Determinação dos estágios de sono

Para avaliarmos as possíveis alterações eletrofisiológicas induzidas pelo modelo de abasamento estagiamos o sono-vigília em três principais categorias: Acordado, Sono NREM e Sono REM. Os estágios REM e Acordado possuem oscilações hipocampais características nas faixas de teta (5 – 12 Hz), enquanto que estágios NREM possuem oscilações características em frequências mais lentas, como delta (0.5 – 4 Hz). Essa diferença entre as frequências características permite a diferenciação dos estágios através da análise das densidades de potência das oscilações em diferentes frequências.

Desenvolvemos uma rotina onde o sono é estagiado de forma semi-automatizada baseado na atividade oscilatória do LFP em CA1 e na atividade locomotora extraída pelo EMG, acelerômetros ou análise de vídeos.

O primeiro passo consiste na separação do registro em épocas de 10 segundos. Para cada época são estimadas as densidades de potências totais do LFP através do Método de *Welch* (com janelas de 1,25 segundos e *nfft* igual a 2^{12} - WELCH, 1967), em CA1 e então separada nas seguintes faixas de frequência: 0,5 – 4,5 Hz; 0,5 – 9 Hz; 0,5 – 20 Hz e 0,5 – 55 Hz. A partir dessas densidades de potência, calculamos as seguintes razões:

$$Ratio1 = \frac{0.5-4.5Hz}{0.5-9Hz}$$

$$Ratio2 = \frac{0.5-20Hz}{0.5-55Hz}$$

Calculando as razões *Ratio 1* e *Ratio 2* para cada época de 10 segundos, obtivemos um *Scatterplot* (Figura 15) onde podemos manualmente selecionar *Clusters* de estados Ativados (REM/Acordado, sem informação do EMG) e Desativados (NREM, sem informação do EMG):

Figura 15 - Exemplo de clusterização manual de estados Ativados e Desativados num registro de aproximadamente 8 horas. O Cluster azul foi classificado como Desativado, enquanto que o vermelho classificado como Ativado.

Em seguida adicionamos as informações sobre a locomoção do animal, criando novos gráficos de entre as Razões 1 e 2 pelo RMS da atividade locomotora (Figura 16):

Figura 16 - Scatterplots tridimensionais (a) e bidimensionais (b e c) entre Ratio 1, Ratio 2 e o EMG. Nesta etapa é possível excluir épocas selecionadas como estados Ativado ou Desativado, mas que possuem altos valores de EMG, indicando movimentação do animal.

Nesta etapa podemos excluir manualmente épocas que foram incluídas nos Clusters Ativados ou Desativados, mas que indicam movimento, resultando na Figura 17:

Figura 17 - Scatterplot tridimensional e bidimensional de Ratio1 e Ratio2 contra o EMG (a). Somente os blocos que apresentam Atonia foram mantidos (b e c), resultando na figura d).

Ao final, podemos verificar a densidade espectral média dos Clusters resultantes (Figura 18):

Figura 18 – Exemplo do espectro de potência para um animal entre 0 e 100 Hz para os estados NREM (laranja) e REM (azul) determinados pela Clusterização (à esquerda), e a potência normalizada das principais frequências que diferenciam os estados (à direita).

A maior densidade de potência nas frequências mais baixas (de 0 a 5 Hz) caracterizam oscilações do Sono de NREM (em laranja), enquanto que o pico em torno de 5 a 12 Hz (teta) caracteriza o sono REM (azul), o que nos indica que a separação dos estágios de sono foi bem-sucedida.

3.8.2 Métodos para detecção de eventos eletrofisiológicos durante o sono NREM: Ondas Delta, *Spindles*, *Ripples* e IEDs

As detecções de eventos eletrofisiológicos foram baseadas na análise da amplitude de sinais filtrados em bandas de frequências específicas, verificando intervalos temporais com amplitudes e intervalos dentro de limiares sugeridos pela literatura (GELINAS et al., 2016; MAINGRET et al., 2016), apresentados na Tabela 3. Para refinar a detecção destes eventos optamos por adotar limiares iguais ou ligeiramente abaixo dos recomendados pela literatura e utilizar variáveis auxiliares que tragam informações que não estejam relacionadas somente às bandas de frequência utilizadas, mas também sobre dinâmica da amplitude dos eventos detectados, como o número de cruzamentos em zero, o desvio padrão da amplitude sobre o tempo e a integral da amplitude sobre a curva. Neste segundo passo utilizamos estas variáveis auxiliares para criar *Clusters* a partir dos eventos detectados, visualizando e selecionando manualmente os que mais se adequem ao evento estudado, ignorando possíveis falsos positivos. A seguir exemplificaremos o processo de detecção para *Ripples*, IEDs, Ondas-Delta e *Spindles*.

Tabela 3 – Bandas de frequência utilizadas na detecção de eventos eletrofisiológicos

Evento	<i>Ripples</i>	IEDs	Ondas-Delta	<i>Spindles</i>
Frequência (Hz)	100 – 250	50 – 90**	0.5 – 4	9 – 17
Intervalo de duração (ms)	25 – 200	20 – 100	150 – 500	400 – 3000
Limiar adotado	*Média + 3*DP	Média + 3*DP	Média + 2*DP	***Média + 1.5*DP

*Adotado Média + 2*DP para alguns animais; ** Intervalo sugerido: 60 – 90 Hz; ***Limiar sugerido: Média + 3*DP;

3.8.2.1 Detecção de Ripples e IEDs

A clusterização de eventos de alta frequência detectados em CA1 foi realizada contabilizando o número de cruzamentos em zero (eixo y) e o desvio padrão da amplitude sobre o tempo total do evento detectado (eixo x), fornecendo informações sobre a frequência de oscilação e sobre a variação da amplitude, respectivamente. As Figura 19 a Figura 23 ilustram o processo de seleção de eventos de IEDs e *Ripples*, exemplificando também falsos positivos detectados. A Figura 23 exemplifica um Cluster de eventos *Ripples* selecionado manualmente, com um evento falso positivo excluído da seleção.

Figura 19 - Exemplo de IED detectada corretamente.

Figura 20 - Exemplo de evento falso positivo durante a detecção de IEDs

Figura 21 - Exemplo de falso Ripple detectado

Figura 22 - Exemplo de Ripple detectado corretamente

Figura 23 - Cluster de Ripples selecionados, destacando um falso positivo não incluído.

Apesar de utilizarmos diferentes faixas de frequência para a detecção de cada evento, as IEDs podem surgir como falsos positivos em *Ripples*. Sendo assim, *Ripples* detectadas durante o mesmo intervalo que IEDs foram descartadas, como sugerido em (GELINAS et al., 2016).

3.8.2.2 Detecção de Ondas Delta

Além da detecção de amplitudes do sinal filtrado a partir dos limiares sugeridos, a detecção de ondas delta ainda conta com outro processo anterior a clusterização. Semelhante a (MAINGRET et al., 2016), identificamos o ponto máximo dentro dos intervalos que se destacam acima dos limiares do sinal filtrado. A partir deste ponto máximo, calculamos o diferencial num intervalo de -250 a + 250 ms, sendo 0 o ponto máximo detectado previamente. Calculando o máximo e o mínimo do diferencial nos intervalos de -250 – 0 ms e 0 – 250 ms, respectivamente, obtemos o ponto inicial e final da onda delta, como exemplificado na Figura 24:

Figura 24- Exemplo de cálculo do início e fim de onda Delta a partir da derivada. Em azul temos o envelope do sinal filtrado e retificado. Em cinza, o sinal filtrado. As linhas verticais indicam o início e fim da onda delta detectada.

Como a detecção dos limiares de sinais filtrados é realizada através do envelope do sinal retificado, podemos obter falsos negativos como ondas delta de curvatura negativa, como na Figura 25:

Figura 25 - Exemplo de falso positivo na detecção de onda delta: curvatura negativa

Para evitar este tipo de erro, introduzimos em nossa Clusterização o cálculo da integral numérica do sinal filtrado do evento detectado, como exemplificado na Figura 26 e Figura 27:

Figura 26 - Exemplo do processo de clusterização de ondas delta, identificando falsos positivos detectados pela curvatura negativa através do valor da integral numérica, calculada somente no intervalo destacado em vermelho.

Figura 27 - Exemplo de onda delta corretamente classificada

3.8.2.3 Detecção de Spindles

A clusterização dos eventos *Spindles* através dos valores de Cruzamentos em zero, desvio padrão ou integral numérica não apresentou resultados eficientes em termos de clusterização, principalmente devido à grande variação de intervalos em que os eventos podem ocorrer, indo de 400 ms a 3 segundos. Com isso, apenas a detecção de eventos acima do limiar foi utilizada. No entanto, a ocorrência de IEDs e ondas Delta também podem contaminar o sinal filtrado na faixa de *spindles* (9 – 17 Hz), podendo levar a detecção de falsos positivos. Sendo assim, todos os eventos *spindles* que foram detectados juntamente com IEDs ou ondas delta foram descartados.

3.8.3 Análise da incidência de eventos eletrofisiológicos durante o sono NREM

A incidência de IEDs, *Ripples*, Ondas Delta e *Spindles* durante o sono NREM foi avaliada através da análise de tendência de Mann-Kendall (HAMED; RAMACHANDRA RAO, 1998; exemplo de aplicação em GELINAS et al., 2016), verificando se a Tendência da incidência ao longo dos dias de experimento é significativa (sessão 3.10.2).

3.8.4 Análise do acoplamento de eventos hipocampais com eventos corticais durante o sono NREM

Nesta etapa verificamos se o acoplamento entre eventos eletrofisiológicos de CA1 e do mPFC podem ser alterados em animais submetidos ao abasamento. Para isso, verificamos a probabilidade de ocorrência de Ondas Delta ou *Spindles* detectados no mPFC após eventos *Ripples* ou IEDs.

Para cada evento hipocampal (*Ripple* ou IED) procuramos a ocorrência mais próxima de um evento cortical (Delta ou *Spindle*), calculando o intervalo temporal entre os eventos. Os intervalos calculados foram separados entre grupos KD e CTRL, e reamostrados aleatoriamente através da técnica de *bootstrap* com 5000 iterações (sessão 3.10.3).

3.9 Sono REM: análises de densidades de potência e comodulação entre oscilações teta e gama

Foram analisadas as densidades de potência do LFP em CA1 e calculados os MI (TORT et al., 2010) entre as fases de teta e amplitudes de gama para cada dia de experimento, dividindo os episódios de sono REM em épocas contínuos de 30 segundos.

Os animais dos grupos KD-b e CTRL-b não foram incluídos nas análises de sono REM, pois o tempo total de registro deste segundo sub-grupo foi relativamente menor comparado ao grupo 'a' devido a questões técnicas relacionadas às estimulações e registros simultâneos, resultando em poucos episódios de sono REM registrados de maneira adequada.

3.9.1 Análise da densidade de potência durante sono REM

Analizamos as densidades de potência média através da estimação dos espectros pelo Método de Welch (WELCH, 1967), permitindo a utilização de uma janela de 2 segundos com sobreposição das estimativas em 50%, e resolução em frequência (via Transformada de Fourier Discreta) de 2^{13} pontos, na faixa de 0 a 500 Hz.

Foram calculadas as densidades de potência para cada época de 30 segundos durante todos os dias, e verificadas as potências relativas em 4 diferentes bandas de frequência: teta (5 – 12 Hz), gama baixo (*low-gamma*, LG: 30 – 55 Hz), gama alto (*high-gamma*, HG: 55 – 120 Hz) e oscilações de alta frequência (*high frequency oscillation*, HFO: 100 – 120 Hz).

Separando as épocas em dois grupos, KD e CTRL, as amostras foram normalizadas em relação ao primeiro dia de experimento e comparadas entre os grupos através de reamostragem estatística por *Bootstrap* com 5000 iterações (sessão 3.10.3), verificando diferenças na distribuição das potências entre os animais controle e nos animais submetidos ao abrasamento elétrico.

3.9.2 Análise da comodulação entre fase em teta e amplitude em gama

A amplitude de frequências gama moduladas pela fase de teta dependem das estruturas hipocampais avaliadas, com variações características no eixo dorso-ventral (SCHEFFER-TEIXEIRA; TORT, 2017). Para determinarmos os canais mais adequados para os cálculos do MI geramos comodulogramas bidimensionais envolvendo diferentes frequências para a análise de fase e diferentes frequências para análise de amplitude, como mostra a Figura 28:

Figura 28 - Exemplo de diferentes acoplamentos de fase-amplitude durante o sono REM num animal do grupo KD. As linhas representam os comodulogramas gerados entre diferentes canais de registro no hipocampo (1, 2 e 3, respectivamente) para o cálculo da frequência de amplitude, e um canal fixo (3) para a frequência de fase. As colunas representam os dias de experimento. Os eletrodos 1 e 2 apresentam comodulações entre teta e HFOs, enquanto que o eletrodo 3 apresenta comodulações em gama. Em cada gráfico o eixo 'x' apresenta as frequências para o cálculo da fase, e o eixo 'y' as frequências para o cálculo da amplitude.

De acordo com os comodulogramas gerados, determinamos que as bandas em gama com alterações mais significantes durante a aplicação do abrasamento foram em LG (30 – 55 Hz), utilizada portanto para o cálculo de MI.

A comparação dos MI entre os grupos KD-a e CTRL-a foram realizadas utilizando técnicas de *bootstrap* para intervalos de confiança, calculados para cada dia de experimento.

3.10 Análises estatísticas

3.10.1 Teste de Mann-Whitney

Para a comparação entre os ID e a proporção dos estágios de sono entre os grupos KD e CTRL foram realizados testes não-paramétricos de *Mann-Whitney*, com valores de alfa iguais a 0,05.

3.10.2 Análise de tendência de Mann-Kendall

O teste de Mann-Kendall aparece como uma opção aos testes de Correlação de Pearson/Spearman, que exigem a linearidade entre as variáveis observadas. Os resultados do teste podem ser interpretados através dos valores de *tau*, sendo -1 indicando Tendência Negativa perfeita, e +1 indicando Tendência Positiva perfeita (HAMED; RAMACHANDRA RAO, 1998). A significância do teste é verificada através do teste Z, analisando se a Tendência da incidência ao longo dos dias de experimento é significativa. O teste Z é similar ao teste-t de Student, porém considera os valores de variância da amostra normalizada durante a comparação. Distribuições das Tendências que estejam centradas em zero são indicadas como não significativas ($p > 0,05$).

3.10.3 Análise por reamostragem - Bootstrap

A estratégia de *Bootstrap* consiste na reamostragem aleatória repetitiva com reposição de um conjunto de dados experimentais aplicados a uma função desejada, como o cálculo da média de uma distribuição ou a comparação entre a diferença entre médias de dois grupos. O caráter aleatório das reamostragens leva à redução de vieses estatísticos que acompanham a comparação entre diversos indivíduos num mesmo grupo (EFRON, 1992).

A partir da aplicação do *Bootstrap* nossas variáveis passam a ser descritas como distribuições, não apenas como um conjunto de dados observados. Neste trabalho, aplicamos o *Bootstrap* para a caracterização dos valores médios de um

grupo e também para a diferença média entre dois grupos. No primeiro caso, foram realizadas 5000 reamostragens do conjunto de dados experimentais, e a cada iteração foi calculada a média dos valores selecionados aleatoriamente, obtendo assim uma distribuição das médias em cada reamostragem aleatória. Para a comparação entre dois grupos foram calculadas as diferenças entre as médias de cada iteração, obtendo assim uma distribuição das diferenças entre as médias. Para avaliar essa diferença foram calculados os intervalos de confiança com alfa de 0.05. As distribuições onde o intervalo de confiança contém o valor zero não foram consideradas estatisticamente diferentes. As técnicas de *Bootstrap* foram aplicadas nas análises de probabilidade de ocorrência entre eventos durante sono NREM e também para a análise do MI entre oscilações teta-gama e análise de potência de oscilações teta, LG, HG e HFO durante sono REM.

3.10.4 Correlação entre os efeitos do abrasamento e alterações em sono NREM e REM

Para avaliarmos quais os efeitos da aplicação do abrasamento elétrico e verificar a dependência das alterações nos padrões oscilatórios e os déficits cognitivos, calculamos as correlações de Pearson entre o ID, a duração das AD, o número de Spikes, a incidência de IEDs durante sono NREM, a variação das potências de Teta e o MI durante o sono REM.

3.11 Histologia

Ao final dos experimentos os animais foram anestesiados com Uretana (1,5 mg/kg, solução a 50%). Em seguida foram aplicadas correntes de 1 mA durante 1 segundo para indução da lesão eletrolítica nos tecidos para a verificação do posicionamento dos eletrodos, sendo perfundidos em soluções de tampão fosfato-salina (PBS – 350 ml) e paraformaldeído (PFA 4% - 250 ml) logo em seguida. Após a perfusão os encéfalos foram extraídos e imersos em solução de PFA 4% durante 12 horas. Durante os 3 dias seguintes foram realizados os procedimentos para crioproteção através da desidratação dos encéfalos, sendo transferidos em soluções de 10%, 20% e 30% de sacarose a cada 24 horas, respectivamente. Ao final, foram

congelados por imersão em solução de Isopentano e armazenados em *freezer* a -80° C.

Para verificação do posicionamento das lesões eletrolíticas foram realizados cortes transversais em criostato com 30 µm de espessura em torno das coordenadas respectivas ao mPFC, BLA e CA1. Em seguida, as lâminas foram coradas utilizando Cresil-violeta para identificação das lesões.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos comportamentais do abrasamento elétrico rápido da BLA

Durante o protocolo de indução de pós-descargas as respostas comportamentais após cada trem de estímulos foram analisadas por vídeo e classificadas de acordo com a Escala de Racine (Tabela 2, RACINE, 1972b). A Figura 29 traz os valores máximos na escala alcançados pelos animais dentro de cada dia de aplicação, com no mínimo 3 repetições para cada comportamento. Apenas os animais K1, K7 e B7 não alcançaram o estágio 5.

Figura 29 – Estágios de Racine máximo alcançado por cada animal em cada dia de estimulação, aplicados nos dias 1, 2 e 3. O estágio de Racine reportados para cada animal é relativo ao estágio máximo alcançado em cada dia, com o mínimo de 3 repetições.

4.2 Reconhecimento de objetos

Os ID foram calculados durante cada minuto do *decoding* (Figura 30), sendo utilizados para a comparação entre os grupos os valores de ID calculados até o segundo minuto (MAINGRET et al., 2016).

Figura 30 - Índice de discriminação calculado para cada minuto do experimento A linha pontilhada representa o ID igual a 0,5, equivalente ao mesmo tempo de exploração entre os objetos.

Observamos diferenças nos IDs entre os grupos KD-POS e KD-PRE (* $p = 0,024$) enquanto que os grupos CTRL-PRE e CTRL-POS não apresentaram diferenças significativas ($p = 0,932$), indicando a diminuição das performances nos animais submetidos ao abrasamento (Figura 31 e Figura 32).

Figura 31 - Boxplot indicando a distribuição dos ID para cada grupo, com diferença entre os grupos KD-PRE e KD-POS (* $p = 0,024$; Teste de Mann-Whitney). Os grupos CTRL-PRE e CTRL-POS não apresentaram diferenças ($p = 0,936$; Teste de Mann-Whitney)

Figura 32 - Médias e erro padrão dos ID calculados até 2 minutos para todos os grupos, com diferença entre os grupos KD-PRE e KD-POS (* $p = 0,024$; Teste de Mann-Whitney). Os grupos CTRL-PRE e CTRL-POS não apresentaram diferenças ($p = 0,932$; Teste de Mann-Whitney)

4.3 Efeitos do abasamento elétrico sobre o sono

4.3.1 Alterações na Arquitetura do Sono durante a aplicação do abasamento

Após a classificação dos estágios do sono (Figura 33, exemplo da densidade média de potência espectral por grupos durante o primeiro dia de experimento) verificamos que a proporção entre os estados Acordado, NREM e REM não foi alterada entre os grupos KD e CTRL (Figura 34 - Teste de *Mann-Whitney* – $p = 0,714$ (Acordado), $p = 0,714$ (NREM) e $p = 0,341$ (REM)):

Figura 33 – Densidade espectral dos estágios de sono nos grupos KD e CTRL durante o primeiro dia

Figura 34 - Proporção média entre os estágios de sono para cada grupo. A proporção entre os grupos não apresentou diferenças significativas (Teste de *Mann-Whitney* – $p = 0,714$ (Acordado), $p = 0,714$ (NREM) e $p = 0,341$ (REM)).

4.3.2 Efeitos do abrasamento sobre o sono NREM: substituição de *Ripples* por IEDs

Nesta etapa calculamos a incidência de eventos (eventos/segundo) durante o sono NREM (Figura 35 e Figura 36). As incidências de IEDs entre os dias 1 e 4 apresentaram uma Tendência Positiva significativa ($\tau = 0,83$; $p < 0,001$ – teste Z), enquanto que *ripples* e *spindles* apresentaram uma Tendência Negativa significativa ($\tau = -0,70$; $p < 0,01$ e $\tau = -0,73$; $p < 0,001$ – teste Z, respectivamente). Os eventos de onda delta no grupo KD e os eventos de onda delta, spindle e *ripple* no grupo Controle não apresentaram Tendências significativas ($\tau = 0,2$; $p = 0,4$ para Ondas Delta (KD), $\tau = 0,06$; $p = 0,8$ para *Ripples* (CTRL), $\tau = 0,04$; $p = 0,17$ para *Spindles* (CTRL) e $\tau = 0,02$; $p = 0,5$ para Ondas Delta (CTRL)).

Figura 35 - Incidência de eventos durante o sono NREM em animais submetidos ao abrasamento

Figura 36 - Incidência de eventos Delta, Spindle e Ripples em animais controle.

4.3.3 Acoplamento hipocampo-cortical: probabilidade de Ondas Delta e Spindles após eventos hipocampais

A Figura 37 traz as distribuições de Probabilidade para cada evento analisado, detalhadas na Tabela 5:

Figura 37 - Probabilidade de ocorrência de ondas delta após IEDs e Ripples. b) Probabilidade de ocorrência de Spindles após IEDs e Ripples. c) Probabilidade de ocorrência de Spindles após ondas delta.

Tabela 5 – Distribuição do intervalo de ocorrência de eventos corticais em relação a eventos hipocampais.

Eventos	Densidade de probabilidade máxima	Intervalo de ocorrência		Número total de eventos
		Média ± desvio padrão (s)	Intervalo de confiança (s)	
IED – delta	0,026	0,11 ± 0,018	[-0,07; 0,14]	8343
<i>Ripple</i> (KD) – delta	0,007	0,37 ± 0,08	[-0,20; 0,55]	8411
<i>Ripple</i> (CT) – delta	0,011	0,33 ± 0,05	[0,25; 0,42]	12457
IED – Spindle	0,009	3,0 ± 0,6	[1,80; 4,32]	8343
<i>Ripple</i> (KD) – Spindle	0,001	1,5 ± 0,5	[0,40; 2,52]	13421
<i>Ripple</i> (CT) – Spindle	0,011	2,6 ± 0,5	[1,68; 3,70]	12457
Delta (KD – Spindle	0,024	0,7 ± 0,2	[0,31; 1,08]	83813
Delta (CT) – Spindle	0,044	0,9 ± 0,1	[0,70; 1,08]	73619

A Tabela 6 compara as distribuições das probabilidades de eventos calculadas através da análise do Intervalo de Confiança, sendo a hipótese H0 de que as distribuições de probabilidade não possuem diferença ($h = 1$).

Tabela 6 – Comparações entre as distribuições dos intervalos de ocorrências.

Probabilidade de ocorrência de onda delta	Média ± Desvio Padrão da Diferença (s)	Intervalo de confiança da diferença	Teste de hipótese: igualdade entre os grupos	N
IEDs vs <i>Ripples</i> (KD)	-0,27 ± 0,09	[-0,43; -0,10]	$h = 1$	8343
IEDs vs <i>Ripples</i> (CT)	-0,22 ± 0,06	[-0,35; -0,12]	$h = 1$	8343
<i>Ripples</i> (CT) vs <i>Ripples</i> (KD)	-0,04 ± 0,10	[-0,24; 0,16]	$h = 0$	8411
Probabilidade de ocorrência de <i>Spindles</i>				
IEDs vs <i>Ripples</i> (KD)	1,61 ± 0,94	[-0,19; 3,42]	$h = 0$	8343
IEDs vs <i>Ripples</i> (CT)	0,43 ± 0,90	[-1,38; 2,14]	$h = 0$	8343
<i>Ripples</i> (KD) vs <i>Ripples</i> (CT)	-1,17 ± 0,77	[-2,72; 0,33]	$h = 0$	12457
Delta (KD) vs Delta (CT)	-0,20 ± 0,24	[-0,66; 0,26]	$h = 0$	73619

4.4 Sono REM: alterações nas oscilações locais de CA1

4.4.1 Potência de oscilações teta e gama

Foram calculadas as densidades de potência espectral médias durante o sono REM para cada dia de experimento (Figura 38). Em seguida foram calculadas as densidades espectrais médias em 4 bandas de frequência: teta (5 – 12 Hz, LG (30 a 55 Hz), HG (65 a 100 Hz) e HFO (100 a 120 Hz). As densidades foram normalizadas para cada animal com relação ao seu respectivo valor durante o primeiro dia, e então calculadas as médias e erros padrão (Figura 39), comparando as potências médias totais entre os grupos (Figura 40). Valores nas faixas de 23 — 26 Hz, 55 — 65 Hz e 115 — 125 Hz foram removidos devido à ruídos por contaminação elétricas e seus harmônicos.

Figura 38 – Exemplo da densidade espectral média comparada entre primeiro dia de experimento (antes do abrasamento e o último dia de experimento).

Figura 39 - Potência normalizada para teta, LG, HG e HFO durante o sono REM.

Diferença entre as potências normalizadas (%) entre os grupos KD e CT

Figura 40 - Histogramas das diferenças entre densidades de potência entre o Grupo KD e Grupo CTRL obtidas por meio de Bootstrap. Todas as diferenças rejeitam a hipótese de que as distribuições entre os grupos sejam iguais, exceto para Teta e HG. Porém, apenas Teta possui uma alteração razoável, com uma diminuição média de 7,32%

A variação da densidade de potência com relação ao primeiro dia foi significativa nas frequências de Teta e HG. Em teta temos uma diminuição de $7,32 \pm 0,40\%$ no grupo KD em relação ao grupo CTRL, enquanto que as outras frequências apresentam variações que, apesar de significantes, são relativamente baixas, sendo a maior observada em HG ($-0,10 \pm 0,01\%$).

As comparações realizadas com o *Bootstrap* das diferenças entre os Grupo KD e Grupo CTRL podem ser conferidas na Tabela 7:

Tabela 7 – Comparações de KD vs CTRL para cada banda de frequência durante REM

Banda de frequência	Média ± Desvio padrão (%)	Intervalo de confiança (%)	H
Teta (5–12 Hz)	-7,323 ± 0,398	[-8,114; -6,567]	1
LG (30–55 Hz)	-0,054 ± 0,038	[-0,020; 0,128]	0
HG (65–100 Hz)	-0,105 ± 0,015	[-0,135; -0,075]	1
HFO (100–120 Hz)	-0,007 ± 0,004	[-0,015; -0,003]	1

4.4.1.1 Dinâmica oscilatória: comodulação de fase-amplitude entre teta e gama

Os valores MI foram calculados para cada registro de sono realizado nos 5 dias de experimento (Figura 41), sendo reamostrados através do *bootstrap*. Normalizando os valores de MI em relação ao MI médio calculado durante o sono no primeiro dia de registro, observamos um aumento do MI entre teta e LG durante os dias de aplicação do abrasamento (Figura 42).

Figura 41 – Comodulogramas de um animal do grupo CTRL (acima) e do grupo KD (abaixo), indicando o aumento do MI durante os dias de aplicação do abrasamento (vermelho)

Figura 42 - Média e desvio padrão das distribuições de MI calculados para cada dia de experimento nos grupos CTRL (Preto) e KD (vermelho), destacando o aumento do MI durante a aplicação do abrasamento (dias 2, 3 e 4).

Para verificarmos a diferença entre os grupos para cada dia, calculamos a distribuição da diferença entre as médias de cada grupo pelo *bootstrap*, indicada pelos histogramas da Figura 43:

Figura 43 - Histogramas com a distribuição da diferença entre as médias do grupo KD e do grupo CTRL repetidas 5000 vezes.

Através da análise de intervalos de confiança e testes de hipóteses verificamos que existem diferenças somente durante o sono REM após a aplicação do abrasamento. Durante os dias 2, 3 e 4 o Grupo KD apresenta valores médios maiores em relação aos grupos controles, com diferenças médias de $54,1 \pm 11,3$ %, $48,3 \pm 9,6$ % e $58,3 \pm 15,6$ %.

Tabela 8 – Diferenças médias entre o Grupo KD e Grupo CTRL

Dia	Média $\pm$ Desvio padrão (%)	Intervalo de confiança (%)	H
1º dia	$0,06 \pm 6,8$	[-13,2; 13,3]	0
2º dia	$54,1 \pm 11,3$	[33,1; 77,2]	1
3º dia	$48,3 \pm 9,6$	[29,8; 67,5]	1
4º dia	$58,3 \pm 15,6$	[28,2; 89,8]	1
5º dia	$-9,5 \pm 7,6$	[-24,3; 5,43]	0

4.5 Correlação entre os efeitos do abrasamento, sono e memória

Verificamos que a incidência de IEDs durante o sono subsequente à última aplicação do abrasamento possui uma correlação negativa com o ID ($r = -0,80$; $p = 0,01$; Figura 44 à esquerda). Entretanto, essa correlação não se mantém durante o sono registrado durante o quinto dia, subsequente à sessão de *encoding* do reconhecimento de objeto ($r = -0,2$; $p = 0,62$ - Figura 44 à direita).

Figura 44 - Correlação entre o Índice de Discriminação e a incidência de IEDs no quarto dia (à esquerda) e no quinto dia (à direita).

Durante o quinto dia verificamos uma correlação negativa entre a potência de teta e a incidência de IEDs ($r = -0,82$; $p = 0,01$)

Figura 45 – Correlação entre a densidade de potência relativa de Teta (%) e a incidência de IEDs (Eventos/s) durante o sono após o encoding ($r = -0,82$, $p = 0,01$).

Observamos também uma correlação negativa entre os valores de MI médios por animal a cada dia e a duração das pós-descargas médias para cada dia:

Figura 46 – Correlação negativa entre os valores médios de MI (%) e os valores médios de AD(s) ($r = -0,55$; $p = 0,03$).

4.6 Histologia

As lesões eletrolíticas realizadas no mPFC geraram lesões menores quando comparadas às lesões na BLA e CA1. Como implantamos um fio único no mPFC, a referência para as estimulações foram o parafuso terra posicionado sobre o osso occipital, gerando uma menor quantidade de corrente em torno do eletrodo. Em CA1, no entanto, as lesões foram extensas, uma vez que foram aplicados correntes sobre cada um dos três eletrodos.

Figura 47 – Lesões identificadas a partir de cortes coronais do atlas estereotático (adaptado de (PAXINOS; WATSON, 2006) nas regiões do mPFC, BLA e CA1. As lesões em CA1 foram representadas por marcadores maiores, correspondendo à extensão da lesão.

5 DISCUSSÃO

Uma das mais complexas comorbidades presentes na ELT são os prejuízos cognitivos verificados tanto em pacientes como em modelos animais. As alterações morfofuncionais das estruturas límbicas envolvidas tanto na ELT como na consolidação de memórias durante o sono pode descrever estes efeitos, porém os mecanismos que levam a estas alterações não foram completamente elucidados (HOLMES, 2015).

Neste trabalho buscamos caracterizar como oscilações típicas durante o sono são alteradas na ELT e quais as possíveis implicações destas alterações nos processos de consolidação de memória. Utilizando um modelo de abrasamento rápido da BLA, verificamos que além do prejuízo no reconhecimento de objetos e alterações eletrofisiológicas durante o sono NREM, como a substituição gradativa de *ripples* por IEDs, os animais submetidos ao abrasamento elétrico apresentaram um aumento na comodulação fase-amplitude entre oscilações teta e gama durante o sono REM após as estimulações, exibindo também correlação negativa entre a

comodulação e a duração das pós-descargas induzidas pelos estímulos do abrasamento durante o sono subsequente a aplicação dos protocolos. Estes resultados podem levar a identificação de novos marcadores eletrofisiológicos que possam esclarecer como o estabelecimento de circuitos epiléticos recrutam mecanismos fisiológicos relacionados à consolidação de memória, como discutido nos próximos itens.

5.1 Vantagens do modelo de abrasamento rápido da amígdala basolateral

O estudo dos processos epileptogênicos através de modelos de abrasamento possibilita um controle preciso da progressão da epilepsia e também dos focos epiléticos (GODDARD, 1967; RACINE, 1972b; KANDRATAVICIUS et al., 2014; MORALES et al., 2014), se tornando um dos principais modelos utilizados neste tipo de estudo. Essa popularidade também levou ao desenvolvimento de diversos métodos de aplicação, incluindo modelos de abrasamento elétrico, químicos e até por indução de traumas (BUTUZOVA; KITCHIGINA, 2008; MORALES et al., 2014; ASTASHEVA; ASTASHEV; KITCHIGINA, 2015). Porém grande parte destes protocolos são realizados diariamente durante períodos de 14 até 30 dias de estimulações, tornando-se um processo dispendioso.

A redução do período de estimulações é interessante para estudos envolvendo registros eletrofisiológicos, principalmente de alta densidade, uma vez que reações do tecido cerebral aos eletrodos implantados podem levar a perda da estabilidade do registro ao longo do tempo (WINSLOW; TRESCO, 2010). Diversos protocolos de abrasamento rápido propostos dependem de estimulações acima do limiar de evocação de ADs e da necessidade de aplicação sobre as mesmas estruturas a serem estudadas, o que pode levar a alterações como astrogliose e perda neuronal não somente devido à epileptogênese, mas também ao próprio protocolo de estimulação (MORALES et al., 2014). A aplicação do protocolo de abrasamento rápido da BLA sugerido por (MORALES et al., 2014) possibilita a estimulação de correntes abaixo do limiar para evocação de ADs, levando a alterações comportamentais e também na morfologia e funcionalidade de células hipocâmpais semelhante a um modelo de abrasamento lento. Apesar de demonstrar as semelhanças entre estes protocolos, a caracterização realizada por (MORALES

et al., 2014) não avalia os prejuízos na consolidação de memória e as alterações eletrofisiológicas envolvidas nesse déficit.

Além de reproduzimos os efeitos comportamentais da aplicação do protocolo de abrasamento rápido sugerido por (MORALES et al., 2014), onde 5 animais atingiram o estágio 5 de Racine (enquanto que 2 permaneceram no estágio 4 e apenas 1 no estágio 3 - Figura 29), também caracterizamos os prejuízos cognitivos e disfunções eletrofisiológicas resultantes deste modelo, evidenciando tanto sua reprodutibilidade como também ampliando sua aplicabilidade, introduzindo as possibilidades de sua utilização em estudos sobre as alterações cognitivos e fisiológicas durante os processos de epileptogênese.

5.2 Alterações cognitivas induzidas pelo abrasamento elétrico

Ratos tendem naturalmente a explorar mudanças que observam ao seu redor, desde novos objetos inseridos num ambiente familiar como também objetos já conhecidos, porém em novas posições ou durante novos contextos ambientais (MUMBY, 2002). A consolidação do aprendizado relativo a cada um desses modelos de exploração pode ser atribuído a diferentes estruturas cerebrais, como a dependência do Córtex Perirrinal durante a exploração de novos objetos e a dependência do Hipocampo na exploração de objetos conhecidos, porém deslocados ou em novos contextos ambientais (WARBURTON; BROWN, 2015).

O teste de reconhecimento de objetos utilizado neste experimento permite verificar a eficácia na consolidação de informações dependentes do hipocampo, uma vez que envolvem todo o contexto ambiental/espacial em torno dos objetos. Nesse sentido, os animais submetidos aos protocolos de abrasamento elétrico apresentaram prejuízos na consolidação dessa memória espacial, indicando assim possíveis alterações nos mecanismos de consolidação de memória dependentes do hipocampo. Prejuízos em testes semelhantes também foram observados em modelos animais de ELT por administração de pilocarpina (JIANG et al., 2018), enquanto que em modelos de abrasamento elétrico do hipocampo os animais apresentaram um menor desempenho em labirintos circulares (*CheeseBoard Maze*, GELINAS et al., 2016), sugerindo que os efeitos observados neste trabalho corroboram com a literatura a respeito dos prejuízos cognitivos em modelos de ELT.

5.3 Efeitos do abasamento sobre eventos eletrofisiológicos durante sono NREM

As alterações nas oscilações eletrofisiológicas durante o sono NREM sugerem que a substituição de *ripples* hipocámpais por oscilações patológicas, como as IEDs, estejam relacionados a déficits na consolidação da memória espacial, alterando principalmente a comunicação hipocampo-cortical (GELINAS et al., 2016).

Relações causais já foram estabelecidas entre a eficiência da consolidação de memória e o acoplamento entre *ripples* com ondas delta corticais e *spindles* tálamo-corticais. Em MAINGRET et al., 2016, o acoplamento entre essas oscilações foi aumentado artificialmente através de estimulações elétricas sobre regiões corticais, gerando ondas deltas e *spindles* sincronizados com a detecção de *ripples* em CA1. Este acoplamento hipocampo-cortical artificial melhorou o desempenho dos animais em tarefas de reconhecimento de objetos, enquanto que a estimulação elétrica não-sincronizada com *ripples* não modificou o desempenho. Como observamos neste estudo, as IEDs levam a um acoplamento aberrante entre o hipocampo e o córtex pré-frontal, com intervalos entre IEDs e ondas delta até 0.27 ± 0.09 segundos menores quando comparados a *ripples* (Figura 37, Tabela 5). Essa diminuição no intervalo de ocorrência de ondas delta após eventos hipocámpais se assemelha à estimulação elétrica realizada em (MAINGRET et al., 2016) (Figura 48), porém com a ausência de informações relevantes contidas em *ripples* e possivelmente com a introdução de informações irrelevantes ou distorcidas provenientes das IEDs.

Figura 48 – Probabilidade de ocorrência de uma onda delta no mPFC após a detecção de ripples em CA1. Em verde, a probabilidade de ocorrência durante o acoplamento artificial por estimulação elétrica, e em roxo a probabilidade de ocorrência com estimulação elétrica não pareada aos ripples. A diminuição no intervalo entre os eventos hipocámpais e corticais se assemelha ao observado durante IEDs e ondas delta – adaptado de (MAINGRET et al., 2016).

De fato, a geração de IEDs ocorre de maneira semelhante à geração de ripples em CA3, porém com a diminuição da atividade das *basket cells* parvalbuminérgicas, levando a um aumento da atividade de neurônios excitatórios (GULYÁS; FREUND, 2015). Essa diminuição na regulação da atividade neuronal durante a geração dos ripples pode explicar os déficits cognitivos observados na ELT, sendo as IEDs uma representação distorcida dos padrões de disparos neuronais em consolidação durante o sono NREM.

As análises de probabilidade de eventos mostram os efeitos do abrasamento principalmente sobre o acoplamento hipocampo-cortical através das ondas delta, uma vez que a probabilidade de ocorrência de *spindles* após IEDs ou Ripples (grupo KD e CTRL), e a probabilidade de *spindles* após ondas delta não possuem diferenças significativas entre os grupos (Tabela 5). Este resultado sugere que o acoplamento entre eventos hipocámpais (IEDs ou Ripples) e as ondas delta possa se iniciar através de estruturas hipocámpais, indicado principalmente pelo curto intervalo de $0,11 \pm 0,02$ segundos entre IEDs e ondas delta.

Neste trabalho também observamos que a incidência de IEDs durante o sono subsequente ao último dia de abrasamento está correlacionada ao Índice de

Discriminação de objetos ($r = -0,8$; $p = 0,01$; Figura 44). Esta correlação, entretanto, pode indicar o efeito das aplicações do abrasamento sobre a performance nas tarefas comportamentais, e não necessariamente o efeito das IEDs durante a consolidação da memória, uma vez que a incidência durante o sono subsequente ao aprendizado no quinto dia não apresentou correlação com o desempenho dos animais durante o teste.

5.4 Alteração de oscilações teta e gama durante o sono REM

A geração de oscilações teta no hipocampo emerge da interação entre estruturas intrahipocampais e também extrahipocampais, envolvendo diferentes circuitos osciladores teta ao longo do eixo septo-temporal no hipocampo como também a interação do hipocampo com estruturas corticais, como o CE, e subcorticais, como o septo medial (BUZSÁKI, 2002; PATEL et al., 2012; SHUMAN; AMENDOLARA; GOLSHANI, 2017). Alterações nestes circuitos podem levar tanto à diminuição das potências como também da sincronia em teta, e as correlações destas alterações eletrofisiológicas com déficits em tarefas envolvendo memórias dependentes do hipocampo sugerem que estas alterações podem levar à perturbação da transferência e integração de informações através destes circuitos (SHUMAN; AMENDOLARA; GOLSHANI, 2017).

Já a manipulação destes circuitos osciladores em teta pode levar a condições semelhantes a modelos de ELT e até mesmo reverter os efeitos cognitivos observados. A administração repetitiva de antagonistas de receptores GABA_A ou agonistas de receptores inespecíficos de glutamato no septo-medial, por exemplo, são capazes de induzir atividades epileptiformes no hipocampo (BUTUZOVA; KITCHIGINA, 2008; ASTASHEVA; ASTASHEV; KITCHIGINA, 2015), enquanto que a inibição optogenética de neurônios GABAérgicos do septo-medial durante o sono REM leva à diminuição da potência de teta, acompanhado por prejuízos na consolidação da memória (BOYCE et al., 2016). Já a estimulação elétrica da mesma região em frequências teta é capaz de promover uma melhora na performance de animais tratados com pilocarpina em tarefas de memória dependentes do hipocampo (LEE et al., 2017).

É interessante notar que a diminuição da potência em teta observada em nossos experimentos possui uma correlação negativa com a incidência de IEDs

durante o sono pós-aprendizado ($r = -0,82$; $p = 0,01$; Figura 45). Uma das interpretações da correlação observada envolveria os possíveis efeitos de abrasamento elétrico sobre o septo-medial. Resultados semelhantes ao nosso trabalho foram verificados em animais submetidos ao abrasamento elétrico da via perfurante, induzindo o surgimento de IEDs e também uma tendência à diminuição de teta hipocampal. Entretanto, durante os eventos de IEDs registrados em CA1 também foram detectados disparos neuronais no septo-medial sincronizados com os eventos patológicos (KITCHIGINA et al., 2013). O septo-medial, por sua vez, pode influenciar diretamente o processo de epileptogênese. A administração repetitiva de antagonistas de receptores GABA_A, como a infusão intraseptal de bicuculina, é capaz de induzir atividades epileptiformes no hipocampo e comportamentos de crises epiléticas (BUTUZOVA; KITCHIGINA, 2008), enquanto que o mesmo procedimento utilizando o agonista de receptores glutamatérgicos L-glutamato leva aos mesmos efeitos (ASTASHEVA; ASTASHEV; KITCHIGINA, 2015). Em ambos experimentos também é observado a diminuição das oscilações teta registradas no hipocampo durante períodos interictais. A indução destes fenômenos epiléticos ocorre principalmente através das projeções septo-hipocampais, levando a alterações no equilíbrio excitatório/inibitório das estruturas hipocampais (BUTUZOVA; KITCHIGINA, 2008). Com base nestas evidências, podemos sugerir que a correlação entre IEDs e a diminuição das potências em teta observadas em nosso experimento pode estar relacionada a alterações nos circuitos septo-hipocampal-entorrinal observadas nestes modelos, levando tanto ao surgimento de IEDs como também a diminuição da potência em teta e prejuízos cognitivos.

Uma hipótese alternativa seria de que a diminuição das oscilações teta é resultado da dessincronização das atividades eletrofisiológicas entre diferentes estruturas hipocampais, devido principalmente a alterações nas projeções hipocampo-entorrinais. Em animais tratados com injeções intraperitoniais de ácido caínico, o prejuízo na consolidação de memórias episódicas (relacionadas à representação espaço-temporal) ocorre junto à diminuição da coerência de oscilações teta entre as regiões de CA1 e do giro denteado (INOSTROZA et al., 2013). Analisando a influência das projeções entre o hipocampo e o CE, LAURENT et al., 2015 sugere que essa dessincronização ocorre principalmente devido à reorganização das vias temporoamônica e perfurante após a esclerose hipocampal característica da ELT. Da mesma forma que alterações morfológicas podem induzir a

desincronização das oscilações teta entre as regiões hipocampais, as IEDs poderiam surgir principalmente devido à diminuição da inibição em CA3 e à modificação dos circuitos geradores de *ripples* (MA et al., 2006; GULYÁS; FREUND, 2015), associando a correlação entre IEDs e a potência de teta a possíveis mecanismos comuns de modificações morfológicas das regiões hipocampais.

5.4.1 Alterações na comodulação de fase-amplitude de oscilações teta e gama

No presente estudo, não observamos diferenças em relação a densidade de potência em gama durante os dias de experimento. Entretanto, o acoplamento entre as oscilações teta e LG (indicados pelo MI) mostrou um aumento durante o sono REM subsequente ao abراسamento (Figura 42). O aumento na comodulação de fase-amplitude nestas frequências é comumente associada aos processos de aprendizado e consolidação de memória (TORT et al., 2009; COLGIN, 2015), e o fato de não apresentar correlação com a incidência de IEDs ou com as densidades de potência em teta pode sugerir que esse acoplamento seja reflexo de outros mecanismos afetados durante a epileptogênese, como a reativação de circuitos relacionados aos padrões de disparos epileptiformes pelo hipocampo.

A correlação negativa entre o MI e a duração das ADs (Figura 46, $r = -0,55$; $p = 0,03$) sugere que possa haver certa intersecção entre mecanismos de formação de memória e de epileptogênese. A duração das ADs se torna maior à medida em que as crises deixam de ser parciais (locais) e passam a influenciar outras regiões (crises generalizadas) (MORALES et al., 2014). Durante este processo, as redes hipocampais gradativamente se tornam hiperexcitáveis, podendo levar a crises recorrentes, sendo considerado um aprendizado do circuito à redução da inibição local (GODDARD, 1967; MUSTO; SAMII; HAYES, 2009). Neste sentido, a correlação encontrada mostra que durante os períodos de menor duração das ADs ocorrem eventos eletrofisiológicos semelhantes aos observados durante a consolidação de informações durante o sono REM. Podemos sugerir que, neste período, os circuitos modulados pela estimulação elétrica estariam sendo reativados durante o sono, passando assim por um processo de plasticidade sináptica, indicando diretamente o processo de epileptogênese na alteração de excitabilidade hipocampal. Já os períodos com maiores durações de ADs podem estar relacionados às crises generalizadas, indicando um circuito epiléptico já consolidado.

Resultados semelhantes foram observados em pacientes epiléticos durante o sono NREM. Utilizando uma combinação de macro e microeletrodos para registro da atividade eletrofisiológica tanto no foco epilético como em regiões temporais adjacentes, BOWER et al., 2015 mostraram que o padrão de ativação de grupos neuronais que disparam minutos antes da ocorrência de crises epiléticas são repetidos durante o sono NREM. Além disso, esses grupos não necessariamente estão localizados na região do foco epilético, demonstrando a ativação de uma rede neuronal relacionada às descargas epiléticas distribuída espacialmente. Além da ativação destes grupos neuronais, também foi observado que as alterações na forma de onda das IEDs podem ocorrer tanto após episódios de crises epiléticas como também após o sono NREM (BOWER et al., 2017). Essa alteração das características de onda das IEDs estariam relacionadas à modificação e incorporação de novos circuitos geradores de descargas interictais, tornando-se um indicador dos processos de epileptogênese, e sua alteração durante o sono NREM indica que essas mudanças podem ocorrer principalmente através de circuitos relacionados à consolidação da memória (BOWER et al., 2017). Dessa forma, podemos sugerir que o aumento da comodulação de fase-amplitude em teta-gama observado em nossos experimentos também emerge como um marcador eletrofisiológico dos processos de epileptogênese através dos mecanismos de consolidação de memória empregados durante o sono REM, complementando as evidências apresentadas por (BOWER et al., 2017).

6 LIMITAÇÕES E POSSIBILIDADES FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem uma abordagem observacional sobre as alterações de oscilações em diferentes estágios de sono durante a aplicação de um protocolo de abrasamento elétrico, não possibilitando o estabelecimento de relações causais entre os eventos observados e correlatos comportamentais, como prejuízos cognitivos ou indução de crises epiléticas. Através da utilização deste modelo podemos apenas inferir que os efeitos comportamentais e eletrofisiológicos estão relacionados ao processo de epileptogênese, e que apesar de descritos em (MORALES et al., 2014) não

descrevemos alterações características de tecidos epiléticos, como a excitabilidade neuronal ou astrogliose reativa em tecidos hipocampus, ou ainda crises espontâneas (para uma revisão ver KANDRATAVICIUS et al., 2014).

As sugestões acerca da origem da correlação entre mecanismos envolvidos na diminuição das potências de teta em CA1 e a incidência de IEDs são baseados principalmente em evidências da literatura, analisando os efeitos de diferentes modelos de ELT sobre circuitos oscilatórios hipocampus/extrahipocampus responsáveis pela coordenação das oscilações teta. Nossos resultados são relativos apenas às oscilações locais em CA1, enquanto que para determinar quais mecanismos estão engajados tanto na diminuição de teta como na incidência de IEDs seriam necessários registros dos vários componentes dos circuitos septo-hipocampo-entorrinal, assim como uma análise histológica para verificar alterações celulares em diferentes instâncias deste circuito, como a diminuição de projeções GABAérgicas do septo-medial ao hipocampo (COLOM et al., 2006) e também alterações no giro denteado (FRORIEP et al., 2012) e nas projeções entre o CE e Hipocampo (INOSTROZA et al., 2013; LAURENT et al., 2015; JANZ et al., 2017).

Outra limitação nas considerações sobre a diminuição das potências de teta e as alterações morfológicas envolvidas se dá ao fato de que grande parte das caracterizações presentes na literatura são conduzidas durante tarefas comportamentais ou comportamentos exploratórios (INOSTROZA et al., 2013; LAURENT et al., 2015; LOPEZ-PIGOZZI et al., 2016), e não necessariamente durante períodos de sono REM, o que pode refletir como uma caracterização dos prejuízos durante o aprendizado, e não necessariamente na consolidação das memórias durante o sono. O melhor desempenho de animais epiléticos em tarefas dependentes do hipocampo através da estimulação elétrica do septo-medial em frequências de teta durante as tarefas comportamentais (LEE et al., 2017) confirmaria essa hipótese. Para verificar a influência dessa diminuição da potência durante o sono REM na ELT podemos propor intervenções semelhantes a (LEE et al., 2017), porém estimulando os circuitos osciladores em teta durante o sono REM pós-aprendizado.

O aumento da comodulação de fase-amplitude entre oscilações teta-gama durante o sono REM aparece como um dos principais achados de nosso trabalho. Para verificarmos de fato quais tipos de processos essa comodulação pode estar influenciando podemos propor experimentos induzindo perturbações nesse

acoplamento. Caso esse acoplamento esteja relacionado ao processo de epileptogênese, podemos dificultar a propagação dos efeitos num modelo de abrasamento elétrico, levando a um aumento do número de estímulos necessários para levar ao abrasamento completo.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho caracterizamos os efeitos comportamentais e eletrofisiológicos de um modelo de abrasamento rápido da BLA, reproduzindo os déficits cognitivos em um teste de reconhecimento de objetos e alterações nas oscilações durante o sono NREM observados em modelos tradicionais de abrasamento elétrico, como a substituição de *ripples* por IEDs e alterações no acoplamento hipocampo-cortical através da diminuição do intervalo entre ondas delta corticais geradas após IEDs.

Nossos resultados mostram que a incidência de IEDs durante a consolidação de memória está correlacionada à diminuição da densidade de potência de oscilações teta durante o sono REM. Uma hipótese plausível é que os possíveis mecanismos que podem levar a estas alterações eletrofisiológicas em conjunto envolvem tanto a alteração da atividade do septo-medial, capaz de induzir atividades epiléticas e a redução de oscilações teta no hipocampo (COLOM et al., 2006; BUTUZOVA; KITCHIGINA, 2008; GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2010; KITCHIGINA et al., 2013; ASTASHEVA; ASTASHEV; KITCHIGINA, 2015), como também a alteração morfológica de circuitos osciladores de teta intrahipocampais, levando à desincronização de teta e também à geração de IEDs (MA et al., 2006; INOSTROZA et al., 2013; LAURENT et al., 2015). Apesar de sugerirmos estes possíveis mecanismos nas alterações observadas durante o sono REM, nossos dados refletem eventos registrados apenas em CA1, não possibilitando uma delimitação refinada das circuitarias envolvidas nestes processos.

Além das alterações relacionadas aos processos de consolidação de memória, o sono REM também fornece informações sobre o processo de epileptogênese através do acoplamento de fase-amplitude entre oscilações teta e gama. O aumento do MI durante o sono após a aplicação dos protocolos de abrasamento sugere que a comodulação de fase-amplitude em teta-gama possa ser um marcador eletrofisiológico dos processos de epileptogênese. A correlação dos

valores médios de MI e os valores médios de AD durante os dias de aplicação do abrasamento pode indicar a dinâmica da epileptogênese sobre os mecanismos de consolidação de memória empregados durante o sono REM, complementando as evidências verificadas durante o sono NREM (BOWER et al., 2015, 2017).

Em conclusão, nossos achados ampliam a compreensão vigente sobre como alterações de oscilações cerebrais durante o sono, especialmente da fase REM, poderiam estar subjacentes a prejuízos de memória que ocorrem na ELT .

8 REFERÊNCIAS

ASTASHEVA, E.; ASTASHEV, M.; KITCHIGINA, V. Changes in the behavior and oscillatory activity in cortical and subcortical brain structures induced by repeated l-glutamate injections to the medial septal area in guinea pigs. **Epilepsy Research**, v. 109, p. 134–145, jan. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121114003015>>.

BARKER-HALISKI, M.; WHITE, H. S. Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 8, p. a022863, ago. 2015. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a022863>>.

BOWER, M. R. et al. Evidence for Consolidation of Neuronal Assemblies after Seizures in Humans. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 3, p. 999–1010, 21 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3019-14.2015>>.

BOWER, M. R. et al. Reactivation of seizure-related changes to interictal spike shape and synchrony during postseizure sleep in patients. **Epilepsia**, v. 58, n. 1, p. 94–104, jan. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/epi.13614>>.

BOYCE, R. et al. Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. **Science**, v. 352, n. 6287, p. 812–816, 13 maio 2016. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aad5252>>.

BRAGIN, A.; PENTTONEN, M.; BUZSÁKI, G. Termination of Epileptic Afterdischarge in the Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 7, p. 2567–2579, 1 abr. 1997. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.17-07-02567.1997>>.

BUTUZOVA, M. V.; KITCHIGINA, V. F. Repeated blockade of GABAA receptors in the medial septal region induces epileptiform activity in the hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 434, n. 1, p. 133–138, mar. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394008001183>>.

BUZSÁKI, G. Theta Oscillations in the Hippocampus. **Neuron**, v. 33, n. 3, p. 325–340, jan. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662730200586X>>.

BUZSÁKI, G. Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. **Hippocampus**, v. 25, n. 10, p. 1073–1188, out. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hipo.22488>>.

COLGIN, L. L. Theta–gamma coupling in the entorhinal–hippocampal system. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 31, p. 45–50, abr. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438814001639>>.

COLGIN, L. L. Rhythms of the hippocampal network. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 4, p. 239–249, 10 abr. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn.2016.21>>.

COLOM, L. V. et al. Septo-Hippocampal Networks in Chronically Epileptic Rats: Potential Antiepileptic Effects of Theta Rhythm Generation. **Journal of Neurophysiology**, v. 95, n. 6, p. 3645–3653, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00040.2006>>.

DIEKELMANN, S.; BORN, J. The memory function of sleep. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 114–126, 4 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn2762>>.

EBERT, U.; RUNDFELDT, C.; LÖSCHER, W. Development and Pharmacological Suppression of Secondary Afterdischarges in the Hippocampus of Amygdala-kindled Rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 732–741, abr. 1995. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.1995.tb00677.x>>.

EFRON, B. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. In: KOTZ, S.; JOHNSON, N. L. (Ed.). **Breakthroughs in Statistics: Methodology and Distribution**. New York, NY: Springer New York, 1992. p. 569–593.

FOFFANI, G. et al. Reduced Spike-Timing Reliability Correlates with the Emergence of Fast Ripples in the Rat Epileptic Hippocampus. **Neuron**, v. 55, n. 6, p. 930–941, set. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627307005879>>.

FRIARD, O.; GAMBA, M. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 7, n. 11, p. 1325–1330, 2016.

FRORIEP, U. P. et al. Altered theta coupling between medial entorhinal cortex and dentate gyrus in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 53, n. 11, p. 1937–1947, nov. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2012.03662.x>>.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, A. et al. Septo-hippocampal networks in chronic epilepsy. **Experimental Neurology**, v. 222, n. 1, p. 86–92, mar. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488609005032>>.

GELINAS, J. N. et al. Interictal epileptiform discharges induce hippocampal-cortical coupling in temporal lobe epilepsy. **Nature Medicine**, v. 22, n. 6, p. 641–648, 2016.

GODDARD, G. V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature**, v. 214, n. 5092, p. 1020–1, 3 jun. 1967. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6055396>>.

GROSMARK, A. D. et al. REM Sleep Reorganizes Hippocampal Excitability. **Neuron**, v. 75, n. 6, p. 1001–1007, set. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627312007520>>.

GULYÁS, A. I.; FREUND, T. T. Generation of physiological and pathological high frequency oscillations: the role of perisomatic inhibition in sharp-wave ripple and interictal spike generation. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 31, p. 26–32, abr. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438814001573>>.

HAMED, K. H.; RAMACHANDRA RAO, A. A modified Mann-Kendall trend test for autocorrelated data. **Journal of Hydrology**, v. 204, n. 1–4, p. 182–196, jan. 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002216949700125X>>.

HERMANN, B. P. et al. Growing up with epilepsy: A two-year investigation of cognitive development in children with new onset epilepsy. **Epilepsia**, v. 49, n. 11, p. 1847–1858, nov. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2008.01735.x>>.

HOLMES, G. L. Cognitive impairment in epilepsy: the role of network abnormalities. **Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape**, v. 17, n. 2, p. 101–16, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905906>>.

INOSTROZA, M. et al. Specific Impairment of “What-Where-When” Episodic-Like Memory in Experimental Models of Temporal Lobe Epilepsy. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 45, p. 17749–17762, 6 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0957-13.2013>>.

JANZ, P. et al. Synaptic Remodeling of Entorhinal Input Contributes to an Aberrant Hippocampal Network in Temporal Lobe Epilepsy. **Cerebral Cortex**, v. 27, n. 3, p. 2348–2364, 1 mar. 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cercor/article/27/3/2348/3056317>>.

JIANG, Y. et al. Abnormal hippocampal functional network and related memory impairment in pilocarpine-treated rats. **Epilepsia**, v. 59, n. 9, p. 1785–1795, set. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/epi.14523>>.

JIRUSKA, P. et al. Epileptic high-frequency network activity in a model of non-lesional temporal lobe epilepsy. **Brain**, v. 133, n. 5, p. 1380–1390, maio 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awq070>>.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Psychiatric Comorbidities in Temporal Lobe Epilepsy: Possible Relationships between Psychotic Disorders and Involvement of Limbic Circuits. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 4, p. 454–466, dez. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1516444612000396>>.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 10, p. 1693–705, 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25228809>>.

KITCHIGINA, V. et al. Disturbances of septohippocampal theta oscillations in the epileptic brain: Reasons and consequences. **Experimental Neurology**, v. 247, p. 314–327, set. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488613000423>>.

KITCHIGINA, V. F.; BUTUZOVA, M. V. Theta activity of septal neurons during different epileptic phases: The same frequency but different significance? **Experimental Neurology**, v. 216, n. 2, p. 449–458, abr. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488609000065>>.

LAURENT, F. et al. Proximodistal Structure of Theta Coordination in the Dorsal Hippocampus of Epileptic Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 11, p. 4760–4775, 18 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4297-14.2015>>.

LEE, D. J. et al. Stimulation of the medial septum improves performance in spatial learning following pilocarpine-induced status epilepticus. **Epilepsy Research**, v. 130, p. 53–63, fev. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121117300116>>.

LI, L. et al. Extrahippocampal high-frequency oscillations during epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 59, n. 4, p. e51–e55, abr. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/epi.14041>>.

LISMAN, J.; BUZSAKI, G. A Neural Coding Scheme Formed by the Combined Function of Gamma and Theta Oscillations. **Schizophrenia Bulletin**, v. 34, n. 5, p. 974–980, 21 jul. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/schizophreniabulletin/article-lookup/doi/10.1093/schbul/sbn060>>.

LISMAN, J. E.; IDIART, M. A. Storage of 7 +/- 2 short-term memories in oscillatory subcycles. **Science (New York, N.Y.)**, v. 267, n. 5203, p. 1512–5, 10 mar. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7878473>>.

LISMAN, J. E.; JENSEN, O. The Theta-Gamma Neural Code. **Neuron**, v. 77, n. 6, p. 1002–1016, mar. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627313002316>>.

LOPEZ-PIGOZZI, D. et al. Altered Oscillatory Dynamics of CA1 Parvalbumin Basket Cells during Theta-Gamma Rhythmopathies of Temporal Lobe Epilepsy. **eNeuro**, v. 3, n. 6, 22 nov. 2016. Disponível em: <<http://eneuro.org/cgi/doi/10.1523/ENEURO.0284-16.2016>>.

MA, D. L. et al. Reorganization of CA3 area of the mouse hippocampus after pilocarpine induced temporal lobe epilepsy with special reference to the CA3-septum pathway. **Journal of Neuroscience Research**, v. 83, n. 2, p. 318–331, 1 fev. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.20731>>.

MAINGRET, N. et al. Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 959–964, 16 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn.4304>>.

MELBOURNE CHAMBERS, R. et al. Cognition, academic achievement, and epilepsy in

school-age children: A case–control study in a developing country. **Epilepsy & Behavior**, v. 33, p. 39–44, abr. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525505014000389>>.

MIYAWAKI, H.; DIBA, K. Regulation of Hippocampal Firing by Network Oscillations during Sleep. **Current Biology**, v. 26, n. 7, p. 893–902, abr. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982216300768>>.

MORALES, J. C. et al. A new rapid kindling variant for induction of cortical epileptogenesis in freely moving rats. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, 23 jul. 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00200/abstract>>.

MUMBY, D. G. Hippocampal Damage and Exploratory Preferences in Rats: Memory for Objects, Places, and Contexts. **Learning & Memory**, v. 9, n. 2, p. 49–57, 1 mar. 2002. Disponível em: <<http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.41302>>.

MUSTO, A. E.; SAMII, M. S.; HAYES, J. F. Different phases of afterdischarge during rapid kindling procedure in mice. **Epilepsy Research**, v. 85, n. 2–3, p. 199–205, ago. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121109000722>>.

NAKAZONO, T. et al. Gamma oscillations in the entorhinal-hippocampal circuit underlying memory and dementia. **Neuroscience Research**, v. 129, p. 40–46, abr. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168010217306570>>.

PATEL, J. et al. Traveling Theta Waves along the Entire Septotemporal Axis of the Hippocampus. **Neuron**, v. 75, n. 3, p. 410–417, ago. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627312006666>>.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition by. **Academic press**, v. 170, p. 547612, 2006.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. after-discharge threshold. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 32, n. 3, p. 269–279, mar. 1972a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0013469472901769>>.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 32, n. 3, p. 281–294, mar. 1972b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0013469472901770>>.

ROUX, L. et al. Sharp wave ripples during learning stabilize the hippocampal spatial map. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 6, p. 845–853, 10 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.4543>>.

SCHEFFER-TEIXEIRA, R.; TORT, A. B. L. Unveiling Fast Field Oscillations through Comodulation. **Eneuro**, v. 4, n. 4, p. ENEURO.0079-17.2017, 2017. Disponível em: <<http://eneuro.sfn.org/lookup/doi/10.1523/ENEURO.0079-17.2017>>.

SHUMAN, T.; AMENDOLARA, B.; GOLSHANI, P. Theta Rhythmpathy as a Cause of Cognitive Disability in TLE. **Epilepsy Currents**, v. 17, n. 2, p. 107–111, mar. 2017. Disponível em:

<<http://epilepsycurrents.org/doi/10.5698/1535-7511.17.2.107>>.

SIEGLE, J. H. et al. Open Ephys: an open-source, plugin-based platform for multichannel electrophysiology. **Journal of Neural Engineering**, v. 14, n. 4, p. 045003, 1 ago. 2017. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/1741-2552/14/i=4/a=045003?key=crossref.72f4c42751bd1cca996f430a5a7a3758>>.

SMITH, P. D. et al. Seizures, not hippocampal neuronal death, provoke neurogenesis in a mouse rapid electrical amygdala kindling model of seizures. **Neuroscience**, v. 136, n. 2, p. 405–415, jan. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452205008067>>.

STALEY, K. J. Neurons Skip a Beat during Fast Ripples. **Neuron**, v. 55, n. 6, p. 828–830, set. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627307006733>>.

SUURMEIJER, T. P. B. M.; REUVEKAMP, M. F.; ALDENKAMP, B. P. Social Functioning, Psychological Functioning, and Quality of Life in Epilepsy. **Epilepsia**, v. 42, n. 9, p. 1160–1168, 12 jan. 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1528-1157.2001.37000.x>>.

TAXIDIS, J. et al. Local Field Potentials Encode Place Cell Ensemble Activation during Hippocampal Sharp Wave Ripples. **Neuron**, v. 87, n. 3, p. 590–604, ago. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627315006364>>.

TORT, A. B. L. et al. Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 49, p. 20942–20947, 8 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0911331106>>.

TORT, A. B. L. et al. Measuring Phase-Amplitude Coupling Between Neuronal Oscillations of Different Frequencies. **Journal of Neurophysiology**, v. 104, n. 2, p. 1195–1210, ago. 2010. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00106.2010>>.

WARBURTON, E. C.; BROWN, M. W. Neural circuitry for rat recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 285, p. 131–139, maio 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432814006512>>.

WELCH, P. The use of fast Fourier transform for the estimation of power spectra: A method based on time averaging over short, modified periodograms. **IEEE Transactions on Audio and Electroacoustics**, v. 15, n. 2, p. 70–73, jun. 1967. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/1161901>>.

WHELAN, C. D. et al. Structural brain abnormalities in the common epilepsies assessed in a worldwide ENIGMA study. **Brain**, v. 141, n. 2, p. 391–408, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/brain/article/141/2/391/4818311>>.

WHO. **Epilepsy - World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>>.

WINSLOW, B. D.; TRESKO, P. A. Quantitative analysis of the tissue response to chronically implanted microwire electrodes in rat cortex. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1558–1567, mar. 2010.

Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209012770>>.